

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA’NIN KAN VE İDRAR
NUMUNELERİNDEN KATI FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE
EKSTRAKSİYONU VE LC-MS/MS İLE TAYİNLERİ

DOKTORA TEZİ

Osman Can ÇAĞILCI

HAZİRAN 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI ANABİLİM DALI

MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA’NIN KAN VE İDRAR
NUMUNELERİNDEN KATI FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE
EKSTRAKSİYONU VE LC-MS/MS İLE TAYİNLERİ

Osman Can ÇAĞILCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTORA (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02/06/2025

Tezin Savunma Tarihi : 20/06/2025

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ümmühan TURGUT OCAK

Trabzon 2025

ÖNSÖZ

Bu doktora tez çalışması, Trabzon Adli Tıp Kurumu Grup Başkanlığı Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Doktora tez çalışmalarımda her an yanımda olan, değerli zamanını ve eşsiz tecrübesini benimle paylaşan, çok değer verdiğim danışman hocam Prof. Dr. Ümmühan TURGUT OCAK'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, her daim enerjisiyle bana iyi gelen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Miraç OCAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım esnasında bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Fatih İSLAMOĞLU'na, bu çalışmalarda bana destek olan sayın hocam Prof. Dr. Hakan ALP'e, yüksek lisans dönem arkadaşım Arş.Gör. Nurhayat ÖZBEK'e, tez çalışmamın her aşamasında bilgisini, zamanını ve tecrübesini benden esirgemeyen, bana tüm çalışmalarım boyunca yardımcı çok görmeyen, mesai arkadaşım ve hocam Dr. Hamide ELVAN BAYRAK'a ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana inanan ve her türlü desteği sunan sevgili anneme, babama, abime ve kız kardeşime yürekten teşekkür ederim.

Üniversite eğitimime başlamamla hayatıma giren ve daha sonra eşim olan sayın Elvan ÇAĞILCI'ya, bana göstermiş olduğu sabırdan, destekten ve yoğun ilgiden dolayı canı gönülden teşekkür ederim. Ayrıca 2021 yılında dünyama giren ve güzelleştiren kızım Alven ÇAĞILCI'ya da teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda beni destekleyen TÜBİTAK'a ve Adli Tıp Kurumu'na teşekkürü bir borç bilirim.

Osman Can ÇAĞILCI
Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA’nın Kan ve İdrar Numunelerinden Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi ile Ekstraksiyonu ve LC-MS/MS ile Tayinleri” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ümmühan TURGUT OCAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/numuneleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, 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.

20.06.2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Sentetik Kannabinoidler	1
1.1.1. MDMB-4en-PINACA.....	6
1.1.2. ADB-BUTINACA (BINACA)	7
1.2. Adli Toksikoloji.....	8
1.2.1. Adli Toksikolojide SK'lerin Tespitine Yönelik Analitik Yöntemler.....	9
1.2.2. Adli Toksikolojide SK'lerin Tespiti İçin Kullanılan Biyolojik Matrisler.....	10
1.2.3. SK Tayini için Adli Toksikolojide Numune Alma, Taşıma ve Saklama Şartları	11
1.2.4. Adli Toksikolojide SK Tespiti İçin Kullanılan Tarama Yöntemleri.....	12
1.2.5. Adli Toksikolojide SK Tespiti için Uygulanan Doğrulama Yöntemleri.....	12
1.2.6. Adli Toksikolojide SK Analizlerinde Karşılaşılan Zorluklar	13
1.3. KFE ve LC-MS/MS Yönteminin Önemi	15
1.3.1. LC-MS/MS Yöntemi.....	17
1.3.2. Adli Toksikolojide SK Analizi İçin Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri	20
1.3.2. KFE Yöntemi	21
1.4. Adli Toksikolojide Kan ve İdrar Numuneleri.....	23
1.5. Analitik Kimyada Metot Validasyonu	24
1.6. Literatürdeki MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA Tayin Yöntemleri.....	25
1.7. Araştırmanın Amacı ve Önemi	28
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	29

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler.....	29
2.3. IS Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
2.4. Analit Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
2.5. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
2.6. Analit Eklenmiş Kan ve İdrar Numunelerinin Hazırlanması.....	31
2.7. KFE İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
2.8. Mobil Fazların Hazırlanması	31
2.9. Kan ve İdrar Numunelerinin Temini	32
2.10. Kan ve İdrar Matrislerinde Analiz Öncesi Hazırlık ve Ayırma Teknikleri	32
2.11. KFE Kartuş Seçiminin Optimizasyonu.....	33
2.12. Ön Temizlemede Uygulanan KFE Yöntemi.....	34
2.13. Kontrol Numuneleri.....	35
2.14. LC-MS/MS Çalışma Şartları	36
2.14.1. LC İşleminin Çalışma Şartları	36
2.14.2. MS Sisteminin Çalışma Şartları	36
2.15. Validasyon Çalışmaları.....	37
2.15.1. Seçicilik.....	37
2.15.2. Doğrusallık	37
2.15.3. Duyarlılık.....	38
2.15.4. LOD ve LOQ Değerleri.....	38
2.15.5. Doğruluk.....	39
2.15.6. Kesinlik	39
2.15.7. Kararlılık	39
2.15.8. KFE-GK Değerleri	40
2.15.9. ME Değerleri.....	40
2.15.10. Taşıyıcı Etki	40
2.16. MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA Tayini için Önerilen Yöntem.....	40
3. BULGULAR	41
3.1. Numunelerin Ön Temizlenmesi.....	41
3.1.1. DSSE Yöntemiyle Elde Edilen GK Sonuçları	41
3.1.2. KFE Yöntemiyle Elde Edilen KFE-GK Sonuçları.....	42
3.2. KFE 3 Yöntemi ile Elde Edilen %KFE-GK ve %ME Değerleri.....	43
3.3. LC-MS/MS Analiz Parametreleri	43
3.4. Validasyon Bulguları	44

3.4.1. Seçicilik.....	44
3.4.2. Doğrusallık.....	49
3.4.3. Duyarlılık	50
3.4.4. LOD ve LOQ Değerleri.....	50
3.4.5. Doğruluk.....	51
3.4.6. Kesinlik	52
3.4.7. Kararlılık	52
3.4.8. Taşıyıcı Etki	52
3.5. Gerçek Numunelerin Analizleri.....	53
4. TARTIŞMA.....	55
4.1. SK'lerin Artan Tehdidi ve Toksikolojik Önemi	55
4.2. DSSE'nin Yetersizliği ve KFE'ye Geçişin Gerekçesi	55
4.3. KFE Kolonlarının Karşılaştırılması ve OASIS HLB'nin Üstünlüğü	56
4.4. KFE 3 Yöntemi ile Ön Temizleme İşleminin Etkinliği.....	57
4.5. LC-MS/MS Sisteminin Analitik Yöntem Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	57
4.6. Yöntem Validasyonunun Değerlendirilmesi	58
4.7. Gerçek Numunelerde Yöntemlerin Uygulanması.....	65
4.8. Yöntemin Literatürle Karşılaştırması ve Adli Laboratuvarlarda Kullanım Potansiyeli.....	65
5. SONUÇ.....	70
6. ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA’NIN KAN VE İDRAR NUMUNELERİNDEN KATI FAZ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE EKSTRAKSİYONU VE LC-MS/MS İLE TAYİNLERİ

Osman Can ÇAĞILCI

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ümmühan TURGUT OCAK

2025, 79 Sayfa

Son yıllarda dünya genelinde sentetik kannabinoidlerin (SK) kullanımı ciddi bir artış göstermektedir. “Bonzai”, “Spice”, “K2”, “Spice Gold”, “Spice Diamond”, “Chill Out” ve “Chill X” gibi çeşitli ticari adlarla pazarlanan bu bileşikler, toplum sağlığını tehdit eden yaygın psikoaktif maddeler arasında yer almaktadır. SK’lerin düşük maliyetli olması, etkilerinin güçlü ve hızlı başlaması ile klasik analiz yöntemleriyle uzun süre saptanamamış olmaları, bu maddelerin yaygınlaşmasında etkili olmuştur.

Bu tez çalışmasında, özellikle son dönemde sıkça karşılaşılan MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA adlı iki SK’nin kan ve idrar numunelerinde tayinine yönelik özgün ve güvenilir bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Numune hazırlığında matris bileşenlerinden arındırmayı sağlamak amacıyla katı faz ekstraksiyonu (KFE) uygulanmıştır. Yöntem doğrusal aralık bakımından 1,0–50,0 ng/mL konsantrasyonları arasında yüksek korelasyon katsayısı ($r^2 = 0,998$) göstermiştir. Yüksek geri kazanım (GK) oranları ve toksikolojik analizler için gerekli validasyon parametrelerinin sağlanması, geliştirilen metodun hem analitik güvenilirliğini hem de gerçek adli numunelerde uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: MDMB-4en-PINACA, ADB-BUTINACA, Sentetik Kannabinoidler, LC-MS/MS, Kan, İdrar, Adli Toksikoloji

PhD. Thesis

SUMMARY

EXTRACTION OF MDMB-4en-PINACA AND ADB-BUTINACA FROM BLOOD AND URINE SAMPLES BY SOLID PHASE EXTRACTION METHOD AND DETERMINATION BY LC-MS/MS

Osman Can ÇAĞILCI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Ümmühan TURGUT OCAK
2025, 79 Pages

In recent years, there has been a significant global increase in the use of synthetic cannabinoids (SCs). These compounds, marketed under various brand names such as “Bonzai,” “Spice,” “K2,” “Spice Gold,” “Spice Diamond,” “Chill Out,” and “Chill X,” are among the most commonly encountered psychoactive substances posing a threat to public health. Their widespread use can be attributed to their low cost, rapid and potent psychoactive effects, and the fact that they remained undetectable by conventional analytical methods for an extended period.

In this thesis study, a novel and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated for the determination of two frequently encountered SCs, MDMB-4en-PINACA and ADB-BUTINACA, in blood and urine samples. To eliminate matrix interferences during sample preparation, solid-phase extraction (SPE) was employed. The developed method demonstrated excellent linearity within a concentration range of 1.0–50.0 ng/mL, with a high correlation coefficient ($r^2 = 0.998$). High recovery (RE) rates and the successful fulfillment of all necessary validation parameters for forensic toxicological analysis confirmed both the analytical reliability of the method and its applicability to real forensic samples.

Key Words: MDMB-4en-PINACA, ADB-BUTINACA, Synthetic Cannabinoids, LC-MS/MS, Blood, Urine, Forensic Toxicology

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Δ^9 -THC'nin kimyasal yapısı	1
Şekil 2.	Sikloheksilfenoller (CP 47,497)'in kimyasal yapısı.....	2
Şekil 3.	HU-210'un kimyasal yapısı	2
Şekil 4.	JWH-018'in kimyasal yapısı	3
Şekil 5.	AM-2201'in kimyasal yapısı	3
Şekil 6.	MDMB-4en-PINACA'nın kimyasal yapısı	7
Şekil 7.	ADB-BUTINACA'nın kimyasal yapısı	8
Şekil 8.	ESI iyon kaynağında iyonların oluşturulması ve kapilere girişi.....	19
Şekil 9.	LC-MS/MS sisteminde kuadrupollerin dizilimi	20
Şekil 10.	KFE işlemindeki basamakların sırası	23
Şekil 11.	KFE işleminin basamaklarının ayrıntılı gösterimi.....	35
Şekil 12.	Boş kan numunelerine ait total iyon kromatogramı	44
Şekil 13.	Boş idrar numunelerine ait total iyon kromatogramı.....	44
Şekil 14.	1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram.....	45
Şekil 15.	1 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram	45
Şekil 16.	1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS'ni gösteren kromatogram.....	46
Şekil 17.	1 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS'ni gösteren kromatogram	46
Şekil 18.	10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram.....	47
Şekil 19.	10 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram	47
Şekil 20.	10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS'ni gösteren kromatogram.....	48
Şekil 21.	10 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS'ni gösteren kromatogram	48
Şekil 22.	Kan örneği için MDMB-4en-PINACA'nın kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 23.	Kan örneği için ADB-BUTINACA'nın kalibrasyon grafiği	49
Şekil 24.	İdrar örneği için MDMB-4en-PINACA'nın kalibrasyon grafiği	50
Şekil 25.	İdrar örneği için ADB-BUTINACA'nın kalibrasyon grafiği	50

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı SK'lerin geliştirildiği yıllara göre sınıflandırılması	5
Tablo 2. DSSE yönteminin çalışma basamakları ve %DSSE-GK sonuçları	42
Tablo 3. Test edilen KFE metotlarının çalışma basamakları ve %KFE-GK sonuçları.....	42
Tablo 4. KFE 3 yöntemi ile elde edilen %E-GK ve %ME değerleri.....	43
Tablo 5. MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için LC-MS/MS'de kullanılan analiz parametreleri	43
Tablo 6. Geliştirilen yöntemlerin S/N, LOD ve LOQ değerleri	51
Tablo 7. MDMB-4en-PINACA için kan ve idrarda yapılan gün içi ve günler arası ölçümlerin kesinlik sonuçları	52
Tablo 8. ADB-BUTINACA için kan ve idrarda yapılan gün içi ve günler arası ölçümlerin kesinlik sonuçları.....	52
Tablo 9. Trabzon Adli Tıp Kurumu'ndan sağlanan kan ve idrar numunelerindeki sonuçlar.....	53
Tablo 10. İdrar ve kandaki ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA'nın belirlenmesine yönelik literatürdeki kromatografik yöntemlerin karşılaştırılması.....	67

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

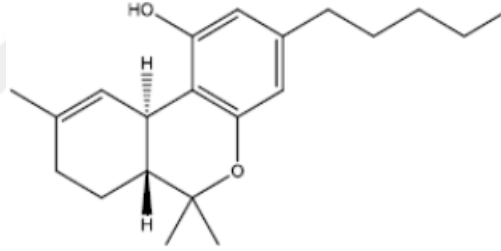
ABD	: Amerika birleşik devletleri
APCI	: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu
AS	: Alıkonma süresi
BSS	: Bağlı standart sapma
CB1	: Kannabinoid 1
CB2	: Kannabinoid 2
CBD	: Kannabidiol
CE	: Parçalanma enerjisi
CP	: Sikloheksilfenol
ÇE	: Çarpışma enerjisi
DC	: Doğru akım
DSSE	: Dispersif sıvı-sıvı ekstraksiyonu
DSSME	: Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu
EMA	: Avrupa ilaç ajansı
EMCDDA	: Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
ES	: Endokannabinoid sistem
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
ESI-LC-MS/MS	: Elektrosprey iyonizasyonlu-sıvı kromatografi spektrometrisi
EWS	: Erken uyarı sistemi
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
GC-MS/MS	: Gaz kromatografisi/tandem kütle spektrometrisi
GK	: Geri kazanım
h/h	: Hacim hacimce
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HU	: Hebrew University
IS	: İç standart
KFE	: Katı Faz Ekstraksiyonu
KFE-GK	: Katı faz ekstraksiyonu yöntemiyle bulunan geri kazanım
LC	: Sıvı kromatografi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometrisi

LC/QTOF-MS	: Sıvı kromatografi/kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
LC/TOF-MS	: Sıvı kromatografi/uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
LOD	: Tespit sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
ME	: Matris etkisi
m/z	: Kütle/yük
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme
MS	: Kütle spektrometrisi
NIDA	: ABD ulusal uyuşturucu bağımlılığı enstitüsü
OASIS HLB	: Hidrofilik lipofilik kartuş
PÇ	: Protein çöktürme
PM	: Psikoaktif madde
Q1	: Öncül iyonun kütle/yük oranı
Q3	: Parçalanmış iyonun kütle/yük oranı
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
SALLE	: Tuzla Ayırma Destekli Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon
SFC-MS/MS	: Süprekritik akışkan kromatografisi/tandem kütle spektrometrisi
SIM	: Selektif iyon izleme
SK	: Sentetik kannabinoid
S/N	: Sinyal/gürültü
SSE	: Sıvı-sıvı ekstraksiyon
STA	: Sistematik toksikolojik analiz
SWGTOX	: Toksikoloji bilimsel çalışma grubu
Δ^9 -THC	: Tetrahidrokannabinol
UPLC-MS/MS	: Ultra performanslı sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometrisi
WHO	: Dünya sağlık örgütü
YPM	: Yeni psikoaktif madde

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Sentetik Kannabinoidler

Kannabis bitkisi, insanlık tarihinin en eski tarım ürünlerinden biri olarak bilinir ve binlerce yıldır hem tıbbi hem de eğlence amaçlı kullanılmaktadır. *Cannabis sativa L.* türü, içeriğinde başta $\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol ($\Delta 9$ -THC) ve kannabidiol (CBD) olmak üzere yüzlerce farklı fitokannabinoid barındırır. $\Delta 9$ -THC'nin kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmiştir. Bu bileşikler, insan vücudundaki endokannabinoid sistemi (ES) üzerinde etkili olarak çeşitli nörolojik, psikolojik ve fizyolojik tepkimelere yol açar (Pertwee, 2008). Özellikle $\Delta 9$ -THC, psikoaktif etkilerden sorumlu temel kannabinoid olup, merkezi sinir sistemindeki CB1 reseptörlerine bağlanarak öfori, kaygı, algı bozukluğu ve motor koordinasyon bozuklukları gibi semptomlara neden olabilir (Huestis ve ark., 2001).

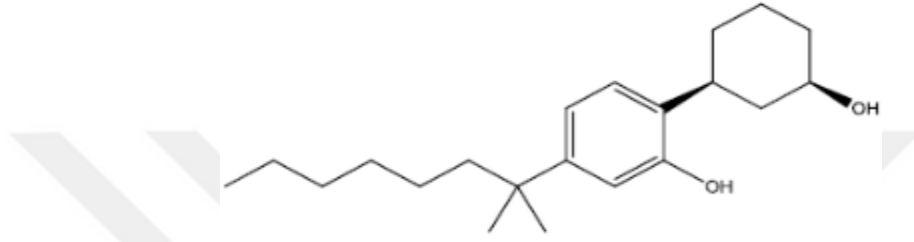


Şekil 1. $\Delta 9$ -THC'nin kimyasal yapısı

Kannabis, vücutta CB1 ve CB2 olarak adlandırılan kannabinoid reseptörleri üzerinde etkili olmaktadır. İnceleme konumuz olan SK türü maddeler ise kimyasal yapıları doğal kannabisten farklı görünse de benzer şekilde CB1 ve CB2 reseptörlerini etkileyen ve “yeni nesil” olarak sınıflandırılan psikoaktif maddeler (PM'ler) arasında yer almaktadır.

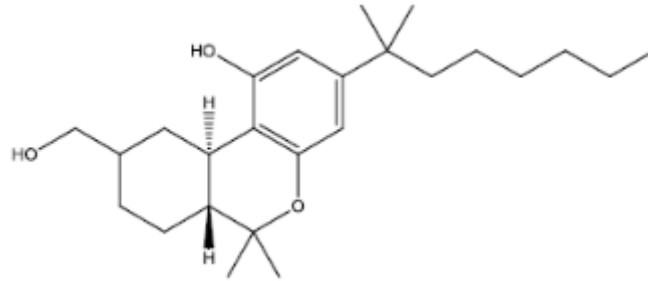
Raphael Mechoulam, 1964 yılında haşhaş bitkisinden $\Delta 9$ -THC'yi izole etmiştir (De Luca ve Fattore, 2018). $\Delta 9$ -THC'nin keşfinin ardından, ilaç endüstrisi psikoaktif ve bağımlılık yapıcı etkileri olmayan ancak kannabinoidlerin biyolojik aktivitesini ve etkilerini sürdürebilen sentetik analoglar geliştirmek amacıyla birçok araştırma başlatmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, fitokannabinoidlerle yapısal olarak benzer bileşiklerin yanı sıra farklı kimyasal yapılara sahip yeni moleküller de sentezlenmiş ve bu bileşikler SK'ler olarak adlandırılmıştır (Mechoulam ve ark., 1995).

1964 yılında Δ^9 -THC'nin kenevirden izole edilmesinin ardından, araştırmacılar ES'yi keşfetmiş ve SK'lerin sentezine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. 1970'lerde, ağrı yönetimi ve diğer tıbbi uygulamalar için yeni tedaviler geliştirmek amacıyla ilk SK'ler üretilmiştir (De Luca & Fattore, 2018; Lafaye et al., 2017; Mechoulam ve ark., 1995). Selektif SK reseptör agonistleri üzerine yapılan ilk çalışmalar 1974 yılında Pfizer firması tarafından sikloheksilfenoller ile başlatılmıştır. Sikloheksilfenollerin açık formülü Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Sikloheksilfenoller (CP 47,497)'in kimyasal yapısı

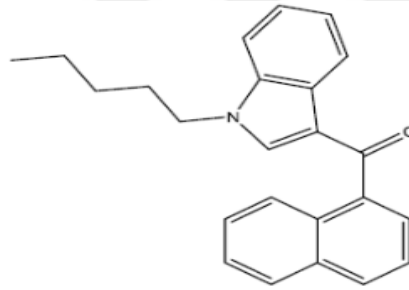
Hebrew Üniversitesi'nde Raphael Mechoulam ve ekibi bu çalışmaları sürdürerek 1988 yılında HU-210 adlı maddeyi sentezlemiştir. Bu maddenin açık formülü Şekil 3'te verilmiştir. HU-210, Δ^9 -THC'ye yapısal olarak benzeyen bir dibenzopirran olup, CB1 ve CB2 reseptörlerine oldukça güçlü bir agonisttir. THC'den 100 ile 800 kat daha etkili olduğu ileri sürülen bu madde ilk kez, 2009 yılında ele geçirilen "Spice Gold" adlı ürün içerisinde tespit edilmiştir (De Luca & Fattore, 2018; Lafaye et al., 2017; Mechoulam ve ark., 1995).



Şekil 3. HU-210'un kimyasal yapısı

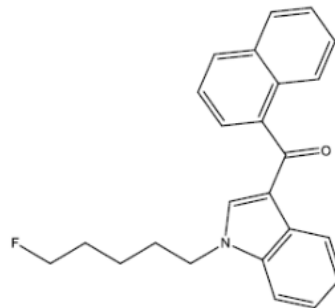
Clemson Üniversitesi'nden Profesör John W. Huffman ve ekibi, Güney Carolina'da yaklaşık 450 farklı SK üretmiştir. Huffman'ın ABD Ulusal Uyuşturucu Bağımlılığı

Enstitüsü (NIDA) tarafından finanse edilen “Drug Abuse” (madde bağımlılığı) çalışmaları, endokannabinoid reseptörlerini hedef alan ilaçların geliştirilmesine odaklanmıştır. 1984 yılından itibaren Huffman ve ekibi, multiple skleroz ve kemoterapi araştırmalarına katkı sağlayacak yeni kannabinoid türleri üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Klasik dibenzopiran yapılarından farklı olmasına rağmen hayvanlarda kannabinoid benzeri etkiler yaratan geniş bir SK serisi sentezlemişlerdir. Huffman tarafından sentezlenen JWH serisi, SK’ler arasında en sık tespit edilen bileşiklerden biridir. 1995’te üretilen JWH-018, kolay sentezlenebilmesi ve güçlü farmakolojik etkileri nedeniyle yaygın olarak kötüye kullanılan ve tercih edilen kannabinoidler arasında yer almıştır (Huffman ve ark., 2005; Wiley ve ark., 2011). JWH-018’in açık kimyasal yapısı Şekil 4’te verilmiştir.



Şekil 4. JWH-018’in kimyasal yapısı

ABD’deki Northeastern Üniversitesi’nde görev yapan kimya profesörü Alexandros Makriyannis ve araştırma ekibi, tıbbi kullanım amacıyla birçok SK bileşiği sentezlemiştir. Bu SK’lerden en bilindik olanı AM-2201’dir (Makriyannis, 2001). Bu bileşiğin açık kimyasal formülü Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 5. AM-2201’in kimyasal yapısı

Son 20 yılda, 450'den fazla SK bileşiği sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin isimlendirilmesi genellikle bunları sentezleyen bilim insanlarının ya da kurumların baş harfleri ile yapılmıştır. Örneğin, Alexandros Makriyannis'in ürettiği AM-2201, John W. Huffman ve ekibinin sentezlediği "JWH" serisi, Hebrew Üniversitesi'nde sentezlenen HU-210 ve Charles Pfizer tarafından geliştirilen sikloheksilfenol türevi CP 47,497 bu duruma örnek olarak verilebilir (Papaseit ve ark., 2018). Zaman içinde, bu yeni bileşiklerin çoğu bilimsel yayınlar ve patentlerle geniş kitlelere tanıtılmıştır. Bu süreçle birlikte, yasa dışı laboratuvarlar da bu bileşikleri keşfederek PM pazarına, özellikle kannabisin yerine kullanılabilecek maddeler olarak sunmuştur. SK'ler, 2000'lerin başlarında PM piyasasında ortaya çıkmış ve 2008'de Almanya ile Avusturya'da "bitkisel ürün" olarak pazarlanan bir üründe JWH-018 bileşiğinin tespit edilmesiyle dikkat çekmiştir (EMCDDA/EUDA 2020). O tarihten bu yana, SK'lerin hızla piyasaya girip çıktığı, sürekli yeni bileşiklerin geliştirildiği ve satışa sunulduğu gözlenmiştir. Bu durum, özellikle bu maddelerle mücadeleyi her geçen gün daha da zor hale getirmiştir. MDMB-4en-PINACA gibi yeni tür SK'lerin kannabis ile karıştırılıp kullanıcıya sunulması, bu bileşiklerin bilinmeden tüketilmesi sonucu oluşabilecek ciddi sağlık risklerine dikkat çekmektedir. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA/EUDA) 2020 yılı itibariyle Avrupa'da 830 yeni PM'yi izlemeye almıştır, bunların 46'sı ilk kez 2020 yılında rapor edilmiştir. 2008'den bu yana ise Avrupa'da toplam 209 yeni SK keşfedilmiş, bunlardan 11'i 2020'de tespit edilmiştir. 2019 yılında Avrupa Birliği Üye Devletleri tarafından bildirilen ele geçirilen yeni psikoaktif maddeler (YPM)'lerin yaklaşık %60'ını SK'ler ve katinonlar oluşturmaktadır (EMCDDA/EUDA,2021). Tablo 1, bazı SK'lerin geliştirildiği yıllara göre sınıflandırılmasını göstermektedir.

Tablo 1. Bazı SK'lerin geliştirildiği yıllara göre sınıflandırılması

Madde adı	Geliştirme yılı	Tespit edilme yılı / ülke	Notlar
CP 47,497	1974	2008/Almanya	Pfizer tarafından
HU-210	1988	2009/ABD	THC'den çok daha güçlü
JWH-018	1995	2008/Avrupa	Bonzai'de yaygın
*JWH-073	1995	2009	JWH-018'in varyantı
*AM-2201	2010	2011	JWH-018'in fluoro türevi, daha güçlü
UR-144	2008	2012/ABD	CB2 affinitesi yüksek
*XLR-11	2009	2012	UR-144'e yapısal olarak benzeri
*5F-PB-22	2012	2013	Şiddetli toksisiteye neden
*5F-AB-PINACA	2012	2013	Yüksek etki, güvenlik riski
MDMB-CHMICA	2014	2014/Avrupa	Çok güçlü ve ölümlerle ilişkili
5F-MDMB-PICA	2015	2016/Avrupa	Avrupa'da sık ele geçirilen maddelerden
MDMB-4en-PINACA	2017	2018/Avrupa	Son derece güçlü, 2020 sonrası analizlerde sık görülme
ADB-BUTINACA	2019	2019/Asya-Avrupa	Yeni nesil maddelerden, yüksek toksisite ve hızlı etki.
*İlk tespit edildikleri ülke hakkında kesin bilgi bulunmamaktadır.			

