T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

YAPAY BEYİN OMURİLİK SIVISINDA KOKAİNİN VE ANA METABOLİTİ BENZOİLEKGONİNİN SIVI KROMATOGRAFİSİ ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER TUĞBA TEKİN BÜLBÜL

İSTANBUL, 2021

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

YAPAY BEYİN OMURİLİK SIVISINDA KOKAİNİN VE ANA METABOLİTİ BENZOİLEKGONİNİN SIVI KROMATOGRAFİSİ ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER TUĞBA TEKİN BÜLBÜL

İSTANBUL, 2021

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 33564

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösteren ve her türlü imkânı sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN'e,

Bu çalışmanın her aşamasında desteğini, anlayışını ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Selda MERCAN'a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yanımda olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Merve KULOĞLU GENÇ'e, Biyolog Murat YAYLA'ya, Doktora öğrencileri Sümeyye Zulal ŞİMŞEK ve Çağdaş ADIÖREN'e,

Hayatımın en kıymetlileri, her an yanımda olduklarını bildiğim, sevgi ve destekleriyle bana güç veren sevgili eşim Ahmet Turan BÜLBÜL'e, kızkardeşim Tuğçe TEKİN'e, annem Gülseren KORKMAZ TEKİN'e ve babam Ali TEKİN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba TEKİN BÜLBÜL

Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **iv**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **v**
KISALTMALAR ..... **vii**
ÖZET **1**
ABSTRACT **3**
1. Giriş ve Amaç **5**
2. Genel Bilgiler **7**
2.1. Kokain 7
2.1.1. Kokainin tarihçesi 7
2.1.2. Kokainin çeşitleri ve vücuda alım yolları 10
2.1.3. Kokainin kimyasal yapısı ve metabolitleri 11
2.1.4. Kokainin etki mekanizması 14
2.2. BOS 18
2.2.1. BOS çalışmalarının tarihçesi 21
2.2.2. BOS'un klinik ve adli önemi 23
2.2.3. BOS ile yapılan toksikolojik çalışmalar 24
2.3. Kromatografi 26
2.3.1. Sıvı kromatografisi (liquid chromatography; LC) 28
2.3.2. LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 31
2.4. Analitik Yöntemlerin Validasyon (Geçerli Kılma) Çalışması 33
2.4.1. Doğruluk (accuracy) 34
2.4.1.1. Gerçeklik (trueness) 34
2.4.1.2. Kesinlik (precision) 35
2.4.2. Seçicilik (selectivity) 36
2.4.3. Hassasiyet (sensitivity) 36
2.4.4. Doğrusallık (lineerlik) ve çalışma aralığı (range) 37
2.4.5. Tespit limiti (limit of detection, LoD) ve tayin limiti (limit of quantitation, LoQ) 37
2.4.6. Sağlamlık (robustness/ruggedness) 38

3. Gereç ve Yöntem 40
3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve ekipmanlar 40
3.2. Referans standart maddelerden stok çözeltilerin hazırlanması 41
3.2.1. Kokain ve BE standart çözeltileri.....42
3.2.2. Kokain-d3 ve BE-d3 iç standart çözeltileri 42
3.3. yBOS numunesinin hazırlanması 42
3.4. Numune hazırlama yöntemi 43
3.4.1. LLE yöntemi 44
3.4.2. SPE yöntemi.....44
3.5. LC-MS/MS sistem koşulları.....46
3.6. Validasyon çalışmaları 50
3.6.1. Seçicilik 50
3.6.2. Doğrusallık.....51
3.6.3. LoD ve LoQ 52
3.6.4. Doğruluk 52
3.6.5. Sağlamlık.....53
3.6.6. Stabilite 53
4. Bulgular.....55
4.1. Ekstraksiyon yöntemi.....55
4.2. Sağlamlık.....56
4.3. Seçicilik.....56
4.4. Çalışma aralığı (kalibrasyon grafiği).....62
4.5. LoD ve LoQ sonuçları.....65
4.6. Doğruluk.....69
4.7. Stabilite.....73
5. Tartışma 75
6. Sonuç 83
7. Kaynaklar 84
8. Özgeçmiş 94

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo I. BOS genel özellikleri, molekül ve hücre bileşimi 21

Tablo II. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması 28

Tablo III. Deneysel çalışmalarda kullanılan referans standartlar ve kimyasallar 40

Tablo IV. Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar 41

Tablo V. yBOS hazırlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları 43

Tablo VI. Referans standartların MRM çalışmaları 47

Tablo VII. LC-MS/MS sistem koşulları 50

Tablo VIII. Mobil fazın zamana bağlı değişimi 50

Tablo IX. Kokaine ait LLE ve SPE ile yapılan çalışma sonuçları 55

Tablo X. BE'ye ait LLE ve SPE ile yapılan çalışma sonuçları 55

Tablo XI. Numune miktarının yöntem üzerine etkisi 56

Tablo XII. Matris etkisinin değerlendirildiği analiz sonuçları 65

Tablo XIII. Kokain ve BE'nin tekrarlanabilirlik sonuçları 70

Tablo XIV. Kokain ve BE'nin ara kesinlik sonuçları 71

Tablo XV. Kokain ve BE'nin günler arası fark sonuçları 72

Tablo XVI. Kokainin %geri kazanım sonuçları 72

Tablo XVII. BE'nin %geri kazanım sonuçları 72

Tablo XVIII. Kokain içeren yBOS numunelerinin stabilite sonuçları 73

Tablo XIX. BE içeren yBOS numunelerinin stabilite sonuçları 74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Koka bitkisi 7

Şekil 2: Kokain içeren bir diş ağrısı ilacının tanıtımı 8

Şekil 3: Kokainin biyotransformasyonu 13

Şekil 4: BOS'un salgılanma, dolaşım ve geri emilim mekanizması 20

Şekil 5: İnsan beyin yüzeyindeki bariyerler 23

Şekil 6: Üç farklı ayırma gücü için kromatogram 29

Şekil 7: Sıvı kromatografisi sistemi 30

Şekil 8: MS/MS şeması 32

Şekil 9: SPE ekstraksiyon manifoldu 46

Şekil 10: Kokaine ait LC-MS/MS spektrumu 47

Şekil 11: Kokain d3'e ait LC-MS/MS spektrumu 48

Şekil 12: BE'ye ait LC-MS/MS spektrumu 48

Şekil 13: BE-d3'e ait LC-MS/MS spektrumu 49

Şekil 14: Deneysel çalışmaların analiz edildiği LC-MS/MS sistemi 49

Şekil 15: Analit içermeyen metanol çözücüsüne ait kromatogram 57

Şekil 16: 25 ng/mL kokain içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram 57

Şekil 17: 25 ng/mL BE içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram 58

Şekil 18: 25 ng/mL kokain-d3 içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram 58

Şekil 19: 25 ng/mL BE-d3 içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram 59

Şekil 20: Analit içermeyen yBOS matrisine ait kromatogram 60

Şekil 21: 25 ng/mL kokain içeren yBOS matrisine ait kromatogram 60

Şekil 22: 25 ng/mL BE içeren yBOS matrisine ait kromatogram 61

Şekil 23: 25 ng/mL kokain-d3 içeren yBOS matrisine ait kromatogram 61

Şekil 24: 25 ng/mL BE-d3 içeren yBOS matrisine ait kromatogram 62

Şekil 25: Kokain için metanol çözücüsünde elde edilmiş kalibrasyon grafiği 63

Şekil 26: BE için metanol çözücüsünde elde edilmiş kalibrasyon grafiği 63

Şekil 27: Kokain için yBOS matrisinde elde edilmiş kalibrasyon grafiği 64

Şekil 28: BE için yBOS matrisinde elde edilmiş kalibrasyon grafiği 64

Şekil 29: Metanol içerisinde 0,01 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoD) 66

