



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**AMFETAMİN TİPİ STİMÜLANLARIN
İDRARDA ANALİZİNE YÖNELİK
KATI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Rukiye ASLAN

Madde Bağımlılığı Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**AMFETAMİN TİPİ STİMÜLANLARIN
İDRARDA ANALİZİNE YÖNELİK
KATI FAZ MİKROEKSTRAKSİYON YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Rukiye ASLAN

Danışman(lar)
Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR
Doç. Dr. Hasan ERTAŞ

Madde Bağımlılığı Anabilim Dalı
Madde Bağımlılığı Doktora Programı

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR

(Danışman)

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hasan ERTAŞ

Üye : Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ

Üye : Doç. Dr. Nebile DAĞLIOĞLU

Üye : Doç. Dr. İsmail Özgür CAN

Üye : Doç. Dr. Levent PELİT

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ender ŞENOL

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:14.07.2021.....

Önsöz

Kimya Bölümü Lisans öğrenimimin son sınıfındayken Analitik Toksikoloji seçmeli dersini aldığımda hayatımın bu yöne evrileceği konusunda en ufak bir fikrim bile yoktu. Toksikolojide olduğu gibi, hayatta da her şeyin faydalı ve faydasız hale gelmesinin doza bağımlı olduğu bilgisini bu denli hayatın içinde uygulayabileceğim bir bilim alanı oldu... Öyle ki geriye dönüp baktığımda kimya alanı ile birleştirip, harmanlayabileceğim kendime daha uygun bir alan bulamazmışım diyorum. Tesadüf gibi görünen ama aslında emin adımlarla başlayan bu yolculuk, doktora eğitimim ile daha da perçinlenmiş oldu. Hem ders aşaması hem de laboratuvar aşaması ile bambaşka bir vizyon kazandırdı. Özellikle deneylerde yaşanan sıkıntılar ve bu sorunlara bulunması gereken makul çözümler analitik bakış açımı daha da geliştirdi. Bu cümleleri kurabilmek; sarf edilen emeklerin, yüzyılda bir denk gelen COVID-19 pandemisinde laboratuvarında geçen uzunca saatlerin ve alınan güzel sonuçların eseridir.

Geçmişte olduğu gibi günümüzde katlanarak artan bir sorun haline gelen madde kullanımının saptanmasında adli toksikolojinin büyük rolü olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Bu doktora tez çalışması kapsamında hiçbir çözgen kullanmadan geliştirilen katı faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi alana birçok yönüyle katkı sağlayacaktır. Literatürde birçok kritik noktadan bahsedilmemesi gerçeğinin zorluklarıyla baş edebilmek, yöntemi geliştirirken yaşanan zorluklardan belki de en önemlisi olmuştur. Bu bağlamda bu doktora tezi, Amfetamin Tipi Stimülanların SPME yöntemi ile analizinde nelerin yapılması gerektiğine ışık tutacağı gibi nelerin yapılmaması gerektiği konusunda da yol gösterici olacaktır. Bu tezin önsözü zorlu ama bir o kadar da öğretici olan doktora yolculuğunun sonuna gelindiğini gösterse de aslında öğrenmenin hiçbir zaman bitmeyeceği bilincindeyim. Bundan sonraki öğrenme sürecimde Konfüçyüs'ün *“Düşünmeden öğrenmek faydasız, öğrenmeden düşünmek tehlikelidir”* sözü hep aklımda olacaktır.

İzmir, 14.07.2021

Rukiye ASLAN (DÖĞER)

Özet

Amfetamin Tipi Stimülanların İdrarda Analizine Yönelik

Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi

Madde kullanımı dünyada olduğu gibi ülkemizde de gittikçe artmaktadır ve tüm boyutlarıyla ortaya konması gereken bir konudur. Amfetamin Tipi Stimülanlar (ATS) dünya genelinde esrardan sonra en çok suistimal edilen güçlü merkezi sinir sistemi uyarıcılarıdır. Bu maddeleri kullananların saptanması, dolayısıyla toksikolojik analizleri madde kullanımı ile mücadelede büyük bir yer tutmaktadır.

ATS'lerin analizinde sıklıkla kullanılan idrar ve kan gibi biyolojik materyallerde ilgili analiti saptayabilmek için hızlı, temiz ve uygun ön işlem (ekstraksiyon) prosedürlerinin uygulanması önemlidir. Günümüze kadar birçok analitik yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte daha az çözgenin harcandığı, yeşil çevreye katkıda bulunan ve küçük örnek hacimlerinde çalışma imkânı sağlayan mikroekstraksiyon yöntemleri üzerine yoğunlaşmaya başlanmıştır. 1990'ların başında geleneksel örnek hazırlamadaki bazı dezavantajları gidermek, yerinde (on-site) analize olanak sağlamak vb. amaçlarla katı faz mikroekstraksiyon yöntemi (SPME) analitik uygulamaya sokulmuştur. Fiber tip SPME tekniği, günümüze kadar en çok kullanılan SPME yaklaşımı olmaya devam etmektedir. Uygun fiber yardımıyla çözücü kullanılmadan yapılan bu teknik; sıvıdan bileşenleri ya tepe boşluğundan (headspace) ya da sıvı içerisine daldırarak doğrudan ekstrakte edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu tez çalışmasında, kromatografik ayırma tekniklerinden yararlanılarak ATS'lerden amfetamin (AMP), metamfetamin (MET), 3,4- metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4- metilendioksimetamfetamin (MDMA,ekstazi)'nin idrarda hassas ve güvenilir tayini için SPME yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ticari olarak satılan fiberlerden uygun olan Polidimetilsiloksan/Divinilbenzen (PDMS/DVB) fiberi ile yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem kemometrik olarak optimize edildikten sonra valide edilmiştir. Nanomalzemeler kullanılarak elektrokimyasal polimerizasyonla kaplama yapılarak laboratuvar tipi fiberler oluşturulmuştur. Oluşturulan bu fiberler kullanılarak ticari olarak alınan fiberle valide edilen yöntem ATS'lerin idrarda analizinde uygulanmaya çalışılmıştır.

Geliştirilen üst boşluklu (head space) SPME yönteminde hiçbir çözügen kullanılmamış olup, yeşil çevreye büyük katkı sağlayan bir yöntem oluşturulmuştur. Ancak, çalışma kapsamında yöntem geliştirme kısmında yaşanan en büyük sıkıntı fiberin türevlendirici nedeniyle soyulması olmuş ve fiber çok az tekrarlar kullanılabilmektedir. Literatürlerde genelde kullanılan türevlendirici reaktiflerden AA, PFPA ve TFA'nın etkinlikleri karşılaştırılmış ve TFA ile daha güzel sonuçlar elde edilmiştir. Plakett-Burman tasarımı sonrası regresyon analizinde adsorpsiyon süresi, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme süresinin en etkili faktörler olduğu belirlenmiştir. Bu faktörlerin optimize edilmesiyle en iyi sonuçlar 10 dk. adsorpsiyon süresinde, 80⁰C türevlendirme sıcaklığında ve 1 dk. türevlendirme süresinde elde edilmiştir. Kemometrik olarak optimize edilen yöntem; seçicilik, kesinlik, doğruluk, belirtme alt sınırı (LOD), saptama alt sınırı (LOQ), doğrusalılık, duyarlılık, çalışma aralığı, taşınma etkisi (carry over) ve matris etkisi parametreleri yönünden valide edilmiştir.

Nanoteknolojik gelişmeler sayesinde ayırma bilimi alanında maddelerin eser analizi için yeni sorbentler olarak karbon nanotüpler (CNT) kullanılmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvar tipi fiber elde edebilmek için monomer olarak pirol varlığında MWCNT, MWCNT-COOH, azot-katkılı MWCNT, grafen ve nanoselüloz ayrı ayrı elektropolimerizasyon yöntemiyle çelik tele kaplanmıştır. Ancak, geliştirilen SPME yöntemi, laboratuvar tipi fiberlere uygulandığında ATS'leri ait bir analit piki saptanamamıştır. Kısıtlı imkanlar nedeniyle nanomalzemelerle yapılan çalışmalar daha ileri aşamalara götürülememiştir.

Bu doktora tezi ile ATS'lerin analizi için çevreye duyarlı ve hiç çözügenin kullanılmadığı, kısa sürede eş zamanlı ekstraksiyona olanak sağlayan SPME yöntemi geliştirilmiştir. Türevlendirme basamağının fiberlere verdiği zarar somut olarak gösterilmiştir. SPME yöntemi birçok alanda kullanılmasına rağmen adli toksikoloji alanında kullanımı kısıtlıdır. Bu çalışma ile geliştirilen yöntem rutin analize olanak sağlamaktadır. Özellikle otomatize edilebilirliğiyle kullanım alanı kısıtlılıktan çıkıp, genişleyebilmektedir.

Anahtar Kelimeler; Amfetamin Tipi Stimülanlar; Katı Faz Mikro Ekstraksiyon Yöntemi; İdrar; Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi; Nanomalzeme; Elektropolimerizasyon.

Abstract

Development Solid Phase Microextraction Method for Analysis of Amphetamine Type Stimulants in Urine

Substance use is increasing in our country as well as in the world, and it is an issue that needs to be addressed in all its dimensions. Amphetamine-type stimulants (ATS) are the most abused potent central nervous system stimulants worldwide after cannabis. Identification substance users, and therefore their toxicological analysis, has a great place in the anti drug effort.

It is important to apply fast, clean and appropriate pretreatment (extraction) procedures in order to detect the relevant analyte in biological materials such as urine and blood, which are frequently used in the analysis of ATs. Although many analytical methods have been developed to date, it has begun to focus on microextraction methods that use less solvent, contribute to a green environment and allow working in small sample volumes. In the early 1990s, it was aimed to overcome some of the disadvantages of traditional sample preparation, to allow on-site analysis, etc. for these purposes, the solid phase microextraction method (SPME) has been put into analytical application. The fiber type SPME technique remains the most widely used SPME approach to date. This technique is made without the use of solvents with the help of suitable fiber and based on the principle of directly extracting the components from the liquid either from the headspace or by immersing them in the liquid. In this thesis, SPME method is developed for the sensitive and reliable determination of amphetamine (AMP), methamphetamine (MET), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) from ATs in urine by using chromatographic separation techniques. The method was developed with suitable Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber from commercially available fibers. The developed method was validated after being optimized chemometrically. Laboratory type fibers were formed by coating with electrochemical polymerization using nanomaterials. Using these fibers, the method validated with commercially available fiber has been tried to be applied in the analysis of ATs in urine.

No solvent was used in the developed head space SPME method, and a method that greatly contributed to the green environment was created. However, the biggest problem experienced in the method development part of the study was the peeling of the fiber due to the derivatization and the fiber could be used with very little repetition. The efficiency of AA, PFPA and TFA, which are generally used in the literature, were compared and better results were obtained with TFA. It was determined that adsorption time, derivatization temperature and derivatization time were the most effective factors in the regression analysis after Plackett-Burman design. The best results were obtained in 10 min. adsorption time, 80°C derivatization temperature and 1 min. derivatization time. Chemometrically optimized method was validated for selectivity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity, sensitivity, working range, carry over, and matrix effect parameters.

Thanks to nanotechnological developments, carbon nanotubes (CNT) are used as new sorbents for trace analysis of substances in the field of separation science. In this study, in the presence of pyrrole as monomer, MWCNT, MWCNT-COOH, nitrogen-doped MWCNT, graphene and nanocellulose were coated separately on steel wire by electropolymerization method in order to obtain laboratory type fiber. However, when the developed SPME method was applied to laboratory type fibers, no analyte peak of ATS could be detected. Due to limited opportunities, studies with nanomaterials could not be taken to further stages.

With this doctoral thesis, the SPME method was developed for the analysis of ATSs, which was environmentally friendly, did not use any solvent, and allowed simultaneous extraction in a short time. The damage done by the derivatization step to the fibers was concretely demonstrated. Although the SPME method is used in many fields, its use in forensic toxicology is limited. The method developed in this study allows routine analysis. Especially with its automatizability, the usage area can get out of the limitation and expand.

Keywords; Amphetamine-Type Stimulants; Solid Phase Microextraction Method; Urine; Gas Chromatography-Mass Spectrometry; Nanomaterial; Electropolymerization.

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Grafikler Dizini	XII
Kısaltma Listesi	XIII
Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Amfetamin Tipi Stimülanlar (ATS)	4
2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) Yöntemi.....	5
2.2.1. SPME Çeşitleri	6
2.2.2. Piyasada Bulunan Ticari Fiberler	8
2.3. Nanomalzemeler	9
2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon	12
3. Gereç ve Yöntem	14
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	15
3.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Koşulları	16
3.3. PDMS-DVB Ticari SPME Fiberi ile Yöntem Geliştirme	18
3.3.1. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonu	22
3.3.2. Yöntem Validasyonu	24
3.4. Farklı Nanomalzemelerle Elektrokimyasal Kaplama İşlemi.....	24
3.4.1. Paslanmaz Çelik Telin Hazırlanması	24
3.4.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon	25
3.4.3. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)	26

3.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	26
4. Bulgular.....	27
4.1. PDMS-DVB Ticari SPME Fiberi ile Yöntem Geliştirmeye Ait Veriler	27
4.1.1. Türevlendirme İşlemi Sorunsalı	27
4.1.2. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonuna Ait Veriler	33
4.1.2.1. Plakett-Burman Tasarımı	33
4.1.3. Yöntem Validasyonuna Ait Veriler	38
4.1.3.1. Seçimlilik.....	38
4.1.3.2. Doğruluk, Gerçeklik ve Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	42
4.1.3.3. Doğrusallık (Linearite)	47
4.1.3.4. Çalışma Aralığı.....	49
4.1.3.5. Duyarlılık	50
4.1.3.6. Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection, LOD) ve Saptama Alt Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)	50
4.1.3.7. Matris Etkisi.....	51
4.1.3.8. Taşınma (Carry over)	52
4.1.4. Farklı Nanomalzemelerle Yapılan Elektrokimyasal Kaplama İşlemi ile Elde Edilen Laboratuvar Tipi Fiberlere Ait Veriler	52
4.1.4.1. Elektrokimyasal Polimerizasyon Verileri	52
4.1.4.2. TGA Verileri.....	55
4.1.4.3. SEM Analizi Verileri	57
4.1.4.4. Farklı Nanomalzemelerle Kaplaması Yapılan Laboratuvar Tipi Fiberlerin Valide edilen SPME Yöntemi ile Uygulanması.....	60
Tartışma	63
Sonuç ve Öneriler.....	68
Kaynaklar	69
Ekler	79
Teşekkür	82
Özgeçmiş	83

Tablolar Dizini

Tablo 1. Amfetamin Tipi Stimülanların Fizikokimyasal Özellikleri (Cody, 2005).....	5
Tablo 2. SPME yöntemi ile yapılan ATS'lerin analizine ilişkin literatür özeti.....	11
Tablo 3. GC-MS için optimum olarak belirlenen çalışma koşulları	17
Tablo 4. GC-MS ile analiz edilen analitler için kütle/yük (m/z) oranları	18
Tablo 5. Plakett-Burman jeneratörleri.....	24
Tablo 6. Elektrokimyasal polimerizasyon koşulları	26
Tablo 7. Plakett-Burman tasarımında kullanılan 7 faktör ve min, max değerleri.....	33
Tablo 8. 7 Faktörlü Plakett-Burman deney tasarımı	33
Tablo 9. 7 Faktörlü Plakett-Burman deney tasarımı değerleri	34
Tablo 10. Plakett-Burman deneyleri sonrası analitlere ait elde edilen alan değerleri	34
Tablo 11. Amfetamine ait regresyon analizi sonuçları	35
Tablo 12. Metamfetamine ait regresyon analizi sonuçları	35
Tablo 13. MDA'ya ait regresyon analizi sonuçları	35
Tablo 14. MDMA'ya ait regresyon analizi sonuçları	36
Tablo 15. AMP, MET, MDA ve MDMA'ya ait gün-içi tekrarlanabilirlik verileri	43
Tablo 16. Amfetamine ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri.....	44
Tablo 17. Metamfetamine ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri.....	45
Tablo 18. MDA'ya ait günler-arası tekrarlanabilirlik veriler	46
Tablo 19. MDMA'ya ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri	47
Tablo 20. Analitlere ait LOD ve LOQ değerleri	51
Tablo 21. Analitlere ait matriks etkisi parametresi verileri.....	51

Şekiller Dizini

Şekil 1. Çeşitli SPME konfigürasyonları (Janusz Pawliszyn, 2012)	7
Şekil 2. SPME ünitesi bileşenleri (Janusz Pawliszyn, 2012)	7
Şekil 3. Fiber tip SPME yönteminde ekstraksiyon ve desorpsiyon basamakları (Ahmed et al., 2016; Barroso et al., 2012)	8
Şekil 4. Karbon nanotüpler (Jackson et al., 2013)	10
Şekil 5. Çalışma tasarımı.....	15
Şekil 6. Çalışmada kullanılan GC-MS cihazı	16
Şekil 7. Standart madde karışımının ön hazırlık aşaması	17
Şekil 8. Deneylerde kullanılan PDMS-DVB ticari SPME fiberi	18
Şekil 9. SPME yöntemi çalışma şeması.....	19
Şekil 10. Fiberin şartlandırılması	19
Şekil 11. Geliştirilen SPME yönteminde adsorpsiyon aşaması	21
Şekil 12. Geliştirilen SPME yönteminde türevlendirme aşaması	21
Şekil 13. Geliştirilen SPME yönteminde desorpsiyon aşaması	22
Şekil 14. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi tasarımı	25
Şekil 15. Türevlendirme işlemi sonrası soyulan PDMS-DVB SPME fiberi	27
Şekil 16. PFPA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram	27
Şekil 17. TFA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram	28
Şekil 18. AA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram	28
Şekil 19. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda amfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum	29
Şekil 20. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda metamfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum	30
Şekil 21. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda MDA analitine ait kromatogram ve spektrum	31
Şekil 22. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda MDMA analitine ait kromatogram ve spektrum.....	32
Şekil 23. Kör idrar örneğine ait kromatogram ve spektrum.....	39

Şekil 24. SPME yöntemiyle analiz edilen amfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum.....	39
Şekil 25. SPME yöntemiyle analiz edilen amfetamin-d6 analitine ait kromatogram ve spektrum.....	40
Şekil 26. SPME yöntemiyle analiz edilen metamfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum	40
Şekil 27. SPME yöntemiyle analiz edilen MDA analitine ait kromatogram ve spektrum.....	41
Şekil 28. SPME yöntemiyle analiz edilen MDMA analitine ait kromatogram ve spektrum.....	41
Şekil 29. PPy- MWCNT'ye ait voltammogram	52
Şekil 30. PPy-MWCNT-COOH'a ait voltammogram.....	53
Şekil 31. PPy-Azot Katkılı-MWCNT'ye ait voltammogram	53
Şekil 32. PPy-Grafen'e ait voltammogram	54
Şekil 33. PPy-Nanoselüloz'a ait voltammogram	54
Şekil 34. PPy- MWCNT'ye ait TGA verileri	55
Şekil 35. PPy-MWCNT-COOH'a ait TGA verileri	55
Şekil 36. PPy-Azot Katkılı-MWCNT'ye ait TGA verileri.....	56
Şekil 37. PPy-Grafen'e ait TGA verileri.....	56
Şekil 38. PPy-Nanoselüloz'a ait TGA verileri.....	57
Şekil 39. PPy-MWCNT'ye ait SEM görüntüsü.....	57
Şekil 40. PPy-MWCNT-COOH'a ait SEM görüntüsü	58
Şekil 41. PPy-Azot katkı-MWCNT'ye ait SEM görüntüsü	58
Şekil 42. PPy-Grafene ait SEM görüntüsü.....	59
Şekil 43. PPy- Nanoselüloz'a ait SEM görüntüsü	59
Şekil 44.PPy-MWCNT fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum	60
Şekil 45. PPy-MWCNT-COOH fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum.....	61
Şekil 46. PPy-Azot Katkılı-MWCNT fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum	61
Şekil 47. PPy-Grafen fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum	62
Şekil 48. PPy-Nanoselüloz fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum.....	62

Grafikler Dizini

Grafik 1. Farklı adsorpsiyon sürelerinin etkisi.....	37
Grafik 2. Farklı türevlendirme sıcaklıklarının etkisi.....	37
Grafik 3. Farklı türevlendirme sürelerinin etkisi	38
Grafik 4. Amfetamine ait kalibrasyon eğrisi.....	48
Grafik 5. Metamfetamine ait kalibrasyon eğrisi	48
Grafik 6. MDA'ya ait kalibrasyon eğrisi	49
Grafik 7. MDMA'ya ait kalibrasyon eğrisi	49



Kısaltma Listesi

ATS	: Amfetamin Tipi Stimulanlar
AA	: Asetik anhidrit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ag/AgCl	: Gümüş /Gümüşklorür
AMP	: Amfetamin
ATS	: Amfetamin tipi stimulanlar
BAP	: Bilimsel Araştırma Projesi
C18	: Oktadesilsilan
CNT	: Karbon nanotüp
CV	: Döngüsel Voltammetri
CV	: Varyans katsayısı
CW/ DVB	: Karbowax/ Divinilbenzen
dk.	: Dakika
DOE	: Deney tasarımı (Design of Experiments)
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-FID	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HS-SPME	: Üst boşluklu (headspace) katı faz mikroekstraksiyon

iBCF	: İzobutil kloroformat
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LLE	: Sıvı-sıvı ekstraksiyon
LOD	: Belirtme alt sınırı
LOQ	: Saptama alt sınırı
M _A	: Moleküler ağırlık
MDA	: 3,4- metilendioksiamfetamin
MDMA	: 3,4- metilendioksimetamfetamin
MET	: Metamfetamin
mg	: Miligram
MS	: Kütle spektrometresi
MWCNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
MWCNT-COOH	: _COOH Fonksiyonlu Çok Katmanlı Karbon Nanotüp
m/z	: Kütle / yük oranı
ng	: Nanogram
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
N-doped MWCNT	: Azot Katkılı Çok Katmanlı Karbon Nanotüp
PA	: Poliakrilat
PB	: Plackett-Burman

PDMS	: Polidimetilsiloksan
PDMS/DVB	: Polidimetilsiloksan/divinilbenzen
PFPA	: Pentafloropropiyonik anhidrit
PPy	: Polipirol
Pt	: Platin
% R	: % Geri kazanım
R ²	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
% RSD	: % Bağlı standart sapma
SD	: Standart sapma
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
S/N	: Sinyal/gürültü
SPE	: Katı-faz ekstraksiyonu
SPME	: Katı Faz Mikroekstraksiyon
SWCNT	: Tek duvarlı karbon nanotüp
SWGTOX	: Scientific Working Group for Forensic Toxicology Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology
TFA	: Trifloroasetik anhidrit
TGA	: Termal gravimetrik analiz
µL	: Mikrolitre

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Madde kullanımı Türkiye’de diğer Avrupa ülkelerinde olduğu kadar yaygın görülmemekle birlikte tüm boyutları ve risk etmenleriyle birlikte ortaya konması gereken bir konudur. Amfetamin tipi stimülanlar (ATS) dünya genelinde esrardan sonra en çok suistimal edilen güçlü merkezi sinir sistemi uyarıcılarıdır. Düşük maliyetli, kolay ulaşılabilir olması gibi nedenlerle gençler ve yetişkinler arasında kullanımı artmaktadır. Kullanımın artmasıyla birlikte giderek artan ekonomik, sosyal ve sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır.

Madde kullanımı ile mücadelede bireyleri madde kullanımından uzak tutmayı hedefleyen stratejiler gündemdedir. Bu maddeleri kullananların saptanması, dolayısıyla toksikolojik analizleri büyük bir yer tutmaktadır. ATS’lerin analizinde sıklıkla kullanılan idrar ve kan gibi biyolojik materyallerde ilgili analiti saptayabilmek için hızlı, temiz ve uygun ön işlem (ekstraksiyon) prosedürlerinin uygulanması analitik aşamalarda önemlidir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), katı-faz ekstraksiyonu (SPE) gibi geleneksel yöntemler fazla miktarda çözücü veya örnek gerektiren, karmaşık ekstraksiyon adımları içeren, zaman alıcı tekniklerdir. Teknolojik gelişmeler doğrultusunda bu dezavantajların önüne geçebilmek için organik çözücü kullanımı az olan, otomatize edilebilir, basit ekstraksiyon basamaklarının olduğu mikroekstraksiyon yöntemlerine olan ilgiyi artırmıştır. 1990’ların başında Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi geliştirilmiştir. SPME yönteminde prensip olarak; örnek matriksi, örnek ile SPME fiber arasındaki dağılım esasına bağlı olarak ayrılmaktadır. Ticari olarak üretilen fiberlerin yanısıra laboratuvar ortamında da SPME fiberleri oluşturulabilmektedir. Birçok alanda uygulama alanı bulan SPME yöntemi ile ATS’lerin analizi ile ilgili ülkemizde yayın sayısı sınırlıdır. Bu tez kapsamında geliştirilen SPME yöntemi hem ATS’lerin idrarda hızlı, güvenilir ve doğru analizine olanak sağlayacak hem de literatüre katkıda bulunacaktır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Bu araştırmada “SPME yöntemi ATS’lerin idrarda doğru, güvenilir ve hassas tayinine olanak sağlar mı?” ve “nanomalzemeler kullanılarak elde edilen laboratuvar tipi SPME fiberler ATS’lerin analizine uygulanabilir mi?” sorularına yanıt bulunmaya çalışılmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

- İdrar suistimal edilen maddelerin tayini için kullanılan önemli bir matristir.
- İdrarda ATS’lerin analizi GC-MS veya LC-MS yöntemleri ile yapılabilmektedir.
- SPME yöntemi ATS’lerin seçimli, hassas, güvenilir ve duyarlı analizine olanak sağlamaktadır.
- ATS’lerin SPME yöntemi ile analizinde kullanılmak üzere sentezlenecek fiberler defalarca kez kullanılabilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan malzemelerin üzerinde belirtildiği üzere büyük oranda saf olduğu varsayılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma COVID-19 pandemisi döneminde yürütölmeye çalışılmıştır. Bu nedenle gerek malzemelerin temini aşamasında gerekse laboratuvarda yapılan deney aşamalarında büyük zorluklar yaşanmıştır. Çalışmanın diğeri bir sınırlılığını ise yurtdışından ithal edilen ticari fiberlerin türevlendirici ajan nedeniyle deforme olması (soyulması) oluşturmaktadır. Soyulma sorununun kaynağının bulunması için zaman harcanmış ve sonra da türevlendirici olduğu sonucuna varılmıştır. Türevlendirme işleminin yarattığı bu hasar nedeniyle daha ileri yapılabilecek deneyler yapılamamış, olabilecek en uygun şartlar oluşturulmaya çalışılmıştır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; yasadışı maddelerin analizinde, ilaçların tanımlanmasında ve miktar tayinlerinde en büyük rolü üstlenen kromatografik ayırma tekniklerinden yararlanılarak ATS’lerden amfetamin (AMP), metamfetamin (MET), 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA,ekstazi)’nin idrarda hassas ve güvenilir tayini için SPME yöntemi

geliştirmektir. Bu kapsamda ticari olarak satılan fiberlerden uygun olan Polidimetilsiloksan/Divinilbenzen (PDMS/DVB) fiberi ile yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem kemometrik olarak optimize edildikten sonra valide edilmiştir. Nanomalzemeler kullanılarak elektrokimyasal polimerizasyonla kaplama yapılarak laboratuvar tipi fiberler oluşturulmuştur. Oluşturulan bu fiberler kullanılarak ticari olarak alınan fiberle valide edilen yöntemle ATS'lerin idrarda analizinde uygulanmaya çalışılmıştır.



2. Genel Bilgiler

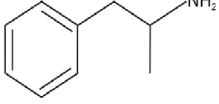
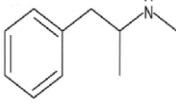
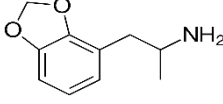
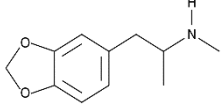
2.1. Amfetamin Tipi Stimülanlar (ATS)

Günümüzde amfetamin (AMP), metamfetamin (MET), 3,4- metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA,ekstazi) gibi amfetamin tipi stimülanlar kolay ulaşılması ve düşük maliyetli olması nedeniyle ergenler ve yetişkinler arasında sıklıkla kullanılmaktadır. Amfetamin, dekstroamfetamin, efedrin ve metamfetamini de içeren bu madde sınıfı ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında sentezlenmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında askerler bu maddeleri uyarıcı özellikleri için kullanmışlar ve savaştan sonra amfetamin kötüye kullanımı salgın boyutuna ulaşmıştır (Maisto et al., 2011). ATS'ler uzun süre uyanık kalmak amacıyla kullanılabildiği gibi narkolepsi, hiperaktivite bozukluğu, Parkinson hastalığı tedavisinde, eğlence, sosyalliği artırma vb. amaçlarla da kullanılabilmektedir (Australian Government Department of Health and Ageing, 2011).

Amfetamin tipi stimülanlar dünya genelinde esrardan sonra en çok suistimal edilen yasadışı maddelerdir (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2019). Kuzey ve Doğu Avrupa'da ele geçirilen maddeler arasında en yaygın olanlar amfetamin ve ekstazi (MDMA)'dır (Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi, 2018). 15 ile 34 yaşındaki yetişkinlerde ATS kullanımının yaşam boyu yaygınlığı ülkeler arasında % 0,1 ile % 9,1 arasında değişmektedir. 1,4 milyon (yani % 1,2) genç Avrupalı yetişkin insanın (15-34 yaş) geçen yıl amfetamin kullandığı ve 2,3 milyon (yani % 1,9) kişinin ise MDMA kullandığı bildirilmiştir (European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2020). Ülkemizde ise 2019 Türkiye Uyuşturucu Raporu'na göre; 15-34 yaş arasındaki kişilerin % 1,8'i geçen yıl esrarı ve % 0,2'si MDMA kullandığını bildirmiştir (European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2019).