2024 yılı Avrupa Uyuşturucu Raporu'nda (European Drug Report 2024) EMCDDA/EUDA, SK'ler arasında MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın Avrupa'da önemli bir tehdit oluşturduğunu vurgulamaktadır. Bu maddeler, özellikle Bulgaristan'da, ulusal Erken Uyarı Sistemi (EWS) aracılığıyla tespit edilen YPM'ler arasında öne çıkmaktadır. 2023 yılında Bulgaristan'da MDMB-4en-PINACA'dan 803, ADB-BUTINACA'dan ise 252 vaka bildirilmiştir. Toplamda, bu iki SK, 2023 yılında ulusal EWS tarafından bildirilen 1.356 yeni PM vakasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. EMCDDA/EUDA, MDMB-4en-PINACA'nın güçlü bir CB1 reseptör agonisti olduğunu ve bu nedenle ciddi zehirlenmelere, hatta ölüme yol açabileceğini belirtmektedir. Bu madde, genellikle “yasal alternatifler” olarak sunulmakta ve özellikle gençler arasında popülerlik kazanmaktadır. Ancak, bu maddelerin etkileri konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. ADB-BUTINACA ise, benzer şekilde, güçlü bir CB1 reseptör agonisti olup, kullanımıyla ilişkili olarak çeşitli sağlık riskleri taşımaktadır. Bu madde de genellikle “yasal alternatifler” olarak sunulmakta ve kullanıcılar tarafından bilinçsizce tüketilmektedir. EMCDDA/EUDA, bu maddelerin sağlık üzerindeki etkilerini daha iyi anlayabilmek için daha fazla bilimsel araştırma yapılması gerektiğini önermektedir. Sonuç olarak, EMCDDA/EUDA, MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA gibi SK'lerin Avrupa'da önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturduğunu

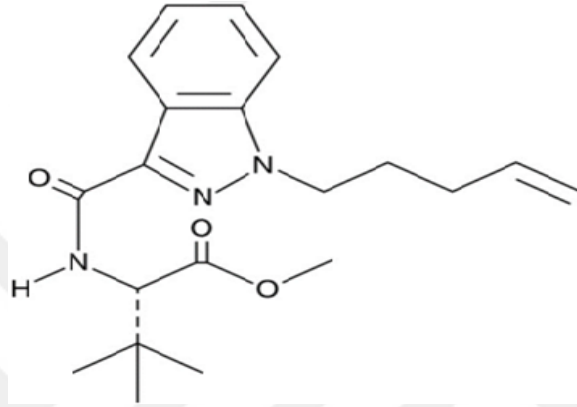
ve bu maddelerin etkileri konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Ayrıca, bu maddelerin kullanımının azaltılması için etkili önleme ve müdahale stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği ifade edilmektedir (EMCDDA/EUDA, 2024).

1.1.1. MDMB-4en-PINACA

Açık kimyasal formülü Şekil 6'da verilen MDMB-4en-PINACA (diğer adıyla MDMB-PENINACA veya MDMB-PINACA N1-pentyl-4en isomer), kimyasal olarak metil 3,3-dimetil-2-(1-(pent-4en-1-il)-1H-indazol-3-karboksamido) butanoat olarak bilinir EMCDDA'nın EWS'si tarafından ilk kez 2018'de rapor edilmiştir (EMCDDA/EUDA, 2020). 5F-MDMB-PINACA ile yapısal bir benzerlik göstermektedir ve insanlarda bulunan kannabinoid tip 1 (hCB1) reseptörlerine bağlanmaktadır. Molekül, kiral bir merkezi yapıya sahiptir. İnsan karaciğer mikrozomları, hepatositler ve idrar numuneleri üzerinde yapılan araştırmalarda en yaygın karşılaşılan metabolit M3 olmuştur. MDMB-4en-PINACA, vücutta büyük oranda metabolize edilir, ancak birçok diğer SK'den farklı olarak, orijinal madde idrar numunelerinde de tespit edilmiştir (WHO, 2020).

Çin'de gerçekleştirilen ve 31 büyük şehirden alınan atık su numunelerinde SK'lerin incelendiği bir araştırmada, 21 şehirde en az bir SK veya metaboliti tespit edilmiştir. Numunelerin %13,4'ünde MDMB-4en-PINACA'nın butanoik asit metaboliti bulunmuş ve bu madde en sık tespit edilen SK olarak öne çıkmıştır (Fan ve ark., 2022). Hapishanelerde YPM'nin saptanması üzerine yapılan literatür taraması, cezaevlerinde en yaygın kullanılan YPM türünün SK olduğunu göstermektedir. PM'lerin cezaevine en yaygın olarak posta yoluyla ulaştırıldığı anlaşılmıştır. Biyolojik olmayan numunelerde en sık tespit edilen SK, 4F-MDMB-BINACA, MDMB-4en-PINACA ve 5F-MDMB-PINACA iken, biyolojik numunelerde en yaygın bildirilen maddeler SP-MDMB-PICA, 4F-MDMB-BINACA ve MDMB-4en-PINACA olmuştur (Vaccaro ve ark., 2022). 2019 yılının nisan ile ağustos ayları arasında yapılan ve 2150 idrar örneğini kapsayan bir araştırmada, SK pozitifliği %22 (n=473) olarak bulunmuştur; MDMB-4en-PINACA'nın kullanım oranı ise %2,6 (n=56) olarak tespit edilmiştir (Öztürk & Yeter, 2020). Türkiye'de 250 narkotik vaka üzerinde yapılan bir araştırmada, gönüllü katılımcıların %18,4'ünde MDMB-4en-PINACA adlı maddenin bulunduğu saptanmıştır (Şaştım, 2021). Bu madde, SK türlerinden biri olup Avrupa'da ilk defa 2017 yılında fark edilmiş ve 2018 yılında EMCDDA'nın EWS'si

aracılığıyla rapor edilmiştir. EMCDDA, 2020 yılında gerçekleştirdiği risk değerlendirmesinde, yüksek risk taşıyan üç maddeye dikkat çekmiştir. Bu maddeler arasında MDMB-4en-PINACA'nın yanı sıra 4F-MDMB-BICA ve izotonitazen de yer almıştır. MDMB-4en-PINACA, tehlikeli ve hızla yayılan sentetik maddelerden biri olarak kabul edilmektedir ve uluslararası PM izleme sistemleri tarafından yakından takip edilmektedir (EMCDDA/EUDA, 2021).



Şekil 6. MDMB-4en-PINACA'nın kimyasal yapısı

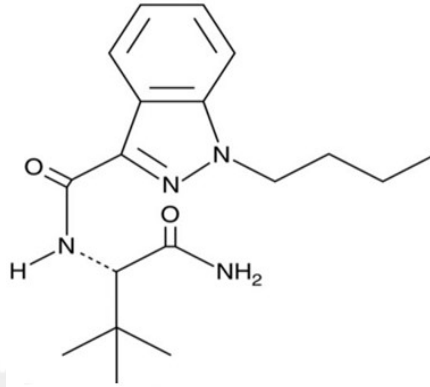
1.1.2. ADB-BUTINACA (BINACA)

Açık kimyasal yapısı Şekil 7'de gösterilen ADB-BUTINACA, kimyasal olarak N-(1-amino-3,3-dimetil-1-oksobutan-2-il)-1-butil-1H-indazol-3-karboksamid olarak bilinen bir SK'dir. 2019'da Avrupa'da tanımlanmış ve 2020'nin başlarında Singapur'da tespit edilmiştir. Bu maddenin analizinde, kan, idrar ve karaciğer numunelerinde ana bileşiğin yanı sıra dihidrodiol ve monohidroksile metabolitlerin hedef alınması önerilmektedir. ADB-BINACA'nın, JWH-018'den yaklaşık üç kat daha güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kavanagh ve ark., 2022; Qian ve ark., 2016). Ki Hon Sia ve ekibi, ADB-BUTINACA'nın biyotransformasyonu sonucunda 15 farklı metabolit tanımlamıştır. Bu madde, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP3A enzimleri tarafından hızlıca metabolize edilmektedir ve M6, M11, M14 ve M15 biyobelirteç olarak kullanılabilir (Sia ve ark., 2021).

ABD'deki verilere göre, ADB-BINACA 2020'nin sonunda SK'ler arasında hızla popüler hale gelmiş ve 2021 boyunca en sık tespit edilen ilk dört madde arasında yer

almıştır. 2022'nin ilk çeyreğinde ise üçüncü sıraya yükselmiştir (Aegis Sciences Corporation, 2023).

Türkiye'deki 2021 YPM olaylarında ise en çok karşılaşılan maddelerin SK'ler olduğu, özellikle MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın öne çıktığı görülmüştür (TUBİM, 2022).



Şekil 7. ADB-BUTINACA'nın kimyasal yapısı

1.2. Adli Toksikoloji

Adli toksikoloji, toksikoloji biliminin ilkelerini hukuki süreçlere uygulayan bir disiplindir. Bu alan, zehirlenme, ilaç kötüye kullanımı, madde bağımlılığı, trafik kazaları ve şüpheli ölümler gibi durumlarda, biyolojik numunelerdeki toksik maddelerin tespiti ve değerlendirilmesiyle ilgilenir. Adli toksikologlar, analitik kimya, farmakoloji ve patoloji gibi bilim dallarından yararlanarak, elde edilen verileri yasal ve tıbbi bağlamda yorumlarlar. Bu sayede, adli olayların aydınlatılmasına ve adaletin sağlanmasına katkıda bulunurlar (Açıkkol, 2023).

Paracelsus, “Her madde zehir olabilir, zehir olmayan madde yoktur. Bir maddenin zehir mi ilaç mı olduğunu belirleyen onun dozudur.” diyerek dozun önemine dikkat çekmiş ve toksikolojinin altını çizmiştir. Analitik kimya, biyolojik sistemlerdeki maddelerin varlığını ve miktarlarını tespit etmek için kullanılan teknikler ve yöntemler sunarken, bu veriler toksikoloji ve adli toksikolojiye önemli katkılar sağlar. Böylelikle, organizmaya giren maddelerin canlı üzerindeki olumsuz etkileri araştırılabilir ve anlaşılabilir hale gelir (Dokgöz, 2019).

1.2.1. Adli Toksikolojide SK'lerin Tespitine Yönelik Analitik Yöntemler

Adli toksikoloji kapsamına giren birçok farklı analit bulunmaktadır. Her geçen gün bu alanda ilgiyi üzerine çeken yeni maddeler piyasaya çıkmakta ve madde kullanım alışkanlıkları değişkenlik göstermektedir. Bu yüzden adli toksikoloji laboratuvarlarının, sık karşılaşılan kimyasal ve maddeleri tespit etmenin yanı sıra, nadiren rastlanan maddeleri de belirlemek için planlama yapmaları gerekmektedir (Lappas & Lappas, 2021).

Sistematik toksikolojik analiz (STA), modern adli toksikoloji laboratuvarlarında uygulanan bir yöntemdir. STA, toksikolojik olarak önemli maddelerin numunelenmesi, izolasyonu, ayırt edilmesi, tespiti ve tanımlanmasını içeren, numunelerin sistematik ve kapsamlı biçimde analiz edilmesine olanak tanıyan bir süreçtir (Rygaard ve ark., 2023).

SK'ler, kimyasal yapılarındaki çeşitlilik ve sürekli değişim nedeniyle adli toksikoloji alanında önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu maddelerin tespiti, özellikle düşük konsantrasyonlarda ve kompleks biyolojik matrislerde, hassas ve özgül analiz yöntemlerini gerektirir. Bu bağlamda, adli toksikoloji laboratuvarlarında kullanılan başlıca analiz yöntemleri arasında gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yer almaktadır (Namera ve ark., 2015; Waters ve ark., 2016).

GC-MS, özellikle uçucu ve termal olarak kararlı bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, birçok SK termal olarak kararsız olduğundan, GC-MS analizleri sırasında termal bozunmaya uğrayabilirler. Bu durum, analiz sonuçlarının güvenilirliğini azaltabilir. Bu nedenle, LC-MS/MS gibi alternatif yöntemler, SK'lerin tespiti için daha uygun olabilir (Namera ve ark., 2015).

LC-MS/MS, yüksek duyarlılık ve seçicilik özellikleri sayesinde, SK'lerin hem nitel hem de nicel analizinde tercih edilen bir yöntemdir. Bu teknik, düşük tespit limitleri ve geniş analit kapsamı ile, çeşitli biyolojik örneklerde SK'lerin tespitini mümkün kılar. Ayrıca, LC-MS/MS, SK'lerin metabolitlerinin analizinde de etkili bir araçtır (Namera ve ark., 2015).

Adli toksikoloji laboratuvarlarında, analizlerin güvenilirliğini artırmak amacıyla, tarama ve doğrulama testlerinin kombinasyonu sıklıkla kullanılmaktadır. İlk aşamada, geniş kapsamlı tarama testleri ile olası SK'ler belirlenir. Ardından, LC-MS/MS gibi yüksek özgüllüğe sahip yöntemlerle doğrulama testleri gerçekleştirilir. Bu yaklaşım, yanlış pozitif ve negatif sonuçların azaltılmasına yardımcı olur (Waters ve ark., 2016).

Sonuç olarak, SK'lerin adli toksikolojideki analizinde, sürekli gelişen kimyasal yapıları ve düşük konsantrasyonları nedeniyle, yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip analiz yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. LC-MS/MS, bu gereksinimleri karşılayan ve SK'lerin tespiti için en uygun yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır (Namera ve ark., 2015).

1.2.2. Adli Toksikolojide SK'lerin Tespiti İçin Kullanılan Biyolojik Matrisler

Adli toksikoloji alanında SK'lerin tespiti için çeşitli biyolojik örnekler kullanılmaktadır. Bu örnekler, maddenin vücuda alım zamanını, kullanım sıklığını ve dozajını belirlemede önemli bilgiler sunar. En yaygın kullanılan biyolojik örnekler arasında kan, idrar, tükürük, saç ve ter yer almaktadır (Djilali ve ark., 2022).

Kan, SK'lerin tespiti için en yaygın kullanılan örneklerden biridir. Kan örnekleri, maddenin vücuda alımından kısa bir süre sonra alınır, SK'lerin ana bileşiklerinin ve bazı metabolitlerinin tespitine olanak tanır. Ancak, SK'lerin hızlı metabolizması nedeniyle, kan örneklerinde tespit süresi genellikle sınırlıdır (Krotulski ve ark., 2020).

İdrar, SK metabolitlerinin tespiti için tercih edilen bir örnek türüdür. SK'ler vücutta hızla metabolize edildiğinden, ana bileşikler yerine metabolitlerin tespiti daha yaygındır. İdrar örnekleri, maddenin kullanımını takiben daha uzun bir tespit imkanı sunar, bu da özellikle rutin tarama testleri için avantajlıdır (Krotulski ve ark., 2020).

Tükürük, SK'lerin kısa süreli tespiti için kullanılan bir diğer biyolojik örnektir. Tükürük örnekleri, maddenin alımından kısa bir süre sonra alınır, ana bileşiklerin tespiti mümkündür. Ancak, tükürükteki SK konsantrasyonları genellikle düşüktür ve tespiti son derece sınırlıdır (Djilali ve ark., 2022).

Saç, SK'lerin uzun süreli kullanımını belirlemede kullanılan bir örnek türüdür. Saç örnekleri, maddenin kronik kullanımını ve kullanım desenlerini değerlendirmede faydalıdır. Ancak, saç örneklerinin dış kontaminasyona açık olması ve analizinin karmaşıklığı, bu yöntemin sınırlamalarındandır (Krotulski ve ark., 2020).

Ter, SK'lerin tespiti için alternatif bir biyolojik örnek olarak kullanılmaktadır. Ter örnekleri, özellikle sürekli izleme gereken durumlarda, maddenin vücuda alımını belirlemede yardımcı olabilir. Ancak, ter örneklerinin toplanması ve analiz edilmesi, diğer biyolojik örneklerle göre daha zordur (Djilali ve ark., 2022).

1.2.3. SK Tayini için Adli Toksikolojide Numune Alma, Taşıma ve Saklama Şartları

SK'lerin adli toksikolojik analizlerinde güvenilir ve geçerli sonuçlar elde edilebilmesi için numune alma, taşıma ve saklama süreçlerinin her aşaması titizlikle yürütülmelidir. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları genellikle kararsız olup, çevresel faktörlere karşı duyarlıdır. Bu nedenle, örnekleme sürecinde analit stabilitesini korumak amacıyla uygun önlemler alınmalıdır (Djilali ve ark., 2022).

Numune alma işlemi, olay yeri veya otopsi sırasında mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirilmelidir. SK'ler, lipofilik yapıları nedeniyle biyolojik örneklerde hızlı bir şekilde dağılır ve metabolize olurlar. Bu durum, özellikle kan ve plazma örneklerinde analitlerin tespiti için zamanın kritik olduğunu göstermektedir (Fort ve ark., 2017).

Numunelerin taşınması sırasında, sıcaklık, ışık ve nem gibi dış etkenlerden korunması gerekmektedir. Özellikle oda sıcaklığında veya yüksek ısıda taşınan numunelerde bazı SK'lerin degradasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, örneklerin +4 °C'de soğuk zincirde taşınması önerilmektedir (Djilali ve ark., 2022).

Numune saklama koşulları da adli analizler açısından büyük önem taşır. Yapılan çalışmalar, SK'lerin -20 °C veya -80 °C gibi düşük sıcaklıklarda uzun süre stabil kalabildiğini göstermektedir. Özellikle -20 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bu sürecin hızlandığı belirlenmiştir. Bu bağlamda, uzun süreli saklama gereken durumlarda -80 °C önerilmektedir (Fort ve ark., 2017). Ayrıca, numunelerin saklandığı kapların materyali de analit stabilitesini etkileyebilir. Plastik kaplarda, SK'lerin yüzeylere adsorpsiyonu nedeniyle analit kaybı yaşanabilir. Bu nedenle, cam kapların tercih edilmesi önerilmektedir (Djilali ve ark., 2022).

Sonuç olarak, sentetik kannabinoidlerin adli toksikolojik analizlerinde analit stabilitesini etkileyen başlıca faktörler; numune alma zamanı, taşıma sürecinde uygun sıcaklık sağlanması, saklama koşullarının uygunluğu ve kullanılan kap materyalidir. Bu aşamalarda yapılan hatalar, yanlış negatif sonuçlara neden olabileceği gibi, analitin tespiti açısından da analitik güvenilirliği riske atmaktadır (Fort ve ark., 2017).

1.2.4. Adli Toksikolojide SK Tespiti İçin Kullanılan Tarama Yöntemleri

SK'ler, kimyasal olarak sürekli değişen yapıları ve farmakolojik etkileri nedeniyle adli toksikolojide tanımlanması en güç yeni psikoaktif maddelerden biridir. Bu maddelerin tanımlanmasında kullanılan analiz teknikleri, çoğu zaman klasik uyuşturucu tarama yöntemlerinin ötesine geçmeyi gerektirir. Tarama (screening) işlemleri, pozitif sonuçların daha ileri analizlerle doğrulanmasını amaçlayan ilk adımdır (Namera ve ark., 2015).

İmmünolojik testler, hızlı sonuç vermeleri ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle adli toksikolojide tarama testi olarak sıkça kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin çoğu, yalnızca belirli metabolitlere veya sınırlı sayıda SK yapısına duyarlıdır. Bu da testin yalancı negatif sonuç verme riskini artırır. Ayrıca, yapısal olarak benzer olmayan yeni türevlerin çoğu mevcut kitler tarafından tanınmaz (Franz ve ark., 2016).

GC-MS, uçucu ve ısıya dayanıklı bileşiklerin analizinde yüksek çözünürlük ve ayırma gücüne sahiptir. Ancak birçok SK türevi termal olarak kararsız ve polar yapıda olduğu için ön türevlendirme (derivatizasyon) işlemi gerektirir. Bu da yöntemin uygulama süresini uzatır ve kompleks örneklerde bazı SK'lerin kaçırılmasına neden olabilir (UNODC, 2020).

LC-MS/MS, SK analizinde en çok tercih edilen tekniklerden biridir. Hem orijinal bileşiklerin hem de faz I ve faz II metabolitlerinin yüksek duyarlılıkla tespitini mümkün kılar. LC-MS/MS yöntemleri, numune matrisine bağlı olarak kan, idrar, tükürük ve saç örneklerinde uygulanabilir. Gelişmiş MRM geçişleri ve hedefe yönelik kütüphanelerle SK'lerin geniş bir paneli analiz edilebilmektedir (Franz ve ark., 2016).

Yeni nesil tarama yöntemleri arasında yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HR-MS), doğrudan analiz sistemleri (örneğin DART-MS) ve veri-bağımsız tarama (DIA) gibi teknikler öne çıkmaktadır. Bu yöntemler, hedef dışı analiz (non-targeted screening) özelliğiyle bilinmeyen SK türevlerinin bile tespitine olanak tanımaktadır. Ancak bu sistemlerin maliyeti yüksek ve veri analiz süreçleri karmaşıktır (Namera ve ark., 2015).

1.2.5. Adli Toksikolojide SK Tespiti için Uygulanan Doğrulama Yöntemleri

İkili doğrulama, adli toksikoloji analizlerinde büyük önem taşır. Bilimsel kuruluşlar, ilaçlar veya toksinlerin tespiti ve tanımlanması sürecinde tek bir yöntemle çalışmanın yeterli olmayacağını, farklı kimyasal prensipler temelinde çalışan ikinci bir teknikle

doğrulama yapılmasının gerektiğini vurgulamaktadır (Scientific Working Group for Forensic Toxicology SWGTOX, 2013). Tarama testleriyle saptanan maddelerin, doğrulama yöntemleri kullanılarak onaylanması büyük önem taşır. Bu nedenle, tarama testleriyle elde edilen pozitif sonuçların mutlaka ikinci bir doğrulama yöntemi ile tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir (Lappas & Lappas, 2021). Günümüz adli toksikoloji laboratuvarlarının çoğu, bu ilkeler doğrultusunda farklı kimyasal prensiplere dayanan teknikler kullanmaktadır. Analiz sonuçlarının hukuki ve cezai sorumluluklarla ilişkili olması, yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçları minimuma indirme gerekliliğini doğurmakta ve bu da oldukça kritik bir konudur.

Analitik toksikolojide en yaygın kullanılan doğrulama yöntemi olarak GC-MS kabul edilmekle birlikte, son yıllarda LC-MS/MS'te bu yöntemler arasında giderek popüler hale gelmiştir. LC-MS'in, polar, uçucu olmayan, ısıdan kararsız ve yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler tespit etme konusunda GC/MS'e göre daha avantajlı olduğu bilinmektedir. LC-MS, tek bir numunede yüzlerce bileşiği düşük saptama limitleriyle tespit edebilme kapasitesine sahiptir ve bu yönüyle birçok yönetime kıyasla daha düşük saptama limitlerine ulaşmaktadır. Bu avantajların, LC-MS'in doğrulayıcı yöntemler arasında daha fazla tercih edilmesini sağladığı düşünülmektedir. Ancak, LC-MS'in daha maliyetli olması ve matris etkileri gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (D'Ovidio ve ark., 2023).

1.2.6. Adli Toksikolojide SK Analizlerinde Karşılaşılan Zorluklar

Toksikolojik analizlerin doğru, güvenilir ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi birçok faktöre bağlıdır. Analiz süreci; numune alma, hazırlık, ekstraksiyon, cihaz seçimi ve sonuçların yorumlanması gibi aşamaları içerir. Her bir aşama, analiz edilen maddenin türüne, matris yapısına (kan, idrar, tükürük, doku vb.) ve maddenin konsantrasyon düzeyine bağlı olarak çeşitli zorluklar içerebilir (Levine, 2020).

SK'ler gibi YPM'ler, adli toksikolojideki en büyük zorluklardan birini oluşturmaktadır. Bu maddeler, sürekli değişen kimyasal yapıları ve yüksek potansiyelleri nedeniyle hem tanımlama hem de analiz açısından önemli sorunlar doğurur. Üreticiler, mevcut yasal boşlukları kullanarak moleküler yapıyı küçük değişikliklerle modifiye etmekte ve böylece yeni türevler ortaya çıkarmaktadır. Bu durum, analiz için gerekli olan referans standartlarının bulunmasını zorlaştırmakta ve laboratuvarların analiz yöntemlerini sürekli olarak güncellemesini gerektirmektedir (Ferrari Júnior ve ark., 2022).

Adli analizlerde kullanılan biyolojik numunelerin çeşitliliği de ayrı bir zorluk teşkil eder. Kan, idrar, saç, tükürük ve iç organ dokuları gibi numuneler; her biri farklı yapısal ve biyokimyasal özelliklere sahip olduğundan farklı numune hazırlama teknikleri gerektirir. Özellikle SK'lerin kan ve idrardaki konsantrasyonları genellikle çok düşüktür. Bu da ekstraksiyon ve ön hazırlık aşamasında yüksek duyarlılığa sahip tekniklerin kullanılmasını zorunlu kılar. KFE gibi yöntemler, bu maddelerin kompleks biyolojik matrislerden izole edilmesini sağlasa da yöntemin seçimi ve validasyonu, örneğin içeriğine göre değişkenlik gösterir (Badawy ve ark., 2022).

Yüksek analitik seçicilik ve duyarlılık gerektiren sentetik kannabinoidlerin analizlerinde, kullanılan cihaz teknolojisi belirleyici bir rol oynamaktadır. Özellikle immünolojik analiz yöntemleri tabanlı tarama testleri, yalnızca önceden tanımlanmış yapıları algılayabildiği için yeni nesil sentetik bileşikler saptamakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, GC-MS ve LC-MS/MS gibi ileri analiz yöntemleri tercih edilmektedir. Ancak bu teknikler, yüksek donanım maliyeti, uzmanlık gereksinimi ve metod geliştirme sürecinin zaman alıcılığı gibi sınırlamalar taşımaktadır. Her bir yeni analit için uygun iyon geçişleri, parçalanma profili ve alıkonma süresi (AS) gibi parametrelerin titizlikle optimize edilmesi gereklidir (Ahmed ve ark., 2024). Bununla birlikte, YPM'lerin metabolizmasının büyük ölçüde bilinmemesi de analiz sürecini zorlaştırmaktadır. Pek çok sentetik madde, vücuda alındıktan sonra hızlı bir şekilde metabolitlerine dönüşür ve orijinal bileşik nadiren tespit edilebilir hale gelir. Bu durumda, metabolitlerin karakterizasyonu ve analitik yönteme dahil edilmesi gerekir. Ancak metabolit profili bilinmeyen veya sınırlı bilgiye sahip bir bileşik söz konusu olduğunda, doğru teşhis koymak ve farmakolojik etkinliği yorumlamak neredeyse imkânsız hale gelir. Bu durum, adli raporların güvenilirliğini doğrudan etkileyebilir (Diao & Huestis, 2019). Diğer bir önemli zorluk ise analiz sonuçlarının adli açıdan yorumlanmasıdır. Tespit edilen madde ya da metabolitin bireyin davranışları üzerindeki etkisi, dozaj, kullanım zamanı ve bireyin farmakogenetik yapısı gibi birçok değişkene bağlıdır. Örneğin, kanında MDMB-4en-PINACA tespit edilen bir bireyin bu maddeyi 15 dakika önce mi yoksa 5 saat önce mi kullandığını belirlemek zordur. Aynı şekilde, belirlenen konsantrasyon düzeyi her bireyde aynı toksik etkiyi oluşturmayabilir. Bu durum hem adli bilirkişiler hem de savcılar için sonuçların yorumlanmasında belirsizlik yaratmaktadır (Diao & Huestis, 2019).

Adli toksikolojide ayrıca numunelerin kontaminasyonu, yanlış pozitif/negatif sonuçlar, matris etkisi (ME) ve kararlılık sorunları gibi teknik problemler de analizlerin

doğruluğunu etkileyebilir. Örneğin, idrar numunelerinin uzun süre uygun olmayan sıcaklıkta saklanması hem madde miktarının azalmasına hem de analiz sonuçlarının güvenilir hale gelmesine neden olabilir. Bu nedenle hem numune alımında hem de analiz sürecinde kalite kontrol ve güvence sistemlerinin uygulanması kritik öneme sahiptir (GTFCh. 2009).

Sonuç olarak, adli toksikoloji alanında SK'lerin ve diğer YPM'lerin analizinde karşılaşılan zorluklar çok boyutludur. Kimyasal yapılarının değişkenliği, metabolizma bilgisinin eksikliği, biyolojik matrislerin karmaşıklığı ve analitik cihazların sınırlamaları, bu maddelerin etkin şekilde analiz edilmesini ve doğru şekilde yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle adli toksikoloji laboratuvarlarının multidisipliner iş birliği içinde çalışması, analiz yöntemlerini sürekli güncellemesi ve yeni teknolojilere yatırım yapması gerekmektedir (EMCDDA/EUDA, 2023).

1.3. KFE ve LC-MS/MS Yönteminin Önemi

Adli toksikoloji analizlerinde doğruluk ve güvenilirlik büyük ölçüde numune hazırlama sürecinin etkinliğine bağlıdır. Bu süreçte en yaygın ve etkili tekniklerden biri olan KFE biyolojik numunelerdeki hedef analitlerin matris bileşenlerinden ayrılmasını ve konsantre edilmesini sağlar. KFE yöntemi, sıvı-sıvı ekstraksiyona (SSE) kıyasla daha az çözücü kullanımı, daha yüksek seçicilik ve otomasyona uygunluk gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca, analit kaybını minimuma indirerek özellikle düşük konsantrasyondaki bileşiklerin tayininde kritik rol oynar (Mahdavijalal ve ark., 2024).

KFE yöntemi, kan, idrar ve tükürük gibi biyolojik numunelerde yer alan proteinler, lipidler ve tuzlar gibi interferanları uzaklaştırmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu temizleme işlemi, özellikle SK'ler gibi düşük konsantrasyonlarda bulunan, lipofilik ve termal olarak stabil olmayan bileşiklerin doğru şekilde analiz edilmesi açısından hayati öneme sahiptir. KFE kartuşları, genellikle ters faz (C18), iyon değiştirici veya polimer bazlı yapılarla hazırlanmakta ve hedef maddeye özgü seçicilik sağlamaktadır. KFE uygulamasında, adsorpsiyon, yıkama ve elüsyon gibi basamaklar dikkatle optimize edilmelidir. Çünkü ekstraksiyon verimliliği bu parametrelere doğrudan bağlıdır (Javadi, G. 2022).