Şekil 30: Metanol içerisinde 0,05 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoQ) 66

Şekil 31: Metanol içerisinde 0,01 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoD) 67

Şekil 32: Metanol içerisinde 0,05 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoQ) 67

Şekil 33: yBOS içerisinde 0,02 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoD) 68

Şekil 34: yBOS içerisinde 0,1 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoQ) 68

Şekil 35: yBOS içerisinde 0,01 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoD) 69

Şekil 36: yBOS içerisinde 0,05 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoQ) 69

KISALTMALAR

6-AM: 6-asetilmorfin
APCI: Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu
BE: Benzoilekgonin
BOS: Beyin omurilik sıvısı
$CaCI_2.2H_2O$: Kalsiyum klorür dihidrat
CE: Çarpışma enerjisi
cm: Santimetre
dk: Dakika
DT: Bekleme süresi
ESI: Elektrosprey iyonizasyonu
FD: Floresan
g: Gram
GC-MS: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IR: Kızılötesi
KCI: Potasyum klorür
kV: Kilovolt
L: Litre
LC: Sıvı kromatografisi
LC-MS/MS: Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi
LLE: Sıvı-sıvı ekstraksiyon
LoD: Tespit limiti
LoQ: Tayin limiti
m/z: Kütle/yük
m: Metre
M: Molar
mg: Miligram
$MgCl_2.6H_2O$: Magnezyum klorür hekzahidrat
mL: Mililitre
mm: Milimetre
mM: Milimolar
mmHg: Milimetre civa
mmol: Milimol
mOsm: MiliOsmol
MÖ: Milattan önce
MRM: Çoklu reaksiyon izleme
MS/MS: Ardışık kütle spektrometresi
ms: Milisaniye
MSS: Merkezi sinir sistemi
$Na_2HPO_4.2H_2O$: Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
NaCI: Sodyum klorür
$NaH_2PO_4.2H_2O$: Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat

ng: Nanogram
pg: Pikogram
Q: Kuadrupol
r: Korelasyon katsayısı
rpm: Dakikadaki dönme sayısı
RSD: Bağıl standart sapma
RT: Alıkonma zamanı
S: Standart sapma
sa: Saat
SPE: Katı faz ekstraksiyonu
USS: Ultra saf su
UV: Ultraviyole
yBOS: Yapay beyin omurilik sıvısı
µg: Mikrogram
µL: Mikrolitre
µmol: Mikromol
%: Yüzde
<: Küçük
>: Büyük
≥: Büyük eşit
°C: Santigrat derece

ÖZET

Beyin omurilik sıvısı (BOS), postmortem toksikolojinin kan ve idrara alternatif matrisler arayışıyla kıymetli bir vücut sıvısı haline gelmiştir. Adli toksikoloji açısından sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile kantitatif analize imkan veren BOS, kana alternatif vücut sıvısı oluşuyla analizlerde tamamlayıcı sonuçlar verebilmektedir. BOS numunesi ile yapılacak analizlerin yöntem geliştirilmesinde, gerçek BOS numunesi kullanmadan gerçek sıvıya vekil niteliğinde yapay BOS (yBOS) sıvısı ile araştırmalar yapılmaktadır.

Kokain, keyif almak için kullanılan ve kullanımı her geçen gün artan yasa dışı bir alkaloiddir. Beyne olan etkisi nedeniyle bağımlılığı yüksek bir madde olan kokainin; kullanım türüne, vücuda alım yoluna, kişinin metabolizasyonuna ve kullanım sıklığına bağlı olarak vücut sıvılarında bulunabilirliği farklıdır. Bu nedenle toksikolojik analizlerde kokain tespit ve tayinine dair farklı vücut sıvılarında daha hassas yöntemler geliştirmeye karşı ilgi artmıştır. Bu nedenle bu çalışmada gerçek numuneye en yakın haliyle hazırlanmış yBOS içerisinden kokaini ve ana metaboliti benzoilekgonini tespit ve tayin edebilmek için katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemi kullanılarak sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) sistemi ile hassasiyeti ve verimliliği yüksek analitik yöntem geliştirilmiştir.

Yapılan çalışmalarla kokain için metanol çözücüsünde 9 noktalı 0,2-100 ng/mL aralığında kalibrasyon grafiği çizdirilmiş r^2 değeri 0,999 bulunmuştur. Kokainin ana metaboliti benzoilekgonin için ise 8 noktalı 0,5-100 ng/mL aralığında ve r^2 değeri 0,999 olan kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir. Metanol çözücüsüne ilaveten, matris etkisiyle daha doğru sonuçlar alabilmek adına yBOS numunesi ile de kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir. Kokain için yBOS matrisinde 7 noktalı 0,5-50 ng/mL aralığında kalibrasyon eğrisi çizidirilmiş ve r^2 değeri 0,998 bulunmuştur. Benzoilekgonin için ise yine 7 noktalı 0,5-50 ng/mL aralığında ve r^2 değeri 0,998 olan kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir. Kokain ve benzoilekgonin için

metanol içerisinde elde edilen LoQ değerleri her ikisi için de 0,05 ng/mL bulunurken yBOS matrisi içerisinde sırasıyla 0,1 ng/mL ve 0,05 ng/mL bulunmuştur.

Belirlenen SPE yöntemiyle 3 farklı konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılan tekrarlanabilirlik ve 7 gün sonrasındaki ara kesinlik çalışmalarının sonuçlarında yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değeri <20 elde edilmiştir. Geri kazanım çalışmaları tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik için hazırlanan 3 farklı konsantrasyon için toplamda 12 örnek üzerinden hesaplanmış ve tüm ölçüm sonuçları %70-120 geri kazanım aralığında bulunmuştur. Bulunan %RSD ve geri kazanım sonuçları ile geliştirilen yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır. Stabilite çalışmaları için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış örneklerin her 3 tanesi oda sıcaklığı, +4 ºC, -20 ºC ve -80 ºC derecelerde 7 günlük süreyle bekletilmiştir. 7 gün sonrasında yapılan ölçümlerle değişim değerlerinin %1'in altında olduğu bulunmuş, geliştirilen yöntemin kararlılığını ispatlanmıştır.

yBOS numunesinden kokain ve benzoilekgonin tespiti için geliştirilen yöntemin tüm validasyon çalışmaları uygun sonuçlarla tamamlanmıştır. Sonrasında, kokaine ait diğer metabolitleri de değerlendirmeye katarak daha hassas yöntemler geliştirmek ve bu yöntemleri gerçek numunelerde çalışarak doğrulamak hedeflenmektedir. Böylelikle postmortem olgularda kan örneğine alternatif olan ve korunaklı yapısıyla postmortem yeniden dağılımdan oldukça az etkilenen BOS numunesi, adli toksikolojiye ve adalete katkı sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kokain, Benzoilekgonin, Yapay Beyin Omurilik Sıvısı, Postmortem Toksikoloji, Katı Faz Ekstraksiyon, LC-MS/MS

ABSTRACT

Cerebrospinal fluid (CSF) has become a valuable body fluid as postmortem toxicology seeks alternative matrices to blood and urine. CSF, which allows quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in terms of forensic toxicology, can give complementary results in analyzes as it is an alternative body fluid to blood. In the development of the method for the analysis to be made with the CSF sample, researches are carried out with artificial CSF (aCSF) fluid as a substitute for the real fluid, without using the real CSF sample.

Cocaine is an illegal alkaloid that is used for pleasure and its use is increasing day by day. Cocaine, which is a highly addictive substance due to its effect on the brain; the availability in body fluids is different depending on the type of use, route of intake, metabolism of the person and frequency of use. Therefore, there has been increased interest in developing more sensitive methods for the detection and determination of cocaine in different body fluids in toxicological analyses. For this reason, in this study, in order to detect and determine cocaine and its main metabolite benzoylecgonine from aCSF prepared in the closest form to the real sample, LC-MS/MS system using solid phase extraction (SPE) method with high sensitivity and efficiency method has been developed.

