

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
ADLİ BİLİMLER TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

AMFETAMİN VE METAMFETAMİNİN KANDA LC-MS/MS İLE ANALİTİK
METOT VALİDASYONU VE GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali TEPEKIRAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hülya KARADENİZ

EYLÜL 2025
TRABZON

ÖNSÖZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Bilimler Yüksek Lisans programında hazırlanan ve FYL-2023-11088 kodu ile KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen "Amfetamin ve Metamfetaminin Kanda LC-MS/MS ile Analitik Metot Validasyonu ve Gerçek Örneklerle Uygulanması" başlıklı tez çalışması, Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Adli Toksikoloji Laboratuvarı ve Enstrümental Analiz Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez yazım sürecimde engin bilgisi, deneyimi, sabrı ve güler yüzüyle yanımda olan kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Hülya KARADENİZ'e,

Tezimin deneysel sürecinde analitik cihazlarından ve teknik altyapısından faydalanma imkanını veren, mensubu olmaktan gurur duyduğum Adli Tıp Kurumu Başkanlığına,

Adli Tıp Kurumu Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Hızır ASLIYÜKSEK'e ve Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesine,

Deneysel çalışmalarında bilgisi ve desteklerinden istifade ettiğim mesai arkadaşım Dr. Kim. Hamide Elvan BAYRAK'a,

Katkılarından dolayı ANT TEKNİK Uygulama Mühendisi Emrah KALYONCU'ya,

Tüm bu süreçte ve öncesinde maddi manevi yanımda olan ve beni lisansüstü eğitim noktasında cesaretlendiren annem Hava TEPEKİRAN'a, Babam Zeki TEPEKİRAN'a, kardeşlerim Maide Eker'e ve Saliha TEPEKİRAN'a ve kıymetli eşim Selime TEPEKİRAN'a en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Ali TEPEKİRAN

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Amfetamin ve Metamfetaminin Kanda LC-MS/MS ile Analitik Metot Validasyonu ve Gerçek Örneklerle Uygulanması" başlıklı bu çalışmayı baştan sona değin danışmanım Prof. Dr. Hülya KARADENİZ'in sorumluluğunda tamamladığımı, planlamasından yazımına değin hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/09/2025

Ali TEPEKIRAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Amfetamin Tipi Uyarıcılar (ATS).....	4
2.1.1. Amfetamin	5
2.1.2. Metamfetamin	9
2.1.3. MDMA (3,4-Metilendioksimetamfetamin, Ekstazi).....	15
2.1.4. MDA (3,4-Metilendioksiamfetamin)	17
2.2. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Biyolojik Numuneler.....	18
2.2.1. Kan ve İdrar	18
2.2.2. Saç ve Tırnak	18
2.2.3. Tükürük ve Ter.....	18
2.2.4. Postmortem Örnekler	19
2.2.5. Özel Durumlar: Göbek Kordonu ve Plasenta	19
2.3. Adli Toksikolojide Analitik Yaklaşımlar ve Kromatografik Yöntemlerin Rolü	19
2.4. Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	22
2.4.1. LC-MS/MS Sisteminin Çalışma Prensipleri	24
2.4.2. LC-MS/MS Sisteminin Adli Toksikolojideki Yeri	27
2.5. Numune Hazırlama Yöntemleri	28
2.5.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	29
2.6. İç Standart Yöntemi ve Kromatografik Analizlerdeki Önemi	31
2.7. Metot Validasyonu	32
2.7.1. Seçicilik.....	34

2.7.2. Doğrusallık.....	35
2.7.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	35
2.7.4. Doğruluk	36
2.7.4.1. Kesinlik	36
Tekrarlanabilirlik;.....	36
Tekrar Üretilirlik;	37
2.7.4.2. Gerçeklik	37
Bias (Sistemik Hata Hesabı);	37
Geri Kazanım;	37
2.7.5. Sağlamlık	37
2.7.6. Kararlılık	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
3.3. LC-MS/MS Sistem Koşulları	40
3.4. LC-MS/MS Sistemine Ait Akış Tablosu.....	41
3.5. Amfetamin, Metamfetamin ve MDMA-d ₅ (IS) Kütle-Yük Oranları ve Alıkonma Zamanları.....	42
3.6. Çalışmada Kullanılan Mobil Faz, Standart Ara Stok ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürleri.....	42
3.6.1. Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	42
3.6.2. Standart Maddelerin Hazırlanması.....	43
3.6.3. Amfetamin ve Metamfetamin Ara Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	43
3.6.4. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	44
3.7. Örnek Hazırlama Yöntemi	44
3.8. Validasyon Çalışmaları	46
3.8.1. Seçicilik.....	46
3.8.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	47
3.8.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	47
3.8.4. Geri Kazanım	48
3.8.5. Kesinlik	48
3.8.5.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik.....	48
3.8.5.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	49
3.8.6. Kararlılık	49

4. BULGULAR.....	50
4.1. Metot Validasyonu	50
4.1.1. Seçicilik.....	50
4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri	53
4.1.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	55
4.1.4. Geri Kazanım	56
4.1.5. Kesinlik	59
4.1.5.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik.....	59
4.1.5.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik	59
4.1.6. Kararlılık	61
4.1.7. Valide Edilen Metodun Gerçek Örneklerle Uygulanması	62
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR	68
EKLER	83
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÖZET

Amfetamin ve Metamfetaminin Kanda LC-MS/MS ile Analitik Metot Validasyonu ve Gerçek Örneklerle Uygulanması

Psikoaktif madde olarak tanımlanan yasadışı uyutucu, uyuşturucu ve uyarıcı madde kullanımı hem küresel düzeyde hem de ülkemizde giderek artan bir yaygınlık göstermektedir. Bu tür maddelerin kullanımının önlenmesi kadar, kullanım sonrası bireylerdeki varlığının kalitatif ve kantitatif olarak doğru biçimde tespit edilmesi de büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, hızlı, güvenilir ve bilimsel temellere dayanan toksikolojik analiz yöntemlerine duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Adli bilimler, bu ihtiyaca yanıt verebilmek amacıyla en güncel bilimsel ve teknolojik gelişmeleri takip ederek, yüksek doğruluk ve kesinlikte sonuçlar elde etmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir. Zira yargı mercileri, olayların aydınlatılmasında ve adil kararların verilmesinde kesin ve güvenilir kanıtlara ihtiyaç duymaktadır.

Bu çalışma, kanda amfetamin ve metamfetaminin tespiti amacıyla katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi kullanılarak sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemine dayalı analitik bir metodun geliştirilmesi ve validasyonunu kapsamaktadır. Toksikolojik analizlerde güvenilir ve geçerli sonuçların elde edilmesi, adli bilimler açısından büyük önem taşımakta olup, bu doğrultuda geliştirilen yöntemlerin uluslararası validasyon kriterlerine uygunluğu temel bir gerekliliktir.

Yöntemin seçiciliği, kör kan örnekleri üzerinde yapılan analizlerle değerlendirilmiş; amfetamin ve metamfetamin için herhangi bir interferans gözlemlenmemiştir. Doğrusal çalışma aralığı 1–200 ng/mL olarak belirlenmiş, korelasyon katsayıları amfetamin için 0,996, metamfetamin için ise 0,992 olarak saptanmıştır. Tespit limitleri (LOD) sırasıyla amfetamin için 0,46 ng/mL, metamfetamin için 0,31 ng/mL; tayin limitleri (LOQ) ise amfetamin için 0,95 ng/mL, metamfetamin için 0,65 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Yöntemin tekrarlanabilirliği, gün içi ve günler arası analizlerle değerlendirilmiş ve %RSD değerleri %15'in altında bulunmuştur. Geri kazanım oranları amfetamin için %93,28–%111,87; metamfetamin için %105,15–%115,17 aralığında gerçekleşmiştir. +4 °C'de otomatik örnekleyici ile yapılan 7 günlük kararlılık çalışması ve -20 °C'de 6 ay süresince gerçekleştirilen uzun dönem kararlılık çalışmasında sapma oranları <%10 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen tüm validasyon parametreleri, toksikolojik analizlerin validasyonuna yönelik uluslararası rehberlerde belirtilen kabul edilebilir sınırlar içerisinde yer almaktadır. Bu doğrultuda, geliştirilen yöntemin amfetamin ve metamfetaminin kan örneklerinde güvenilir biçimde tespit ve tayini için geçerli olduğu ortaya konmuştur. Valide edilen metot, gerçek adli örneklerde başarıyla uygulanmış olup, adli olguların aydınlatılmasına bilimsel katkı sağlayacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, amfetamin, metamfetamin, metot validasyonu, antemortem, kan



ABSTRACT

Analytical Method Validation of Amphetamine and Methamphetamine in Blood by LC-MS/MS and Its Application to Real Samples

The use of illicit sedative, narcotic, and stimulant substances classified as psychoactive drugs is increasingly prevalent both globally and within our country. In addition to preventing the use of such substances, accurately identifying their presence in individuals, both qualitatively and quantitatively, is of critical importance. In this context, the demand for rapid, reliable, and scientifically grounded toxicological analysis methods is steadily growing. Forensic sciences aim to meet this need by closely following the latest scientific and technological developments and conducting studies to obtain highly accurate and precise results. Judicial authorities require definitive and trustworthy evidence to clarify incidents and ensure fair rulings.

This study encompasses the development and validation of an analytical method based on solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the detection of amphetamine and methamphetamine in blood samples. Obtaining reliable and valid results in toxicological analyses is of critical importance in forensic sciences, and the conformity of developed methods to international validation criteria is a fundamental requirement.

The method's selectivity was evaluated through analyses of blank blood samples, and no interference was observed for amphetamine and methamphetamine. The linear range was established between 1–200 ng/mL, with correlation coefficients of 0.996 for amphetamine and 0.992 for methamphetamine. The limits of detection (LOD) were calculated as 0.46 ng/mL for amphetamine and 0.31 ng/mL for methamphetamine; the limits of quantification (LOQ) were 0.95 ng/mL and 0.65 ng/mL, respectively.

Repeatability of the method was assessed through intra-day and inter-day analyses, with %RSD values found to be below 15%. Recovery rates ranged from 93.28% to 111.87% for amphetamine and from 105.15% to 115.17% for methamphetamine. Stability studies conducted at +4 °C using an autosampler over 7 days and long-term storage at –20 °C for 6 months revealed deviation rates of less than 10%.

All validation parameters obtained fall within the acceptable ranges defined by international guidelines for toxicological method validation. Accordingly, the developed method has been demonstrated to be valid for the reliable detection and quantification of

amphetamine and methamphetamine in blood samples. The validated method was successfully applied to real forensic cases and is expected to contribute significantly to the elucidation of forensic investigations.

Key Words: LC-MS/MS, amphetamine, methamphetamine, method validation, antemortem, blood



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Amfetaminin kimyasal yapısı (URL-2, 2025)	5
Şekil 2. Amfetamin (URL-3, 2025)	5
Şekil 3. Metamfetaminin kimyasal yapısı (URL-6, 2025)	9
Şekil 4. Metamfetamin (URL-7, 2025)	10
Şekil 5. MDMA'nın kimyasal yapısı (URL-10, 2025)	15
Şekil 6. MDMA tabletleri (URL-12, 2025)	16
Şekil 7. MDA'nın kimyasal yapısı (URL-13, 2025)	17
Şekil 8. MDA (URL-15, 2025)	17
Şekil 9. Kromatografik ayırma yöntemi (URL-16, 2025)	21
Şekil 10. LC-MS/MS sisteminin şematik görünümü (URL-17, 2025)	24
Şekil 11. LC-MS/MS sistemi çalışma prensibi şematik görünümü (URL-18, 2025)	27
Şekil 12. Otomatik ve manuel SPE manifoldları	30
Şekil 13. SPE işlemi (URL-19, 2025)	31
Şekil 14. Metot validasyonu parametreleri	34
Şekil 15. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazı	41
Şekil 16. Amfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile amfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram	50
Şekil 17. Metamfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile metamfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram	51
Şekil 18. IS-MDMA-d ₅ içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile IS-MDMA-d ₅ ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram	52
Şekil 19. IS, Amfetamin ve Metamfetamine ait MRM kromatogramları	53
Şekil 20. Amfetamine ait kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 21. Metamfetamine ait kalibrasyon eğrisi	54

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihaz/gereçler ile marka/modelleri.....	39
Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ile markaları.....	40
Tablo 3. LC-MS/MS sistem koşulları	40
Tablo 4. LC-MS/MS sisteminin mobil fazlarının zamana bağlı akış koşulları	41
Tablo 5. Maddelerin m/z ve RT değerleri.....	42
Tablo 6. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	44
Tablo 7. Amfetamin ve metamfetamine ait kalibrasyon eğrilerinin denklemi, ...	55
Tablo 8. Amfetamin içermeyen kan örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu.....	55
Tablo 9. Metamfetamin içermeyen kan örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu	56
Tablo 10. 5 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	57
Tablo 11. 25 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	57
Tablo 12. 100 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	57
Tablo 13. 5 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	58
Tablo 14. 25 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	58
Tablo 15. 100 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları	58
Tablo 16. Amfetamin ve metamfetamine ait gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları (n=6)	59
Tablo 17. Amfetamine ait günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	60
Tablo 18. Metamfetamine ait günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.....	60
Tablo 19. Amfetamin ve metamfetamin içeren örneklerde, farklı aylarda ölçülen konsantrasyonlara göre kararlılık değişimleri	61
Tablo 20. Amfetamin ve metamfetamin içeren örneklerde, farklı günlerde ölçülen konsantrasyonlara göre kararlılık değişimleri.....	61
Tablo 21. Olgulara ait gerçek kan örneklerindeki amfetamin ve metamfetamin konsantrasyonları.....	62

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
AMP	: Amfetamin
APCI	: Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu
atm	: Atmosferik Basınç Birimi
ATS	: Amfetamin Tipi Stimülanlar
BBB	: Kan-Beyin Bariyeri
BMK	: Benzil-Metil Keton
BM	: Birleşmiş Milletler
BOS	: Beyin-Omurilik Sıvısı
CO ₂	: Karbondioksit
DEHB	: Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
dk	: Dakika
DLLME	: Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon
EMCDDA	: Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
EUDA	: Avrupa Birliği Uyuşturucu Ajansı
Euro-DEN Plus	: Avrupa Uyuşturucu Acil Durumlar Ağı
EUROPOL	: Avrupa Polis Teşkilatı
GC-MS	: Gaz Kromatografi- Kütle Spektrometresi
GC-MS/MS	: Gaz Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi
GİS	: Göz İçi Sıvısı
GK	: Geri Kazanım
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IS	: İç Standart
INCB	: Uluslararası Uyuşturucu Kontrol Kurulu
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

kg	: Kilogram
kV	: Kilovolt
L	: Litre
LC-MS	: Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi
LC-MS/QTOF	: Sıvı Kromatografi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LLE	: Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
LOD	: Tespit Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
LSD	: Liserjik Asit Dietilamid
m/z	: Kütle/yük
MAO	: Monoamin Oksidaz
MDA	: 3,4-metilenedioksiamfetamin
MDMA	: 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin
MET	: Metamfetamin
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
MS/MS	: Tandem Kütle Spektrometresi
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
ng	: Nanogram
NPS	: Yeni Nesil Psikoaktif Madde
O ₂	: Oksijen Gazı
pH	: Potansiyel Hidrojen
ppb	: Milyarda Bir Parça
Q (1-2-3)	: Kuadropol
R ²	: Kalibrasyon Katsayısının Karesi
%RSD	: Bağlı Standart Sapma
RT	: Alıkonma Zamanı
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
SPME	: Katı Faz Mikro-Ekstraksiyon
S.S.	: Standart Sapma

SWGTOX : Adli Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu
TUBIM : Türkiye Ulusal Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme
Merkezi
TÜRKAK : Türk Akreditasyon Kurumu
URL : Birörnek Kaynak Konumlayıcı
UNODC : Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir maddenin fiziksel, psikolojik ya da sosyal sorunlara sebep olmasına rağmen alımına devam edilmesi, bırakma isteği bulunmasına karşın bırakılamaması ve maddeyi alma isteğinin durdurulamaması durumu "Bağımlılık" olarak tanımlanmaktadır. Bağımlının genetik yapısı, cinsiyet, psikolojik rahatsızlık geçmişi, dürtüsellik ve yenilik arama gibi kişilik özellikleri, sosyal çevre, düzensiz-huzursuz aile ve ev ortamı, ebeveynlerin madde kullanımı geçmişi olması, ebeveyn ilgisinden yoksunluk, çocuklukta yaşanan olumsuz olaylar, arkadaş etkisi, maddeyi erken yaşta kullanıma başlama ve maddenin kendisine bağlı özellikler bağımlılık süreci üzerinde etkili olan çeşitli faktörlerdir (URL-1, 2025).

Bağımlılık yapan maddeleri etkilerine göre tasnif etmek gerekirse bunlar;

- Uyutucu/uyuşturucular (narkotikler; opiatlar ve narkotik analjezikler)
- Uyarıcılar (stimülanlar; amfetamin, kokain)
- Halüsinojenler (hayal gördürücüler; esrar, fenisiklidin, LSD)
- Yatıştırıcılar (depresanlar; alkol, sedatif ve trankilizan ilaçlar).

Tıbbi maksat haricinde kullanılmaları, satılmaları ve dağıtılmaları "madde bağımlılığı" ya da "madde suistimali" şeklinde değerlendirilen bu maddelerin dağıtım, satış ve kullanımı devletler ve uluslararası kuruluşlarca düzenlenmektedir (Akyüzlü & Kayaaltı, 2015). Bununla beraber bu maddelerin üretim, tıbbi maksat dışı tüketim ve yaygın hale gelmesini önlemek için ulusal ve uluslararası düzeyde birçok kurum ve kuruluş mevcuttur. Uluslararası düzeyde yayınları ve çalışmaları bulunan ve Birleşmiş Milletler bünyesinde faaliyet yürüten Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC) bunlardan biridir. Avrupa Birliği (AB) bünyesindeki Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) ise uyuşturucu kullanımına bağlı ölüm olayları, uyuşturucu kaynaklı sosyolojik yıkım ve ölüme sebebiyet veren konuların araştırılması alanında faaliyet yürütmektedir (Akgül, 2023). Ülkemizde, bulunduğu coğrafi konumdan da kaynaklı sebeplerle, bağımlılık yapan maddelerin imalatı, kullanımı ve suistimali global trende paralel olarak her geçen gün artmaktadır (Görgöz, 2022). Türkiye'nin de taraf olduğu ve global düzeyde uyuşturucu ile mücadele alanında yürürlükte olan uluslararası

sözleşmeler ve protokoller bulunmaktadır. Kronolojik olarak sıralamak gerekirse bunlar 1961 Tek Sözleşmesi, 1971 Psikotrop Maddeler Sözleşmesi, 1961 Tek Sözleşmesi'ni tadil eden 1972 Protokolü ve 1988 Birleşmiş Milletler (BM) Uyuşturucu ve Psikotrop Maddelerin Kaçakçılığı ile Mücadele Sözleşmesi'dir (T.C. İçişleri Bakanlığı, 2024). Bunlarla birlikte ülkemizde "Türkiye Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM)"de yürütülen çalışmalar neticesinde tespit edilen tüm uyuşturucular EMCDDA bünyesinde bulunan "Erken Uyarı Sistemi"ne bildirilmektedir (Akgül, 2023).

Popüler kültürün etkisiyle, özellikle televizyon dizileri aracılığıyla kamuoyundaki görünürlüğü artan amfetamin ve metamfetamin, Avrupa'nın yasadışı uyuşturucu piyasasında yer alan sentetik merkezi sinir sistemi (MSS) uyarıcıları arasında bulunmaktadır (EUDA, 2023). Tarihsel olarak amfetamin kullanımı her zaman daha yaygın olmuştur; metamfetaminin ise global çapta yarattığı sorunlar artıyor gibi görünse de bulunabilirliği ve kullanımı çoğu ülkede daha sınırlıdır. Avrupa'da, birkaç ülke dışında, metamfetamin nadiren kullanılan bir uyarıcıdır, ancak bu sentetik uyarıcının dünyanın birçok yerinde uyuşturucuyla alakalı oluşturduğu zararlar giderek artmaktadır. Kimyasal olarak amfetamin ve metamfetamin benzer moleküler yapılaraya sahip olsalar da halk sağlığı açısından oluşturdukları riskler eşdeğer değildir. Metamfetamin, daha yüksek lipofilik özellikleri nedeniyle beyne daha hızlı nüfuz eder ve daha güçlü nörotoksik etkilere sahiptir. Özellikle kristal formda, yüksek saflıkta içilebilir metamfetaminin kullanımı, bağımlılık gelişimini hızlandırmakta ve ciddi nörolojik, kardiyovasküler ve psikiyatrik komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu iki uyarıcı madde, benzer görünüme sahip toz veya tablet formlarında piyasada bulunabilmektedir. Bu durum, kullanıcıların hangi maddeyi veya karışımını tükettiklerinin farkında olmamalarına neden olmakta ve sağlık risklerini artırmaktadır. Özellikle sokak piyasasında, amfetamin ve metamfetaminin karıştırılması veya yanlış etiketlenmesi, zehirlenme vakalarının ve bağımlılık gelişiminin önlenmesini zorlaştırmaktadır. (EMCDDA, 2024).

Modern analiz yöntemleriyle donatılmış adli toksikoloji laboratuvarları, bağımlılık oluşturan psikoaktif maddeler ve bunların metabolitlerinin tespitini hızlı, güvenilir ve hassas bir biçimde gerçekleştirebilme kapasitesine sahiptir (Akgül, 2023). Adli toksikoloji laboratuvarlarında bu analizler için LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/QTOF, HPLC gibi kromatografik sistemler kullanılmaktadır. Bağımlılık yapıcı maddelerin analizi, bağımlı bireylerin tespit edilmesi açısından kritik bir öneme sahipken;

söz konusu maddelerin saptanabilirliği, tedavi süreçlerinin planlanması ve izlenmesinde temel bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bağımlı bireylerin ve kullanılan maddelerin profillerinin oluşturulabilmesi amacıyla, kullanıcı bireylerden düzenli aralıklarla biyolojik örneklerin temin edilmesi gerekmektedir (Wolff vd., 2009). Bağımlılık yapıcı maddelerin belirlenmesine yönelik olarak alınan biyolojik örnekler, olayın niteliği ve bireyin sağlık durumu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte; genellikle kan, idrar ve tükürük gibi vücut sıvıları ile saç ve tırnak gibi keratinize dokulardan elde edilmektedir.

Bu çalışmada, amfetamin tipi uyarıcılar arasında yer alan amfetamin ve metamfetaminin antemortem kan örneklerinde LC-MS/MS sistemi kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi ve uygulanan analitik metodun geçerlilik testlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen ve valide edilen yöntem, Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Toksikoloji Laboratuvarı'na gelen gerçek adli vaka örneklerine başarıyla uygulanmış; böylece yöntemin adli toksikoloji alanında pratik kullanım potansiyeli ortaya konmuştur.

Geliştirilen analitik yöntemin rutin analiz süreçlerine entegrasyonu amacıyla, Enstrümantal Analiz Laboratuvarı bünyesinde kullanıma sunulması planlanmıştır. Bu doğrultuda, katı faz ekstraksiyonu (SPE) aşamasında farklı fizikokimyasal özelliklere sahip adsorban içeren kartuşların kullanımı değerlendirilmiş ve yöntemin seçicilik, geri kazanım ve matriks etkisi açısından performansı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ayrıca, analit stabilitesini çeşitli koşullar altında değerlendirmek amacıyla kapsamlı kararlılık çalışmaları yürütülmüştür. Gerçek adli örnekler üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar, yöntemin pratik geçerliliğini ve analitik güvenilirliğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, valide edilen bu metodun hem adli toksikoloji alanındaki rutin laboratuvar uygulamalarına entegrasyonu hem de mevcut literatüre bilimsel katkı sağlaması hedeflenmiştir.

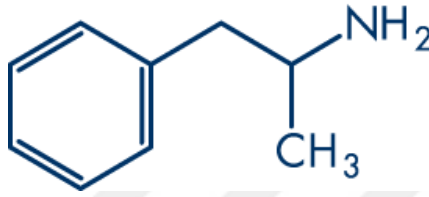
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amfetamin Tipi Uyarıcılar (ATS)

Amfetamin tipi stimülanlar (ATS), yalnızca uyku bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ile Parkinson hastalığı gibi nörolojik ve psikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde değil; aynı zamanda uzun süreli uyanıklık sağlama, öfori oluşturma ve sosyal etkileşimi artırma gibi amaçlarla da yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu sınıfın öne çıkan bileşenleri arasında Amfetamin (AMP), Metamfetamin (MET), 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA) ve 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) yer almaktadır. (Australian Government Department of Health and Ageing, 2011). İlk sentezlendiklerinde benzer biyolojik etkileri ve kimyasal yapılarıyla MET ve MDMA başta olmak üzere birçok kimyasal bileşik 'amfetaminler'le ilişkilendirilmiştir (Fleckenstein, 2007). Fenetilamin analogları olan bu bileşikler, yapılarındaki bir veya daha fazla hidrojen atomunun süstitüsyon reaksiyonu ile değiştirilmesiyle kolaylıkla sentezlenebilmektedir (Woźniak vd., 2018). ATS molekülleri dekstro (d-) ve levo (l-) olmak üzere iki enantiyomerik formda bulunmaktadır. Bu izomerlerden dekstro formu (d-ATS), levo formuna (l-ATS) kıyasla merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde belirgin şekilde daha yüksek farmakolojik aktivite sergilemektedir. (Jenkins, 2008). ATS'ler yirminci yüzyılın başlarından itibaren tıbbi amaçlarla kullanılsalar da uyarıcı, öforik ve zaman zaman halüsinojenik etkileri nedeniyle yüksek düzeyde kötüye kullanım potansiyeline sahip olup, aynı zamanda nörotoksik özellikler taşımaktadır. (Beman vd., 2009; Carvalho vd., 2012). Buna ek olarak, ATS'lere kolay erişilebilir olmaları ve düşük maliyetleri, farklı yaş gruplarındaki bireyler arasında yaygın kullanımını teşvik eden başlıca etmenler arasında yer almaktadır. (Aslan, 2021). İkinci Dünya Savaşı süresince, amfetamin türevi stimülanlar; cesaret artırıcı etkileri, uyanıklık süresini uzatmaları ve adrenalin salınımını teşvik etmeleri nedeniyle Alman, Amerikan, İngiliz ve Japon ordularında yaygın biçimde kullanılmıştır. Savaş sonrası dönemde ise bu maddelerin kötüye kullanım oranları, kitlesel düzeyde artış göstererek epidemiyolojik boyutlara ulaşmıştır (Roll vd., 2009; Moisto vd., 2011). ATS'ler küresel düzeyde en fazla suistimal edilen yasadışı maddeler arasında esrardan sonra ikinci sırada yer almakta olup (EMCDDA, 2019), bağımlılık potansiyeli yüksek sentetik psikoaktif maddeler arasında ise ilk sırada konumlanmaktadır (Dülger,

2008). ATS'ler temel olarak sentetik bileşikler olarak sınıflandırılmakla birlikte; Catha edulis (Khat) ve Ephedra türleri (Ephedraceae familyası) gibi amfetamin benzeri alkaloidleri doğal olarak içeren bitkilerin tüketimi yoluyla da doğal kaynaklı amfetaminlerin kullanımı söz konusu olabilmektedir (Carvalho, 2003).