Analitik cihaz olarak LC-MS/MS, modern adli toksikolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir. LC-MS/MS, özellikle SK'ler gibi hedef analitlerin düşük düzeyde,

kompleks biyolojik numunelerde ve hızlı şekilde tayininde en güvenilir yöntemlerden biridir. LC bileşeni, analitlerin fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılmasını sağlarken; tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ise moleküler iyonları parçalayarak spesifik parçalanma ürünlerini ortaya koyar. Bu sayede hem kalitatif hem de kantitatif analiz mümkün olur (D'Ovidio ve ark., 2023).

LC-MS/MS'in en önemli avantajlarından biri, yüksek seçicilik ve duyarlılıkla birlikte çok sayıda bileşiği aynı anda analiz edebilmesidir. Özellikle çoklu reaksiyon izleme (MRM - Multiple Reaction Monitoring) modu ile analit ve iç standart (IS) arasında izlenen iyon geçişleri sayesinde yanlış pozitif sonuçların önüne geçilir. Ayrıca, bu yöntem, geniş bir doğrusal aralıkta analiz yapabilme kapasitesi ile hem akut hem de kronik madde kullanımının değerlendirilmesinde kullanılabilir. KFE ile birleştirildiğinde, numuneden kaynaklı matris etkileri büyük oranda azaltılır ve elde edilen veriler daha güvenilir hale gelir (Souza & Queiroz, 2021).

KFE ve LC-MS/MS'in birlikte kullanımı, SK'lerin tespiti açısından çok önemli avantajlar sunmaktadır. KFE'nin uygulandığı ön hazırlık süreciyle matrisin etkileri azaltılırken, LC-MS/MS ise bu maddelerin kısa sürede yüksek doğrulukla tespit edilmesini sağlar. Özellikle MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA gibi bileşiklerin termal bozunmaya karşı hassas olmaları nedeniyle gaz kromatografisine uygun olmamaları, bu maddelerin analizinde LC-MS/MS yönteminin tercih edilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda metabolit analizine de olanak tanıyarak, sadece ana bileşiğin değil, biyotransformasyon ürünlerinin de tespitini mümkün kılabilir (Wang ve ark., 2022).

Günümüzde bu tekniklerin kullanımı, sadece adli toksikoloji ile sınırlı kalmamakta, aynı zamanda sporcu biyolojik pasaportları, işyeri madde taramaları ve klinik toksikoloji gibi alanlarda da yaygınlaşmaktadır. Bununla birlikte, LC-MS/MS sistemlerinin yüksek maliyeti, cihaz kalibrasyonu ve operatör eğitimi gibi teknik gereksinimleri, her laboratuvarın bu sistemi kullanabilmesini sınırlandıran faktörlerdendir. Ayrıca, her yeni madde için özgün analiz metodu ve validasyon süreci gereklidir; bu da zaman ve kaynak gerektiren bir süreçtir (Vaiano ve ark., 2021).

Sonuç olarak, KFE ve LC-MS/MS kombinasyonu, modern adli toksikolojide numune hazırlama ve analiz açısından en etkili yöntemlerden biridir. SK'ler gibi hızla değişen, düşük konsantrasyonda bulunan ve yüksek toksik potansiyele sahip bileşiklerin analizinde bu yöntemlerin önemi tartışılmazdır. Doğru numune hazırlığı ve cihaz parametrelerinin

titizlikle optimize edilmesi, hem yasal süreçlerde delil değerin artmasını hem de halk sağlığının korunmasını sağlar (EMCDDA/EUDA, 2023).

1.3.1. LC-MS/MS Yöntemi

Kütle spektrometrisi (MS), molekülleri ayırt etmede oldukça hassas ve seçici bir yöntemdir. Ancak, bu teknik sadece kütle/yük (m/z) oranına göre maddeleri tespit eder ve birçok maddenin aynı m/z değerine sahip olma olasılığı nedeniyle, karışık matrislerdeki analitlerin MS'e gönderilmeden önce seçici bir şekilde ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu sorunu aşmak için LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. LC-MS, iki seçici tekniği birleştirir: İlk aşamada LC, analiz edilecek numunedeki maddeleri fizikokimyasal özelliklerine göre yüksek bir seçicilikle matristen ayırır. Ardından, bu maddeler MS sistemine yönlendirilir. Burada, moleküller kuadrupol alanlarındaki elektrostatik kuvvetler tarafından m/z değerlerine göre ayrılır ve iyonların enerjisi dedektör tarafından elektriksel enerjiye dönüştürülerek tespit edilir (Bhole, Jagtap, Chadar, & Zambare, 2020).

LC-MS cihazında sadece bir analizör vardır ve LC kısmından gelen iyonları doğrudan ölçer. LC-MS/MS cihazında ise iki analizör vardır. Bunlardan birincisi LC kısmında ayrılan iyonları belirler, ikincisi ise bu iyonların parçalanmasından sonra oluşan fragmentleri hassas bir şekilde belirler. LC-MS cihazı genellikle tarayıcı (scan) mod veya selektif iyon izleme (SIM) gibi modlarla çalışırken LC-MS/MS cihazı genellikle MRM gibi çok hassas ve seçici modlarda çalışır. Bu nedenle günümüzde LC-MS/MS yöntemi, hızlı analiz süresi, yüksek hassasiyet ve seçicilik özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen bir teknik haline gelmiştir.

LC-MS/MS sisteminin ana bileşenleri:

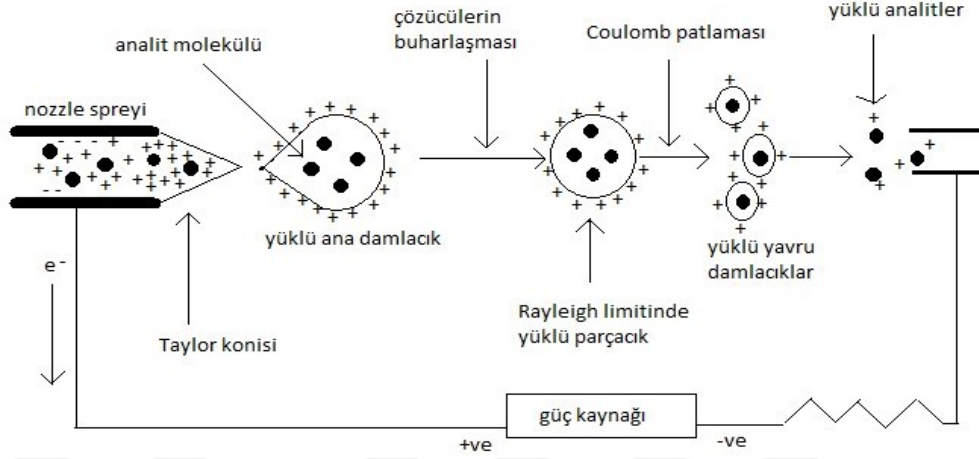
1. HPLC/UPLC pompa sistemi,
2. Analitik kolon,
3. İyon kaynağı,
4. MS vakum sistemi,
5. Lensler,
6. Analizör,
7. Dedektör,
8. Yazılım'dan oluşmaktadır.

LC cihazı dendiğinde ilk akla gelen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazıdır. HPLC bir karışım içindeki bileşenleri ayırmak için sıvı mobil faz kullanan bir enstrümantal analiz yöntemidir. Analitlerin ayrılması, metotta belirtilen uygun mobil faz bileşimi ve basıncıyla sağlanır. Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) sistemi ise sabit mobil faz akışını sistemde düzenli şekilde sağlar. Numune, enjektör aracılığıyla sisteme dahil edildikten sonra, mobil faz içinde çözünür. Ayrım işlemi analitik kolon içerisinde gerçekleşir. Bu kolonlar, maddelerin türüne bağlı olarak seçilen farklı polaritelere ve farklı boyutlara sahip mikropartiküllerle dolu metalik silindirik çubuklardır. Numuneler, fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak kolonun dolgu maddeleriyle etkileşime girer. Bu etkileşim ne kadar kuvvetliyse, madde kolonda o kadar uzun süre tutulur. Daha az etkileşime sahip maddeler ise yüksek basınçlı mobil fazın yardımıyla kolondan daha hızlı çıkar ve böylece HPLC sistemleri maddeleri fizikokimyasal özelliklerine göre ayırır. LC-MS/MS sistemlerinde, maddeler kolondaki durgun fazda tutulma özelliklerine göre kolondan farklı sürelerde çıkarak iyonizasyonun gerçekleşeceği iyon kaynağına yönlendirilir.

Maddelerin elektrostatik alanda hareket edebilmesi için gaz fazında ve yüklü olmaları gerekir. LC'den çıkan ve çözücüde çözünmüş olan katı fazdaki maddeler, MS sistemine ulaşmadan önce buharlaştırılır. Sonrasında maddeler, iyon kaynağına gider ve burada gaz fazına dönüştürülen maddeler kimyasal yapılarına bağlı olarak pozitif (+) ya da negatif (-) yüklü iyonlara dönüşür. İyon kaynağı, analiz edilen numune bileşenlerinin buharlaşarak iyon formuna geçmesini sağlar. En yaygın kullanılan iyon kaynakları arasında elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) bulunmaktadır. APCI, düşük polariteli ve sıcaklığa dayanıklı maddelerin tespitinde tercih edilir.

ESI, atmosferik basınç altında çalışır. Kolondan farklı AS'lerine göre çıkan maddeler, paslanmaz çelikten yapılmış kapiler bir iğne aracılığıyla ESI kaynağına girer (Şekil 8). Bu iğne ile etrafındaki elektrot arasında 3-5 kV'lık bir yüksek potansiyel farkı yaratılır. Bu fark sonucunda sıvı haldeki madde, yüksek voltajlı iğneden geçerken yüklenmiş analitleri içeren spreyci damlacıkları oluşturur. Elektrotun iki yanındaki ısıtıcılar ve azot gazı, çözücülerin buharlaşmasını sağlar. Çözücüler buharlaştıkça damlacıklar küçülür ve yüzey gerilimi yükü taşıyamayacak noktaya, yani "rayleigh limiti"ne ulaşır. Bu noktada damlacıklar parçalanır ve "coulomb patlaması" meydana gelir. Bu süreç,

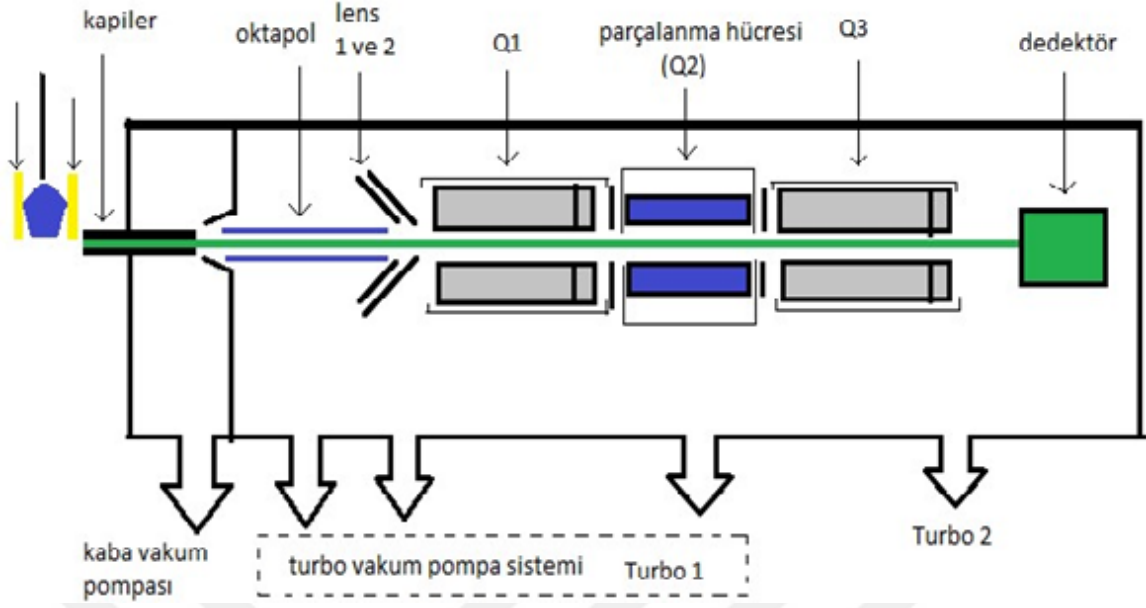
damlacıklar küçülüp tamamen buharlaşarak sadece yüklü analit kalana kadar devam eder (Şekil 8).



Şekil 8. ESI iyon kaynağında iyonların oluşturulması ve kapilere girişi (Banerjee & Mazumdar, 2012).

Kapilerden çıkan iyonlar hala bir miktar çözücü taşır. Bu nedenle yüksek sıcaklık ve azot gazıyla kalan çözücü uzaklaştırılır (desolvasyon) ve bazı özel yapılarla iyonlar yönlendirilir. Nötr parçacıklar ve fazla gazlar dışarı atılır. Sonrasında iyon odaklama sistemleri (lensler) ile yüklü iyonlar hizalanarak düzgün bir demet oluşturması sağlanır. Bu odaklama sistemleri sayesinde iyonlar analizöre zarar vermeden doğru şekilde analizöre iletilir. Analizörde iyonlar kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır.

İyon kaynağında çözücüsünden ayrılan analit iyonları elektrostatik bir alan tarafından MS'e doğru çekilir. İyonlar kapilerden sonra iyonları vakumlu MS bölgesine alan geçiş noktasından girdikten sonra, radyo frekansı uygulanarak odaklanmanın sağlandığı iyon yolu boyunca ilerleyip Q1 bölgesine ulaşırlar. Q1'de seçilen ana iyonlar, fragmentasyon amacıyla parçalanma hücresi olan Q2'ye yönlendirilir. Q2'de belirli bir parçalanma enerjisi ve azot veya argon gibi inert bir gaz kullanılarak iyonlar parçalanır ve bu parçalanmış iyonlar, yavru iyonların filtrelendiği Q3 bölgesine gönderilir (Şekil 9).



Şekil 9. LC-MS/MS sisteminde kuadropollerin dizilimi (Agilent Technologies, 2013).

Kuadropoller, dört adet silindirik metal çubuktan meydana gelir ve bu çubuklar karşılıklı olarak elektriksel bağlantı halindedir. Bir çift çubuğa pozitif DC voltajı uygulanırken, diğer çifte negatif DC voltajı verilir. Aynı anda tüm çubuklara sürekli olarak değişen radyo frekanslı bir alternatif akım potansiyeli uygulanmaktadır. Kuadropol içerisine giren iyonlar ile bu metal çubuklar arasında oluşan elektriksel etkileşim sonucunda, iyonlar kendilerine en yakın olan zıt yüklü çubuğa doğru yönelir. Radyo frekans (RF) voltajı, çubuk çiftlerinin polaritesini değiştirerek, karşılıklı çubukların aynı polaritede kalmasını sağlar. Böylece iyon her seferinde en yakınındaki zıt yüklü çubuğa çekilir ve potansiyel fark nedeniyle iyonlar, kuadropoller arasında spiral bir hareketle ilerler. Sadece belirli bir m/z oranına sahip iyonlar, RF/DC voltajında kararlı bir şekilde ilerleyebilir.

Ayrıştırılan moleküller, iyonların enerjisini elektrik sinyallerine dönüştüren dedektöre doğru hareket ederler. LC-MS/MS sistemlerinde genellikle elektron çoğaltıcı dedektörler (elektromultiplier) kullanılır. Son olarak, dedektörden gelen analog sinyallerin dijital sinyallere çevrilmesiyle yazılım aracılığıyla veriler elde edilir.

1.3.2. Adli Toksikolojide SK Analizi İçin Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri

Adli toksikolojik analizlerde, sentetik kannabinoidlerin güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde tespiti, öncelikle uygun örnek hazırlama tekniklerinin uygulanmasına bağlıdır. Bu maddeler biyolojik örneklerde genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için, hedef bileşiklerin karmaşık matrislerden ayrıştırılmasını sağlayacak etkili bir ekstraksiyon

yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Ekstraksiyon süreci yalnızca analitin izolasyonunu değil; aynı zamanda matris etkisinin azaltılmasını, analit stabilitesinin korunmasını ve LC-MS/MS gibi ileri analiz teknikleriyle uyumlu, temiz ve yoğunlaştırılmış ekstraktların elde edilmesini de amaçlar (Aldlgan & Torrance, 2016).

En sık kullanılan ekstraksiyon teknikleri arasında SSE, KF, protein çöktürme (PÇ) ve dispersif sıvı sıvı mikro ekstraksiyon (DSSME) gibi yöntemler yer alır. SSE, apolar çözücüler (örneğin kloroform, etilasetat) ile SK'lerin ayrılmasını sağlar ancak organik çözücü kullanımı, çözücü buharlaştırma adımı ve düşük seçicilik gibi sınırlılıkları vardır. KFE özellikle polimerik fazlara (örneğin Oasis HLB) sahip kartuşlarla uygulanarak yüksek geri kazanım ve düşük matris etkisi sağlar. KFE yöntemleri, kan ve idrar gibi kompleks matrislerde tercih edilen birincil hazırlama yöntemlerindendir (Namera ve ark., 2015).

Düşük hacimli örneklerle çalışılan durumlarda ise DSSME, yüksek ön zenginleştirme faktörü ve hızlı uygulama avantajı sunar. Bu yöntem, özellikle idrar numunelerinde uygulanmakta olup, çevresel sürdürülebilirliği ile de dikkat çekmektedir. Ayrıca bazı laboratuvarlarda uygulanan PÇ, basitliği nedeniyle tercih edilse de, analiz öncesi yeterli temizlik sağlamadığı için doğrulama analizlerinde genellikle tercih edilmez (Giorgetti ve ark., 2020).

Sonuç olarak, ekstraksiyon yöntemi seçimi; analizin amacı, hedeflenen SK türü, biyolojik matriksin özellikleri ve kullanılacak cihaz altyapısı göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Yüksek duyarlılık, analit stabilitesi ve temiz ekstrakt gereksinimi göz önünde bulundurulduğunda KFE, adli toksikolojik uygulamalarda en çok tercih edilen yöntem olmayı sürdürmektedir.

1.3.2. KFE Yöntemi

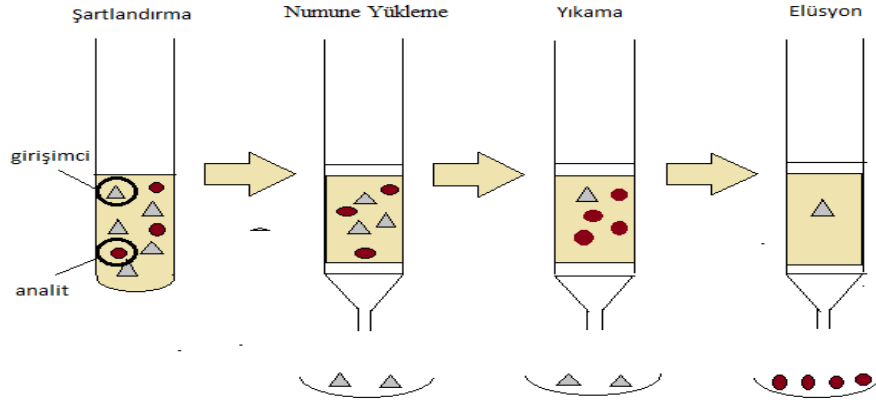
Önderiştirme, analizi güç olan düşük konsantrasyonlardaki analitlerin belirlenmesini mümkün kılmak amacıyla, bu bileşiklerin uygun bir ortama aktarılması ve bu yeni ortamda daha güvenilir şekilde analiz edilmesini sağlayan kritik bir süreçtir. Bu işlem sayesinde, eser miktardaki maddelerin konsantrasyonu artırılarak kullanılan analitik yöntemin duyarlılığı yükseltilir ve tespit sınırları düşürülür. Aynı zamanda, analitler analiz için daha uygun bir ortama taşınarak mevcut matrisin yaratabileceği girişimlerin önüne geçilir. Bu sayede, daha temiz bir arka plan elde edilir ve sinyal/gürültü (S/N) oranı iyileştirilir. Ayrıca, analitlerin bilinen ve standartlaştırılmış bir matrise aktarılması, kalibrasyon eğrisinin örneğe daha doğru biçimde uygulanmasını sağlayarak kantitatif analizlerde doğruluğu artırır. Tüm bu nedenlerle önderiştirme, özellikle eser düzeyde analiz gerektiren

bileşiklerin yüksek doğrulukla tayininde vazgeçilmez bir ön hazırlık basamağı olarak kabul edilir.

KFE, hedef analitlerin karmaşık matrislerden etkili bir şekilde çıkarılması için kullanılan bir numune temizleme ve önderiştirme yöntemidir (Büyüktiryaki, Keçili, & Hussain, 2020). KFE analitik kimyada numune hazırlama sürecinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, analitlerin kompleks matrislerden ayrılması ve konsantre edilmesi işlemlerinde yüksek etkinlik sunar. KFE'nin temel avantajları arasında, SSE yöntemine kıyasla daha az organik çözücü kullanımı, işlem süresinin kısalığı ve otomasyona uygunluğu yer almaktadır. Ayrıca, KFE yöntemi, numune matrisinden kaynaklanan girişimleri azaltarak analizlerin doğruluğunu artırır ve daha düşük tespit limitlerine ulaşılmasını sağlar. Bu özellikleri sayesinde, KFE çevresel analizlerden biyolojik numunelerin incelenmesine kadar geniş bir uygulama yelpazesinde tercih edilmektedir (Buszewski & Szultka, 2012).

KFE yönteminin temel adımları, kolonun şartlandırılması, numune yükleme, yıkama ve elüsyon işlemleridir. Bu aşamalar, ekstraksiyonun katı fazda (kartuş, fiber veya karıştırma çubuğu gibi) gerçekleştiği süreçleri içermektedir (Wu ve ark., 2021). KFE'nin temel prensibi, analitlerin sulu fazdan katı fazın aktif yüzeylerine transferidir (Das ve ark., 2012). KFE tekniklerinde, ağır metal iyonlarının ekstraksiyonunda adsorban seçimi büyük bir öneme sahiptir (Khan ve ark., 2020). KFE yöntemiyle gerçekleştirilen çalışmalar, yüksek adsorpsiyon kapasitesine, iyi yenilenebilirliğe ve erişilebilir yüzey alanına sahip yeni adsorbanların geliştirilmesine odaklanmaktadır. Uygun bir adsorban seçimi, analitik yöntemlerin performansını doğrudan etkilemektedir. Etkili bir adsorban, hedef metal iyonlarıyla etkileşimde bulunan uygun aktif gruplara sahip, kararlı ve çözünmeyen gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır (Giakisikli & Anthemidis, 2013).

KFE, analitik kimya ve toksikoloji alanlarında, biyolojik numunelerden hedef analitlerin etkin bir şekilde izole edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu süreç, genellikle dört ana adımdan oluşur: şartlandırma, yükleme, yıkama ve geri alma. Şartlandırma, analit iyonlarının katı fazla etkileşimde bulunmadan önce, uygun bir çözeltiliyle katı fazın hazırlanması işlemidir. Yükleme adımında, analit içeren çözeltinin katı fazdan belirli bir hızla geçirilmesi sağlanır. Yıkama aşamasında, matris bileşenleri katı fazdan temizlenir ve son olarak geri alma, analit iyonlarının uygun bir çözelti ile geri kazanılmasını sağlar (Khan ve ark., 2020). Şekil 10 KFE işlemindeki basamakların sırası şematik olarak göstermektedir.



Şekil 10. KFE işlemindeki basamakların sırası

1.4. Adli Toksikolojide Kan ve İdrar Numuneleri

Adli bilimlerde canlı vakalarda en yaygın kullanılan biyolojik numuneler kan ve idrar matrisleridir. Bununla birlikte, oral sıvı, saç, yenidoğanlar için göbek bağı, plasenta, mekonyum ve tırnak gibi diğer biyolojik numunelerin incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Postmortem adli toksikolojide alternatif matrisler, özellikle kan, idrar veya saç gibi sık kullanılan matrislerin bulunmadığı (örneğin, yanma olaylarında) veya kontamine olduğu (örneğin, kanla kirlenmiş saç) durumlarda daha fazla önem kazanmaktadır. Mide içeriği, kas dokusu, vitröz sıvı, karaciğer, safra veya beyin dokusu gibi farklı numuneler de analizlerde kullanılabilir (Henkel K ve ark., 2020).

İdrar biyolojik numune olarak kolay alınması, yapısının kan gibi karmaşık olmaması, maddenin metabolitlerinin uzun süre saptanmasına fırsat veren geniş bir saptanabilirlik süresine sahip olması gibi avantajları nedeniyle adli toksikolojide tercih edilen bir biyolojik materyaldir. İdrar örneğinin alınması aşamasının hileli girişimlere açık olması önemli bir kısıtlılık oluşturmaktadır. Numune alımı yakın gözetim altında kurallara uyularak yapılmalıdır. Numune alınması emniyet ve gözetim zincirine uyularak yapılsa dahi, olgularda kişinin değişik yollarla aldığı farklı maddelerle idrar kimyasında değişiklikler oluşturarak yapılan hileli girişimlerin saptanmasına yeterli olmamaktadır (Yılmaz, H. 2023).

İdrar numunelerinde birden fazla benzer madde kullanan bağımlılarda, kullanılan maddelerin türlerini tespit etmek zor olabilmektedir. Bu gibi durumlarda, hedef madde ve metabolitler için yüksek seçicilik sunan LC-MS/MS yöntemi tercih edilir. Ancak, idrarın en önemli avantajı, maddelerin vücuttan atılma yolu olması nedeniyle, özellikle PM'lerin

metabolitleri açısından geniş bir analit çeşitliliğine ve daha yüksek analit konsantrasyonuna sahip olmasıdır (Yılmaz, H. 2023).

Kandaki toksikolojik analizlerin, idrar numunelerine kıyasla en büyük avantajı, kişinin madde etkisi altında olup olmadığını gösterebilmesidir. Madde konsantrasyonu ile maruz kalma düzeyi arasında bir doğrusal ilişki bulunduğundan, zehirlenme vakalarında sıklıkla tercih edilir. Bu sayede maddenin dozu ve yarılanma süresi hakkında yaklaşık bilgi elde edilebilir. Doz ile etki arasında bir bağlantı olduğu için, dozun belirlenmesi etkisinin şiddetinin de anlaşılmasını sağlar. Ancak, PM'ler hızlı bir şekilde metabolitlerine dönüşüp vücuttan atıldığından, kandaki tespit süresi oldukça kısadır. Bu nedenle kan analizlerinde, şüphelenilen maddenin metabolitlerinden ziyade ana bileşiğin incelenmesine odaklanılır. Kan numunelerinin bazı olumsuz yönleri de vardır. Bunlar arasında kan alımının girişimsel bir işlem olması ve bunun sonucunda enfeksiyon veya kanama gibi komplikasyonların ortaya çıkma riski bulunmaktadır. Ayrıca, kan almak özel bir eğitim gerektirir ve sınırlı miktarda elde edilebilen bir biyolojik materyaldir (Campos ve ark., 2021).

1.5. Analitik Kimyada Metot Validasyonu

Analitik yöntemlerle yapılan ölçümler, çeşitli dış etkenlerden etkilenebilmektedir. Bu etkenler arasında kullanılan cihaz, standart çözeltiler ve kimyasal maddeler, laboratuvar ortamı ve analizi yürüten analist yer almaktadır. Bu nedenle, ileride rutin analizlerde kullanılabilecek güvenilir bir yöntemin oluşturulabilmesi için, söz konusu faktörlerin analiz sonuçları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, geliştirilen analitik yöntemin geçerliliğinin sağlanması, yani validasyonu zorunludur. Validasyon çalışmaları, yeni bir analitik yöntem geliştirildiğinde ya da mevcut, validasyonu yapılmış bir yöntemde değişiklikler yapıldığında mutlaka gerçekleştirilmelidir (SWGTOX 2013). Bu değişiklikler, analitik sistemin yapısında, laboratuvar koşullarında veya kullanılan cihaz ve sarf malzemelerinde olabilir. Validasyonu tamamlanmış bir analitik yöntemin uygulama prosedüründe yapılacak herhangi bir farklılık, yeni bir validasyon çalışmasını gerektirir.

SWGTOX 2013 kılavuzuna göre, validasyon süreci aşağıda sıralanan belirli basamaklar çerçevesinde yürütülmelidir.

- Seçicilik / Spesifiklik
- Doğrusallık / Ölçüm aralığı

- Tespit sınırı (LOD)
- Tayin sınırı (LOQ)
- Doğruluk
- Kesinlik
- Kararlılık

1.6. Literatürdeki MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA Tayin Yöntemleri

SK'lerin, özellikle adli toksikoloji alanında güvenilir şekilde tayin edilmesi için çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilerek valide edilmiştir. Güncel SK'lerden olmaları sebebiyle MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın belirlenmesine yönelik literatürde yer alan çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte rapor edilen yöntemlerin çoğunluğu LC-MS/MS sistemleriyle yapılan ölçümlere dayanmaktadır. Bu sistemler; yüksek analitik seçicilik, duyarlılık ve geniş doğrusal aralıkları sayesinde SK analizlerinde tercih edilmektedir.