ATS'lerin dekstro (d-) ve levo (l-) olmak üzere iki izomerik formu mevcuttur ve d-formu daha yüksek periferik semptomimetik aktiviteye sahip olan l-izomerine göre daha güçlü merkezi stimulant aktiviteye sahiptir. Yaygın bulunan halleri suda çözünebilen kristaller veya toz haldeki hidroklorür tuzlarıdır (Jenkins AJ., 2008). ATS'lerin fizikokimyasal özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1.Amfetamin Tipi Stimülanların Fizikokimyasal Özellikleri (Cody, 2005)

	Amfetamin (AMP)	Metamfetamin (MET)	3,4- Metilendioksi amfetamin (MDA)	3,4-Metilendioksi metamfetamin (MDMA)
				
	$C_9H_{13}N$ MA: 135,21 g/mol	$C_{10}H_{15}N$ MA: 149.237 g/mol	$C_{10}H_{13}NO_2$ MA: 179.219 g/mol	$C_{11}H_{15}NO_2$ MA: 193.246 g/mol
pKa	9.9	9.87	9.67	9.9
Kaynama Noktası	200-203 °C	212	398 -399 °C	155 °C
Erime Noktası	25 °C	170 °C	187-188 °C	147-148 °C
Buhar Basıncı (mm Hg, 25 °C)	1.8×10^{-3}	5.4×10^{-3}	1.69×10^{-3}	2.27×10^{-3}

Amfetamin gastrointestinal sistemden kolayca emilir. Etkiyi artırmak için burundan çekildiği ya da enjekte edildiği de olur. Kristal formunda metamfetaminin baz hali “crack” ismi verilen kokain formuna benzer şekilde sigara gibi içilebilmektedir. Amfetamin kan-beyin bariyerini efedrin ya da diğer tiramin gibi sempatomimetikaminlerden daha kolay geçer ve bu nedenle etkileri diğer aminlere göre daha kuvvetlidir. Amfetamin genellikle idrar ile değişmeden atılır ve atılım hızı idrar asitleştirildikçe artar. Amfetaminin plazma yarılanma ömrü 5-30 saat arasında değişebilir, idrar akışı ve idrar pH’ı bunu belirlemede önemlidir (Kaplan & Demir, 2014).

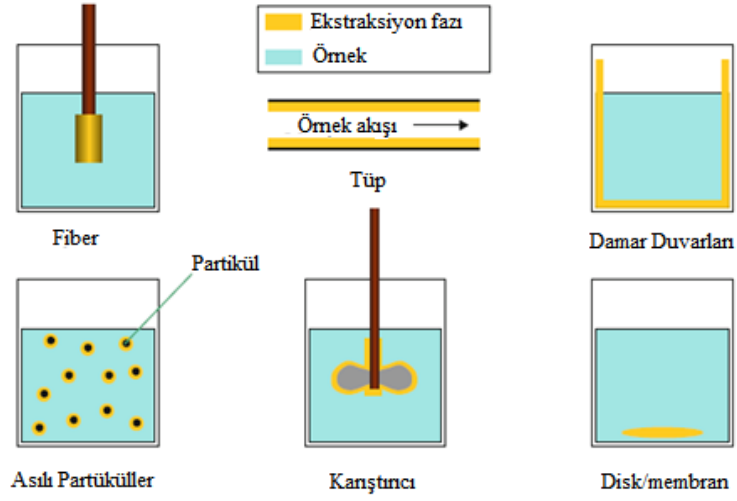
2.2. Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) Yöntemi

Yasadışı maddelerin ilgili yasal düzenlemeler doğrultusunda biyolojik ortamlarda belirlenmesini sağlayan uluslararası standartlarda geçerli olan analitik yöntemlerin gelişmesi, insan sağlığını tehdit eden risklerin tanımlanmasında ve onlardan korunmada son derece önem taşımaktadır. ATS’lerin analizinde sıklıkla kullanılan idrar ve kan gibi biyolojik materyallerde ilgili analiti saptayabilmek için hızlı, temiz

ve uygun ön işlem (ekstraksiyon) prosedürlerinin uygulanması analitik aşamalarda önemli yer tutmaktadır (Alsenedi & Morrison, 2018). Günümüze kadar birçok analitik yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte daha az çözgenin harcandığı, yeşil çevreye katkıda bulunan ve küçük örnek hacimlerinde çalışma imkânı sağlayan mikroekstraksiyon yöntemleri üzerine yoğunlaşmaya başlanmıştır. 1990'ların başında Pawliszyn ve ark. tarafından geleneksel örnek hazırlamadaki bazı dezavantajları gidermek, yerinde (on-site) analize olanak sağlamak vb. amaçlarla katı faz mikroekstraksiyon yöntemi (solid phase microextraction, SPME) analitik uygulamaya sokulmuştur (J. Pawliszyn., 1997). O zamandan beri SPME çevresel örneklerin (Ouyang & Pawliszyn, 2006a, 2006b; Tang & Isacson, 2008), gıda ürünlerinin (Câmara et al., 2006; Jeleń et al., 2013; Wardencki et al., 2004), adli örneklerin (Agius et al., 2010; Alizadeh et al., 2008; Duff et al., 2008; Lai et al., 2008; Pragst, 2007) ve farmasötik örneklerin (Musteata & Pawliszyn, 2007a, 2007b) analizi gibi birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

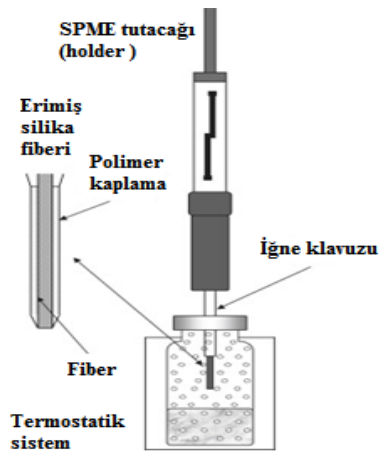
2.2.1. SPME Çeşitleri

SPME yönteminde, karmaşık örneklerden ilgilenilen hedef analitleri izole etmek ve yoğunlaştırmak için küçük hacimde bir polimerik ekstraksiyon fazı kullanılır. Kullanım kolaylığı, minimum organik çözücü tüketimi ve kısa örnek hazırlama sürelerine ek olarak, SPME küçük örnek miktarı gereksinimlerine, otomasyon kapasitesine ve kompleks yapıdaki örnekler için yüksek kaliteli nitel ve nicel analitik sonuçlar üretme özelliğine sahiptir (Ramos, 2012). Bu teknikte, katı bir destek üzerine dağılmış az miktarda ekstraksiyon fazı, iyi tanımlanmış bir süre boyunca örneğe maruz bırakılmaktadır. Bir yaklaşımda, örnek matrisi ve ekstraksiyon fazı arasında bir bölümlenme (partisyon) dengesine ulaşılmaktadır. Bu durumda, konveksiyon (ısı taşınımı) koşulları ekstrakte edilen miktarı etkilememektedir. İkinci bir yaklaşımda ise, kısa ön denge ekstraksiyon süreleri kullanılmaktadır. Ekstrakte edilen analit miktarı, konveksiyon / ajitasyon (çalkalama) sabitse zamanla ilişkilidir. Nicelleme (kantifikasyon), kaplamadaki zamanlanmış analit birikimine dayalı olarak gerçekleştirilebilmektedir. Şekil 1 open-bed (açık yatak) ekstraksiyon yaklaşımlarını içeren çeşitli SPME uygulamalarını göstermektedir (Janusz Pawliszyn, 2012).



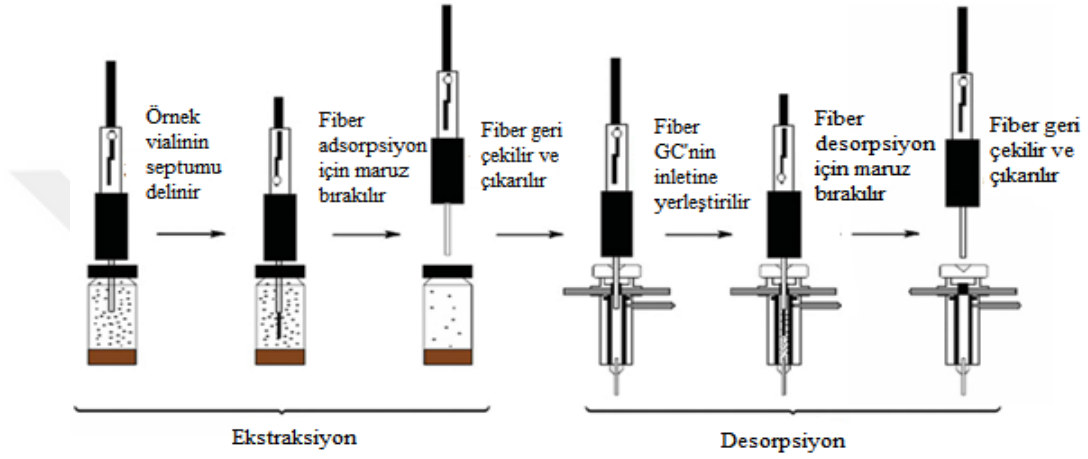
Şekil 1. Çeşitli SPME konfigürasyonları (Janusz Pawliszyn, 2012)

Fiber tip SPME tekniği, günümüze kadar en çok kullanılan SPME yaklaşımı olmaya devam etmektedir. Uygun fiber yardımıyla çözücü kullanılmadan yapılan bu teknik; sıvıdan bileşenleri ya tepe boşluğundan (headspace) ya da sıvı içerisine daldırarak doğrudan ekstrakte edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bir SPME ünitesi Şekil 2’de gösterildiği üzere bir enjektör (holder), katı faz (dolgu materyali) ile kaplı bir fiber ve fiber üzerinde hidrofobik veya hidrofilik karakterde destek materyalinden oluşmaktadır (Janusz Pawliszyn, 2012).



Şekil 2. SPME ünitesi bileşenleri (Janusz Pawliszyn, 2012)

SPME yönteminde sıcaklığın kontrol edildiği koşullarda analizi yapılacak olan örneğin içerdiği bileşenlerin asılı bulunan özel fibere geçmeleri (adsorpsiyon) sağlanmaktadır. Fibere geçen bileşenler doğrudan Gaz Kromatografisine (GC) gibi analiz sistemlerine enjekte edilmekte (desorpsiyon) ve bozulma ürünlerinin nitel ve nicel analizleri yapılmaktadır (Janusz Pawliszyn, 2012). Headspace modu, ekstraksiyon ve ardışık desorpsiyon (GC'ye) adımlarını içermektedir ve çözücülerle elüsyon adımını ortadan kaldırmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Fiber tip SPME yönteminde ekstraksiyon ve desorpsiyon basamakları (Ahmed et al., 2016; Barroso et al., 2012)

Bazı uçucu olmayan ve yarı uçucu analitlerin headspace ekstraksiyonunu mümkün kılan çeşitli türevlendirme ajanları bulunmaktadır. Etki mekanizması, analitin değişen polaritesine (aynı zamanda uçuculuğu da etkilemektedir) bağlıdır. Türevlendirme örnek matriksinde, SPME fiber kaplamasında ve GC enjektör portunda olmak üzere üç şekilde yapılabilir. Türevlendirme işlemi, polar analitleri daha az polar analoglarına dönüştürür, dolayısıyla kaplama/su veya kaplama/gaz bölüşüm katsayılarını artırır ve SPME verimliliğini ve yöntem hassasiyetini geliştirir (Pan & Pawliszyn, 1997).

2.2.2. Piyasada Bulunan Ticari Fiberler

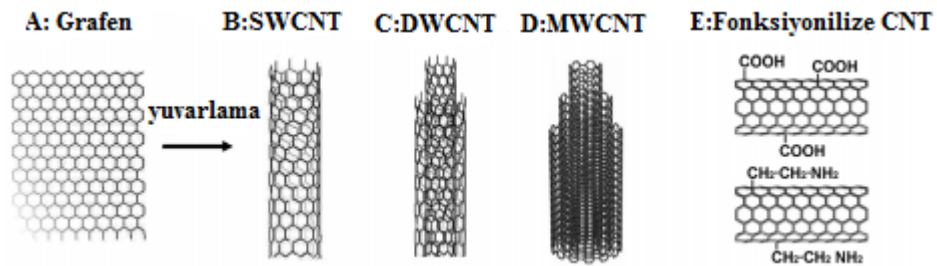
Piyasada çok çeşitli ticari olarak üretilen fiberler bulunmaktadır. Bu fiberler polar, semi-polar ve apolar olmak üzere üç temel kategoriye ayrılmaktadır. Fiber kaplamaların fizikokimyasal yapısı ve kalınlığı, analizin ekstraksiyon verimliliğini, seçiciliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen örnek matriksi ile ekstraksiyon fazı arasındaki analitlerin dağılımı üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Fiber seçiminde,

hedef bileşiklerin moleküler ağırlığı, polaritesi ve uçuculuğu dikkate alınmaktadır (Spietelun et al., 2010). Polidimetilsiloksan (PDMS), SPME'de yaygın olarak kullanılan apolar bir ekstraksiyon fazıdır ve 100, 65 ve 7 µm film kalınlığında farklı türleri bulunmaktadır. Polidimetilsiloksan / divinilbenzen (PDMS/ DVB) yarı polar kaplama olarak üretilirken, poliakrilat (PA) ve Karbowax/ Divinilbenzen (CW/ DVB) polar kaplamalara örnektir (Zoltan Mester et al., 2001; Zoltán Mester & Sturgeon, 2005). Kaplamaların diğer bir sınıflandırması, aktif fazın homojenliğine bağlıdır ve bunlardan biri homojen saf polimer kaplamalardır. PDMS ve PA, homojen kaplama örnekleridir. Bu kaplamaların organik çözücüler yoluyla stabilitesi, polimerlerin çapraz bağlanması (cross linking bonding) ile artırılmaktadır. İkinci tip kaplama, kısmen çapraz bağlı bir polimerik fazda gömülü gözenekli partiküllerdir. Bu kaplamalar homojen tipler kadar sağlam olmamakla birlikte daha seçicidir. Farklı kaplamaların birleşiminden oluşturulan fiberlerde (örn: PDMS/DVB ve PDMS/ Karboksen) kaplamaların gözenekliliği arttırılarak, fiberin toplam kapasitesi ve ekstraksiyon seçiciliği artırılmaktadır (J. Pawliszyn, 1999). SPME fiber kaplamaların çoğu sabit GC fazlarına dayalı olarak geliştirilmiş olmasına rağmen, son zamanlarda sıvı kromatografisi (LC) uygulamalarında nispeten polar ve apolar analitlerin ekstraksiyonu için bir oktadesilsilan (C18) fiber probu ticarileştirilmeye başlanmıştır (Sigma Aldrich, 2017).

2.3. Nanomalzemeler

Ticari olarak temin edilebilen fazların sayısı hala nispeten düşüktür ve neredeyse apolar veya polar olmayan bileşiklerle sınırlıdır. Bu dezavantaj, çalışma sıcaklıklarının sınırlandırılmasına ek olarak, çözücülerin ve numune bileşiminin kullanılması, bu umut verici tekniğin daha geniş bir uygulanabilirliğine izin veren yeni fiber kaplama materyallerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Souza Silva et al., 2013; Wang et al., 2012). Uygun fiber kaplama seçimi, SPME yöntemi geliştirmedeki en kritik adımlardan biri olduğundan, pekçok bilim ve teknoloji dalını içeren alanlarda yeni gelişmiş malzemeler üzerine araştırmalar yapılmaktadır (Augusto et al., 2010; Bagheri et al., 2012; Ho et al., 2011; J. Zeng, J. Chen, W. Chen, X. Huang, L. Chen, 2009). Nanomalzeme kullanan SPME tekniği, bazı nanomalzemelerin genel olarak iyi biyoyumluluğa sahip olduğu gösterildiğinden yöntemin etkinliğini artırmaktadır (Mohseni et al., 2014; Riahi-Zanjani et al., 2018).

Bu yeni nanomalzemeler arasında, ilgilenilen en önemli hedeflerden biri karbon nanotüplerdir (CNT). İlk olarak 1991 yılında Iijima tarafından bulunan CNT'ler, yarı çapları 1-100 nm arasında olan, analitik bilimlerde çok çeşitli uygulamaları ortaya çıkaran, yeni ve ilginç karbon nanomalzemesidir (Iijima & Ichihashi, 1993). CNT'ler, elektronik olarak aromatik bir delokalize sistemde binlerce karbon atomu içeren bir veya daha fazla grafen katmanının kesintisiz silindirleridir. Eşsiz tüp biçimli yapıları ve geniş uzunluk-çap oranları ve kimyasal, elektronik ve mekanik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir (Latrous El Atrache et al., 2016). CNT'lerin teknik özelliklerini ve uygulamalarını açıklayan çok sayıda bilimsel makale bulunmaktadır (De Volder et al., 2013; Guldi & Martín, 2010; Monthieux M, 202 C.E.). CNT'ler grafenin yuvarlanması ile bir tüp oluşturan tek bir haddelenmiş grafit lamelden (tek duvarlı karbon nanotüpler, SWCNT'ler) veya bir ortak eksen etrafında düzenlenmiş birkaç tek tüpten (çok duvarlı karbon nanotüpler, MWCNT'ler) oluşan iğne benzeri yapılardır (Augusto et al., 2010). Grafen, grafitin tek katmanlı halidir ve bilinen en üstün yüzey/ağırlık oranına sahip, dayanıklı malzemedir. Bu özellikleri nedeniyle 2010 yılında araştırmacılarına Nobel Fizik Ödülü kazandırmıştır. CNT'lerin yüzey özelliklerini değiştirmek için (örn. polar çözücüdeki (su) CNT dağılımını değiştirmek için) işlevsel gruplar ekleyerek yüzey modifikasyonu ile -COOH Fonksiyonlu Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (MWCNT-COOH), Azot Katkılı Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (N-doped MWCNT) gibi farklı fonksiyonolize CNT'ler oluşturulabilmektedir (Şekil 4). (Aziz-Zanjani & Mehdinia, 2014; Spietelun et al., 2010).



Şekil 4. Karbon nanotüpler (Jackson et al., 2013)

CNT'lerin, özellikle MWCNT'lerin ayırt edici özelliklerinden biri, geniş yüzey-hacim oranlarıdır. Hem hidrofobik hem de elektronik etkileşimler, CNT'lerin apolar, polar ve hatta iyonik türlerin ekstraksiyonuna başarıyla uygulanmasına izin veren analitlerin tutulmasına katkıda bulunmaktadır (Bagheri et al., 2011, 2012). Nanoselüloz ise; lignoselülozik hammadde kaynaklarından elde edilebilen ve fiziksel, kimyasal ve morfolojik özellikleri dolayısıyla elde edilen son ürünlere olumlu etkiler kazandıran ve orman ürünleri alanında bu potansiyeli ile büyük önem arz eden bir hammadde kaynağıdır.

SPME yöntemi ile yapılan ATS'lerin analizlerinden örnek olarak oluşturulan literatür özeti Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 2. SPME yöntemi ile yapılan ATS'lerin analizine ilişkin literatür özeti

Yıl-Ülke	Analitler, matriks	Teknik	Kullanılan Fiber Türü	Referans
2018 Çin	AMP, MA, MDMA, MDEA İdrar	HS-SPME, GC-MS	CNT kaplamalı fiber	(Song et al., 2018)
2018 İngiltere	AMP, MA, MDMA, sentetik katinonlar İdrar	SPME, GC-MS	C18, C18/SCX ve PDMS/DVB	(Alsenedi & Morrison, 2018)
2015 Hollanda	AMP, amitriptilin Kan	SPME, HPLC, LC-MS	C18/propilsulfonik it (C18/SCX), C18	(Peltenburg et al., 2015)
2015 Çin	MA, ketamin İdrar & kan	Magnetik SPME GC-MS	Okside edilmiş çok katmanlı karbon nanotüpler	(Zhang et al., 2015)
2015 Çin, Pakistan	AMP, MA İdrar & serum	Elektrokimyasal olarak güçlendirilmiş SPME GC-FTD	Sıralı Mezoporlu karbon (OMC)/Nafyon kaplıfiber	(Zeng et al., 2015)
2015 İran	AMP, MA İdrar & tam kan	Elektromembran SPME GC-FID	CNT fiber	(Rezazadeh et al., 2015)
2013 İspanya	AMP, MA, MDMA, MDEA İdrar & atık su	SPME, GC-MS	PDMS, PDMS-DVB, poliakrilat, CAR-PDMS	(Racamonde et al., 2013)
2013 Hollanda	AMP	SPME, HPLC	C18/SCX, PA, C18 (Ticari)	(Peltenburg et al., 2013)
2011 Çin, Güney Kore	AMP, MA İdrar	Elektrokimyasal olarak güçlendirilmiş SPME GC-FID	MWCNTs/Nafyon kaplı fiber (Modifiye, sentez) PA (Ticari)	(Zeng et al., 2011)
2009 ABD	AMP, MA İdrar	İyonik sıvı bazlı SPME GC-MS	İL-bazlı SPME fiber (Modifiye, sentez)	(He et al., 2009)

2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Elektroanalitik teknikler, akım, potansiyel veya yük gibi elektriksel büyüklüklerin ölçümleri ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkisi ile ilgilidir. Voltammetri, elektrot yüzeyindeki tepkimelerle elektrotlardan geçen akımın referans elektrota göre uygulanan potansiyele karşı izlendiği yöntem grubudur. "Döngüsel voltammetri" (Cyclic Voltammetry, CV), elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında kalitatif bilgi elde etmek için en yaygın kullanılan tekniktir. Sonuçta ortaya çıkan akım-potansiyel eğrilerinin döngüsel voltamogram olarak adlandırıldığı üçgen bir dalga formu oluşturan potansiyelin döngüsünü içermektedir. Döngüsel voltammetri, kimyada klasik bir ölçüm yöntemi olarak kabul edilmiştir ve voltamogramların tepe akımı, tepe potansiyeli ve karakteristik şekilleri, redoks sistemlerinin bireysel elektrokimyasal özelliklerini içermektedir ve "elektrokimyasal spektroskopi" olarak da anılmaktadır. Potansiyel değişim hızıyla orantılı olarak kolayca değişen voltammetrik deneyin değişen zaman ölçeği, onu tarihsel olarak diğer elektroanalitik tekniklerden ayıran benzersiz avantajıdır (Lida Khalafi & Mohammad Rafiee, 2017).

Rutin voltammetrik deneyler, destekleyici elektrolit olarak bilinen yüksek konsantrasyonda bir tuz içeren bir çözelti içinde çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrot konfigürasyonu kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çalışma elektrodunun potansiyeli, incelenen aralıkta sabit bir potansiyele sahip olan, genellikle Ag/AgCl olan bir referans elektroduna karşı değiştirilir. Çalışma elektrotları olarak altın veya platin elektrot gibi metal bir disk, veya daha yaygın olarak karşılaşılan karbon bazlı elektrotlar kullanılmaktadır. Nanoteknolojideki son gelişmeler sayesinde nanopartiküller ve diğer nanomalzemeler elektrodun yüzeyini değiştirerek katalitik yüzeyler geliştirmek için kullanılmaktadır (Özdokur et al., 2016). Akım ölçümünü genellikle spiral şeklinde platin olan bir yardımcı elektrot sağlamaktadır. Referans elektrot sabit bir referans potansiyel sağlar ve çalışma elektrot potansiyelinin ölçüldüğü iyi tanımlanmış bir potansiyel oluşturur (Lida Khalafi & Mohammad Rafiee, 2017).

Elektropolimerizasyon tekniği laboratuvarında yapılan SPME fiberlerin oluşturulma sürecinde sıklıkla kullanılmaktadır. Elektroaktif iletken polimerler, fizikokimyasal özellikleri, yüksek elektrik iletkenlikleri ve iyi stabiliteleri nedeniyle gelecek vaat

etmektedir ve araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Polipirol, politiyofen ve polianilin tipik elektroaktif iletken polimer örneklerindendir (Harraz, 2006). Polipirol (PPy), yüksek iletkenliği ve kararlılığı sayesinde en yaygın olarak çalışılan iletken polimerlerden biridir (Gribkova et al., 2019). PPy, nanomalzemelerle laboratuvar tipi SPME fiberlerin kaplanmasında da kullanılmaktadır.



3. Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda rutin olarak biyolojik örneklerde yasadışı madde analizleri yapılmaktadır. Deneysel bir çalışma olan bu doktora tezinin yöntem geliştirme kısmında sağlıklı gönüllülerden alınarak oluşturulan idrar havuzu kullanılmıştır. İdrar örneklerine amfetamin, metamfetamin, MDA ve MDMA'nın standart katımı yapılarak ticari olarak alınan polidimetilsiloksan-divinilbenzen (PDMS-DVB) fiberi ile GC-MS kullanılarak kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem üzerine etkili olan parametrelerin saptanması için kemometrik olarak Plakett-Burman dizaynı kullanılarak taranmıştır. Kemometrik optimizasyon sonrası yöntem seçimlilik, kesinlik, doğruluk, belirtme alt sınırı (LOD), saptama alt sınırı (LOQ), doğrusallık, duyarlık, çalışma aralığı, taşınma etkisi (carry over) ve matriks etkisi parametreleri yönünden valide edilmiştir.

Elektrokimyasal polimerizasyon yoluyla nanomalzemeler kullanılarak laboratuvarında fiberler üretilmiştir. Üretilen fiberlerin termal gravimetrik analizleri (TGA) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri yapılmıştır. Elde edilen fiberler valide edilen yöntemle çalışılmış ve etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin validasyon kısmı Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda yapılırken, elektrokimyasal polimerizasyonla fiberleri kaplama kısmı ise Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (EK 1). Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no: TGA-2020-21552). Çalışma tasarımı Şekil 5'te görülmektedir.



Şekil 5. Çalışma tasarımı

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Bu çalışmada deney aşamasında amfetamin standartı (Cerilliant), metamfetamin standartı (Cerilliant), amfetamin-d6 internal standardı (Cerilliant), MDA standartı (Cerilliant), MDMA standartı (Cerilliant), asetik anhidrit (AA) (Sigma Aldrich), pentafloropropiyonik anhidrit (PFPA) (Sigma Aldrich), trifloroasetik anhidrit (TFA) (Sigma Aldrich), sodyum Klorür (NaCl) (Merck), sodyum karbonat (Na₂CO₃) (Merck), sodyum potasyum tartarat (Merck), okzalik asit (Tekkim), pirol (Sigma Aldrich), aseton (Merck), hidroklorik asit (HCl) (Merck), polidimetilsiloksan-divinilbenzen (PDMS-DVB) SPME fiberi (Supelco), paslanmaz çelik tel, grafen (Nanografi), nanoselüloz (Nanografi), Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (Multiwalled Carbon Nanotube, MWCNT) (Nanografi), _COOH Fonksiyonlu Çok Katmanlı

Karbon Nanotüp (Multiwalled Carbon Nanotube, MWCNT-COOH) (Nanografi), Azot Katkılı Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (Nitrogen-Doped Multi Walled Carbon Nanotube, N-doped MWCNT) (Nanografi) kullanılmıştır.

3.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Koşulları

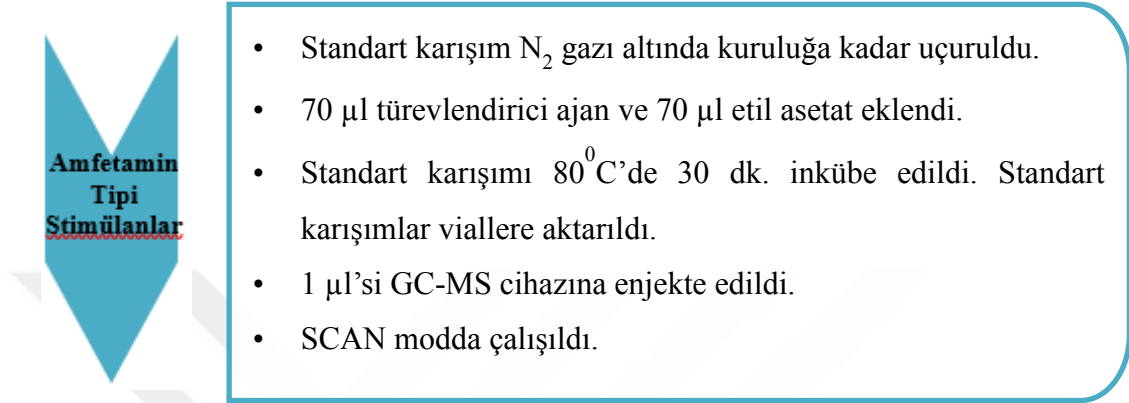
Maddelerin gaz kromatografisi ile analiz edilebilmesi için uçucu hale getirilmesi amacıyla türevlendirici ajanlar kullanılmaktadır. Türevlendirici ajan seçimi maddenin fizikokimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında analizi yapılan ATS'lerin farklı türevlendirici ajanlar ile metanoldeki saf standart katımları yapıldı ve en etkin sonuç veren türevlendirici ajana göre cihaz koşulları optimize edildi.

Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Laboratuvarı'nda bulunan GC-MS cihazı ile analizler yapıldı. Bunun için (%5-Fenil)-metil polisiloksan (HP-5MS) non-polar, düşük kanama özellikleri olan kapiler kolon kullanıldı. Enjeksiyon hacmi, split/splitless modu, fırın sıcaklığı ve MS koşulları optimize edildi. GC-MS cihazında (Şekil 6) yöntemi optimize edebilmek amacıyla, 1000 µg/ml olarak bulunan saf standart çözeltiler (ana stok) öncelikle her çalışma öncesi kararlılıklarından emin olmak için taze olarak 25 µg/ml ara stok çözeltileri hazırlandı. 25 µg/ml ara stok standartlardan yola çıkılarak metanole 1000 ng/ml derişimde olacak şekilde standart karışım çözeltisi hazırlandı.



Şekil 6. Çalışmada kullanılan GC-MS cihazı

Türevlendirme aşamasında literatürden edinilen bilgilere göre ATS’lerde en çok kullanılan pentafloropropionik anhidrit (PFPA), asetik anhidrit (AA) ve trifloroasetik anhidrit (TFA) türevlendirici ajanları kullanıldı. 1000 ng/ml derişimde standart katımından GC-MS enjeksiyonuna kadar yapılan işlemler Şekil 7’de görölmektedir.



Şekil 7. Standart madde karışımının ön hazırlık aşaması

GC-MS’de farklı sıcaklık programları denemek suretiyle ilgili maddeler için optimum cihaz programı oluşturulmuştur (Tablo 3). Her bir standart maddeye ait m/z oranları ise Tablo 4’te görölmektedir.

Tablo 3. GC-MS için optimum olarak belirlenen çalışma koşulları

	Amfetamin Tipi Stimulanlar
Kullanılan Cihaz	Thermo Finnigan TRACE ISQ
Kapiler Kolon	Silika dolgulu; 30 m uzunluğunda, 0,25 µm film kalınlığı ve 0,25 mm iç çapında olan (HP-5MS)
Fırın Sıcaklık Programı	Başlangıç sıcaklığı 80°C de 1 dakika bekleyerek, 20°C/dk. artışla 250°C’ye çıkarılır. 30°C/dk. artışla 280°C’ye çıkarılır ve 5 dakika bekleyerek son sıcaklığa ulaşılır.
Taşıyıcı Gaz ve Akış	Helyum, 1,3 ml/dk.
Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	250 °C
Dedektör Sıcaklığı	250 °C
Enjeksiyon Hacmi	1 µL, splitless

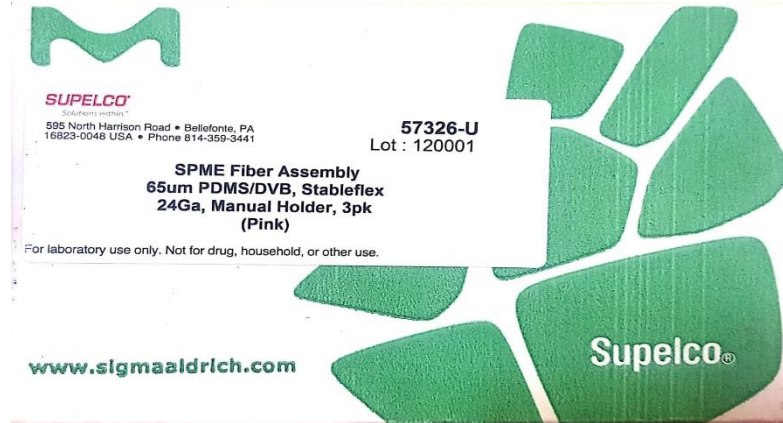
Tablo 4. GC-MS ile analiz edilen analitler için kütle/yük (m/z) oranları

Analiz edilen maddeler	PFPA	AA	TFA
	m/z oranları	m/z oranları	m/z oranları
Amfetamin	91, 118, 190	44 , 86, 118	91, 118, 140
Metamfetamin	91, 118, 160, 204	58 , 91, 100	91, 110, 118, 154
MDA	135 , 162, 325	44 , 135, 162	135 , 162
MDMA	162, 204 , 339	58 , 100, 162	135, 154 , 162
AMP-d6			93, 123, 144

Optimum cihaz programı ile SCAN modda çalışılarak 1000 ng/ml standart karışımlarından maddelere ait kromatogramlar elde edildi.

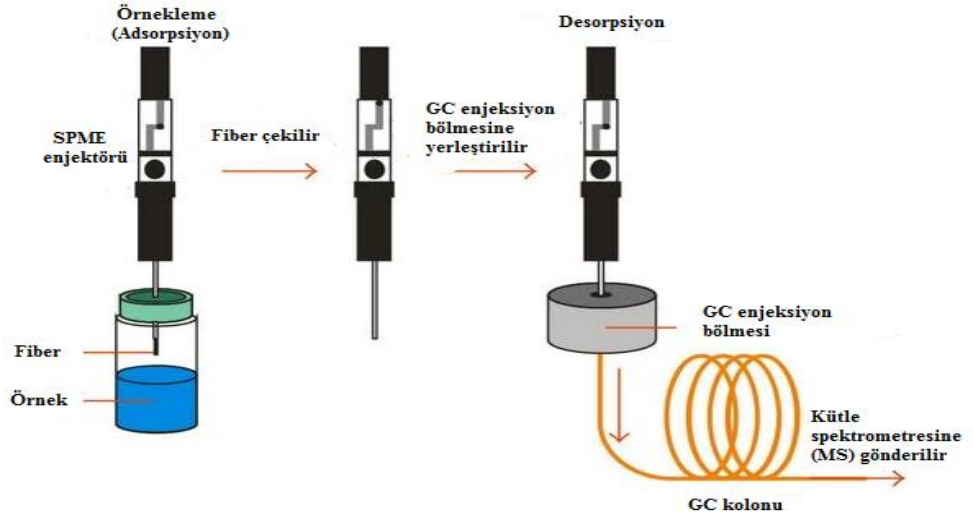
3.3. PDMS-DVB Ticari SPME Fiberi ile Yöntem Geliştirme

Deneylerde uçucular, yarı-uçucular, semipolar maddeler, aminler ve nitroaromatik bileşikler gibi uygulama alanları olan 65 µm 24 Ga PDMS-DVB ticari fiberi kullanılmıştır (Şekil 8). Kullanılacak fiberin özelliklerinin uygunluğuna, firmanın manuelinden bakılarak karar verilmiştir.



Şekil 8. Deneylerde kullanılan PDMS-DVB ticari SPME fiberi

SPME yöntemine bakıldığında adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri bulunmaktadır (Şekil 9). ATS gibi yarı-uçucu analitler için türevlendirme işlemi bulunmaktadır.



Şekil 9. SPME yöntemi çalışma şeması

Fiberin şartlandırılması: Ticari fiber alındıktan sonra çalışmaya başlamadan önce manuelinde gösterildiği şartlar olan GC-MS'in inlet bloğunda 250 °C'de 30 dk. bekletilerek şartlandırıldı (Şekil 10).



Şekil 10. Fiberin şartlandırılması

Yöntem geliştirirken farklı adsorpsiyon, türevlendirme ve desorpsiyon şartları denendi.

Adsorpsiyon: 5 ml idrara 1000 ng/ml olacak şekilde AMP, MET, MDA ve MDMA'nın standart katımı yapıldı. 0.72 g NaCl eklendi. Dengeye gelmesi için

alüminyum blok içerisinde 80⁰C'de 600 rpm'de 10 dk. bekletildi. Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde aynı koşullarda 30 dk. magnetik çalkalayıcıda bekletildi.

Türevlendirme: İdrarda ATS'lerin rutin analizinde laboratuvar-içi yöntem olarak uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde türevlendirici ajan olarak pentafloro propiyonik anhidrit (PFPA) kullanılmaktadır. Bu nedenle türevlendirme aşamasında ilk olarak PFPA denendi. 2 ml'lik vial 100 µl PFPA konuldu. Dengeye gelmesi için 80 ⁰C'de 15 dk. bekletildi. Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde aynı koşullarda 15 dk. bekletildi.

Desorpsiyon: 250 ⁰C'deki GC-MS'in inlet bloğuna 7 dk. boyunca desorbe edilir. Enjeksiyondan sonra fiberin ucu soyuldu (Şekil 15).

İkinci fiber şartlandırıldıktan sonra, GC-MS koşullarında belirtildiği üzere türevlendirici ajanlardan en etkin sonucu veren TFA olması ve PFPA'nın fiberin soyulmasına neden olmasından dolayı türevlendirici aşamasında TFA kullanılarak deneme yapıldı. PFPA ile yapılan aynı adsorpsiyon ve desorpsiyon koşullarında TFA ile deneme yapıldı. Türevlendirme aşamasında 2 ml'lik vial 100 µl TFA konuldu. Dengeye gelmesi için 80 ⁰C'de 15 dk. bekletildi. Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde aynı koşullarda 15 dk. bekletildi. 250 ⁰C'deki GC-MS'in inlet bloğuna 7 dk. boyunca manuel enjeksiyon yapıldı. TFA ile yapılan bu denemede ATS'lere ait kromatogramlar elde edildi. Bu işlemten sonra fiber üzerinde bir safsızlık kalıp kalmadığının kontrolü için boş enjeksiyon yapıldı. TFA kullanılarak yapılan ikinci denemede desorpsiyon işleminden sonra fiber soyuldu.

Literatürler incelendiğinde SPME fiber ile türevlendirici ilişkisi hakkında bir bilgi verilmediği görülmüştür. Birçok defa kullanılacağı beyan edilen fiberler en çok iki defa kullanılabilmektedir. Türevlendiricilerin fizikokimyasal özellikleri ile fiberin yapısı arasındaki ilişki ile ilgili yapılan detaylı inceleme sonrasında TFA'nın hacminin fazla gelebileceğine ve 25 µl TFA kullanılmasına karar verildi.

Adsorpsiyon: 1 ml idrara 1000 ng/ml olacak şekilde AMP, MET, MDA ve MDMA'nın standart katımı yapıldı. 0.72 g NaCl eklendi. Dengeye gelmesi için alüminyum blok içerisinde 80⁰C'de 600 rpm'de 10 dk. bekletildi. Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde aynı koşullarda 30 dk. magnetik çalkalayıcıda bekletildi.

Türevlendirme: 10 ml'lik vialde 25 µl TFA konuldu. Dengeye gelmesi için 80 °C'de 5 dk. bekletildi. Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde aynı koşullarda 1 dk. bekletildi.

Desorpsiyon: 250°C'deki GC-MS'in inlet bloğuna 5 dk. boyunca manuel enjeksiyon yapıldı. Denemelerde AMP ve MET görüldü MDA ve MDMA saptanmadı. Tuz yerine Na₂CO₃ kullanıldı. 0,5 g ve 0,72 g denendi. 0,5 g Na₂CO₃'te tüm analitler etkin biçimde saptandı.



Adsorpsiyon:

- İdrar örneği 10 ml'lik headspace tüpüne aktarılarak 0,5 g Na₂CO₃ eklendi.
- Karıştırıcı ısıtıcıda 600 rpm'de 80 °C'de 30 dk. inkübe edilerek dengeye gelmesi beklendi.
- PDMS/DVB ticari fiberi konularak üst boşlukta (headspace) olacak şekilde 10 dk fiber tutuldu.

Şekil 11. Geliştirilen SPME yönteminde adsorpsiyon aşaması



Türevlendirme:

- Aynı bir 10 ml'lik tüpe 25 µl türevlendirici ajan olan TFA konuldu ve 5 dk. boyunca 80 °C'de dengeye gelmesi için bekletildi.
- Fiber üst boşlukta (headspace) olacak şekilde 1 dk. bekletildi.

Şekil 12. Geliştirilen SPME yönteminde türevlendirme aşaması

**Desorpsiyon:**

- 250⁰C'de GC-MS inletinde manuel olarak 5 dk. enjeksiyon yapıldı.

Şekil 13. Geliştirilen SPME yönteminde desorpsiyon aşaması

Fiberin Temizlenmesi: Her denemeden sonra fiber 250 ⁰C'deki GC-MS inletinde 15 dk. boyunca bekletildi. Sonrasında fiberin temizlendiği, üzerinde bir kalıntı kalmadığının teyidi için boş enjeksiyon yapıldı.

3.3.1. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonu

Kemometri, deneysel doğa bilimlerinde, özellikle kimyada, tanımlayıcı ve öngörücü problemleri çözmek için günümüzde birçok alanda uygulanmaktadır. Tanımlayıcı ve öngörüşel uygulamalarda, kimyasal sistemlerin özellikleri, sistemin altta yatan sebeplerini ve yapısını öğrenme amacıyla modellenmiştir (Otto, 2016). Deney tasarımı (Design of Experiments, DOE) olarak da bilinen istatistiksel deneysel tasarım, en düşük analiz sayısı ile maksimum miktarda bilgiyi elde etmek için deneylerin nasıl yürütüleceğine ve planlanacağına ilişkin bir metodolojidir (DeCaestecker et al., 2004). Değişkenler arasındaki etkileşimler, değişiklik yapılarına kadar kimsenin göremeyeceği sorunlara neden olabilmektedir. DOE birkaç faktörün aynı anda değişken olması, ancak her faktörün bağımsız olarak değerlendirilmesi avantajına dayanmaktadır.

Bir "tarama tasarımı" çok sayıda potansiyel nedensel faktörün incelenmesi gerektiğinde, bir veya daha fazla ilgili yanıtı etkileyebilecek en önemli faktörleri belirlemek için uygulanan deneysel bir tasarımı ifade etmektedir (Vanaja & Rani, 2007). Tarama tasarımı belli bir değişkenin üst ve alt kontrol düzeylerini (level) belirleyerek kalite kontrol sürecini iyileştirmeye yardımcı olmaktadır. Etkileyen faktörlerin daha az deneyle daha ucuz bir şekilde tanımlanmasıyla süreç iyileştirilebilmektedir (Murphy RJ., 2003). Bilgiyi en üst düzeye çıkarırken deney sayısını en aza indirmek nihai hedeftir (Trocine & Malone, 2000). Elde edilen

bilgiler bir işlemi optimize etmek için kullanılabilir ve bir sürecin tekrarlanabilirliği korunabilir (Prvan & Street, 2002).

Plackett-Burman (PB) tasarımı R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından 1946'da tasarım parametrelerinin sistem durumu üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılabilecek kalite kontrol sürecini iyileştirmek için geliştirilen, yaygın olarak kullanılan bir tarama tasarımı sınıfıdır. Çeşitli sayıda veya "n" faktör "n+ 1" deneyli PB tasarımı ile taranabilmektedir. PB tasarımları, yediden fazla faktör için deneysel tasarımlar öneren n deneyde n-1 değişkenleri araştırmak için kullanılmaktadır. Özellikle sırasıyla 7, 11, 15, 19, vb. faktörleri incelemek için uygun olan $n \times 4$ deneyler yani 8, 12, 16, 20, vb. için uygundur (Analytical Methods Committee, 2013; Vanaja & Rani, 2007). Faktör sayılarına göre uygun üreteçler seçilerek Tablo 5'te görülen tasarımlar oluşturulabilmektedir. (-) düşük düzeyi, (+) ise yüksek düzeyi temsil etmektedir.

Bu çalışmada geliştirilen yöntem Plackett-Burmann dizaynı kullanılarak kemometrik olarak optimize edilmiştir. Uygulanan SPME yönteminde etkin olabileceği ön görülen 7 faktör tespit edildi. Bu faktörler;

- X_1 : Örnek hacmi,
- X_2 :Tuz miktarı,
- X_3 :Karıştırma hızı,
- X_4 :Dengeye gelme süresi,
- X_5 :Adsorpsiyon süresi,
- X_6 :Türevlendirme sıcaklığı,
- X_7 :Türevlendirme süresidir.

Bu faktörlerin en düşük ve en yüksek değerleri ön çalışmalarla belirlendi. Tüm aşamalarının optimum şartlarının ekstraksiyon verimine etkisi belirlenmesi için Plaket-Burman Tasarımı ile tarama yapıldı. Etmen sayılarına göre 7 faktörlü uygun üreteç seçilerek en az sayıda deney ile tarama yapıldı. Tablo 8-9'a göre yapılan deneyler sonucunda elde edilen alan değerlerine göre regresyon analizi yapıldı ve bu tarama deneylerinden sonra en etkili üç faktör belirlendi.

Tablo 5.Plakett-Burman jeneratörleri

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

3.3.2. Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu, temelde bir analitik gereksinimin tanımlaması ve incelenen yöntemin, uygulaması gerektirdiği esaslara uygun olduğuna dair bir onaylama sürecidir. Bir yöntem, performans özelliklerinin belirli bir amaçla kullanım için yeterli olduğunun kanıtlanması gerektiği durumlarda valide edilmelidir.

- Standart olmayan yöntemler,
- Laboratuvar tarafından tasarlanmış/geliştirilmiş yöntemler,
- Amaç dışında kullanılan standart yöntemler,
- Standart yöntemlerin yükseltilmesi ve modifikasyonları durumunda laboratuvarların validasyon yapması gerekmektedir (Aydoğdu et al., 2018).

Kemometrik olarak optimize edilen yöntem SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology) yöntem validasyon standardına göre, seçimlilik, doğrusalılık, geri kazanım, kesinlik, tekrarlanabilirlik, belirtme alt sınırı (LOD) ve saptama alt sınırı (LOQ) vb. parametreler yönünden valide edilmiştir.

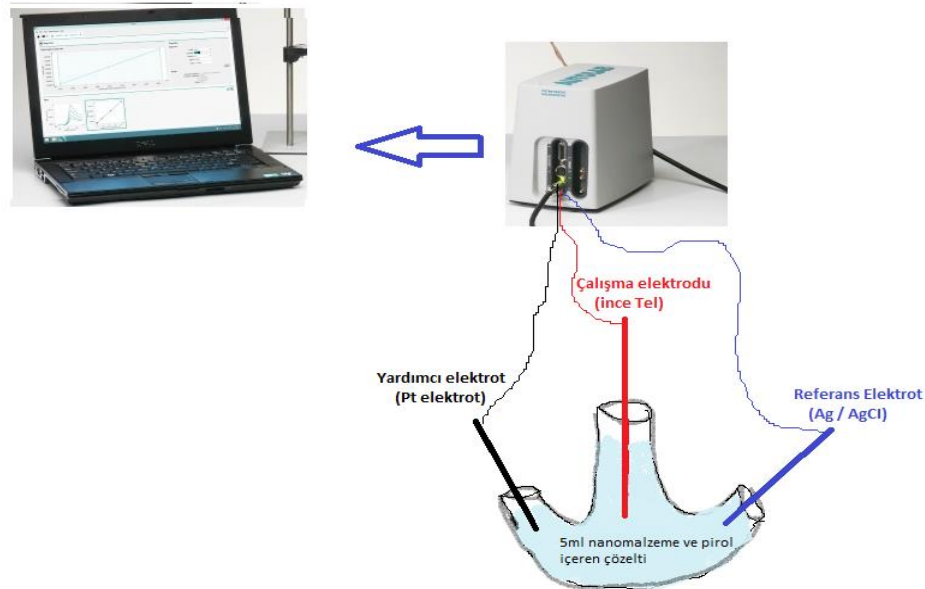
3.4. Farklı Nanomalzemelerle Elektrokimyasal Kaplama İşlemi

3.4.1. Paslanmaz Çelik Telin Hazırlanması

Paslanmaz çelik teller SPME manuel holderından geçecek boyuta gelene kadar su banyosunda bulunan HCl içeren tüpte sıcaklık uygulanarak inceltildi. İnceltme sonrasında yüzeyinde oluşabilecek olası safsızlıklardan arındırmak için ultrasonik banyoda 15 dk. doygun okzalik asit çözeltisinde ve 15 dk. da aseton içerisinde bekletilerek, kullanıma hazır hale geldi.

3.4.2. Elektrokimyasal Polimerizasyon

Çelik tellerin çalışma elektrodu olarak kullanılarak kaplanması işlemi elektrokimyasal polimerizasyon işlemi ile yapıldı. Monomer olarak pirol kullanıldı. Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (MWCNT), -COOH Fonksiyonlu Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (MWCNT-COOH), Azot Katkılı Çok Katmanlı Karbon Nanotüp (N-Dopped MWCNT), Grafen ve Nanoselüloz olmak üzere 5 farklı nanomalzeme kullanarak 5 farklı çalışma elektrodu oluşturuldu. 10 ml ultra saf suda 0.2 M sodyum potasyum tartarat çözüldü. 1.1 mg nanomalzeme eklendi. 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözelti elektrolitik hücreye konuldu ve üzerine 175 µL pirol eklenerek üzerinden 5 dk boyunca azot geçirildi. Siklik voltammetri yöntemi kullanıldı. Yardımcı elektrot olarak platin (Pt) elektrot, referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrodu kullanıldı (Şekil 14) (Kirlangiç et al., 2019). Tablo 6’da belirtilen koşullarda Autolab voltammetri cihazı kullanılarak NOVA yazılımı ile elektropolimerizasyon işlemi ile teller kaplandı.



Şekil 14. Elektrokimyasal polimerizasyon işlemi tasarımı

Tablo 6. Elektrokimyasal polimerizasyon koşulları

Başlama potansiyeli (V)	-0.5
Bitiş Potansiyeli potansiyeli(V)	2.00
Tarama Hızı (V/s)	0.05
Döngü sayısı	7

Hazırlanan SPME fiberlerin etkinliği valide edilen yöntem ile çalışılarak karşılaştırıldı.

3.4.3. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

Elektrokimyasal olarak kaplaması yapılan fiberler kazınarak 5-7 mg örnek Ege Üniversitesi Kimya Bölümü'nde hizmet alımı şeklinde analiz edildi.

3.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

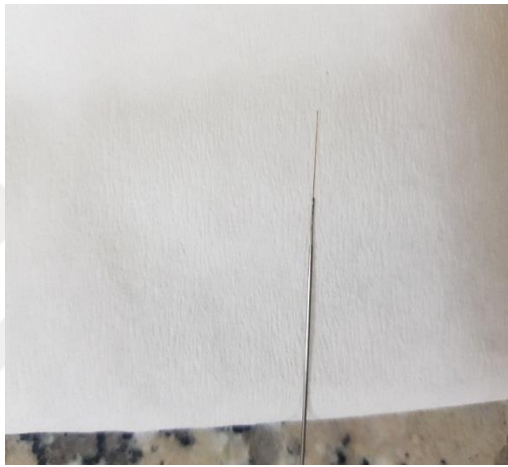
Kaplaması yapılan fiberlerin SEM analizi, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı şeklinde yapıldı.

4. Bulgular

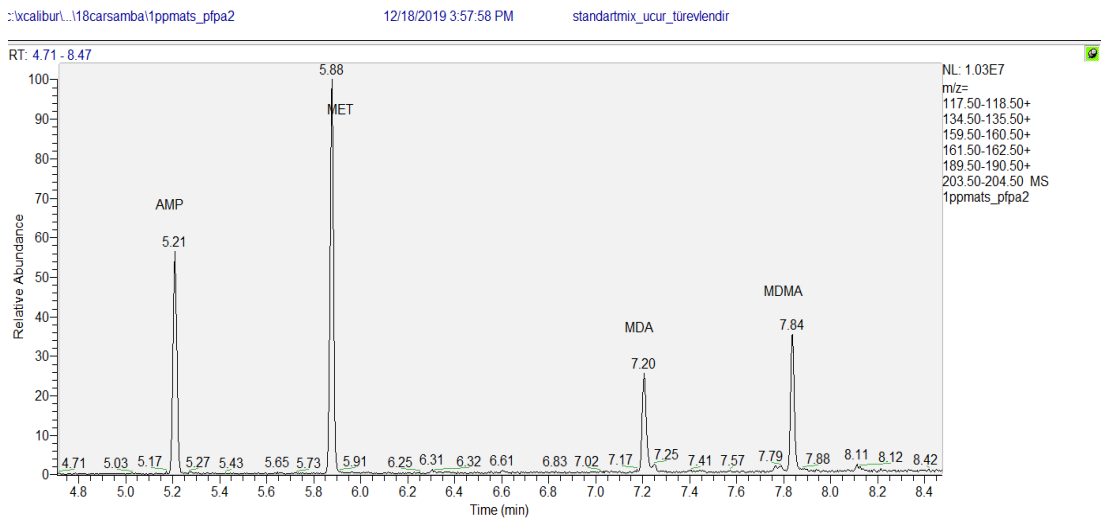
4.1. PDMS-DVB Ticari SPME Fiberi ile Yöntem Geliştirmeye Ait Veriler

4.1.1. Türevlendirme İşlemi Sorunsalı

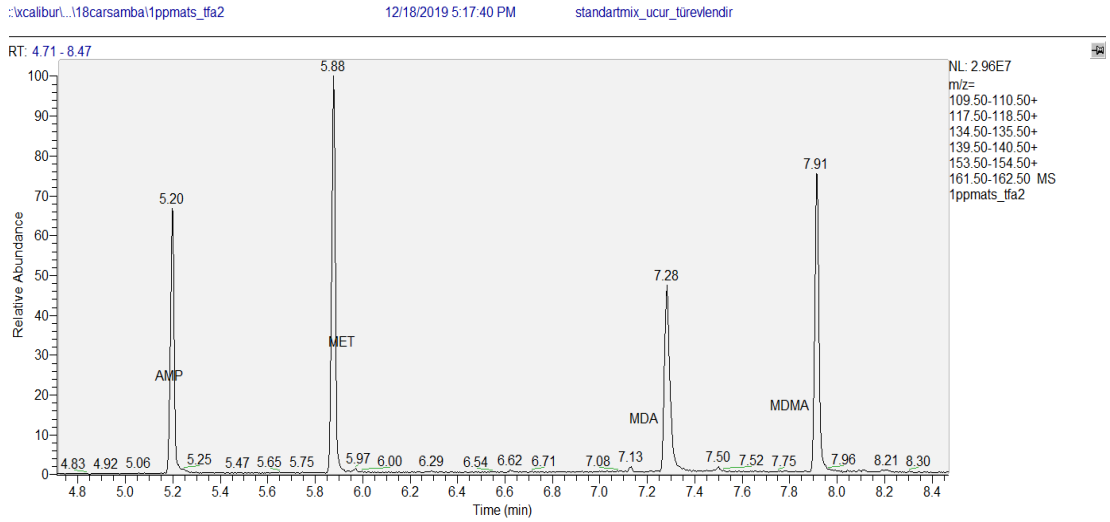
PFPA ile yapılan SPME denemesinde ilk seferde fiber soyuldu (Şekil 15). Bunun üzerine ATS'lerin analizinde türevlendirme basamağında PFPA'ya alternatif olabilecek hangi reaktifin daha etkili olduğunun belirlenmesi için metanol içerisinde standart katımı yapıp, PFPA, TFA ve AA ile türevlendirildi. Analitlere ait kromatogramlar Şekil 16-18'de görülmektedir.