2.1.1. Amfetamin



Şekil 1. Amfetaminin kimyasal yapısı (URL-2, 2025)

Amfetamin MSS üzerindeki uyarıcı ve semptomimetik etkileri ile canlılık veren ve fenetilamin türevleri arasında yer alan sentetik bir bileşiktir (Şekil 1). Genellikle beyaz veya renksiz kristalize bir toz halinde bulunur (Heal vd., 2013; Fineberg vd., 2013). Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, obezite ve narkolepsinin tedavisinde kullanılmaktadır (Leis vd., 2014; Hädener vd., 2017). IUPAC adı 1-fenilpropan-2-amin'dir. Tuz formunun kimyasal formülü $C_9H_{14}ClN$, molekül kütlesi 171,5 g/mol, erime sıcaklığı $148\pm 3^{\circ}C$ 'dir ve su ile alkolde çözünürken kloroform ile eterde çözünmemektedir (Şekil 2) (Sönmez, 2016).



Şekil 2. Amfetamin (URL-3, 2025)

Çin tıbbında, efedrin etken maddesini içeren *Efedra vulgaris* bitkisi aracılığıyla astım tedavisinde amfetamin benzeri bileşiklerin kullanımı yüzlerce yıldır bilinmektedir (Vearrier vd., 2012). Bununla birlikte, amfetamin ilk kez 1887 yılında Rumen kimyager Lazar Edeleanu tarafından Berlin Üniversitesi'nde yürüttüğü doktora çalışmaları kapsamında 1-metil-2-fenetilamin adıyla sentetik olarak elde edilmiştir (Sulzer vd., 2005). 1929 yılında kimyager Gordon Alles, dönemin astım tedavisinde yaygın olarak kullanılan efedrin maddesine hem ekonomik hem de sentez açısından alternatif oluşturabilecek bir bileşik arayışı sırasında amfetamin sülfatı sentezlemiştir. Alles, bileşiğin güvenliğini değerlendirmek amacıyla hem hayvanlar üzerinde hem de kendi üzerinde deneyler gerçekleştirmiş; bu süreçte amfetaminin uyarıcı ve duygu durum değiştirici etkilerini 'iyilik hissi' olarak tanımlamıştır (Söylemezoğlu, 2001). Her ne kadar astım tedavisinde gerekli dozlarda kullanıldığında taşikardi, hipertansiyon, insomnia, mide bulantısı ve baş ağrısı gibi advers etkiler gözlemlenmiş olsa da, solunum yoluyla alındığında etkili bir dekonjestan olduğu kanıtlanmıştır (URL-4, 2025). Bu özellikleri doğrultusunda, 1932 yılında Smith, Kline & French adlı ilaç firması tarafından 'Benzedrine Inhaler' adıyla reçetesiz bir ürün olarak piyasaya sunulmuş ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yasaklanan kokainin yerine ikame edilmiştir (Green vd., 2008). Amfetamin, tarihsel olarak kriz, şizofreni, barbitürat doz aşımı, multipl skleroz, migren, deniz tutması, çocukluk çağı hiperaktivitesi ve narkolepsi gibi çeşitli klinik durumların tedavisinde önerilmiş ve kullanılmıştır. Ancak narkolepsi hastalarında paranoid psikotik semptomların ortaya çıkması, bu tedavi yaklaşımına yönelik önemli sınırlamalar doğurmuştur. Öte yandan, aynı hasta grubunda gözlemlenen iştahsızlık nedeniyle amfetamin, obezite tedavisinde iştah baskılayıcı ajan olarak da değerlendirilmiştir. Uyarıcı etkileri dolayısıyla kamyon şoförleri tarafından uzun süre uyanık kalmak amacıyla kullanılmıştır (Söylemezoğlu, 2001). Ayrıca yapısında adrenalin hormonuna benzer sentetik aminler içermesi nedeniyle fiziksel dayanıklılığı artırdığı düşünüldükçe sanayi işçilerinde üretkenliği artırmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak işçilerde gözlenen saldırgan davranışlar sonucunda bu uygulamaya son verilmiş ve amfetamin, cephe hattındaki askerlere yönlendirilmiştir. 1950'li yıllarda amfetaminin bağımlılık potansiyelinin bilimsel olarak ortaya konmasıyla birlikte bu tür uygulamalar durdurulmuş; hekimler, daha düşük bağımlılık riski taşıyan metilfenidat gibi alternatif bileşiklere yönelmiştir (Heal vd., 2013; URL-5, 2025).

Günümüzde amfetaminin kötüye kullanımı, metamfetamin ile paralel bir şekilde artış göstermektedir. 2016–2021 yılları arasında 25 ülkede gerçekleştirilen anket çalışmaları,

15–34 yaş arası genç yetişkinlerin yaklaşık %1,4'üne karşılık gelen 1,4 milyon kişinin son bir yıl içerisinde amfetamin kullandığını ortaya koymuştur. 2020 yılı verilerine göre, Bulgaristan, Çekya, Estonya, Almanya, Letonya, Polonya, Slovakya, Finlandiya ve Türkiye'de bağımlılık tedavisi amacıyla ilk kez başvuran bireylerin en az %15'i amfetamin veya metamfetamin kullanıcısıdır. Aynı yıl içerisinde Euro-DEN Plus ağına bağlı hastaneler tarafından amfetamin, en yaygın bildirilen dördüncü madde olarak kaydedilmiştir. Bu bulgularla uyumlu biçimde, amfetamin kaynaklı mortalite oranlarında da artış gözlemlenmiştir (EMCDDA, 2022).

Amfetamin, çeşitli yollarla uygulanabilen bir psikoaktif maddedir; burun yoluyla inhalasyon (snorting), sigaraya sarılarak içilmesi veya dumanının solunması, intravenöz enjeksiyon ve oral yolla alınması en yaygın kullanım biçimleridir. Kullanıcılar, maddenin etkisini artırmak amacıyla genellikle burun yoluyla çekme veya damar yoluyla enjeksiyon yöntemlerini tercih etmektedirler (de la Torre vd., 2004). Amfetaminin burun yoluyla alınması nazal mukozada irritasyona ve doku hasarına yol açabilirken, intravenöz enjeksiyon yöntemi kendine özgü ciddi riskler barındırmaktadır. Enjeksiyon sonrası ortaya çıkan yoğun uyarıcı etki, bazı kullanıcılar için tekrarlama arzusu doğurarak bu uygulama biçiminin saplantı haline gelmesine neden olabilir. Bu yöntemle amfetamin hızla merkezi sinir sistemine ulaşmakta ve doz aşımı riski artmaktadır. Enjeksiyon sırasında kullanılan materyallerin hijyenik olmaması, çeşitli kontaminasyonların doğrudan kan dolaşımına geçmesine neden olmakta; bu durum sepsis dahil olmak üzere çok sayıda enfeksiyöz komplikasyona yol açabilmektedir. Aynı enjeksiyon bölgesine yinelenen uygulamalar, damar yapısında harabiyete neden olarak trombüs ve apse oluşumunu tetikleyebilir. Ayrıca, enjektörlerin birden fazla kullanıcı tarafından paylaşılması, HIV/AIDS ve hepatit gibi bulaşıcı hastalıkların yayılımı açısından ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır (UNODC, 2004). Amfetaminin oral yolla alınması, diğer uygulama yöntemlerine kıyasla daha güvenli kabul edilmekte olup, hızlı emilim ve yüksek biyoyararlanım ile karakterizedir. Emilim, ince bağırsakta gerçekleşmekte ve oldukça yüksek düzeyde olmaktadır. Bu uygulama biçiminde farmakolojik etkiler yaklaşık bir saat içerisinde yavaş yavaş başlamaktadır; plazma konsantrasyonu ise 3 ila 6 saat arasında pik seviyeye ulaşmakta ve etkisi yaklaşık 24 saat boyunca devam etmektedir. Bu uzun etki süresi, diğer kullanım yollarına kıyasla daha belirgindir (UNODC, 2004; Heal vd., 2013) Amfetamin, dekstro (d-) ve levo (l-) olmak üzere iki optik izomerden (enantiyomer) oluşmaktadır. Bu izomerlerden d-amfetamin, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki daha belirgin uyarıcı

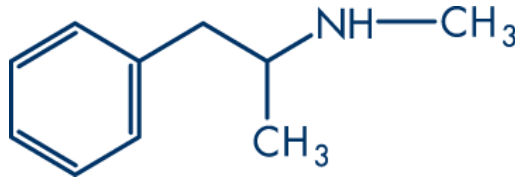
etkileri nedeniyle hem terapötik uygulamalarda hem de eğlence amaçlı kullanımda daha yaygın olarak tercih edilmektedir (Rothman & Baumann, 2006; Heal, 2013; Fineberg, 2013).

Amfetamin, merkezi sinir sistemi üzerinde güçlü uyarıcı etkiler gösteren bir psikoaktif maddedir. Etkisini başta dopaminerjik ve seratonerjik sistemler olmak üzere çeşitli nörotransmitter sistemler aracılığıyla göstermektedir. Katekolaminlerin presinaptik salınımını artırarak dopamin ve noradrenalin düzeylerinde belirgin bir yükselişe neden olur; bu durum sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu tetikler. Ayrıca, seratonerjik sistem üzerindeki etkileri nedeniyle halüsinojenik özellikler de sergileyebilmektedir. Bu nörokimyasal etkileşimlerin sonucunda, amfetamin kullanımı sonrasında bireylerde uykusuzluk, öfori, artmış özgüven, hiperaktivite, taşkınlık, haz alma, neşe, canlılık hissi ile birlikte bilişsel performans ve dikkat düzeylerinde geçici artış gözlemlenmektedir (Leis vd., 2014; Hädener, 2017; Akgür, 2021). Amfetaminin uzun süreli ve yoğun kullanımı, bireylerde hem psikiyatrik hem de fizyolojik düzeyde çeşitli olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Psikiyatrik belirtiler arasında duygusal tepkilerde azalma, kronik yorgunluk, depresif duygudurum, sosyal izolasyon, kişilerarası ilişkilerde artan duyarlılık, konuşkanlıkta artış, insanlarla daha fazla birliktelik kurma eğilimi, kaygı bozuklukları, irritabilite, öfke nöbetleri, uyanıklıkta artış, grandiyöz düşünceler, kalıplaşmış ve tekrarlayıcı davranış örüntüleri, yargı mekanizmalarında bozulma ve riskli cinsel davranışlar gibi semptomlar gözlemlenebilmektedir. Fizyolojik düzeyde ise taşikardi, midriyazis, hipertansiyon, tremor, aşırı terleme, bulantı ve kusma, belirgin kilo kaybı, davranışsal huzursuzluk, kas zayıflığı, solunum depresyonu, göğüs ağrısı, kardiyak aritmi, zihinsel konfüzyon, epileptik nöbetler, diskinezi ve distoni gibi motor bozukluklar, koma ve algı bozuklukları gibi ciddi belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Amfetamin kullanımının kesilmesi sonrasında en belirgin yoksunluk belirtisi depresyondur. Yoksunluk semptomları genellikle kullanımın bırakılmasını takiben 2 ila 4 gün içerisinde en yüksek düzeye ulaşmakta ve bu tablo yaklaşık bir hafta boyunca devam edebilmektedir (UNODC, 2004).

Amfetamin, lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini efedrin ve diğer sempatomimetik aminlere kıyasla daha etkin biçimde geçebilmektedir. Bu özelliği, merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin daha güçlü ve belirgin olmasına katkı sağlamaktadır (Kaplan & Demir, 2014). Sistemik dolaşıma girdikten sonra, yüksek kanlanma düzeyine sahip beyin, karaciğer, böbrekler ve kalp gibi organlarda yüksek

konsantrasyonlara ulaşır. Kimyasal olarak zayıf bazik özellik taşıyan amfetamin, asidik ortamda daha hızlı emilmekte ve bu tür dokularda daha düşük konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Bu farmakokinetik özellikler, amfetaminin vücut içindeki dağılımını ve etkilerinin şiddetini belirleyen temel faktörler arasında yer almaktadır (Rothman & Baumann, 2006; Heal, 2013; Fineberg, 2013). Amfetamin, karaciğerde çeşitli biyotransformasyon süreçlerine uğrayarak metabolize edilmektedir. Bu süreçler arasında başlıca hidroksilasyon, deaminasyon ve oksidasyon reaksiyonları yer almaktadır. Bu metabolik dönüşümler sonucunda amfetamin; para-hidroksi-amfetamin, para-hidroksi-noradrenalin ve norefedrin gibi aktif veya inaktif metabolitlere ayrılmaktadır (Schepers vd., 2003; Carvalho, 2012). Hepatik metabolizma sonucunda amfetaminin yaklaşık %40'ı biyotransformasyona uğrarken, geri kalan kısmı yapısını koruyarak sistemik dolaşımda kalmaktadır. Eliminasyon süreci büyük ölçüde renal yolla gerçekleşmektedir. Amfetaminin yaklaşık %40'ı değişmeden idrarla atılmaktadır. Bu atılımın hızı, idrarın pH düzeyine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. İdrar ortamı asidik hale getirildiğinde amfetaminin renal eliminasyonu hızlanmakta; alkalik ortamda ise eliminasyon süresi uzamaktadır. Bu durum, ilacın biyolojik yarı ömrü üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Amfetaminin yarı ömrü genel olarak 10 ila 13 saat arasında değişmekle birlikte, idrar pH'ına bağlı olarak bu süre 7 ila 34 saat arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu farmakokinetik değişkenlik, amfetaminin vücutta kalış süresini ve etkilerinin süresini belirleyen önemli bir faktördür (Schepers vd., 2003; Heal, 2013).

2.1.2. Metamfetamin



Şekil 3. Metamfetaminin kimyasal yapısı (URL-6, 2025)

Metamfetamin, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde güçlü uyarıcı etkiler gösteren, yüksek bağımlılık potansiyeline sahip sentetik bir psikoaktif maddedir. Farmakolojik etkileri arasında uyarıcılığın yanı sıra halüsinojenik özellikler de yer almaktadır. Kristalize formundan dolayı halk arasında "Kristal Meth" veya "Buz" olarak adlandırılmaktadır

(Şekil 3). Metamfetaminin tuz formu, hem su hem de alkolde yüksek çözünürlük göstermektedir. Fiziksel olarak beyaz renkli ya da yarı saydam kristal yapıdadır. Acı bir tada sahip olup kokusuzdur. Bu özellikleri, maddeyi tanımlamada ve sahada tespit etmede önemli rol oynamaktadır (Şekil 4). Metamfetamin, bazı tıbbi endikasyonlar kapsamında kontrollü şekilde kullanılabilen bir psikoaktif ajandır. Özellikle obezite ve dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) tedavisinde, kısa süreli ve düşük dozlu uygulamalarla terapötik amaçla reçetelenebilmektedir (Jenkins, 2008; Chomchai & Chomcai, 2015; Evren & Bozkurt, 2018; de Matos vd., 2018). Ancak, kimyasal olarak amfetaminin bir türevidir olmasına rağmen, metamfetaminin daha güçlü ve daha uzun süreli etkileri nedeniyle kötüye kullanım potansiyeli ve zarar verme riski oldukça yüksektir. Uluslararası Kimyasal Adlandırma Sistemi (IUPAC) kapsamında metamfetaminin sistematik adı 1-fenil-2-metilaminopropanon olarak tanımlanmıştır. Genellikle hidroklorür tuzu formunda kullanılır ve bu formun kimyasal formülü $C_{10}H_{16}ClN$ 'dir. Molekül kütlesi 185.74 g/mol olup, baz formunun pKa değeri 9.9'dur. Fiziksel özellikleri arasında 170–175 °C aralığında değişen erime noktası yer almaktadır (Smith vd., 2001).



Şekil 4. Metamfetamin (URL-7, 2025)

Metamfetamin ilk kez 1919 yılında Japon kimyager Akira Ogata tarafından, efedrin maddesi kullanılarak sentezlenmiştir (Vearrier vd., 2012). Başlangıçta tıbbi amaçlarla geliştirilen bu bileşik, zamanla farklı kullanım alanlarına yönelmiş ve özellikle psikoaktif etkileri nedeniyle kötüye kullanım riski artmıştır (EMCDDA & EUROPOL, 2019).

Amfetamine kıyasla daha kolay üretilmesi ve enjeksiyon yoluyla kullanılan tuz formunun suda yüksek çözünürlük göstermesi, metamfetamini yasa dışı üretim ve tüketim açısından daha cazip hale getirmiştir. (URL-8, 2025).

İkinci Dünya Savaşı döneminde, Alman ilaç firması Temmler, metamfetamin içeren tabletleri Pervitin ticari adıyla piyasaya sürmüştür. Reçetesiz olarak temin edilebilen bu tabletler; cesaret verme, uyanıklığı sürdürme, fiziksel dayanıklılığı artırma ve yorgunluğu azaltma gibi etkileri nedeniyle hem Alman hem de Japon ordularında yaygın biçimde kullanılmıştır. Ayrıca, savaş döneminde uzun saatler boyunca üretim yapan Alman ve Japon fabrika işçileri tarafından da performans artırıcı amaçlarla tercih edilmiştir (Roll vd., 2009). 1950'li yıllarda, Metedrin ticari ismiyle üretilen metamfetamin tabletleri, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın biçimde erişilebilir hale gelmiştir. Uyarıcı etkileri nedeniyle bu dönemde özellikle öğrenciler, uzun yol şoförleri ve sporcular tarafından performans artırıcı amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır (Bell, 2006). 1960'lı yıllarda genç nüfus arasında kullanımın artmasıyla birlikte, metamfetaminin enjeksiyon yoluyla uygulanabilen formu piyasaya sürülmüş ve bu gelişme, maddenin küresel ölçekte bir narkotik tehdit haline gelmesine zemin hazırlamıştır (T.C. İçişleri Bakanlığı, 2022; Köse, 2023).

1970'li yıllardan itibaren uluslararası düzeyde metamfetaminin kontrol altına alınmasına yönelik hukuki düzenlemeler yürürlüğe girmiştir. Birleşmiş Milletler (BM), 1971 tarihli Psikotrop Maddeler Sözleşmesi ve 1988 tarihli Uyuşturucu Maddelere Karşı Birleşmiş Milletler Sözleşmesi aracılığıyla metamfetaminin yanı sıra üretiminde kullanılan ara kimyasalları da denetim kapsamına almıştır. Bu sözleşmeler doğrultusunda metamfetaminin yasadışı üretimi, dağıtımı, kullanımı ve kaçakçılığı uluslararası düzeyde suç olarak tanımlanmıştır (T.C. İçişleri Bakanlığı, 2022). Amerika Birleşik Devletleri, 1971 yılında metamfetamin üretiminde yaygın biçimde kullanılan öncül maddeler olan psödoefedrin ve efedrinin satış ve kullanımına yönelik düzenlemeler getirmiştir. Bu düzenlemeler, özellikle Orta Avrupa başta olmak üzere çeşitli bölgelerde kristal metamfetamin üretiminin sınırlandırılmasına yönelik önemli bir adım olarak değerlendirilmiştir. Metamfetamin üretiminde kullanılan başlıca öncül maddelerden biri olan 1-fenil-2-propanon (P2P), diğer adıyla benzil metil keton (BMK), özellikle Rusya, Çin ve Litvanya gibi ülkelerdeki yasa dışı laboratuvarlarda yaygın biçimde tercih edilmektedir (Covey, 2007; EMCDDA, 2014; Courtney vd., 2014). Bu kimyasal, metamfetaminin sentezinde kritik bir ara madde olup, üretim sürecinin etkinliğini ve verimliliğini doğrudan etkilemektedir.

Küresel düzeyde metamfetamin kullanımının en yoğun olduğu ülkeler arasında Çekya ve Slovakya ön plana çıkmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, Çekya'daki 15–64 yaş aralığındaki aktif nüfusun %0,42'si, Slovakya'daki aynı yaş grubunun ise %0,21'i metamfetamin kullanıcısı olarak tahmin edilmektedir (UNODC, 2013; Evren & Bozkurt, 2018).

Metamfetamin üretiminde kullanılan yöntemlerden biri de Efedra bitkisinden efedrin maddesinin ekstraksiyonu yoluyla gerçekleştirilen üretim sürecidir. Bu yöntem, özellikle öncül kimyasalların yasal düzenlemelerle kısıtlanması nedeniyle alternatif bir üretim yolu olarak öne çıkmaktadır. Her ne kadar Afganistan özelinde bu yöntem yeni bir gelişme olarak değerlendirilse de efedrin bazlı metamfetamin üretimi tarihsel olarak uzun süredir bilinmekte ve çeşitli bölgelerde uygulanmaktadır (INCB, 2019). Afganistan'ın orta kesimindeki dağlık alanlarda doğal olarak yetişen, çalı formundaki Efedra bitkisi, bu üretim sürecinde temel kaynak olarak kullanılmaktadır. Yapılan saha gözlemlerine göre, yaklaşık 45 kilogram taze Efedra bitkisinden, 72 saatlik bir işlem süreci sonunda 1 kilogram metamfetamin elde edilebilmektedir (EMCDDA, 2020).

Metamfetamin, farmakolojik etkilerini hızlı ve yoğun biçimde göstermesi nedeniyle çeşitli yollarla kullanılabilir. Bu kullanım yolları arasında oral alım, nazal inhalasyon, sigara şeklinde içme, dumanının solunması ve enjeksiyon yer almaktadır (URL-9, 2025).

Oral yolla alınan metamfetamin, gastrointestinal sistem üzerinden etkin biçimde emilir. Bu kullanım şekliyle biyoyararlanım oranı %60–70 düzeyindedir ve plazma konsantrasyonunun pik seviyeye ulaşması 3–6 saat arasında gerçekleşmektedir (Rau vd., 2016).

Nazal yolla kullanım, hızlı emilim ve yüksek biyoyararlanım sağlamaktadır. Bu yöntemle alınan metamfetaminin biyoyararlanımı yaklaşık %80'dir ve plazma konsantrasyonu yaklaşık 4 saat içinde pik yapmaktadır (Schep vd., 2010; Cruickshank & Dyer, 2009; Harris vd., 2003). Bu yolla kullanımda öfori hissi genellikle 8–12 saat sürebilmektedir (Meredith vd., 2005). Ayrıca, nazal yolla alınan metamfetaminin ana metaboliti olan amfetaminin kandaki konsantrasyonunun pik yapması 10–24 saat sürebilmektedir (Schep vd., 2010).

Sigara şeklinde içilmesi veya dumanının solunması durumunda metamfetamin, akciğerler tarafından hızlıca absorbe edilmekte ve etkilerini 15–20 dakika içinde

göstermektedir (Hendrickson vd., 2006). Bu kullanım şeklinin biyoyararlanımı, uygulama tekniğine bağlı olarak %67 ile %90 arasında değişkenlik göstermektedir (Harris vd., 2003).

Enjeksiyon yoluyla kullanım ise metamfetaminin etkilerini anında ortaya çıkaran en hızlı yöntemlerden biridir. Bu yol, ilacın doğrudan sistemik dolaşıma verilmesi nedeniyle maksimum biyoyararlanım sağlamaktadır (Butcher vd., 2013).

Metamfetamin, kimyasal yapısı itibarıyla enantiyomerik özellik gösteren bir bileşiktir ve dekstro (d-) ile levo (l-) olmak üzere iki optik izomer formunda bulunmaktadır. Bu enantiyomerler, farmakolojik etkileri bakımından birbirinden belirgin şekilde ayrılmaktadır. Levo (l-) metamfetamin, yüksek düzeyde periferel semptomatik aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, özellikle solunum sistemiyle ilişkili farmasötik ürünlerde, nazal dekonjestan olarak kullanılmaktadır. L-formun merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki etkisi ise sınırlıdır. Buna karşılık, dekstro (d-) metamfetamin, merkezi sinir sistemi üzerinde daha güçlü bir uyarıcı etki göstermektedir. Bu özellik, d-formun nörotransmitter salınımını artırıcı etkisiyle ilişkilidir. Dolayısıyla, kötüye kullanım potansiyeli yüksek olan form genellikle d-enantiyomeridir. Uyuşturucu olarak kullanılan metamfetamin örneklerinin büyük çoğunluğu bu formu içermektedir (Jenkins, 2008).