Arianna Giorgetti ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, içlerinde MDMB-4en-PINACA'nın da bulunduğu 132 SK dahil olmak üzere toplam 182 YPM'nin tam kan numunelerinde tespitine yönelik hızlı ve hedefli bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Numune hazırlığı aşamasında asetonitrille protein çöktürme yöntemi uygulanmış; mobil faz olarak %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril tercih edilmiştir. Kolon tipi ve AS belirtilmemekle birlikte, yöntem kapsamında SK'ler için doğrusal aralık 0.25–10 ng/mL olarak elde edilmiştir. Bu yöntem, özellikle adli toksikoloji uygulamaları için yüksek hassasiyet ve pratiklik sunmaktadır (Giorgetti ve ark., 2022).

Simon ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, MDMB-4en-PINACA'nın kan ve idrar numunelerdeki tayini için tuzla desteklenen sıvı-sıvı ekstraksiyon (SALLE) yöntemi uygulanmış ve SFC-MS/MS ile analiz gerçekleştirilmiştir. Analitik ayırma aşamasında Waters ACQUITY Torus DIOL kolon tercih edilmiştir. Mobil faz olarak karbon dioksit ile amonyum hidroksit ve formik asit/metanol karışımı kullanılmış ve analizde MDMB-4en-PINACA için AS yalnızca 1,03 dakika gibi oldukça kısa bir süre olarak raporlanmıştır. Yöntemin tespit limiti 0,09 ng/mL olarak belirlenmiş, doğrusal aralık ise 0,15–50,00 ng/mL arasında elde edilmiştir. Bu sonuçlar, SALLE tekniğiyle hazırlanan numunelerin hızlı, seçici ve duyarlı analizine olanak tanıdığını

göstermektedir (Simon ve ark., 2023). Ancak SALLE tekniği manuel işlem adımları gerektirdiğinden, otomasyona uygun değildir ve bu durum, SFC-MS/MS analizlerinin hızlı ve yüksek verimli olma avantajıyla çelişerek önerilen yöntemi ön temizleme açısından dezavantajlı kılmaktadır.

Du ve arkadaşları, çalışmalarında ADB-BUTINACA'nın sıçan plazmasında tayini için hızlı ve hassas bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Numune hazırlamada SSE uygulanmış, IS olarak midazolam kullanılmıştır. Ayırma işlemleri BEH C18 kolonu ile gerçekleştirilmiş, pozitif ESI modunda MRM geçişleri optimize edilmiştir. Yöntemin doğrusal aralığı 1–1000 ng/mL, LOQ değeri ise 1 ng/mL olarak saptanmıştır. Analiz kılavuzlarına uygun olarak yapılan validasyon çalışmaları, yöntemin yüksek seçicilik ve doğruluk sunduğunu göstermiştir. Yöntem, ADB-BUTINACA'nın intravenöz uygulanmasından sonra sıçan plazmasındaki farmakokinetik izlenmesi için başarıyla uygulanmıştır (Du ve ark. 2024).

Wang ve arkadaşları (2022) tarafından yürütülen bir çalışmada, insan saç numunelerinde MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın kantitatif analizi için GC-MS/MS tekniği kullanılmıştır. Numune hazırlama sürecinde saç numuneleri metanol ile ekstrakte edilmiş, ardından türevleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemleri Agilent DB-5MS kolonu (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) kullanılarak sağlanmış ve SIM modunda analiz gerçekleştirilmiştir. MDMB-4en-PINACA için gözlenen AS 10,3 dakika olup, yöntemin tespit limiti 0,5 pg/mg, doğrusal aralığı ise 1–500 pg/mg olarak belirlenmiştir. Çalışmada geliştirilen yöntem, adli toksikoloji uygulamaları açısından saç numunelerinde güvenilir sonuçlar sunabileceğini ortaya koymuştur (Wang ve ark. 2022).

Kavanagh ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, ADB-BUTINACA'nın insan idrarı, kanı, böbrek ve karaciğer numunelerinde metabolitlerinin tespiti amacıyla yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi-zaman uçuşlu kütle spektrometrisi (LC-TOF-MS) yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada, ADB-BUTINACA'nın mono- ve dihidroksilasyon, N-butil yan zincirinin hidroksilasyonu ve dehidrojenasyon gibi çeşitli metabolik dönüşümlerle oluşan metabolitleri tanımlanmıştır. Özellikle dihidrodiol metaboliti, diğer metabolitlere kıyasla yaklaşık on kat daha yüksek kromatografik pik alanına sahip olarak baskın metabolit olarak belirlenmiştir. Numuneler analiz öncesi uygun şekilde hazırlanmış; idrar numunelerinde asidik ekstraksiyon ve enzimatik dekonjugasyon sonrası SSE, kan numunelerinde sodyum bikarbonat ilavesi sonrası sıralı çözücü ekstraksiyon, doku numunelerinde ise tripsin ile enzimatik parçalama ve ardından

çöktürme uygulanmıştır. Bu bulgular, ADB-BUTINACA'nın biyolojik numunelerdeki tespiti ve metabolik profilinin anlaşılması açısından önemli katkılar sağlamaktadır (Kavanagh ve ark. 2022).

Gu ve arkadaşları (2022), MDMB-4en-PINACA'nın insan idrarı ve serum numunelerindeki metabolik profillerini incelemek ve tarama stratejileri geliştirmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada, MDMB-4en-PINACA'nın metabolizmasında 11 farklı metabolik süreç tanımlanmış olup, bunlar arasında asetilasyon gibi SK reseptör agonistleri için yeni sayılabilecek bir metabolik süreç de bulunmaktadır. Bu bulgu, MDMB-4en-PINACA'nın biyotransformasyonunun daha önce bilinmeyen yönlerini ortaya koymaktadır. Analitik yöntem olarak LC-MS/MS kullanılmıştır. Numune hazırlama sürecinde, idrar ve serum numuneleri enzimatik hidroliz işlemine tabi tutulmuş ve ardından SSE uygulanmıştır. Kromatografik ayırma, Waters ACQUITY UPLC HSS T3 kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve mobil faz olarak %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril karışımı tercih edilmiştir. Analiz, pozitif elektrospray iyonizasyon modunda ve MRM geçişleri optimize edilerek yapılmıştır (Gu ve ark. 2022).

Bu tez kapsamında geliştirilen yöntemde ise kan ve idrar numuneleri, KFE yöntemi ile ön temizleme işlemine tabi tutulmuş ve LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Yöntem pozitif ESI modunda çalıştırılmış, mobil faz olarak amonyum asetat, formik asit ve metanol içeren sistem kullanılmıştır. Raptor Biphenyl (2,1 × 100 mm, 2,7 µm) kolonu ile yapılan analizlerde, MDMB-4en-PINACA için AS 7,8 dakika, ADB-BUTINACA için ise 5,8 dakika olarak belirlenmiştir. Tespit limitleri kan için sırasıyla 0,60 ng/mL (MDMB-4en-PINACA) ve 0,63 ng/mL (ADB-BUTINACA); idrar için ise 1,29 ng/mL ve 1,33 ng/mL olarak bulunmuştur. Doğrusal aralık her iki analit için de 1–50 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Literatürde raporlanan ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması, analitik performans açısından farklı avantaj ve sınırlamaların bulunduğunu ortaya koymaktadır. Protein çöktürme gibi basit ön hazırlık teknikleri hızlı ve pratik olsalar da matris kaynaklı iyonizasyon etkilerine açık olmaları nedeniyle ölçüm sonuçlarının doğruluğu ve tekrarlanabilirliği üzerinde olumsuz etkileri olabilir. Buna karşılık, KFE gibi daha gelişmiş yöntemler, kompleks biyolojik matrislerden daha seçici ve temiz ekstraksiyon sağlayarak analiz doğruluğunu artırmaktadır. Bu bağlamda, çalışmada önerilen KFE'ye dayanan yöntem yüksek GK oranı ve tekrarlanabilirlik düzeyleri ile adli toksikoloji uygulamaları için daha güvenilir ve tercih edilebilir bir alternatif sunmaktadır.

1.7. Araştırmanın Amacı ve Önemi

SK'ler, psikoaktif etkileri nedeniyle hızla yayılan ve adli toksikoloji alanında tanınan zorluklara yol açan yeni psikoaktif maddelerdir. Bu tezde analiz edilen MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA, son yıllarda hem uluslararası hem de ulusal vakalarda en sık karşılaşılan iki SK bileşiğidir. Her iki madde de CB1 reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanan güçlü agonistlerdir ve bu nedenle ciddi düzeyde merkezi sinir sistemi etkileri doğururlar (WHO, 2020; Kronstrand ve ark., 2021).

Literatürde, MDMB-4en-PINACA'nın yapısında yer alan ester grubunun hızlı şekilde hidrolize uğrayarak aktif metabolitlere dönüştüğü bildirilmiştir. Bu durum, yalnızca ana bileşiğin değil, metabolitlerin de analiz kapsamında değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır (WHO, 2020). ADB-BUTINACA ise lipofilik yapısı sayesinde biyolojik numunelerde daha uzun süre kalabilmesine rağmen, klasik immünolojik yöntemlerle tespiti oldukça güçtür. Bu nedenle, her iki maddenin güvenilir bir şekilde tespitinde yüksek seçicilik ve duyarlılık sunan yöntemlere ihtiyaç vardır (Kronstrand et al., 2021).

SK'lerin analizi yalnızca bireysel kullanıcıların tespiti açısından değil; trafik kazaları, ani ölümler, cezaevi kontrolleri ve suç bağlantılı olayların aydınlatılması açısından da kritik öneme sahiptir. Bu maddeler hızlı etkili ve kısa yarı ömürlü olduklarından, uygulanan analiz yönteminin hem hızlı hem de son derece hassas olması zorunludur. Düşük doz maruziyetin dahi ölümcül olabilmesi, adli toksikoloji laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin tanınan doğruluk açısından en üst seviyede olmasını gerektirmektedir (Kronstrand ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasının temel amacı, yeni nesil SK'lerden MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın insan kan ve idrar numunelerinde, KFE temelli ve yüksek performanslı bir LC-MS/MS yöntemi ile güvenilir, hassas ve tekrarlanabilir şekilde tespit edilmesini sağlayan bir analiz yönteminin geliştirilmesidir. Geliştirilen yöntem, SWGTOX 2013 yönergelerine uygun şekilde valide edilmiştir.

Mevcut literatürde yer alan birçok yöntem ya yalnızca metabolit tespitine odaklanmakta ya da yüksek maliyet ve sınırlı cihaz erişimi nedeniyle pratik kullanıma uygun değildir. Bu çalışma, düşük LOD/LOQ, yüksek geri kazanım (%GK) ve düşük matris etkisi (%ME) değerleriyle öne çıkarak özellikle düşük doz kullanımına bağlı vakalarda tanınan doğruluğu artırmayı hedeflemektedir.

Geliştirilen yöntem, adli vakalardan elde edilen gerçek numuneler üzerinde başarıyla test edilmiş ve pratik saha uygulamaları için uygunluğu gösterilmiştir. Bu yönüyle, acil servisler ve adli toksikoloji laboratuvarlarında hızlı tanı ve etkili müdahale süreçlerinin oluşturulmasına katkı sağlaması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu tez çalışması, literatürde eksikliği hissedilen MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın kan ve idrarda hızlı, özgül ve güvenilir şekilde analizine yönelik bir açığı kapatmayı hedeflemektedir. Yerel vaka analizlerinden elde edilen sonuçların hem ulusal halk sağlığı politikalarına yön vermesi hem de uluslararası veri tabanlarına katkı sunması bakımından stratejik önemi vardır.

Bu çalışmada, rutin olarak analiz edilen kan ve idrar numunelerinde yalnızca kalitatif analizle yetinilmemiş, aynı zamanda kantitatif analiz de gerçekleştirilmiştir. Kalitatif analiz, hedef bileşiklerin varlığını ortaya koyarken; kantitatif analiz, bu bileşiklerin numunedeki gerçek konsantrasyonlarını belirlemeye olanak tanımaktadır. Özellikle adli toksikoloji uygulamalarında, yalnızca maddenin tespiti değil, aynı zamanda ne düzeyde bulunduğu da olayın yorumlanmasında kritik öneme sahiptir. Çünkü bir maddenin toksik, terapötik ya da ölümcül düzeyde olup olmadığı ancak kantitatif verilerle ortaya konabilir. Bu nedenle, çalışmada kantitatif analizlerin de yer alması, elde edilen bulguların hem bilimsel geçerliliğini artırmakta hem de adli süreçlerde daha sağlıklı değerlendirme yapılmasına katkı sunmaktadır.

Geliştirilen bu yöntem, ilerleyen dönemlerde daha geniş bir analit yelpazesi ile entegre edilerek çok bileşenli tarama panellerine dönüştürülebilir. Bu durum, PM'lerle mücadele kapsamında bilimsel tabanlı bir ulusal altyapının oluşturulmasına katkı sağlayabilir. Bu yönüyle tez, yalnızca laboratuvar düzeyinde değil, aynı zamanda adli süreçler ve halk sağlığı için de önemli bir referans noktası olmayı hedeflemektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

LC-MSMS Sistemi: Shimadzu LC-MS/MS-8050

Analitik Kolon: Raptor Biphenyl (2,1 × 100 mm, 2,7 µm)

Cihaz Yazılımı: Lab Solutions

Azot Jeneratörü: Peak-Scientific

Vorteks: Biosan MSW-3500

Hassas Terazı: Shinko Denshi Vibra

Otomatik Mikro Pipetler: Eppendorf

Santrifüj: NF 1200R

Ultrasonik Banyo: Bandelin Sonorex

Buzdolabı: KW Apparechci

Dondurucu sistem: Liebherr ZLN 180

KFE Cihaz Manifoldu: Biotage Pressure⁺ 48

KFE Kartuşu: OASIS HLB

Deney Tüpleri: Plastik ve cam tüpler

Vialler: Lab Maker 1,5 mL

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözücüler

Ultra Saf Su: Merck

Asetonitril: Merck

Metanol: Merck

Formik Asit: Sigma Aldrich

Etil Asetat: Merck

Amonyum Asetat: Merck

MDMB-4en-PINACA standartı: Cayman

ADB-BUTINACA standartı: Cayman

Diazepam-d5 (IS): Chiron AS

2.3. IS Çözeltilerinin Hazırlanması

Analitik yöntemin doğruluk ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla Diazepam-d5 IS olarak kullanılmıştır. IS çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Stok IS Çözeltisi (10 µg/mL): 250 µg Diazepam-d5, 25 mL metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Ara Stok IS Çözeltisi (500 ng/mL): 10 µg/mL stok çözeltiden 1 mL alınarak metanol ile 20 mL'ye tamamlanmış ve bu şekilde ara stok çözelti elde edilmiştir.

2.4. Analit Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Analizi yapılacak hedef bileşikler olan MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA maddelere ait önce stok ve ara stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için aşağıda açıklanan işlemler gerçekleştirilmiştir.

- Ana Stok Çözeltisi (100 µg/mL): Her bir bileşikten 1 mg tartılmış ve metanol ile 10 mL hacme tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Ara Stok Çözeltisi (1 µg/mL): Ana stok çözeltiden 1 mL alınarak metanol ile 100 mL'ye seyreltilmiştir.
- 1 ng/mL çözeltisi: 100 ng/mL çözeltiden 0,1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Tüm çözeltiler analizden hemen önce taze olarak hazırlanmış ve +4 °C ile -20 °C arasında uygun sıcaklıklarda saklanmıştır.

2.5. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Boş numunelere 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 35 ng/mL ve 50 ng/mL olacak şekilde eklenerek elde edilen numunelere KFE 3 yöntemi uygulandı. Elde edilen ekstraktlar kalibrasyon çözeltileri olarak kullanıldı.

2.6. Analit Eklenmiş Kan ve İdrar Numunelerin Hazırlanması

Analitik yöntemin doğruluğunu test etmek amacıyla ekleme-geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar için, geliştirilen yöntemle analiz edilmek üzere kan ve idrar numunelerine belirli miktarlarda analit eklenmiştir. Bunun için, analitlerin stok çözeltilerinden uygun miktarlarda alınarak, analit içermediği bilinen (boş) kan ve idrar numunelerine eklenmiştir. Eklenen analitlerin konsantrasyonları sırasıyla 1, 5, 10, 20, 25, 35 ve 50 ng/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde, analiz yapılacak numuneler hazırlanmıştır.

2.7. KFE İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

KFE işlemlerinde, analitlerin etkili şekilde izole edilmesini sağlamak amacıyla farklı özellikte çözeltiler kullanılmıştır. Bu çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- %5 (h/h) metanol çözeltisi
- %2 Asetik asit içeren metanol çözeltisi
- %2 Amonyak içeren metanol çözeltisi

Hazırlanan çözeltiler, kromatografik saflıktaki çözücüler kullanılarak hazırlanmış ve analiz süreci boyunca oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.8. Mobil Fazların Hazırlanması

Kromatografik ayırmada kullanılan mobil fazları hazırlamak için önce 1 M amonyum asetat çözeltisi, ondan da mobil faz A çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Mobil faz B ise sadece metanoldür.

- 1 M amonyum asetat çözeltisi: 7,71 gram amonyum asetat, saf su içerisinde çözülerek 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Mobil Faz A: 5 mL 1 M amonyum asetat çözeltisi, 2,5 mL formik asit ve 125 mL metanol ile karıştırılarak son hacim saf suyla 2500 mL'ye tamamlanmıştır.
- Mobil Faz B: Yüksek saflık derecesine sahip metanol kullanılmıştır (HPLC grade).

Tüm mobil faz çözeltileri analiz öncesinde ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiş, böylece içerdikleri hava kabarcıkları giderilmiş ve homojen karışım elde edilmiştir.

2.9. Kan ve İdrar Numunelerinin Temini

Çalışmada kullanılan kan ve idrar numuneleri hedef maddeleri kullanmadığı bilinen 20 farklı gönüllüden alınmıştır ve analizlerde kullanılmadıkları zamanlarda +4°C’de muhafaza altında tutulmuştur. Gerçek numunelerin analizi çalışmaları için kullanılan kan ve idrar örnekleri ise Trabzon Adli Tıp Kurumu’ndan 20 adet olarak temin edilmiştir.

2.10. Kan ve İdrar Matrislerinde Analiz Öncesi Hazırlık ve Ayırma Teknikleri

Bu çalışmada, LC-MS/MS analizinden öncesinde kan ve idrar numunelerinden MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın numune matrisinden izole edilip numunelerin temizlenmesinin sağlanması için önce basit ve hızlı olması sebebiyle DSSE test edilmiştir. Bu amaçla, biyolojik numunelerin hazırlanmasında sırasıyla deproteinizasyon, sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ve analiz öncesi yeniden çözme adımları uygulanmıştır. İlk olarak, 500 µL kan örneği, eşit hacimde metanol ile karıştırılarak proteinlerden arındırılmış ve bu karışım 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen 500 µL’lik süpernatant, 1 mL saf su, 0,2 g NaCl ve 100 µL doymuş karbonat tamponu içeren 15 mL’lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için, ekstrakt/dispersif çözücü sistemi olarak 100 µL kloroform ve 250 µL metanol hızla eklenmiş; çözelti bulutlu bir emülsiyon halini almıştır. Bu karışım, bir dakika boyunca yavaşça çalkalanmış ve ardından 4.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek organik faz ayrılmıştır. Elde edilen organik faz, uygun bir vial içine alınarak kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve ardından mobil faz A ile yeniden çözülerek LC-MS/MS sistemi ile analize tabi tutulmuştur. DSSE işleminin numunelerin ön temizlenmesinde etkinliğinin düşük olması sebebiyle daha farklı avantajlara sahip olan KFE yöntemi denenmiştir. Ön temizleme işlemini etkin bir şekilde sağlayacak katı fazı belirlemek amacıyla üç farklı marka KFE kartuşu denenmiştir. KFE yöntemi uygulanırken Positive Pressure Manifold cihazı kullanılmıştır.

2.11. Yöntem Optimizasyonu

MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın LC-MS/MS analizinden önce numunelerden ekstraksiyonu için üç farklı KFE kolonu test edilmiştir. KFE geri kazanımı (KFE-GK) ve ME değerlendirmeleri, kalibrasyon aralığı içinde yer alan en düşük (1,0 ng/mL) ve en yüksek (50,0 ng/mL) konsantrasyon düzeylerinde gerçekleştirilmiştir. Bu parametreleri değerlendirmek amacıyla üç farklı tipte numune hazırlanmış ve bu numuneler LC-MS/MS'de analiz edilmiştir. Bu numuneler aşağıda açıklanmıştır.

A: KFE işleminden önce analit eklenmiş boş numuneler (numune analitle birlikte ekstraksiyon basamağından geçmiş)

B: KFE işleminden sonra ekstrakta analit eklenmiş boş numuneler (analit ekstraksiyon basamağından geçmemiş)

C: Aynı konsantrasyonda ve aynı hacimde, yalnızca elüsyon çözeltisi içerisinde hazırlanmış standart çözeltiler (matrissiz çözeltide analit).

% KFE-GK değeri, A ve B numunelerinin pik alan oranları (analit/IS) karşılaştırılarak Eşitlik (1)'deki formülle hesaplanmıştır.

$$\% KFE - GK = \left(\frac{A}{B} \right) * 100 \quad (1)$$

% ME değeri, B ve C numunelerinin pik alanları karşılaştırılarak Eşitlik (2)'ye göre hesaplanmıştır.

$$\% ME = \left(\frac{B}{C} \right) * 100 \quad (2)$$

ME değeri %100'ün üzerinde olduğunda iyon artışı (ion enhancement), %100'ün altında olduğunda ise iyon baskılanması (ion suppression) söz konusu olduğu kabul edilmiştir.

Bu çalışmada KFE kartuşları olarak üç farklı ürün test edilmiştir. Bunlar SpeXtract, C8, InertStep HLB ve OASIS, HLB kartuşlarıdır. SpeXtract, C8 kartuşu ile yapılan ekstraksiyon işlemi KFE 1, InertStep HLB kartuşu ile yapılan ekstraksiyon işlemi KFE 2 ve OASIS, HLB kartuşu ile yapılan ekstraksiyon işlemi ise KFE 3 olarak ifade edilmiştir.

En yüksek GK değerleri KFE 3 kartuşunda gözlemlendiği için, sonraki tüm analizler bu kartuşun optimize edilmiş koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.12. Ön Temizlemede Uygulanan KFE Yöntemi

Kolonun şartlandırılması: Analiz öncesinde KFE kolonlarının aktivasyonu ve uygun hale getirilmesi amacıyla kolon şartlandırılmıştır. Bunun için sırasıyla aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

- Kolonlardan 1 mL metanol geçirilerek ilk ıslatma ve çözücüyle koşullandırma sağlanmıştır.
- Ardından, kolondan 1 mL saf su geçirilerek metanol uzaklaştırılmış ve kolon analize uygun hale getirilmiştir.
- Tüm bu işlemler Positive Pressure Manifold sisteminde gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında akış hızı, kolon yapısına zarar vermeyecek şekilde düşük basınçta (1-5 psi) kontrol edilmiştir.

Örneğin hazırlanması ve kolona uygulanması: Analiz edilecek olan numuneler aşağıdaki ön işlemlere tabi tutulmuştur:

- 1 mL biyolojik numune (kan veya idrar) üzerine 2 mL saf su eklenmiş ve bu karışım 2000 rpm devirde 5 dakika süreyle vortekslenerek homojen hale getirilmiştir.
- Homojenize edilen karışım, 4000 rpm hızında 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, kartuşlara 4 saniyede bir damla olacak şekilde yavaşça geçirilmiştir. Bu akış hızı, analitin kolon içindeki sabit faza maksimum tutunmasını sağlamak amacıyla tercih edilmiştir.

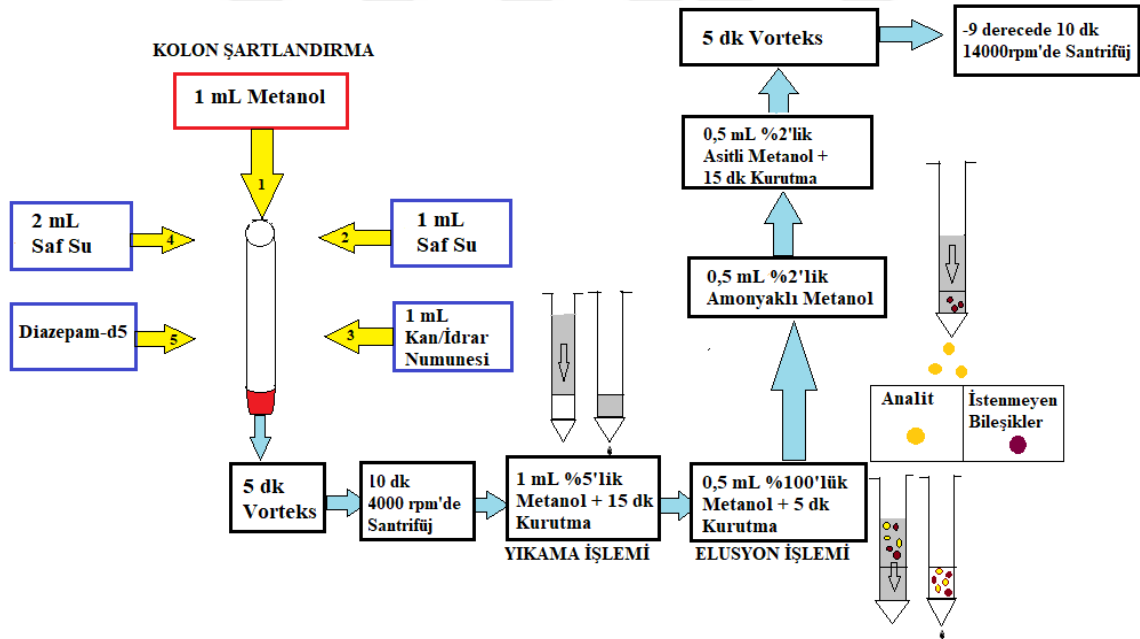
Yıkama Aşaması: Numunelerin kartuşlara yüklenmesinden sonra, matris bileşenlerinden arındırılması amacıyla yıkama işlemi uygulanmıştır:

- Kolona 1 mL %5 (h/h) metanol eklenmiş ve 4 saniyede bir damla akış hızıyla geçirilmiştir.
- Yıkama sonrası, kolondaki fazla çözücünün uzaklaştırılması amacıyla 15 dakika süreyle kurutma işlemi uygulanmıştır.
- Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon aşamasına geçilmeden önce, eluatın toplanacağı Eppendorf tüpler KFE cihazının altına yerleştirilmiştir.

Elüsyon İşlemi: Analitlerin kolonlardan etkin biçimde elüe edilmesi için ardışık olarak üç farklı çözücü uygulanmıştır:

- 0,5 mL %100 metanol, belirlenen akış hızıyla (4 saniyede 1 damla) kartuşlardan geçirilmiş ve ardından kartuşlar 5 dakika süreyle kurutulmuştur.
- 0,5 mL %2 (h/h) amonyaklı metanol, aynı yöntemle kartuşlardan geçirilmiş ve yine 5 dakika kurutulmuştur.
- 0,5 mL %2 (h/h) asetik asitli metanol ile son elüsyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen eluat, tek bir tüpte birleştirilmiştir.

Elde edilen elüsyon çözeltisi, 2000 rpm'de 5 dakika süreyle vortekslenerek homojenize edilmiştir. Ardından, numuneler 18 °C'de 1 saat bekletilmiş ve numune kararlılığı sağlanmıştır. Bekletme sonrası, -9 °C'ye ayarlanmış santrifüj cihazında, 14000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonucunda oluşan süpernatant faz dikkatlice alınarak, LC-MS/MS cihazına enjeksiyon için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanılan KFE işleminin basamakları ayrıntılı olarak Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. KFE işleminin basamaklarının ayrıntılı gösterimi

2.13. Kontrol Numuneleri

Metot doğrulaması ve analitik girişimlerin takip edilebilmesi amacıyla boş kan ve idrar numuneleri yukarıda açıklanan KFE prosedürlerinin tamamına, aynı koşullar altında

tabi tutulmuştur. Böylece, sistemsel veya kimyasal kontaminasyonların belirlenmesi ve yöntemin spesifikliğinin teyit edilmesi sağlanmıştır. Boş kan ve idrar numuneleri, KFE işlemi sonrası LC-MS/MS analizine tabi tutulmuş ve elde edilen kromatogramlar, analitlerin hedef MRM geçişleri açısından değerlendirilmiştir. Bu ölçümler sırasında analitlere ait herhangi bir sinyal gözlenmemesi, yöntemsel kontaminasyonun ve analitik girişimin bulunmadığını göstermiştir.