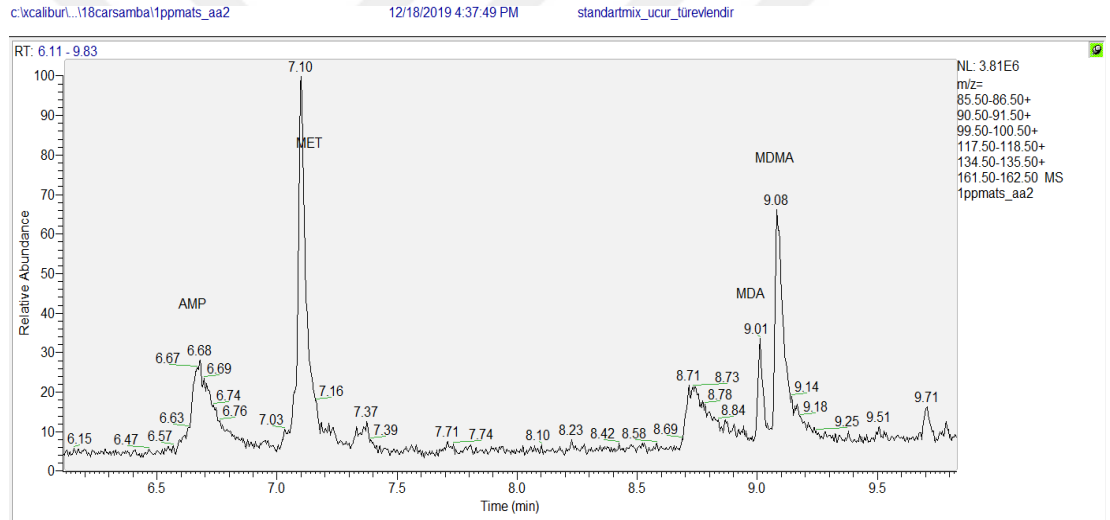
Şekil 15. Türevlendirme işlemi sonrası soyulan PDMS-DVB SPME fiberi



Şekil 16. PFPA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram



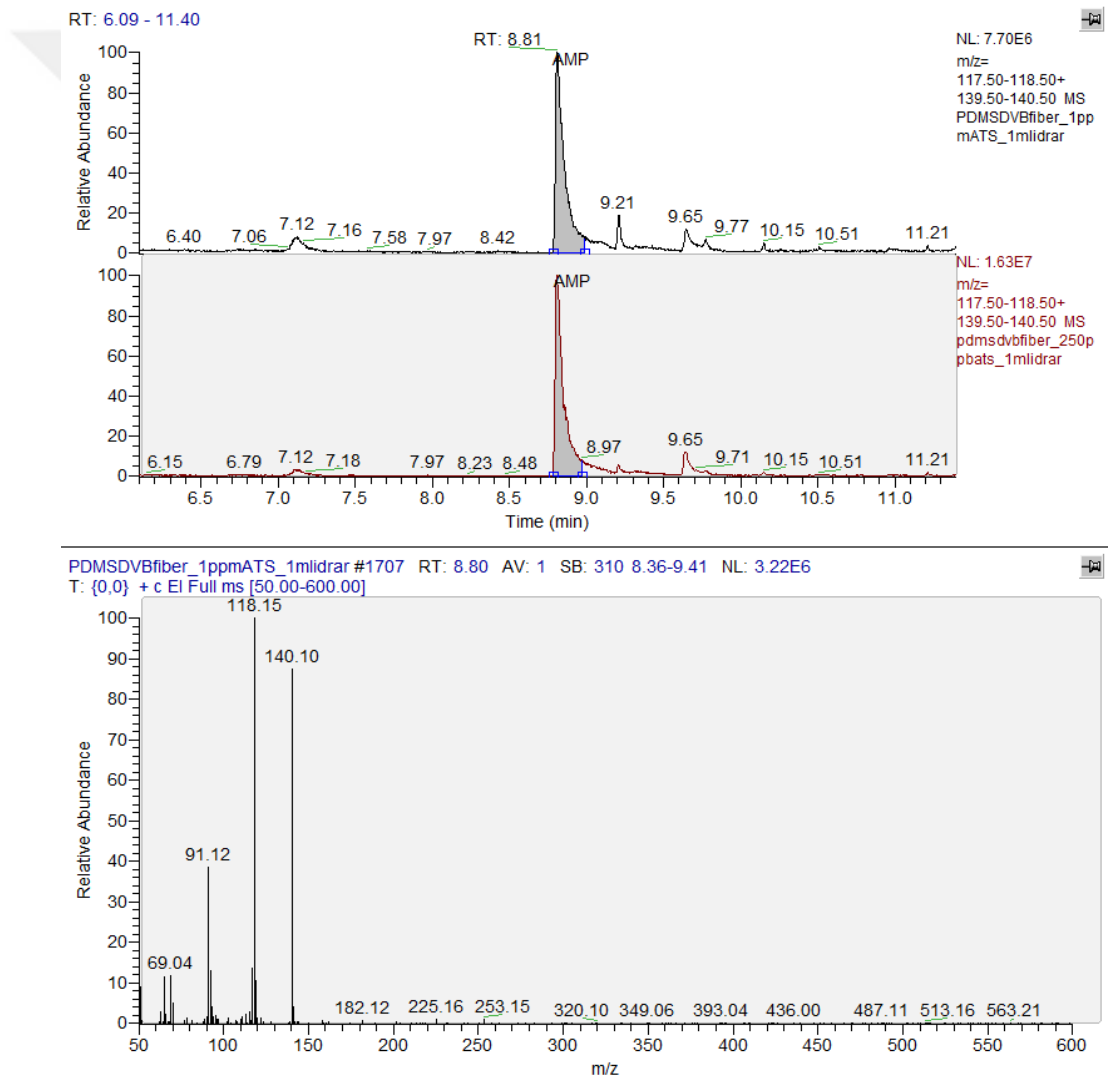
Şekil 17. TFA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram



Şekil 18. AA ile türevlendirilmiş 1000 ng/ml ATS standart karışımına ait kromatogram

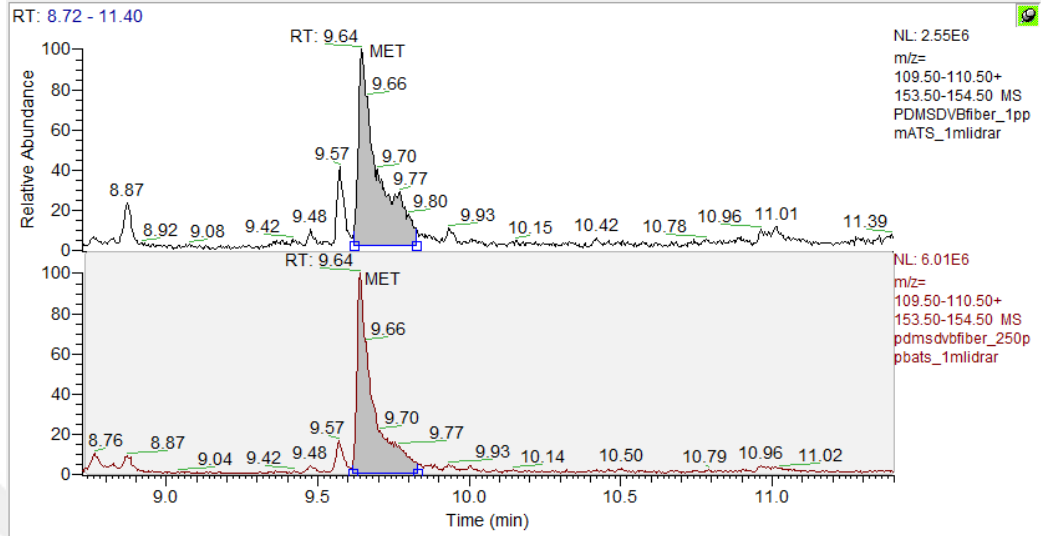
Kromatogramlardaki analitlere ait piklerin alanından yola çıkılarak yapılan türevlendirici karşılaştırmasında en etkin olarak TFA daha sonra sırasıyla PFPA ve AA bulundu. Hem PFPA'nın fiberin soyulmasına neden olması hem de etkinlik karşılaştırmasının sonucunda çalışmalarda türevlendirici ajan olarak TFA ile devam edilmesine karar verildi.

100 µl TFA kullanılarak yapılan deneme sonrasında da fiber soyuldu. Literatürlerde kısıtlılık olarak ne kadar türevlendirici ajan kullandıkları belirtilmediği görülmüştür. Türevlendiricilerin yapıları nedeniyle bu ajanların SPME fiberler üzerinde korozif etki oluşturduğu saptandı. M_A ile bağlantılı olarak 1:1,5 oranında türevlendirici ajan kullanılmasına karar verildi. Hesaplamalar sonucunda türevlendirme basamağında 25 µl TFA kullanılarak deneme yapıldı. Deneme sonunda fiberde bir soyulma olmadı ve analitler başarılı bir şekilde saptandı (Şekil 19-22). Elimizde sınırlı sayıda bulunan ve ithalatı maliyetli olan fiberlerle bu nedenle olabildiğince az zarar verecek çalışmalar yapıldı.

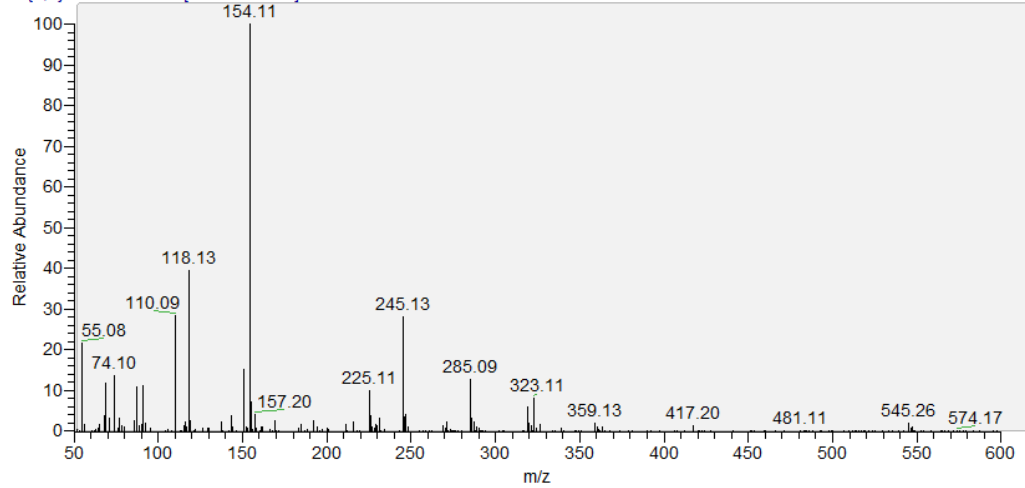


Şekil 19. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda amfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum

st 1 dk tür 250c

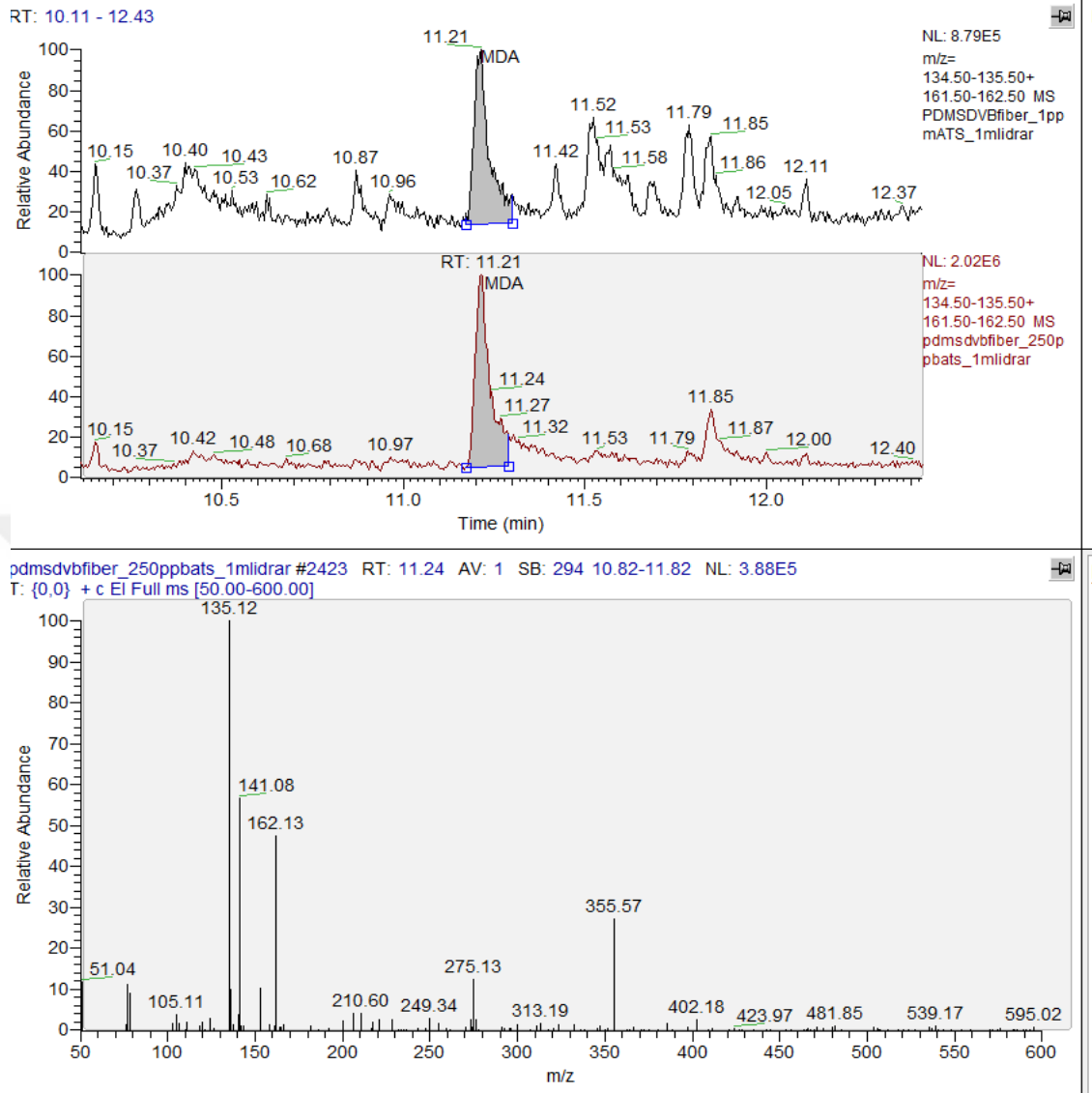


PDMSDVBfiber_1ppmATS_1mlidrar #1953 RT: 9.64 AV: 1 SB: 269 9.37-10.28 NL: 1.54E6
T: {0,0} + c EI Full ms [50.00-600.00]



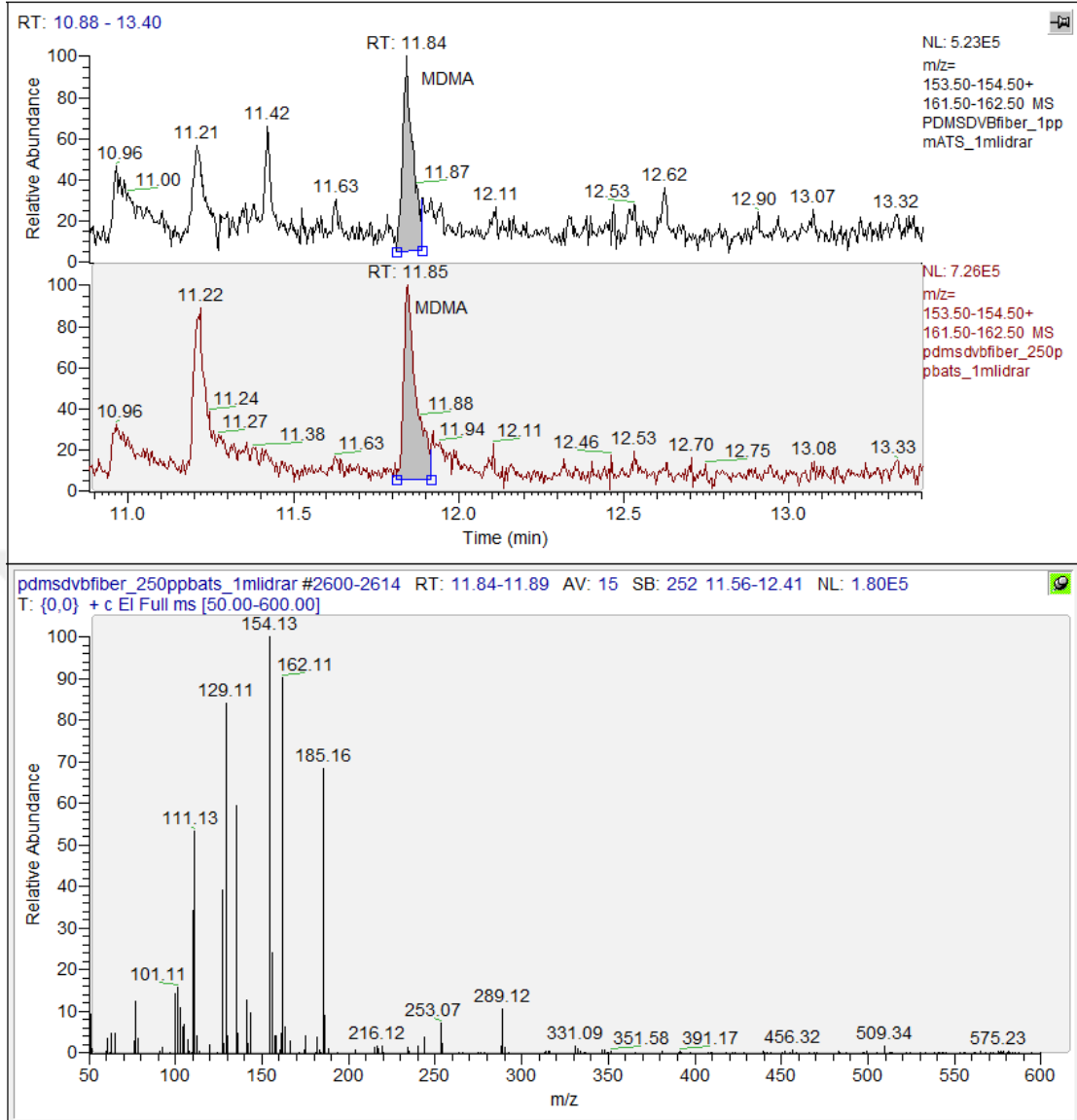
CAP NIM

Şekil 20. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda metamfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum



Şekil 21. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda MDA analitine ait kromatogram ve spektrum

st 1 dk tür 250c



Şekil 22. TFA ile türevlendirilmiş 250 ng/ml ve 1000 ng/ml standart katımı yapılmış idrarda MDMA analitine ait kromatogram ve spektrum

4.1.2. Yöntemin Kemometrik Optimizasyonuna Ait Veriler

4.1.2.1. Plakett-Burman Tasarımı

Geliştirilen SPME yöntemi üzerine etkili olan 7 faktör ve ön denemelerle elde edilen min ve max değerleri belirlendi (Tablo 7). Belirlenen bu faktörlere ve değerlere göre Tablo 9’da görülen Plakett-Burman Tasarımı oluşturuldu.

Tablo 7. Plakett-Burman tasarımında kullanılan 7 faktör ve min, max değerleri

Faktörler	Birim	Min (-1)	Max (+1)
X1 Örnek Hacmi	ml	1	3
X2 Tuz miktarı	g	0.5	0.72
X3 Karıştırma hızı	rpm	300	600
X4 Dengeye gelme süresi	dk.	15	30
X5 Adsorpsiyon süresi	dk.	5	10
X6 Türevlendirme Sıcaklığı	⁰ C	60	80
X7 Türevlendirme Süresi	dk.	1	3

Tablo 8.7 Faktörlü Plakett-Burman deney tasarımı

Deney No/ Faktör	Örnek Hacmi	Tuz miktarı	Karıştırma hızı	Dengeye gelme süresi	Adsorpsiyon süresi	Türevlendirme Sıcaklığı	Türevlendirme Süresi
1	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	-	+	+
3	+	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-	+	-
5	-	+	+	+	-	-	+
6	+	-	+	+	+	-	-
7	-	+	-	+	+	+	-
8	-	-	+	-	+	+	+

Tablo 9. 7 Faktörlü Plakett-Burman deney tasarımı değerleri

Deney No/ Faktör	Örnek Hacmi	Tuz miktarı	Karıştırma hızı	Dengeye gelme süresi	Adsorpsiyon süresi	Türevlendirme Sıcaklığı	Türevlendirme Süresi
1	1 ml	0.5 g	300 rpm	15 dk.	5 dk.	60 °C	1 dk.
2	3 ml	0.5 g	300 rpm	30 dk.	5 dk.	80 °C	3 dk.
3	3 ml	0.7 g	300 rpm	15 dk.	10 dk.	60 °C	3 dk.
4	3 ml	0.7 g	600 rpm	15 dk.	5 dk.	80 °C	1 dk.
5	1 ml	0.7 g	600 rpm	30 dk.	5 dk.	60 °C	3 dk.
6	3 ml	0.5 g	600 rpm	30 dk.	10 dk.	60 °C	1 dk.
7	1 ml	0.7 g	300 rpm	30 dk.	10 dk.	80 °C	1 dk.
8	1 ml	0.5 g	600 rpm	15 dk.	10 dk.	80 °C	3 dk.

Yapılan 8 deneme sonrası analitlere ait elde edilen alan değerleri Tablo 10'da görülmektedir.

Tablo 10. Plakett-Burman deneyleri sonrası analitlere ait elde edilen alan değerleri

Deney No/Faktör	y (AMP)	y (MET)	y (MDA)	y (MDMA)
1	494,239	286,637	1,617	3,336
2	1,194,730	717,038	72,410	57,333
3	1,196,048	536,663	3,406	10,642
4	793,282	264,618	25,715	9,950
5	1,351,018	1,007,247	3,261	8,010
6	1,501,418	1,241,164	45,851	43,345
7	1,317,107	539,440	73,755	29,839
8	7,550,373	2,689,252	103,443	227,591

Yöntem üzerinde en etkili 3 faktörün belirlenmesi için Tablo 9'a göre yapılan deneyler sonunda elde edilen alan değerlerine göre regresyon analizi yapıldı. Yapılan regreasyon analizine ait veriler Tablo 11-14'te görülmektedir.

Tablo 11. Amfetamine ait regresyon analizi sonuçları

	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>Düşük %95</i>	<i>Yüksek %95</i>
Kesişim	1924776,875	0	65535	1924777	1924777
X Değişkeni 1	-753407,375	0	65535	-753407	-753407
X Değişkeni 2	-760413,125	0	65535	-760413	-760413
X Değişkeni 3	874245,875	0	65535	874245,9	874245,9
X Değişkeni 4	-583708,625	0	65535	-583709	-583709
X Değişkeni 5	966459,625	0	65535	966459,6	966459,6
X Değişkeni 6	789096,125	0	65535	789096,1	789096,1
X Değişkeni 7	898265,375	0	65535	898265,4	898265,4

Tablo 12. Metamfetamine ait regresyon analizi sonuçları

	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>Düşük %95</i>	<i>Yüksek %95</i>
Kesişim	910257,375	0	65535	910257,4	910257,4
X Değişkeni 1	-220386,625	0	65535	-220387	-220387
X Değişkeni 2	-323265,375	0	65535	-323265	-323265
X Değişkeni 3	390312,875	0	65535	390312,9	390312,9
X Değişkeni 4	-34035,125	0	65535	-34035,1	-34035,1
X Değişkeni 5	341372,375	0	65535	341372,4	341372,4
X Değişkeni 6	142329,625	0	65535	142329,6	142329,6
X Değişkeni 7	327292,625	0	65535	327292,6	327292,6

Tablo 13. MDA'ya ait regresyon analizi sonuçları

	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>Düşük %95</i>	<i>Yüksek %95</i>
Kesişim	41182,25	0	65535	41182,25	41182,25
X Değişkeni 1	-4336,75	0	65535	-4336,75	-4336,75
X Değişkeni 2	-14648	0	65535	-14648	-14648
X Değişkeni 3	3385,25	0	65535	3385,25	3385,25
X Değişkeni 4	7637	0	65535	7637	7637
X Değişkeni 5	15431,5	0	65535	15431,5	15431,5
X Değişkeni 6	27648,5	0	65535	27648,5	27648,5
X Değişkeni 7	4447,75	0	65535	4447,75	4447,75

Tablo 14. MDMA'ya ait regresyon analizi sonuçları

	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>Düşük %95</i>	<i>Yüksek %95</i>
Kesişim	48755,75	0	65535	48755,75	48755,75
X Değişkeni 1	-18438,25	0	65535	-18438,25	-18438,25
X Değişkeni 2	-34145,5	0	65535	-34145,5	-34145,5
X Değişkeni 3	23468,25	0	65535	23468,25	23468,25
X Değişkeni 4	-14124	0	65535	-14124	-14124
X Değişkeni 5	29098,5	0	65535	29098,5	29098,5
X Değişkeni 6	32422,5	0	65535	32422,5	32422,5
X Değişkeni 7	27138,25	0	65535	27138,25	27138,25

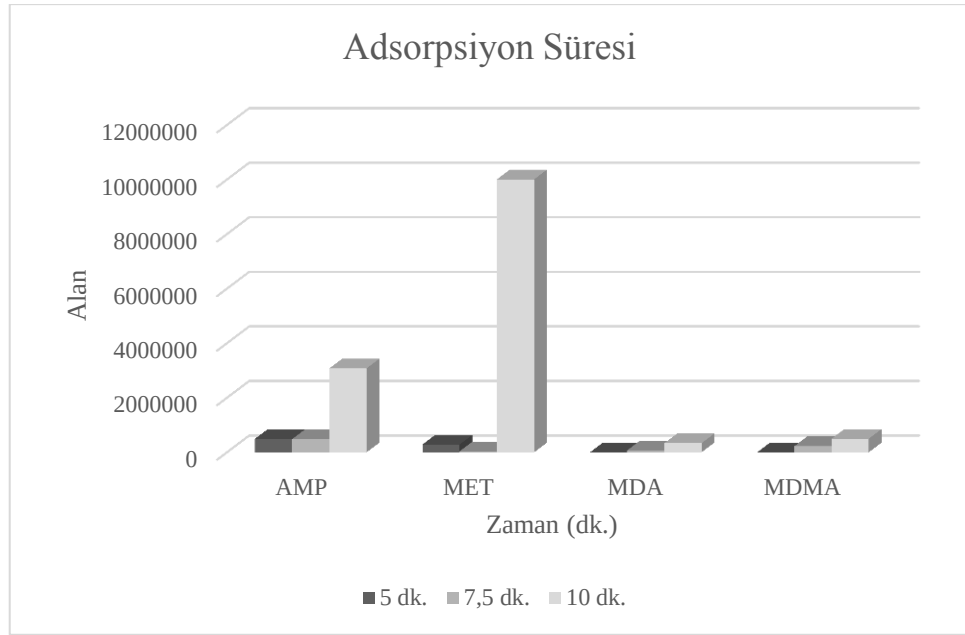
Yapılan regresyon analizleri sonucunda en etkili 3 faktör;

- Adsorpsiyon süresi,
- Türevlendirme sıcaklığı,
- Türevlendirme süresi olarak belirlendi.

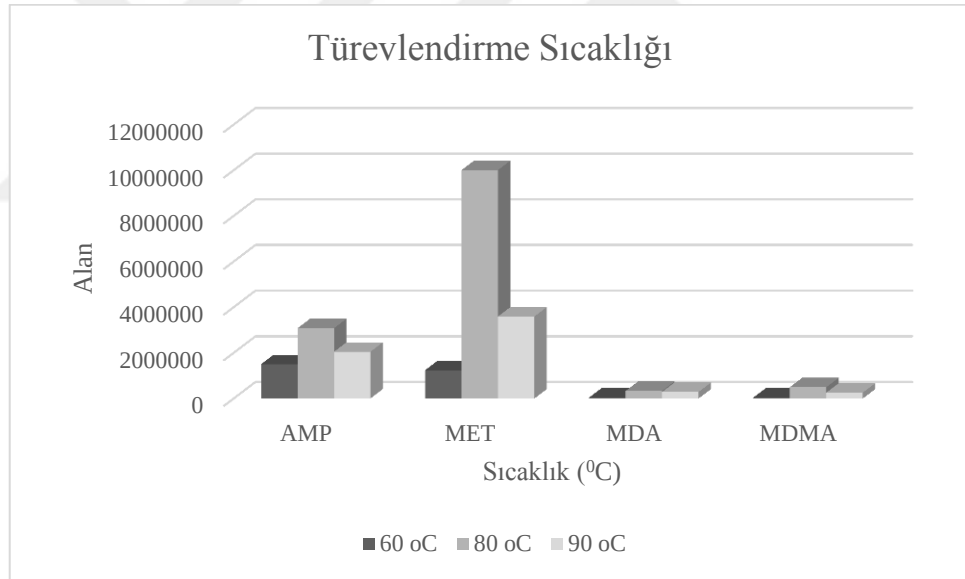
Belirlenen bu faktörler için aşağıda değişkenleri gösterilen süre ve sıcaklıklarda 250 ng/ml derişimde standart katım yapılarak çalışıldı.

- Adsorpsiyon süresi: 5 dk., 7.5 dk., 10 dk.
- Türevlendirme sıcaklığı: 60 °C, 80 °C, 90 °C,
- Türevlendirme süresi: 1dk., 2 dk., 3 dk.

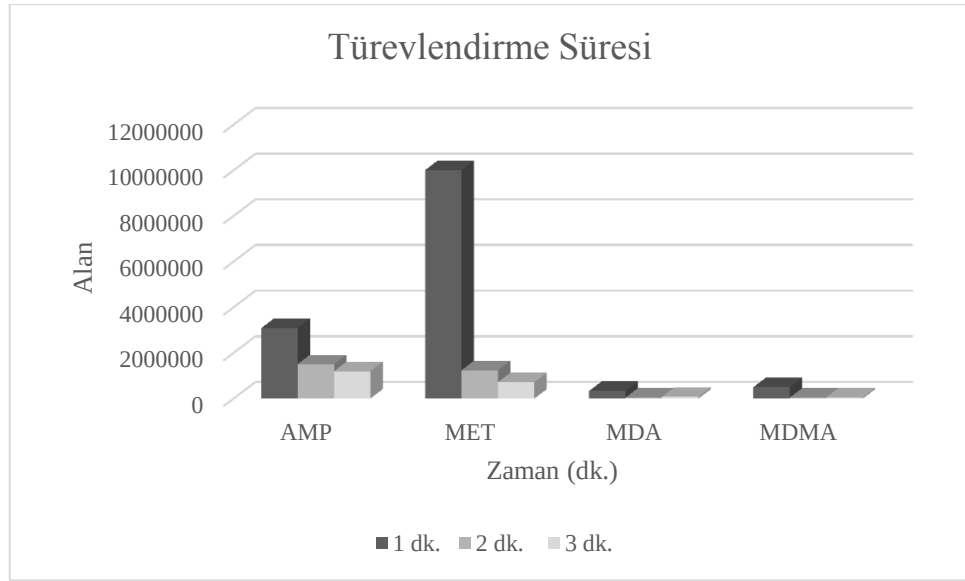
Grafik 1-3'ten görüleceği üzere en iyi sonuçlar 10 dk. adsorpsiyon süresinde, 80 °C türevlendirme sıcaklığında ve 1 dk. türevlendirme süresinde elde edildi.