Metamfetamin, kısa süreli kullanımda özgüven artışı, öfori, uyanıklık, hiperaktivite, çeviklik ve iştah azalması gibi belirgin psikoaktif etkiler göstermektedir (Moszczynska & Callan, 2017; Pike vd., 2016). Bu etkiler arasında özellikle öfori hissi, kullanıcıda güçlü bir psikolojik bağımlılık gelişmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Söz konusu öforik durum, kullanım sonrasında 6 ila 24 saat sürebilmekte ve bireyin tekrar kullanıma yönelmesini tetikleyebilmektedir (Panenka vd., 2013). Metamfetaminin bağımlılık yapıcı etkisinin temelinde, dopamin salınımının yoğun biçimde uyarılması yer almaktadır. Dopamin sisteminin bu şekilde aşırı uyarılması, zamanla nörodejeneratif süreçleri tetikleyerek dopamin reseptörlerinde ve taşıyıcılarında kalıcı hasarlara yol açabilmektedir (Rusyniak, 2011). Bu nörotoksik etkiler, bireyde motor becerilerde bozulma, anksiyete bozuklukları, şiddet eğilimi, depresif semptomlar ve psikotik belirtiler (örneğin sanrılar) gibi ciddi nöropsikiyatrik sonuçlara neden olabilmektedir. Bu etkilere ek olarak iştahsızlık, solunum hızında ve kan basıncında artış, baş dönmesi, kas yorgunluğu, titreme, mide krampları, bulantı, kusma ve ilerleyen safhada ritim bozukluğu, vücut sıcaklığında artış, hipertansiyon, felç, beyin kanaması, böbrek yetmezliği, koma ve ölüm de sayılabilir (Moszczynska & Callan, 2017; Richards vd., 1999a; Richards vd., 1999b).

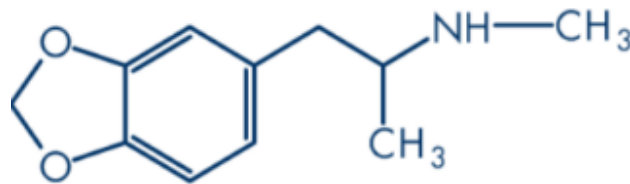
Metamfetamin, yüksek dozda ve/veya uzun süreli kullanımı sonucunda kompulsif madde kullanım davranışlarını tetikleyebilen, bağımlılık potansiyeli son derece yüksek bir psikoaktif ajandır. Bu maddeye ilişkin bağımlılık yükü, kullanımın kesilmesiyle birlikte ortaya çıkan yoksunluk belirtilerinin şiddeti ve süresi bakımından dikkat çekicidir. Özellikle yoğun kullanımın ardından gelişen yoksunluk süreci, yalnızca tipik akut belirtilerle sınırlı kalmayıp, aylarca sürebilen ve "akut sonrası yoksunluk sendromu" olarak tanımlanan bir klinik tabloya evrilebilmektedir. Yüksek doz metamfetamin kullanımı, orta beyin bölgesindeki dopaminerjik nöronlar üzerinde belirgin nörotoksik etkilere sahiptir. Bu nörotoksiste, beyin çeşitli bölgelerinde gri madde hacminde azalmalarla kendini göstermekte; yapısal bütünlükte bozulmalar, nörometabolik işlevlerde düzensizlikler ve genel beyin işleyişinde patolojik değişiklikler ile sonuçlanmaktadır. Söz konusu değişiklikler, bilişsel işlevlerde gerileme, duygudurum bozuklukları ve nöropsikiyatrik semptomların ortaya çıkmasına zemin hazırlayabilir. Ek olarak, metamfetaminin serotonerjik sistem üzerindeki etkileri de dikkate değerdir. Bu madde, yüksek afinitesi nedeniyle serotonerjik nöronlara karşı klasik amfetamin türevlerine kıyasla daha belirgin nörotoksik özellikler sergilemektedir (Yu vd., 2015; Krasnova & Cadet, 2009). Bu durum, serotonerjik nörotransmisyonunda kalıcı bozulmalara ve buna bağlı olarak duygudurum düzenleyici mekanizmalarda işlev kaybına yol açabilmektedir.

Metamfetamin, farmakodinamik etkileri bakımından amfetamin ile benzerlik göstermesine karşın, kimyasal yapısında yer alan metil grubu nedeniyle daha yüksek lipofilik özellik taşımaktadır. Bu yapısal farklılık, metamfetaminin monoamin oksidaz (MAO) enzimine karşı daha dirençli olmasını sağlamakta ve biyolojik bozunma süreçlerine karşı dayanıklılığını artırmaktadır (Schep vd., 2010). Aynı zamanda bu lipofilik yapı, metamfetaminin kan-beyin bariyerini (BBB) geçme kapasitesini belirgin biçimde artırmakta; bu maddeyi diğer merkezi sinir sistemi uyarıcılarına kıyasla daha hızlı ve daha kapsamlı bir şekilde beyin dokusuna ulaşabilir kılmaktadır (Nordahl vd., 2003). Metamfetamin kullanımı sonrasında, madde yüksek konsantrasyonlarda ve kısa sürede BBB'yi aşarak merkezi sinir sisteminde etkisini göstermeye başlar. Bu hızlı geçiş ve yüksek biyoyararlanım, dopaminerjik ve serotonerjik sistemler üzerinde yoğun bir uyarıcı etki yaratmakta; nörotransmitter düzeylerinde ani ve patolojik artışlara neden olmaktadır. Her ne kadar fizyolojik yanıtları amfetamin ile benzerlik taşısa da, metamfetaminin daha güçlü bir uyarıcı olması, aynı dozda daha fazla miktarda aktif bileşenin beyne ulaşması ve

nörotoksik potansiyelinin daha yüksek olması, bu maddeyi amfetaminden ayıran temel özellikler arasında yer almaktadır (URL-4, 2025).

Metamfetamin, karaciğerde başlıca iki biyotransformasyon süreci olan hidroksilasyon ve demetilasyon yoluyla metabolize edilmektedir. Bu süreçler sonucunda metamfetamin, p-hidroksimetamfetamin ve amfetamin olmak üzere iki temel metabolite dönüşmektedir (Jenkins, 2008). Bu bağlamda, amfetamin, metamfetaminin başlıca aktif metaboliti olarak tanımlanmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda, uygulanan metamfetamin dozunun yaklaşık %43'ü ilk 24 saat içerisinde idrarla değişikliğe uğramadan atılmakta; %4 ila %7'lik kısmı ise amfetamin formunda saptanmaktadır. Atılım yolları arasında en belirgin olanı renal ekskresyon olup; terleme ve dışkılama yoluyla eliminasyon daha düşük oranlarda gerçekleşmektedir. Metamfetaminin idrar yoluyla atılımı, uygulanan dozun yanı sıra idrar akış hızı ve idrarın pH değeri gibi fizyolojik parametrelerden etkilenmektedir. Zayıf baz niteliği taşıyan metamfetaminin asidik ortamda çözünürlüğü artmakta ve bu durum atılım hızını belirgin şekilde yükseltmektedir. Örneğin, bazik koşullarda %2 oranında ana ilaç olarak saptanan metamfetamin, idrarın asidik hale gelmesiyle birlikte %76 oranında değişmeden atılabilmektedir (Schep vd., 2010; Baselt, 2009). Uygulama yoluna bağlı olarak metamfetaminin atılım profili değişkenlik göstermektedir. Oral yolla alımda, dozun %30 ila %54'ü metamfetamin, %10 ila %23'ü ise amfetamin formunda idrarla atılmaktadır. Damar içi enjeksiyon yoluyla kullanımda ise bu oranlar sırasıyla %45 ve %7 olarak bildirilmektedir. Oral yolla alınan metamfetaminin yaklaşık %70'i ilk 24 saat içinde idrarla vücuttan uzaklaştırılmakta olup, bu maddenin eliminasyon yarı ömrü bireysel metabolik farklılıklara bağlı olarak 5 ila 30 saat arasında değişkenlik göstermektedir (Rau vd., 2016; Kim vd., 2004).

2.1.3. MDMA (3,4-Metilendioksimetamfetamin, Ekstazi)



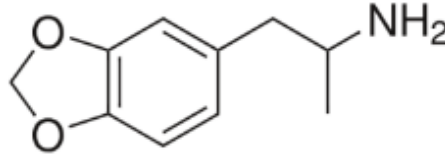
Şekil 5. MDMA'nın kimyasal yapısı (URL-10, 2025)

Günümüzde genellikle çeşitli renklerde ve üzerlerine basılı logolarla ayırt edilen tablet formunda piyasaya sürülen MDMA, özellikle eğlence amaçlı kullanılan "parti uyuşturucusu" olarak tanımlanmaktadır (Şekil 6). Kullanımını takiben bireylerde titreme, aşırı terleme, görme bozuklukları, hipertermi, taşikardi, iştah azalması ve ajitasyon gibi fizyolojik ve psikolojik etkiler gözlemlenmektedir (URL-11, 2025).

A 4x4 grid of 16 different colored and shaped tablets. The top row has four tablets: light green, light blue, white, and tan. The second row has four tablets: light green with a question mark, light blue with a butterfly, white with 'NG', and tan with 'A1'. The third row has four tablets: reddish-pink, reddish-pink, orange, and yellow. The bottom row has four tablets: reddish-pink with 'L', reddish-pink with 'FOR YOU', orange with 'KISS', and yellow with 'H'.

16

2.1.4. MDA (3,4-Metilendioksiamfetamin)



Şekil 7. MDA'nın kimyasal yapısı (URL-13, 2025)

3,4-Metilendioksiamfetamin (MDA), ATS grubunda yer alan ve "Tenamfetamin" adıyla da bilinen sentetik bir merkezi sinir sistemi (MSS) uyarıcısıdır (Gökçe, 2001; EMCDDA & Europol, 2011). Kimyasal yapısı itibarıyla metillenmiş türevi olan MDMA'ya benzemekle birlikte, farmakolojik etkileri ve toksisite düzeyi açısından farklılıklar göstermektedir. MDA ilk olarak 1910 yılında sentezlenmiş, 1939 yılında hayvanlar üzerinde deneysel çalışmalara konu olmuş ve 1941 yılında Parkinson hastalığının tedavisine yönelik insan deneylerinde test edilmiştir (Topal, 2012). Uyarıcı özelliklerinin yanı sıra, yüksek dozlarda katekolamin nörotransmitterlerinin geri alımını inhibe etmesi nedeniyle halüsinojenik etkiler de ortaya çıkabilmektedir (URL-14, 2025). MDMA ile benzer psikolojik etkiler göstermesine rağmen, literatürde MDA'nın daha yüksek toksisiteye sahip olduğu bildirilmektedir (Topal, 2012; URL-14, 2025).

Yüksek doz alımları sonucunda titreme, sarsıntı, taşikardi ve ileri düzeyde koma gibi ciddi fizyolojik komplikasyonlar gözlemlenebilmektedir (Topal, 2012). MDA'nın kimyasal formülü $C_{10}H_{13}NO_2$ hidroklorür olup, molekül ağırlığı 215,5 g/mol'dür. Erime noktası 180–181 °C olarak belirlenmiştir (Gökçe, 2001; EMCDDA & Europol, 2011).



Şekil 8. MDA (URL-15, 2025)

2.2. Adli Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Biyolojik Numuneler

Adli toksikoloji, bireylerin toksik maddelere maruziyetini belirlemek amacıyla çeşitli biyolojik numunelerin analizini içeren disiplinler arası bir bilim dalıdır. Bu kapsamda kullanılan biyolojik örnekler, olayın niteliğine (antemortem veya postmortem), analiz edilecek maddenin özelliklerine ve mevcut örneklerin bütünlüğüne göre değişiklik göstermektedir.

2.2.1. Kan ve İdrar

Kan ve idrar, adli toksikolojik analizlerde en sık kullanılan örneklerdir. Kan, sistemik dolaşımdaki maddelerin doğrudan tespiti açısından yüksek doğruluk sağlar. İdrar ise, özellikle ilaç ve madde metabolitlerinin daha uzun süre tespit edilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Her iki örnek de hem antemortem hem de postmortem vakalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yayayürük vd., 2014).

2.2.2. Saç ve Tırnak

Saç ve tırnak örnekleri, madde kullanımının uzun dönemli retrospektif değerlendirilmesinde önemli avantajlar sunar. Bu örneklerde maddeler keratin matriksine entegre olur ve haftalar hatta aylar boyunca tespit edilebilir. Özellikle kronik madde kullanımı veya geçmişe dönük incelemelerde tercih edilmektedir (Moeller vd., 1998).

2.2.3. Tükürük ve Ter

Tükürük ve ter örnekleri, non-invaziv ve kolay erişilebilir olmaları nedeniyle antemortem vakalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tükürük, kan plazması ile benzer madde konsantrasyonları gösterebildiğinden hızlı tarama testlerinde etkilidir. Ter ise özellikle madde izleme programlarında ve sürekli izlemeye yönelik cihazlarda kullanılmaktadır.

2.2.4. Postmortem Örnekler

Postmortem toksikolojik analizlerde, kan ve idrarın yanı sıra göz içi sıvısı (GİS), beyin omurilik sıvısı (BOS), safra, mide içeriği, mide duvarı, iç organ dokuları, kemik ve kemik iliği gibi örnekler kullanılmaktadır. Bu örnekler, ölüm sonrası metabolik değişikliklere rağmen madde tespiti açısından değerli bilgiler sunabilir (Levine, 2003; Flanagan vd., 2005).

2.2.5. Özel Durumlar: Göbek Kordonu ve Plasenta

Yeni doğanlarda prenatal madde maruziyetinin belirlenmesinde göbek kordonu ve plasenta gibi örnekler kullanılmaktadır. Prenatal dönemde fetüsün toksik maddelere maruziyetinin belirlenmesi hem klinik hem de adli toksikoloji açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, doğum sonrası elde edilen biyolojik örnekler arasında göbek kordonu kanı, plasenta dokusu, mekonyum ve yenidoğan saçları gibi materyaller, fetüsün gebelik süresince maruz kaldığı maddelerin retrospektif olarak değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Loizou vd.,2024).

2.3. Adli Toksikolojide Analitik Yaklaşımlar ve Kromatografik Yöntemlerin Rolü

Adli toksikoloji hem antemortem hem de postmortem vakalarda biyolojik örneklerden elde edilen toksik maddelerin çeşitli analitik yöntemler aracılığıyla incelenmesini konu alan bir bilim dalıdır. Bu disiplin, toksik maddelerin organizma üzerindeki etkilerini belirlemenin yanı sıra, söz konusu maddelerin olası kriminal olaylarla ilişkisini bilimsel veriler ışığında ortaya koymayı amaçlamaktadır. Adli bilim uzmanları, kolluk kuvvetlerinin desteğiyle, elde edilen toksikolojik bulguların hangi suçlarla bağlantılı olduğunu tespit etmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir (Rahmawati, 2021).

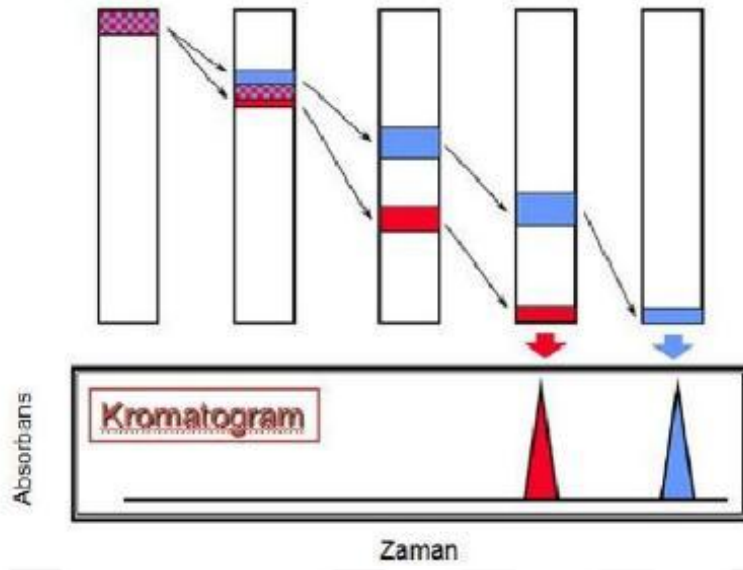
Adli toksikolojik analizler içerisinde en kritik öneme sahip olanlardan biri, bilinmeyen madde analizidir. Bu analiz, genellikle iki temel aşamadan oluşur: ayırma ve tanıma. Ayırma işlemi, örnek içerisindeki bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre birbirinden ayrıştırılmasını; tanıma işlemi ise bu bileşenlerin kimyasal yapılarının belirlenmesini ifade eder. Bu iki aşama, toksik maddenin doğru şekilde tanımlanabilmesi ve etkilerinin anlaşılabilmesi açısından temel teşkil etmektedir.

Günümüz adli toksikoloji laboratuvarlarında, ayırma işlemi için en yaygın ve en gelişmiş teknolojilerden biri kromatografik yöntemlerdir (Mozayani & Noziglia, 2011). Kromatografi, yalnızca adli bilimlerde değil; biyokimya, çevre analizi, farmasötik araştırmalar ve gıda güvenliği gibi pek çok bilimsel alanda yaygın biçimde kullanılan etkili bir ayırma, tanıma, tayin ve saflaştırma yöntemidir. Bu yöntemde üç temel unsur yer alır: sabit faz, mobil faz ve bu iki faz arasında gerçekleşen etkileşim (Görgöz, 2022).

Kromatografi ilk kez 1900 yılında Rus botanikçi Mikhail Tsvet tarafından bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla kullanılmıştır. Tsvet, renk pigmentlerinin ayrı bantlar halinde ayrıştığı bu yöntemle "kromatografi" adını vermiştir (Skoog vd., 1998; Skoog vd., 2007). Kromatografik ayırma işlemi, kimyasal bir karışım içerisinde yer alan farklı yapıdaki bileşenlerin, mobil ve sabit fazlar arasındaki dağılım dengelerine dayanarak ayrılmasını sağlar. Bu yöntem, özellikle fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine yakın olan maddelerin ayrıştırılmasında yüksek başarı göstermektedir (Görgöz, 2022).

Kromatografik sistemlerde, numune genellikle gaz, sıvı ya da süper kritik bir akışkan olan mobil faz aracılığıyla taşınır. Mobil faz, bir kolonda veya yüzeyde sabitleştirilmiş ve kendisiyle karışmayan sabit faz içerisinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz, numune bileşenlerinin mobil ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir (Skoog vd., 1998). Maddeler mobil faz yardımıyla sabit faz üzerinde ilerlerken, sabit fazla farklı düzeylerde adsorpsiyon etkileşimine girer. Bu etkileşim farkı, her bileşenin sabit fazı farklı sürelerde terk etmesine neden olur. Böylece karışım içerisindeki maddeler birbirinden ayrılır, ayrı ayrı toplanır ve tanımlanabilir hale gelir.

Kromatografik analizlerde, bir maddenin sisteme girişi ile sabit fazı terk etmesi arasında geçen süre, alıkonma zamanı (Retention Time, RT) olarak adlandırılır. Bu süre, sabit analiz koşulları altında her kimyasal madde için ayırt edici bir özellik niteliği taşır (Cheremisinoff, 1996; Eser & Sepici, 2018). Kromatografide temel hedef, istenilen maddenin anlamlı bir süre içerisinde ayrıştırılmasını sağlamak ve kantitatif olarak miktarının doğru biçimde ölçülmesidir (Rahmawati, 2021).



Şekil 9. Kromatografik ayırma yöntemi (URL-16, 2025)

Kromatografi teknikleri, ayrılma mekanizması (örneğin adsorpsiyon, jel filtrasyon), uygulama yöntemi (örneğin ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi) ve kullanılan fazın fiziksel hâli (sıvı veya gaz faz) gibi temel kriterlere göre sınıflandırılmaktadır (Zengin, 2020). Kromatografi teknikleri, günümüzde kozmetik, gıda analizi, sağlık hizmetleri, endüstriyel üretim ve tarımsal araştırmalar gibi çok çeşitli alanlarda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu yöntemler; karışımların bileşenlerine ayrılması, maddelerin saflaştırılması ve kantitatif analizlerin gerçekleştirilmesi gibi amaçlarla tercih edilmekte olup, özellikle yüksek duyarlılık ve seçicilik gerektiren uygulamalarda önemli bir analitik araç olarak öne çıkmaktadır (Emekdaş vd., 1990; Eser & Sepici, 2018).

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) gibi kromatografik ayırmaya dayalı birleşik teknikler, günümüzde rutin toksikolojik analizlerde maddelerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesinde en etkili analitik yöntemler arasında yer almaktadır. Özellikle biyolojik materyallerde bağımlılık yapıcı psikoaktif maddelerin tespiti açısından bu yöntemler, yüksek duyarlılık ve seçicilik özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen teknikler olarak öne çıkmaktadır (Wozniak vd., 2018)

2.4. Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), psikoaktif maddeler ve bunların metabolitlerinin kan gibi biyolojik örneklerde tespiti açısından en çok tercih edilen analitik yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntemin tercih edilmesinde; düşük tayin limitine sahip olması, kolay uygulanabilirliği, ön türevlendirme gerektirmemesi, kısa analiz süresi, maliyet etkinliği ve ppb (parts per billion) düzeyindeki konsantrasyonların hassas biçimde belirlenebilmesi gibi birçok avantaj etkili olmaktadır. Ayrıca, kandaki maddelerin kısa yarılanma ömrü göz önüne alındığında, LC-MS/MS yöntemi bu tür maddelerin zamanında ve doğru biçimde saptanmasında kritik bir rol üstlenmektedir (Uzcan, 2023).

Son yıllarda, bağımlılık yapıcı psikoaktif maddelerin analizine yönelik çalışmalarda LC-MS/MS yönteminin kullanımı artış göstermiş; bu teknik, toksikolojik ve adli bilimler alanında yürütülen araştırmalarda önemli bir yer edinmiştir.

Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS), sıvı kromatografinin fiziksel ayırma kapasitesi ile kütle spektrometrisinin gelişmiş analiz teknolojisinin birleşiminden oluşan, yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip güçlü bir analitik tekniktir (Köse, 2023). Bu sistemin daha gelişmiş versiyonu olan LC-MS/MS, tandem kütle analizörleri sayesinde analit ve matriks piklerini daha etkin biçimde ayırarak analizlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırmaktadır (Yıldız, 2012).

Sıvı kromatografinin en gelişmiş ve modern formu olan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), bir sıvı içinde çözünmüş bileşenlerin, kolon içerisindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girmesi sonucu farklı hızlarda ilerleyerek kolonu farklı zamanlarda terk etmeleri prensibine dayanır. Bu farklı çıkış zamanları, bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlar (Snyder vd., 2011). Başarılı bir ayırmanın ardından, kolondan çıkan bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla çeşitli dedektörler kullanılmaktadır. Bu bağlamda kütle spektrometresi (MS), atom ve molekülleri iyonlaştırarak oluşan iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre sıralayan bir analitik tekniktir (Johansson vd., 1989). MS tekniği yüksek seçiciliğe sahip olmasına rağmen, kompleks karışımlarda analitlerin diğer bileşenlerden ayrılmasında sınırlılıklar yaşayabilmektedir. Bu sınırlılıklar, MS sisteminin LC ile kombine edilmesiyle büyük ölçüde giderilmekte; böylece LC-MS/MS sistemleri, düşük konsantrasyonlardaki bileşenlerin hassas biçimde tespiti için ideal bir çözüm sunmaktadır (Görgöz, 2022). LC-MS/MS sistemleri, tandem

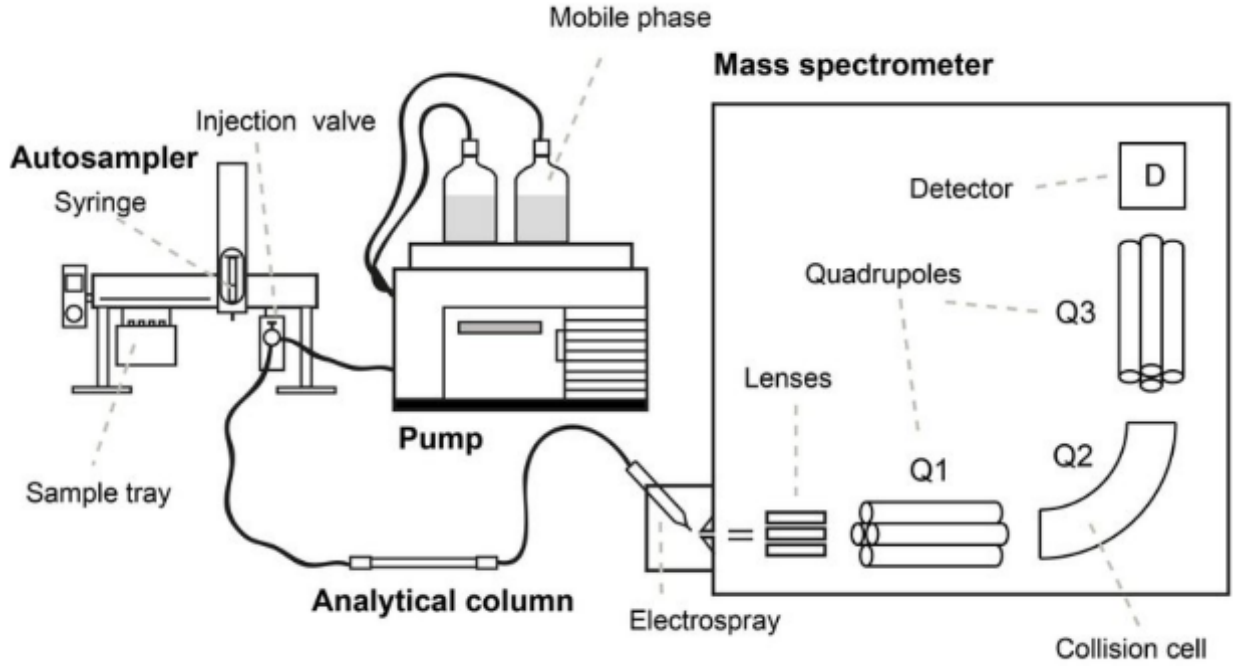
yapı sayesinde birden fazla kütle analizörünün ardışık olarak kullanılmasıyla, analitlerin yapısal tanımlanması ve miktar tayini açısından yüksek doğruluk ve güvenilirlik sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde, özellikle biyolojik örneklerde bulunan bağımlılık yapıcı psikoaktif maddelerin analizinde yaygın olarak tercih edilmektedir.