The r^2 value was found to be 0,999, with the calibration graph drawn in the range of 0,2-100 ng/mL with 9 points in methanol solvent for cocaine. For benzoylecgonine, the main metabolite of cocaine, a calibration chart was drawn with an 8-point range of 0,5-100 ng/mL and an r^2 value of 0,999. In addition to the methanol solvent, a calibration graph was drawn with the aCSF sample in order to get more accurate results with the matrix effect. A calibration curve was drawn for cocaine in the range of 0,5-50 ng/mL with 7 points in the aCSF matrix and the r^2 value was found to be 0,998. For benzoylecgonine, a 7-point calibration chart was drawn in the 0,5-50 ng/mL range and with an r^2 value of 0,998. For

cocaine and benzoylecgonine, the LoQ values obtained in methanol were 0,05 ng/mL for both, while 0,1 ng/mL and 0,05 ng/mL were found in the aCSF matrix, respectively.

In the results of the reproducibility and intermediate precision studies performed with 6 replications at 3 different concentrations with the determined SPE method, the percent relative standard deviation (%RSD) value was <20. Recovery studies were calculated on 12 samples in total for 3 different concentrations prepared for reproducibility and intermediate precision, and all measurement results were found in the recovery range of 70-120%. The accuracy of the developed method has been proven with the %RSD and recovery results found. For stability studies, each of the 3 samples prepared at 3 different concentrations were kept at room temperature, +4 ºC, -20 ºC and -80 ºC for 7 days. With the measurements made after 7 days, the change values were found to be below 1%, and the stability of the developed method was proven.

All validation studies of the developed method for the detection of cocaine and benzoylecgonine from the aCSF sample were completed with appropriate results. Afterwards, it is aimed to develop more sensitive methods by including other metabolites of cocaine into the evaluation and to verify these methods by working on real samples. Thus, the CSF sample, which is an alternative to blood sample in postmortem cases and is less affected by postmortem redistribution with its sheltered structure, will contribute to forensic toxicology and justice.

Keywords: Cocaine, Benzoylecgonine, Artificial Cerebrospinal Fluid, Postmortem Toxicology, Solid Phase Extraction, LC-MS/MS

1. Giriş ve Amaç

Toksikolojik analizlerde en çok tercih edilen matrisler kan ve serum örnekleridir. Vücuda giren maddenin antemortem ve postmortem olgularda vücut sıvılarında bulunma ve tespit süreleri farklı olduğundan birçok analizde birlikte değerlendirilerek maruziyet yorumlanır (1). Bazı postmortem olgularda kan ve idrar örneğinin bulunmayışı toksikolojik analizler açısından alternatif matris arayışlarını ortaya koymuştur. Bu noktada, beyin omurilik sıvısı (BOS), göz içi sıvısı, tükürük, tırnak gibi matrislerle yapılan çalışmalara olan eğilim artmış ve toksik madde analizinde yararları görülmüştür (2).

BOS, beyin ile kafatası arasında bulunan, beyin ile omuriliği koruyan, korunaklı bir plazma ultrafiltratıdır. Yeterli kan örneği olmadığı durumlarda kana alternatif bir matris olmasıyla antemortem ve postmortem madde konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir. Buna ilaveten, postmortem yeniden dağılımın sınırlı olması, korunaklı bir ortamda olması ve kontaminasyona karşı oldukça korunaklı olması nedeniyle BOS numunesi alternatif matrisler arasında oldukça avantajlı bir durumdadır (3). Dezavantajı ise BOS numunesiyle yapılacak analitik yöntemin geçerliliğini ortaya koymak için ihtiyaç duyulan özdeş BOS numune miktarını elde etmenin mümkün olmayışıdır. Ancak bu noktada, klinikte hali hazırda kullanılmakta olan yapay BOS (yBOS) numunesi devreye girmektedir. yBOS numunesi ile yapılacak yöntem geliştirme çalışmaları sayesinde postmortem toksikolojik analizlerde BOS numunesinin kullanımı artacak ve kan, idrar geleneksel matrislerine alternatif matris kullanımları yaygınlaşacaktır.

Antemortem ve postmortem toksikolojide sıkça karşılaşılan maruziyet maddeleri arasında kokain oldukça yüksek oranlardadır. Kan matrisinde kokain analizi postmortem yeniden dağılım kaynaklı baskılanabildiğinden, kokain ve ana metaboliti benzoilekgonin (BE) için postmortem yeniden dağılımdan daha az etkilenen BOS numunesi kıymetli bir matristir.

Kokain ve BE için kantitatif analize elverişli olması da BOS numunesini avantajlı hale getirmektedir.

Bu çalışmanın amacı, gerçeğe en yakın olacak haliyle yBOS hazırlamak ve sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) sistemini kullanarak hazırlanan matris içerisinde kokain ve ana metaboliti BE tayini için yöntem geliştirmektedir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Kokain

Kokain, uyarıcı madde grubunda yer alan ve keyif almak amaçlı kullanılan bir alkaloiddir. Esas memleketi Şili, Peru, Kolombiya ve Bolivya olan koka bitkisinin (Erythroxylon coca) yapraklarından elde edilir ve bu yapraklardan ekstrakte edilen doğal kaynaklı en güçlü stimülandır (4). Acı bir tada sahip yapraklarında doğal olarak kokain oluşan koka bitkisinin Şekil 1'de gösterildiği gibi dalları oldukça sert ve kahverengi-yeşil renkte, çiçekleri yeşil-beyaz renkte ve meyvesi kabuklu ve kırmızı renktedir (5, 6). Bitki çoğu zaman 500 cm ile 1,5 m arasında bir uzunluktağa sahiptir ancak nadiren boyu 2,5 metreye kadar uzayabilmektedir.



Şekil 1: Koka bitkisi (7)

2.1.1. Kokainin tarihçesi

Koka bitkisinin yapraklarının Güney Amerika'da halk tarafından açlığın etkisini azaltmak, yorgunluk hissini gidermek, zihni hızlandırmak ve zor koşullarda dağlarda çalışmayı kolaylaştırmak gibi amaçlarla yıllar boyunca çiğnendiği bilinmektedir (8). Yapılan arkeolojik çalışmalar, binlerce yıl boyunca eski kültürler ve şamanlar tarafından özellikle dini törenlerde kokain yapraklarının sıklıkla kullanıldığını hatta ilahi bir bitki olarak

adlandırıldığını göstermiştir (6, 9, 10). Antik Çağ dönemindeki Peru'ya ait mumyalarda koka yapraklarının çiğnendiğine dair ağız içinde kalıntılar bulunmuştur (11).

2000 yılı aşkın süredir kullanımı bulunan kokainin 1880'li yıllar ve öncesinde bugünkü yan etkileri tam olarak bilinmediğinden kontrolsüzce birçok alanda kullanılmıştır. 15. yüzyılda İspanyollar'ın Güney Amerika'ya fetihleri esnasında koka yapraklarının enerji verici ve açlık yatıştıcı özelliklerini keşfettikleri, bu nedenle verimi artırmak için madenlerde çalıştırdıkları işçilerde kullandıkları bilinmektedir (6, 8). 1863 yılında kimyager Angelo Mariani tarafından koka içeren şarap satışa sunulmuş, ardından çay, pastil gibi içerisinde koka yaprağı içeren başka ürünler hem Amerika hem Avrupa'da piyasaya sürülmüştür. Birçok ürün içerisine giren koka yaprağının Şekil 2'de bir diş ağrısı ilacının içerisinde bulunduğu reklamı görülmektedir. Yasaklanmadan önce Coca Cola'nın içinde de kokain bulunduğu ve adını da buradan aldığı bilinmektedir. O dönemler reklamları 'Yorgunluğu geçiren içecek' sloganıyla yapılmıştır ve kokainin yasaklanmasıyla birlikte, Coca Cola kokain yerine kafein kullanmaya başlamıştır (9, 12, 13).