Grafik 1. Farklı adsorpsiyon sürelerinin etkisi



Grafik 2. Farklı türevlendirme sıcaklıklarının etkisi

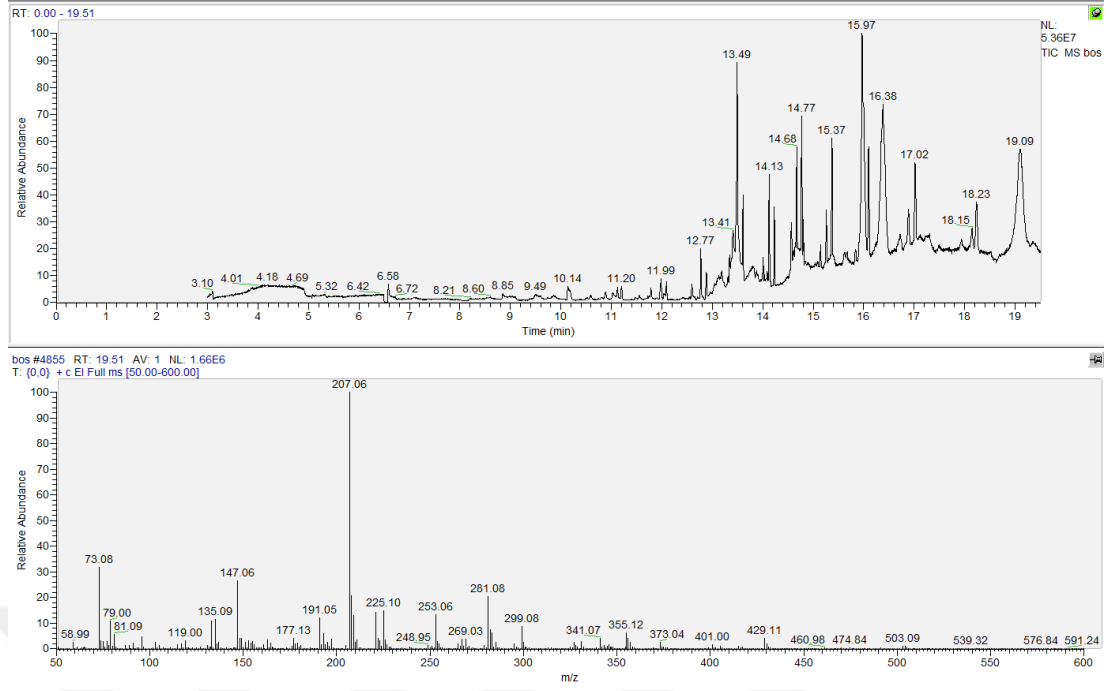


Grafik 3. Farklı türevlendirme sürelerinin etkisi

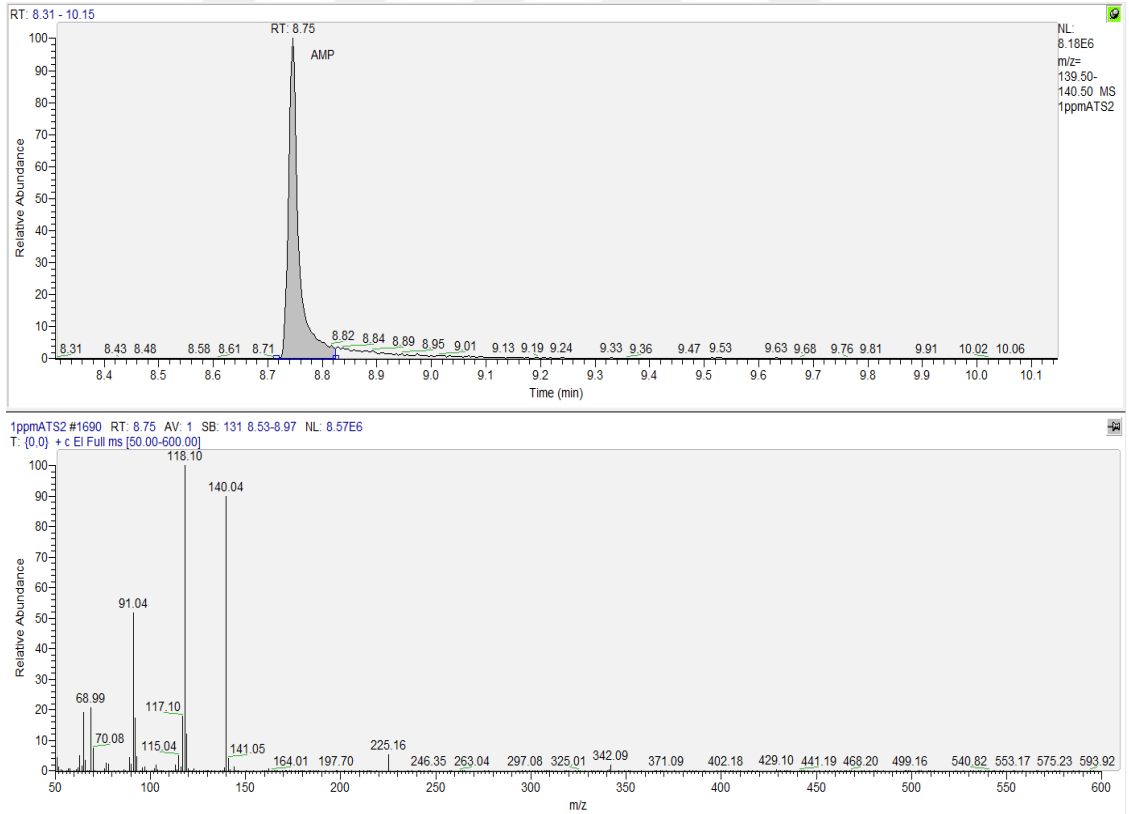
4.1.3. Yöntem Validasyonuna Ait Veriler

4.1.3.1. Seçimlilik

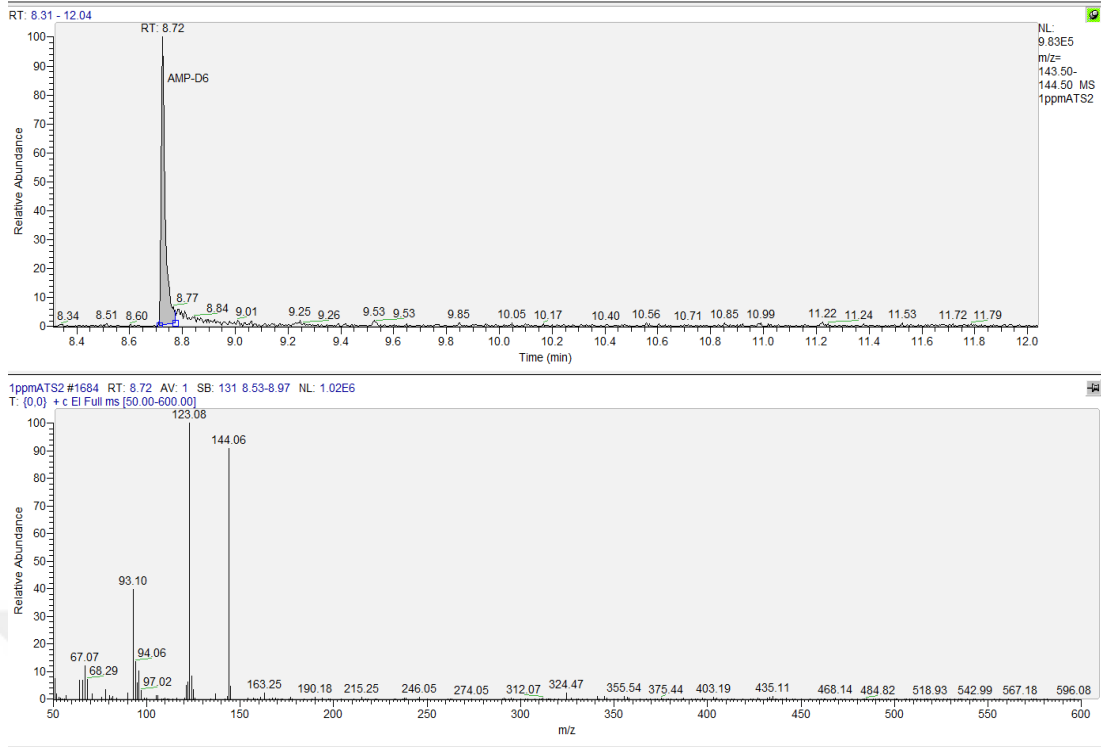
Bir analitik yöntemin seçimliliği, bir analiti, örnek matriksinde bulunması beklenebilecek girişimler varlığında doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğidir. Seçimlilik, analit pikinin beklenen zaman penceresinde kromatografik körlerin (analit içermediği bilinen bir örnek) incelenmesiyle kontrol edilir (Whitmire & Ross, 2015). Geliştirilen SPME yöntemi Şekil 23-28'den görüleceği gibi AMP, MET, MDA ve MDMA için seçimli bir yöntemdir.



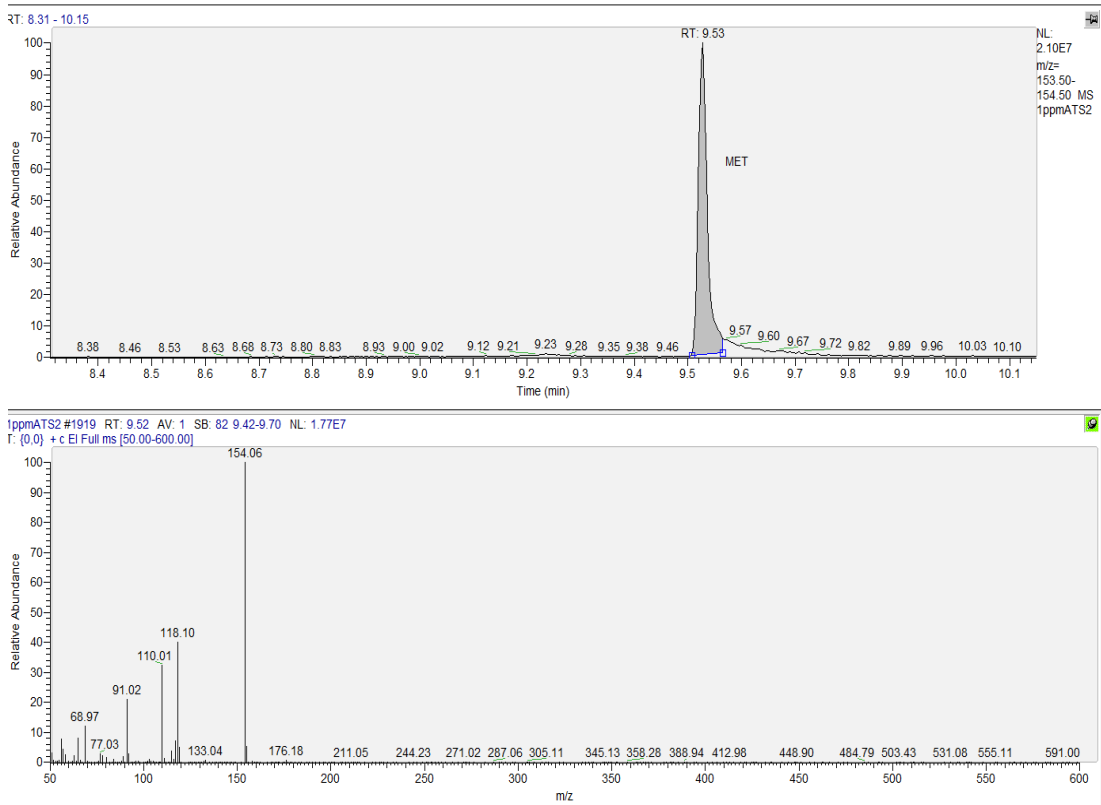
Şekil 23. Kör idrar örneğine ait kromatogram ve spektrum



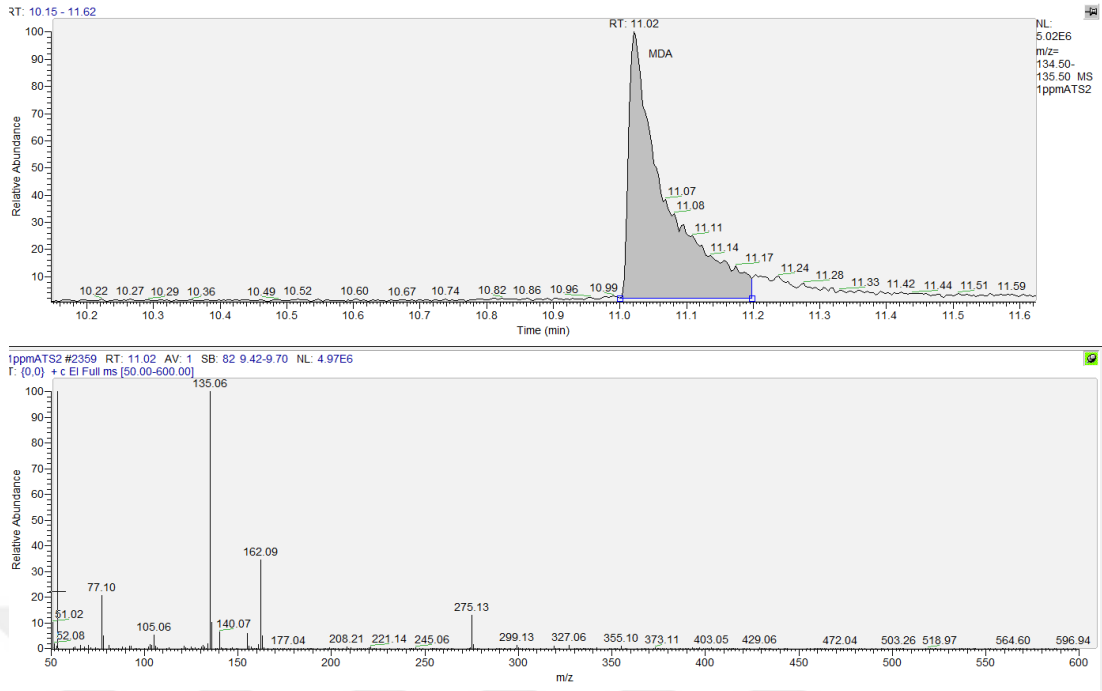
Şekil 24. SPME yöntemiyle analiz edilen amfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum



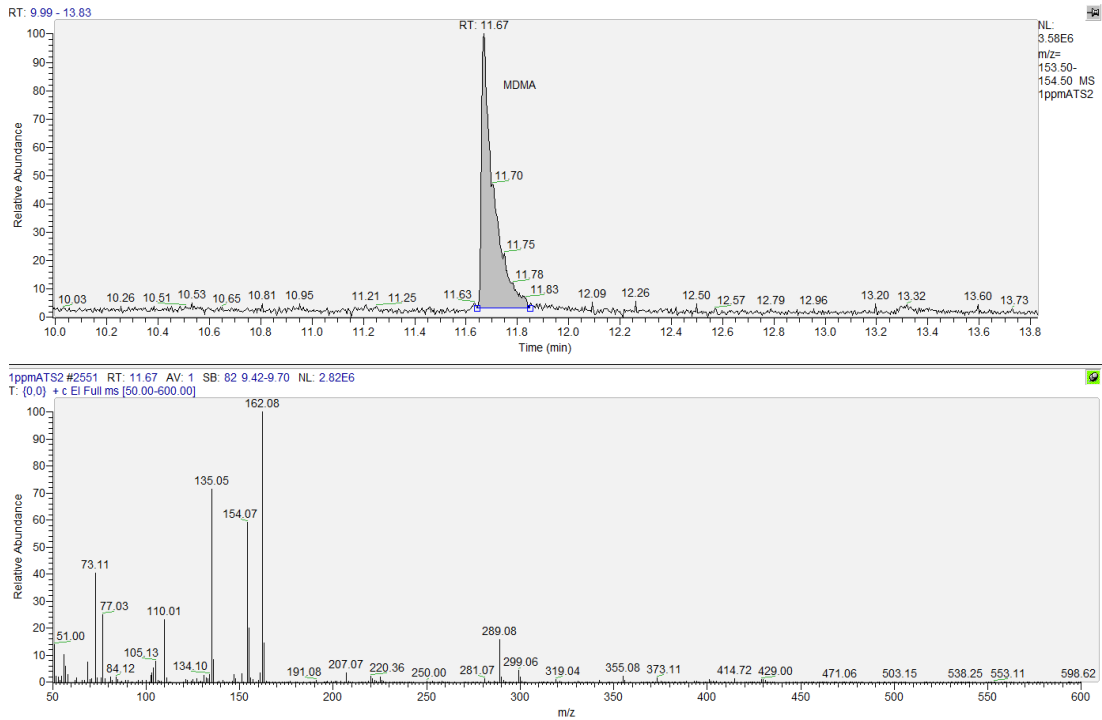
Şekil 25. SPME yöntemiyle analiz edilen amfetamin-d6 analitine ait kromatogram ve spektrum



Şekil 26. SPME yöntemiyle analiz edilen metamfetamin analitine ait kromatogram ve spektrum



Şekil 27. SPME yöntemiyle analiz edilen MDA analitine ait kromatogram ve spektrum



Şekil 28. SPME yöntemiyle analiz edilen MDMA analitine ait kromatogram ve spektrum

4.1.3.2. Doğruluk, Gerçeklik ve Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değer arasındaki yakınlığın ifadesidir. Doğruluk parametresi, gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır (Yılmaz, 2013). Gerçeklik çalışması geri kazanım (% recovery, %R) olarak da ifade edilmektedir. Geri kazanım, ekstraksiyon verimliliğidir. Bir matriks içindeki bir analitin geri kazanımı, saf standardın gerçek konsantrasyonu ile matrikse eklenmiş ve ekstrakte edilmiş olan analit miktarının ölçüm sonucunun karşılaştırılmasıdır.

Bir yöntemin kesinliği, prosedür birden çok örneğe tekrar tekrar uygulandığında bireysel test sonuçları arasındaki uyuma derecesidir. Kesinlik, bir dizi örneğin enjekte edilmesiyle veya homojen bir lottan çok sayıda numuneden alınan bir dizi örneğin analiz edilmesiyle ölçülür. Genellikle standart sapma (SD), bağıl standart sapma (% RSD), varyans veya varyans katsayısı (CV) olarak ifade edilir. Biyolojik örnekler için % 15'den az ve diğer derişim seviyelerinde %10 RSD ile kesinlik sağlanabilir (Eurachem, 2014). Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir. Bağımsız deney sonuçlarının, kısa zaman aralıkları içinde, aynı donanım kullanılarak, deneyi yapan aynı kişi tarafından, aynı laboratuvarında, eş değer deney maddeleri üzerinde aynı yöntem ile elde edilmesidir. Gün-içi tekrarlanabilirlik için her analit 50 ng/ml ve 250 ng/ml olmak üzere iki farklı derişimde 3 tekrarlı çalışıldı. Günler-arası tekrarlanabilirlik için ise; her analit 50 ng/ml ve 250 ng/ml olmak üzere iki farklı derişimde 5 gün boyunca üç tekrarlı çalışıldı. Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirlik verileri Tablo 15-19'da gösterilmiştir.

Tablo 15. AMP, MET, MDA ve MDMA'ya ait gün-içi tekrarlanabilirlik verileri

Gün-içi Tekrarlanabilirlik								
	AMP		MET		MDA		MDMA	
	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml
1.paralel	52,38	242,98	52,93	236,96	40,01	249,37	35,45	232,69
2.paralel	46,72	258,80	56,22	249,18	45,14	233,08	34,24	243,16
3.paralel	48,30	255,28	55,06	240,25	47,51	230,48	39,48	240,58
Ortalama	49,14	252,35	54,74	242,13	44,22	237,64	36,39	238,81
Std. Sapma	2,92	8,31	1,67	6,32	3,83	10,24	2,74	5,45
%RSD	5,94	3,29	3,05	2,61	8,67	4,31	7,53	2,28

Tablo 16. Amfetamine ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri

Günler-arası Tekrarlanabilirlik										
AMFETAMİN										
	1.Gün		2.Gün		3.Gün		4.Gün		5.Gün	
	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml
1.paralel	52,38	242,98	46,36	231,19	44,84	237,57	51,50	262,21	51,56	237,22
2.paralel	46,72	258,80	48,09	238,48	41,13	236,50	54,18	256,75	46,06	235,92
3.paralel	48,30	255,28	52,17	244,39	47,00	240,11	55,75	257,03	45,85	244,49
Ortalama	49,14	252,35	48,87	238,02	44,32	238,06	53,81	258,66	47,83	239,21
% Ort.Geri Kazanım	98,27	100,94	97,74	95,21	88,64	95,22	107,62	103,47	95,65	95,68
Std. Sapma	2,92	8,31	2,99	6,61	2,97	1,86	2,15	3,08	3,24	4,62
%RSD	5,94	3,29	6,11	2,78	6,70	0,78	4,00	1,19	6,77	1,93

Tablo 17.Metamfetamine ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri

Günler-arası Tekrarlanabilirlik										
METAMFETAMİN										
	1.Gün		2.Gün		3.Gün		4.Gün		5.Gün	
	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml
1.paralel	52,93	263,01	54,85	236,96	42,03	246,31	55,55	265,14	46,89	256,69
2.paralel	56,22	261,82	53,05	249,18	41,74	260,59	53,57	244,65	47,16	278,96
3.paralel	55,06	278,45	52,45	240,25	40,64	259,65	61,26	255,24	46,01	252,89
Ortalama	54,74	267,76	53,45	242,13	41,47	255,52	56,79	255,01	46,69	262,84
% Ort.Geri Kazanım	109,47	107,10	106,90	96,85	82,94	102,21	113,58	102,00	93,38	105,14
Std. Sapma	1,67	9,28	1,25	6,32	0,73	7,98	3,99	10,25	0,60	14,08
%RSD	3,05	3,46	2,34	2,61	1,77	3,12	7,03	4,02	1,29	5,36

Tablo 18. MDA'ya ait günler-arası tekrarlanabilirlik veriler

Günler-arası Tekrarlanabilirlik										
MDA										
	1.Gün		2.Gün		3.Gün		4.Gün		5.Gün	
	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml
1.paralel	40,01	249,37	43,06	230,12	40,10	242,59	41,92	248,25	38,62	236,73
2.paralel	45,14	233,08	38,09	242,81	36,10	263,99	36,86	252,50	34,97	253,09
3.paralel	47,51	230,48	40,58	238,70	40,61	234,56	36,81	246,89	39,99	245,17
Ortalama	44,22	237,64	40,58	237,21	38,93	247,05	38,53	249,21	37,86	245,00
% Ort.Geri Kazanım	88,44	95,06	81,15	94,88	77,87	98,82	77,06	99,68	75,72	98,00
Std. Sapma	3,83	10,24	2,48	6,47	2,47	15,21	2,94	2,93	2,59	8,18
%RSD	8,67	4,31	6,12	2,73	6,34	6,16	7,62	1,17	6,85	3,34

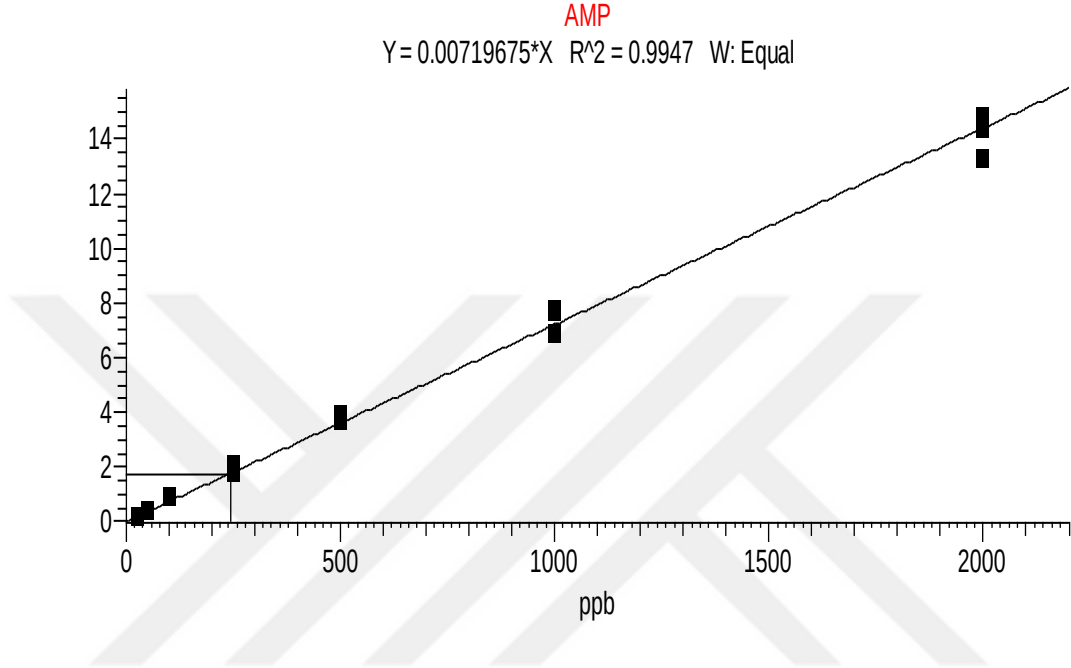
Tablo 19. MDMA'ya ait günler-arası tekrarlanabilirlik verileri

Günler-arası Tekrarlanabilirlik										
MDMA										
	1.Gün		2.Gün		3.Gün		4.Gün		5.Gün	
	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml	50 ng/ml	250 ng/ml
1.paralel	35,45	232,69	37,44	230,80	35,46	237,69	34,40	248,74	39,39	248,80
2.paralel	34,24	243,16	35,78	229,91	36,10	251,75	41,77	243,29	35,74	244,84
3.paralel	39,48	240,58	44,79	247,75	43,59	256,91	34,54	250,37	36,05	235,08
Ortalama	36,39	238,81	39,33	236,15	38,38	248,78	36,90	247,47	37,06	242,91
% Ort.Geri Kazanım	72,78	95,52	78,67	94,46	76,76	99,51	73,81	98,99	74,12	97,16
Std. Sapma	2,74	5,45	4,80	10,05	4,52	9,95	4,21	3,71	2,02	7,06
%RSD	7,53	2,28	12,20	4,26	11,78	4,00	11,42	1,50	5,46	2,91

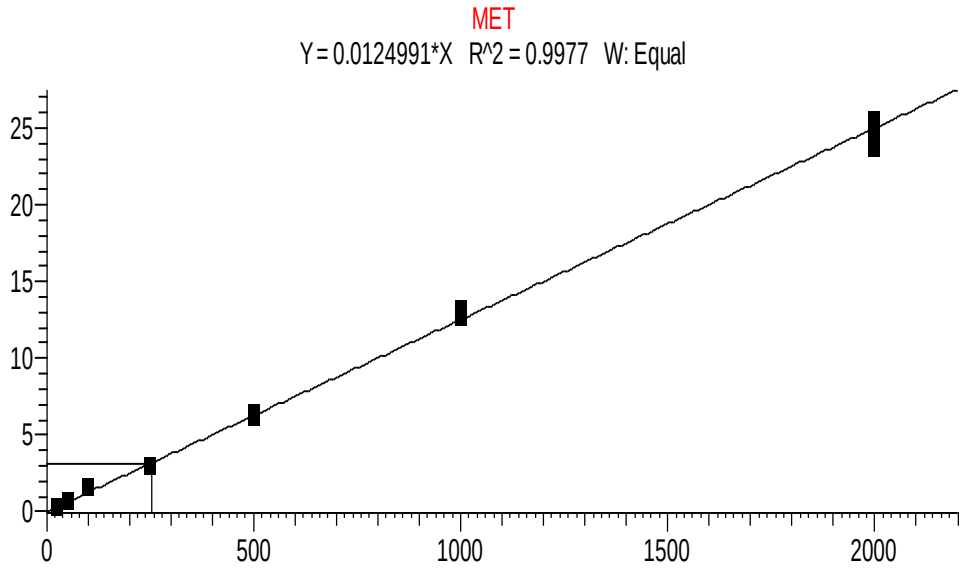
4.1.3.3. Doğrusallık (Linearite)

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıktaki analitlerin derişimiyle orantılı olarak, bir kerede veya iyi tanımlanmış matematiksel ayarlamalar yardımıyla kontrol sonuçlarını ortaya çıkarma yeteneğidir. Doğrusallık % 80 - % 120 oranındaki derişim aralığına sahip en az beş ya da beşten fazla standarttan en az 3 tekrar çalışılmasıyla elde edilir (Söğüt Ertaş & Kayali, 2005). Veriler grafiğe geçirilerek, lineer regrasyon analizi yapılır ve korelasyon katsayısı (R^2) hesaplanır. Korelasyon katsayısı 0,99'dan büyük olmalıdır.

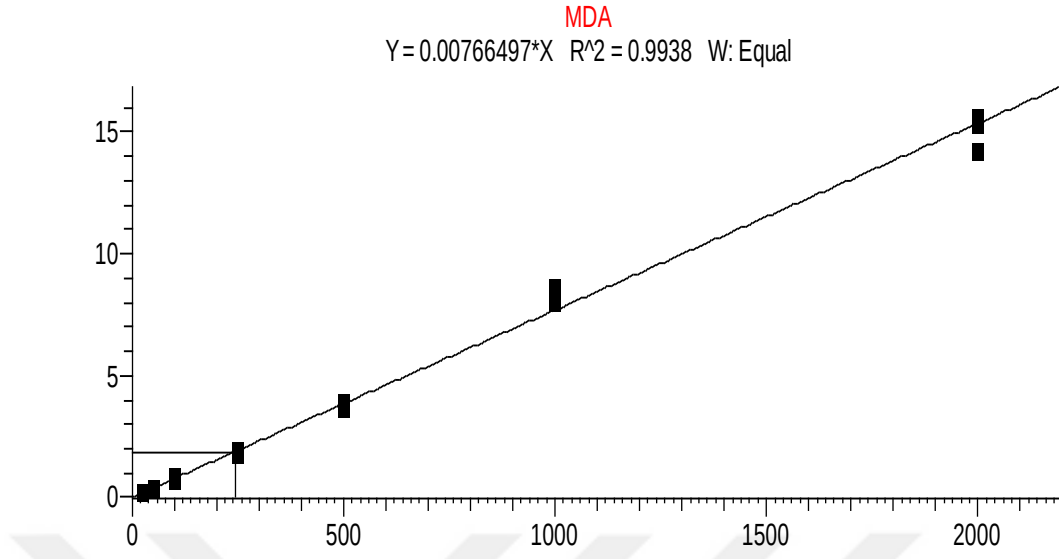
Bu çalışmada AMP, MET, MDA ve MDMA için 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 ng/ml standart derişiminde ve 100 ng/ml derişimde iç standart (AMP-d6) eklenerek 7 noktalı (n=3) kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisi, derişimlere denk gelen standart alanı/iç standart alanı hesaplanarak çizildi (Grafik 4-7).