LC-MS/MS sistemi, kromatografi ve spektrometri tekniklerinin analitik etkinliğini tek bir cihazda birleştiren, yüksek duyarlılığa sahip bir sistem olarak tanımlanmaktadır (Adıören, 2024). Bu sistemde, sıvı kromatografisinde gerçekleştirilen ayırma işlemleri genellikle 100–300 atm basınç aralığında yürütülmektedir ve bu sayede kompleks örneklerde bile bileşenlerin etkin biçimde ayrılması sağlanmaktadır (Döğer, 2016).

LC-MS/MS, sıvı kromatografisinde dedektör olarak ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılmasıyla elde edilen kombine bir sistemdir (Bülbül, 2021). Bu yapı sayesinde, ayrımı tam olarak gerçekleşmeyen moleküller bile kalitatif ve kantitatif açıdan daha kesin biçimde analiz edilebilmektedir (Görgöz, 2022). Sistem, iki farklı iyonizasyon kaynağı içerir: Elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI). Bu kaynaklar, analitlerin iyonlaştırılmasında kullanılırken, özellikle ESI, yüksek polariteye sahip ve uçucu olmayan bileşiklerin iyonlaştırılmasında daha yaygın olarak tercih edilmektedir. ESI, yumuşak iyonizasyon tekniği olması nedeniyle moleküllerin parçalanmadan iyonlaştırılmasını sağlar ve bu yönüyle biyolojik örneklerdeki hassas analizlerde önemli avantajlar sunar (Bülbül, 2021).

LC-MS/MS sisteminin temel parçaları;

Pompa sistemi → Analitik kolon → İyon kaynağı → Vakum sistemi → Lensler → Analizör → Dedektör → Yazılım, şeklinde sıralanabilir.



Şekil 10. LC-MS/MS sisteminin şematik görünümü (URL-17, 2025)

2.4.1. LC-MS/MS Sisteminin Çalışma Prensibi

LC-MS/MS sistemi, otomatik örnekleyici aracılığıyla gerçekleştirilen enjeksiyonun ardından, analiz edilmek istenen bileşenlerin mobil faz içerisinde çözünmüş halde sisteme aktarılmasıyla çalışmaya başlar. Numune, öncelikle guard (koruyucu) kolon üzerinden geçerek olası kirleticilerden arındırılır; ardından sabit faz içeren ayırıcı kolona yönlendirilir. Bu süreç, sistemin yüksek basınç altında (genellikle 100–300 atm) çalışması sayesinde etkin biçimde gerçekleşir (Ardrey, 2003; Ersoy, 2017; Döğer, 2016).

Kolon içerisindeki dolgu maddesine olan farklı kimyasal ve fiziksel ilgileri doğrultusunda, karışımdaki bileşenler birbirinden ayrılır (Ardrey, 2003). Bu ayrımın sağlanabilmesi için iki farklı pompa programı kullanılabilir:

- İzokratik pompa programı, analiz süresince sabit bileşimde tek bir çözücü kullanır.
- Gradient pompa programı ise farklı polaritelere sahip birden fazla çözücünün zamanla değişen oranlarda kullanılmasıyla daha karmaşık karışımların ayrımını mümkün kılar (Langford vd., 2005).

Kolon içindeki ayrımı etkileyen başlıca faktörler; mobil fazın polaritesi, pH değeri ve analit molekülünün yapısal özellikleridir. Sistemin yüksek basınç altında çalışması nedeniyle, analiz sırasında hava kabarcıklarının oluşması istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle mobil fazlar önceden degazör yardımıyla gazdan arındırılır (Ardrey, 2003).

LC-MS/MS sisteminde, sıvı kromatografi ünitesinden çıkan bileşenler, ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) dedektörüne yönlendirilir. Bu dedektör, bileşenleri önce iyonlaştırır; ardından kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırarak kalitatif ve kantitatif analizlerini gerçekleştirir. Sistem, genellikle iki iyonizasyon kaynağı içerir:

- Elektrosprey iyonizasyonu (ESI)
- Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI)

Analizlerde çoğunlukla ESI tercih edilir; çünkü bu teknik, polar ve uçucu olmayan bileşiklerin parçalanmadan iyonlaştırılmasını sağlar (Bülbül, 2021).

Kolonda ayrıştırılan numune bileşenleri, sıvı kromatografi ünitesinden çıktıktan sonra LC-MS/MS sisteminin iyonizasyon bölümüne yönlendirilir. Bu aşamada, moleküller elektrosprey iyonizasyonu (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI) tekniklerinden biriyle iyonlaştırılır (Bülbül, 2021). LC-MS/MS sistemlerinde en yaygın kullanılan iyonizasyon yöntemi olan ESI, hem pozitif hem de negatif modda çalışabilme özelliğine sahiptir ve özellikle polar bileşiklerin iyonlaştırılmasında yüksek verim sunar (Ardrey, 2003). İyonizasyon bölümünde, mobil faz içerisinde çözünmüş halde bulunan moleküller, yüksek voltajlı bir iğne aracılığıyla iyonlaşma odasına püskürtülür. Bu işlem sırasında iyon kaynağı, nötr moleküllere yük kazandırarak iyon oluşumunu sağlar. Oluşan yüklü iyonlar, voltaj farkı sayesinde kapiller boruya doğru yönlendirilirken; iyonlaşmayan bileşenler atık borusu aracılığıyla sistemden uzaklaştırılır (Anılanmert, 2014; Ersoy, 2017). İyonlaşmış moleküllerin kütle analizörlerine ulaşabilmesi için, sistemin iç ortamında hava molekülleriyle çarpışmaların engellenmesi gerekmektedir. Bu durum, yalnızca analizörlerin yüksek vakum koşullarında çalışmasıyla mümkün hale gelir. Bu nedenle LC-MS/MS sistemlerinde bir adet kaba vakum pompası ile birlikte iki adet turbo moleküler vakum pompası entegre edilmiştir. Bu pompalar, iyonların serbest biçimde analizörlere ulaşmasını sağlayarak sistemin hassasiyetini ve doğruluğunu artırır (Ersoy, 2017; Çığman, 2019).

Kütle spektrometresi analizörü, üç temel bileşenden oluşmaktadır: iki adet kütle analizörü (Q1 ve Q3) ve bir çarpışma hücresi (Q2) (Ersoy, 2017). Her bir kuadropol, dört adet silindirik metal çubuktan meydana gelmekte olup, karşılıklı konumlandırılmış

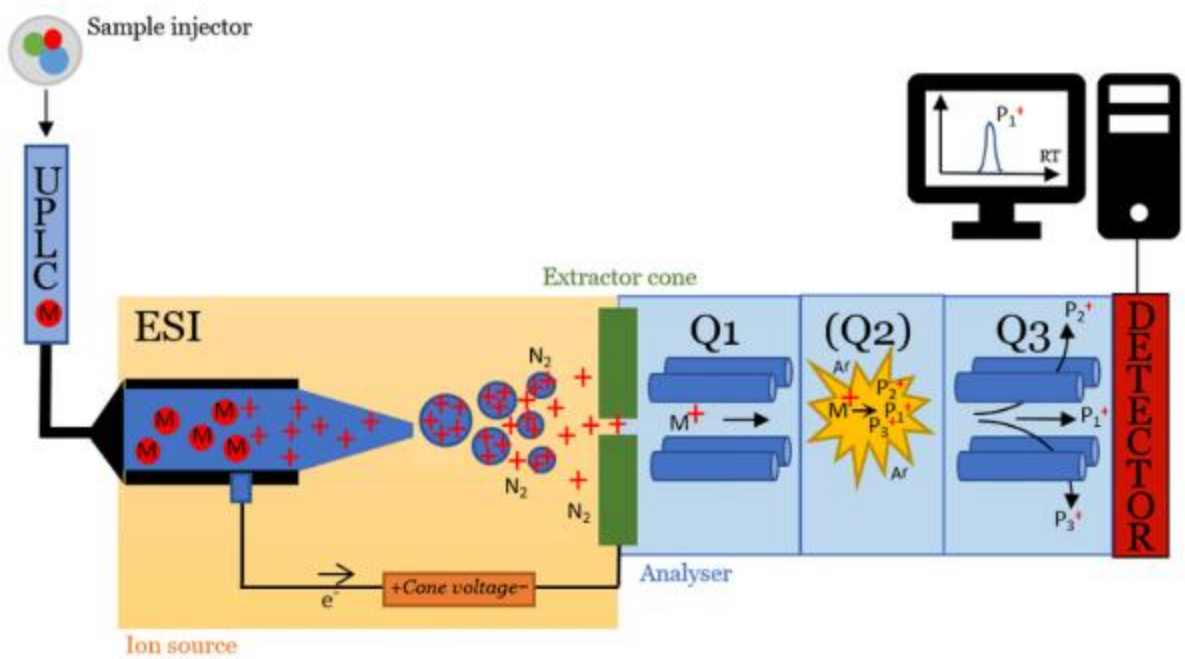
çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlanmıştır. Kuadrupol çiftlerinden birine pozitif doğru akım, diğerine ise negatif doğru akım uygulanmakta; bununla eşzamanlı olarak tüm kuadrupollere sürekli değişen radyofrekanslı alternatif akım verilmektedir. Bu kombinasyon, kuadrupol serisine giren yüklü iyonların helezonik bir hareketle analizör boyunca ilerlemesini sağlar (Çığman, 2019). Sisteme giren moleküller, odaklama işlevi gören elektrostatik lensler aracılığıyla ilk kütle analizörü olan Q1'e yönlendirilir. Q1, iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırarak ana iyonları (precursor ion) belirler (Anılanmert, 2014; Çığman, 2019; Bülbül, 2021). Bu iyonlar, çarpışma hücresi olarak görev yapan Q2'ye geçerek burada azot veya argon gibi inert gazlarla çarpıştırılır. Bu çarpışmalar sonucunda, farklı m/z oranlarına sahip ikincil iyonlar (product ion) oluşur (Bülbül, 2021; Görgöz, 2022). Oluşan ikincil iyonlar, yalnızca bu iyonları filtreleyen ikinci kütle analizörü olan Q3'e ulaşır. Q3, seçilen iyonları dedektöre iletir; burada iyonların enerjisi elektriksel sinyale dönüştürülerek özel yazılım aracılığıyla kütle spektrumuna çevrilir (Çığman, 2019; Adıören, 2024). Bu spektrum üzerinden kantitatif analiz yalnızca ikincil iyonlar kullanılarak yapılabilirken, kalitatif analiz hem ana hem de ikincil iyonların birlikte değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir.

Bir analitin karakteristik iyonunun, ilk parçalanma sonrası oluşan iyonun ikinci kez parçalanmasıyla elde edilmesi ve bu iyonun izlenmesi işlemi, Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring, MRM) olarak adlandırılır. Bu yöntemin duyarlılığı, oluşan ikinci iyonun miktarına bağlıdır (Zazoğlu, 2011). MRM modu, yalnızca hedef analite özgü iyonları seçerek kimyasal gürültüyü büyük ölçüde azaltmakta ve bu yönüyle son derece seçici ve hassas bir analiz imkânı sunmaktadır (Kushnir vd., 2010). Son olarak, Q3'ten dedektöre ulaşan iyonlar, veri kontrol ünitesi tarafından dijital sinyallere dönüştürülerek analiz edilebilir veriye çevrilir (Ersoy, 2017).

LC-MS/MS analizlerinde analitlerin kimyasal özellikleri, iyonizasyon tipi, moleküllerin polariteleri, iyonize veya iyonize olabilen fonksiyonel grup varlığı, yüzey aktivitesi, parçalanma modeli ve mobil fazın bileşimi gibi parametreler, sistemin spesifite (özgüllük) ve hassasiyet (duyarlılık) düzeyleri üzerinde doğrudan etkili olmaktadır (Kushnir vd., 2010). Bu faktörler, analitin iyonlaşma verimliliğini ve dedektöre ulaşma kapasitesini belirleyerek hem kalitatif hem de kantitatif analiz sonuçlarının doğruluğunu şekillendirir.

LC-MS/MS sisteminin en önemli sınırlayıcı unsurlarından biri ise matriks etkisi olarak tanımlanmaktadır. Matriks etkisi, biyolojik örneklerde bulunan proteinler, tuzlar, lipidler ve diğer kompleks bileşenlerin iyonizasyon sürecini olumsuz yönde etkilemesiyle ortaya çıkar. Bu

durum, analit sinyalinin baskılanmasına veya artırılmasına neden olarak kantitatif doğruluğu tehdit edebilir. Nitekim, oldukça iyi optimize edilmiş bir numune hazırlama süreci uygulanmış olsa dahi, matriks etkisinin tamamen ortadan kaldırılması çoğu zaman mümkün olmamaktadır (Peters & Remane, 2012). Bu nedenle, LC-MS/MS analizlerinde matriks uyumlu kalibrasyon, iç standart kullanımı, SPE gibi stratejilerle matriks etkisinin minimize edilmesi hedeflenmektedir. Ancak bu önlemler, matriks kaynaklı varyasyonları tamamen elimine edememekte; bu da yöntemin uygulama hassasiyetini sınırlayan önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 11. LC-MS/MS sistemi çalışma prensibi şematik görünümü (URL-18, 2025)

2.4.2. LC-MS/MS Sisteminin Adli Toksikolojideki Yeri

Adli bilimlerin bir alt disiplini olan adli toksikoloji, insan biyolojik örneklerinde (kan, plazma, serum vb.) bulunan kimyasal maddelerin kalitatif ve kantitatif analizini gerçekleştirmek amacıyla yüksek doğruluk ve güvenilirlik düzeyine sahip analitik yöntemlere ihtiyaç duymaktadır (Oka, 2020). Bu bağlamda, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi, adli toksikoloji alanında en yaygın ve en güvenilir teknik olarak kabul edilmektedir (Maurer, 2007; Bülbül, 2021).

LC-MS/MS yöntemi, çok düşük konsantrasyonlardaki maddelerin tespiti ve miktar tayini açısından üstün performans sergilemektedir. Özellikle tek seferlik madde kullanımı

ya da kullanım üzerinden uzun süre geçmiş vakalarda bile, hedef bileşiğin biyolojik örneklerdeki düşük miktarlarının hassas ve doğru biçimde analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Bu özellikleri sayesinde LC-MS/MS, adli toksikolojide "altın standart" yöntem olarak literatürde yerini almıştır (Maurer, 2007; Bülbül, 2021).

Adli toksikolojik analizlerde, özellikle ATS'ler ve diğer psikoaktif maddelerin biyolojik örneklerde kapsamlı biçimde taranması hem zaman hem de maliyet açısından önemli bir yük oluşturmaktadır. Buna ek olarak, yeni nesil psikoaktif maddelerin (NPS) sayısının gün geçtikçe artması, LC-MS/MS yönteminin bu dinamik ve sürekli değişen madde profiline uyum sağlayacak şekilde güncellenmesini zorunlu kılmaktadır (Grapp vd., 2018). Bu bağlamda, LC-MS/MS metodolojisinin sürekli olarak optimize edilmesi ve yeni maddelere yönelik tarama kapasitesinin artırılması, adli toksikolojinin güncel gereksinimlerini karşılamada kritik bir rol oynamaktadır.

2.5. Numune Hazırlama Yöntemleri

LC-MS/MS yöntemi ile biyolojik numunelerin analizinde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi, yalnızca cihazın teknik kapasitesine değil, aynı zamanda analiz öncesi gerçekleştirilen numune hazırlama sürecine de doğrudan bağlıdır. Numune hazırlama, analitik kimyanın temel basamaklarından biri olup, örnek içerisindeki hedef analitin uygun biçimde izole edilmesini, matris etkilerinin minimize edilmesini ve homojen bir çözelti elde edilmesini amaçlamaktadır. (Yayayürük vd., 2018).

ATS'ler ve diğer psikoaktif bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılan kromatografik yöntemlerde, analitik sürecin başarısı büyük ölçüde numunenin analiz öncesi uygun şekilde hazırlanmasına bağlıdır (Yayayürük vd., 2018; Rahmawati, 2021). Bu bağlamda, biyolojik örneklerde bulunan hedef analitin karmaşık matris ortamından etkin biçimde izole edilmesi ve interferans oluşturabilecek bileşenlerden arındırılması gerekmektedir.

Analitlerin matriksten ayrıştırılması amacıyla çeşitli ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiştir. Kullanılan yöntemler arasında sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), katı faz mikro-ekstraksiyon (SPME) ve dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) yer almaktadır (Rahmawati, 2021; Köse, 2023).

Numune ön hazırlık tekniklerinin seçimi, analiz edilecek bileşiğin kimyasal özelliklerine, biyolojik örneğin türüne ve hedeflenen analiz hassasiyetine göre

belirlenmekte olup, analitik yöntemin validasyonu açısından kritik bir aşamayı oluşturmaktadır.

2.5.1. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyon (SPE), biyolojik numunelerdeki hedef analitlerin izolasyonu amacıyla kullanılan, ayırım işleminin tek kullanımlık katı faz kartuşlar aracılığıyla gerçekleştirildiği ve günümüzde yaygın biçimde tercih edilen bir numune hazırlama yöntemidir (Köse, 2023). Bu yöntemde sıvı numuneler, istenmeyen bileşenlerden arındırılarak temizlenmekte, yoğunlaştırılmakta ve analizin ileri safhaları için örnek matriks yapısı uygun hale getirilmektedir (Aksoy & Yavuz, 2006).

SPE sürecinde, sıvı örnekler sorbent materyali içeren kartuşlardan geçirilmekte; analitler, adsorban yüzeyleriyle etkileşime girerek tutulmakta ve ardından uygun çözücüler kullanılarak düşük hacimlerde geri kazanılmaktadır (Kataoka, 2003; Kole vd., 2011). Bu geri kazanım işlemi, analitin seçici biçimde zenginleştirilmesini ve matris etkilerinin minimize edilmesini sağlamaktadır.

Sıvı numunelerin kartuşlardan geçirilmesi, yer çekimi etkisiyle pasif olarak gerçekleştirilebildiği gibi, işlem süresini kısaltmak ve laboratuvar verimliliğini artırmak amacıyla vakum manifold sistemleri kullanılarak da yapılabilmektedir. SPE yöntemi, yüksek tekrarlanabilirlik, düşük çözücü tüketimi ve otomasyona uygunluğu gibi avantajları sayesinde özellikle LC-MS/MS gibi yüksek duyarlılığa sahip analiz sistemleriyle birlikte biyolojik örneklerin hazırlanmasında etkin bir rol oynamaktadır. (Aksoy & Yavuz, 2006).



Şekil 12. Otomatik ve manuel SPE manifoldları

SPE işlemi, analitik örnek hazırlama sürecinde dört temel aşamadan oluşmaktadır: şartlandırma, numune yükleme, yıkama ve elüsyon. Her bir aşama, hedef analitlerin seçici biçimde tutulması ve matris bileşenlerinden ayrıştırılması açısından kritik öneme sahiptir.

- **Şartlandırma Aşaması:** Bu aşamada, kartuş içerisinde yer alan adsorban materyal uygun bir çözücü ile ıslatılarak işlemeye hazır hale getirilir. Şartlandırma işlemi, adsorban yüzeyindeki fonksiyonel grupların çözülmesini sağlamak, adsorbanın bünyesinde bulunabilecek safsızlıkları uzaklaştırmak ve partiküller arasındaki hava boşluklarını elimine etmek amacıyla gerçekleştirilir. Bu sayede analitlerin adsorbanla etkin etkileşim kurması için uygun bir ortam oluşturulur.

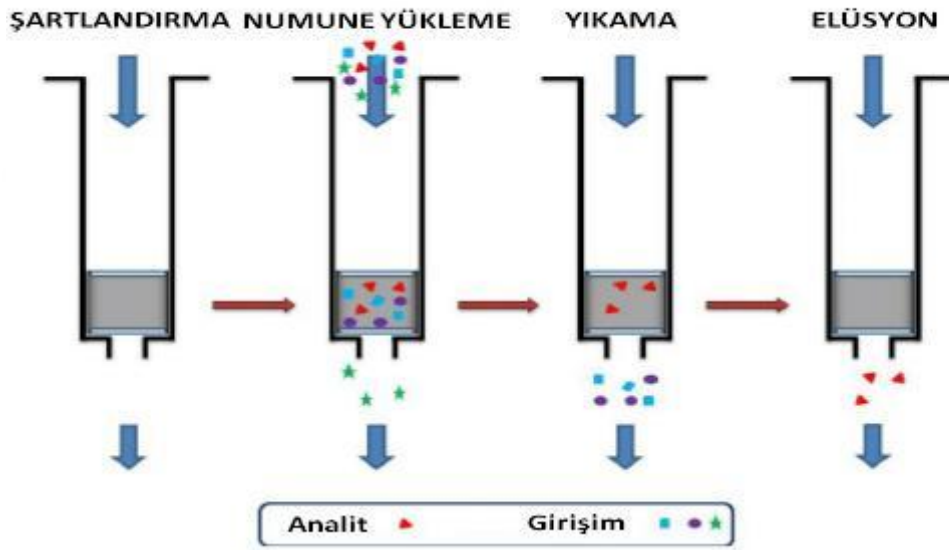
- **Numune Yükleme Aşaması:** Şartlandırılmış kartuşa sıvı numune yüklenerek kolondan geçirilir. Bu süreçte hedef analitler adsorban yüzeyleriyle etkileşime girerek tutulurken, matris içerisinde yer alan istenmeyen bileşenler kartuşu geçerek uzaklaştırılır. Numune yükleme hızı ve hacmi, analitlerin adsorpsiyon verimliliğini doğrudan etkileyebilmektedir.

- **Yıkama Aşaması:** Kartuş, analitlerin adsorban üzerinde kalmasını sağlayacak şekilde düşük polariteye veya düşük konsantrasyona sahip bir çözücü ile yıkanır. Bu aşama, adsorban üzerinde tutulan analitlerin korunmasını sağlarken, zayıf etkileşimli ve interferans oluşturabilecek bileşenlerin uzaklaştırılmasına olanak tanır.

- **Elüsyon Aşaması:** SPE işleminin son aşamasında, analitlerin adsorbandan ayrıştırılması amacıyla uygun çözücüler kartuş üzerinden geçirilir. Elüat, analitleri içeren fraksiyon olarak toplanır ve bu fraksiyon analiz için hazır hale getirilir. Elüsyon

solventinin seçimi, analitin kimyasal özelliklerine ve adsorban türüne bağlı olarak optimize edilmelidir.

Bu dört aşamalı SPE süreci, biyolojik örneklerdeki analitlerin seçici biçimde zenginleştirilmesini ve LC-MS/MS gibi yüksek duyarlılığa sahip analiz sistemlerinde güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. (Andrade-Eiroa vd., 2016; Camel, 2023).



Şekil 13. SPE işlemi (URL-19, 2025)

2.6. İç Standart Yöntemi ve Kromatografik Analizlerdeki Önemi

Kromatografik analizlerde miktar tayininin doğruluğunu ve kesinliğini artırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan iç standart yöntemi, analitik kimyada "bağlı kalibrasyon" olarak da adlandırılmaktadır (Aslın, 1995). Bu yöntem, özellikle LC-MS/MS gibi yüksek hassasiyetli sistemlerde, enjeksiyon hacmi farklılıkları, ayırma faktörlerinden kaynaklanan değişkenlikler ve numune matrisine bağlı belirsizliklerin etkisini minimize etmek amacıyla tercih edilmektedir (Skoog vd., 1998).

İç standartlar; analitlerin alıkonma zamanlarına yakın ancak onlardan farklı bir noktada belirgin bir pik veren, çözünürlük, dedektör hassasiyeti ve kromatografik davranış açısından analitlere benzer özellikler taşıyan, aynı zamanda numune bileşenleri, kolon dolgu maddeleri ve mobil faz ile reaksiyona girmeyen, yüksek saflıkta ve numune

matrisinde doğal olarak bulunmayan bileşiklerdir. Bu özellikleri sayesinde iç standartlar, analitik sistemde referans görevi görerek kantitatif analizlerde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlar (Aslın, 1995).

İç standart yönteminde, konsantrasyonları bilinen analit ve iç standart bileşikleri birlikte hazırlanarak kromatografik sisteme enjekte edilir. Elde edilen kromatogramda analit pik alanı veya pik yüksekliği, iç standart pik alanına veya yüksekliğine oranlanarak analitik değişken olarak değerlendirilir. Bu oranlar kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi, ideal koşullarda orijinden geçen doğrusal bir grafik şeklinde elde edilir (Aslın, 1995). Doğru şekilde hazırlanmış kalibrasyon karışımları ile %1'in altında hata payı ile yüksek kesinlikte sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bu yöntemin başarıyla uygulanabilmesi için en temel koşul, uygun bir iç standart bileşiğinin seçilmesidir. İç standart seçimi, analit ile benzer fizikokimyasal özelliklere sahip ancak analitik sistemde birbirinden ayrılabilir nitelikte olmalıdır. Uygun iç standart kullanımı, kromatografik analizlerde sistematik hataların giderilmesine ve analitik güvenilirliğin artırılmasına olanak tanımaktadır (Skoog vd., 1998).

2.7. Metot Validasyonu

Analitik metot validasyonu, belirli bir matriks içerisinde yer alan bir veya birden fazla analitin konsantrasyonlarının tayininde kullanılan yöntemin, hedeflenen uygulama kapsamında güvenilirliğini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen sistematik işlemler bütünüdür (Green, 1996). Bu süreç, söz konusu metodun analitik gereksinimlerini tanımlamaya yönelik temel bir adımdır ve herhangi bir nitelikli analitik uygulamanın vazgeçilmez bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (Görgöz, 2022).

Bir analitik metodun valide edilmesindeki temel amaç, yöntemin öngörülen kullanım koşulları altında güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar üretebildiğinin bilimsel olarak doğrulanmasıdır. Bu bağlamda validasyon, analitik sürecin kalite güvencesini sağlayan ve elde edilen verilerin geçerliliğini destekleyen kritik bir aşamadır. (Oka, 2020).