Şekil 2: Kokain içeren bir diş ağrısı ilacının tanıtımı (14)

Kokain ilk kez 1859 yılında bir Alman kimyager olan Albert Niemann tarafından koka yapraklarından sentezlenmiştir (15). Renksiz ve kristal bir formda saf olarak izole etmeyi başaran Niemann, acımsı bir tadı olduğunu belirtmiş ve diğer alkaloidlerde olduğu gibi bu alkaloide de sentezlediği koka bitkisinin adının sonuna -in ekini getirerek 'kokain' adını vermiştir (6, 10, 16).

Kokain aynı zamanda çok güçlü bir lokal anesteziktir ve güçlü bir lokal anestezik olduğu da 1880 yılında bilim adamı Basil Vassily von Anrep tarafından deney hayvanları üzerinde kanıtlanmıştır (10, 13). 1884 yılında kronik ağrı çeken hastalar için yeni tedaviler geliştirmek isteyen farmakolog ve psikolog Sigmound Freud, kokainin bu özelliğine ek olarak merkezi sinir sistemi üzerindeki uyarıcı etkisi keşfetmiştir. Kokaini bir solüsyon haline getirerek lokal anestezik olarak ilk kullanan ve bunu 1884 yılında bilimsel bir toplantıda sunan hekim ise Karl Koller'dir (10, 17). İlk olarak yüz cerrahisinde kullanılan kokainin, lokal anestezik olarak en çok diş, kulak burun boğaz ve göz cerrahisinde kullanımına devam edilmiştir. Kokainin sistemik yan etkileri ve bağımlılık yapma potansiyeli üzerine 1905'te kokain yerine prokain sentezlenmiş ve sonraki yıllarda da yeni lokal anestezikler kullanıma girmiştir (18).

Sigmound Freud kokainin insanlarda yorgunluğu giderdiğine, açlığı yatıştırdığına ve hatta psikolojik sorunları unutturduğu gerekçesiyle antidepresan olarak tedavide kullanılabileceğine inanmıştır. Bunlara ek olarak Freud, alkol ve morfin bağımlılarda kokainin tedavi etkici özelliği olduğunu savunmuştur. Nişanlısına, arkadaşlarına, hastalarına kokain kullanımını tavsiye ettiği bilinmektedir. Bağımlılık tedavisinde bu görüşleri kısa vadede olumlu sonuçlar almış ancak uzun vadede yeni bir madde bağımlılığın doğduğu görülmüştür. Tedavi amaçlı kokain kullanan bir arkadaşının ölümü üzerine Freud da kokainin zararlarını onaylamıştır (10, 12, 13, 19).

1914'te kokain Harrison Narkotik Yasası uyarınca narkotik madde sınıfına alınmış ve satışı durdurulmuştur (14, 20). 1970 yılında Kontrollü Maddeler Yasası uyarınca yüksek bir kötüye kullanım potansiyeli olan, kullanıldığında bağımlılığa neden olan tıbbi ilaç olarak listeye eklenmiş ve bilimsel ve tıbbi amaçlar dışında kullanımı yasaklanmıştır. Kokaine dair bu kararlar hala geçerliliğini korumaktadır ve kokain günümüzde yasal olarak yalnızca kulak, burun, boğaz ve göz ameliyatlarında lokal anestezik olarak kullanılmaktadır (12, 14, 21, 22).

2.1.2. Kokainin çeşitleri ve vücuda alım yolları

Yasaklanmış maddeler arasında cannabisten sonra en çok kullanılan madde kokaindir. Yılda 20-30 milyon civarında insanın düzenli olarak kullandığı tahmin edilmektedir (9). Yıllar içinde kokain kullanımında çeşitli yöntemler ve yollar denenmiştir. Yüzyıllar öncesinde koka yaprakları çiğnenerek etkisi sağlanırken, kokainin ayrıştırılması ve çeşitli saflık derecelerinde üretimine başlanmasıyla kokain toz hali ve kristalize hali (crack) ile kullanılmaya başlanmıştır (4, 9, 23). Günümüzde ise kokain genellikle alkol, opioidler, esrar ve sedatif hipnotikler gibi diğer suistimal edilen veya yasaklanmış maddelerle birlikte kullanılmaktadır (4, 23, 24).

Çok güçlü psikolojik ve fizyolojik bağımlılık yapıcı bir alkaloid olan kokain beyaz toz madde halinde ya da crack veya taş olarak adlandırılan küçük kristalize hallerde bulunabilir. Crack, kokainin hidroklorik formuna sodyum bikarbonat veya amonyak ve su eklenerek elde edilen kokain türüdür. Kokainin toz formu çoğunlukla gelişmiş ülkelerde intranazal ve intravenöz yöntemler ile kullanılırken crack formu kokainin yıllar içerisinde fiyatının giderek artması sonucu ekonomik olarak erişim kolaylığını artırmak için sigara olarak içmeye uygun piyasaya sunulan halidir (6, 10, 14, 25). Sigara gibi içilmesinden dolayı beyne kokaine göre daha kısa sürede madde gitmesini sağlar. Vücut tarafından daha hızlı emilir ve etki süresi daha kısa sürede ortaya çıkar. Sentetik uyuşturucularda olduğu gibi kişinin crack diye satın aldığı madde her zaman crack olamayabileceğinden etkisinin tam olarak ne olacağını önceden kestirmek mümkün değildir. Bağımlılığı kokaine göre çok daha hızlı gelişirken yoksunluk belirtileri ise kokain ile aynıdır (15, 23). Benzer şekilde kokainin toz formu da piyasaya saf halde sürülmeyip kar marjı ön planda tutularak şeker, nişasta ya da prokain gibi lokal anestezik maddelerle karıştırılarak kullanıcılara ulaştırılabilmektedir (6, 14, 25). Ayrıca toz formun eroinle karıştırılarak ‘speedball’ adı altında intravenöz kullanıma uygun bir şekilde satışa sunulduğu da bilinmektedir (6, 26, 27).

Kokainin vücuda alım yolları şu şekildedir;

Buruna çekme (intranazal)

Kullanıcılar tarafından en çok tercih edilen kokain kullanım şekli maddeyi burundan çekmektir. Bu kullanım şekli kokainin toz formuna özgüdür. Beyaz toz kokain ile belli miktarlarda çizgiler yapılır ve bir rulo yardımıyla burundan çekilir. Yaklaşık 3 dakika içerisinde etki eder ve etki süresi çekilen miktara göre 30-40 dakika kadar sürebilir. Biyoyararlanımı çekilen miktara bağlı olarak yaklaşık %25-94 aralığındadır.

Enjekte etme (intravenöz)

Bu alım şekli burundan çekmeye göre daha risklidir. Bu şekilde kokainin hem toz ve hem crack formu kullanılabilir. Kokain suda eritilerek bir şırınga yardımıyla damar yolundan vücuda enjekte edilir. Yaklaşık 20 saniye içerisinde etki eder ve biyoyararlanımı % 90'dan fazladır.

Dumanını çekme (inhalasyon)

Sigara gibi içilen bu alım şekli diğerlerine kıyasla beyne kokaini göndermenin en hızlı yoludur. Crack formu kokainin bu şekilde kullanımı içindir. Kullanılan cihaz ve sıcaklık gibi koşullara bağlı olmakla birlikte yaklaşık 7-10 saniye içerisinde etki eder. En kolay bağımlılık yapan kokain kullanım şeklidir ve biyoyararlanım %60-70 arasındadır.