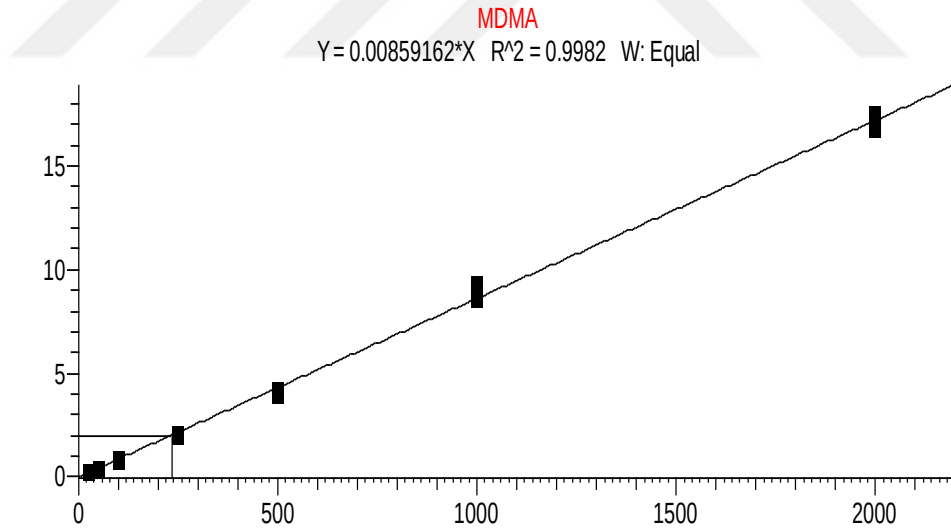
Grafik 4. Amfetamine ait kalibrasyon eğrisi



Grafik 5. Metamfetamine ait kalibrasyon eğrisi



Grafik 6. MDA'ya ait kalibrasyon eğrisi



Grafik 7. MDMA'ya ait kalibrasyon eğrisi

4.1.3.4. Çalışma Aralığı

Bir analitik prosedürün çalışma aralığı, analitik prosedürün uygun kesinlik düzeyine, doğruluğa ve doğrusallığa sahip olduğu kanıtlanmış numunedeki analitin üst ve alt

derişimi arasındadır (Aydoğdu et al., 2018). Geliştirilen SPME yönteminin çalışma aralığı 25 ng/ml-2000 ng/ml arasındadır.

4.1.3.5. Duyarlılık

Duyarlılık; test işleminin konsantrasyonundaki küçük değişimleri kaydetme kapasitesidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimidir (Söğüt Ertaş & Kayali, 2005). Kalibrasyon eğrilerindeki eğimlere bakıldığında AMP için duyarlılık 0,0072, MET için 0,0125, MDA için 0,0077 ve MDMA için 0,0086'dır.

4.1.3.6. Belirtme Alt Sınırı (Limit of Detection, LOD) ve Saptama Alt Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)

Tek bir analitik prosedürün belirtme alt sınırı (LOD) bir numunedeki analitin tespit edilebilen ancak mutlak kesin bir değer olarak nicelleştirilemeyen en düşük miktardır. Saptama Alt Sınırı (LOQ) ise; analitin uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimidir. LOD ve LOQ farklı yaklaşımlar kullanılarak hesaplanabilmektedir. Bunlar arasında görsel değerlendirmeye dayalı, sinyal/gürültü (S/N) oranına dayalı, yanıtın (response) ve eğimin (slope) standart sapmasına dayalı, krn (blank) standart sapmasına dayalı ve kalibrasyon eğrisine dayalı yaklaşımlar bulunmaktadır (Aydoğdu et al., 2018).

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ'sunun belirlenmesinde sinyal/gürültü (S/N) oranına dayalı yaklaşım kullanıldı. 50 µg/l derişimde elde edilen kromatogramdan pik yüksekliği ve gürültü ölçülerek S/N oranı elde edildi ve aşağıdaki formüle göre yöntemin LOD'si ve LOQ'su hesaplandı.

$$LOD = \frac{Std_c * 3 * B_h}{Std_h} \quad LOQ = \frac{Std_c * 10 * B_h}{Std_h}$$

B_h : Kr Sinyal Gürültü Yüksekliği (2-3 dk aralık)

Std_h : En düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği

Std_c : Standardın derişimi

Tablo 20. Analitlere ait LOD ve LOQ değerleri

	AMP	MET	MDA	MDMA
S/N	25	27	15	13
LOD (ng/ml)	6	5,56	9,99	11,54
LOQ (ng/ml)	20	18,52	33,33	38,46

4.1.3.7. Matriks Etkisi

Matriks etkisi, örnekte bulunup referans materyalde bulunmayan maddelerin test sonucunu etkilemesidir. Matriks etkisi, kütle spektrometrik yöntemlerle en az 6 gönüllüden (donörden) alınan boş matriks kullanılarak araştırılmalıdır. Matriks varlığındaki pik alanının (kör matriksin analit katıldıktan sonra ekstaksiyonu yapıp ölçülen pik alanı), matriks yokluğundaki pik alanına (söz konusu analitin saf çözeltisinin pik alanı) oranıyla hesaplaması gerçekleştirilir. Bu çalışmada 100 µg/l derişimde idrar örneğinde ve metanoldeki standartların elde edilen alanları karşılaştırıldı. Tablo 21’den görüleceği üzere matriks etkisi bulunamadı.

Tablo 21. Analitlere ait matriks etkisi parametresi verileri

	AMP	MET	MDA	MDMA
İdrardaki std.alanı	2821717	5059342	3044024	3414949
Metanoldeki std. alanı	5352627	7988636	4971110	5282149
Oran	0,53	0,63	0,61	0,65

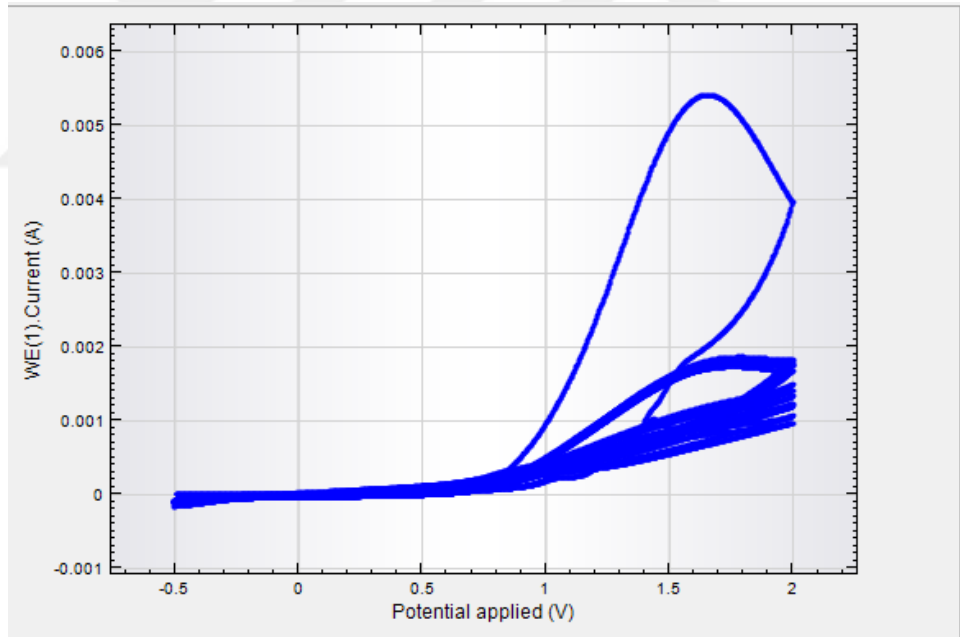
4.1.3.8. Taşınma (Carry over)

Validasyon çalışmalarında taşınma, yüksek derişimdeki bir numuneden veya en yüksek kalibrasyon standardından sonra kör örnek enjekte edilerek değerlendirilmelidir. Yüksek derişimde olan standarttan sonra çalışılan kör örnek (LLOQ) %20'sinden ve iç standardın %5'inden büyük olmaması gerekmektedir. Çalışmada 1000 ng/ml derişimde örnek çalışılıp enjekte edildikten sonra analit içermeyen kör örneğin enjeksiyonu yapıldı. Herhangi bir analite dair pik saptanmadı.

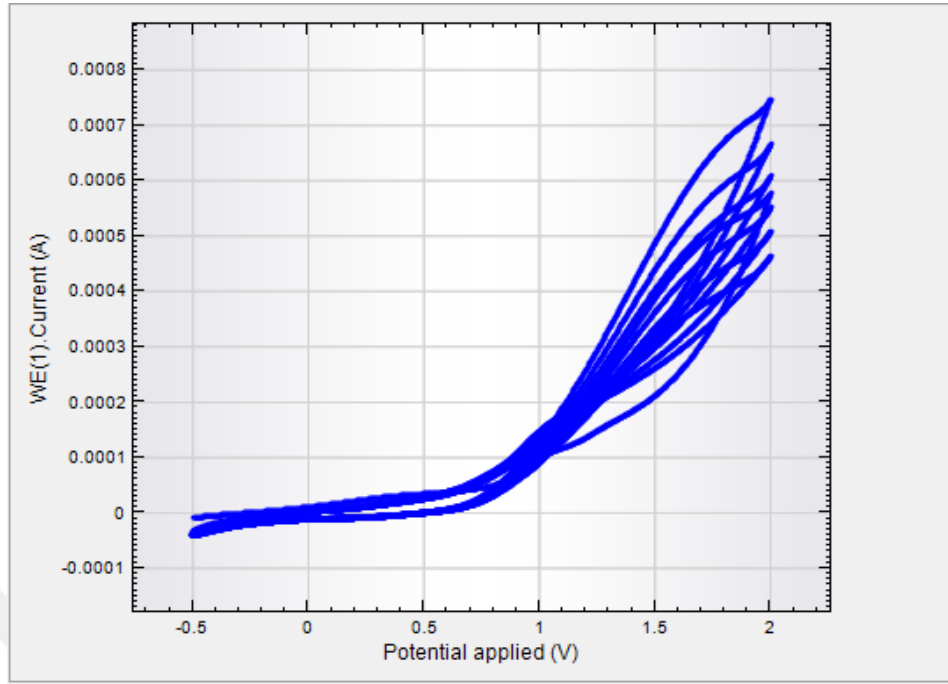
4.1.4. Farklı Nanomalzemelerle Yapılan Elektrokimyasal Kaplama İşlemi ile Elde Edilen Laboratuvar Tipi Fiberlere Ait Veriler

4.1.4.1. Elektrokimyasal Polimerizasyon Verileri

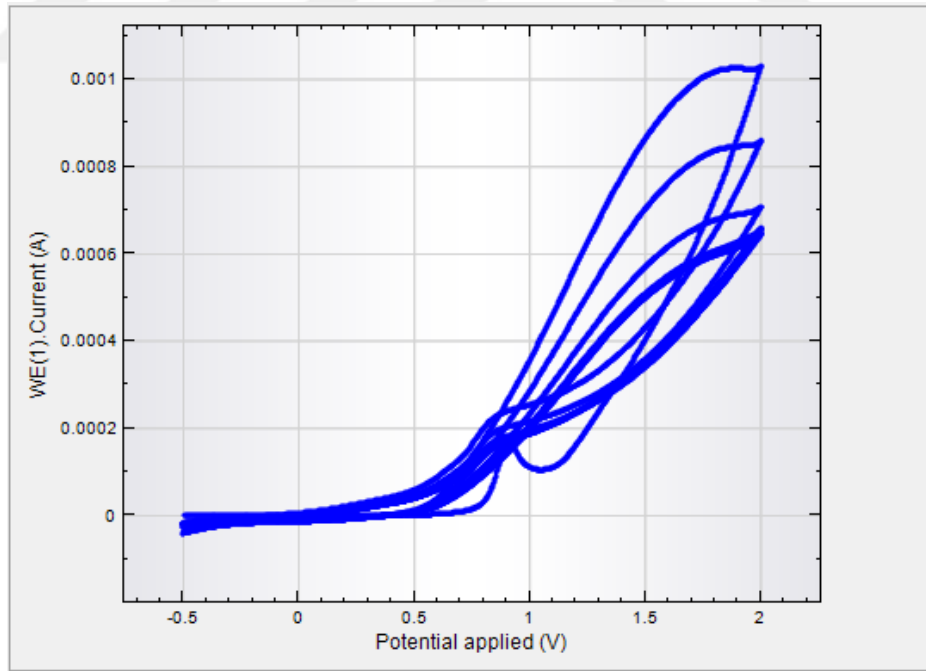
Elektrokimyasal polimerizasyon yardımıyla kaplama yapılan nanomalzemelere ait voltammogramlar Şekil 29-Şekil 33'te verilmiştir.



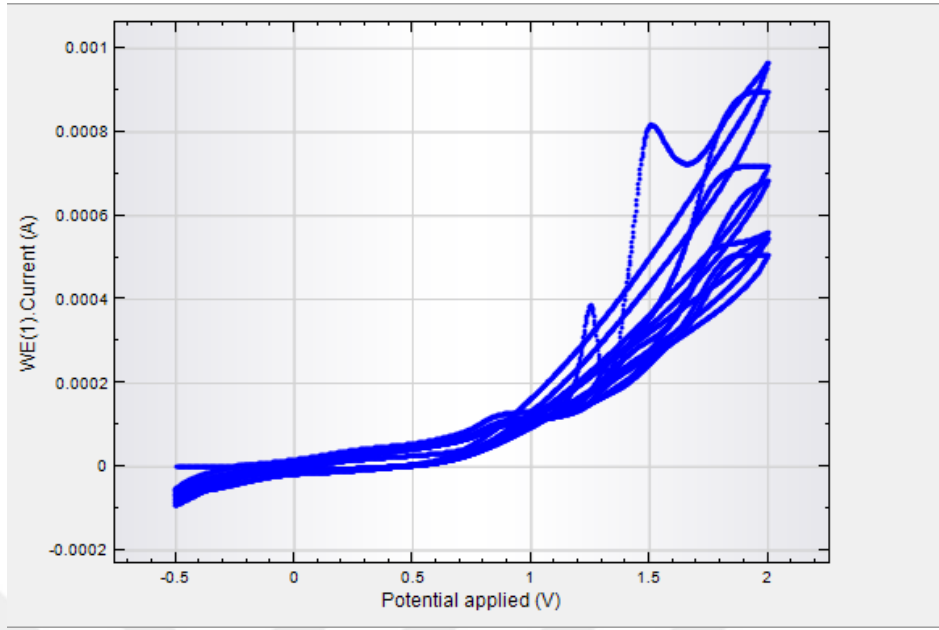
Şekil 29. PPy- MWCNT'ye ait voltammogram



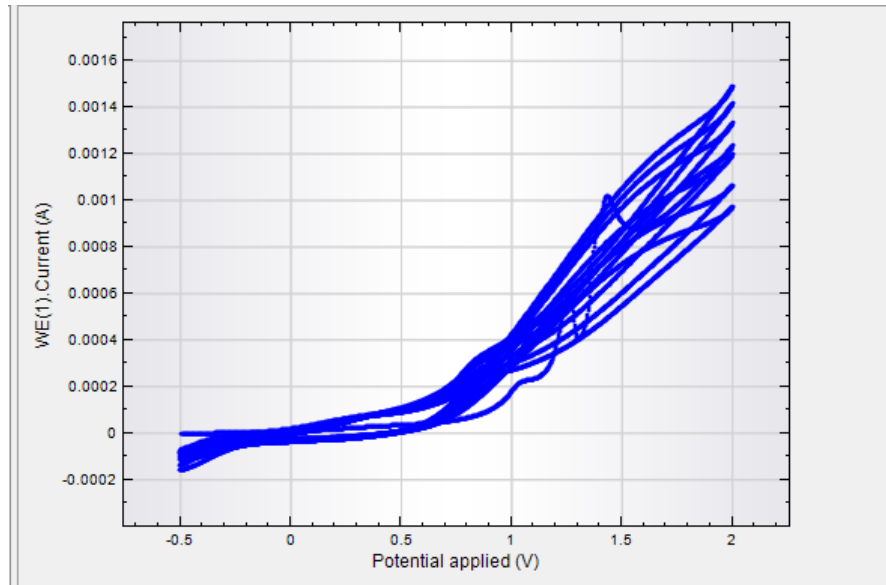
Şekil 30. PPy-MWCNT-COOH'a ait voltammogram



Şekil 31. PPy-Azot Katkılı-MWCNT'ye ait voltammogram



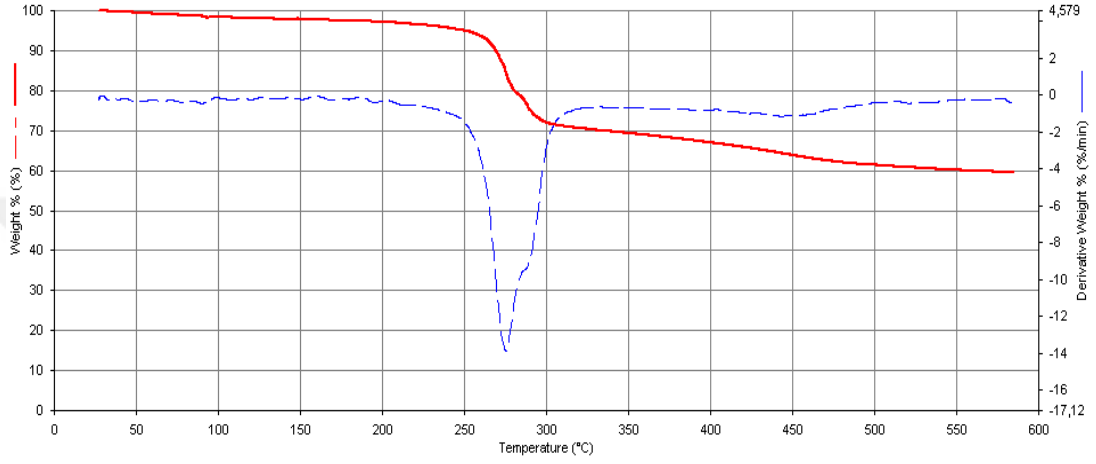
Şekil 32. PPy-Grafen'e ait voltammogram



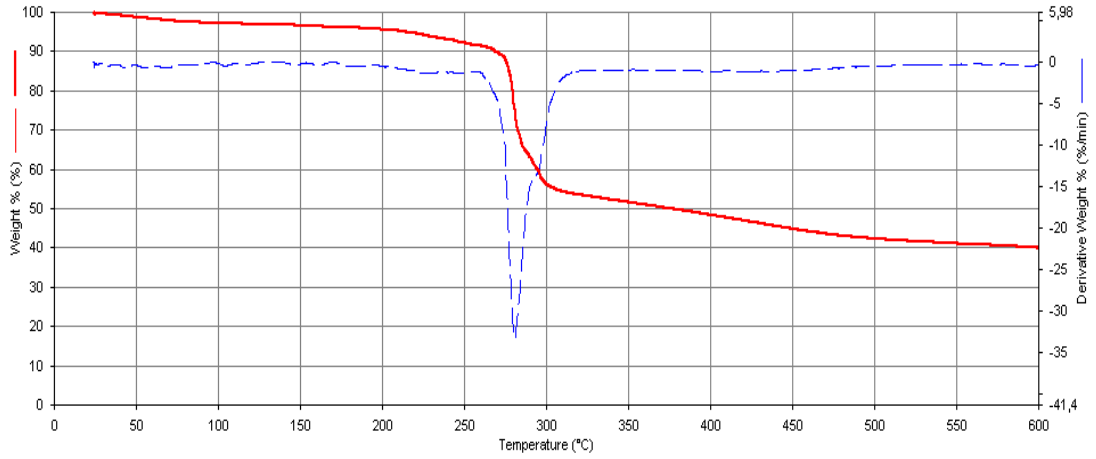
Şekil 33. PPy-Nanoselüloz'a ait voltammogram

4.1.4.2. TGA Verileri

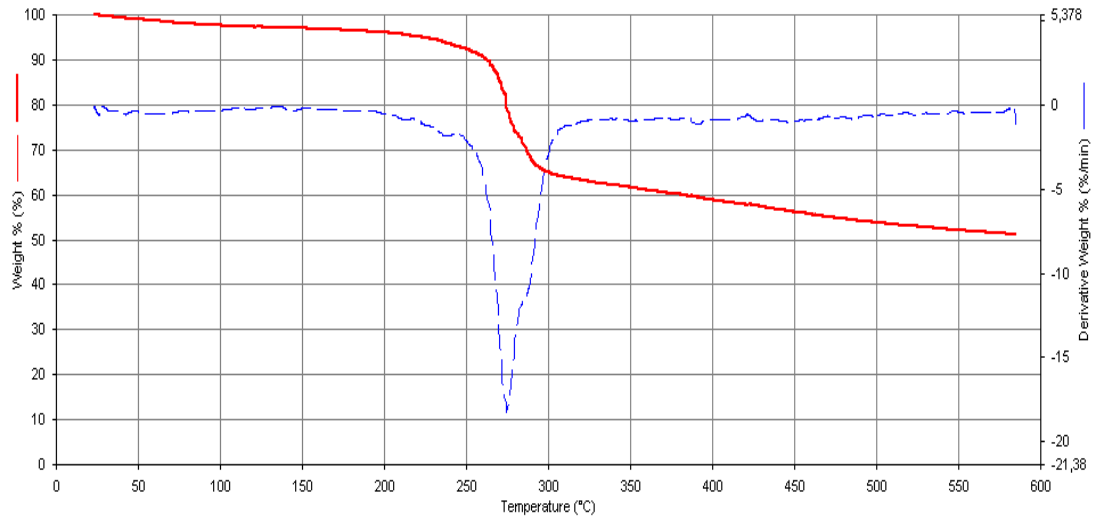
Şekil 34-38'den görüleceği üzere nanomalzemeler 250⁰C'den sonra termal olarak dayanaklılıklarını koruyamamaktadır. Geliştirilen SPME yönteminde desorpsiyon işlemi bu sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



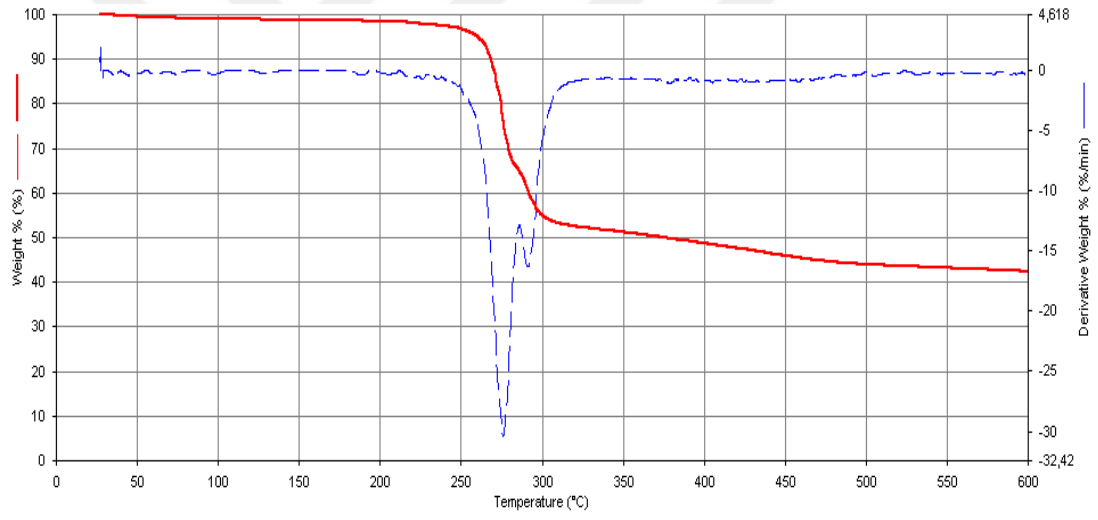
Şekil 34. PPy- MWCNT'ye ait TGA verileri



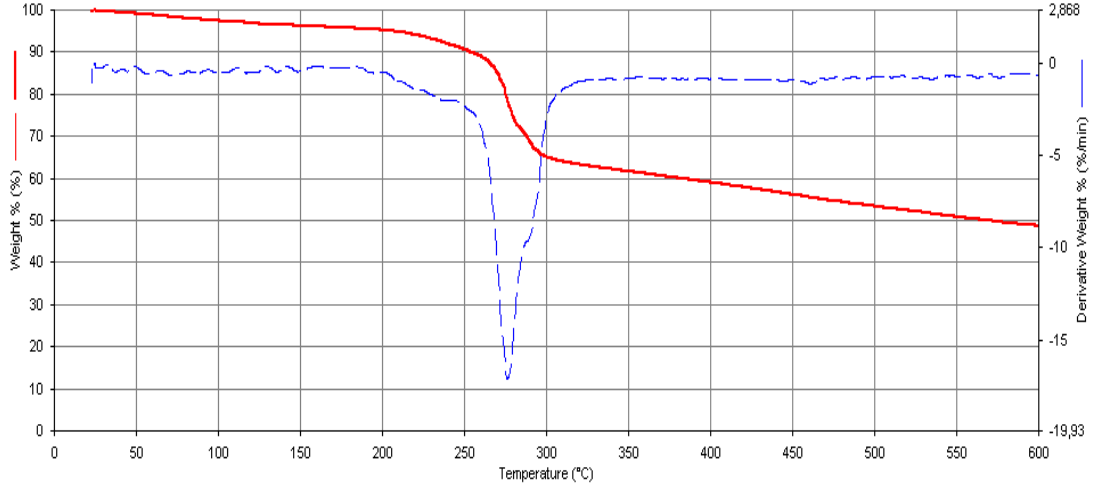
Şekil 35. PPy-MWCNT-COOH'a ait TGA verileri



Şekil 36. PPy-Azot Katkılı-MWCNT'ye ait TGA verileri



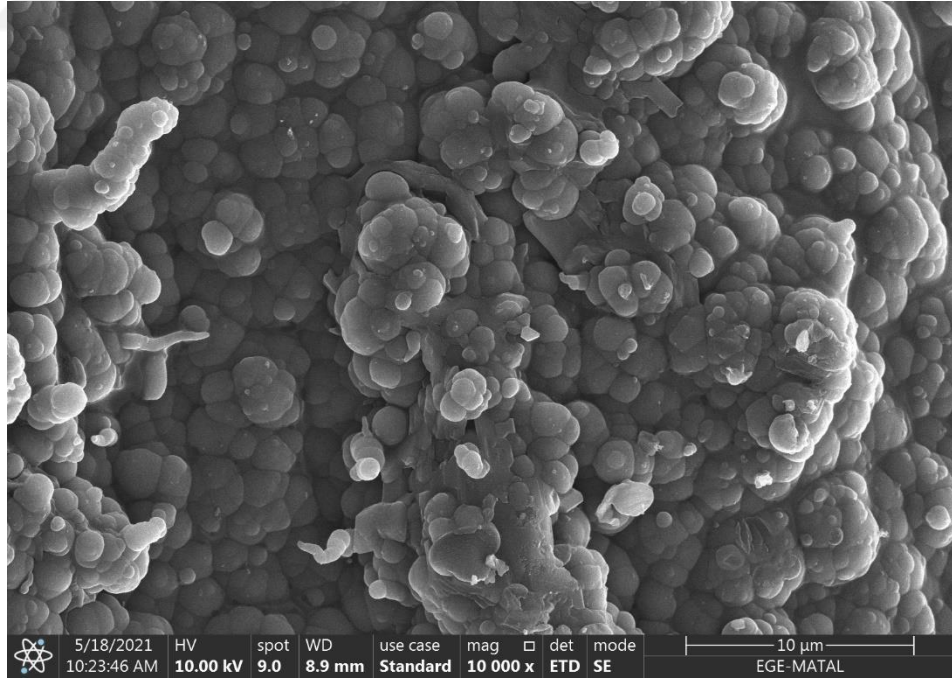
Şekil 37. PPy-Grafen'e ait TGA verileri



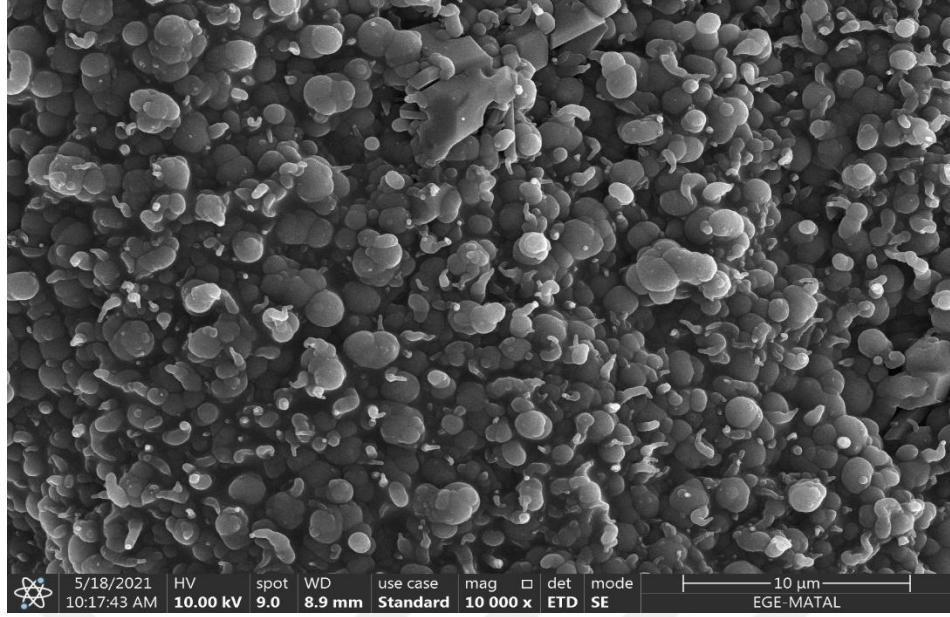
Şekil 38. PPy-Nanoselüloz'a ait TGA verileri

4.1.4.3. SEM Analizi Verileri

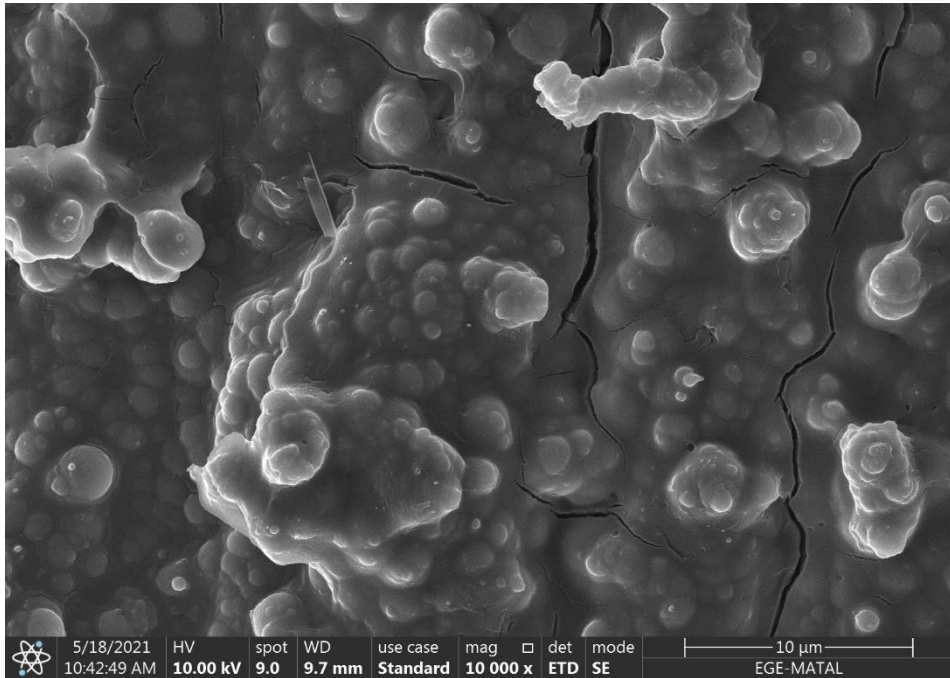
Nanamalzemelerin elektropolimerizasyon yardımıyla çelik tele yapılan kaplamaların SEM görüntüleri Şekil 39-Şekil 43'te gösterilmiştir.