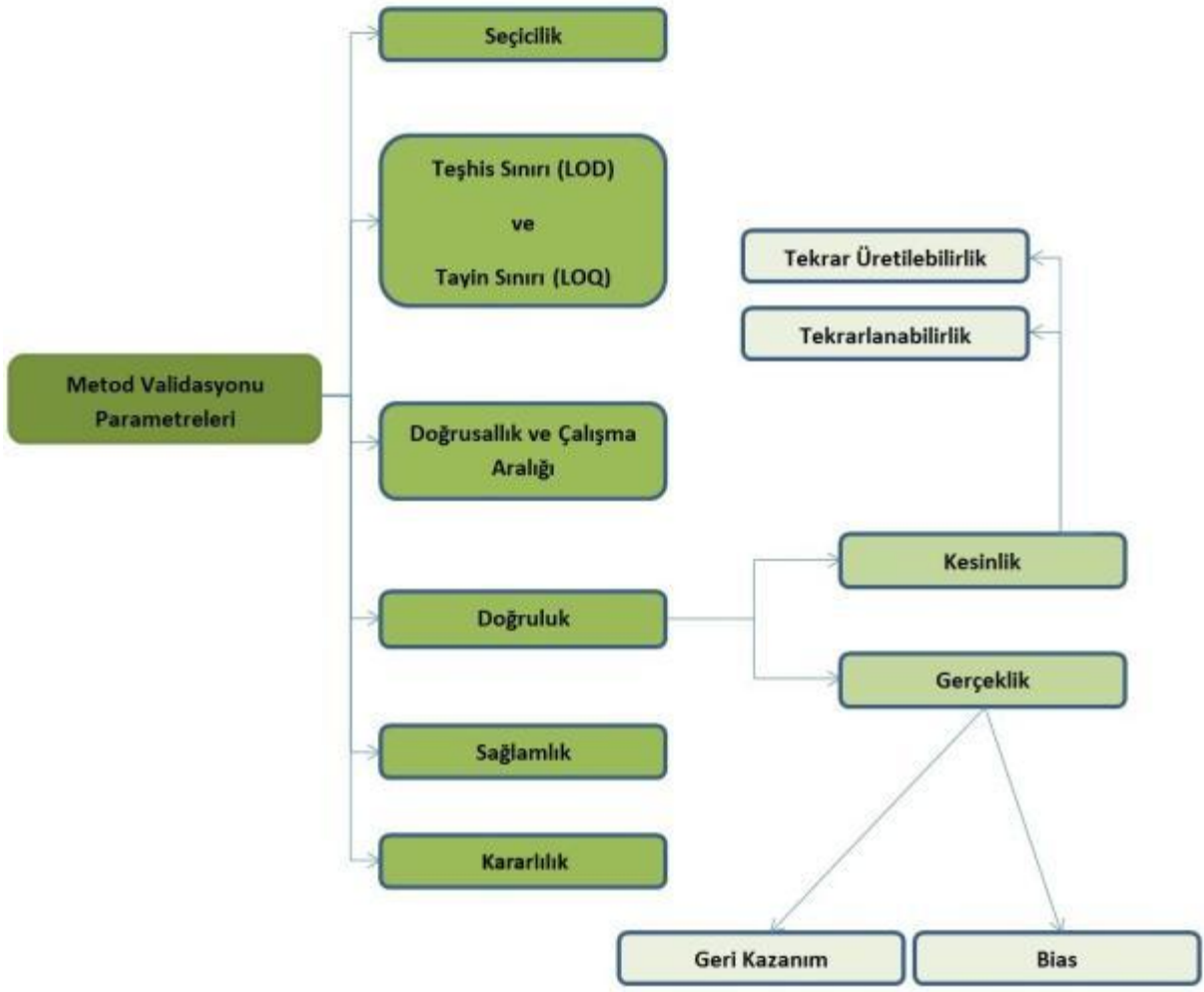
Validasyon işlemi;

- Bir metot laboratuvarında ilk kez kullanıldığında,
- Bir analiz için yeni bir metot geliştirildiğinde,
- Kullanılan metotta değişiklik yapıldığında,

- Validasyonu yapılmış bir metot farklı bir laboratuvarında kullanıldığında,
- Farklı bir cihaz kullanıcısı tarafından veya farklı bir cihazda ilk defa kullanıldığında,
- Kalite kontrol testlerinde mevcut metodun zamanla değiştiği tespit edildiğinde,
- İki metodun karşılaştırılması gerektiğinde yapılır (Akdağ, 2003).

Validasyon parametreleri;

- Seçicilik,
- Doğrusallık ve Çalışma aralığı,
- Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ),
- Doğruluk,
- Kesinlik,
 - Tekrarlanabilirlik,
 - Tekrar Üretilirlik,
- Gerçeklik,
 - Geri Kazanım,
 - Bias,
- Sağlamlık
- Kararlılık olarak sıralanabilmektedir (T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018).



Şekil 14. Metod validasyonu parametreleri

2.7.1. Seçicilik

Seçicilik, analitik metodun hedef analiti, aynı örnek matrisi içerisinde bulunması muhtemel diğer bileşenlerden ayırt edebilme kapasitesini ifade eder. Bu parametre, metodun yalnızca hedef analite özgü olduğunu ve interferans oluşturan maddelere karşı duyarlılığını ortaya koyar. Analitik yöntemin seçici olduğu, boş (blank) örneklerde ve kullanılan çözücülerde hedef analite ait kromatografik bölgede herhangi bir girişim (interferans) oluşturan pik bulunmamasıyla doğrulanır. Bu durum, yöntemin spesifikliğini destekler ve analitin doğru şekilde tanımlanmasını sağlar. (T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018).

2.7.2. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik metodun ölçüm sinyali ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişkinin belirli bir aralıkta doğrusal olup olmadığını değerlendiren parametredir. Bu ilişki, en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar arasında yapılan ölçümlerle ortaya konur ve genellikle kalibrasyon grafiği ile ifade edilir. Eurachem rehberine göre, güvenilir bir kalibrasyon eğrisi oluşturulabilmesi için ölçümler en az altı farklı konsantrasyon düzeyinde ve her düzeyde üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmelidir. Kalibrasyon grafiği, referans konsantrasyonlara karşılık gelen ölçüm sinyalleri veya doğrudan ölçüm sonuçları kullanılarak çizilir.

Kalibrasyon eğrisinden elde edilen:

- Eğri denklemi: $y = ax + b$
- Kalibrasyon katsayısı (R) ve
- Kalibrasyon katsayısının karesi (R^2)

doğrusallığın kantitatif göstergeleridir. R^2 değerinin ± 1 'e yakın olması, ölçüm sinyali ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu gösterir. Literatürde $R^2 \geq 0,99$ değeri, doğrusal ilişkinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu ifade etmektedir (Yılmaz, 2013; He vd., 2018).

2.7.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Bir numunenin ihtiva ettiği analitin varlığının belirlenebildiği ancak kantitatif analiz için kesin değer olmadığı konsantrasyon sınırı tespit sınırı (LOD) olarak adlandırılırken, numunedeki analitin en düşük konsantrasyonunun ölçülebileceği alt sınır ise tayin sınırı (LOQ) olarak adlandırılır (Yıldız vd., 1997).

LOD ve LOQ değerlerinin çeşitli hesaplama yöntemleri vardır. Bunlar kör numunelerin sonuçları üzerinden, metodun standart sapması üzerinden ve cihazın sinyal-gürültü oranı üzerinden olarak sıralanabilir.

- **Kör numunelerin sonuçları üzerinden**

$$LOD = 3 \times S + C$$

$$LOQ = 10 \times S + C$$

S: Standart sapma

C: Ortalama konsantrasyon

- Metodun standart sapması üzerinden

$$LOD = 3 \times S/b$$

$$LOQ = 10 \times S/b$$

S: Metodun standart sapması

b: doğrunun eğimi

- Sinyal-gürültü oranı üzerinden

LOD düzeyindeki bir numunede bulunan analit pikinin sinyalinin kromatografik sistemin gürültüsüne oranı 3,3; LOQ düzeyindeki bir numunede bulunan analit pikinin sinyalinin kromatografik sistemin gürültüsüne oranı 10 olmalıdır. (Yuwono & Indrayanto, 2005; T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2013; T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018; Arpacık, 2019).

$$LOD = 3,3 \times S/N$$

$$LOQ = 10 \times S/N$$

2.7.4. Doğruluk

Doğruluk, mevcut analitik yöntemle ulaşılan analiz sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır (T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018). Yani, kullanılan yöntemle ulaşılan analiz sonuçları gerçek değerle ne kadar örtüşüyorsa yöntem o derece doğrudur (Adıören, 2024). Kalitatif bir ölçü olan doğruluk kantitatif değer ifade etmez. Doğruluk ölçümünün kesinlik ve gerçeklik olmak üzere iki bileşeni vardır (Bülbül, 2021).

2.7.4.1. Kesinlik

Kesinlik, analiz sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ölçüsü olup analiz sonuçlarının ortalama değer etrafındaki ve ölçüm belirsizliğinde rastgele hatanın dağılımını göstermektedir. Kesinlik, standart sapma, bağıl standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı ile ifade edilir. Tamamen bertaraf edilemese de iyi çalışma teknikleri ile küçültülebilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere iki bileşeni vardır (Yuwono & Indrayanto, 2005; Şahin, 2019)

Tekrarlanabilirlik; yöntemin aynı laboratuvarında, aynı gün içinde, aynı analist nezaretinde ve aynı sistemle yapılan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. "r" ile gösterilir. Standart sapma veya yüzde bağıl standart sapma ile ifade edilir (T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018).

Tekrar Üretilebilirlik; yöntemin farklı laboratuvarında, farklı günlerde, farklı analistler nezaretinde ve farklı sistemle yapılan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. "R" ile gösterilir. Standart sapma veya yüzde bağıl standart sapma ile ifade edilir (T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018).

2.7.4.2. Gerçeklik

Gerçeklik, büyük sayılarda yapılan analiz sonuçlarının ortalamasının gerçek değere yakınlığının bir ifadesidir (TÜRKAK, 2019). Gerçeklik, sistematik hata hesabı (bias) türünden ifade edilirken hesaplamalar için kesinlik çalışmasından elde edilen veriler kullanılmakta ve gerçek değere göre geri kazanım oranları hesaplanmaktadır (Bülbül, 21021; Adıören, 2024).

Bias (Sistematik Hata Hesabı); tüm ölçümlerde sabit hata veya sistematik hata olarak adlandırılan, bias (eğilim) şeklinde karakterize edilen ve rastgele hatalar haricinde kabul edilen gerçek değerden daha az veya daha fazla elde edilen değerler vardır. Sistematik hata kantitatif olarak gerçek bias veya biasın tahmini limiti ile belirtilir. Bu şekilde kantitatif olarak ele alınabildiğinde bu değer, tüm ölçüm sonuçlarına eklenebilen bir düzeltme faktörü işlevi görür. Sıfır biaslı, yani gerçek değer ile ölçülen değerlerin gerçek ortalaması arasında hiç fark olmayan ölçümler pratikte enderdir (Sadikhov vd., 1995).

Geri Kazanım; Numunedeki analitin ölçülen konsantrasyonunun gerçek konsantrasyon değerine oranı olarak ifade edilir (Yıldız vd., 1997). Validasyon parametrelerinden biri olan geri kazanım çalışması en az 6 paralel tekrarlı yapılmalı ve oranın kabul edilebilir olması için %70-120 aralığında olmalıdır (T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2013). Ekstraksiyon ve ön işlemler ile yakından ilgilidir, bu işlemlerdeki madde kayıplarını vermektedir (Zengin, 2020).

2.7.5. Sağlamlık

Numune miktarı, kolon sıcaklığı, analist değişimi, uçuculuk, markası farklı kimyasallar, enjeksiyon hacmi vb. gibi analiz koşullarındaki ufak değişikliklerden yöntemin etkilenmeden kalabilme kapasitesi olarak ifade edilir. Yani, bir yöntem değişikliklerden ne kadar az etkileniyorsa o nispette sağlamdır (Zengin, 2020). Gerçek

analiz koşulları altındaki tekrarlanabilirlik, yöntemin tutarlılığının bir göstergesidir (Yıldız vd., 1997).

2.7.6. Kararlılık

Mevcut yöntem ile bir analizde çalışılıp akabinde daha sonra tekrar çalışılmak üzere muhafaza edilen materyallerde yapılan ve analiz sonuçlarında analit(ler)in bozunmadan kaldığı süreyi belirlemek amacıyla yapılan işlemler kararlılık çalışması olarak adlandırılır (Chambers vd., 2007). Mevcut yöntemin tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar verebilmesi numunelerin, standart maddelerin ve çözücülerin belli bir süre kararlılığını koruması ile mümkündür (Zengin, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, antemortem kan örneklerinde amfetamin ve metamfetaminin kromatografik analizine yönelik deneysel bir araştırma olarak planlanmıştır. Çalışma, Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Adli Toksikoloji ve Enstrümantal Analiz Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışma, Adli Tıp Kurumu Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından 20.09.2023 tarihli ve 2023/885 sayılı karar ile onaylanmıştır (Ek 1). Ayrıca, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından etik açıdan uygun bulunmuş ve 08.11.2023 tarihli, 24237859-652 sayılı izin ile onaylanmıştır (Ek 2).

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Çalışmada kullanılan tüm cihaz ve gereçler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihaz/gereçler ile marka/modelleri

Cihaz/Gereç	Marka/Model
LC-MS/MS	Shimadzu LC-MS 8050
Yazılım	LAB SOLUTIONS
Analitik Kolon	Restek Raptor Biphenyl 2.7µm 2.1x100mm
Otomatik Pipetler (200-1000 µL)	Eppendorf
Pipet uçları	Eppendorf Duafilter T.I.P.S.
Santrifüj	Nüve NF 1200R
Vorteks	BIOSAN MSV-3500 ve VWR DVX-2500
SPE Manifoldu	Biotage PRESSURE ⁺ 48
SPE Kartuşları	Oasis HLB 3cc (60mg) ve UCT XTRACT Gravity Flow DAU 3 mL 500 mg
Vial	LabMarker 1.5 mL Screw Neck ND-9
Vial Kapakları	LabMarker 9mm PP Screw Cap
Mikrosantrifüj Tüpü	Medpoint 2.0 mL
Ultrasonik Banyo	Kudos SK3300 GT
Buzdolabı (-20°C)	LIEBHERR MediLine
Buzdolabı (+4°C)	KW Apparecchi Scientifici

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasal maddeler, türleri ve ilgili özellikleriyle birlikte Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler ile markaları

Madde Adı	Marka
Metanol ≥ 99.8 %	VWR Chemicals BDH
Ultra saf su	Fisher Scientific
Formik Asit	Supelco
Amonyum Asetat	Merck
Metamfetamin standardı	Chiron
Amfetamin standardı	Chiron
IS (MDMA-d5) standardı	Chiron

3.3. LC-MS/MS Sistem Koşulları

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazına ait sistem koşulları, analiz parametreleriyle birlikte Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. LC-MS/MS sistem koşulları

İyon kaynağı	ESI, pozitif mod
Dedektör voltajı	1,70 kV
DL sıcaklığı	250 °C
Arayüz sıcaklığı	300 °C
Numune sıcaklığı	15 °C
Akış hızı	0,5 mL/dk
Analiz süresi	18 dk
Enjeksiyon hacmi	5 μ L
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Maksimum sıcaklık	85 °C
Mobil faz A	2,5 L Ultra saf su içerisinde %0,1 formik asit + 5 mM amonyum asetat
Mobil faz B	2,5 L metanol içerisinde %0,1 formik asit

3.4. LC-MS/MS Sistemine Ait Akış Tablosu

LC-MS/MS cihazında kullanılan mobil fazların zamana bağlı akış koşulları Tablo 4'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4. LC-MS/MS sisteminin mobil fazlarının zamana bağlı akış koşulları

Total zaman (dk)	Pompa Akış Hızı (mL/dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0.0	0,5	90	10
1.5	0,5	50	50
2.5	0,5	40	60
5.0	0,5	30	70
7.0	0,5	20	80
9.0	0,5	15	85
11.0	0,5	10	90
13.0	0,5	5	95
14.0	0,5	5	95
14.2	0,5	90	10



Şekil 15. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazı

3.5. Amfetamin, Metamfetamin ve MDMA-d₅ (IS) Kütle-Yük Oranları ve Alıkonma Zamanları

Metot validasyonu kapsamında analiz edilen amfetamin, metamfetamin ve IS ait kütle-yük (m/z) oranları ile alıkonma (retention) zamanları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Maddelerin m/z ve RT değerleri

Madde	m/z	RT
Amfetamin	136,10>91,10	1,60
Metamfetamin	150,15> 91,10	1,80
IS (MDMA-d ₅)	199,20>165,10	1,97

3.6. Çalışmada Kullanılan Mobil Faz, Standart Ara Stok ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürleri

3.6.1. Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

Mobil Faz A: 2,5 L saf su içerisine 387,5 mg amonyum asetat ve 2,5 mL %98 formik asit ilave edilerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti, 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda degaze edilmek suretiyle hava kabarcıklarından arındırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Mobil Faz B: 2,5 L metanol içerisine 2,5 mL %98 formik asit ilave edilerek hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti, 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda degaze edilerek hava kabarcıklarından arındırılmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Enjeksiyon portu yıkama çözeltisi: Saf su ve metanol, hacimce 1:1 oranında karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan karışım, 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda degaze edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.2. Standart Maddelerin Hazırlanması

Amfetamin, Metamfetamin ve MDMA-d₅ ana stok çözeltileri aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

- **Amfetamin Ana Stok Çözeltisi (1µg/mL):** 1,0 mg/mL amfetamin referans standart maddesinden 10 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
- **Metamfetamin Ana Stok Çözeltisi (1µg/mL):** 1,0 mg/mL metamfetamin referans standart maddesinden 10 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.
- **MDMA-d₅ Ana Stok Çözeltisi (500 ng/mL):** 0,1 mg/mL MDMA-d₅ referans standart maddesinden 50 µL alınıp metanol ile 10 mL tamamlanmıştır.

3.6.3. Amfetamin ve Metamfetamin Ara Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Amfetamin ve metamfetamin için hazırlanan 1 µg/mL konsantrasyonundaki ana stok çözeltilerden 25 ng/mL, 100 ng/mL ve 500 ng/mL konsantrasyonlarında ara stok çözeltiler elde edilmiştir.

- **500 ng/mL Konsantrasyonunda Amfetamin ve Metamfetamin İçeren Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

1 µg/mL konsantrasyona sahip amfetamin ve metamfetamin ana stok çözeltilerinden 500'er µL alınarak hazırlanmıştır.

- **100 ng/mL Konsantrasyonunda Amfetamin ve Metamfetamin İçeren Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

500 ng/mL konsantrasyonundaki amfetamin ve metamfetamin ara stok çözeltisinden 200'er µL alınarak metanol ile hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır.

- **25 ng/mL Konsantrasyonundaki Amfetamin ve Metamfetamin İçeren Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması**

100 ng/mL konsantrasyonundaki amfetamin ve metamfetamin ara stok çözeltisinden 250'şer µL alınarak metanol ile hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan çözelti, analiz öncesi ve süresince kimyasal bütünlüğünün korunması amacıyla homojen hale getirilmiş ve kararlılığının sağlanması için uygun ortam koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.6.4. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk kalibrasyon noktası boş kan (kör numune) olacak şekilde kalibrasyon noktaları belirlendi. Her bir kalibrasyon noktası, son hacmi 1 mL olacak şekilde hazırlanmış olup, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ve 200 ng/mL konsantrasyonlarını içermektedir. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin detayları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon Noktası	Amfetamin + Metamfetamin	IS Ana Stok (500 ng/mL)	Kullanılan Ara Stok ve Ana Stok Çözeltisi
Blank	-	100 µL	-
1 ng/mL	40 µL	100 µL	25 ng/mL
5 ng/mL	50 µL	100 µL	100 ng/mL
10 ng/mL	100 µL	100 µL	100 ng/mL
25 ng/mL	50 µL	100 µL	500 ng/mL
50 ng/mL	100 µL	100 µL	500 ng/mL
100 ng/mL	100 µL	100 µL	1000 ng/mL
200 ng/mL	200 µL	100 µL	1000 ng/mL

3.7. Örnek Hazırlama Yöntemi

Sağlıklı gönüllülerden temin edilen kan örneklerine Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi Enstrümantal Analiz Laboratuvarında geliştirilmiş olan SPE yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, amfetamin ve metamfetaminin karmaşık kan matrislerden etkin bir şekilde izole edilmesini, örneklerin temizliği, tekrar üretilebilirliği ve analitik doğruluğu açısından yüksek düzeyde güvenilirliği için kullanılmıştır. SPE yönteminde iki farklı SPE kartuşu denenmiştir.

OASIS HLB Kartuşları (3 mL): Hidrofilik-lipofilik dengeli adsorban yapısıyla geniş polarite aralığında analit tutma kapasitesine sahiptir.

UCT XTRACT Gravity Flow DAU Kartuşları (3 mL): Asit nötrler, steroidler ve bazların seçici elüsyonu uygulamaları için tasarlanmıştır.

- **Örnek Ön Hazırlığı**

Tablo 6'da gösterildiği gibi zenginleştirilmiş olan 1 mL hacimli kan örneklerine, 2 mL ultra saf su ilave edilmiş; ardından örnekler 5 dakika süreyle 2000 rpm'de vortekslenmiştir. Vorteks işleminden sonra, örnekler 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenerek ayırma işlemi tamamlanmıştır.

- **Kartuş Şartlandırması**

Pozitif basınçlı manifold cihazı kullanılarak, SPE kartuşları şartlandırılmıştır. Bu kapsamda, her bir kartuşa sırasıyla 1 mL Metanol ($\geq 99.8\%$) ve ardından 1 mL ultra saf su geçirilmiştir.

- **Numune Yükleme**

Vorteks ve santrifüj işlemlerinden geçmiş olan kan örnekleri, şartlandırılmış kartuşlara 4 saniyede 1 damla akacak şekilde uygulanmıştır.

- **Yıkama ve Kurutma İşlemi**

Kartuşlara yıkama aşamasında 1 mL %5'lik metanol 4 saniyede 1 damla hızında uygulanmıştır. Sonrasında tüm kartuşlar 15 dakika boyunca kurutulmuştur. Atık eluatlar bertaraf edildikten sonra mikrosantrifüj tüpleri kartuşların altına yerleştirilerek elüsyon aşamasına geçilmiştir.

- **Elüsyon Prosedürü**

Elüsyon işlemi üç aşamada gerçekleştirilmiştir:

İlk aşama: Kartuşlara 0.5 mL Metanol ($\geq 99.8\%$) 4 saniyede 1 damla hızında uygulanmış ve sonrasında 5 dakika kurutulmuştur.

İkinci aşama: Aynı kartuşlara 0.5 mL %2'lik amonyaklı metanol 4 saniyede 1 damla hızında uygulanmış ve sonrasında 5 dakika kurutulmuştur.

Üçüncü aşama: Aynı kartuşlara 0.5 mL %2'lik asetik asitli metanol 4 saniyede 1 damla hızında uygulanmış ve sonrasında 5 dakika kurutma yapılmıştır.

Toplamda 1.5 mL hacminde elde edilen eluat mikrosantrifüj tüplerinde toplanmış, 5 dakika süreyle 2000 rpm'de vorteks işlemi uygulanmış ve -9°C 'de santrifüj cihazında 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı dikkatlice ayrılarak uygun viallere aktarılmış ve LC-MS/MS sisteminde analize alınmıştır.

Amfetamin ve metamfetamin içeren örneklere iki farklı SPE kartuşları kullanılarak yukarıdaki numune hazırlama tekniği uygulanmıştır. Örnekler LC-MS/MS'de analiz edilmiş ve SPE kartuşlarının geri kazanım değerlendirmesinde OASIS HLB kartuşu ile yapılan çalışmada geri kazanım değerlerinin istenilen limitler dahilinde olduğu görülmüştür. Validasyon çalışmaları OASIS HLB kartuşu ile yapılmıştır.

3.8. Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışması SWGTOX (Adli Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu) validasyon rehberine uygun olarak yapılmıştır (SWGTOX, 2013).

- Seçicilik
- Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi
- Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)
- Geri kazanım
- Kesinlik (gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik)
- Kararlılık

3.8.1. Seçicilik

Matriks ve çözücü kaynaklı olası interferansları belirlemek amacıyla, analitik yöntemin seçicilik parametresi kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

• **Matriks Etkisi:** Amfetamin, metamfetamin ve iç standart (IS) yönünden zenginleştirilmemiş olan 1 mL'lik boş kan örneğine SPE uygulanarak elde edilen örnek LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Elde edilen kör kan kromatogramı değerlendirilmiş, hedef analitlerin alıkonma sürelerine yakın bölgelerde herhangi bir sinyal gözlemlenip gözlemlenmediği araştırılmıştır.

• **Çözücü Etkisi:** Analiz ortamında kullanılan metanol çözücüsünün olası interferans etkilerini belirlemek amacıyla, saf metanol LC-MS/MS sisteminde doğrudan analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogram incelenmiş ve hedef analitlere özgü MRM geçişleri ile ilgili olası girişimler kontrol edilmiştir.

• **Analitlerin Alıkonma Sürelerinin Değerlendirilmesi:** Her bir boş kan örneğine, amfetamin, metamfetamin ve IS katılarak SPE işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen

ekstrakt LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, hedef bileşiklerin alıkonma sürelerinde herhangi bir interferansın mevcut olup olmadığı incelenmiş ve her bir analite ait MRM kromatogramları kaydedilerek karşılaştırmalı değerlendirmeler yapılmıştır.

3.8.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Yöntemin doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla, amfetamin ve metamfetamin için farklı konsantrasyon düzeylerinde kalibrasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, boş kan örneklerine amfetamin ve metamfetamin standart çözeltileri sırasıyla 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 ng/mL konsantrasyonlarında katılmıştır. Ayrıca, iç standart (IS) çözeltisi tüm örneklerle sabit olarak 50 ng/mL konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Her bir kalibrasyon düzeyi için birbirinden bağımsız üçer örnek hazırlanmış olup, toplamda 21 adet hazırlanan örnek SPE işlemine tabi tutulmuştur. SPE sonrasında elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS sistemiyle analiz edilmiş ve her bir kalibrasyon noktası ardışık şekilde çalışılarak ilgili kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin doğruluğu, eğrilerin korelasyon katsayısı (R^2) değerinin $>0,99$ olduğu tespit edilmiştir.