Ağızdan alma (oral)

Bu yolla alınan kokain vücutta sindirim sistemi tarafından ayrıştırılır. Genellikle dişlere veya dilaltına sürerek oral yolla kullanım şekli gerçekleştirilir. Bu şekilde kokainin toz formu kullanılır. Ağız yoluyla alımda biyoyararlanım % 30'dur ve diğer vücuda giriş yollarına göre en az etki gösteren kullanım şeklidir. (15, 20, 23, 28).

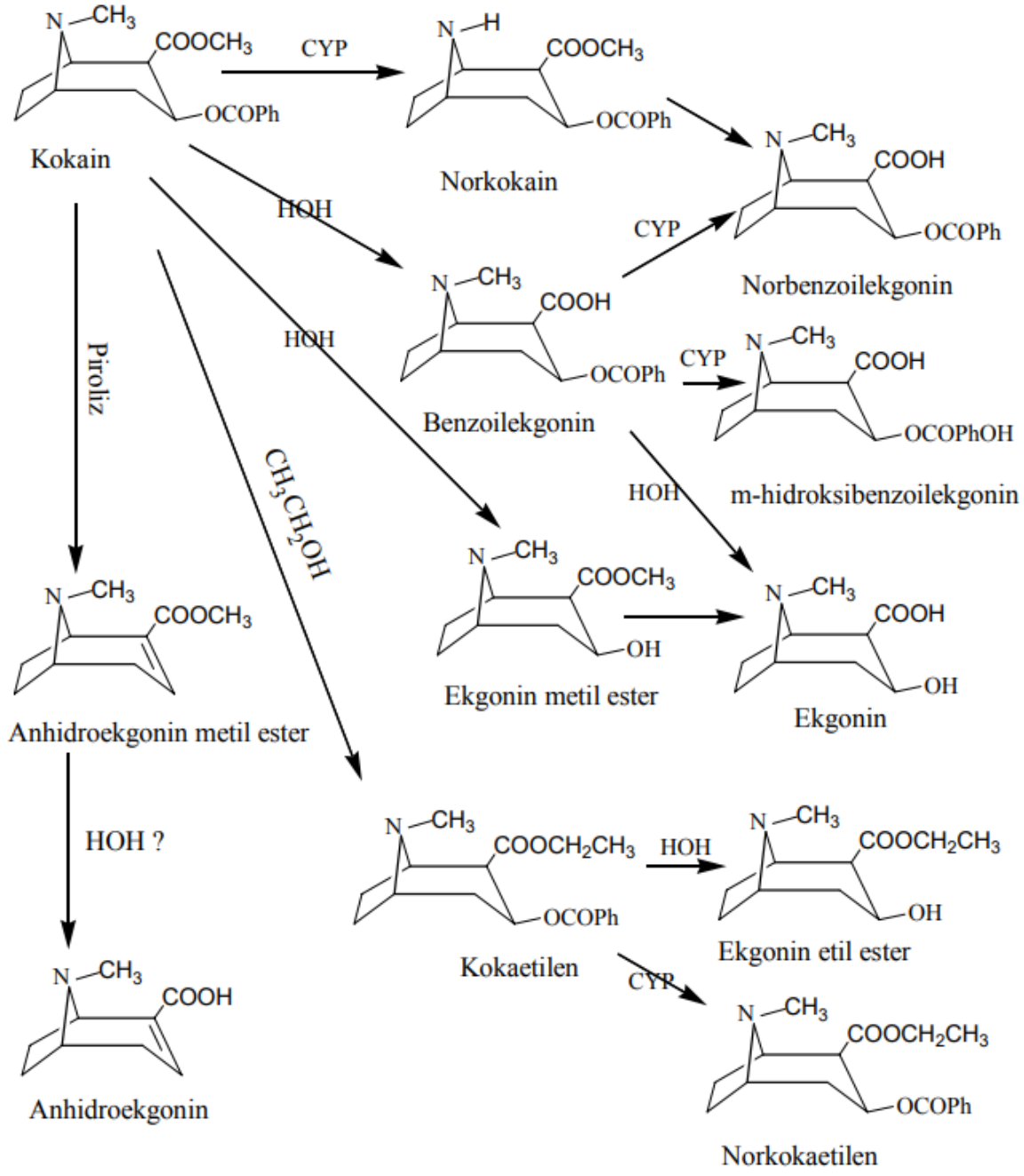
2.1.3. Kokainin kimyasal yapısı ve metabolitleri

Bilimsel adı benzoilmetilekgonin olan kokain maddesinin iki formunun (toz ve crack) da kimyasal formülü aynıdır ve $C_{17}H_{21}NO_4$'tür.

Kokainin yarılanma ömrü doza bağlı olarak yaklaşık 40 dakika ile 4 saat arasında değişmektedir (29). Metabolize edilmesi sonucu bir metil grubunu kaybeder ve ana metaboliti olan BE oluşur. BE büyük oranda kokainin kimyasal hidrolizi sonucu oluşurken, BE'ye kıyasla daha az miktarda oluşan ekgoninmetilester (EME) ise enzimatik hidrolizi sonucu oluşur. BE metaboliti, EME'den farklı olarak insan vücudunda fizyolojik pH'da kendiliğinden de hidroliz olabilmektedir. Bu ikili dışındaki diğer kokain metabolitleri ise norkokain (NCOC), norbenzoilekgonin (NBE), mhidroksibenzoilekgonin (HBE) ve ekgonindir (E). Fakat bu metabolitler BE ve EME ile kıyaslandıklarında çok daha nadir rastlanılan metabolitlerdir. Kokain sigara şeklinde içildiğinde piroliz ürünü olarak yalnızca anhidroekgoninmetilester (AEME) oluşur. AEME ve metaboliti olan anhidroekgonin (AE) tespiti, crack formunda kokain kullanımının göstergesidir. Kokain ve alkolün birlikte kullanımı sonucu ise kokaetilen (CE) metaboliti oluşur. Lipofilik yapılı CE, kokaine göre daha toksiktir ve yüksek dozda ortaya çıkabilecek ölüm riskini artırır. Buna rağmen uzun süreli ve şiddetli etkileri dolayısıyla kullanıcılar tarafından kokain ve alkolün birlikte kullanımının oldukça fazla tercih edildiği görülmektedir (4, 15, 30). Şekil 3'te kokain maddesinin vücuttaki biyotransformasyonu sonucu oluşan tüm bu metabolitler gösterilmektedir.

Vücuda alınan kokain öncelikle kana ve sonrasında diğer vücut sıvı ve dokularına dağılmaktadır. Bu nedenle kan, idrar, saç, ter, tükürük, anne sütü, BOS, göz içi sıvısı, tırnak gibi matrisler kokain ve metabolitleri için toksikolojik analizlerde kullanılabilen numunelerdir. Vücut içerisinde metabolize olduktan sonra %85-90 kadarı 6-8 içerisinde idrar yoluyla atılır ancak ana metaboliti benzoilekgonin tek kullanımda dahi 2-3 güne kadar idrardan tespit edilebilmektedir. Akut veya kronik maruziyete bağlı değişmekle birlikte kokainin yarılanma ömrü yaklaşık 0,5-4 saat, BE'nin yaklaşık 5-8 saat, EME'nin ise 8 saat civarında olduğu bilinmektedir (31). Bu iki ana metabolit içerisinde en fazla oluşanı BE

olduğu için çoğunlukla vücut sıvı ya da dokularından kokain kullanımını araştırmaya yönelik toksikolojik tarama ve doğrulama testlerinde daha çok onun varlığı araştırılmaktadır.



Şekil 3: Kokainin biyotransformasyonu (4).