2.14. LC-MS/MS Çalışma Şartları

2.14.1. LC İşleminin Çalışma Şartları

Akış hızı	: 0,6 mL/dk
Basınç üst limiti	: 600 bar
Enjeksiyon hacmi	: 10 µL
Analiz süresi	: 16 dk
Kolon fırını sıcaklığı	: 40 °C
Mobil faz A	: 2 mM amonyum asetat, %0,1 formik asit, %5 metanol (suda)
Mobil Faz B	: %100 metanol

2.14.2. MS Sisteminin Çalışma Şartları

Gaz	: Azot
İyon kaynağı	: AJS ESI
Kurutucu gaz sıcaklığı	: 300 °C
Kurutucu gaz akışı	: 10 L/dk
Nebulizatör basıncı	: 15 psi
Kapiler voltajı	: 3000 V
İyon sprey voltajı	: 1500 V
Sheath gaz sıcaklığı	: 250 °C
Sheath gaz akışı	: 7 L/dk
MS 1 sıcaklığı	: 100 °C
MS 2 sıcaklığı	: 100 °C

Tarama modu : Dinamik MRM

2.15. Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemlerinin, SWGTOX 2013 kılavuzuna uygun şekilde validasyonları yapılmıştır. Yöntem validasyonu; seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, LOD ve LOQ değerleri, doğruluk (GK değerleri), kesinlik, kararlılık, ME ve taşıyıcı etki gibi parametreleri kapsamaktadır.

2.15.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğini değerlendirmek amacıyla, öncelikle analit içermeyen boş kan ve idrar örnekleri temin edilmiştir. Bu kontrol numuneleri, örnek hazırlama protokolü doğrultusunda hazırlanarak analiz sistemine enjekte edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, hedef bileşiklerin AS'nde herhangi bir sinyal gözlenmemiştir. Bu durum, yöntemle çalışılan biyolojik matrislerde doğal olarak bulunan bileşenlerin hedef analitlerle çakışmadığını ve yöntemin biyolojik matris kaynaklı girişimlere karşı dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur.

2.15.2. Doğrusallık

Bu amaçla her iki analit boş idrar ve kan numunelerine son konsantrasyonlar 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 35 ng/mL ve 50 ng/mL olacak şekilde eklenerek elde edilen numunelere KFE 3 yöntemi uygulandı. Toplanan ekstraktların LC-MS/MS cihazında optimize edilen şartlar altında kromatogramları alındı. Analit konsantrasyonuna karşı analitlerin pik alanlarının iç standardın pik alanına oranlarının grafiği (sinyal oranları) çizildi ve bir doğru elde edildi. Elde edilen grafiklerden doğrusal aralığın her iki analit için de 1–50 ng/mL arasında olduğu belirlenmiştir. MDMB-4en-PINACA için $r^2 = 0,996$, ADB-BUTINACA için $r^2 = 0,998$ olarak saptanmıştır.

2.15.3. Duyarlılık

Sistemin duyarlılığını göstermek için analit eklenmiş boş kan ve idrar örneklerinin optimize edilen şartlarda LC-MS/MS cihazı ile kromatogramları alındı. Cihazın yazılımı ile S/N değerleri belirlendi. S/N değerlerinden LOD ve LOQ değerleri Bölüm 2.15.4'teki Eşitlik (3) ve Eşitlik (4)'e göre hesaplandı. Sistemin duyarlılığı bu şekilde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri olarak ifade edilebilir. Metodun duyarlılığı için ise Bölüm 2.15.4'teki Eşitlik (5) ve Eşitlik (6)'ya göre LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

2.15.4. LOD ve LOQ Değerleri

LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde çeşitli yaklaşımlar kullanılmakla birlikte, bu tez çalışmasında sistemin duyarlılığını belirlemek için S/N oranı esas alınarak LOD ve LOQ değerleri Bölüm 2.15.3'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Bu yöntemde, numunede ölçülen analit sinyalinin, temel gürültü seviyesine oranı 3 olduğunda, bu konsantrasyon LOD olarak kabul edilmiştir. Diğer bir ifadeyle, analitin oluşturduğu sinyalin arka plan gürültüsüne kıyasla 3 kat daha yüksek olduğu durum, LOD'yi ifade etmektedir. Benzer şekilde, sinyalin gürültüye oranı 10 olduğunda, bu düzey LOQ olarak değerlendirilmiştir; yani analit sinyalinin gürültüden en az 10 kat daha güçlü olduğu konsantrasyon düzeyi, güvenilir miktar tayini için uygun kabul edilmiştir. Bu değerlere ilişkin hesaplamalar, literatürde yer alan ilgili formüller doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (SWGTOX 2013). LOD ve LOQ'nun hesaplanması formül olarak sırasıyla Eşitlik (3) ve Eşitlik (4)'te verilmiştir.

$$LOD = 3 \times (S/N) \quad (3)$$

$$LOQ = 10 \times (S/N) \quad (4)$$

Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri ise Eşitlik (5) ve Eşitlik (6)'daki fömüllere göre hesaplanmıştır.

$$LOD = X_{ort} + 3xS_b \quad (5)$$

$$LOQ = X_{ort} + 10xS_b \quad (6)$$

Eşitlik (5) ve Eşitlik (6)'da Xort 11 adet boş numunenin ölçümlerinin ortalamasını, Sb ise bu numunelerin ölçümlerinin standart sapmasını göstermektedir.

2.15.5. Doğruluk

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunun gösterilmesi için kalibrasyon grafiklerindeki en düşük (1 ng/mL) ve en yüksek (50 ng/mL) konsantrasyonları içeren analit eklenmiş boş numuneler KFE 3 yöntemi ile ön temizlemeye tabi tutulduktan sonra LC-MS/MS cihazında Bölüm 2.14'te belirtilen şartlar altında analizi yapılmıştır. GK değerleri Eşitlik (7)'de verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\% GK = \left(\frac{C_{bulunan}}{C_{eklenen}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Eşitlik (7)'de $C_{bulunan}$ ölçüm sonucunda bulunan analit konsantrasyonunu ifade ederken $C_{eklenen}$, boş numunelere eklenen analit konsantrasyonunu gösterir.

2.15.6. Kesinlik

Kesinlik değerlendirmesi analit eklenmiş boş numuneler için gün içi ve günler arası analizler gerçekleştirilmiştir. Gün içi ölçümlerde 6 tekrar, günler arası ölçümlerde 15 tekrar numunesi analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarının kesinliği %BSS değerleri ile ifade edilmiştir.

2.15.7. Kararlılık

Oto numuneleyicide bekleyen KFE işlemine tabi tutulmuş numunelerdeki analitlerin zamana bağlı sinyal (alan) değişimleri 24 saatlik bir süre boyunca izlenmiştir. Bu amaçla, 1 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarda hazırlanmış kan ve idrar numuneleri analiz edilmiştir. Analizler, her 6 saatte bir olmak üzere toplam 5 zaman noktasında gerçekleştirilmiş; elde edilen kromatografik sinyal alanları, başlangıç değeriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tüm numuneler oda sıcaklığında, buzdolabında, dondurucuda ve dondur/çöz döngüsünde değerlendirilmiştir.

2.15.8. KFE-GK Değerleri

KFE-GK değerlerinin hesaplanması için yapılan ölçümler ve hesaplamalar Bölüm 2.11’de verilmiştir.

2.15.9. ME Değerleri

ME değerlerinin hesaplanması için yapılan ölçümler ve hesaplamalar Bölüm 2.11’de verilmiştir.

2.15.10. Taşıyıcı Etki

Taşıyıcı etkinin belirlenmesi için önce analitin belli konsantrasyonunu içeren kan ve idrar numunelerinin LC-MS/MS cihazında kromatogramları alındı. Hemen sonrasında boş kan ve idrar numunelerinin aynı cihazda kromatogramları alındı. İki kromatogram karşılaştırılarak analitin AS’nde boş kromatogramlarda pik olup olmadığı tespit edildi. Bu çalışmalarda her iki analitin kalibrasyon grafiğinin yaklaşık orta kısmına karşılık gelen 10 ng/mL konsantrasyonu için ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonrasında çalışılan boş numunelerin kromatogramlarında analitlere ait AS’nde herhangi bir sinyal tespit edilmemiştir.

2.16. MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA Tayini için Önerilen Yöntem

Numune hazırlama sürecinde KFE yöntemi uygulanmıştır. KFE kartuşları, önce 1 mL metanol ve ardından 1 mL saf su geçirilerek şartlandırılmıştır. Tüm işlemler, 1–5 psi basınç aralığında çalışan Positive Pressure Manifold sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Biyolojik numuneler (1 mL kan veya idrar), 2 mL saf su ile karıştırılmış, 2000 rpm’de 5 dakika vortekslenmiş ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, 4 saniyede bir damla akış hızıyla KFE kartuşlarına uygulanmıştır. Kartuşlara yükleme sonrası, matris kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla 1 mL %5 metanol ile yıkama yapılmış ve ardından kartuşlar 15 dakika kurutulmuştur. Elüsyon aşamasında, sırasıyla 0,5 mL %100 metanol, %2 amonyaklı metanol ve %2 asetik asitli metanol kartuşlardan

geçirilmiş; eluatlar tek bir tüpte toplanmıştır. Elde edilen elüsyon çözeltisi, 2000 rpm’de 5 dakika vortekslenerek homojenize edilmiş, ardından 18 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Kararlılığın sağlanmasının ardından, -9 °C’de 14000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant faz LC-MS/MS analizi için viallere alınmış ve LC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Bu analizlerde 20 ng/mL diazepam-d5 iç standart olarak kullanılmıştır. Taşıyıcı etki olmadığı için ölçümler arasında analitik kolonun yıkanması için herhangi bir çözücü kullanılmamıştır.



3. BULGULAR

3.1. Numunelerin Ön Temizlenmesi

LC-MS/MS analizlerinde ME'nin ortaya çıkmaması için biyolojik numunelerin ön temizleme işlemine tabi tutularak analitlerin numune matrisinden izole edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için DSSE ve KFE yöntemleri denenmiştir.

3.1.1. DSSE Yöntemiyle Elde Edilen GK Sonuçları

Analit eklenmiş boş numunelerin LC-MS/MS analizinden önce, biyolojik matristen kaynaklanabilecek bozucu etkileri azaltmak amacıyla ön temizleme işlemi uygulanmıştır. Bu kapsamda ilk olarak, basit ve hızlı uygulanabilirliği nedeniyle DSSE yöntemi test edilmiştir. Numune hazırlığında ekstrakt/dispersif çözücü sistemi olarak kloroform ve metanol kullanılmıştır. Uygulanan yöntemin özeti Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de özetlenen yönteme göre hazırlanan numuneler LC-MS/MS analizine tabi tutulmuştur. Ancak numunelerin analizi sonucunda elde edilen sinyallerin düşük yoğunlukta olması ve kromatografik pik şekillerinin bozulması durumları gözlenmiştir. Bu şartlardaki ölçüm sonuçlarına göre, DSSE yöntemiyle elde edilen yüzde ekstraksiyon GK değerleri (%DSSE-GK), MDMB-4en-PINACA için kan örneklerinde %45,2, idrar örneklerinde ise %50,2 olarak belirlenmiştir. ADB-BUTINACA açısından ise bu oranlar kan ve idrar örneklerinde sırasıyla %52,8 ve %55,5 düzeyinde bulunmuştur. Elde edilen bu düşük GK değerleri nedeniyle, daha yüksek ekstraksiyon verimliliği sağlamak amacıyla çalışma kapsamında DSSE yönteminden vazgeçilmiş ve KFE yöntemlerine geçilmiştir.

Tablo 2. DSSE yönteminin çalışma basamakları ve %DSSE-GK sonuçları

DSSE		
Numune hazırlama	Kan/İdrar 500 µL	
Deproteinizasyon	1:1 metanol	
Ön işlem	1 mL su / 0,2 g NaCl / 100 µL tampon çözelti	
Ekstraksiyon	100 µL kloroform / 250 µL metanol	
Santrifüj	4,000 rpm/5dk.	
Buharlaştırma	Kuruluğa kadar	
Yeniden çözme	Mobil faz A	
%DSSE-GK ($\pm$ %BSS) n=3	<u>Kan</u>	<u>İdrar</u>
MDMB-4en-PINACA	45,2 ($\pm$ 10,8)	50,2 ($\pm$ 9,7)
ADB-BUTINACA	52,8 ($\pm$ 12,3)	55,5 ($\pm$ 13,8)

3.1.2. KFE Yöntemiyle Elde Edilen KFE-GK Sonuçları

KFE ile numunelerin ön temizlenmesinde 3 farklı kartuş kullanılmıştır. Bu kartuşlarla yapılan ön temizleme işlemlerinde uygulanan adımlar Tablo 3'te verilmiştir. Tablo 3'de bu kartuşların kullanıldığı ekstraksiyon metotları KFE1, KFE2 ve KFE3 olarak ifade edilirken kartuşların isimleri de metotların altında belirtilmiştir.

Tablo 3. Test edilen KFE metotlarının çalışma basamakları ve %KFE-GK sonuçları

	(KFE 1) SpeXtract, C8		(KFE 2) InertStep HLB		(KFE 3) OASIS, HLB	
Numune seyreltme	5-mL fosfat tamponu (pH 6)		4 mL su		4 mL su	
Şartlandırma	2×3 mL metanol		1×1 mL metanol		1×1 mL metanol	
	2×2 mL su		1×1 mL su		1×1 mL su	
	Numune ilavesi		Numune ilavesi		Numune ilavesi	
Yıkama	2×2 mL su		1×1 mL metanol/su (5:95)		1×1 mL metanol/su (5:95)	
	2×2 mL su/metanol (80:20)		1×1 mL metanol/su (5:95)		1×1 mL metanol/su (5:95)	
	1×1 mL 0.1 M asetik asit		1×1 mL metanol/su (5:95)		1×1 mL metanol/su (5:95)	
Santrifüj	3000 rpm'de 10 dk		4000 rpm'de 10 dk		4000 rpm'de 10 dk	
Buharlaştırma	40 °C, azot		18 °C, azot		18 °C, azot	
Tekrar düzenleme	50 µL asetonyitril/metanol/ su(3:3:2)		100 µL metanol		100 µL metanol	
	50 µL asetonyitril/metanol/ su(3:3:2)		100 µL metanol/amonyak (98:2)		100 µL metanol/amonyak (98:2)	
	50 µL asetonyitril/metanol/ su(3:3:2)		100 µL metanol/asetik asit (98:2)		100 µL metanol/asetik asit (98:2)	
%KFE-GK ($\pm$ %BSS), n=3	<u>Kan</u>	<u>İdrar</u>	<u>Kan</u>	<u>İdrar</u>	<u>Kan</u>	<u>İdrar</u>
MDMB-4en-PINACA	76,5 ($\pm$ 11,5)	68,9 ($\pm$ 13,2)	82,2 ($\pm$ 6,1)	81,0 ($\pm$ 5,3)	97,3 ($\pm$ 3,1)	95,2 ($\pm$ 4,1)
ADB-BUTINACA	68,5 ($\pm$ 10,2)	73,0 ($\pm$ 7,9)	79,3 ($\pm$ 8,1)	80,7 ($\pm$ 9,3)	96,3 ($\pm$ 3,0)	93,4 ($\pm$ 5,2)

Tablo 3'teki %KFE-GK verileri 1 ng/mL konsantrasyonundaki kan ve idrar numunelerinde her iki analit için olan ölçümlere aittir.

3.2. KFE 3 Yöntemi ile Elde Edilen %KFE-GK ve %ME Değerleri

KFE 3 yöntemi ile elde edilen geri kazanımlar %KFE-GK olarak ifade edilmiş olup, düşük (1 ng/mL) ve yüksek (50 ng/mL) konsantrasyonlardaki numuneler için değerlendirilmiştir. Ayrıca KFE 3 yöntemine göre yapılan numune hazırlama sonrası analizler için %ME değerleri de hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. KFE 3 yöntemi ile elde edilen %KFE-GK ve %ME değerleri

	%KFE-GK ($\pm$ %BSS), n=3		%ME ($\pm$ %BSS), n=3	
	Düşük konsantrasyon (1 ng/mL)	Yüksek konsantrasyon (50 ng/mL)	Düşük konsantrasyon (1 ng/mL)	Yüksek konsantrasyon (50 ng/mL)
Kan				
MDMB-4en-PINACA	94,2 ($\pm$ 1,7)	93,5 ($\pm$ 1,8)	102,2 ($\pm$ 3,5)	102,5 ($\pm$ 2,4)
ADB-BUTINACA	89,7 ($\pm$ 5,4)	90,7 ($\pm$ 5,8)	103,0 ($\pm$ 3,2)	104,7 ($\pm$ 4,8)
İdrar				
MDMB-4en-PINACA	90,8 ($\pm$ 3,0)	93,2 ($\pm$ 2,6)	106,2 ($\pm$ 2,0)	107,2 ($\pm$ 7,8)
ADB-BUTINACA	89,7 ($\pm$ 5,1)	89,2 ($\pm$ 5,0)	103,5 ($\pm$ 4,0)	104,8 ($\pm$ 4,2)

3.3. LC-MS/MS Analiz Parametreleri

LC-MS/MS cihazındaki çalışma şartları optimize edilmiştir. Tablo 5 MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için kullanılan analiz parametrelerini göstermektedir.

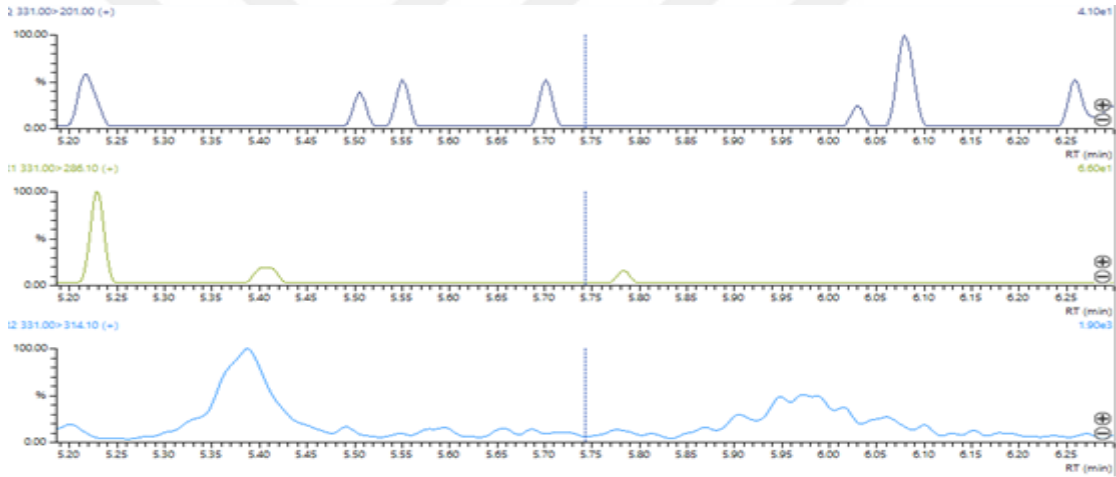
Tablo 5. MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için LC-MS/MS'de kullanılan analiz parametreleri

SK	Molekül Ağırlığı (g)	Öncül İyon	Ürün İyon	Q1 (V)	ÇE	Q3 (V)	AS (dk.)
MDMB-4en-PINACA	357,5	358,2	298,2	-16	-20	-26	7,8
	357,5	358,2	213,1	-16	-31	-26	
ADB-BUTINACA	330,4	331,2	201,2	-16	-18	-24	5,8
	330,4	331,2	145,0	-16	-25	-29	

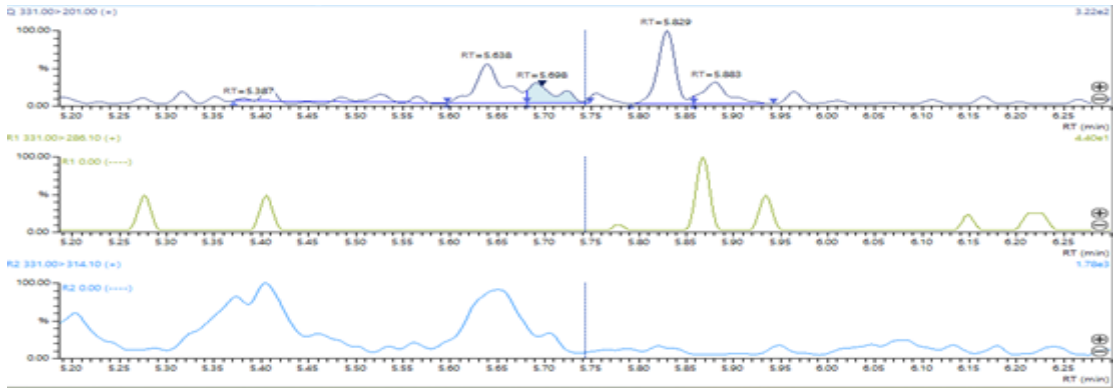
3.4. Validasyon Bulguları

3.4.1. Seçicilik

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla hem MDMB-4en-PINACA hem de ADB-BUTINACA için analit içermeyen boş kan ve idrar numunelerinden elde edilen kromatogramlar Şekil 12 ve Şekil 13'te sırasıyla verilmiştir. Bu kromatogramlarda yer alan siyah, mavi ve yeşil kromatogramlar, farklı bireylere ait üç ayrı boş biyolojik numuneye aittir. Kromatogramlarda AS'nde hedef dışı piklere rastlanmamıştır. Bu bulgular, biyolojik matrislerin karmaşık yapısına rağmen yöntemin girişimlere karşı dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur.

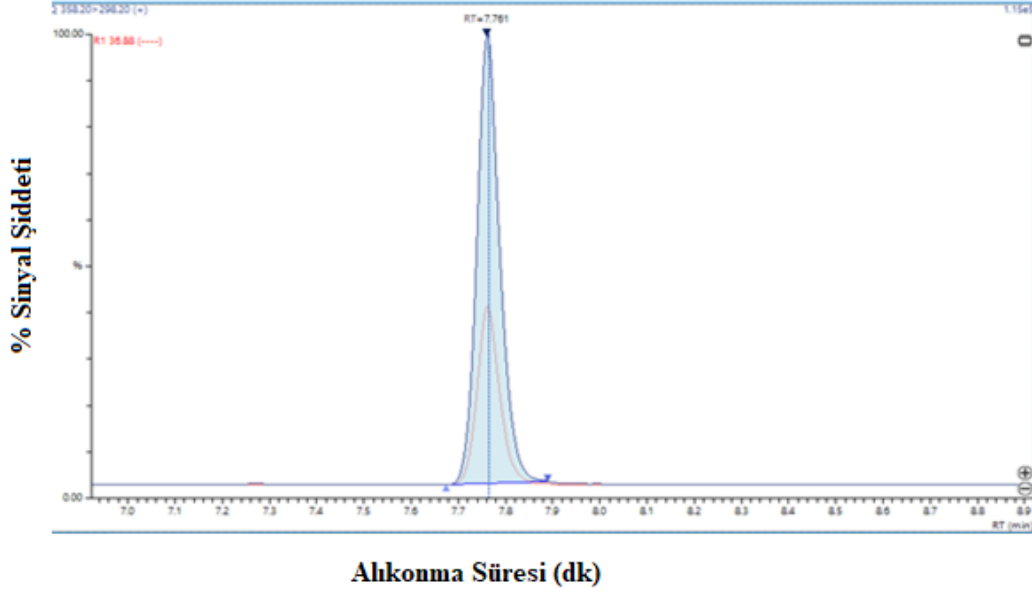


Şekil 12. Boş kan numunelerine ait total iyon kromatogramı

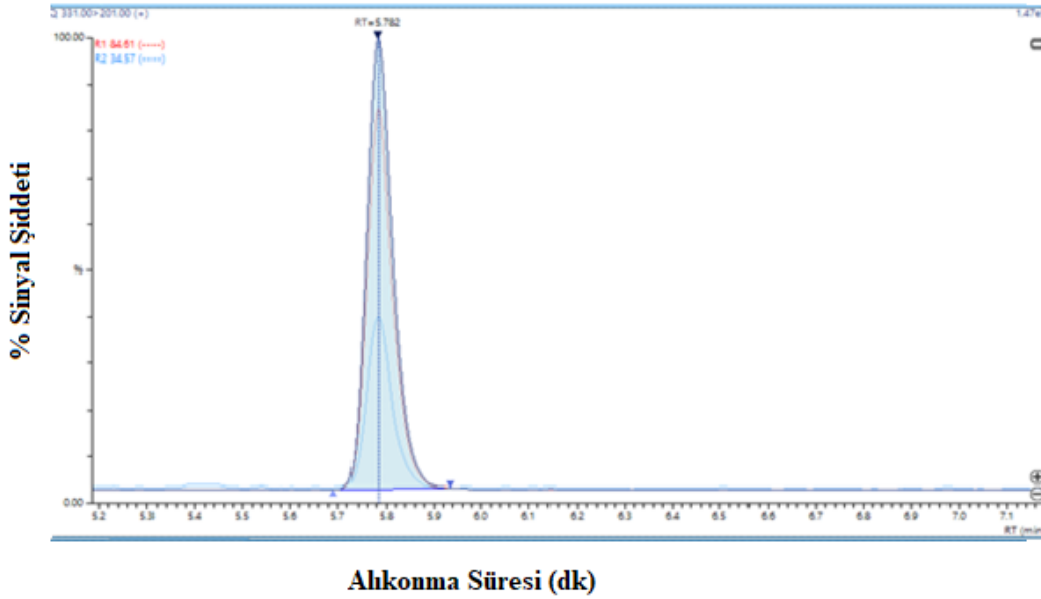


Şekil 13. Boş idrar numunelerine ait total iyon kromatogramı

Analitlerin AS'ni belirlemek için belli konsantrasyonlarda analit eklenmiş boş numunelerin kromatogramları optimize edilen LC-MS/MS şartlarında alınmıştır. Şekil 14 ve Şekil 15'te sırasıyla 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan numuneleri için AS'ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.

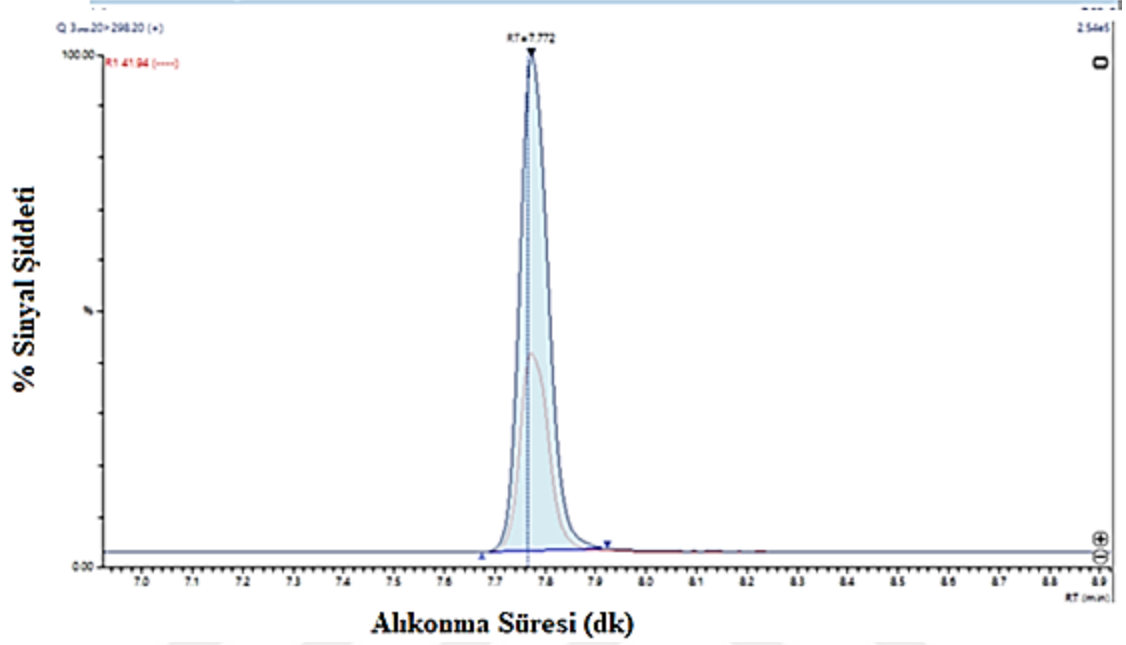


Şekil 14. 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram

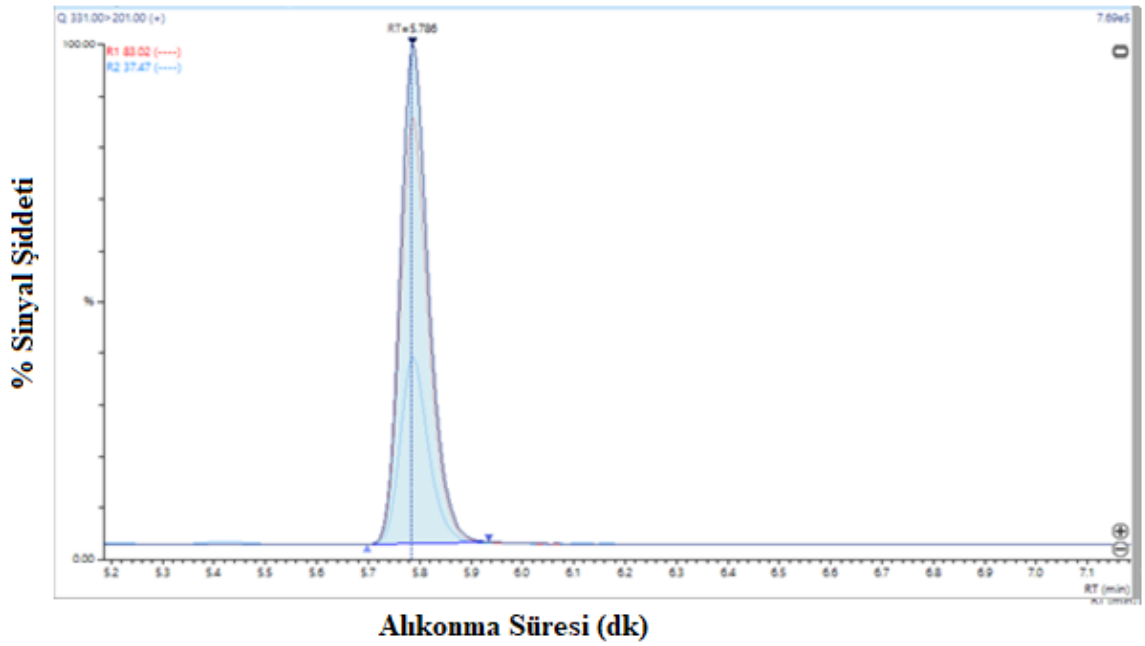


Şekil 15. 1 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS'ni gösteren kromatogram

Şekil 16 ve Şekil 17’de ise sırasıyla 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar numuneleri için AS’ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.