3.8.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Amfetamin ve metamfetamin içermeyen 900 µL hacmindeki boş kan örneklerine, 100 µL 500 ng/mL konsantrasyonundaki iç standart (IS) çözeltisi içeren örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerle SPE işlemi uygulanmış ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analitik yöntemin hassasiyetini belirlemek amacıyla, söz konusu örnekler 10 kez tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Kör numunelerden elde edilen sonuçların ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Tespit sınırı (LOD), ortalama değere standart sapmanın 3 katı eklenerek; tayin sınırı (LOQ) ise standart sapmanın 10 katı eklenerek hesaplanmıştır. Elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin doğrulanabilirliğini test etmek amacıyla, ilgili konsantrasyon düzeylerinde hazırlanmış örnekler üçer kez daha analiz edilerek ölçüm tekrarlanabilirliği ve sinyal güvenilirliği kontrol edilmiştir. Bu doğrulama çalışması, yöntemin düşük konsantrasyonlardaki analitleri tespit etme ve tayin etme kapasitesini desteklemektedir.

LOD: Ortalama kör kan konsantrasyonu+ 3 x SS

LOQ: Ortalama kör kan konsantrasyonu+ 10 x SS

3.8.4. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmaları yapmak için kalibrasyon noktalarında düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyon düzeyi kullanılmıştır (5, 25 ve 100 ng/mL).

Her konsantrasyon seviyesi için 6 tekrarlı örnek hazırlanmış ve tüm örnekler 50 ng/mL iç standart (IS) eklenmiştir. Hazırlanan örnekler SPE işlemine tabi tutulmuş, ardından LC-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Konsantrasyon düzeyi için elde edilen analiz verileri doğrultusunda aşağıdaki parametreler hesaplanmıştır:

Geri Kazanım Oranı (%GK)

Standart Sapma (S.S.)

Bağıl Standart Sapma (%RSD)

Değerlendirme kriterleri SWGTOX (2013) rehberine göre aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

Standart Sapma (S.S.): < 15

Bağıl Standart Sapma (%RSD): < %15

Geri Kazanım Oranı (%GK): %80 – %120

3.8.5. Kesinlik

Çalışmanın kesinliği iki aşamalı bir yaklaşımla değerlendirilmiş olup, analizler gün içi tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrarlanabilirlik olmak üzere iki ayrı düzeyde gerçekleştirilmiştir.

3.8.5.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik

İlk aşamada gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasında elde edilen veriler, gün içi tekrarlanabilirlik analizlerinde de kullanılarak metodolojik tutarlılık sağlanmıştır.

3.8.5.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik

İlk aşamada gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasında izlenen işlem basamakları, her gün örneklerin yeniden hazırlanması koşuluyla beş ardışık gün boyunca tekrarlanarak günler arası tekrarlanabilirlik değerlendirilmiştir.

3.8.6. Kararlılık

Kararlılık değerlendirmesi iki aşamalı olarak yrtlmştır. İlk aşamada, donma-erime kararlılığı ile uzun dönem kararlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, boş kan örneklerine amfetamin ve metamfetamin, her biri 10 ng/mL konsantrasyonunda olacak şekilde eklenmiştir. Zenginleştirilen rneklerle, dondurma işlemi uygulanmaksızın, 50 ng/mL konsantrasyonunda IS ilave edilmiş ve ardından SPE işlemi uygulanmıştır. Üç tekrar halinde gerçekleştirilen bu işlem sonucunda elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır.

Devamında, 10 ng/mL konsantrasyonunda amfetamin ve metamfetamin içeren, ancak iç standart içermeyen kan rnekleri -20 °C'de dondurulmuştur. İlk işlemden altı ay sonra, bu örnekler herhangi bir müdahale olmaksızın oda sıcaklığında çözdürülmüş ve aynı işlem basamakları üç tekrar halinde yeniden uygulanmıştır.

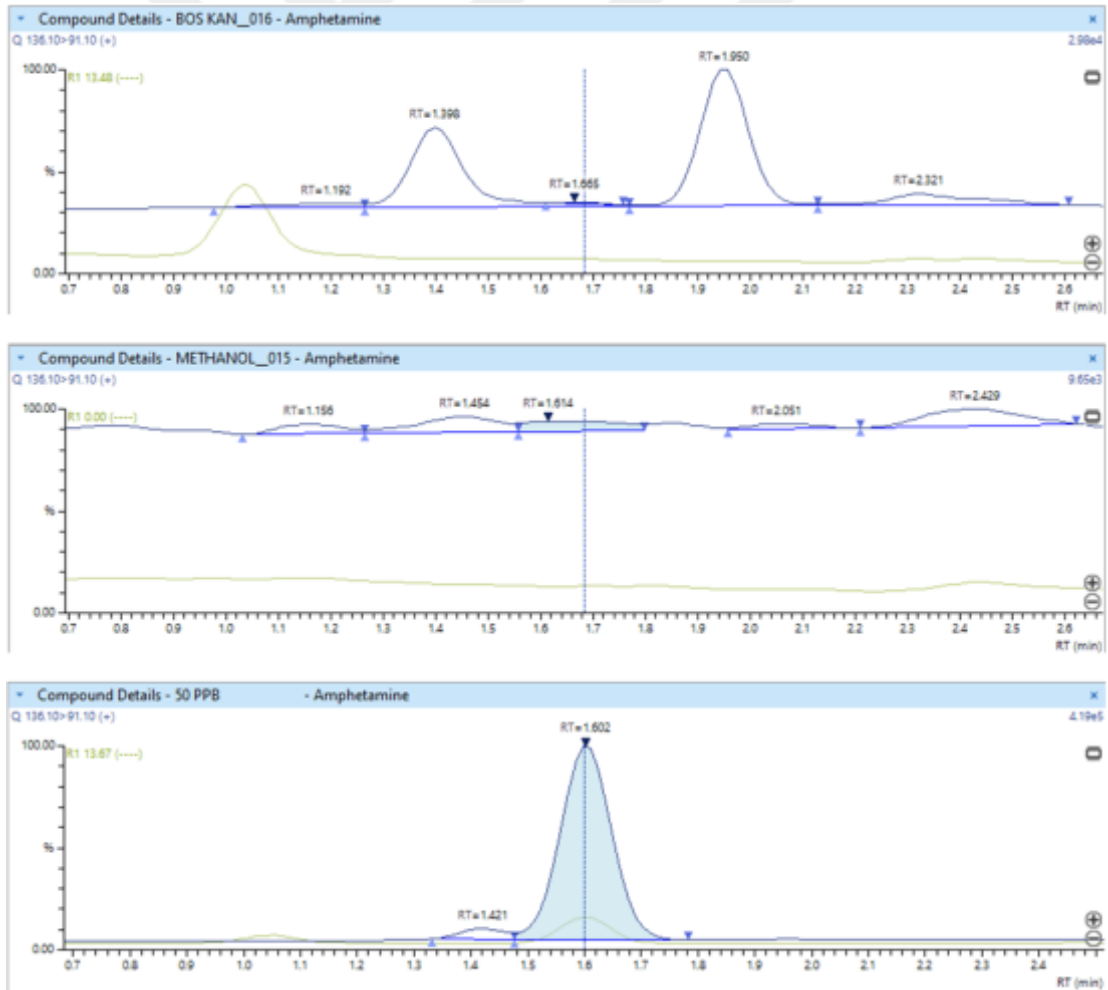
İkinci aşamada ise, geri kazanım çalışmasında hazırlanarak kullanılan 25 ng/mL konsantrasyonundaki altı adet kan rneği, kararlılıklarının korunup korunmadığını değerlendirmek amacıyla otomatik örnekleyici içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir. Aynı numuneler, yedi gün sonra yeniden LC-MS/MS sistemi ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar, örneklerin kararlılığını ve yöntemin güvenilirliğini doğrulamak amacıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Metot Validasyonu

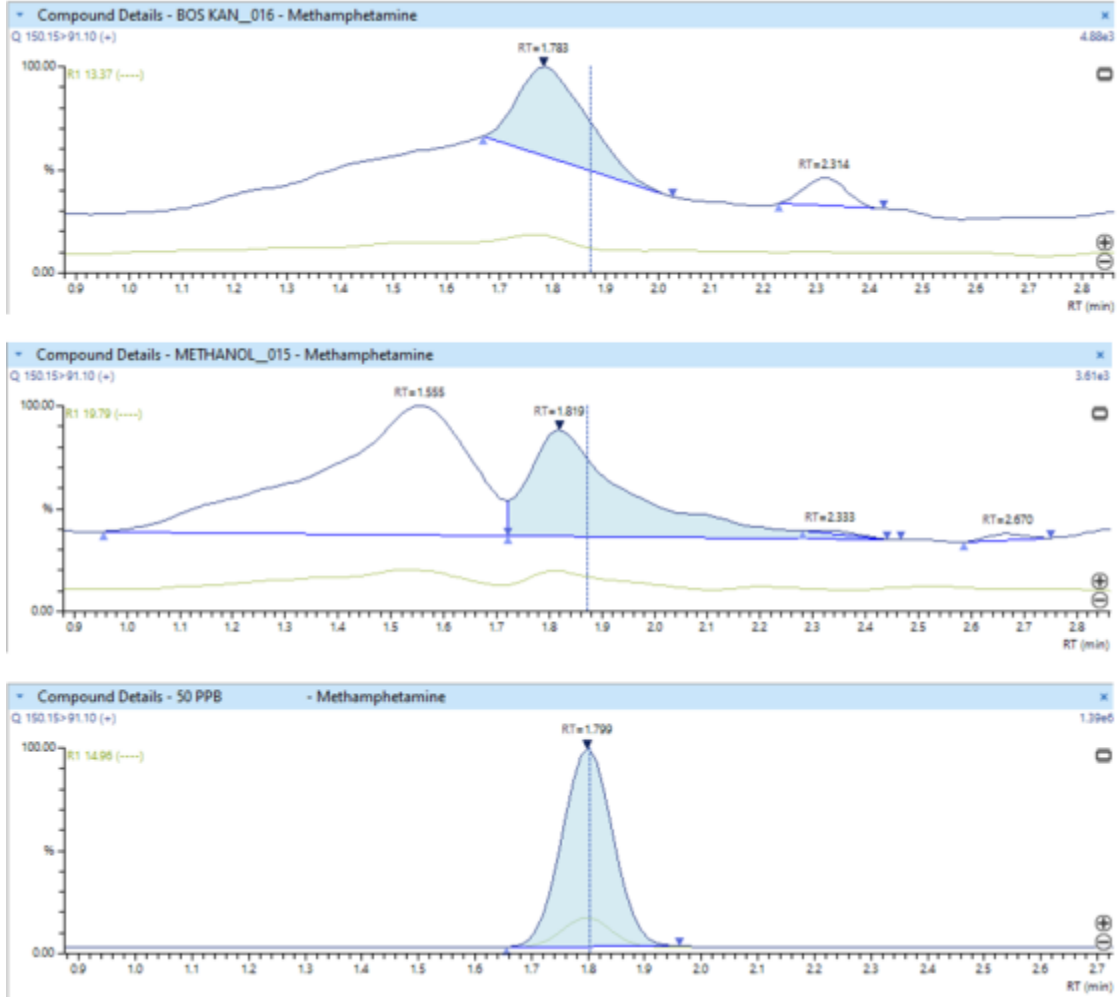
4.1.1. Seçicilik

Bölüm 3.8.1'de belirtildiği üzere, çalışmada kullanılan kör kan örneklerine ve çözücü olarak kullanılan metanole ait kromatogramlarda IS, amfetamin ve metamfetamin için belirlenen alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim sinyali gözlemlenmemiştir. Amfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile amfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram Şekil 16'da verilmiştir.



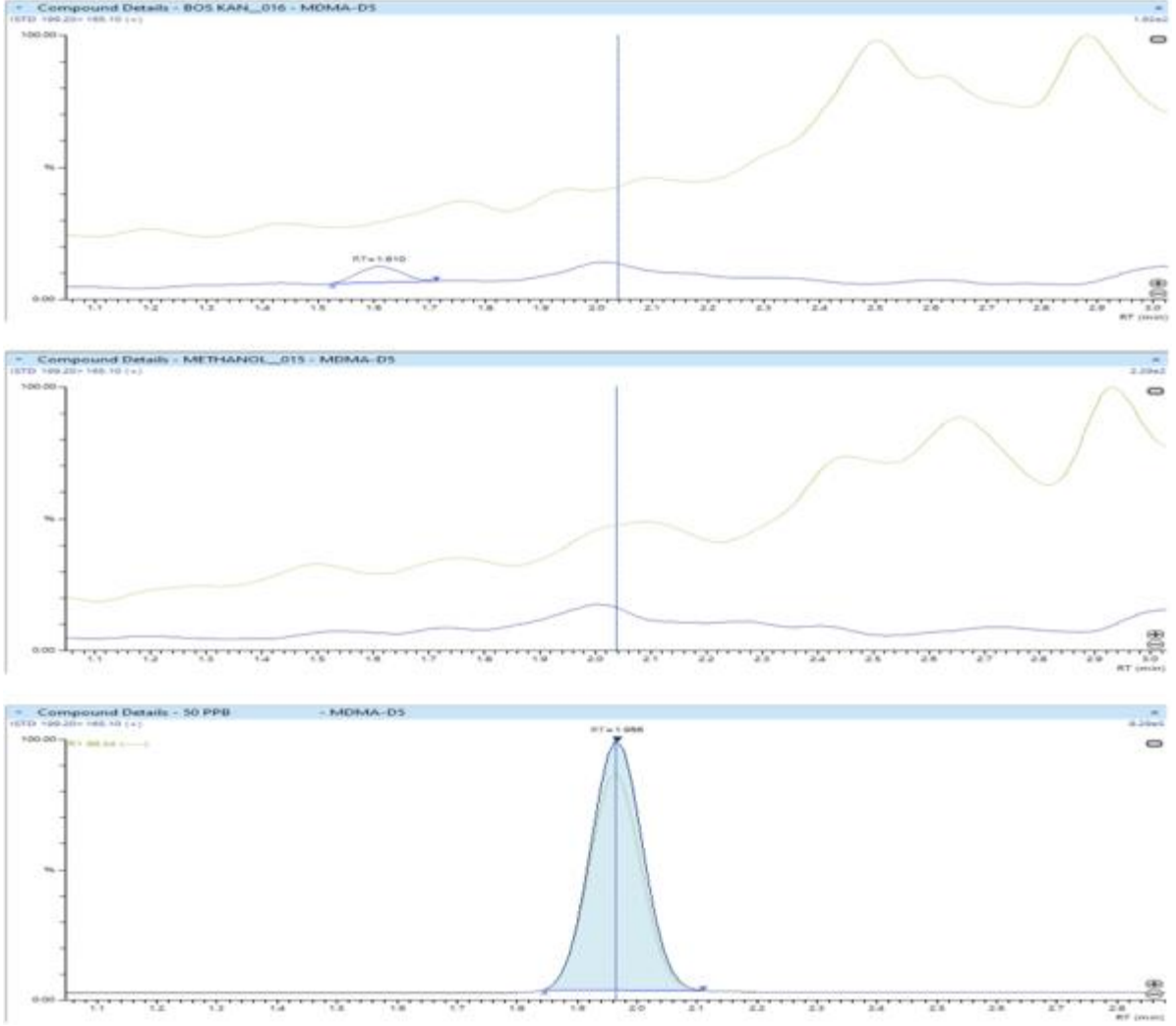
Şekil 16. Amfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile amfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram

Metamfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile metamfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram Şekil 17'de verilmiştir.



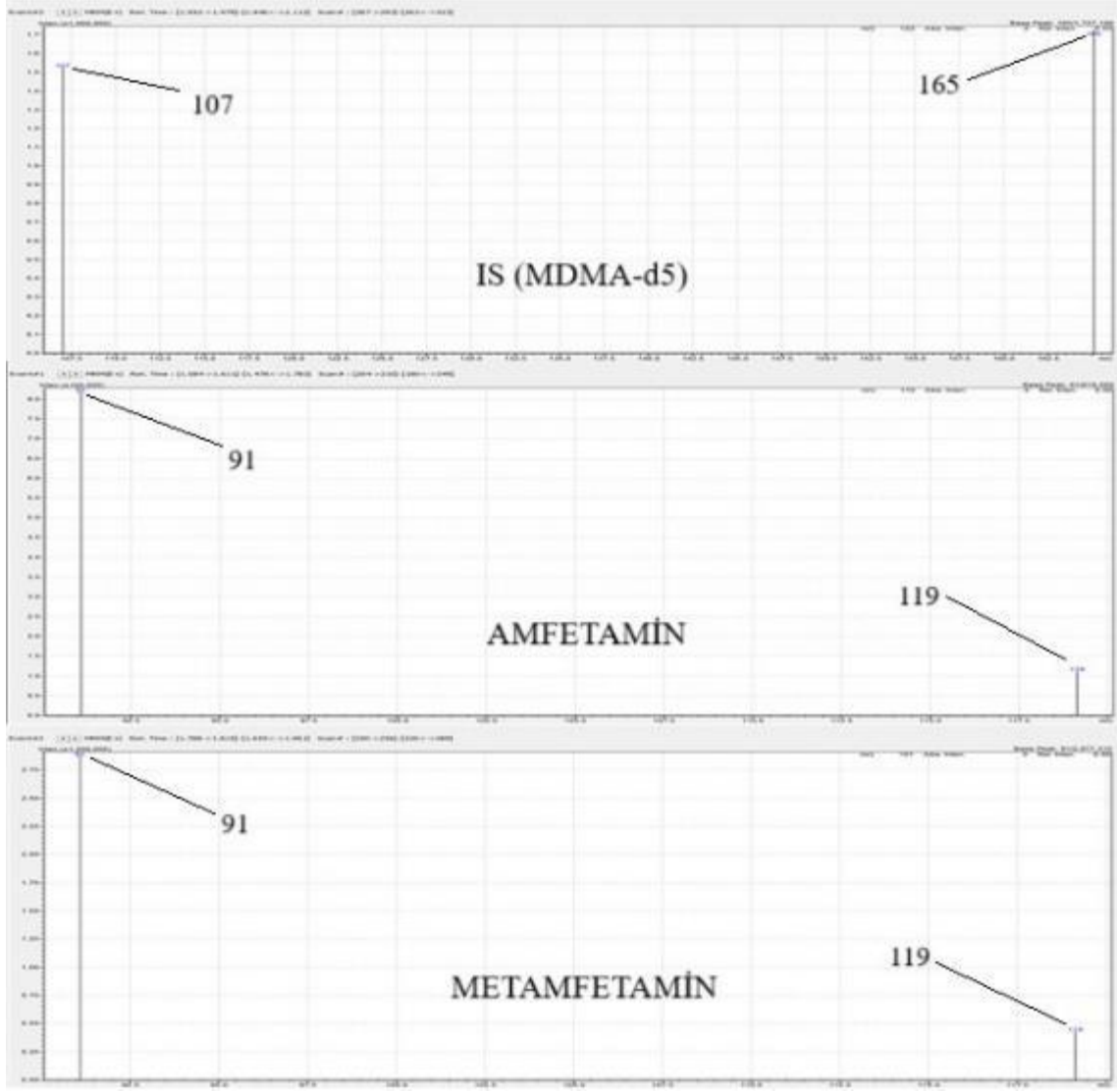
Şekil 17. Metamfetamin içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile metamfetamin ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram

IS-MDMA-d₅ içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile IS-MDMA-d₅ ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. IS-MDMA-d₅ içermeyen kör kan ve metanole ait kromatogramlar ile IS-MDMA-d₅ ile zenginleştirilmiş kan örneğine ait kromatogram

Her bir analite ait alıkönma zamanlarında elde edilen MRM kromatogramları Şekil 19'da verilmiştir.

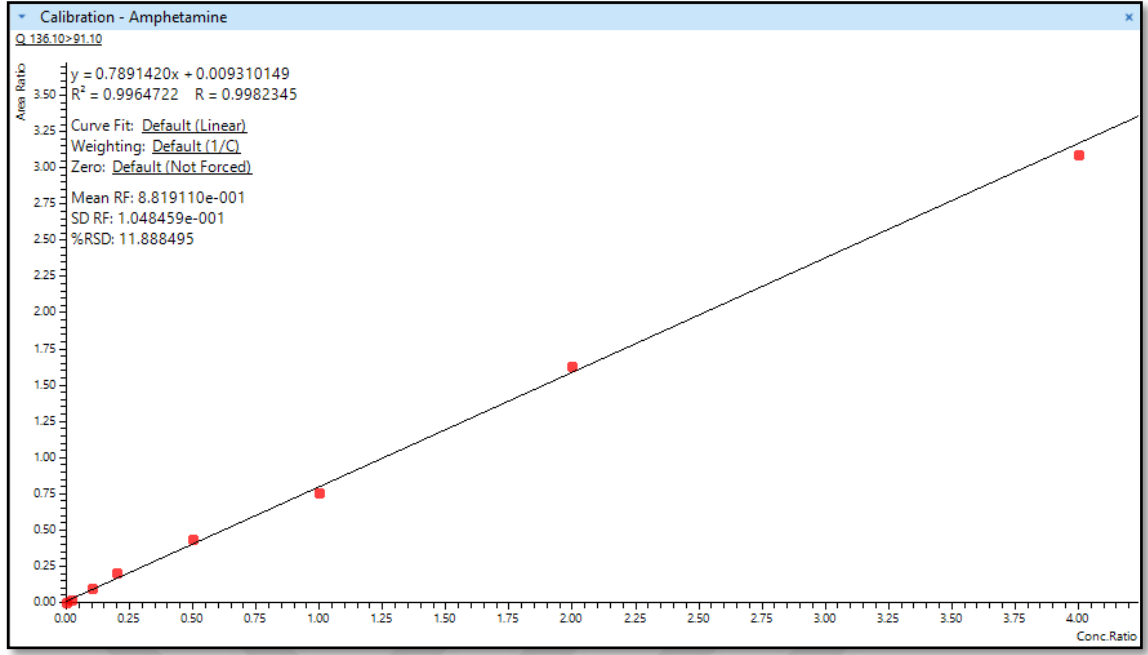


Şekil 19. IS, Amfetamin ve Metamfetamine ait MRM kromatogramları

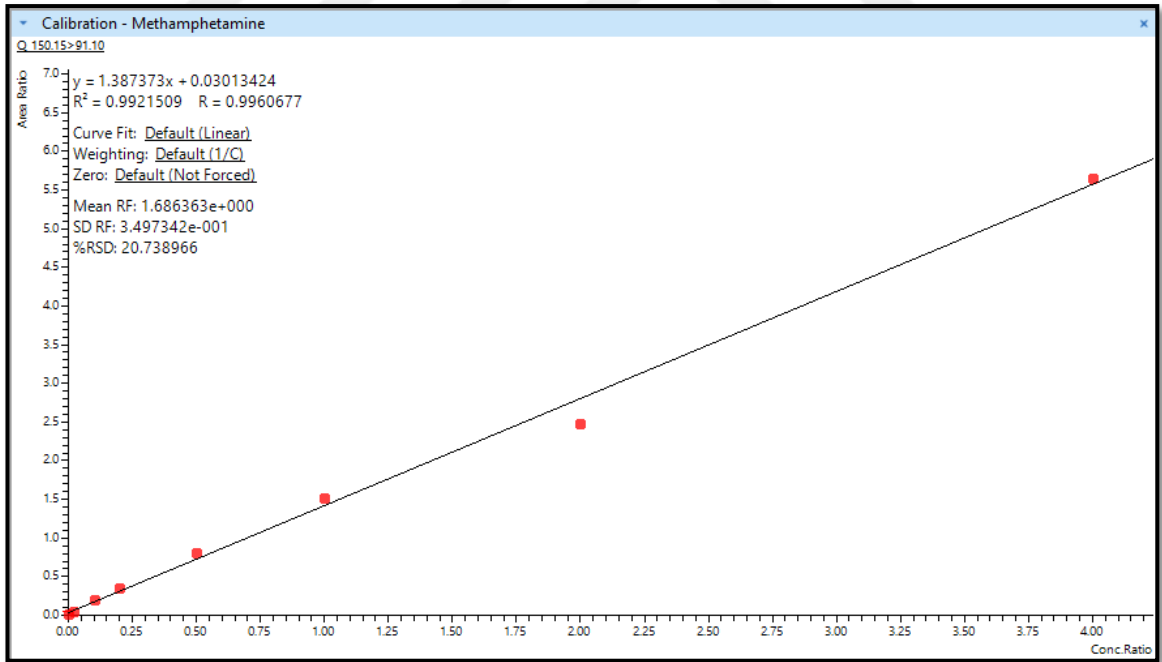
Elde edilen tüm veriler doğrultusunda, matriks ve çözücü kaynaklı herhangi bir girişimin bulunmadığı ve hedef analitlerin alıkonma zamanlarında oluşan piklerin net bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir.

4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri

Amfetamin ve metamfetamin için kalibrasyon aralıkları 1–200 ng/mL (1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 ng/mL) olarak belirlenmiştir. Bu analitlere ait kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 20. Amfetamine ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 21. Metamfetamine ait kalibrasyon eğrisi

Amfetamin ve metamfetamin için elde edilen kalibrasyon eğrisi denklemleri, doğrusal çalışma aralıkları ve korelasyon katsayıları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Amfetamin ve metamfetamine ait kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve korelasyon katsayısı

MADDE	Doğrusal Aralık	Kalibrasyon Eğrisi Denklemi	Korelasyon Katsayısı (R ²)
Amfetamin	1-200 ng/mL	$y=0,789x+0,009$	0,996
Metamfetamin	1-200 g/mL	$y=1,387x+0,030$	0,992

Çalışmamızda korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, çalışma aralığının doğrusal olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, yöntem performansının analiz edilen konsantrasyon aralığında doğrusal karakter sergilediğini ve kantitatif analizler için güvenilir sonuçlar sağladığını ortaya koymaktadır.