2.1.4. Kokainin etki mekanizması

Herhangi bir mukozadan mükemmel şekilde emilen kokain, santral sinir sistemine, kalbe, karaciğere ve böbreklere toksik etki gösteren bir alkaloiddir. Vücuda alındıktan kısa süre sonra bireyde güçlü bir şekilde yeniden kokain alma isteği oluşturur. Yaygın suistimali edildiği bilinmektedir ve ani verdiği öfori, cinsel istek artışı, rahatlama ve bilincin açılması hissi insanların bu maddeyi tüketmesinin temel nedenleri arasında gösterilmektedir (8, 23). Etki süresi, en yaygın kullanım şekli olan toz formunun burun kılcal damarlarına çekilmesinden sonra yaklaşık 30-40 dakikadır ve bu süre vücuda giren kokain miktarına ve kullanıcının toleransına göre değişiklik göstermektedir (8). Burundan çekildikten sonra 3 dakika, crack formu sigara şeklinde içildikten sonra sıcaklık, hız, kullanılan cihaz gibi şartlara bağlı olarak 7-10 saniye içinde beyin ve santral sinir sistemine ulaştığı bilinmektedir (23, 29). Vücuda alındıktan sonra önce kana sonrasında kalp, beyin, karaciğer, böbrek ve diğer organlara daha sonra da dokulara ve vücut sıvılarına dağılmaktadır (32). Ayrıca yağda çözülebildiği için kan-beyin bariyerini geçebilir ve düşük molekül ağırlıklı olduğu için de plasentadan difüzyonla geçişi kolaydır (23, 33)**.**

Kokain, merkezi sinir sistemi stimülanıdır ve dopamin, norepinefrin ve serotonin nörotransmitterlerinin geri alım inhibitörüdür. Bu nörotransmitterlerin taşıyıcı proteinini inhibe eder. Yeniden emilimi ve hücre içine geri alımı engellediği için sinaptik aralıkta bu nörotransmitterlerin ani olarak artmasına yol açar. Böylece hazzı ve kendini iyi hissetme halini oldukça artırır. Bu nörotransmitterlerin artması libidoyu ve cinsel isteği artırdığı gibi özellikle kadınlarda orgazmı güçlendirir. Kokain, sırasıyla önce dopamin sonra norepinefrin ve son olarak serotonin nörotransmitterlerinin sinaptik aralıkta birikmesini sağlar (8, 23, 34, 35).

Tolerans ve yoksunluk

Kokaine karşı tolerans hızla ortaya çıkabilir. Madde etkisini kaybetmeye başlayınca kişinin kendini mutsuz, bitkin, sıkıntılı, kaygılı, ajite, hiçbir şeyden keyif alamaz, güçsüz, sinirli, saldırgan ve depresif hissettiği bilinmektedir. Uyku hali artar ve bazen kötü rüyalar da görebilir. Bu çöküntü halinden kurtulmak için kişide tekrar madde kullanma isteği ortaya çıkar (23, 36). Bu yoksunluk sendromları son kullanımdan 1-2 gün sonra başlar ve 4. günden sonra sendrom kötüleşir. Bu durum haftalarca sürebilir. Yoksunluk sendromunun 3 aşaması vardır. Birinci faz depresyon olarak adlandırılır. İlk birkaç gün içerisinde ortaya çıkar ve kişide sinirlilik, yoğun açlık, kokain krizleri, aşırı yorgunluk görülür. İkinci faz yoksunluk evresidir ve bu evrede kokain krizi, enerji tükenmesi, sinir krizleri, sürekli kötü durumda olma hissi, uykusuzluk ve kâbuslar yaşanır. Bu süreç 10 haftaya kadar devam edebilir. Üçüncü ve son faz ise tükenmedir. Bu evrede sık kokain krizleri, ağır depresyon ve bunları takiben intihar davranışı görülmektedir (36, 37).

Letal doz

Kokainin ortalama ölümcül dozu (letal doz) tam olarak bilinmezken kişinin metabolizmasına, alınan kokainin saflığına ve vücuda giriş yoluna göre değişkenlik göstermektedir. Lokal anestezik olarak kullanım alanı olan kokainin belirtilen "güvenli" dozu 200 mg olmakla birlikte 25 mg kadar düşük kokain dozlarında dahi ölümler bildirilmiştir. Bununla birlikte insanlarda yaklaşık 500 mg kokainin kardiyak toksisiteye, 1 g üzerinin ise ölüme sebep olabildiği bildirilmiştir (38). Yapılan fare deneylerinde ise kg başına 95,1 mg kokainin ölümcül doz olduğu bulunmuştur (39). Ölüm sonrası hidroliz devam ettiğinden kandaki kokain miktarı giderek azalır ve kokain kaynaklı ölümlerde kandaki madde konsantrasyonları ölçümünün yararlı yorumlayıcı bilgiler sağlama olasılığı düşüktür (40). Ölümler, kullanım şekli açısından en sık intravenöz ve inhalasyon yoluyla vücuda alımında gözlenmektedir. Piyasaya verilen maddenin saflığının artırılması nedeniyle yüksek doza bağlı ya da alkol, eroin ve diğer narkotiklerle birlikte kullanımı kaynaklı artan toksisite

nedeniyle de ölümler görülebilmektedir. En çok kokain ölüm şekli ise kaçakçılık sırasında gümrükten geçirmek amacıyla kokain paketlerinin yutulması veya vücut boşluklarına konulması ve bu paketlerin vücut içerisindeyken açılması ya da patlaması sonucu ortaya çıkmaktadır (41).

Fiziksel etkileri

Kokain kullanımında bireyde başlangıçta göz bebeklerinin büyümesi, aşırı neşe, özgüven artışı, konuşkanlık ve sosyal bir ruh hali ile birlikte hareketlilik ve yüksek enerji ortaya çıkmaktadır. Bu etkileri takiben iştah azalması, ağız kuruluğu, vücut ısısının artması ve terleme, kan basıncının artması ve kalp atışının hızlanması, bulantı, kusma, titreme ve baş dönmesi gözlenmektedir (4, 8, 23).

Beyne etkileri

Kokain beyindeki kimyasal ileticiler olan dopamin, norepinefrin ve serotonin seviyesini arttırır. Normalde bu moleküller salındığı hücreye geri dönerek sinir hücreleri arasındaki iletimin bitmesini sağlar. Kokain kullanıldığında ise bu moleküller hücre içerisine tekrar alınmaz, sinaptik boşlukta sayıları artar ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi bozarlar. Beyinde gerçekleşen dopamin, norepinefrin ve serotonin akışı kokain kullanımını arttırır çünkü beyin kokain kullanımındaki seviyelere alışır ve daha az olması haline yoksunluk sendromları ortaya çıkar (8, 23, 34, 35, 42).

Kalbe etkileri

Kokain kullanımı düzensiz kalp atımı ve kalp krizi veya felç gibi aniden ölümle sonuçlanan kardiyovasküler ve sereberovasküler hastalıklara neden olabilir. Kokain ayrıca koroner damarlarda daralmaya da neden olur. Ölümler genellikle kalp durması veya solunum durması sonucu kalp krizi ile gerçekleşir. Kokainin yüksek dozda alınması ise solunum güçlüğü, yüksek kan basıncı, ateş, halüsinasyonlar ve ileri derecede sinirlilik hali yapar (23, 43-45).

Yarattığı psikolojik sorunlar

Kokainin bağımlılık yapıcı etkisi doğrudan beyinde salgılanan maddeler üzerinden gerçekleştiğinden psikolojik etkileri de oldukça belirgindir. Kullanıldığı dönemde kişi çok canlı, konuşkan ve özgüveni yüksek bir bireyken, maddenin kullanılmadığı dönemlerde agresif, depresif bir ruh haline bürünür. Psikotik davranışlar ve paranoya gelişir. Bununla birlikte kişide ciddi sinir krizleri meydana gelir. Kokain sonrası depresyonlar ise intihar girişimlerine yol açabilirler (23).