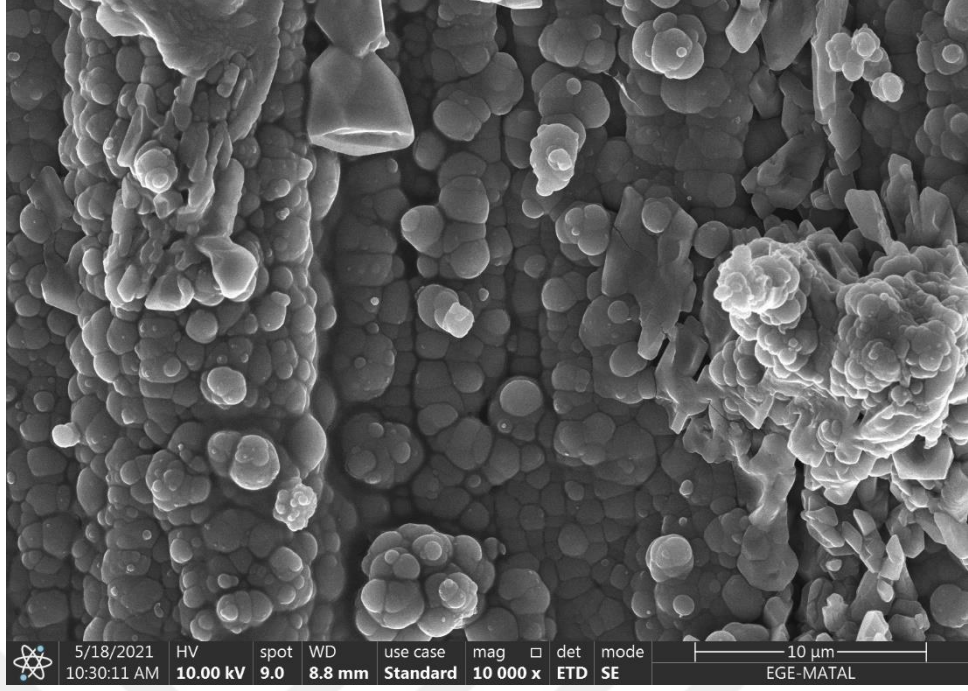
Şekil 39. PPy-MWCNT'ye ait SEM görüntüsü



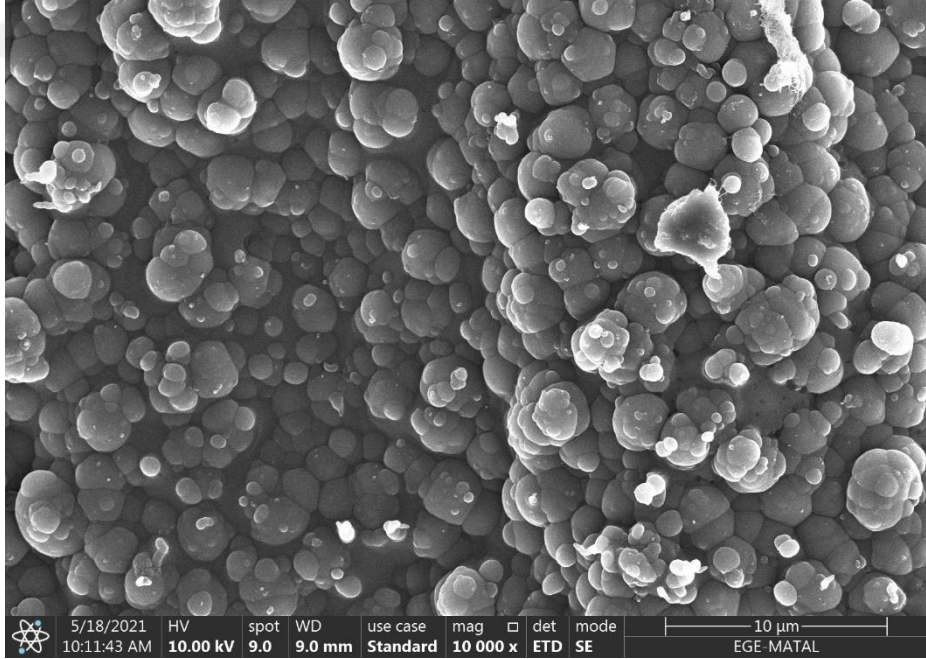
Şekil 40. PPy-MWCNT-COOH'a ait SEM görüntüsü



Şekil 41. PPy-Azot katkılı-MWCNT'ye ait SEM görüntüsü



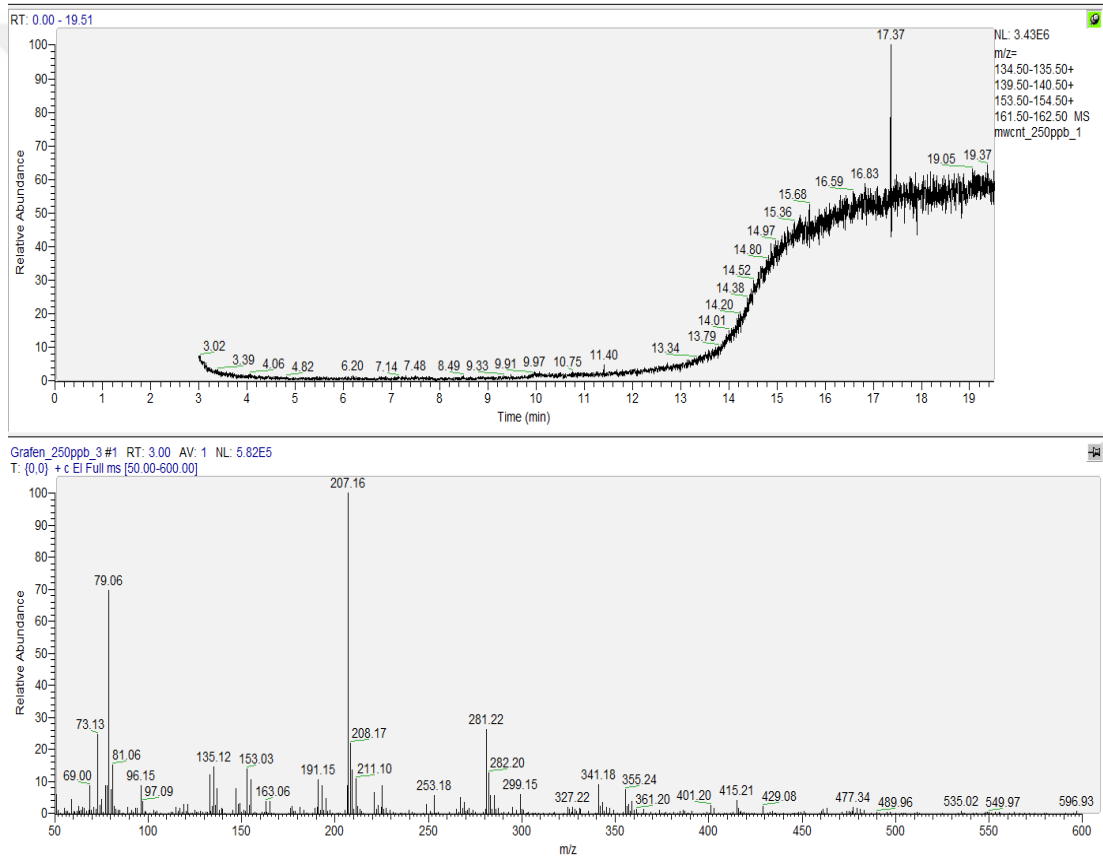
Şekil 42. PPy-Grafene ait SEM görüntüsü



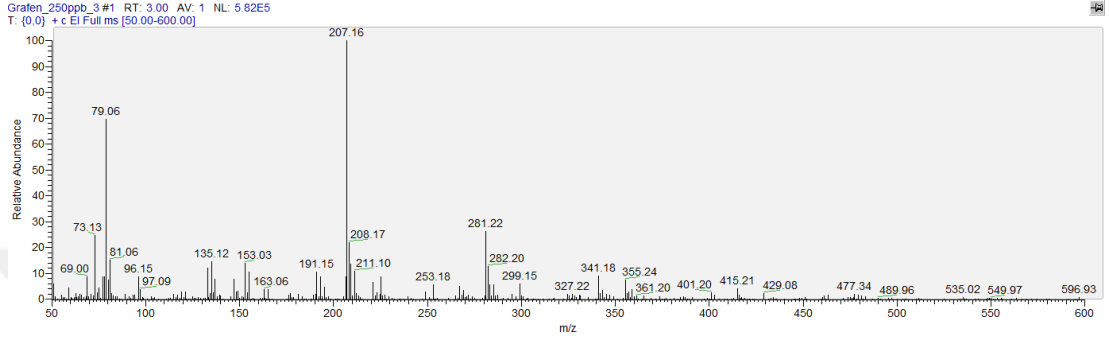
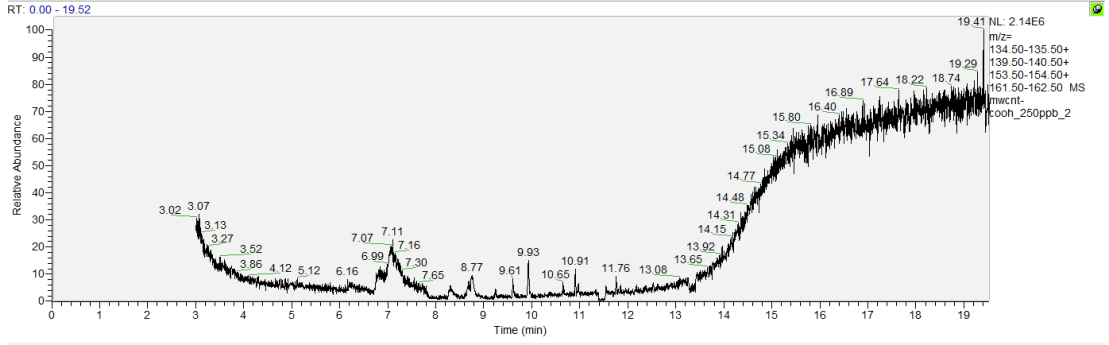
Şekil 43. PPy- Nanoselüloz'a ait SEM görüntüsü

4.1.4.4. Farklı Nanomalzemelerle Kaplaması Yapılan Laboratuvar Tipi Fiberlerin Valide edilen SPME Yöntemi ile Uygulanması

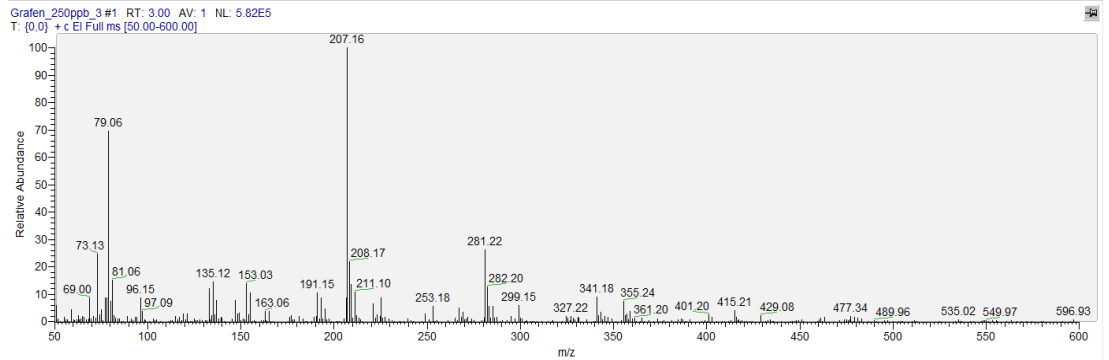
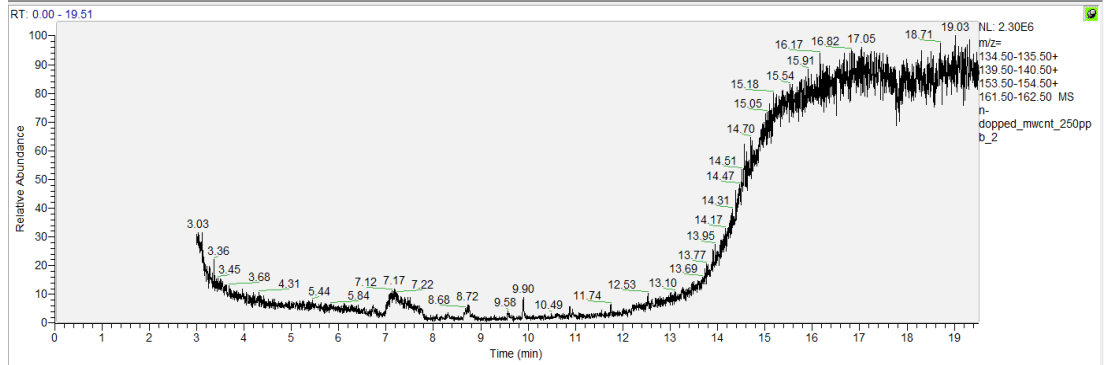
PDMS/DVB fiberi ile valide edilen SPME yöntemi elektropolimerizasyon tekniği ile kaplaması yapılan fiberlere uygulandı. 250 ng/ml derişimde analitlerin standart katımı yapılan idrar örneği nanomalzemelerle kaplaması yapılan fiberler ile üç tekrar olacak şekilde analiz edildi. Analiz verileri kantitasyon iyonları girilerek elde edilen kromatogramlardan da görüleceği üzere herhangi bir analit saptanamadı (Şekil 44-48).



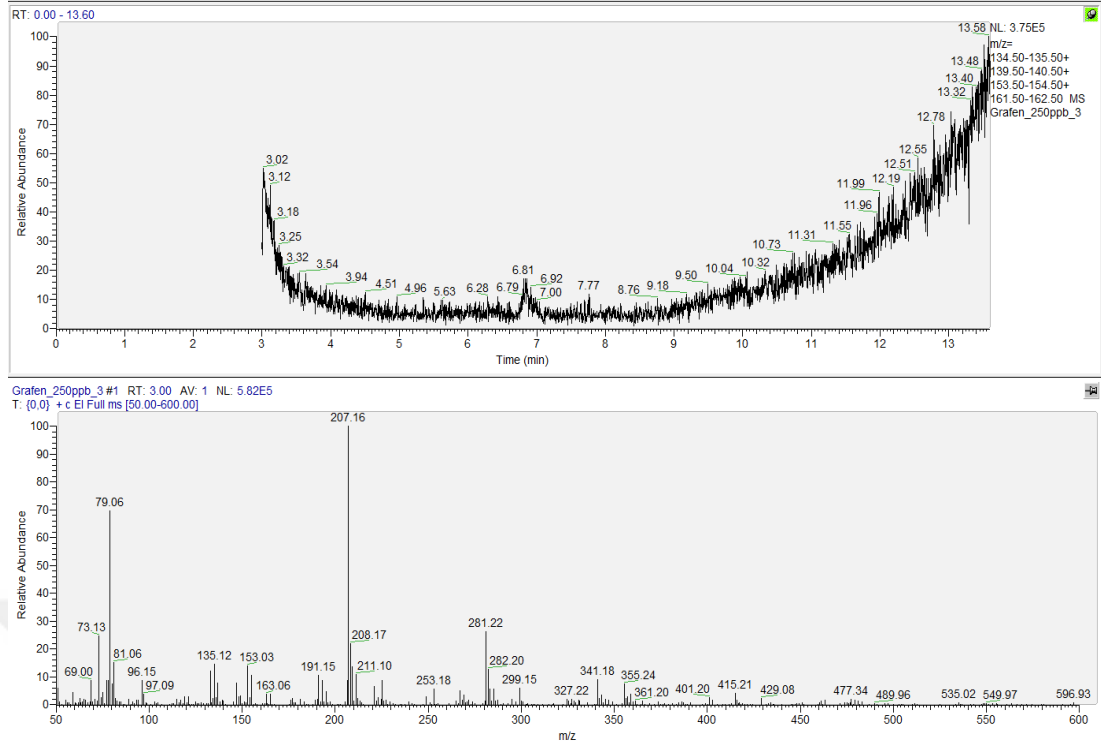
Şekil 44.PPy-MWCNT fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum



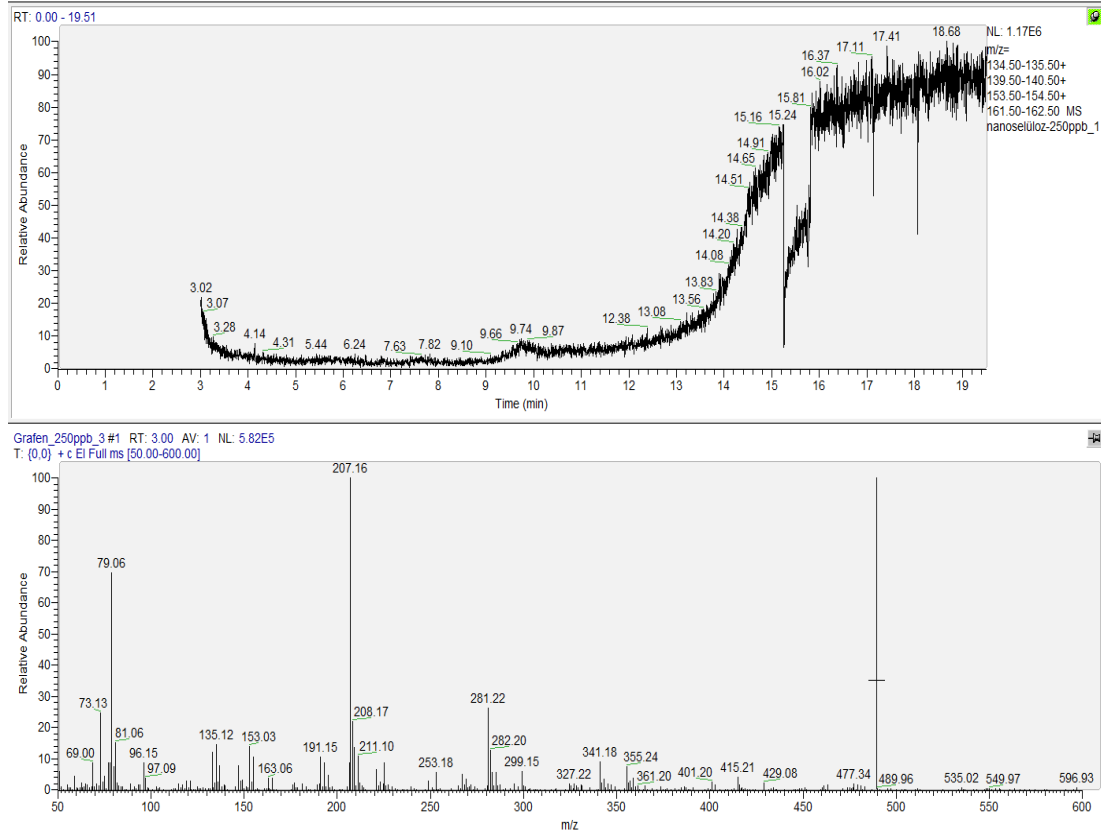
Şekil 45. PPy-MWCNT-COOH fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum



Şekil 46. PPy-Azot Katkılı-MWCNT fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum



Şekil 47. PPy-Grafen fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum



Şekil 48. PPy-Nanoselüloz fiberi ile analize ait kromatogram ve spektrum

Tartışma

Son yıllarda analitik toksikoloji ve kimya alanındaki teknolojik gelişmeler; yasal & yasadışı maddelerin biyolojik örneklerde çok düşük derişimlerde hassas ve doğru analizine olanak sağlamıştır. Düşük analit derişimlerine rağmen, kullanılan örnek miktarında da azalma meydana gelmiştir. Bu azalma ile birlikte ve potansiyel olarak toksik organik çözenlerin aşırı miktarda kullanılmasının bir sonucu olarak (sonradan çevre kirliliğı ve bunların uygun şekilde bertaraf edilmesiyle ilişkili maliyetler nedeniyle de), minyatürize edilmiş örnekleme ve ekstraksiyon tekniklerinin kullanılmasına yönelik artan bir eğilim oluşmuştur. Bu doktora tezinde mikroekstraksiyon tekniklerinden SPME yöntemi kullanılarak ATS'lerin idrarda analizine yönelik hassas, doğru ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir.

LLE ve SPE gibi fazla miktarda çözenin kullanıldığı geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin aksine, SPME gibi mikroekstraksiyon yöntemleri “daha çevreci” olarak nitelendirilmektedir (Samanidou et al., 2011). Bu çalışma kapsamında geliştirilen SPME yönteminde hiçbir çözen kullanılmamış olup, yeşil çevreye büyük katkı sağlayan bir yöntem oluşturulmuştur. SPME yöntemi, termodinamik ve kütle aktarımı ilkelerine dayanmaktadır ve diğer ekstraksiyon yöntemlerinin aksine, ekstrakte edilen analitin tamamı kromatografik sisteme aktarılmaktadır (Kataoka, 2011). SPME yönteminde doğrudan daldırma (direct immersion) ve üst boşluklu (headspace) olarak iki ayrı yaklaşım uygulanmaktadır. Üst boşluklu (headspace) SPME yönteminde agresif veya geri döndürülemez şekilde adsorbe edilmiş matriks bileşenlerinden kaynaklanan fiber hasarı en aza indirildiğinden, aynı fiberin 100'den fazla kez kullanılabileceğı makalelerde bildirilmektedir (Kataoka, 2006; Pragst, 2007; Samanidou et al., 2011). Ancak, bu tez çalışması kapsamında yöntem geliştirme kısmında yaşanan en büyük problem fiberin soyulması olmuş ve fiber çok az tekrarlı kullanılabilmıştır. Bu durum çalışmaların her fiber açılışında yeniden başlamasına hem zaman kaybına hem de yüksek maliyete sebep olmuştur. Bu sorunun nedenleri araştırıldığında en büyük kaynağın türevlendirme aşaması olduğu sonucuna varılmıştır. ATS gibi polar ve yarı uçucu analitlerin kromatografik analizinden önce uçuculuğunu artırmak vb. amaçlarla türevlendirme işlemi yapılmaktadır. Ayrıca, karboksilik asitler ve aminler, kromatografik sistemde bulunan silanol gruplarından herhangi biriyle veya enjektörde veya kolonda kalan

numune kalıntılarının bileşenleriyle güçlü hidrojen bağları oluşturmaktadır. Bu istenmeyen etkileşimler, sırasıyla tersinmez veya tersinir adsorpsiyonun neden olduğu pik kaybı veya kuyruklanmış pik ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle, bu hidroksil (serbest veya bir karboksilik asidin parçası) veya amin grupları, kromatografik analizlerinden önce sıklıkla aktif olmayan bir türe dönüştürülmektedir (Lin et al., 2008). Sililasyon, açilasyon ve alkilasyon yöntemleriyle türevlendirme işlemi yapılabilmektedir. ATS'ler gibi amin yapısındaki bazların türevlendirmesinde kullanılan açilasyon tekniğindeki AA, PFPA ve TFA gibi anhidrit reaktiflerin yapılarındaki floroasil türevlerinin oluşumu, uçuculuğu büyük ölçüde artırmakta ve özellikle negatif kimyasal iyonizasyon olmak üzere GC-MS'te saptanmayı iyileştirmektedir (Dobos et al., 2012; Ondra et al., 2016). Literatür incelemesi yapıldığında çok farklı anhidritler kullanılarak deneylerin yapıldığı ancak kullanılan türevlendirici reaktif miktarının çoğunlukla bildirilmediği saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında deneylerde ilk olarak türevlendirme basamağında 100 µl PFPA reaktifi denenmiştir. Ancak desorpsiyon basamağı sonrasında fiber ilk seferde deforme olmuştur (soyulmuştur). Reaktifin etkinliğinin bu soyulmaya neden olabileceği düşüncesi ile literatürlerde genelde kullanılan türevlendirici reaktiflerden AA, PFPA ve TFA'nın etkinlikleri karşılaştırılmış ve TFA ile analitlere ait daha yüksek pik alanları elde edilmiştir. Jurado ve ark.larının SPME yöntemiyle idrarda ATS'lerin analizini yaptığı çalışmada TFA kullandıkları yöntem denenmiştir (Jurado et al., 2000). Bu literatürde de kullanılan TFA miktarı belirtilmediğinden daha düşük hacimlerde denemeler yapılmıştır. 50 µl TFA konulduğunda analit saptanmadığından 100 µl TFA denenmiştir. Başarılı bir şekilde analit saptanmasına karşılık aynı yöntem birkaç kere daha tekrarlandığında fiber yine soyulmuştur. Yöntem değiştirilerek 1:1,5 oranında (25 µl) TFA kullanılmasıyla bu sorunun üstesinden gelinebilmiştir. Bu tez çalışması, literatürde ifade edilmeyen türevlendirici ajanların SPME fiber üzerine verdiği hasarı somut olarak göstermiştir. Nitekim geliştirilen yöntem ile fiber 30-40 kere kullanılabilmiş ve sonrasında deforme olmuştur (soyulmuştur). Avantajları ile kullanım alanı oldukça genişleyen SPME yönteminin fiber ile türevlendirici ajan ilişkisi en önemli dezavantajlarından olmuştur.

Adli toksikolojide geliştirilen analitik yöntem, tek bir örnek için bile çok sayıda veri kümesi üretmektedir. Bu durum da hem zaman alıcıdır hem de maliyet bakımından yük oluşturmaktadır (Kumar & Sharma, 2018). Bu çalışmada olduğu gibi fibere zarar

veren türevlendirme basamağının olduğu yöntemlerde, yöntem geliştirme aşamasında da sonrasında da fiberin daha az kullanılması avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmada daha az deneme ile daha çok veri elde edilmesine olanak sağlayan kemometrik yaklaşımdan yararlanılarak geliştirilen yöntem optimize edilmiştir. Plakett-Burman tasarımı ile örnek hacmi, tuz miktarı, karıştırma hızı, dengeye gelme süresi, adsorpsiyon süresi, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme süresi olmak üzere yöntem üzerine etkisi olabilecek 7 faktör incelenmiştir. Yapılan regresyon analizi sonrasında bu 7 faktörden adsorpsiyon süresi, türevlendirme sıcaklığı ve türevlendirme süresinin en etkili faktörler olduğu belirlenmiştir. Bu faktörlerin optimize edilmesiyle en iyi sonuçlar 10 dk. adsorpsiyon süresinde, 80°C türevlendirme sıcaklığında ve 1 dk. türevlendirme süresinde elde edilmiştir. Kemometrik yaklaşımdan yararlanarak az deney yapılarak daha etkin sonuçlar elde edilmiştir. Literatür incelendiğinde ATS'lerin idrarda SPME ile analizi için yöntem geliştirilmesi aşamasında kemometrik yaklaşımla yapılan sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır. Racamonde I. ve ark.larının idrarda ve atık suda ATS'lerin SPME yöntemiyle GC-MS'te analizini yaptığı çalışmada yöntem SPME kaplama tipi, iyonik kuvvet, bazik katalizör, türevlendirme ajanı miktarı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı parametreleri bakımından Box–Behnken tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimize edilen son SPME prosedürü, 2 g dipotasyum monohidrojen fosfat trihidrat ve 100 µL izobutil kloroformat (iBCF, asetonitril içinde 1:1) içeren 100 ml örneğin PDMS-DVB fiberi ile 60°C'de 40 dk. boyunca ekstraksiyonunu içermektedir (Racamonde et al., 2013). Örnek miktarı bu tez çalışmasından görece az olmasına karşın türevlendirme süresi ve türevlendirici ajan miktarı çok daha fazladır. Bu durumda fibere verilecek zarar artabilmektedir.