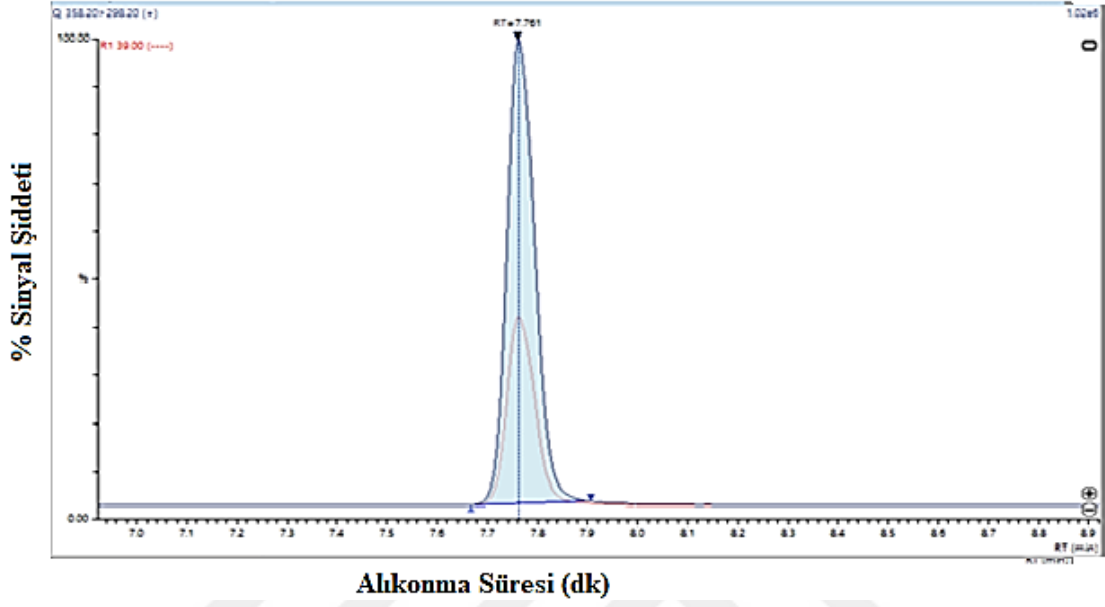


Şekil 16. 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS’ni gösteren kromatogram

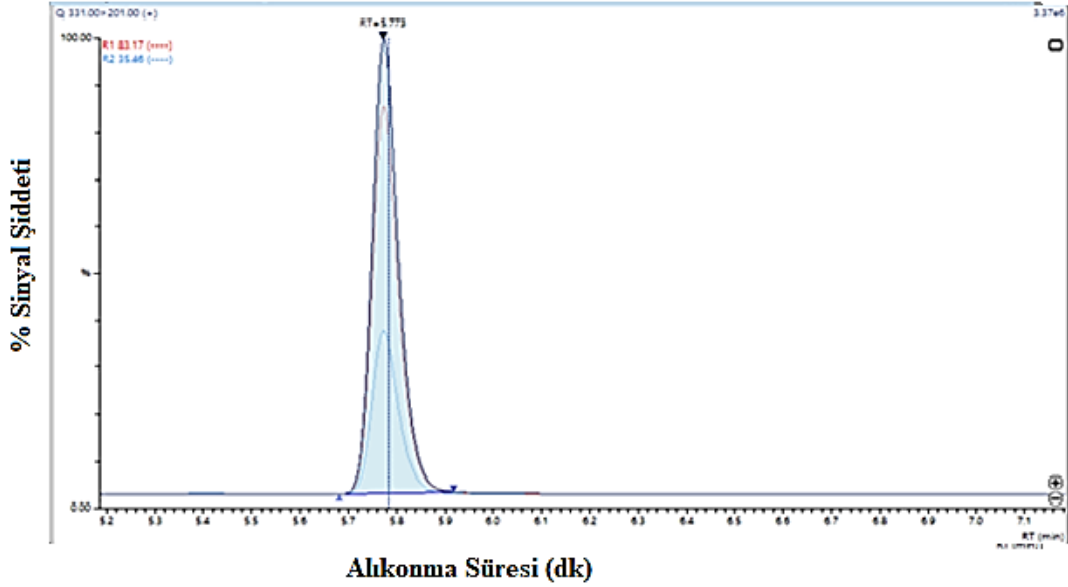


Şekil 17. 1 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS’ni gösteren kromatogram

Şekil 18 ve Şekil 19’da sırasıyla 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan numuneleri için AS’ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.

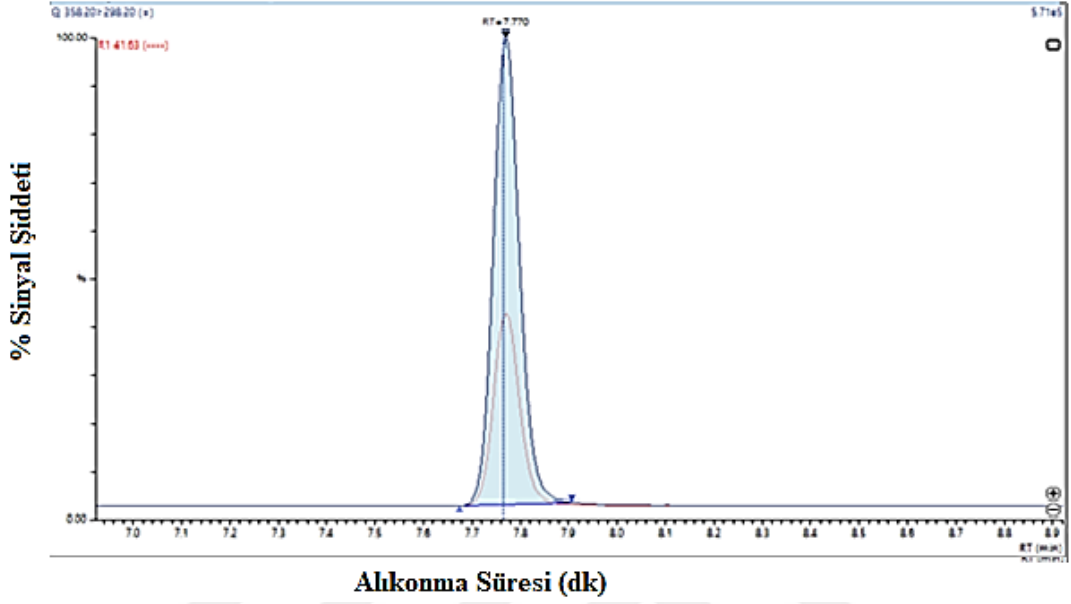


Şekil 18. 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS’ni gösteren kromatogram

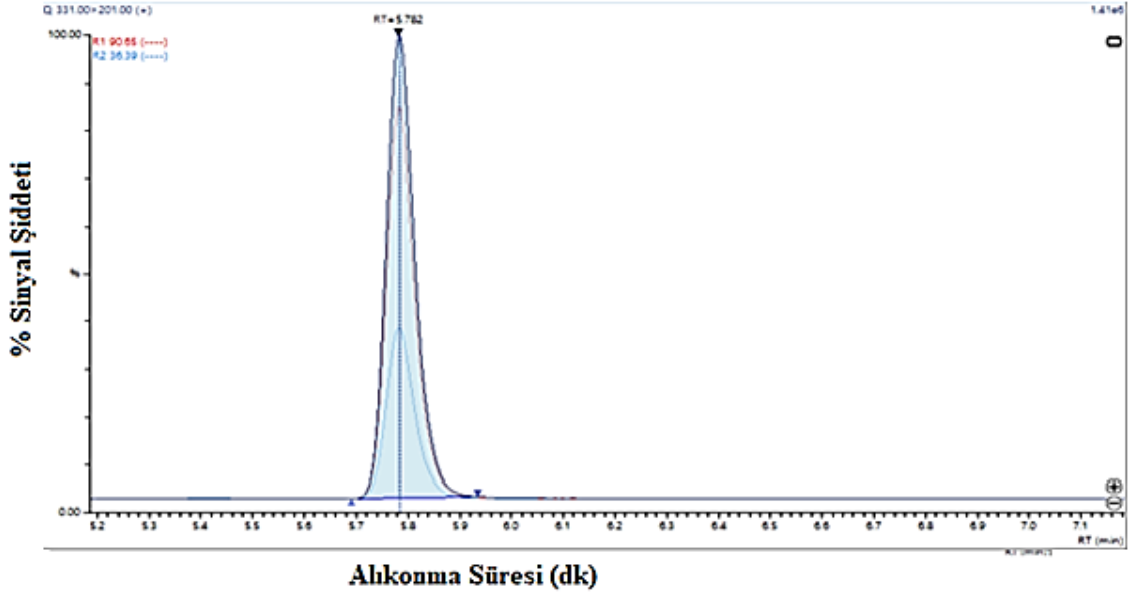


Şekil 19. 10 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan örneği için AS’ni gösteren kromatogram

Şekil 20 ve Şekil 21’de ise sırasıyla 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar numuneleri için AS’ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.



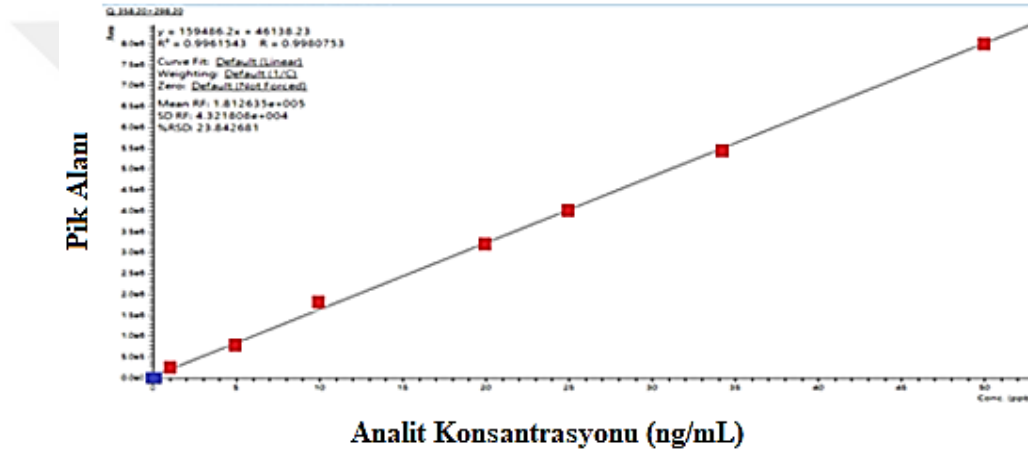
Şekil 20. 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS’ni gösteren kromatogram



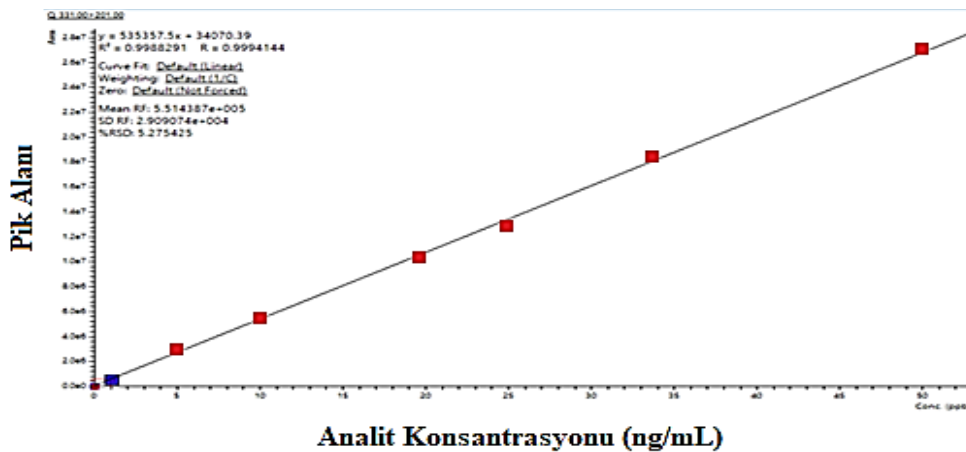
Şekil 21. 10 ng/mL ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar örneği için AS’ni gösteren kromatogram

3.4.2. Doğrusallık

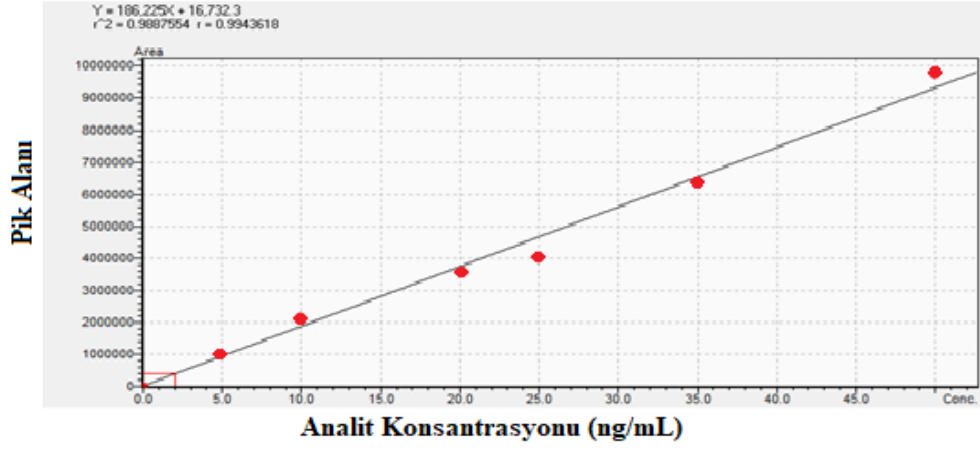
Analit konsantrasyonu ile pik alanlarının sinyal oranları arasındaki ilişkiyi gösteren kalibrasyon grafikleri Şekil 22, 23, 24 ve 25'te sunulmuştur. Bu kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında 7 konsantrasyon seviyesinde çalışılmıştır. Bu konsantrasyonlar 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 35 ng/mL ve 50 ng/mL'dır. Şekil 22-25 arasındaki grafiklerden görüldüğü gibi 1–50 ng/mL aralığında doğrusallık tespit edilmiştir. Bu grafiklerde her iki analit için hem kan hem de idrar numunelerinde elde edilen korelasyon katsayıları (r^2) > 0,9980 olarak bulunmuştur.



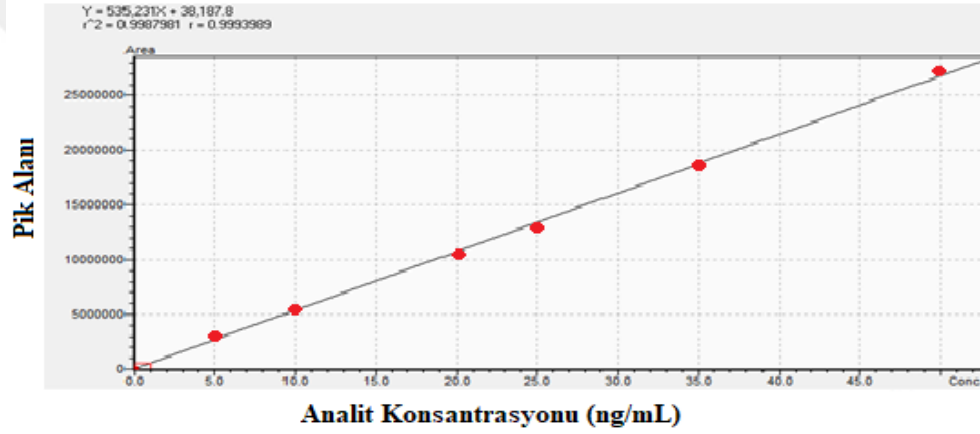
Şekil 22. Kan örneği için MDMB-4en-PINACA'nın kalibrasyon grafiği



Şekil 23. Kan örneği için ADB-BUTINACA'nın kalibrasyon grafiği



Şekil 24. İdrar örneği için MDMB-4en-PINACA'nın kalibrasyon grafiği



Şekil 25. İdrar örneği için ADB-BUTINACA'nın kalibrasyon grafiği

3.4.3. Duyarlılık

Çalışılan sistemin ve metodun duyarlılığı LOD ve LOQ değerleri ile ifade edilebilir. Yapılan çalışmada sistemin ve metodun duyarlılığı için bulunan LOD ve LOQ değerleri Eşitlik (3)-(6)'ya göre hesaplanmış ve Tablo 6'da verilmiştir.

3.4.4. LOD ve LOQ Değerleri

Sistemin ve geliştirilen yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Geliştirilen yöntemlerin S/N, LOD ve LOQ değerleri

	S/N	LOD*	LOQ**	LOD*** (ng/mL)	LOQ**** (ng/mL)
Kan					
MDMB-4en-PINACA	485	0,10	0,33	1,29	1,65
ADB-BUTINACA	373	0,11	0,35	0,60	0,79
İdrar					
MDMB-4en-PINACA	483	0,12	0,38	1,33	1,70
ADB-BUTINACA	320	0,13	0,41	0,63	0,83
*Eşitlik (3)'e göre hesaplanan, ** Eşitlik (4)'e göre hesaplanan, ***Eşitlik (5)'e göre hesaplanan, **** Eşitlik (6)'ya göre hesaplanan					

3.4.5. Doğruluk

Önerilen metotların doğruluğu, ekleme gerikazanım çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Bunun için boş numunelere bilinen miktarda analit eklenerek KFE 3 yöntemi ile ön temizleme işlemi uygulanmış ve elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS'de analiz edilmiştir. Sonuçlar %GK olarak ifade edilmiştir. Tablo 7 ve Tablo 8'de sırasıyla MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için kan ve idrarda yapılan ölçümler için %GK sonuçlarını verilmiştir. Ölçümler, 1 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyon seviyeleri için gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. MDMB-4en-PINACA için kan ve idrarda bulunan %GK sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Doğruluk (%GK)
Kan	1	92,1
Kan	50	94,5
İdrar	1	88,8
İdrar	50	89,2

Tablo 8. ADB-BUTINACA için kan ve idrarda bulunan %GK sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Doğruluk (%GK)
Kan	1	96,6
Kan	50	92,1
İdrar	1	92,3
İdrar	50	93,5

3.4.6. Kesinlik

Yöntemin kesinliği aynı gün içinde (intra-day) ve farklı günler arası (inter-day) yapılan analizlerle değerlendirilmiştir. Tablo 9 ve Tablo 10 sırasıyla MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için kan ve idrarda yapılan ölçümler için gün içi ve günler arası ölçüm sonuçlarının kesinliğini %BSS olarak göstermektedir. Ölçümler, 1 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyon seviyeleri için gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9. MDMB-4en-PINACA için kan ve idrarda yapılan gün içi ve günler arası ölçümlerin kesinlik sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Gün içi (n=6) (%BSS)	Günler arası (n=15) (%BSS)
Kan	1	2,7	3,9
Kan	50	1,1	3,4
İdrar	1	2,0	5,3
İdrar	50	3,3	3,4

Tablo 10. ADB-BUTINACA için kan ve idrarda yapılan gün içi ve günler arası ölçümlerin kesinlik sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Gün içi (n=6) (%BSS)	Günler arası (n=15) (%BSS)
Kan	1	4,9	7,2
Kan	50	1,5	4,1
İdrar	1	5,0	6,3
İdrar	50	6,9	7,4

3.4.7. Kararlılık

MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'ya ait kan ve idrar numunelerinde, analiz başlangıcından itibaren 24 saatlik süre boyunca ölçülen sinyal alanlarında, %10'un üzerinde anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir.

3.4.8. Taşınma Etkisi

Yüksek konsantrasyonlu numune analizinden sonra gelen boş numunelerde hedef analitin saptanıp saptanmadığına bakılarak taşıyıcı etki olup olmadığı test edilmiştir. Her iki analit için de taşıyıcı etki gözlenmemiştir.

3.5. Gerçek Numunelerin Analizleri

Geliştirilen yöntem, adli vakalardan elde edilen numunelere de uygulanmıştır. Bunun için Trabzon Adli Tıp Kurumu'ndan sağlanan kan ve idrar numuneleri kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Trabzon Adli Tıp Kurumu'ndan sağlanan kan ve idrar numunelerindeki sonuçlar

Numune Numarası	MDMB-4en-PINACA (ng/mL)		ADB-BUTINACA (ng/mL)	
	Kan	İdrar	Kan	İdrar
1	7,0	5,5	-	-
2	5,2	4,0	7,3	6,2
3	-	-	8,5	8,0
4	20,3	9,2	3,3	2,0
5	-	-	6,6	4,0
6	8,2	7,5	30,0	28,2
7	25,0	22,9	9,0	5,2
8	-	-	38,5	28,4
9	19,5	10,0	-	-
10	42,0	28,5	-	-
11	20,0	12,5	40,1	39,5
12	-	-	33,0	31,0
13	4,0	3,0	28,5	22,5
14	10,0	9,1	-	-
15	21,5	19,2	7,7	5,3
16	-	-	48,0	40,5
17	32,8	30,1	36,6	39,5
18	20,0	19,1	20,5	20,0
19	18,8	17,0	-	-
20	-	-	47,2	40,5

4. TARTIŞMA

4.1. SK'lerin Artan Tehdidi ve Toksikolojik Önemi

Son yıllarda dünya genelinde PM kullanım profili değişmiş; klasik maddelerin (kannabis, kokain, eroin vb.) yanı sıra YPM'ler olarak adlandırılan sentetik bileşiklerin kullanımında ciddi bir artış gözlenmiştir. Bu maddeler, özellikle genç kullanıcılar arasında popülerlik kazanmış, kolay erişim, düşük maliyet ve yasal düzenlemelerden kaçma avantajlarıyla hızla yayılmıştır (UNODC, 2023). SK'ler, bu gruba dahil olan ve doğrudan ES'yi etkileyerek yüksek psikoaktif yanıt oluşturan bileşiklerdir. Kannabisdeki PM olan Δ^9 -THC, CB1 ve CB2 reseptörleri aracılığıyla etkisini gösterirken, SK'ler bu reseptörlere daha güçlü ve uzun süreli bağlanarak ciddi nöropsikiyatrik ve fizyolojik komplikasyonlara neden olabilmektedir (Souza ve ark., 2023).

EMCDDA'nın 2022 yılı raporuna göre, Avrupa genelinde raporlanan YPM çeşitliliği 880'e ulaşmıştır ve bunların 224'ü SK sınıfına ait bileşiklerdir (EMCDDA/EUDA, 2022). Türkiye'de ise "Bonzai" adıyla bilinen SK'ler, sokak düzeyinde en yaygın kullanılan yasa dışı maddelerden biri hâline gelmiştir. 2020 yılında yalnızca Türkiye'de 49 ölüm vakası doğrudan SK'lerle ilişkilendirilmiştir ve bu sayı Almanya (9) ve Macaristan (34) gibi diğer Avrupa ülkeleriyle kıyaslandığında dikkat çekicidir (EMCDDA/EUDA, 2022). Bu veriler, SK'lerin hem adli hem de klinik toksikoloji açısından ne denli önemli bir tehdit unsuru olduğunu gözler önüne sermektedir (UNODC, 2023; EMCDDA/EUDA, 2022).

4.2. DSSE'nin Yetersizliği ve KFE'ye Geçişin Gerekçesi

Bu çalışmada muhtemel matris girişimlerini önlemek amacıyla DSSE ve KFE olmak üzere iki farklı numune ön temizleme işlemi test edilmiştir. Kullanılan numune hazırlama yöntemlerinin etkinliği, elde edilen analitik sonuçlar doğrultusunda karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

İlk olarak uygulanan DSSE yöntemi, teorik olarak hızlı ve basit bir teknik olmasına rağmen, MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA gibi lipofilik SK'ler için yetersiz

bulunmuştur. Tablo 2’de DSSE yönteminin çalışma şartları ve elde edilen GK değerleri verilmiştir.

Tablo 2’den görüldüğü gibi özellikle kan numunelerinde her iki analit için GK değerlerinin %52,8’in altında kaldığı görülmektedir. Ayrıca bu çalışmalarda pik profillerinin zayıf olduğu ve interferans kaynaklı S/N oranının düştüğü belirlenmiştir. Buna ilaveten DSSE yönteminde kullanılan organik çözücüler ile analitlerin çözünabilirliğinin sınırlı olması, bu yöntemin etkinliğini azaltan bir başka faktör olmuştur. Bu olumsuzluklar, daha yüksek seçicilik ve temiz ekstrakt elde edilmesi adına KFE yönteminin test edilmesine zemin hazırlamıştır.

4.3. KFE Kolonlarının Karşılaştırılması ve OASIS HLB'nin Üstünlüğü

Bu çalışmada üç farklı KFE kartuşu (SpeXtract C8, InertStep HLB ve OASIS HLB) hem kan hem de idrar numunelerinde GK verimliliği ve analitik performansları bakımından karşılaştırılmıştır. Tablo 3’te kullanılan her bir kartuş için uygulanan ekstraksiyon yönteminin basamakları ve hem kan hem de idrar numuneleri için elde edilen % GK değerleri belirtilmiştir.

Tablo 3’te görülebileceği gibi SpeXtract C8 kolonu ile yapılan ekstraksiyonlarda (KFE 1 yöntemi) özellikle idrar numunelerinde analitlerin GK değerleri düşüktür ($68,9 \pm 13,2$), ayrıca interferans pikleri sebebiyle LC-MS/MS cihazında ayırımların net yapılmasında sorunlar yaşanmıştır. InertStep HLB kolonu ile yapılan çalışmada (KFE 2 yöntemi) ise SpeXtract C8’e kıyasla daha yüksek GK sağlamıştır. OASIS HLB kolonu ile yapılan çalışmalarda (KFE 3 yöntemi) ise her iki analit için de hem kan hem idrar numunelerinde her iki yonteme göre daha yüksek GK değerleri ve daha düşük %BSS değerleri elde edilmiştir. Tablo 3’te görülebileceği gibi MDMB-4en-PINACA için % GK değerleri kan numunelerinde %97,3 idrarda %95,2 olarak bulunmuştur. ADB-BUTINACA için % GK değerleri kan numunelerinde %96,3 idrarda %93,4 olarak belirlenmiştir.

OASIS HLB kolonu ile yapılan çalışmalarda (KFE 3 yöntemi) elde edilen ekstraktların analitik saflığı sonucunda LC-MS/MS sisteminde minimum girişime sebep olmuştur. Yüksek GK değerleri, numune hazırlama sürecinde anlamlı analit kaybı yaşanmadığını göstermektedir. Bu kartuşun hem hidrofilik hem lipofilik etkileşimleri kapsayan yapısı sayesinde, çalışılan analitlerin geniş polarite aralığına rağmen yüksek verim elde edilmiştir.

4.4. KFE 3 Yöntemi ile Ön Temizleme İşleminin Etkinliği

KFE 3 yöntemine göre yapılan numune hazırlama sonrası analitler için %GK ve %ME değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Tablo 4'te kan ve idrar numunelerinde MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için KFE-GK değerleri ve ME verilmiştir. Ölçümler iki konsantrasyon seviyesinde yapılmıştır. Düşük konsantrasyon seviyesi olarak 1 ng/mL yüksek konsantrasyon seviyesi olarak 50 ng/mL seçilmiştir.