Gebelikteki etkileri

Kokain kullanımı bebeğe giden kan miktarını azaltır ve bu azalma bebekte büyüme geriliğine yol açar. Ayrıca kokain güçlü bir iştah kesicidir ve gebelerde beslenme yetersizliği kaynaklı da bebekte gelişme geriliği görülmektedir. Kokain kullanıcısı olan annelerin bebeklerinde prematürelik, düşük doğum ağırlığı, taşikardi, böbrek yetmezliği, kalp problemleri riski fazladır. Gebelik boyunca kullanmayıp yalnızca gebelik başlangıcında kullanılsa dahi aynı riskler gebelik süresince devam eder. Ayrıca gebelikteki kokain kullanımının ani bebek ölümü riskini de artırdığı belirtilmektedir. Kokain kullanan annelerin bebeklerinde doğumdan sonra anneden geçen yoksunluk bulguları da görülür. Yağda çözünen bir madde olduğundan emzirmeyle de kokainin anneden bebeğe geçtiği bilinmektedir (24).

Uzun dönem etkileri

Kronik kokain kullanımında birçok yan etki ortaya çıkabilir. Burundan çekenlerde koku duyusunun kaybı, burun kanamaları, sürekli burun akıntısı, yutkunma zorlukları, burun delinmeleri ve üst damak delinmeleri gözlenirken sigara olarak kullanan bağımlılarda astım, öksürük, solunum bozuklukları ve zatürre gibi ciddi enfeksiyonlar ortaya çıkar (46). Ağız yoluyla kokain kullanan bağımlılarda kan akımının azalmasına bağlı olarak ciddi kabızlık görülmektedir. Damar yolundan enjekte olarak alan kullanıcılarda ise enjektörün dezenfekte

olmayışından kaynaklı HIV, Hepatit C ve kanla bulaşan diğer enfeksiyonlar görüldüğü gibi cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, ciltte yaralar ve damarlarda daralmalar görülmektedir (23).

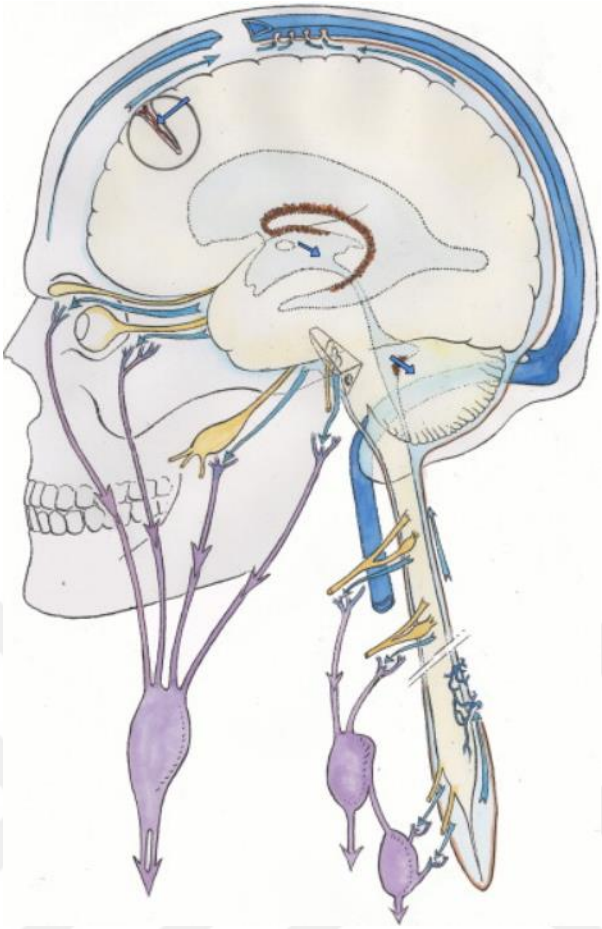
Bunların yanı sıra kokain kullanıcılarında uzun dönem kullanım sonrası uykusuzluk ve yorgunluk, depresyon, paranoya, psikoz ve sinirlilik hali, beyinde inme geçirmeye yüksek eğilim, aşırı açlık hissi, böbrek ve bağırsak hastalıkları, cinsel fonksiyonlarda bozulma, yüksek tansiyon ve düzensiz kalp atımı, kalp hastalıkları gözlenmektedir. Aşırı kullanımında kalp krizi ve ölüm ortaya çıkmaktadır (8, 23, 33, 43, 44).

2.2. BOS

BOS, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) içerisinde subaraknoid aralıklarda ve beyin ventriküllerinde bulunan renksiz ve berrak bir sıvıdır. Beyni ve spinal kordu çevreleyen BOS, kan plazmasının bir ultrafiltratıdır. BOS'un işlevleri;

- MSS'yi mekanik olarak korumak ve desteklemek,
- Beyni tamamen çevreleyerek ağırlığını %97 oranında azaltmak (yakşalık 1500 g'dan 25 g'a),
- Sinir dokusu için besinlerin tedarikini sağlamak,
- İçerisinde bulundurduğu lökosit, immünoglobulin gibi bağışıklık sistemi bileşenleri ile beyin ve spinal kord için tampon görevi görmek,
- Beyin gelişiminde ve nöronal işleyişi etkileyen beyin interstisyel sıvı homeostazının düzenlenmesinde rol almak,
- MSS metabolizmasında yer almak ve laktat, karbondioksit gibi metabolik atıklarını uzaklaştırmak,
- MSS içerisindeki kimyasal ortamı dengede tutmak,
- Beyindeki arteriyel ve venöz damarları arasındaki basıncı dengelemek ve sabit tutmak olarak bilinmektedir (47-49).

BOS hacminin, yenidoğanlarda yaklaşık 10-60 mL, çocuklarda 60-100 mL, yetişkinlerde 90-150 mL arası olduğu tahmin edilmekle birlikte bireyler arası belirgin farklılıklar olduğu da bilinmektedir. Yaşlılarda ise BOS hacminde bir azalma vardır. Hacminin %20'si MSS içerisinde ventriküler sistemde, %80'i ise subaraknoid boşlukta yer almaktadır. Günde 3-4 kez büyük çoğunluğu (%60-75) koroid pleksuslarda olacak şekilde yeniden salgılanıp yenilenir. Salgılanma hızı 0,35 mL/dk, 20 mL/sa veya 500 mL/gün'dür (49, 50). Bu hız gün içerisinde sabit olmayıp BOS üretiminin gece saat 02:00'de en fazla, akşam saat 18:00'de ise en az olduğu bilinmektedir (51). Salgı sonrası bireyde olması gereken hacmi koruyabilmek için oluşan miktara eşit oranda geri emilim meydana gelmektedir. Geri emilim, arakinoid granülasyonlar yoluyla gerçekleşir ve bu emilimi BOS'un üretildiği yerdeki basıncın emilimin gerçekleştiği yerdeki basınçtan az da olsa yüksek olması sağlar (52). Şekil 4'te gösterilen bu emilimin %80'i beyin çevresinde %20'si omurilik etrafında olmaktadır. Yetişkinlikten yaşlılığa doğru gittikçe BOS oluşumu ve BOS emiliminde azalmanın meydana gelmektedir. Bu azalmanın yaşlanmayla birlikte %50 kadar olduğu bilinmektedir (53). BOS miktarı ve basıncı, oluşum ve geri emilim kaynaklı her zaman sabittir.