4.1.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ çalışmalarına yönelik olarak hazırlanan 10 adet boş kan örneği üzerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda, amfetamin ve metamfetamin için elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 8 ve Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 8. Amfetamin içermeyen kan örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu

Boş Kan + IS (n=10)	Bulunan Miktar (ng/mL)
1.Tekrar	0,407
2.Tekrar	0,306
3.Tekrar	0,273
4.Tekrar	0,281
5.Tekrar	0,202
6.Tekrar	0,177
7.Tekrar	0,232
8.Tekrar	0,183
9.Tekrar	0,239
10.Tekrar	0,207
Ortalama	0,251
Standart Sapma	0,070
LOD	0,461
LOQ	0,951

Tablo 9. Metamfetamin içermeyen kan örnekleri ile yapılan LOD ve LOQ sonuç tablosu

Boş Kan+IS (n=10)	Bulunan Miktar (ng/mL)
1.Tekrar	0,176
2.Tekrar	0,142
3.Tekrar	0,153
4.Tekrar	0,174
5.Tekrar	0,125
6.Tekrar	0,136
7.Tekrar	0,226
8.Tekrar	0,129
9.Tekrar	0,265
10.Tekrar	0,109
Ortalama	0,164
Standart Sapma	0,049
LOD	0,311
LOQ	0,654

Bölüm 3.8.3'te belirtilen hesaplama yöntemleri doğrultusunda, amfetamin için LOD değeri 0,46 ng/mL, LOQ değeri ise 0,95 ng/mL olarak; metamfetamin için ise LOD 0,31 ng/mL ve LOQ 0,65 ng/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerlerin doğruluğunu teyit etmek amacıyla ilgili konsantrasyonlarda örnekler hazırlanmış ve her biri üç kez analiz edilerek elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır.

4.1.4. Geri Kazanım

Amfetamin için düşük (5 ng/mL), orta (25 ng/mL) ve yüksek (100 ng/mL) konsantrasyon düzeylerinde gerçekleştirilen altı tekrarlı geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo 10, Tablo 11 ve Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 10. 5 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

5 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1. Tekrar	5	5,50	110,0
2. Tekrar	5	4,90	98,0
3. Tekrar	5	5,56	111,20
4. Tekrar	5	5,11	102,20
5. Tekrar	5	5,70	114,0
6. Tekrar	5	5,08	101,60
Ortalama % GK			106,20
Standart sapma			6,40
%RSD			6,03

Tablo 11. 25 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

25 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1. tekrar	25	26,09	104,40
2. tekrar	25	27,74	110,96
3. tekrar	25	28,69	114,76
4. tekrar	25	28,07	112,28
5. tekrar	25	29,08	116,32
6. tekrar	25	28,13	112,52
Ortalama % GK			111,87
Standart sapma			4,13
%RSD			3,69

Tablo 12. 100 ng/mL amfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

100 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1. Tekrar	100	91,66	91,66
2. Tekrar	100	89,19	89,19
3. Tekrar	100	97,16	97,16
4. Tekrar	100	96,70	96,70
5. Tekrar	100	93,78	93,78
6. Tekrar	100	91,18	91,18
Ortalama % GK			93,28
Standart sapma			3,19
%RSD			3,42

Metamfetamin için düşük (5 ng/mL), orta (25 ng/mL) ve yüksek (100 ng/mL) konsantrasyon düzeylerinde gerçekleştirilen altı tekrarlı geri kazanım çalışmaları

sonucunda elde edilen yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo 13, Tablo 14 ve Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 13. 5 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

5 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1. Tekrar	5	5,77	115,40
2. Tekrar	5	5,97	119,40
3. Tekrar	5	5,97	119,40
4. Tekrar	5	5,33	106,60
5. Tekrar	5	5,98	119,60
6. Tekrar	5	5,53	110,60
Ortalama % GK			115,17
Standart sapma			5,47
%RSD			4,75

Tablo 14. 25 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

25 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1.Tekrar	25	28,37	113,48
2.Tekrar	25	28,89	115,56
3.Tekrar	25	28,51	114,04
4.Tekrar	25	29,17	116,68
5.Tekrar	25	28,01	112,04
6.Tekrar	25	27,46	109,84
Ortalama % GK			113,61
Standart sapma			2,45
%RSD			2,16

Tablo 15. 100 ng/mL metamfetamin içeren kan örneğinin geri kazanım sonuçları

100 ng/mL'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen miktar (ng/mL)	% Geri kazanım
1.Tekrar	100	104,86	104,86
2.Tekrar	100	104,54	104,54
3.Tekrar	100	105,48	105,48
4.Tekrar	100	105,39	105,39
5.Tekrar	100	105,24	105,24
6.Tekrar	100	105,38	105,38
Ortalama % GK			105,15
Standart sapma			0,37
%RSD			0,35

Elde edilen verilere bakıldığında standart sapma değerlerinin (<15), %RSD değerlerinin ($< \%15$) ve geri kazanım değerlerinin (%80-120 aralığında) uygun olduğu ve uygulanan metodun geri kazanım değerlerinin istenilen limitler dahilinde olduğu görülmüştür.

4.1.5. Kesinlik

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve değerlendirme % RSD <20 olarak belirlenmiştir.

4.1.5.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik

Amfetamin ve metamfetaminin düşük (5 ng/mL), orta (25 ng/mL) ve yüksek (100 ng/mL) konsantrasyon düzeylerinde gerçekleştirilen gün içi tekrarlanabilirlik verileri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Amfetamin ve metamfetamine ait gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları (n=6)

	Amfetamin			Metamfetamin		
	5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL	5 ng/mL	25 ng/mL	100 ng/mL
1.Tekrar	5,50	26,09	91,66	5,77	28,37	104,86
2.Tekrar	4,90	27,74	89,19	5,97	28,89	104,54
3.Tekrar	5,56	28,69	97,16	5,97	28,51	105,48
4.Tekrar	5,11	28,07	96,70	5,33	29,17	105,39
5.Tekrar	5,70	29,08	93,78	5,98	28,01	105,24
6.Tekrar	5,08	28,13	91,18	5,53	27,46	105,38
Ortalama	5,31	27,97	93,28	5,76	28,40	105,15
S.S.	0,32	1,04	3,19	0,27	0,61	0,37
%RSD	6,03	3,72	3,42	4,69	2,15	0,35

4.1.5.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Amfetamin ve metamfetaminin düşük (5 ng/mL), orta (25 ng/mL) ve yüksek (100 ng/mL) konsantrasyon düzeylerinde elde edilen günler arası tekrarlanabilirlik verileri amfetamin için Tablo 17'de, metamfetamin için ise Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 17. Amfetamine ait günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

GÜN	KONS.	1.TK	2.TK	3.TK	4.TK	5.TK	6.TK	ORT.	S.S.	%RSD
1	5 ng/mL	5,28	5,22	4,45	5,37	4,62	5,64	5,10	0,46	9,02
	25 ng/mL	24,30	21,65	25,25	22,53	24,46	23,64	23,64	1,33	5,63
	100 ng/mL	82,07	93,48	92,52	89,39	91,95	92,37	90,30	4,26	4,72
2	5 ng/mL	4,59	5,02	5,18	4,39	4,90	4,53	4,77	0,31	6,50
	25 ng/mL	27,20	26,73	25,75	26,01	23,09	27,47	26,04	1,59	6,11
	100 ng/mL	90,74	91,93	84,65	83,87	94,62	92,70	89,75	4,44	4,95
3	5 ng/mL	5,11	5,15	4,67	5,40	4,54	4,52	4,90	0,37	7,55
	25 ng/mL	25,33	23,81	22,57	24,57	24,17	23,99	24,07	0,91	3,78
	100 ng/mL	94,95	92,50	89,37	93,21	83,49	87,54	90,18	4,24	4,71
4	5 ng/mL	4,54	4,72	4,85	4,99	4,95	4,21	4,71	0,29	6,16
	25 ng/mL	27,95	23,58	25,14	22,84	28,10	23,87	25,25	2,28	9,03
	100 ng/mL	86,85	86,11	90,89	88,47	96,53	94,38	90,54	4,20	4,64
5	5 ng/mL	4,46	4,91	5,35	4,70	4,41	4,22	4,67	0,41	8,78
	25 ng/mL	25,04	28,08	26,73	29,16	29,49	28,54	27,84	1,68	6,03
	100 ng/mL	88,41	95,65	93,74	98,02	87,52	90,04	92,23	4,22	4,58

KONS.: Konsantrasyon

Tablo 18. Metamfetamine ait günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

GÜN	KONST.	1.TK	2.TK	3.TK	4.TK	5.TK	6.TK	ORT.	S.S.	%RSD
1	5 ng/mL	4,72	4,85	4,54	4,99	4,79	4,78	4,78	0,15	3,14
	25 ng/mL	26,04	25,38	26,02	26,51	26,81	25,73	26,08	0,52	1,99
	100 ng/mL	98,38	105,56	98,76	102,38	107,53	94,67	101,21	4,84	4,78
2	5 ng/mL	4,86	4,97	4,21	4,81	4,64	4,72	4,70	0,27	5,74
	25 ng/mL	24,61	25,84	23,54	25,66	24,82	24,80	24,87	0,83	3,34
	100 ng/mL	87,86	88,48	88,99	95,21	92,61	86,26	89,90	3,34	3,72
3	5 ng/mL	4,88	4,85	4,47	4,95	4,78	4,81	4,79	0,17	3,55
	25 ng/mL	27,49	26,32	25,29	29,50	26,57	26,50	26,95	1,43	5,31
	100 ng/mL	98,02	92,53	90,00	102,90	95,22	101,38	96,68	5,03	5,20
4	5 ng/mL	4,96	4,55	4,64	4,78	4,66	4,57	4,69	0,15	3,20
	25 ng/mL	29,68	27,39	28,86	27,93	29,81	29,99	28,94	1,08	3,73
	100 ng/mL	98,89	95,88	103,67	105,67	94,96	98,81	99,65	4,24	4,25
5	5 ng/mL	4,05	4,82	4,82	4,89	4,62	3,83	4,51	0,45	9,98
	25 ng/mL	26,44	25,69	25,49	29,42	25,28	28,15	26,75	1,68	6,28
	100 ng/mL	96,69	95,75	95,37	92,92	102,49	102,70	97,65	4,03	4,13

KONS.: Konsantrasyon

Elde edilen verilere bakıldığında standart sapma değerlerinin (<15) ve %RSD değerlerinin (<15) uygun olduğu ve uygulanan metodun kesinlik değerlerinin istenilen limitler dahilinde olduğu görülmüştür.

4.1.6. Kararlılık

Donma-erime döngüleri ve uzun dönem kararlılık değerlendirmeleri temel alınarak gerçekleştirilen birinci basamak kararlılık çalışmasında, amfetamin ve metamfetaminin 0. ay (kan örneği alındıktan hemen sonra yapılan analiz) ve 6. ay zaman noktalarındaki konsantrasyon verileri Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Amfetamin ve metamfetamin içeren örneklerde, farklı aylarda ölçülen konsantrasyonlara göre kararlılık değişimleri

	AMP		MET	
	Konsantrasyon (10 ng/mL)	% Değişim	Konsantrasyon (10 ng/mL)	% Değişim
0.Ay (Ort.)	10,33	-	10,26	-
6.Ay (Ort.)	9,86	4,55	9,90	3,51

LC-MS/MS sistemi ile enjeksiyonu gerçekleştirilen ve analizi yapılan numunelerin otomatik örnekleyici içerisindeki kararlılıklarını değerlendirmek amacıyla yürütülen ikinci basamak kararlılık çalışmasında, amfetamin ve metamfetaminin 0. gün ve 7. gündeki konsantrasyon verileri Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Amfetamin ve metamfetamin içeren örneklerde, farklı günlerde ölçülen konsantrasyonlara göre kararlılık değişimleri

	AMP		MET	
	Konsantrasyon (25 ng/mL)	% Değişim	Konsantrasyon (25 ng/mL)	% Değişim
0.Gün (Ort.)	23,73	-	25,81	-
7.Gün (Ort.)	21,64	8,81	24,61	4,65

İlgili zaman aralıklarında gerçekleştirilen analizler sonucunda, örneklerin konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim (>10) gözlenmemiştir.

4.1.7. Valide Edilen Metodun Gerçek Örneklerle Uygulanması

Kanda amfetamin ve metamfetaminin kantitatif tayinine yönelik olarak valide edilen analiz yöntemi kapsamında, geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen geri kazanım oranları dikkate alınarak, Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı'na uyutucu, uyarıcı ve uyuşturucu madde analizleri amacıyla gönderilen 11 bireye ait kan örneklerinde gerçekleştirilen amfetamin ve metamfetaminin 0. ay ve +4 °C'de saklandıktan sonra 1. ay zaman noktalarındaki analiz sonuçları Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Olgulara ait gerçek kan örneklerindeki amfetamin ve metamfetamin konsantrasyonları

	Cins.	Yaş	0.AY		1.AY	
			MET Kons. (ng/mL)	AMP Kons. (ng/mL)	MET Kons. (ng/mL)	AMP Kons. (ng/mL)
Şahıs 1	Erkek	44	83,17 ± 0,37	3,93 ± 0,32	75,84 ± 0,37	4,12 ± 0,32
Şahıs 2	Erkek	35	133,01 ± 0,37	19,15 ± 1,04	132,99 ± 0,37	18,14 ± 1,04
Şahıs 3	Erkek	43	3,70 ± 0,27	3,14 ± 0,32	3,82 ± 0,27	2,88 ± 0,32
Şahıs 4	Erkek	52	79,74 ± 0,37	8,91 ± 0,32	78,83 ± 0,37	9,29 ± 0,32
Şahıs 5	Erkek	48	92,02 ± 0,37	18,89 ± 1,04	87,43 ± 0,37	17,71 ± 1,04
Şahıs 6	Erkek	32	15,56 ± 0,61	1,14 ± 0,32 (≤ LOQ)	15,08 ± 0,61	1,06 ± 0,32 (≤ LOQ)
Şahıs 7	Erkek	41	32,05 ± 0,61	3,16 ± 0,32	31,13 ± 0,61	3,06 ± 0,32
Şahıs 8	Kadın	23	23,76 ± 0,61	1,18 ± 0,32 (≤ LOQ)	22,12 ± 0,61	1,09 ± 0,32
Şahıs 9	Erkek	27	11,93 ± 0,27	2,21 ± 0,32	11,04 ± 0,27	2,05 ± 0,32
Şahıs 10	Erkek	34	119,34 ± 0,37	9,61 ± 0,32	117,55 ± 0,37	8,97 ± 0,32
Şahıs 11	Erkek	31	131,00 ± 0,37	10,29 ± 0,32	127,80 ± 0,37	9,83 ± 0,32

Cins.: Cinsiyet

Kons.: Konsantrasyon

5. TARTIŞMA

Madde bağımlılığı, toplumun hemen her kesimini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen ciddi bir toplumsal sorundur. Bu durum, sosyal problemlerin ve çeşitli suçların ortaya çıkmasına neden olurken; aynı zamanda sağlık sorunlarına ve hatta ölümle sonuçlanan vakalara yol açabilmektedir. Şiddet olayları, istismar vakaları ve madde etkisi altında araç kullanımı gibi suçlar, bu sorunla bağlantılı olarak sıkça karşılaşılan örneklerdir. Ayrıca madde kullanımı, iş gücü kaybı gibi ekonomik ve toplumsal sıkıntıları da beraberinde getirmektedir.

Son yıllarda, yüksek bağımlılık yapma potansiyeline sahip psikoaktif maddelerin gerek ulusal düzeyde gerekse küresel ölçekte kullanımında dikkat çekici bir artış gözlemlenmektedir. Bu maddeler, bireysel düzeyde zihinsel ve fiziksel tahribata yol açarken, toplumsal yapıda da ciddi bozulmalar meydana getirmektedir. Uyutucu, uyuşturucu ve uyarıcı türlerdeki yasadışı maddelerin oluşturduğu olumsuz etkilerle mücadelede en temel adım, kullanımın önüne geçilmesidir. Ancak bu süreçte, madde kullanımının tespiti ve niteliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen toksikolojik analizlerin rolü göz ardı edilmemelidir. Madde türünün doğru biçimde tespiti, uygulanacak medikal ve psikolojik müdahalelerin etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca toksikolojik veriler, ölümle sonuçlanan vakalarda, bireyin ölüm sebebinin madde kullanımı kaynaklı olup olmadığının anlaşılmasında bilimsel kanıt sunma açısından kritik bir işlev görmektedir. Bu bağlamda hem bireysel hem de toplumsal sağlığın korunması amacıyla, toksikolojik analizlerin nitelikli biçimde gerçekleştirilmesi ve bu alandaki teknik kapasitenin güçlendirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Psikoaktif maddelerin tespiti ve miktar tayini, analitik kimya ile toksikoloji disiplinlerinin kesişim noktasında yer alan önemli bir araştırma alanıdır. Bu maddeler; tıbbi, adli ve çevresel bağlamlarda birey sağlığını ve toplumsal güvenliği etkileyen potansiyele sahip olmaları nedeniyle, kantitatif analizlerinin güvenilir ve hassas bir şekilde gerçekleştirilmesi kritik önem taşımaktadır.

Kantitatif analiz çalışmaları, belirli bir psikoaktif maddenin biyolojik örneklerde (kan, idrar, tükürük, saç gibi) bulunup bulunmadığını saptamanın ötesine geçerek, ilgili maddenin konsantrasyonunu bilimsel doğrulukla ölçmeyi hedeflemektedir. Bu amaçla geliştirilen analitik yöntemler arasında gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS),

sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve immünolojik test sistemleri öne çıkmaktadır. Bahsi geçen yöntemler; duyarlılık, seçicilik, hızlı sonuç üretimi ve düşük hata payı gibi kriterler doğrultusunda değerlendirilmekte ve sürekli olarak optimize edilmektedir.

Toksikolojik açıdan bakıldığında, madde konsantrasyonunun doğru biçimde belirlenmesi hem klinik müdahalelerin yönlendirilmesinde hem de adli süreçlerin kanıta dayalı biçimde yürütülmesinde temel rol üstlenmektedir. Özellikle doz-maruz kalma ilişkisi, zehirlenme derecelendirmesi ve ölüm sebebinin analizinde kantitatif verilerin doğruluğu ve güvenilirliği belirleyicidir.

Merkezi sinir sistemini uyarıcı etkileriyle bilinen ve ATS sınıfının önemli bileşenleri arasında yer alan amfetamin ve metamfetaminin kullanımı, küresel ölçekte giderek artan bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Bu bağlamda, ilgili maddelerin biyolojik numunelerde güvenilir biçimde tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesi hem klinik toksikoloji hem de adli bilimlere açısından kritik bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada, amfetamin ve metamfetaminin antemortem kan örneklerinde kantitatif tayinine yönelik LC-MS/MS teknolojisine dayanan analitik bir metod geliştirilmiş ve kapsamlı şekilde valide edilmiştir. Metodun geçerliliği seçicilik, doğrusalılık, tespit sınırı (LOD)-tayin sınırı (LOQ), geri kazanım, kesinlik (gün içi- günler arası tekrarlanabilirlik) ve kararlılık parametreleri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Çalışmada ilk validasyon parametresi olarak ele alınan seçicilik değerlendirmesinde, hedef analitler olan amfetamin, metamfetamin ve iç standart olarak kullanılan MDMA-ds'in kör (boş) kan örnekleri ile metanol çözücüsünde incelenen kromatografik alıkonma süreleri kapsamında herhangi bir interferans sinyali (pik) gözlemlenmemiştir. Bu durum, LC-MS/MS yönteminin biyolojik matrisler içerisinde hedef bileşikler seçici biçimde ayırt etme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Analitlerin ayrımının iyi olması, yöntemin analitik özgünlük açısından güçlü bir performansa sahip olduğunu desteklemektedir ve klinik ya da adli toksikoloji uygulamaları açısından güvenilir veri üretimi açısından temel teşkil etmektedir.

Yöntemin doğrusal yanıt aralığını belirlemek amacıyla yapılan doğrusalılık çalışmasında, amfetamin ve metamfetamin için kandaki konsantrasyonları sırasıyla 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 ng/mL olacak şekilde yedi noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen regresyon analizleri sonucunda, amfetamin için korelasyon katsayısı (R^2) 0,996, metamfetamin için ise 0,992 olarak belirlenmiştir. Bu değerler,

SWGTOX validasyon kılavuzunda belirtilen kabul kriteri olan $R^2 > 0,99$ eşik değerini sağlamaktadır. Dolayısıyla, yöntem çalışılan konsantrasyon aralığında yüksek düzeyde doğrusal bir yanıt vermekte olup, kantitatif analizler açısından güvenilirlik sergilemektedir.

Yöntemin hassasiyetini belirlemek amacıyla yapılan LOD ve LOQ çalışmaları kapsamında, amfetamin için sırasıyla 0,46 ng/mL ve 0,95 ng/mL; metamfetamin için ise 0,31 ng/mL ve 0,65 ng/mL değerleri elde edilmiştir. Bu veriler, yöntemin düşük konsantrasyonlardaki analitleri bile güvenilir şekilde tespit ve tayin edebildiğini göstermektedir. Literatür taramasında, yurt içinde Döğer (2016), Görgöz (2022), Akgül (2023), Uzcan (2023), Köse (2023) ve Hayırlı (2024) tarafından yürütülen çalışmalarda; amfetamin ve metamfetaminin çeşitli biyolojik materyallerde ve farklı analitik sistemler aracılığıyla kalitatif ve kantitatif analizleri ve yöntem validasyonları yapılmıştır.

Çalışmada, amfetamin ve metamfetaminin kan örneklerindeki geri kazanım oranları 5 ng/mL, 25 ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında incelenmiştir. Amfetamin için %geri kazanım oranları sırasıyla %106,20, %111,87 ve %93,28; metamfetamin için ise %115,17, %113,61 ve %105,15 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, SWGTOX validasyon kılavuzunda belirtilen kabul edilebilir aralık olan %80–120 sınırları içerisinde yer almakta olup, yöntemin kantitatif analiz açısından güvenilirliğini desteklemektedir. Ayrıca elde edilen %RSD değerlerinin 0,35–6,03 aralığında olması, tekrarlanabilirlik açısından yöntemin uygunluğunu göstermektedir (kabul edilebilir sınır: $< \%15$). Bu çalışmada, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip adsorban materyalleri içeren iki ayrı SPE kartuşu olan Oasis HLB ve UCT XTRACT, hedeflenen analiz limitleri doğrultusunda yöntem performansını değerlendirmek amacıyla karşılaştırmalı geri kazanım çalışmaları kapsamında incelenmiştir. Her iki kartuş ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen geri kazanım verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiş; Oasis HLB kartuşu ile anlamlı ve tekrarlanabilir geri kazanım yüzdelere ulaşılırken, UCT XTRACT kartuşu ile elde edilen veriler istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır. Bu bağlamda, UCT XTRACT SPE kartuşunun çalışmada kullanılan yöntem için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tekrarlanabilirlik analizlerinde hem gün içi hem de günler arası varyasyon incelenmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik için geri kazanım çalışmasında elde edilen veriler esas alınmıştır. Bu veriler, analitik yöntemin kısa vadeli tekrarlanabilirliğini ortaya koymaktadır. Günler arası tekrarlanabilirlik değerlendirmesinde ise farklı günlerde yapılan analizler sonucu elde edilen %RSD değerleri incelenmiştir. Amfetamin için 5 ng/mL, 25

ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında sırasıyla 6,16–9,02; 3,78–9,03 ve 4,58–4,95 aralığında %RSD değerleri elde edilmiştir. Metamfetamin için ise aynı konsantrasyonlarda %RSD değerleri sırasıyla 3,14–9,98; 1,99–6,28 ve 3,72–5,20 aralığında bulunmuştur. Tüm konsantrasyon düzeylerinde elde edilen %RSD sonuçlarının SWGTOX validasyon kılavuzunda belirtilen kabul edilebilir sınır olan $<15\%$ kriterini sağladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, yapılan analizlerin günler arası tekrarlanabilirlik açısından güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Kararlılık parametresi kapsamında yürütülen çalışma iki aşamada değerlendirilmiştir. İlk aşamada, numunelerin donma-çözülme çevrimlerine ve uzun dönemli saklama koşullarına karşı kararlılıkları incelenmiştir. Bu kapsamda yapılan ölçümler 0. ve 6. ay zaman noktalarında gerçekleştirilmiş olup, ilgili konsantrasyon % değişimleri amfetamin için 4,55; metamfetamin için 3,51 bulunmuştur. Konsantrasyon değişimleri, SWGTOX validasyon rehberinde belirtilen kabul edilebilir limit olan $<10\%$ sınırının altında kalmıştır. Elde edilen veriler, donma-erime ve uzun dönemli saklama koşullarında analitlerin kararlılığının sürdürülebilir olduğunu göstermektedir. İkinci aşamada, numunelerin otomatik örnekleyici cihazda $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta işlem süresi boyunca gösterdiği kararlılık değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda 0. ve 7. gün ölçüm noktaları dikkate alınmıştır. Amfetamin için 7. gün konsantrasyon % değişimi 8,81, Metamfetamin için 7. gün konsantrasyon % değişimi 4,65 olarak ölçülmüştür. Her iki analit için elde edilen sonuçlar, otomatik örnekleyici koşullarında da yeterli kararlılığın sağlandığını ortaya koymuştur. İlgili konsantrasyon değişimleri $<10\%$ aralığında kalarak kabul edilebilir limitler dahilinde bulunmuştur. Bu bulgular doğrultusunda, yapılan kararlılık testlerinin analitik güvenilirlik açısından yeterliliği doğrulanmıştır. Numune işleme ve analiz süreçlerinde gözlenen düşük varyasyon, yöntem kararlılığının pratik uygulamalara uygun olduğunu göstermektedir.

Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı'na uyutucu, uyarıcı ve uyuşturucu madde analizleri amacıyla gönderilen 11 olguya ait kan örnekler valide edilen yöntemle analiz edilmiştir. Bu örnekler, başlangıçta (0. ay) ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir ay süreyle saklandıktan sonra yeniden analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda, 0. ay ile 1. ay sonunda yapılan analiz sonuçları arasındaki farkın $<10\%$ olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, valide edilen yöntemin gerçek kan örnekleri üzerinde başarıyla uygulanabildiğini ve söz konusu örnekler için pratik açıdan uygunluğunu ortaya koymuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür taramaları sonucunda, ATS grubuna dahil olan amfetamin ve metamfetaminin gerek birlikte gerekse ayrı ayrı analiz edildiği ve validasyon çalışmalarının yer aldığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın özgün yönleri şu şekilde öne çıkmaktadır:

- SPE aşamasında, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip adsorban içeren kartuşların karşılaştırmalı olarak kullanılması,
- İki basamaklı ve geniş kapsamlı kararlılık analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Yöntemin adli olgu örneklerine doğrudan uygulanarak gerçek örneklerle desteklenmesi.

Bu özellikleriyle yöntem, hem metodolojik açıdan literatüre önemli bir katkı sunmakta hem de adli toksikoloji alanında ileriye dönük uygulamalar için güçlü bir referans oluşturmaktadır. Elde edilen veriler ışığında, geliştirilen analitik yöntemin Adli toksikoloji laboratuvarında antemortem kan örneklerinde amfetamin ve metamfetaminin kantitatif tayininde kullanım için uygun olduğu değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, yöntem yalnızca teknik geçerliliğiyle değil, aynı zamanda olgu aydınlatıcı gücüyle de dikkate değer bir potansiyele sahiptir.

7. KAYNAKLAR

Adıören, N. (2024). *Bir Sentetik Kannabinoid Olan RCS-4 Bileşiğinin ve Metabolitinin LC-MS/MS ile Serum Örneğinden Tayini*. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Akdağ, İ. (2003). Metot Validasyon Eğitim Notları, TUBİTAK-UME. 41 s., Ankara.

Akgül, Ö. (2023). *Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Cihazı ile Eroin, Morfin, Kodein, Kokain, Amfetamin, Metamfetamin, MDMA ve THC'nin Kalitatif Analizi*. Çukurova Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

Akgür, S. A. (Ed.). (2021). *Yasal & Yasadışı Maddeler ve Adli Toksikolojik Yaklaşımlar*, 129–130, Ankara, Akademi Kitabevi.

Aksoy, A., & Yavuz, O. (2006). Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *Samsun FÜ Sağlık Bil. Derg*, 20(3), 259-269.

Akyüzlü-Kaya, D. & Kayaaltı, Z. (2015). Kan, Saç, İdrar ve Solunum Havası Örneklerinin Bağımlılık Yapan Maddelerin Analizinde Kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19, 232-237.

Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V. & Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80: 655-667.

Anılanmert, B. (2014). *GHB, Ketamin, Norketamin, Ffenobarbital, Tiyopental, Zolpidem, Zopiklon ve Fenitoin'in LC-MS/MS Yöntemi ile İdrardan Eşzamanlı Tayini*. İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.

Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. Ando, D. J. (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2-185 p.

Arpacık, Y. (2019). *Atık Suda Kafein Analizi İçin Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi ile Yöntem Geliştirilmesi*. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Aslan, R. (2021). *Amfetamin Tipi Stimülanların İdrarda Analizine Yönelik Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi Geliştirilmesi*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Aslın, H. (1995). *Eroin Numunelerinin Gaz Kromatografi Yöntemi ile Tayini*. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Australian Government Department of Health and Ageing. (2011). *National Drug Strategy. National Amphetamine-Type Stimulant Strategy Background Paper*.

Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi (2023), Avrupa Uyuşturucu Raporu 2023, Eğilimler ve Gelişmeler,
https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en

Baselt, R. C. (2009). Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 8th Edition. *Clinical Chemistry*, 55(12): 2232.

Bell, J. (2006). The facts behind amphetamines. *InPharmation*. 7(1): 6–11.

Benzenhöfer, U. & Passie, T. (2010). Rediscovering MDMA (Ecstasy): The Role of the American Chemist Alexander T. Shulgin. 105(8), 1355-1361.

Berman, S. M., Kuczenski, R., Mc Cracken, J. T. & London, E. D. (2009). Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Mol Psychiatry*. Feb; 14(2): 123–142.

Butcher, J. N., Mineka, S & Hooley, J. M. (2013). *Anormal Psikoloji*. (O. Gündüz, Çev.). İstanbul: Kaknüs Yayınları.

Bülbül, T. T. (2021). *Yapay Beyin Omurilik Sıvısında Kokain ve Ana Metaboliti Benzoilekgoninin Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi Yöntemiyle Belirlenmesi*. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Camel, V. (2023). Solid Phase Extraction of Trace Elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58:1177-1233.

Carvalho, F. (2003). The toxicological potential of khat. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 1–2. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00100-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00100-4).

Carvalho, M., Carmo, H., Costa, V. M., Capela, J. P., Pontes, H., Remiao, F., Carvalho, F. & Bastos, M. L. (2012). Toxicity of amphetamines: an update. *Arch Toxicol*, 86(8):1167-231.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z. & Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses. *Journal of Chromatography B*, 852: 22–34.

Cheremisinoff, N. P. (1996). *Polymer characterization: laboratory techniques and analysis*. William Andrew, Norwich, New York.

Chomchai, C. & Chomchai, S. (2015). Global patterns of methamphetamine use. *Curr Opin Psychiatry*, 28:269-274.

Courtney, K. E. & Ray, L. A. (2014). Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature. *Drug Alcohol Depend*, 143:11-21. 74.

Covey, C. H. (2007). The methamphetamine crisis: Strategies to save addicts, families, and communities. *Praeger Publishers/Greenwood Publishing Group*, USA.

Cruickshank, C. C. & Dyer, K. R. (2009). A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*, 104(7): 1085–1099.

Culpepper, L. (2007). A Roadmap to Key Pharmacologic Principles in Using Antipsychotics. *Primary Care Companion To The Journal of Association of Medicine and Psychiatry*, 9 (6) 444–454.

Çiğman, F. B. (2019). *Kan ve İdrar Örneklerinde LC/MS/MS ile AB-CHMINACA ve Metabolitlerinin Tayini*. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

de la Torre, R., Farré, M., Roset, P. N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., Segura, J., & Camí, J. (2004). Human Pharmacology of MDMA. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26(2), 137–144. <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00009>

de Matos, E. G., Hannemann, T. V., Atzendorf, J., Kraus, L., & Piontek, D. (2018). The Consumption of New Psychoactive Substances and Methamphetamine: Analysis of Data From 6 German Federal States. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115(4), 49.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remiao, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(7), 363-414.

Döğer, R. (2016). *Metamfetamin ve MDMA (Ekstazi)'nın İdrar ve Saçta Kromatografik Yöntemlerle Tayini*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Dülger, S. (2008). *Amfetamin Türevleri İçeren Yasa Dışı Üretilmiş Tabletlerin Kromatografik ve Spektroskopik Yöntemlerle Analizi*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

Emekdaş, G., Güngör, S., Gün, H. & Kocabeyoğlu, Ö. (1990). *Kromatografik yöntemler*. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1:108-118, Gaziantep, Türkiye.

Eser, B. & Sepici, D. A. (2018). *Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları*, Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi 2(2):51-57, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Ersoy, C. (2017). *JWH-210 (4-etil-1-naftalenil) (1-pentil-1H-indol-3-il)-metanon ve Metabolitinin (JWH-210-N-5-karboksi pentil) LC-MS/MS ile Kanda Tayini*. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2014). *Exploring methamphetamine trends in Europe*, EMCDDA Papers, Publications Office of the European Union, Luxembourg, http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/787/TDAU14001ENN_460800.pdf.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2019). *European Drug Report 2019: Trends and Developments*

<https://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2019>

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2020) s.6-11-37-38-39-43). *EU4MD SPECIAL REPORT Emerging evidence of Afghanistan's role as a producer and supplier of ephedrine and methamphetamine*, 6, 11, 37-39, 43 <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13410/emcdda-methamphetamine-in-Afghanistan-report.pdf>

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2022). *European Drug Report 2022: Trends and Developments*

https://www.euda.europa.eu/publications/edr/trends-developments/2022_en

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2024). *European Drug Report 2024: Trends and Developments*

https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2024_en

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction ve The European Union Agency for Law Enforcement Cooperation (2011). *Amphetamine: A European Union Perspective in the Global Context*. https://www.euda.europa.eu/publications/joint-publications/amphetamine_en

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction ve The European Union Agency for Law Enforcement Cooperation (2019). 6-112 *Methamphetamine in Europe*. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12132/20195788_TD0119853ENN.Pdf

European Union Drugs Agency (EUDA) (2023). *European Drug Report 2024: Trends and Developments* https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023_en

Evren, C. & Bozkurt, M. (2018). Update on methamphetamine: an old problem that we have recently encountered. *Dusunen Adam The Journal of Psychiatry and Neurological Sciences*, 31:1-10.

Fineberg, N. A., Haddad, P. M., Carpenter, L., Gannon, B., Sharpe, R., Young, A. H., Joyce, E., Rowe, J., Wellsted, D., Nutt, D. J., & Sahakian, B. J. (2013). The size, burden and cost of disorders of the brain in the UK. *Journal of Psychopharmacology*, 27(9):761–70.

Flanagan, R. J., Connally, G., & Evans, J. M. (2005). Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. *Toxicological reviews*, 24(1), 63-71.

Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W. & Hanson, G. R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47:681-98.

Freudenmann, R. W., Oxler, F. & Bernschneider-Reif, S. (2006). The Origin of MDMA (Ecstasy) Revisited: The True Story Reconstructed from the Original Documents. 101(9): 1241-5.

Gökçe, E. (2001). *Ekstazi Örneklerinin Bileşimlerinin İncelenmesi ve Kaynakları Ortak Olanların Belirlenmesi*. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Görgöz, E. (2022). (+/-)-MDA, (+/-)-MDMA, (+/-)-Metamfetamin, 6-Asetilmorfin, Normorfin, Morfin LC-MS / MS ile Eş Zamanlı Analitik Metot Validasyonu. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Grapp, M., Kaufmann, C., Streit, F. & Binder, L. (2018). Systematic forensic toxicological analysis by liquid-chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry in serum and comparison to gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, 287:63–73.

Green, J. M. (1996). Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 68(9), 305A – 309A.

Green, S., Kerr, F. & Braitberg, G. (2008). Amphetamines and related drugs of abuse. *Emerg Med Australasia*, 20: 391–402.

Hädener, M., Bruni, P. S., Weinmann, W., Frübis, M., & König, S. (2017). Accelerated quantification of amphetamine enantiomers in human urine using chiral liquid chromatography and on-line column-switching coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409, 1291-1300.

Harris, D. S., Boxenbaum, H., Everhart, E. T., Sequeira, G., Mendelson, J. E. & Jones, R.T. (2003). The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74(5): 475–486.

He, K., Echigo, S., Asada, Y. & Itoh, S. (2018). Determination of Caffeine and Its Metabolites in Wastewater Treatment Plants Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*, 34(3):349-354.

Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J. & Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology*, 27(6):479–96.

Hendrickson, R. G., Horowitz, B. Z., Norton, R. L. & Notenboom H. (2006). 'Parachuting' meth: a novel delivery method for methamphetamine and delayed-onset toxicity from 'body stuffing'. *Clinical Toxicology* (Philadelphia, Pa.), 44(4): 379–382.

International Narcotics Control Board (2019). *Precursors 2019 and chemicals frequently used in the illicit manufacture of narcotic drugs and psychotropic substances*, 17-22,103,119.

https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2019/Precursors_Report/English_ebook_PRE2019.pdf.

Jenkins A. J. (2008). Pharmacokinetics of Specific Drugs. In Karch SB (Ed.), *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. (pp. 26–30). CRC 73 Press.

Kaplan, Y., & Demir, Ö. (2014). Amfetamin ve Benzeri Maddeler. In S. Akgür & H. Coşkunol (Eds.), *Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi* (pp. 105–116). İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi.

Kataoka, H. (2003). New Trends in Sample Preparation for Clinical and Pharmaceutical Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22: 232-244.

Kim, I., Oyler, J. M., Moolchan, E. T., Cone, E. J. & Huestis, M. A. (2004). Urinary pharmacokinetics of methamphetamine and its metabolite, amphetamine following controlled oral administration to humans. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26:664-672.

Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, J. & Sheshala, R. (2011). Recent Advances in Sample Preparation Techniques for Effective Bioanalytical Methods. *Biomedical Chromatography*, 25:199–217.

Kotta-Loizou, I., Pritsa, A., Antasouras, G., Vasilopoulos, S. N., Voulgaridou, G., Papadopoulou, S. K., Coutts, R. H. A., Lechouritis, E. & Giaginis, C.(2024). Fetus Exposure to Drugs and Chemicals: A Holistic Overview on the Assessment of Their Transport and Metabolism across the Human Placental Barrier. *Diseases*, 12(114):1-26. <https://doi.org/10.3390/diseases12060114>.

Köse, E. (2023). *Kanda, İdrarda ve Tırnak Örneklerinde LC-QTOF/MS ile Metamfetaminin Kalitatif ve Kantitatif Tayini*. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

Krasnova, I. N. & Cadet, J. L. (2009). Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Reviews*, 60(2):379-407.

Kushnir, M. M., Rockwood, A.L. & Bergquist, J. (2010). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrom Rev*, 29(3):480–502.

Langford, A., Dean, J., Reed, R., Holmes, D., Weyers, J. & Jones, A. (2005). *Practical Skills in Forensic Science*, Pearson Education Limited, Essex, Londra.

Leis, H. J., Fauler, G., & Windischhofer, W. (2014). Enantioselective quantitative analysis of amphetamine in human plasma by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 4473-4480.

Levine, B. (Ed.). (2003). *Principles of forensic toxicology*, Amer. Assoc. for Clinical chemistry.

Maisto, S., Galizio, M., & Connors, G. (2011). *Drug Use and Abuse (6th ed.)*. Wadsworth Publishing. <https://www.amazon.com/Stephen-Maisto-Abusesixth/dp/B008UBS0KS>

Maurer, H. H. (2007). Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem*, 388(7):1315–25.

Meredith, C.W., Jaffe, C., Ang-Lee, K. & Saxon, A. J. (2005). Implications of chronic methamphetamine use: a literature review. *The Harvard Review of Psychiatry*, 13(3): 141–154.

Moeller, M. R., Steinmeyer, S., & Kraemer, T. (1998). Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 713(1), 91-109.

Moszczynska, A. & Callan, S. P. (2017). Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: implications for treatment. *The Journal*

of Pharmacology Experiment Therapeutics, 362:474- 488.

Mozayani, A. & Noziglia, C. (2011). *The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice*, 2nd edition, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Nordahl, T.E., Salo, R. & Leamon, M. (2003). Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15:317–325.

Novakova, L. & Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656 8–35.

Oka, M. (2020). *Saçta Olanzapin'in Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)Yöntemi ile Tayini*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Onat, T., Emerk, K. & Sözmen, E.Y. (2002). *İnsan Biyokimyası*, 437, Palme Yayıncılık, Ankara.

Panenka, W. J., Procyshyn, R. M., Lecomte, T., Mac Ewan, G. W., Flynn, S. W., Honer, W. G. & Barr, A. M. (2013). Methamphetamine use: A comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug Alcohol Depend*, 1;129(3):167-79.

Peters, F. T. & Remane, D. (2012). Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology - A review. *Anal Bioanal Chem*, 403(8):2155–72.

Pike, E., Stoops, W. W. & Rush, C. R. (2016). Acute bupropion dosing enhances abuserelated subjective effects of oral methamphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150-151:87-93.

Rahmawati, S. (2021). *Sigara Bırakma Tedavisi Gören Hastaların Plazma ve İdrarında Vareniklinin Kromatografik Tayini*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Rau, T., Ziemniak, J. & Poulsen D. (2016). The neuroprotective potential of low-dose methamphetamine in preclinical models of stroke and traumatic brain injury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 64:231-236.

Richards, J. R., Bretz, S. W., Johnson, E. B., Turnipseed, S. D., Brofeldt, B. T. &

Derlet, R. W. (1999a). Methamphetamine abuse and emergency department utilization. *Western Journal Medicine*, 170:198-202. 80.

Richards, J. R., Johnson, E. B., Stark, R. W. & Derlet, R. W. (1999b). Methamphetamine abuse and rhabdomyolysis in the ED: a 5-year study. *American Journal of Emergency Medicine*, 17:681-685.

Roll, J., Rawson, R., Ling, W. & Shoptaw, S. (2009). Methamphetamine addiction: from basic science to treatment. *UCLA Integrated Substance Abuse Programs (ISAP) Methamphetamine Publications*, The Guilford Press.

Rothman, R. B & Baumann, M. H. (2006). Therapeutic Potential of Monoamine Transporter Substrates. *Curr Top Med Chem*, Sep 3;6(17):1845–59.

Rusyniak, D. E. (2011). Neurologic manifestations of chronic methamphetamine abuse. *Neurologic Clinics*, 29:641-655.

Sadıkho, E., Kangı, R., & Uğur, S. (1995). *Ölçüm Belirsizliği*, Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME) 95-104, Gebze, Kocaeli.

Schep, L. J., Slaughter, R.J. & Beasley, D. M. G. (2010). The clinical toxicology of metamfetamine. *Clin Toxicol*, 48(7):675-694.

Schepers, R. J. F., Oyler, J. M., Joseph, R. E., Cone, E. J., Moolchan, E. T. & Huestis, M.A. (2003). Methamphetamine and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid and Plasma after Controlled Oral Methamphetamine Administration to Human Volunteers. *Clin Chem*, 121–32. Available from: <https://dx.doi.org/10.1373/49.1.121>

Skoog, D. A., Holler, F. J. & Timothy, A. N. (1998). *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Kılıç, E., Köseoğlu, F. ve Yılmaz, H. (eds), *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara, Türkiye.

Skoog, D. A., Holler, J. F. & Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis*, 6th ed, 1039 p, Thomson, Brooks/Cole, Belmont, California.

Smith, A., O'Neil, M. J., Heckelman, P. E. & Budavari, S. (2001). Merck Research Laboratories Division of Merck Co & I. *Merck Index*. 13th ed. (eds.).

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons.

Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W. & Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog Neurobiol*, 75(6):406-33.

Sönmez, K. (2016). *Genç Nüfusta Kullanımı Yaygın Olan Amfetamin Türevlerinin (ekstazi) idrarda GC/MS ile Tayini*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

Söylemezoğlu, T. (2001). *Narkotikler ve Analizleri Ders Notları*, Ankara.

SWGTOX. (2013). Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>.

Şahin, T. (2019). *Etil Asetat Metodu ile Meyve ve Sebzelerde Pestisit Analizi ve Metot Validasyonu*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. (2018). *Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi*.

T. C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı. (2013). *Pestisit Analizleri İçin Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Hesaplanması Açıklamalı Uygulama Rehberi*.

T. C. İçişleri Bakanlığı, Emniyet Genel Müdürlüğü, Narkotik Suçlarla Mücadele Başkanlığı (TCİB) (2022). *METAMFETAMİN; Türkiye ve Dünyadaki Durumu*, 1. Baskı, Ankara: NSB Yayınları, 2022/10.

T. C. İçişleri Bakanlığı, Emniyet Genel Müdürlüğü, Narkotik Suçlarla Mücadele Başkanlığı (TCİB) (2024). *2024 Yılı Türkiye Uyuşturucu Raporu Eğilimler Ve Gelişmeler*, 1. Baskı, Ankara: NSB Yayınları, 2024/1.

Topal, H. (2012). *3, 4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) İçeren Tabletlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri Kullanılarak Kataloglandırılması*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Türk Akreditasyon Kurumu. (2019). *Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması İçin Bilgilendirme Kılavuzu*, Ankara.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2004) "Türkiye'de Sağlık Hizmetleri, Eğitim ve Toplumsal Girişimle Madde Kullanımının Önlenmesi, Madde

Kullanımı Üzerine Ulusal Değerlendirme Çalışması (Altı büyük şehirden elde edilen sonuçlar)", Ankara, 1-105.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2013). *World Drug Report 2012*.

URL-1. (2025. Şubat 23). Bağımlılıkla Mücadele Yüksek Kurulu: <https://bmyk.gov.tr/TR-67179/bagimlilik-nedir.html> adresinden alınmıştır.

URL-2. (2025. Eylül 5). https://www.euda.europa.eu/publications/drug-profiles/amphetamine_en adresinden alınmıştır.

URL-3. (2025. Eylül 5). <https://www.attolife.co.uk/drug-dictionary/amphetamine/> adresinden alınmıştır.

URL-4. (2025. Mart 17). Schwarcz, J. (2017). Birth of Amphetamine. *Mcgill Office for Science and Society*: <https://www.mcgill.ca/oss/article/controversial-science-history-quirky-science-toxicity/birth-amphetamine> adresinden alınmıştır.

URL-5. (2025. Mart 17). National Library of Medicine (NIH), Compound Summary: Amphetamine: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3007>. adresinden alınmıştır.

URL-6. (2025. Eylül 5). https://www.euda.europa.eu/publications/drug-profiles/methamphetamine_en adresinden alınmıştır.

URL-7. (2025. Eylül 5). https://www.dea.gov/sites/default/files/Extremely%20Pure%20Crystal%20Methamphetamine-2_0.JPG adresinden alınmıştır.

URL-8. (2025. Mart 9). Narconon International 2019. Drug Information: Methamphetamine: <https://www.narconon.org/drug-information/methamphetamine-history.html>. adresinden alınmıştır.

URL-9. (2025. Mart 10). United Nations Office on Drugs and Crime. Methamphetamine: <https://www.unodc.org/drugs/en/get-the-facts/methamphetamine.html>. adresinden alınmıştır.

URL-10. (2025. Eylül 8). https://www.euda.europa.eu/publications/drug-profiles/mdma_en adresinden alınmıştır.

URL-11. (2025. Eylül 8). [3,4-Methylenedioxymethamphetamine | C11H15NO2 |](#)

[CID 1615 - PubChem](#) adresinden alınmıştır.

URL-12. (2025. Eylül 8). https://www.researchgate.net/figure/MDMA-in-the-form-of-Ecstasy-tablets-http-wwwusdojgov-dea_fig1_334074535 adresinden alınmıştır.

URL-13. (2025. Eylül 8). <https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:MDA-2D-skeletal.svg> adresinden alınmıştır.

URL-14. (2025. Eylül 8). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_4-Methylenedioxymethamphetamine adresinden alınmıştır.

URL-15. (2025. Eylül 8). <https://www.release.org.uk/drugs/mda-mdai> adresinden alınmıştır.

URL-16. (2025. Eylül 5). <https://labakademi.com/kromatografinin-teorisi/> adresinden alınmıştır.

URL-17. (2025. Eylül 5). https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-a-LC-MS-MS-system-with-a-triple-quadrupole-mass-analyzer_fig7_328980854 adresinden alınmıştır.

URL-18. (2025. Eylül 5). https://www.researchgate.net/figure/The-principle-of-the-LC-MS-MS-method-used-in-Paper-IV-The-samples-containing-the-analyte_fig7_339747713 adresinden alınmıştır.

URL-19. (2025. Eylül 5). https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-solid-phase-extraction-SPE_fig3_334152091 adresinden alınmıştır.

Uzcan, Ş. (2023). *Postmortem Kan Örneklerinde Bazı Psikoaktif Maddelerin LC-MS/MS ile Kantitatif Tayini ve Metot Validasyonu*. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Vearrier, D., Greenberg, M. I., Miller, S. N., Okaneku, J. T. & Haggerty, D. A. (2012). Methamphetamine: history, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine. *Disease-a-month*, DM, 58(2), 38–89.

Wolff, K., Farrell, M., Marsden, J., Monteiro, M. G., Ali, R., Welch, S. & Strang, J. (1999). A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and

clinical usefulness. *Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs Publishing* ,94(9), 1279-1298.

Woźniak, M. K., Wiergowski, M., Aszyk, J., Kubica, P., Namieśnik, J., & Biziuk, M. (2018). Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.020>.

Yayayürük, A. E., Akgür, S., Ertaş, H. & Ertaş, F. N. (2014). Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizi. (Ed. Akgür, S., Coşkunol, H.). *Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi*, p. 211–236, İzmir, Ege Üniversitesi Yayınları.

Yayayürük, A. E., Özdokur, K. V. & Ertaş, F. N. (2018). Örnek Hazırlama Yöntemleri. (Ed. Akgür S, Dağlıoğlu, N.). *Temel Adli Toksikoloji*, p. 235–260, Ankara, Akademisyen Kitabevi.

Yıldız, A., Genç, O. & Bektaş S. (1997). *Enstrümental Analiz Yöntemleri 2. Baskı*, 417-419, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

Yıldız, G. (2012). *İyon Hareketliliği Spektrometresi ile Birleştirilmiş LC-MS/MS Cihazı Kullanılarak Bazı Sebzelerde Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi*. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.

Yılmaz, A. (2013). TURKLAB Rehber 01: *Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu*. Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği, İstanbul.

Yu, S., Zhu, L., Shen, Q., Bai, X. & Di X. (2015). Recent advances in methamphetamine neurotoxicity mechanisms and its molecular pathophysiology. *Hindawi Publishing Corporation Behavioural Neurology*,1-11.

Yuwono, M. & Indrayanto, G. (2005). Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32:243-259.

Zazoğlu, S. (2011). *İmmünolojik Analiz (CEDIA) Pozitif Sonuçlarının LC/MS/MS Yöntemi ile Teyidi ve Yöntemin Validasyonu*. İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.

Zengin, N. (2020). *Yapay Betin Omurilik Sıvısında Δ^9 -THC'nin Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Yöntemiyle Belirlenmesi*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ali TEPEKIRAN
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Okul/Programın Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Adli Bilimler	2025
Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi/Fen Fakültesi/ Kimya	2011
Lise	Bahçelievler Şehit Mehmet Bayar Anadolu Lisesi (Fen Bilimleri Bölümü)	2004

MESLEKİ DENEYİM

Adli Tıp Kurumu Enstrümantal Analiz ve Araştırma Laboratuvarı 2019-

YABANCI DİL İngilizce