Tablo 4'ten görüldüğü gibi en düşük KFE-GK değerleri MDMB-4en-PINACA için kan numunelerinde %93,5 idrar numunelerinde ise %90,8 olarak bulunmuştur. ADB-BUTINACA için en düşük KFE-GK değerleri kan numunelerinde %89,7 idrar numunelerinde ise %89,2 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar analitlerin uygulanan KFE 3 metodu ile biyolojik matris bileşenlerinden etkili bir şekilde izole edildiğini ve önerilen LC-MS/MS metoduyla tayin edilebildiğini göstermektedir.

Karmaşık biyolojik numunelerde iyonizasyonu etkileyen matris bileşenlerinin yönteme etkisi de değerlendirilmiştir. Tablo 4'te bahsedilen iki konsantrasyon seviyesi için OASIS HLB KFE kartuşu ile KFE 3 yöntemine göre yapılan numune hazırlama sonrası yapılan LC-MS/MS ölçümleri sonucunda hesaplanan %ME değerlerini de vermektedir. Tablo 4'ten görüldüğü gibi MDMB-4en-PINACA için %ME değerleri ideal olarak beklenen %100'lük değerlere çok yakın olup kan numunelerinde %102,2-%102,5 arasında bulunurken idrar numunelerinde %106,2-%107,2 arasında olduğu belirlenmiştir. ADB-BUTINACA için ise bu değer kan numunelerinde %103,0-%104,7 arasında idrar numunelerinde ise %103,5-%104,8 arasında olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar matris kaynaklı iyonizasyon baskılanmasının en düşük düzeyde olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla yöntemin ME'ne karşı dirençli olduğunu ifade etmektedir.

4.5. LC-MS/MS Sisteminin Analitik Yöntem Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tablo 5'te MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için optimize edilen MS parametreleri verilmiştir. Bu parametreler, her bir bileşiğin yüksek hassasiyet ve seçicilikle tespit edilebilmesini sağlamak amacıyla belirlenmiştir. Tablo 5'ten görüldüğü gibi her iki bileşiğin moleküler ağırlıkları sırasıyla yaklaşık 357,5 g/mol (MDMB-4en-PINACA) ve 330,4 g/mol (ADB-BUTINACA) olarak tespit edilmiş olup, analizlerde proton eklenmiş $[M+H]^+$ iyonları öncül iyon olarak seçilmiştir. Dolayısıyla MDMB-4en-

PINACA için 358,2 m/z, ADB-BUTINACA için ise 331,2 m/z öncül iyonları kullanılmıştır. Bu öncül iyonlar, MS/MS sisteminde parçalanmaya tabi tutularak karakteristik ürün iyonları elde edilmiştir.

Ürün iyonları incelendiğinde, MDMB-4en-PINACA için 298,2 ve 213,1 m/z; ADB-BUTINACA için ise 202,1 ve 145,0 m/z iyonları belirlenmiştir. Bu değerler, ilgili bileşiklerin tanımlanmasında yüksek seçicilik sağlamak ve metod doğrulama açısından önem taşımaktadır. Aynı bileşik için birden fazla ürün iyonu kullanılması, yöntemin güvenilirliğini artırmakta ve matris kaynaklı girişimlerin minimize edilmesine katkı sağlamaktadır (Liyong ve ark., 2022).

MS parametreleri arasında yer alan Q1, çarpışma enerjisi (ÇE) ve Q3 voltajları, iyonların etkin parçalanması için optimize edilmiştir. Her iki bileşik için Q1 değeri sabit olarak -16 V seçilmiş olup, iyonların öncül olarak seçilmesinde standartlaştırılmış bir enerji düzeyi kullanılmıştır. ÇE ve Q3 değerleri ise analiz edilen ürün iyonlarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, MDMB-4en-PINACA'nın 298,2 m/z iyonu için ÇE -20 V ve Q3 -26 V iken, 213,1 m/z iyonu için bu değerler sırasıyla -31 V ve -26 V olarak belirlenmiştir. ADB-BUTINACA durumunda ise 202,1 m/z için ÇE -18 V, Q3 -24 V; 145,0 m/z için ise ÇE -25 V ve Q3 -29 V olarak optimize edilmiştir.

AS kromatogramlarda piklerin gözlenmesi için geçen süreyi ifade etmektedir. MDMB-4en-PINACA'nın AS 7,8 dakika olarak belirlenirken, ADB-BUTINACA için bu süre 5,8 dakika olarak belirlenmiştir. Bu fark, bileşiklerin yapısal özelliklerindeki farktan ve taşıyıcı fazla olan etkileşimlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, her iki analit için geliştirilen analiz parametreleri, bileşiklerin LC-MS/MS sistemi ile başarılı bir şekilde tespit edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu parametrelerin optimize edilmesi, özellikle adli toksikoloji uygulamalarında hedef analitlerin düşük konsantrasyonlarda dahi güvenilir bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlaması açısından önemlidir.

4.6. Yöntem Validasyonunun Değerlendirilmesi

Yöntem validasyonunun önemli bir göstergesi olan seçicilik değerlendirmeleri sonucunda, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin hem MDMB-4en-PINACA hem de ADB-BUTINACA için yüksek analitik seçicilik sağladığı belirlenmiştir. Analit içermeyen boş kan ve idrar numuneleri üzerinde gerçekleştirilen analizlerde, hedef bileşiklere ait herhangi

bir interferans sinyaline rastlanmamıştır. Bu bulgu, yöntemin seçiciliğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Ayrıca, toplam iyon kromatogramları ve çoklu tepkime izleme (MRM) kromatogramlarında, analitlerin AS'nde hedef dışı pik gözlemlenmemesi; yöntemin hem seçici hem de girişimlere karşı dirençli olduğunu doğrulamaktadır. Tüm bu veriler, yöntemin karmaşık biyolojik matrislerde dahi güvenilir sonuçlar verebildiğini göstermektedir.

Şekil 12 ve Şekil 13'te ise sırasıyla boş kan ve idrar numunelerine ait toplam iyon kromatogramları gösterilmiştir. Sunulan kromatogramlar, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliğini değerlendirmek amacıyla analiz edilen boş kan ve idrar numunelerine ait toplam iyon kromatogramlarıdır. Her üç kromatogramda da MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın AS'lerine karşılık gelen bölgelerde herhangi bir sinyalin bulunmaması, yöntemle tespit edilebilecek düzeyde girişimci piklerin olmadığını göstermektedir. Böylece, hem kan hem de idrar matrislerinde hedef bileşiklere özgü sinyallerin başka bir madde ile örtüşmediği, yani yöntemsel seçiciliğin sağlandığı doğrulanmıştır. Ayrıca farklı matris kaynaklarından alınan numunelerde benzer sonuçların elde edilmesi, yöntemin matris çeşitliliğine karşı tutarlılığını ve biyolojik girişimlere karşı dayanıklılığını ortaya koymaktadır. Bu bulgular doğrultusunda, LC-MS/MS yöntemi ile yürütülen analizlerde elde edilen sonuçların, güvenilir bir şekilde MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'yı saptamaya olanak verdiği söylenebilir. Bu nedenle, söz konusu kromatogramlar yöntemin adli toksikoloji uygulamaları açısından yüksek seçiciliğe sahip olduğunu desteklemektedir.

Şekil 14 ve Şekil 15'te ise sırasıyla 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan numuneleri için AS'ni gösteren kromatogramlar, Şekil 16 ve Şekil 17'de sırasıyla 1 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar numuneleri için AS'ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.

Şekil 18 ve Şekil 19'da ise sırasıyla 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş kan numuneleri için AS'ni gösteren kromatogramlar, Şekil 21 ve Şekil 22'de sırasıyla 10 ng/mL MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA ilave edilmiş boş idrar numuneleri için AS'ni gösteren kromatogramlar verilmiştir.

Şekil 14 ile Şekil 21 arasındaki kromatogramlardan beklendiği gibi artan analit konsantrasyonları ile sadece pik alanlarının arttığı gözlenmiştir. Bu artışın 5 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 35 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonları için de geçerli olduğu

belirlenmiştir. Bu ilişkiden faydalanılarak her iki analit için 1-50 ng/mL aralığında doğrusallık gösteren kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir.

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi kapsamında, analitlerin kantitatif olarak güvenilir şekilde belirlenebilirliğini değerlendirmek amacıyla 1–50 ng/mL aralığında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Bu aralık, hem MDMB-4en-PINACA hem de ADB-BUTINACA'nın biyolojik numunelerdeki olası toksikolojik düzeylerini temsil edebilecek niteliktedir. Kan ve idrar gibi karmaşık biyolojik matrislerde gerçekleştirilen ölçümlerde, her iki analit için de elde edilen kalibrasyon eğrileri yüksek doğrusal uyum göstermiş ve korelasyon katsayısı (r^2) tüm analizlerde $> 0,9980$ olarak bulunmuştur. Bu yüksek korelasyon katsayısı, yöntemle elde edilen pik alanları ile analit konsantrasyonu arasında güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir doğrusal ilişki bulunduğunu göstermektedir. Bu durum, yöntemin nicel analiz açısından güvenilir olduğunu ve hedeflenen analitlerin geniş konsantrasyon aralığında doğrulukla tayin edilebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, kalibrasyon eğrilerinin regresyon doğruluğu sadece yöntemin doğrusallık kriterini sağlamakla kalmamış, aynı zamanda biyolojik numunelerdeki olası matris etkilerine rağmen ölçüm hassasiyetinin korunduğunu da kanıtlamıştır. Bu bulgular, yöntemin hem düşük hem de yüksek konsantrasyon düzeylerinde tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar üretebildiğini göstermektedir. Söz konusu kalibrasyon eğrilerine ilişkin grafiksel veriler Şekil 22, 23, 24 ve 25'te detaylı biçimde sunulmuştur.

S/N, bir analitik ölçüm sisteminin duyarlılığını ve düşük konsantrasyonlardaki analitleri algılayabilme yeteneğini değerlendirmede kullanılan temel bir parametredir. LC-MS/MS yöntemleri başta olmak üzere tüm analitik cihazlarda, sinyal yüksekliği genellikle analite ait kromatografik pikten alınırken, gürültü ise aynı kromatogramda, analitin AS'ne yakın ancak analit içermeyen bir bölgede ölçülen rastgele sinyal dalgalanmaları olarak tanımlanır. S/N oranı Eşitlik 8'deki formülle hesaplanır.

$$S/N = \text{Pik yüksekliği} / \text{Baz çizgisi gürültü yüksekliği} \quad (8)$$

Bu hesaplamada, “pik yüksekliği”, sinyalin pik noktası ile baz çizgisi arasındaki dikey mesafeyi temsil eder. “Gürültü yüksekliği” ise analiz süresince baz çizgisinde meydana gelen rastgele dalgalanmaların ortalama genliğidir. Alternatif olarak bazı sistemlerde pik alanı da kullanılabilir, fakat en yaygın yaklaşım pik yüksekliğine dayalıdır. Bu oran, analitin mevcut sistemle tespit edilebilirliğini ve tayin edilebilirliğini

belirlemek için temel kriter olarak kullanılır. Literatürde genel kabul gören değerlere göre; LOD için $S/N \geq 3$ ve LOQ için $S/N \geq 10$ olmalıdır (SWGTOX, 2013).

Geliştirilen LC-MS/MS sisteminin analitik duyarlılığı S/N oranı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için 1 ng/mL düzeyinde standart ilave edilmiş kan numuneleri üzerinde analizler gerçekleştirilmiş ve S/N oranları hesaplanmıştır. S/N oranlarının belirlenmesinde, analite ait kromatografik pik yüksekliği (sinyal) ile aynı kromatogram üzerinde, analitin AS'ne yakın ve analitin bulunmadığı bir bölgede ölçülen baz çizgisi dalgalanması (gürültü) yüksekliği esas alınmıştır. Bu hesaplama cihaz tarafından yapılmıştır.

Elde edilen veriler doğrultusunda, MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için ortalama S/N oranları Tablo 6'da gösterilmiştir. Tablo 6'daki S/N değerleri, ölçüm sistemlerinin duyarlılık değerlendirmelerinde yaygın olarak referans alınan eşik değerlerin üzerindedir. Nitekim, uluslararası validasyon kılavuzlarında (örneğin FDA, EMA ve SWGTOX) bir bileşiğin LOD değerinin kabul edilebilmesi için S/N oranının en az 3, LOQ için ise en az 10 olması gerektiği belirtilmektedir. Bu bağlamda, elde edilen S/N oranları Tablo 6'dan görüldüğü gibi MDMB-4en-PINACA için kan nümüneleri için 485, idrar numuneleri için 483 olarak bulunmuştur. ADB-BUTINACA için kan nümüneleri için 373, idrar numuneleri için 320 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar her iki analitin de kullanılan sistemle eser miktarlarda saptanabileceğini göstermektedir.

Geliştirilen yöntemlerin duyarlılığı da belirlenmiştir. Bu amaçla konsantrasyona dayalı LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Bunun için 11 adet boş numunenin analizleri yapılmıştır. Ortalama değere boş numunelerin sinyallerinin standart sapmasının üç ve on katı eklenerek sırasıyla yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

LOD ve LOQ değerleri hem kullanılan sistem için hem de geliştirilen yöntemler için hesaplanmıştır. Kullanılan sistemin LOD ve LOQ değerleri analitlerin S/N oranlarına göre yapılan ölçümlerde hesaplanmış ve Tablo 6'da verilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü gibi S/N oranlarına göre yapılan ölçümlerden MDMB-4en-PINACA için kan ve idrarda LOD değerleri sırasıyla 0,10 ng/mL ve 0,12 ng/mL, LOQ değerleri ise 0,33 ng/mL ve 0,38 ng/mL olarak belirlenmiştir. ADB-BUTINACA için kan ve idrar örneğinde LOD değeri 0,11 ng/mL, LOQ değeri 0,13 ng/mL bulunmuştur. LOQ değerleri ise 0,35 ng/mL ve 0,41 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu düşük tespit sınırları, kullanılan sistemin yüksek

hassasiyetle çalışabildiğini göstermektedir ve adli vakalarda eser miktarlardaki maddelerin dahi tespit edilebilmesini mümkün kılmaktadır.

Geliştirilen yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri Bölüm 4.7.3'te açıklandığı gibi konsantrasyona dayalı ölçümlerle 11 tanık numunenin analizinden hesaplanmıştır ve Tablo 6'da verilmiştir. Tablo 6'dan görüldüğü gibi yöntemin hem kan hem de idrar numunelerinde duyarlılığının yüksek olduğu hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinden açıkça görülmektedir. MDMB-4en-PINACA için kanda LOD değeri 1,29 ng/mL idrarda 1,33 ng/mL olarak bulunmuştur. MDMB-4en-PINACA için kanda LOQ değeri 1,65 ng/mL idrarda 1,70 ng/mL olarak belirlenmiştir. ADB-BUTINACA için kanda LOD değeri 0,60 ng/mL idrarda 0,63 ng/mL olarak bulunmuştur. ADB-BUTINACA için kanda LOQ değeri 0,79 ng/mL idrarda 0,83 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, geliştirilen yöntemin eser miktarlarda analitlerin güvenilir şekilde tespiti açısından yeterli performansa sahip olduğunu doğrulamaktadır.

Elde edilen LOD ve LOQ değerleri analitlerin adli vakalarda eser miktarlarının dahi tespit edilebilmesini mümkün kılmaktadır. Tablo 6'daki değerler, SWGTOX tarafından tanımlanan duyarlılık kriterlerini karşılamakta ve yöntemin eser düzeydeki analitleri güvenilir şekilde tespit edebileceğini göstermektedir.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğu, ekleme geri kazanım çalışmaları ile gösterilmiştir. Bunun için boş numunelere bilinen miktarlardaki analitlerin standartları ilave edilerek, eklenmiş numuneler hazırlanmış ve sonra bu numuneler optimize edilen şartlarda analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçlarından eklenen miktarın ne kadarının bulunabildiği hesaplanmış ve bu değerler %GK olarak ifade edilmiştir. Tablo 7 ve Tablo 8'de sırasıyla en uygun KFE yöntemi olduğu belirlenen KFE 3 yöntemi ile MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için kan ve idrarda yapılan ekleme geri kazanım çalışmaları sonucunda bulunan %GK sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 7'den görüldüğü gibi MDMB-4en-PINACA için düşük konsantrasyondaki (1 ng/mL) kan ve idrardaki ölçümlerden bulunan %GK değerleri sırasıyla %92,1 ve %88,8 olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (50 ng/mL) ise bu değerler %94,5 ve %89,2 olarak hesaplanmıştır. Tablo 8'den görüldüğü gibi ADB-BUTINACA için düşük konsantrasyondaki (1 ng/mL) kan ve idrardaki ölçümlerden bulunan %GK değerleri sırasıyla %96,6 ve %92,3 olarak bulunurken yüksek konsantrasyonlarda (50 ng/mL) ise bu değerler sırasıyla %92,1 ve %93,5 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7 ve Tablo 8'deki sunulan %GK sonuçları, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin biyolojik matrislerdeki MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın tayininde hem düşük hem de yüksek konsantrasyon düzeyinde yüksek doğruluk sağladığını göstermektedir.

Her iki analit için de kan ve idrar numunelerinden elde edilen %GK değerleri, analitik yöntem validasyonu açısından uluslararası kılavuzlarda (örneğin SWGTOX, FDA) kabul gören değerler arasında kalmaktadır. Bu durum, geliştirilen yöntemin biyolojik numunelerde analitlerin güvenilir şekilde tayinine olanak sağladığını ve özellikle adli toksikoloji gibi düşük konsantrasyonların kritik öneme sahip olduğu alanlarda başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

Geliştirilen yöntemlerin kesinliği gün içi ve günler arası ölçümlerle belirlenmiştir ve %BSS olarak ifade edilmiştir. Tablo 9 ve Tablo 10'da önerilen yöntemlerin kesinlik sonuçlarını vermektedir.

Tablo 9 ve Tablo 10'da sunulan veriler, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin hem gün içi (intra-day) hem de günler arası (inter-day) kesinlik açısından düşük %BSS değerleri gösterdiğini ortaya koymaktadır. MDMB-4en-PINACA analiti için kan ve idrar numunelerinde gerçekleştirilen tekrar analizlerinde elde edilen %BSS değerleri, hem düşük (1 ng/mL) hem de yüksek (50 ng/mL) konsantrasyon seviyelerinde oldukça düşüktür. Kan numunelerinde düşük konsantrasyon düzeyinde %BSS değerleri gün içi analizlerde %2,7, günler arası analizlerde ise %3,9 olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda ise bu değerler sırasıyla %1,1 ve %3,4'tür. İdrar numunelerinde %BSS oranları 1 ng/mL düzeyinde gün içi %2,0, günler arası %5,3; 50 ng/mL düzeyinde ise sırasıyla %3,3 ve %3,4 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, yöntemin hem tekrarlanabilirlik hem de yeniden üretilebilirlik açısından güvenilirliğini doğrulamaktadır.

Benzer şekilde, ADB-BUTINACA için gerçekleştirilen kesinlik değerlendirmelerinde de tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Kan numunelerinde 1 ng/mL seviyesinde %BSS, gün içi analizlerde %4,9, günler arası analizlerde %7,2 olarak hesaplanmıştır. 50 ng/mL düzeyinde ise %BSS değerleri sırasıyla %1,5 ve %4,1'dir. İdrar numuneleri için yapılan ölçümlerde düşük konsantrasyonda %BSS gün içi analizlerde %5,0, günler arası analizlerde %5,3; yüksek konsantrasyonda ise sırasıyla %6,9 ve %7,4 olarak bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, analitik yöntem validasyonu açısından uluslararası geçerliliği bulunan kılavuzlara (örneğin SWGTOX, FDA) göre önerilen %15'lik sınır

değerlerin oldukça altında kalarak, ADB-BUTINACA için geliştirilen yöntemin de farklı günlerde, farklı matrislerde yüksek derecede kesinlikle ölçülebildiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, her iki analit için elde edilen %BSS değerleri, yöntemin hem klinik hem de adli toksikoloji uygulamalarında güvenle kullanılabileceğini ve özellikle düşük konsantrasyonlu analizlerde dahi ölçüm güvenilirliğinden ödün vermediğini güçlü bir biçimde desteklemektedir.

Analit kararlılığına ilişkin elde edilen veriler, geliştirilen yöntemin numune hazırlığı sonrası süreçlere karşı yüksek düzeyde dayanıklılık sergilediğini ortaya koymuştur. Otonumuneleyici koşullarında, ekstrakte edilmiş kan ve idrar numunelerinin 24 saatlik süre boyunca sistemde bekletilmesi sonucu elde edilen sinyal alanlarında, MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA için %10'un üzerinde anlamlı bir sinyal kaybı gözlemlenmemiştir. Bu bulgu, analitlerin gün içi ekstraksiyon kararlılıklarının korunabildiğini ve sistematik analizlerde zamana bağlı bozunmaya karşı dirençli olduklarını göstermektedir. Özellikle yüksek sıcaklık, ışık veya çözücü buharı gibi çevresel etkenlerin etkili olabileceği bu bekleme koşullarında dahi analit yanıtlarının kararlılığını sürdürmesi, yöntemin pratik laboratuvar uygulamaları açısından önemli bir avantaj sunduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu durum adli toksikoloji bağlamında, yoğun numune akışının olduğu analiz ortamlarında numunelerin sıralı analizler öncesinde otonumuneleyici içinde belirli bir süre beklemesine rağmen güvenilir sonuçlar alınabileceğini göstermesi açısından da anlamlıdır. Literatürde benzer çalışmalarda da kısa süreli kararlılığın korunmasının, yöntemin rutin kullanım uygunluğunun en önemli göstergelerinden biri olduğu vurgulanmaktadır (SWGTOX, 2013). Bu yönüyle, geliştirilen yöntem yalnızca duyarlılık ve seçicilik bakımından değil, aynı zamanda uygulama süreci boyunca analitik güvenilirliği koruma açısından da yeterlilik göstermiştir.

Biyolojik matris bileşenlerinin etkisinin belirlenmesi için KFE 3 yöntemine göre ekstraksiyon işlemi uygulanmış belli miktarda analit içeren boş numuneler ve standartlarla hazırlanan numunelerin analizlerinin sonuçlarından %ME değerleri hesaplanmıştır. Böylece ölçümler üzerinde ME olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir ve Bölüm 4.5'te tartışılmıştır.

Taşıyıcı etki, yüksek konsantrasyonlu numune analizinden sonra gelen boş numunelerde hedef analitin saptanıp saptanmadığına bakılarak test edilmiştir. Her iki analit için de taşıyıcı etki gözlenmemiştir. Ard arda yapılan ölçümler taşıyıcı etkinin analitik olarak ihmal edilebilir düzeyde olduğunu, kullanılan cihazın ve analiz koşullarının

numuneler arası bulaşmayı engelleyecek şekilde yeterli temizliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum, LC-MS/MS sisteminde kontaminasyon riskinin olmadığını ve arka arkaya güvenli analiz yapılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak tüm validasyon parametreleri; SWGTOX 2013, EMA 2011 ve FDA 2018 rehberlerinde belirtilen uluslararası kabul görmüş sınırlarla uyumludur. Geliştirilen yöntemler, yüksek doğruluk, duyarlılık ve seçicilikte çalışarak MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA'nın kan ve idrarda güvenilir biçimde tespitini sağlamaktadır. Böylece önerilen yöntemler klinik ve adli toksikoloji uygulamaları için uygun ve güvenilir bir analiz metodu olma özelliğine sahiptir.

4.7. Gerçek Numunelerde Yöntemlerin Uygulanabilirliği

Geliştirilen ve valide edilen KFE destekli LC-MS/MS yöntemleri, yalnızca laboratuvar ortamında hazırlanan kontrol numunelerinde değil, aynı zamanda gerçek biyolojik numunelerde de uygulanarak pratik geçerliliği test edilmiştir. Bu kapsamda, ilgili analitleri kullanmadığı bilinen ve çalışmaya gönüllü olarak katılan bireylerden alınan kan ve idrar numuneleri ile adli vakalardan elde edilen biyolojik materyaller analiz edilmiştir. Gönüllü numunelerinde herhangi bir SK tespiti yapılmazken, adli vakalara ait numunelerde MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA tespit edilmiştir. Adli vakalardan elde edilen numunelerin analiz sonuçları Tablo 11'de verilmiştir. Tablo 11'deki ölçüm sonuçları, önerilen yöntemlerin sadece kontrollü laboratuvar koşullarında değil, adli vakalarda karşılaşılan karmaşık biyolojik numunelerde de başarılı bir şekilde uygulanabildiğini ortaya koymaktadır.

4.8. Yöntemin Literatürle Karşılaştırması ve Adli Laboratuvarlarda Kullanım Potansiyeli

Son yıllarda SK'lerin analitik tespiti üzerine yapılan çalışmalarla, özellikle MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA gibi bileşiklerin biyolojik numunelerdeki varlığını saptamak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmalar, geliştirilen yöntemlerin duyarlılığı, seçiciliği ve uygulanabilirliği açısından önemli bilgiler sunmaktadır (Wang ve ark., 2022).

Yang ve arkadaşları, insan saç numunelerinde 65 farklı SK'nin tespiti için LC-MS/MS tabanlı bir yöntem geliştirmiş ve bu yöntemin adli vakalarda başarılı bir şekilde uygulandığını bildirmiştir. Benzer şekilde, Liying ve arkadaşları, saç numunelerinde 29 SK ve metabolitinin UPLC-MS/MS yöntemiyle analizini gerçekleştirmiştir. Ancak saç numuneleri, genellikle kronik kullanımın göstergesi olup, akut zehirlenme durumlarının belirlenmesinde sınırlı bilgi sağlamaktadır. Bu nedenle, kan ve idrar gibi numunelerin tercih edilmesi, akut toksikolojik durumların değerlendirilmesi açısından daha avantajlıdır (Yang ve ark., 2024; Liying ve ark., 2022).

MDMB-4en-PINACA'nın metabolik profili üzerine yapılan bir çalışmada, bu bileşiğin ester grubunun hızlı şekilde hidrolize uğrayarak aktif metabolitlere dönüştüğü ve bu nedenle yalnızca ana bileşiğin değil, metabolitlerinin de analizde dikkate alınmasının gerektiği bildirilmiştir (Yeter & Öztürk, 2020). ADB-BUTINACA'nın metabolizması üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, bu bileşiğin lipofilik yapısı nedeniyle biyolojik numunelerde uzun süre kalabildiği, ancak tespitinin immünolojik analiz yöntemleri gibi klasik yöntemlerle zorlaştığı belirtilmiştir (Kavanagh ve ark., 2022).

Tablo 12'de literatürdeki ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA'nın sadece kan ve idrar numunelerinde tayinine yönelik kromatografik yöntemlerin bir karşılaştırması sunulmaktadır. Günümüze kadar, bu SK'lerin kan veya idrar gibi biyolojik matrislerde kantitatif analizine yönelik geliştirilen analitik yöntemlerin sayısı oldukça sınırlıdır (Du ve ark., 2024; Giorgetti ve ark., 2022; Simon ve ark., 2023).