Kemometrik olarak optimize edilen yöntem; seçimlilik, kesinlik, doğruluk, belirtme alt sınırı (LOD), saptama alt sınırı (LOQ), doğrusallık, duyarlık, çalışma aralığı, taşınma etkisi (carry over) ve matriks etkisi parametreleri yönünden valide edilmiştir. ATS'lere seçimli olarak geliştirilen SPME yönteminin gün-içi tekrarlanabilirlik için %RSD değerleri %2,28-8,67 arasında değişirken günler-arası tekrarlanabilirlik %0,78-12,20 arasında değişmektedir. Gün-içi ve günler-arası değişimlerde sapmanın büyük değişiklikler göstermemesi, metodun güvenilirliğini ortaya koymaktadır. %RSD değerleri tüm analitler için izin verilen aralıkta olsa da AMP ve MET için daha düşük sapmalar elde edilmiştir. SPME tekniğinin en büyük handikaplarından

olan tekrarlanabilirlik sorunu, geliştirilen yöntemde yaşanmasa da MDA ve MDMA analitlerinde %RSD değerleri daha yüksek bulunmuştur. Geri kazanım değerleri ise %72,78-113,58 arasında değişmektedir. AMP ve MET için daha yüksek geri kazanım değerleri sağlanırken, MDA ve MDMA için görece daha düşüktür. AMP ve MET'in uçucu, MDA ve MDMA'nın yarı-uçucu doğası (Habib et al., 2020) da geliştirilen HS-SPME yönteminin geri kazanım oranlarını etkilemiş olabilir. Geliştirilen yöntem 25-2000 ng/ml arasında doğrusal olup, korelasyon katsayıları (R^2) 0,99'dan büyüktür. Yöntemin LOD'si 5,56 ng/ml-11,54 ng/ml arasında değişirken LOQ'su 18,52 ng/ml ile 38,46 ng/ml arasında değişmektedir. Alsenedi ve Morrison 2018 yılında PDMS-DVB fiberi kullanarak idrarda GC-MS ile ATS'leri ve sentetik katinonları analiz etmiştir. Yapılan bu çalışmada LOD'ler 5 ng/ml-25 ng/ml arasında değişirken LLOQ'lar 25-100 ng/ml arasında değişmektedir. Çalışmamıza benzer şekilde AMP ve MET için daha düşük %RSD'ler elde edilirken MDMA için bu oran %12 olarak bildirilmiştir (Alsenedi & Morrison, 2018). Geliştirilen ve valide edilen yöntemimiz ATS'lerin eş zamanlı analizine olanak sağlamaktadır. Gerçek olgulara da uygulanmak üzere uygulamaya başlandığı süreçte desorpsiyon basamağında elde olan son fiber soyulmuştur. Yaşanılan bu problem nedeniyle yöntem madde kullanıcılarının idrar örneklerine uygulanamamıştır. Stabilité parametresi de aynı sebepten analiz edilememiştir.

Nanoteknoloji günümüzde internetin icadından sonra endüstriyel üretim uygulamalarında en büyük buluş ve bilim adamlarınca ikinci sanayi devrimi olarak kabul edilmektedir (Tozluoğlu et al., 2015). Bu nanoteknolojik gelişmeler sayesinde birçok analitik kimyager, ayırma bilimi alanında maddelerin eser analizi için yeni sorbentler olarak CNT'lerin potansiyel kullanımından etkilenmiştir. CNT'ler fiberlerde kaplama materyali olarak kullanılmaya başlanmıştır. CNT'ler karmaşık biyolojik örneklerden hedef moleküllerin zenginleştirilmesi için hızlı kütle transfer özellikli geniş bir yüzey alanına sahiptir. CNT'lerin tüpleri arasındaki duvarlarda veya iç boşluklarda bulunan etkileşim bölgeleri, SPME prosedüründe hızlı adsorpsiyon/desorpsiyon işlemine olanak sağlamaktadır. Termal stabilite, yüksek sıcaklık desorpsiyon koşulları altında çok önemli bir faktör olarak kabul edildiğinden, karmaşık matrislerde verimli ekstraksiyon prosedürü sağlamak için SPME'de fiber kaplama için grafen kullanılabilir (Hashemi et al., 2018). Bu avantajlarından dolayı bu doktora tezinde laboratuvar tipi fiber yapılabilmesi için

MWCNT, MWCNT-COOH, azot-katkılı MWCNT, grafen ve nanoselüloz ayrı ayrı kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Elektrokimyasal özellikleri nedeniyle elektropolimerizasyon yöntemi ile kaplama aşamasında monomer olarak pirol kullanılmıştır. Fiber kaplama aşamasında daha önce de birçok maddenin başarılı bir şekilde saptanabilmesine olanak sağlayan laboratuvar-ıçi yöntem kullanılmıştır. Elde edilen laboratuvar tipi fiberlerin SEM görüntülerine bakıldığında PPy-azot-katkılı MWCNT dışında düzenli yapılar elde edilmiştir. Kaplama yapılırken de azot-katkılı MWCNT homojen bir çözelti oluşturmadığı gözlenmiştir. Azot-katkılı MWCNT; geleneksel MWCNT'lerle karşılaştırıldığında, grafit karbondan biraz daha büyük ara katman aralığı ile kısa menzilli sıralama ile farklı çok katmanlı karbon yığını sergilemektedir (Damodar et al., 2021). Ticari fiber kullanılarak valide edilen SPME yöntemi, kaplaması yapılan laboratuvar tipi fiberlere uygulandığında ATS'leri ait bir analit piki saptanamamıştır. Oysaki ATS'lerin fizikokimyasal özellikleri dikkate alındığında, PPy-MWCNT-COOH ve PPy-azot-katkılı MWCNT'den olumlu sonuçlar alınması beklenmiştir. Song ve ark.larının 2018 yılında ATS'lerin idrarda analizi için yaptıkları bir çalışmada; SPME fiberi geliştirmek için basit bir fiziksel yapışma yaklaşımıyla paslanmaz çelik bir tel üzerine MWCNT-COOH kullanarak kaplanmıştır. Standart katımı yapılmış ATS'lerin (5, 50 ve 500 µg/L) geri kazanımları %88-107 aralığındadır. Elde edilen MWCNT-COOH kaplı fiberin, termal olarak oldukça kararlı olduğu ve 150 defadan fazla kullanılabilirdiği bildirilmiştir (Song et al., 2018). Kısıtlı imkanlar nedeniyle nanomalzemelerle yapılan çalışmalar daha ileri aşamalara götürülememiştir. Bu tez kapsamında açılmış olan yeni çalışma alanı ile daha ileri çalışmalar yapılmaya devam edilecektir.

Sonuç ve Öneriler

Günümüzde kullanımı gittikçe artan yasadışı maddelerin analizinde minyatürize edilmiş, zaman ve maliyet açısından da avantaj sağlayan yöntemler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu doktora tezi ile ATS'lerin analizi için çevreye duyarlı ve hiç çözgenin kullanılmadığı, kısa sürede ekstraksiyona olanak sağlayan SPME yöntemi geliştirilmiştir. Türevlendirme basamağının fiberlere verdiği zarar somut olarak gösterilmiştir. Literatürde bununla ilgili bilgi neredeyse bulunmamakta olup, çalışmalar açısından bir kısıtlılık oluşturmıştır. Geliştirilen yöntem kemometrik olarak en az deneyle en çok verimi alacak şekilde optimize edilmiş ve başarılı bir şekilde valide edilmiştir. SPME yöntemi birçok alanda kullanılmasına rağmen adli toksikoloji alanında kullanımı kısıtlıdır. Bu çalışma ile geliştirilen yöntem rutin analize olanak sağlamaktadır. Özellikle otomatize edilebilirliği sayesinde kullanım alanı kısıtlılıktan çıkıp genişleyebilmektedir. Nanoteknolojiden yararlanılarak elde edilen nanomalzemelerle ticari fibere alternatif fiberler üretilmeye çalışılmış, ancak olumlu sonuçlar alınamamıştır. Daha ileri çalışmalar yapılmaya devam edilecektir.

Kaynaklar

- Agius, R., Nadulski, T., Kahl, H. G., Schröder, J., Dufaux, B., Yegles, M., & Pragst, F. (2010). Validation of a headspace solid-phase microextraction-GC-MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines. *Forensic Science International*, 196(1–3), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.07.023>
- Ahmed, I., Fayyaz, F., Nasir, M., Niaz, Z., Furnari, M., & Perry, L. (2016). Extending landscape of volatile metabolites as novel diagnostic biomarkers of inflammatory bowel disease-a review. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(4), 385–392. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1105286>
- Alizadeh, N., Mohammadi, A., & Tabrizchi, M. (2008). Rapid screening of methamphetamines in human serum by headspace solid-phase microextraction using a dodecylsulfate-doped polypyrrole film coupled to ion mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1183(1–2), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.020>
- Alsenedi, K. A., & Morrison, C. (2018). Determination of amphetamine-type stimulants (ATSs) and synthetic cathinones in urine using solid phase micro-extraction fibre tips and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 10(12), 1431–1440. <https://doi.org/10.1039/c8ay00041g>
- Analytical Methods Committee, A. N. 55. (2013). Experimental design and optimisation (4): Plackett-Burman designs. *Analytical Methods*, 5(8), 1901–1903. <https://doi.org/10.1039/c3ay90020g>
- Augusto, F., Carasek, E., Silva, R. G. C., Rivellino, S. R., Batista, A. D., & Martendal, E. (2010). New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2533–2542. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.033>
- Australian Government Department of Health and Ageing. (2011). *National Drug Strategy. National Amphetamine-Type Stimulant Strategy Background Paper*.
- Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi. (2018). *Avrupa Uyuşturucu Raporu 2018, Eğilimler ve Gelişmeler*. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001TRN_PDF

- Aydoğdu, M., Döğər, R., & Ertaş, H. (2018). Adli Toksikolojik Analizlerde Yöntem Geliştirme-Validasyon. In S. Annette Akgür & N. Dağlıoğlu (Eds.), *Temel Adli Toksikoloji* (pp. 271–304). Akademisyen Kitabevi.
- Aziz-Zanjani, M. O., & Mehdinia, A. (2014). A review on procedures for the preparation of coatings for solid phase microextraction. *Microchimica Acta*, 181(11–12), 1169–1190. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1265-y>
- Bagheri, H., Ayazi, Z., & Sistani, H. (2011). Chemically bonded carbon nanotubes on modified gold substrate as novel unbreakable solid phase microextraction fiber. *Microchimica Acta*, 174(3), 295–301. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0621-4>
- Bagheri, H., Piri-Moghadam, H., & Naderi, M. (2012). Towards greater mechanical, thermal and chemical stability in solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 34, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.11.004>
- Barroso, M., Moreno, I., Da Fonseca, B., Queiroz, J. A., & Gallardo, E. (2012). Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology. *Bioanalysis*, 4(14), 1805–1826. <https://doi.org/10.4155/bio.12.139>
- Câmara, J. S., Arminda Alves, M., & Marques, J. C. (2006). Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 555(2), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.001>
- Cody, J. T. (2005). Amphetamines. In *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* (pp. 80–88). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00454-4>
- Damodar, D., Mahanta, U., & Deshpande, A. S. (2021). N-doped MWCNTs from catalyst-free, direct pyrolysis of commercial glue. *Materials Chemistry and Physics*, 262, 124319. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124319>
- De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon nanotubes: Present and future commercial applications. *Science*, 339(6119), 535–539. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>
- Decaestecker, T. N., Lambert, W. E., Van Peteghem, C. H., Deforce, D., & Van Bocxlaer, J. F. (2004). Optimization of solid-phase extraction for a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric general unknown screening procedure by means of computational techniques. *Journal of Chromatography*

- A, 1056(1-2 SPEC.ISS.), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.010>
- Dobos, A., Hidvégi, E., & Somogyi, G. P. (2012). Comparison of five derivatizing agents for the determination of amphetamine-type stimulants in human urine by extractive acylation and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(5), 340–344. <https://doi.org/10.1093/jat/bks026>
- Duff, M. C., Crump, S. L., Ray, R. J., Cotham, W. E., LaMont, S., Beals, D., Mount, K., Koons, R. D., & Leggitt, J. (2008). Solid phase microextraction sampling of high explosive residues in the presence of radionuclides and radionuclide surrogate metals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 275(3), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-7116-0>
- Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. www.eurachem.org.
- European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2019). *Turkey Country Drug Report 2019*. https://www.emcdda.europa.eu/publications/country-drug-reports/2019/turkey_en
- European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2020). *Statistical Bulletin 2020*. https://www.emcdda.europa.eu/data/stats2020_en
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2019). *European Drug Report 2019: Trends and Developments*. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2019>
- Gribkova, O. L., Kabanova, V. A., & Nekrasov, A. A. (2019). Electrochemical Polymerization of Pyrrole in the Presence of Sulfoacid Polyelectrolytes. *Russian Journal of Electrochemistry*, 55(11), 1110–1117. <https://doi.org/10.1134/S1023193519110065>
- Guldi, D. M., & Martín, N. (2010). Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications. In *Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications*. Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527629930>
- Habib, A., Nargis, A., Bi, L., Zhao, P., & Wen, L. (2020). Analysis of amphetaminic drug compounds in urine by headspace-dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 2162–2170.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.04.001>

- Harraz, F. A. (2006). Electrochemical Polymerization of Pyrrole into Nanostructured p-Type Porous Silicon. *Journal of the Electrochemical Society*, 153(5), 349. <https://doi.org/10.1149/1.2185286>
- Hashemi, B., Zohrabi, P., & Shamsipur, M. (2018). Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, 187, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053>
- He, Y., Pohl, J., Engel, R., Rothman, L., & Thomas, M. (2009). Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1216(24), 4824–4830. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.028>
- Ho, T. D., Canestraro, A. J., & Anderson, J. L. (2011). Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 695(1–2), 18–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.034>
- Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363(6430), 603–605. <https://doi.org/10.1038/363603a0>
- J. Zeng, J. Chen, W. Chen, X. Huang, L. Chen, X. C. (2009). Recent Development of Laboratory-made Solid-phase Microextraction Fibers on the Application of Food Safety Analysis. *Food Sci. Biotechnol.*, 18, 579. https://www.researchgate.net/publication/288283405_Recent_Development_of_Laboratory-made_Solid-phase_Microextraction_Fibers_on_the_Application_of_Food_Safety_Analysis
- Jackson, P., Jacobsen, N. R., Baun, A., Birkedal, R., Kühnel, D., Jensen, K. A., Vogel, U., & Wallin, H. (2013). Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-154>
- Jeleń, H. H., Dziadas, M., & Majcher, M. (2013). Different headspace solid phase microextraction - Gas chromatography/mass spectrometry approaches to haloanisoles analysis in wine. *Journal of Chromatography A*, 1313, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.080>
- Jenkins AJ. (2008). Pharmacokinetics of Specific Drugs. In Karch SB (Ed.), *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. (pp. 26–30). CRC

Press.

- Jurado, C., Giménez, M. P., Soriano, T., Menéndez, M., & Repetto, M. (2000). Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 24(1), 11–16. <https://doi.org/10.1093/jat/24.1.11>
- Kaplan, Y., & Demir, Ö. (2014). Amfetamin ve Benzeri Maddeler. In S. Akgür & H. Coşkunol (Eds.), *Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi* (pp. 105–116). Ege Üniversitesi Basımevi.
- Kataoka, H. (2006). Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 1(1), 65–84. <https://doi.org/10.2174/1573412052953373>
- Kataoka, H. (2011). Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses. *Analytical Sciences*, 27(9), 893–905. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.893>
- Kırlanç, İ. A., Afacan, İ. G., Pelit, L., Ertaş, H., & Ertaş, F. N. (2019). Preparation and characterisation of polypyrrole – carbon nanomaterial composite solid-phase microextraction fibres and their applications to the determination of fungicide residues in grape juice samples. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1686145>
- Kumar, R., & Sharma, V. (2018). Chemometrics in forensic science. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 105). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.010>
- Lai, H., Guerra, P., Joshi, M., & Almirall, J. R. (2008). Analysis of volatile components of drugs and explosives by solid phase microextraction-ion mobility spectrometry. *Journal of Separation Science*, 31(2), 402–412. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700292>
- Latrous El Atrache, L., Hachani, M., & Kefi, B. B. (2016). Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents for the extraction of carbamate insecticides from environmental waters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(1), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0861-7>

- Lida Khalafi, & Mohammad Rafiee. (2017). Cyclic Voltammetry. In Z. Wang, U. Wille, & E. Juaristi (Eds.), *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry* (pp. 1–42). John Wiley & Sons, Inc. https://www.researchgate.net/publication/313673407_Cyclic_Voltammetry
- Lin, D.-L., Wang, S.-M., Wu, C.-H., Chen, B.-G., & Liu, R. H. (2008). Chemical Derivatization for the Analysis of Drugs by GC-MS-A Conceptual Review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(1), 1–10.
- Maisto, S., Galizio, M., & Connors, G. (2011). *Drug Use and Abuse* (6th ed.). Wadsworth Publishing. <https://www.amazon.com/Stephen-Maisto-Abuse-sixth/dp/B008UBS0KS>
- Mester, Zoltán, & Sturgeon, R. (2005). Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 60(9–10), 1243–1269. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.06.013>
- Mester, Zoltan, Sturgeon, R., & Pawliszyn, J. (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 56(3), 233–260. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(00\)00304-9](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(00)00304-9)
- Mohseni, S., Aghayan, M., Ghorani-Azam, A., Behdani, M., & Asoodeh, A. (2014). Evaluation of antibacterial properties of Barium Zirconate Titanate (BZT) nanoparticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1393–1399. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400033>
- Monthioux M. (202 C.E.). *Carbon Meta-Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications*. <https://www.wiley.com/en-ao/Carbon+Meta+Nanotubes%3A+Synthesis%2C+Properties+and+Applications-p-9780470512821>
- Murphy RJ. (2003). Screening design. In *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics* (p. 920). Taylor and Francis Inc.
- Musteata, F. M., & Pawliszyn, J. (2007a). Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.11.003>
- Musteata, F. M., & Pawliszyn, J. (2007b). In vivo sampling with solid phase microextraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.07.006>
- Ondra, P., Válka, I., Knob, R., Ginterová, P., & Maier, V. (2016). Analysis of

- amphetamine-derived designer drugs by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(1), 78–85. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv113>
- Otto, M. (2016). *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry* (Third). <https://www.wiley.com/en-us/Chemometrics:+Statistics+and+Computer+Application+in+Analytical+Chemistry,+3rd+Edition-p-9783527340972>
- Ouyang, G., & Pawliszyn, J. (2006a). Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), 692–703. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.005>
- Ouyang, G., & Pawliszyn, J. (2006b). SPME in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 1059–1073. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0460-z>
- Özdokur, K. V., Tatli, A. Y. I., Yilmaz, B., Koçak, S., & Ertaş, F. N. (2016). Development of pulsed deposited manganese and molybdenum oxide surfaces decorated with platinum nanoparticles and their catalytic application for formaldehyde oxidation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(14), 5927–5933. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.02.127>
- Pan, L., & Pawliszyn, J. (1997). Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes. *Anal. Chem*, 69, 196–205. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Pawliszyn, J. (1997). *SPME method development. In Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York.
- Pawliszyn, J. (1999). *Applications of Solid Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry.
- Pawliszyn, Janusz. (2012). Handbook of Solid Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04297-7>
- Peltenburg, H., Droge, S. T. J., Hermens, J. L. M., & Bosman, I. J. (2015). Sorption of amitriptyline and amphetamine to mixed-mode solid-phase microextraction in different test conditions. *Journal of Chromatography A*, 1390, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.065>
- Peltenburg, H., Groothuis, F. A., Droge, S. T. J., Bosman, I. J., & Hermens, J. L. M.

- (2013). Elucidating the sorption mechanism of “mixed-mode” SPME using the basic drug amphetamine as a model compound. *Analytica Chimica Acta*, 782, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.030>
- Pragst, F. (2007). Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(7), 1393–1414. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1289-9>
- Prvan, T., & Street, D. J. (2002). An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 106(1–2), 245–269. [https://doi.org/10.1016/S0378-3758\(02\)00216-1](https://doi.org/10.1016/S0378-3758(02)00216-1)
- Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J. B., & Cela, R. (2013). In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine. *Analytica Chimica Acta*, 770, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.001>
- Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.011>
- Rezazadeh, M., Yamini, Y., & Seidi, S. (2015). Application of a new nanocarbonaceous sorbent in electromembrane surrounded solid phase microextraction for analysis of amphetamine and methamphetamine in human urine and whole blood. *Journal of Chromatography A*, 1396, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.077>
- Riahi-Zanjani, B., Balali-Mood, M., Asoodeh, A., Es’haghi, Z., & Ghorani-Azam, A. (2018). Developing a new sensitive solid-phase microextraction fiber based on carbon nanotubes for preconcentration of morphine. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(8), 2047–2056. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0882-x>
- Samanidou, V., Kovatsi, L., Fragou, D., & Rentifis, K. (2011). Novel strategies for sample preparation in forensic toxicology. *Bioanalysis*, 3(17), 2019–2046. <https://doi.org/10.4155/bio.11.168>
- Sigma Aldrich. (2017). *Sigma Aldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog>
- Söğüt Ertaş, Ö., & Kayali, A. (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 34(1), 41–57.
- Song, A., Wang, J., Lu, G., Jia, Z., Yang, J., & Shi, E. (2018). Oxidized multiwalled

- carbon nanotubes coated fibers for headspace solid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human urine. *Forensic Science International*, 290, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.06.031>
- Souza Silva, E. A., Risticevic, S., & Pawliszyn, J. (2013). Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.006>
- Spietelun, A., Pilarczyk, M., Kloskowski, A., & Namieśnik, J. (2010). Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4524–4537. <https://doi.org/10.1039/c003335a>
- Tang, B., & Isacson, U. (2008). Analysis of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase microextraction: State-of-the-art. *Energy and Fuels*, 22(3), 1425–1438. <https://doi.org/10.1021/ef7007166>
- Tozluoğlu, A., Çöpür, Y., Özyürek, Ö., & Çıtlak, S. (2015). Nanoselüloz üretim teknolojisi. *Turkish Journal of Forestry | Türkiye Ormancılık Dergisi*, 16(2). <https://doi.org/10.18182/tjf.09718>
- Trocine, L., & Malone, L. C. (2000). Finding important independent variables through screening designs: A comparison of methods. *Winter Simulation Conference Proceedings*, 1, 749–754. <https://doi.org/10.1109/WSC.2000.899789>
- Vanaja, K., & Rani, R. H. S. (2007). Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/10601330701220520>
- Wang, X., Liu, J., Liu, A., Liu, Q., Du, X., & Jiang, G. (2012). Preparation and evaluation of mesoporous cellular foams coating of solid-phase microextraction fibers by determination of tetrabromobisphenol A, tetrabromobisphenol S and related compounds. *Analytica Chimica Acta*, 753, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.030>
- Wardencki, W., Michulec, M., & Curyło, J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(7), 703–717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00839.x>
- Whitmire, M., & Ross, R. (2015). A Global GLP Approach to Formulation Analysis

- Method Validation and Sample Analysis. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 07(06), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2153-2435.s2-001>
- Yılmaz, A. (2013). *KİMYASAL ANALİZLERDE METOT VALIDASYONU VE VERİFİKASYONU*. http://turklab.org/tr/TURKLAB_Rehber_01_Rev.2.pdf
- Zeng, J., Chen, J., Li, M., Subhan, F., Chong, F., Wen, C., Yu, J., Cui, B., & Chen, X. (2015). Determination of amphetamines in biological samples using electro enhanced solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1000, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.016>
- Zeng, J., Zou, J., Song, X., Chen, J., Ji, J., Wang, B., Wang, Y., Ha, J., & Chen, X. (2011). A new strategy for basic drug extraction in aqueous medium using electrochemically enhanced solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1218(2), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.020>
- Zhang, S., Cui, Y., Sun, J., Xi, Y., Zhang, C., & Tang, J. (2015). Sensitive magnetic solid-phase microextraction based on oxide multi-walled carbon-nanotubes for the determination of methylamphetamine and ketamine in human urine and blood. *Analytical Methods*, 7(10), 4209–4215. <https://doi.org/10.1039/c5ay00592b>

Ekler

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi

EGE ÜNİVERSİTESİ T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 99166796-050.06.04
Konu : Kararlar 19-3T/41

Sayın, Prof. Dr. Serap AKGÜR
Ege Üniversitesi
Madde Bağımlılığı Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız " Amfetamin tipi Stimülanların İdrarda Analize Yönelik Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, Ciddi Advers Olay Bildirimlerinin, bitirme tarihinin ve Sonuç Raporunun Kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar tarih ve sayısı bildirilerek (Etik Kurul Bilgilendirme Formu ekinde) yapılması gerekmektedir.

Başvuru dosyasının araştırmanın yürütüleceği kuruma iletilerek kurum iznini gösterir belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin Bilimsel Araştırma Proje Fonu (BAP) tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Varsa Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU
Kurul Başkanı

Ek: İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)



EGE ÜNİVERSİTESİ
TİBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel : 0 232 390 2134 e-mail: tibbiletik@yahoo.com
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Amfetamin tıplı Stimülanların İdrarda Analize Yönelik Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Serap AKGÜR
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	
	BİLGİLENDİRME FORMU	
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 19-3T/41	Tarih: 06.03.2019
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TİBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Sadık AKŞİT Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H

ASLI GİBİ
 EÜ TİBBİ ARAŞTIRMALAR
 ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Etik Kurul Başkanının
 Unvanı/Adı/Soyadı:
 Prof. Dr. Aliye
 MANDIRACIOĞLU

Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Sayfa
		1/2



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Amfetamin tipi Stimülanların İdrarda Analize Yönelik Kalı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu: 19-3T/41			
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye	Klinik Biyokimya BD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Klinik Biyokimya BD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. H. Oya TÜRKOĞLU ÇAKAL Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Doç. Dr. Tahir ATİK Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD Çocuk Genetik BD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Teşekkür

Anlattığı güzel derslerle bu alana ilgi duymamı sağlayan, o zamandan sonra yolculuğumda kendisinden çok destek gördüğüm, üzerimde emeği çok büyük olan sevgili danışmanım ve yol göstericim Prof. Dr. Serap Annette AKGÜR'e,

Doktora eğitimim sırasında ve öncesinde aldığım derslerle ufkumu genişleten, sadece bilimsel değil hayat dersi de veren, doktora tez konumun şekillenmesinde ve hem projenin hem tezin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen ikinci danışmanım sayın Doç. Dr. Hasan ERTAŞ'a ve çok değerli Prof. Dr. Fatma Nil ERTAŞ'a,

Tez izleme kurullarında önerileriyle her daim destek olan ve laboratuvarındaki deney aşamalarında kendi yöntemlerini denememize fırsat veren değerli jüri üyeleri Doç. Dr. Levent PELİT ve Dr. Öğr. Üyesi Ender ŞENOL'a,

Maddi destek iyi bir çalışmanın gerekliliklerindendir. Bu anlamda bu çalışmanın gerçekleşmesine destek olan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü Birimi'ne (GAP-21552),

Proje ekip arkadaşı olduğum ve elektrokimya alanındaki bilgilerini aktaran, destek olan İmran AFACAN GÜNEY'e, Ertaş Research Grup'a, Nina'ya, desteklerini esirgemeyen Halil İbrahim BOSTANCI'ya,

Belki de yol arkadaşlığı gibi kader arkadaşlığı da yaptığım, çalışma ofisimizi paylaştığımız gibi heyecanımızı, üzüntülerimizi ve en güzel anlarımızı da paylaştığımız, desteğini hep gördüğüm değerli dostum Ar. Gör. Melike AYDOĞDU'ya, kritik noktalarda bir telefon uzağımda olan çözüm odaklı sevgili arkadaşım Selin DEMİR'e,

Öğrenim hayatım boyunca her aşamasında en az benim kadar heyecanlanan, sonsuza kadar kayıtsız şartsız desteğin ve sevginin ne demek olduğunu gösteren anneme, babama, kardeşim Rabia KOÇAK'a ve yüzünü gördüğümde hep gülümsememe sebep olup, motive eden yeğenim Emir'e,

Doktora sürecimin başında hiç tanımadığım ama pandemide zorlu deneylerin ortasında hayatıma girip işlerimi kolaylaştıran, bana koşulsuz destek veren, benimle gülüp benimle üzülen sevgili eşim Ferdi ASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özgeçmiş

RUKİYE ASLAN

Adres: Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü
Bornova/İzmir

Eğitim Durumu:

2016-2021: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Madde Bağımlılığı Doktora Programı.

2012-2016: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bağımlılık Toksikolojisi Yüksek Lisans Programı.

2009-2012: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü.

2007-2009: Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü.

2003-2007: Ankara Atatürk Lisesi (Fen Bilimleri Bölümü).

2013 yılından bu yana Araştırma Görevlisi olarak çalıştığı Bağımlılık Toksikolojisi alanında yazılmış makaleleri, kitap bölümleri, projeleri, kongre bildirileri ve alınan ödülleri bulunmaktadır.