Tablo 12. İdrar ve kandaki ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA'nın belirlenmesine yönelik literatürdeki kromatografik yöntemlerin karşılaştırılması

SK	Numune	Metot	Numune hazırlama	İyonizasyon modu	Mobil faz / kolon	AS (min.)	LOD (ng/mL)	DA (ng/mL)	Ref.
ADB-BUTINACA	Sıçan plazması	UPLC-MS/MS	Asetonitrille protein çöktürmesi	ESI (+)	Asetonitril ve su (0,1% formik asit) / UPLC BEH C18 ((2,1 mm × 50 mm, 1,7 µm)	1,7	0,3	1-1000	Du ve ark., 2024
MDMB-4en-PINACA	Kan	LC-MS/MS	Asetonitrille protein çöktürmesi	ESI (+)	Mobil faz A, 0,1% formik asit (suda); Mobil faz B, 0,1% formik asit (asetonitrilde) / Waters HSS C18 (1,8 µm, 2,1 × 150 mm)	12,8	0,17	0,25-10	Giorgetti ve ark., 2022
MDMB-4en-PINACA	Kan, idrar	SFC-MS/MS	SALLE	ESI (+)	Karbondioksit (A) ve 10 mM amonyum hidroksit, ve 12 mM formik asit metanol/su (97,2/2,8, v/v) (B) / Waters ACQUITY Torus™ DIOL (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm)	1,030	0,09	0,15-50	Simon ve ark., 2023
ADB-BUTINACA, MDMB-4en-PINACA	Kan, idrar	LC-MS/MS	KFE	ESI (+)	Mobil faz A (A): 5 mL of 1M Amonyum asetat, 2.5 mL formik asit, ve 125 mL methanol (2.5 L suda). Mobil faz (B): Metanol / Raptor Biphenyl (2.1 × 100 mm, 2.7 µm)	5,8 7,8	0,60 (kan), 0,63 (idrar) 1,29 (kan), 1,33 (idrar)	1-50	Bu çalışma

DA: Doğrusal aralık

Bildirilen yöntemler genellikle UPLC-MS/MS, LC-MS/MS veya SFC-MS/MS sistemlerini kullanmakta olup, numune hazırlama aşamasında asetonitril ile protein çöktürme ya da SALLE yöntemleri tercih edilmektedir (Du ve ark., 2024; Giorgetti ve ark., 2022; Simon ve ark., 2023). ADB-BUTINACA için geliştirilen UPLC-MS/MS yöntemi yalnızca sıçan plazmasında uygulanmış olup, insan biyolojik matrislerinde geçerlilik kazanmamıştır. Bu durum, yöntemin adli ve klinik toksikoloji alanlarındaki uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır (Du ve ark., 2024). Her ne kadar bu yöntem 0,3 ng/mL gibi kabul edilebilir bir LOD değeri sunmuş olsa da, insan numunelerinde rutin kullanım açısından sınırlı bir geçerliliğe sahiptir (Du ve ark., 2024). Benzer şekilde, MDMB-4en-PINACA için bildirilen LC-MS/MS yöntemi yalnızca kan numunelerinde kullanılmış; idrar analizine yönelik bir uygulama yapılmamıştır (Giorgetti ve ark., 2022). Mevcut çalışmalar arasında, yalnızca bir adet SFC-MS/MS yöntemi hem kan hem de idrar matrislerinde MDMB-4en-PINACA'nın tayini için bildirilmiştir (Simon ve ark., 2023). Bu SFC-MS/MS yöntemi, MDMB-4en-PINACA için yüksek duyarlılık göstermesine rağmen, LC-MS/MS ile kıyaslandığında bazı donanımsal sınırlamalara sahiptir. SFC sistemlerinde, ana hareketli faz olarak süperkritik karbondioksit kullanılmakta ve bu genellikle metanol gibi organik değiştiricilerle kombine edilmektedir. Bu da yüksek basınçlı CO₂ pompaları ve sıcaklık kontrollü geri basınç düzenleyicileri gibi özel ekipmanlar gerektirir. Bu kurulum, sistemin hem işletme karmaşıklığını hem de bakım gereksinimlerini artırmaktadır. Ayrıca, SFC sistemleri rutin toksikoloji laboratuvarlarında LC-MS/MS kadar yaygın bulunmamaktadır. Tüm bu faktörler, SFC-MS/MS yönteminin yüksek numune kapasiteli adli ya da klinik uygulamalarda pratik kullanımını zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmada, ADB-BUTINACA ve MDMB-4en-PINACA'nın hem kan hem de idrar numunelerinde eş zamanlı kantitatif analizi için KFE kullanılan, yeni ve sağlam bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, kandaki LOD değerlerini 0,60 ile 1,29 ng/mL; idrardaki LOD değerlerini ise 0,63 ile 1,33 ng/mL arasında olduğu gözlemlenmiştir ve 1–50 ng/mL arasında doğrusal bir dinamik aralık sunmuştur. Ayrıca önerilen bu yöntem, bazı önemli avantajlar sunmaktadır: Yaygın olarak bulunabilen reaktiflerle uyumluluk, basitleştirilmiş numune hazırlığı ve özel ekipman gerektirmemesi önemli avantajlardır. Ayrıca, 5,8 ile 7,8 dakika arasında değişen AS sayesinde, yöntem oldukça hızlı bir analiz süresi sunmakta olup, yüksek numune hacimli toksikolojik uygulamalarda önemli avantajlar sağlamaktadır.

Sunulan çalışmada geliştirilen LC-MS/MS tabanlı analitik yöntemler, SWGTOX'un (2013) belirlediği adli toksikoloji analizlerine yönelik validasyon kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemlerle, düşük konsantrasyonlu maruziyetlerin bile başarılı şekilde analiz edilebildiği gösterilmiştir. Örneğin, MDMB-4en-PINACA için kan ve idrarda sırasıyla $r^2 = 0.996$ ve 0.988 , ADB-BUTINACA için $r^2 = 0.998$ değeri elde edilmiştir. Bu değerler, SWGTOX'un doğruluk ve linearite açısından öngördüğü $r^2 \geq 0.99$ sınırlarını karşılayacak düzeyde yüksek korelasyon göstermektedir (SWGTOX, 2013). Ayrıca, bu yöntemlerin doğruluk ve kesinlik parametrelerinde $\pm 15\%$ ve $\%BSS < 5$ hedefi başarıyla sağlanmıştır. Uygulanan analitik yöntem doğrultusunda elde edilen veriler, hedef analitlerin yüksek düzeyde $\%GK$ ile birlikte düşük $\%BSS$ değerleri sergilediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, yöntemin hem doğruluk hem de kesinlik açısından tatmin edici bir performans sunduğunu göstermekte olup; elde edilen sonuçlar, SWGTOX 2013 gibi uluslararası geçerliliği olan validasyon kılavuzlarında belirtilen kabul edilebilir sınırlar ile de uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, literatürdeki mevcut çalışmalar, geliştirilen LC-MS/MS yöntemlerinin SK'lerin tespiti açısından yüksek duyarlılık ve seçicilik sunduğunu göstermektedir. Ancak, bu yöntemlerin uygulanabilirliği, kullanılan biyolojik numune türüne, laboratuvar altyapısına ve teknik uzmanlığa bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu nedenle, yöntemlerin standartlaştırılması ve farklı laboratuvarlarda uygulanabilirliğinin artırılması, adli toksikoloji alanında önemli bir adım olacaktır.

5. SONUÇ

Bu doktora tezi kapsamında, hem Türkiye’de hem de dünya genelinde son yıllarda giderek yaygınlaşan ve halk sağlığını tehdit eden yeni nesil SK’lerden MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA’nın kan ve idrar numunelerinde güvenilir biçimde analizine olanak sağlayan, KFE temelli ve yüksek duyarlılıklı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve uluslararası geçerliliğe sahip kriterler çerçevesinde valide edilmiştir.

Çalışmanın başlangıcında, literatürde yaygın şekilde kullanılan DSSE yöntemi değerlendirilmiş; ancak bu yöntemin özellikle analitik duyarlılık, temiz ekstrakt elde etme kapasitesi ve tekrar edilebilirlik açısından yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle daha yüksek verimlilik sunan KFE yöntemine yönelinmiş ve farklı marka kolonlar karşılaştırılmıştır. Yapılan kıyaslamalarda, OASIS HLB marka kartuş, GK gerekse matris ME açısından diğer kartuşlara kıyasla daha üstün performans göstermiştir. Bu kartuş kullanılarak hem kan hem de idrar numunelerinden yüksek verimlilikle analit geri kazanımı sağlanmış, %BSS değerleri ise %7,4’ün altında kalmıştır. Ayrıca elde edilen ekstraktlar LC-MS/MS cihazına yüksek temizlikte sunulabildiğinden, cihaz performansında sapma veya kontaminasyon riski oluşmamıştır.

Geliştirilen yöntem, SWGTOX 2013 validasyon kılavuzuna göre değerlendirilmiş ve tüm validasyon parametreleri açısından uluslararası standartlara uygunluk göstermiştir. Doğrusal aralık 1–50 ng/mL, LOD/LOQ değerleri 0,60–1,65 ng/mL, doğruluk, kesinlik, taşıyıcı etki, ME ve stabilite ölçümleri bakımından elde edilen veriler, yöntemin hem analitik hem de operasyonel düzeyde güvenilir olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Bu yöntemin en güçlü yönlerinden biri, gerçek adli vakalardan elde edilen kan ve idrar numunelerinde başarıyla uygulanmış olmasıdır. Elde edilen bulgulara göre, eser düzeylerde bulunan MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA bileşikleri net ve güvenilir şekilde tespit edilmiş; böylece yöntemin sahada ve rutin adli toksikoloji uygulamalarında kullanılabilirliği somut biçimde gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen LC-MS/MS yöntemi, literatürde yaygın olarak kullanılan GC-MS, UPLC-MS/MS gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında; analiz hızı, hassasiyet, seçicilik ve örnek hazırlama kolaylığı açısından avantaj sunmaktadır. Özellikle DSSE gibi klasik yöntemlerle kıyaslandığında, KFE destekli yaklaşımın hem ekstraksiyon verimliliği hem de LC-MS/MS cihaz performansı açısından üstün olduğu görülmüştür. Saç, tükürük veya doku

gibi alternatif biyolojik örneklerle yapılan bazı literatür çalışmalarında bu türden yöntemlerin sınırlamaları öne çıkarken; bu tezde tercih edilen kan ve idrar matrisleri, hem akut hem de geçmişe dönük maruziyetlerin güvenilir şekilde değerlendirilmesine imkân tanımıştır.

Yöntemin bir diğer avantajı, analitik doğruluk ile birlikte hızlı sonuç üretme kapasitesidir. Kantitatif analizlerde uygun bir doğrusal aralık sunan yöntem, KFE'nin otomasyona uygun doğası sayesinde yüksek numune sayılarının rutin olarak işlendiği laboratuvar ortamlarında pratik biçimde uygulanabilmektedir. Bu yönüyle, yalnızca araştırma laboratuvarlarında değil, adli tıp kurumları, cezaevi sistemleri ve acil servisler gibi yoğun numune trafiği olan birimlerde de kullanım potansiyeli taşımaktadır. Bununla birlikte, yöntemin bazı sınırlılıkları da mevcuttur. En belirgin sınırlama, LC-MS/MS gibi yüksek maliyetli ve teknik altyapı gerektiren cihazlara ihtiyaç duymasıdır. Bu tür cihazlar hâlihazırda yalnızca sınırlı sayıda merkezde bulunmaktadır. Ayrıca yöntemin uygulanması, ileri düzey kromatografi ve kütle spektrometrisi bilgisi gerektirdiğinden, nitelikli uzman personel ihtiyacı doğurmaktadır. Bir diğer sınırlama ise, çalışmanın yalnızca iki SK bileşiğine (MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA) odaklanmasıdır. SK piyasası sürekli yeni türevlerle genişlediğinden, yöntemin uzun vadede sürdürülebilirliği açısından bu sınırlılık önemlidir. Bu kapsamda, gelecekte yöntemin kapsamı genişletilerek farklı SK bileşikleri ve metabolitlerini içerecek biçimde optimize edilmesi, adli toksikoloji alanında daha kapsamlı analizlerin yapılabilmesini sağlayacaktır. Ayrıca yöntemin tükürük, saç, ter gibi farklı biyolojik örneklerde uygulanabilirliğinin test edilmesi, taşınabilir analiz sistemlerine entegrasyonunu mümkün kılacaktır. Geliştirilen metodun hızlı tarama testleriyle entegrasyonu, ön tarama ve doğrulama sistemlerinin birlikte çalışmasını sağlayarak adli karar süreçlerine daha güçlü bilimsel destek sunabilir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu tez kapsamında geliştirilen KFE destekli LC-MS/MS yöntemi; bilimsel geçerliliği, saha uygulanabilirliği ve kamu sağlığına katkı potansiyeliyle, yeni nesil SK'lerin adli toksikoloji bağlamında doğru, hızlı ve güvenilir biçimde analizine olanak tanıyan değerli bir yöntem olarak literatüre kazandırılmıştır.

6. ÖNERİLER

Geliştirilen yöntemin etkinliği ve uygulanabilirliği dikkate alındığında, gelecekte yapılacak çalışmalar için bazı öneriler geliştirilmiştir. Öncelikle, mevcut yöntem yalnızca MDMB-4en-PINACA ve ADB-BUTINACA bileşenlerini hedef alacak şekilde optimize edilmiştir. Oysa SK'ler kimyasal yapılar açısından hızla çeşitlenmekte ve piyasaya sürekli yeni türevler sürülmektedir. Bu nedenle, yöntemin kapsamı ilerleyen çalışmalarda genişletilip ve daha fazla bileşik grubunu içerecek şekilde revize edilebilir. Ayrıca, bu tezde yalnızca antemortem yani ölüm öncesi kan ve idrar numuneleri üzerine odaklanılmıştır. Fakat posmortem kan ve idrar biyolojik numunelerin de dahil edilmesi, yöntemin çok yönlülüğünü artıracak ve farklı durumlarda uyarlanmasını sağlayacaktır. Bu sayede sentetik kannabinoidlerin ölümlü vakalarda hangi dozlarda gerçekleştiğinin sorusuna cevap bulunabilecektir.

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi doğrulama analizler için son derece uygundur. Ancak ön tarama testleriyle entegrasyon sağlanarak adli toksikoloji laboratuvarlarında hem zaman hem de maliyet açısından daha verimli analiz süreçleri oluşturulabilir. Yöntemin özellikle adli tıp kurumu, üniversite hastaneleri, kriminal inceleme laboratuvarları ve bağımlılıkla mücadele merkezlerinde standart protokol hâline getirilmesi mümkündür.

Son olarak, elde edilen veriler ve yöntem doğrultusunda, sağlık çalışanlarına, hukukçulara ve kolluk kuvvetlerine yönelik eğitimler düzenlenerek SK'lerin toplum sağlığı üzerindeki etkileri konusunda farkındalık oluşturulmalı ve bu sayede kamu sağlığına yönelik bütüncül bir yaklaşım geliştirilmelidir. Bu öneriler, geliştirilen yöntemin yalnızca akademik alanda değil, aynı zamanda toplumsal düzeyde de etkili bir araç hâline gelmesine katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Açıkkol, M. (2023). Adli toksikolojinin tanımı ve tarihsel gelişimi. İçinde S. Mercan & Z. Türkmen (Ed.), *Adli toksikoloji: Temel kavramlar ve prensipler* (s. 1–7). İstanbul: İÜC Yayınevi.
- Aegis Sciences Corporation. (2023). *Synthetic Cannabinoids*. <https://www.aegislabs.com/clinical-update/synthetic-cannabinoids-2/>.
- Agilent Technologies. (2013). *A robust LC/MS solution for quantitation of pesticides in food using the Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS*. Agilent Technologies.
- Agno Pharma. (2019). *Mass spectrometry in bioanalysis. Technical Briefs*. Erişim adresi: <https://agnopharma.com/technical-briefs/mass-spectrometry-in-bioanalysis/>.
- Ahmed, H., & Mujeebuddin, S. (2024). GC–MS/MS analysis of synthetic cannabinoids 5F-MDMB-PICA and 5F-CUMYL-PICA in forensic cases. *Bioanalysis*, 16(9), 401–413. <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0185>.
- Aldlgan, A. A., & Torrance, H. J. (2016). Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 444–457. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.025>.
- Badawy, M. E. I., El-Nouby, M. A. M., Kimani, P. K., & Rabea, E. I. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, 38(12), 1457–1487. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8>.
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. ResearchGate. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- Bhole, R. P., Jagtap, S. R., Chadar, K. B., & Zambare, Y. B. (2020). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique-A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(1), 505–516. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00097.9rjptonline.org>.
- Buszewski, B., & Szultka, M. (2012). Past, present, and future of solid phase extraction: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- Büyüktiryaki, S., Keçili, R., & Hussain, C. M. (2020). Functionalized nanomaterials in dispersive solid phase extraction: Advances & prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115893. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115893>.

- Campos, E. G. de, Costa, B. R. B. da, dos Santos, F. S., Monedeiro, F., & Alves, M. N. R. (2021). Alternative matrices in forensic toxicology: A critical review. *Forensic Toxicology*, 40, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00596-5>.
- Das, D., Gupta, U., & Das, A. K. (2012). Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 38, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.020>.
- De Luca, M. A., & Fattore, L. (2018). Therapeutic use of synthetic cannabinoids: Still an open issue? *Clinical Therapeutics*, 40(9), 1457–1466. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.08.002>.
- Diao, X., & Huestis, M. A. (2019). New synthetic cannabinoids metabolism and strategies to best identify optimal marker metabolites. *Frontiers in Chemistry*, 7, 109. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00109>.
- Djilali, E., Pappalardo, L., Posadino, A. M., Giordo, R., & Pintus, G. (2022). Effects of the Storage Conditions on the Stability of Natural and Synthetic Cannabis in Biological Matrices for Forensic Toxicology Analysis: An Update from the Literature. *Metabolites*, 12(9), 801. <https://doi.org/10.3390/metabo12090801>.
- Dokgöz, H. (Ed.). (2019). *Adli tıp & adli bilimler* (1. baskı, ss. 15–450). Akademisyen Kitabevi.
- D'Ovidio, C., Locatelli, M., Perrucci, M., Ciriolo, L., & Furton, K. G. (2023). LC-MS/MS application in pharmacotoxicological field: Current state and new applications. *Molecules*, 28 (5), 2127. <https://doi.org/10.3390/molecules28052127>.
- Du, Y., Ma, S., Chen, D., Wang, R., Wang, X., Wen, C., & Shen, X. (2024). Determination of ADB-BUTINACA in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application. *Acta Chromatographica*. <https://doi.org/10.1556/1326.2024.01223>.
- European Medicines Agency (EMA). (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr
- EMCDDA. (2022). *European Drug Report 2022: Trends and Developments*. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- EMCDDA. (2023). *European Drug Report 2023: Trends and Developments*. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2020). *European drug report 2020: Key issues*. Publications Office of the European Union.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2020). *EMCDDA initial report on the new psychoactive substance MDMB-4en-PINACA*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2021). *European drug report 2021: Trends and developments*. Publications Office of the European Union.

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2024). *European drug report 2024: Trends and developments*. Publications Office of the European Union.
- Fan, X., Zhang, J., Fu, X., Zhou, B., Xu, Z., Huang, H., ... & Liang, W. (2022). Analysis of synthetic cannabinoids in wastewater of major cities in China. *Science of The Total Environment*, 827, 154267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154267>.
- Ferrari Júnior, E., Leite, B. H. M., Gomes, E. B., Vieira, T. M., Sepulveda, P., & Caldas, E. D. (2022). Fatal cases involving new psychoactive substances and trends in postmortem toxicology in Finland. *Frontiers in Toxicology*, 2, Article 1033733. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.1033733>.
- Fort, C., Jourdan, T., Kemp, J., & Curtis, B. (2017). Stability of synthetic cannabinoids in biological specimens: Analysis through liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(5), 360–366. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx015>.
- Franz, F., Müller, K., Jechle, H., Angerer, V., Moosmann, B., & Auwärter, V. (2016). Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids. *Institute of Forensic Medicine, Forensic Toxicology, Medical Center – University of Freiburg*.
- Giakisikli, G., & Anthemidis, A. N. (2013). Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. *Analytica Chimica Acta*, 789, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.021>.
- Giorgetti A, Barone R, Pelletti G, Marco G, Pascali J, Haschimi B, Auwärter V (2022) Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the detection of 182 novel psychoactive substances in whole blood. *Drug Test Anal* 14:202–223 <https://doi.org/10.1002/dta.3170>.
- .Giorgetti, R., Zamboni, M., Chifari, S., & Busardo, F. P. (2020). Interpretation of forensic toxicology results in the context of new psychoactive substances. *Forensic Science International*, 308, 110127. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110127>.
- GTFCCh. (2009). *Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses*. German Society of Toxicological and Forensic Chemistry.
- Gu, K., Qin, S., Zhang, Y., Zhang, W., Xin, G., Shi, B., Wang, J., Wang, Y., & Lu, J. (2022). Metabolic profiles and screening tactics for MDMB-4en-PINACA in human urine and serum samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 220, 114985. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114985>.
- Henkel, K., et al. (2018). Full validation of a method for the determination of drugs of abuse in nonmineralized dental biofilm using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to postmortem samples. *Talanta*, 176, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.047>.
- Huestis, M. A., Gorelick, D. A., & Heishman, S. J. (2001). Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Archives of General Psychiatry*, 58(4), 322–328. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.4.322>.

- Huffman, J. W., Zengin, G., Wu, M.-J., Lu, J., Hynd, G., Bushell, K., et al. (2005). Structure–activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: Steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB2 receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(1), 89–112. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.09.050>.
- Javadi, G. (2022, October 4). *Tips for Developing Successful Solid Phase Extraction Methods*. Agilent Technologies.
- Kavanagh, P., Pechnikov, A., Nikolaev, I., Dowling, G., Kolosova, M., & Grigoryev, A. (2022). Detection of ADB-BUTINACA metabolites in human urine, blood, kidney and liver. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(6), 641–650. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab088>.
- Khan, W. A., Arain, M. B., & Soylak, M. (2020). Nanomaterials-based solid phase extraction and solid phase microextraction for heavy metals food toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111704. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111704>.
- Kronstrand, R., Norman, C., Vikingsson, S., Biemans, A., Crespo, B. V., Edwards, D., Fletcher, D., Gilbert, N., Persson, M., Reid, R., Semenova, O., Al Teneiji, F., Wu, X., Dahlén, J., NicDaéid, N., Tarbah, F., Sutcliffe, O. B., McKenzie, C., & Gréen, H. (2021). The metabolism of the synthetic cannabinoids ADB-BUTINACA and ADB-4en-PINACA and their detection in forensic toxicology casework and infused papers seized in prisons. *Drug Testing and Analysis*, 14 (4), 634–652. <https://doi.org/10.1002/dta.3203>.
- Krotulski, A. J., Mohr, A. L. A., & Logan, B. K. (2020). Retrospective Identification of Synthetic Cannabinoids in Forensic Toxicology Casework Using Archived High Resolution Mass Spectrometry Data. *Office of Justice Programs*. <https://www.ojp.gov/library/publications/retrospective-identification-synthetic-cannabinoids-forensic-toxicology>.
- Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., & Benyamina, A. (2017). Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.3/glafaye>.
- Lappas, N. T., & Lappas, C. M. (2021). Forensic toxicology: *Principles and concepts* (2nd ed.). Academic Press.
- Levine, B. (2020). Forensic toxicology: *Principles and applications*. Elsevier.
- Liyang, Z., Min, S., Baohua, S., Hang, C., Xin, W., Hongxiao, D., Ping, X., Yan S. (2022). Application of a UPLC–MS/MS method for quantitative analysis of 29 synthetic cannabinoids and their metabolites, such as ADB-BUTINACA and MDMB-4en-PINACA, in human hair in real cases. *Forensic Science International*, 331, 111139. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111139>.
- Mahdaviyalal, M., Petio, C., Staffilano, G., Mandrioli, R., & Protti, M. (2024). Innovative solid-phase extraction strategies for improving the advanced chromatographic determination of drugs in challenging biological samples. *Molecules*, 29(10), 2278. <https://doi.org/10.3390/molecules29102278>.

- Makriyannis, A., & Deng, H. (2001). Synthesis of AM-2201. *Legal High Inhaltsstoffe.de*.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d).
- Namera, A., Kawamura, M., Nakamoto, A., Saito, T., & Nagao, M. (2015). Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicology*, 33(2), 175–194. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0270-0>.
- Öztürk, Y. E., & Yeter, O. (2020). In vitro phase I metabolism of the recently emerged synthetic MDMB-4en-PINACA and its detection in human urine samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(9), 976–984. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa017>.
- Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Pérez-Acevedo, A. P., Hladun, O., Torres-Moreno, M. C., Muga, R., et al. (2018). Cannabinoids: From pot to lab. *International Journal of Medical Sciences*, 15(12), 1286–1295. <https://doi.org/10.7150/ijms.27087>.
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>.
- Qian, Z., Hua, Z., Liu, C., & Jia, W. (2016). Four types of cannabimimetic indazole and indole derivatives, ADB-BINACA, AB-FUBICA, ADB-FUBICA, and AB-BICA, identified as new psychoactive substances. *Forensic Toxicology*, 34(1), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0297-2>.
- Rygaard, K., Pan, M., Nielsen, M. K. K., Dalsgaard, P. W., Rasmussen, B. S., & Linnet, K. (2023). Overview of systematic toxicological analysis strategies and their coverage of substances in forensic toxicology. *Analytical Science Advances*, 4(2), 96–103. <https://doi.org/10.1002/ansa.202200062>.
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). (2013). Standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452–474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>.
- Sia, C. H., Wang, Z., Goh, E. M. L., Tan, Y. L., Fong, C. Y., Moy, H. Y., & Chan, E. C. Y. (2021). Urinary metabolite biomarkers for the detection of synthetic cannabinoid ADB-BUTINACA abuse. *Clinical Chemistry*, 67(11), 1534–1544. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab134>.

- Simon G, Kuzma M, Mayer M, Petrus K, Tóth D (2023) Fatal overdose with the cannabinoid receptor agonists MDMB-4en-PINACA and 4F-ABUTINACA: A case report and review of the literature. *Toxics* 11(8):673. <https://doi.org/10.3390/toxics11080673>.
- Souza, I. D., & Queiroz, M. E. C. (2021). Innovations and strategies of sample preparation techniques to reduce matrix effects during LC–MS/MS bioanalysis. *LCGC North America*, 39(s11), 21–23.
- Souza, J. D. R., Madruga, C. S., & Noto, C. N. (2023). Emerging synthetic cannabinoids and the risk of psychosis: a growing concern for public health. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 45, 306–307. <https://doi.org/10.47626/1516-4446-2023-0051>.
- Şaştım, M. U. (2021). *İki bin yirmi bir yılında Gaziantep adli toksikoloji laboratuvarı'na gönderilen narkotik olgularda yeni psikoaktif maddelerin analizi* [Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniversitesi]. Tez Merkezi.
- Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM). (2022). *Türkiye Uyuşturucu Raporu 2022*. Emniyet Genel Müdürlüğü.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2014). *Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid* (ST/NAR/30/Rev.3).
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2020). *Recommended methods for the identification and analysis of synthetic cannabinoid receptor agonists in seized materials* (ST/NAR/48 Rev.1). United Nations.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2023). *World Drug Report 2023*. United Nations Office on Drugs and Crime.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2013). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- Vaccaro, G., Massariol, A., Guirguis, A., Kirton, S. B., & Stair, J. L. (2022). NPS detection in prison: A systematic literature review of use, drug form, and analytical approaches. *Drug Testing and Analysis*, 14(8), 1350–1367. <https://doi.org/10.1002/dta.3263>.
- Vaiano, F., Bertol, E., Mineo, M., Pietrosevoli, L., Rubicondo, J., Supuran, C. T., & Carta, F. (2021). Development of a new LC-MS/MS screening method for detection of 120 NPS and 43 drugs in blood. *Separations*, 8(11), 221. <https://doi.org/10.3390/separations8110221>.
- Wang, Y., Pan, Y., Yang, H., Liu, J., Wurita, A., & Hasegawa, K. (2022). Quantification of MDMB-4en-PINACA and ADB-BUTINACA in human hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 40(2), 340–348. <https://doi.org/10.1007/s11419-022-00615-z>.

- Waters, B., Ikematsu, N., Hara, K., Fujii, H., Tokuyasu, T., Takayama, M., Matsusue, A., Kashiwagi, M., & Kubo, S. (2016). GC-PCI-MS/MS and LC-ESI-MS/MS databases for the detection of 104 psychotropic compounds (synthetic cannabinoids, synthetic cathinones, phenethylamine derivatives). *Legal Medicine*, 20, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.02.006>.
- Wiley, J. L., Marusich, J. A., Huffman, J. W., Balster, R. L., & Thomas, B. F. (2011). Hijacking of basic research: The case of synthetic cannabinoids. *Methods Report (RTI Press)*, 2011(1). <https://doi.org/10.3768/rtipress.2011.op.0007.1111>.
- World Health Organization. (2020). *Critical review report: MDMB-4en-PINACA*. 43rd Expert Committee on Drug Dependence.
- Wu, A., Zhao, X., Zhang, Y., Chen, D., Zhou, H., & Liu, G. (2021). Application of solid-phase extraction based on magnetic nanoparticle adsorbents for the analysis of selected persistent organic pollutants in environmental water: A review of recent advances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(1), 44–112. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1720493>.
- Yang, Y., Xu, B., Li, D., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., & Ye, Y. (2024). A comprehensive LC–MS/MS method for simultaneous analysis of 65 synthetic cannabinoids in human hair samples and application to forensic investigations. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 101, 102636. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2023.102636>.
- Yeter, O. (2020). Simultaneous determination of 4F-MDMB BINACA, a new synthetic cannabinoid, and its metabolites in human blood samples by LC-MS/MS. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 7(3), 827–832. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.770427>.
- Yeter, O., & Öztürk, Y. E. (2020). In vitro phase I metabolism of the recently emerged synthetic MDMB-4en-PINACA and its detection in human urine samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 44(9), 976–984. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa017>.
- Yılmaz, H. (2023). *Sentetik kannabinoid Ab-PINACA (K3) ve metabolitlerinin idrar, tam kan ve kuru kan kartı (DBS) numunelerinden analizine yönelik LC-MS/MS metodunun geliştirilmesi*. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimini Cudibey İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'ne kayıt oldu ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programına kayıt oldu. 2017 yılında “Baharatlarda Kullanılan Yasaklı Boya Sudan I'in Tayini İçin Basit Bir Spektroflorimetrik Metot” adlı çalışmasıyla Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. 2019 yılında Tübitak Yurt İçi Doktora Bursu almaya hak kazandı. Yine aynı yıl Adli Tıp Kurumu Trabzon Grup Başkanlığı'na Kimyager olarak atandı. Halen aynı kurumda Yüksek Kimyager olarak hizmet vermektedir ve yabancı dili İngilizcedir.