Şekil 4: BOS'un salgılanma, dolaşım ve geri emilim mekanizması (49)

BOS'un içeriğinde bulunan bileşimler miktarsal olarak farklı olmakla birlikte kan plazma içeriğine benzerdir. Kan plazmadan farklı olarak; sodyum, magnezyum ve klor daha fazla iken protein, üre, kalsiyum, potasyum, fosfat ve glikoz daha azdır (48, 49, 54). BOS'a ait fizyolojik ve biyokimyasal bulgular Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I. BOS genel özellikleri, molekül ve hücre bileşimi

Parametre	**Değer**
pH	7,28-7,32
Yoğunluk	1006-1008
Osmolarite	280-300 mOsm/L
Albumin	<100-300 mg/L
Glikoz	2,2-4,2 mmol/L
Keratin	50-110 µmol/L
Demir	0,2-0,4 µmol/L
Fosfor	0,4-0,6 µmol/L
Proteinler	0,1-0,40 g/L
Laktat	1,1-2,0 mmol/L
Üre	3-6,5 mmol/L
Lipidler	10-30 mg/L
Sodyum	135-150 mmol/L
Potasyum	2,6-3,0 mmol/L
Klor	115-130 mmol/L
Karbon dioksit	20-25 mmol/L
Kalsiyum	1,00-1,40
Magnezyum	1,2-1,5 mmol/L
Laktat	1,1-2,4 mmol/L
LDH	Yaklaşık % 10
PCO_2	44-50 mmHg
PO_2	40-44 mmHg
Eritrositler	0 / mm^3
Lenfositler	0-5 / mm^3
Bakteriler	0 / mm^3

2.2.1. BOS çalışmalarının tarihçesi

Tarihte ilk BOS incelemeri M.Ö. 460-375 yılları arasında Hipokrat, daha sonra 130-200 yıllarında anatomist Galen tarafından beyni çevreleyen su tarifiyle başlamıştır. BOS'un ilk

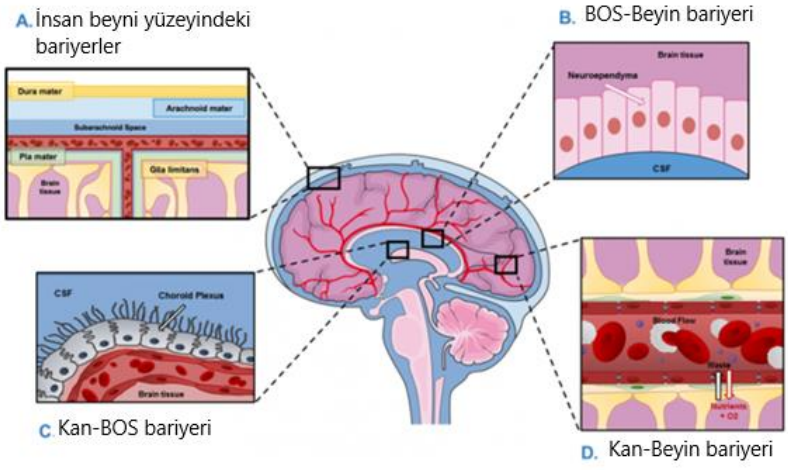
keşfedilmesi ise 1688-1772 yıllarında maden mühendisi Emanuel Swedenborg'a aittir. Onu bu keşfe iten ise dindar bir insan oluşu ve ruh arayışı sonrası Fransa, Almanya ve İtalya'daki anatomistlerle temasa geçmesidir. Swedenborg, beyin, omurilik ve kan dolaşımı hakkındaki gözlemlerini 1700'lü yıllarda yazıya dökmüştür fakat tıp hekimi olmadığından o yıllarda yayıncı bulamamıştır. Yıllar sonra, 1887'de Stockholm'de yazdıkları çeviri olarak yayınlanabilmiştir.

Daha sonra, 1747 yılında, fizyolog ve modern fizyolojinin babası olarak kabul edilen İsviçreli Doktor Albrecht von Haller fizyolojide dönüm noktası niteliği taşıyan bir çalışma gerçekleştirmiştir. von Haller, yaptığı deneylerle BOS'un ventriküllere salgılanıp damarlarda emildiğini ve salgının fazla olması durumunda kafatasına ve omuriliğe inerek hidrosefali yarattığını ortaya koymuştur. 1736-1822 yılları arasında İtalyan anatomist, fizyolog ve cerrahi profesörü Domenico Contugno balıklarda ve kaplumbağalarda BOS'u tanımlamıştır. 1783-1855 yılları arasında Fransız deneysel fizyolog Francois Magendie canlı hayvanlar üzerinde yaptığı deneylerle BOS'u incelemiştir. Yaptığı deneyler sonucunda dördüncü ventrikülün çatısındaki delik olan foramen Magendie'yi keşfetmiştir ve BOS'un sağlıktaki rolleri hakkında tıp dünyasını düşündürmeye başlamıştır. Bu çalışmalar sonrasında ise BOS hakkında gelişmeler hızlanmıştır. 1891'de W. Essex Wynter spinal subaraknoidal boşluğa dokunarak tüberküloz menenjitini tedavi etmiş, aynı yıl Heinrich Quincke bu tedavi tekniğini Alman Tıp Kongresi'nde sunarak ve tanısal ve tedavi amaçlı kullanımını savunmuş ve lomber ponksiyonu popüler hale getirmiştir. İki tanınmış nörolog William Mestrezat ve Harvey W. Cushing'in BOS çalışmalarını modern çağa taşımalarıyla ünlenmişlerdir. 1912'de Mestrezat, BOS'un ilk doğru kimyasal içeriğini tanımlamış ve 1914'te Cushing, BOS'un koroid pleksus tarafından salgılandığına dair kesin kanıtlar ortaya koymuştur (55).

2.2.2. BOS'un klinik ve adli önemi

BOS, beyin ve omurga içerisinde sahip olduğu korunaklı yapısı sayesinde kontaminasyona ve bakteri istilasına oldukça az maruz kalan bir vücut sıvısıdır. İzole yapıya sahip olması, vücutta metabolizma sonucu oluşan maddelerle kontamine olmasına engel olmaktadır. Kanda bulunan maddelerin birçoğu BOS içine geçiş yapamamaktadır. Bu eleme, beynin fonksiyonel özelliği ve kan-beyin bariyesi sayesinde olmaktadır (47).

Sinir sistemine ait astrosit hücrelerin oluşturduğu kan-beyin bariyeri, Alman tıp hekimi Paul Ehrlich'in hayvanlar üzerinde yaptığı deneylerle keşfedilmiştir. Beyin ile kan dolaşımını birbirinden ayıran bu bariyerin asıl işlevi, seçici olarak MSS'yi zararlı maddelere karşı korumaktır. Kan-beyin bariyeri hidrofobik bir yapıya sahiptir ve bu nedenle lipofilik maddelerin geçişine izin verirken hidrofilik maddelerin geçişine müsaade etmez. Beyinden içeri madde geçişi kısıtlıyken dışarı çıkış kolaydır. Benzer şekilde Kan-BOS bariyeri de BOS ile kan dolaşımını birbirinden ayırır. İşlevi, kandaki maddelere karşı seçici olarak BOS'a geçişlerini kısıtlamaktır ancak bu kısıtlamada kan-beyin bariyerine kıyasla daha geçirgendir. Burada da kan-beyin bariyerinde olduğu gibi tersi yönünde BOS'tan kan dolaşımına madde geçişi söz konusudur. İnsan kafatası içerisindeki bu bariyerler Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: İnsan beyin yüzeyindeki bariyerler (56)

Yalıtılmış özelliği sayesinde klinik ve toksikolojik açıdan oldukça önem taşıyan BOS analizleri, birçok hastalığın ve maruziyetin tanı ve tespitinde kullanılmaktadır. MSS'ye bağlı birçok hastalık BOS içeriğinde ya da miktarında değişikliklere neden olabildiğinden, BOS analizleri nörolojik ve bulaşıcı birçok hastalığın teşhisinde ayırt edici nitelik taşımaktadır. Alzheimer, multipl sleroz, iskemi, paraneoplastik sendromlar, sistemik lupuseritematozus, nörosarkoidoz, serebralanjiit, menenjit gibi hastalıklarda, BOS protein içeriği incelenerek hastalığın teşhisine katkı sağlanmaktadır (51, 52, 57-59). Bazı kemoterapi tedavilerinde kan-beyin bariyerini geçemeyen maddelerin MSS'de aktifleşebilmesi için ilaçların BOS'a enjekte edildiği de bilinmektedir (60).

2.2.3. BOS ile yapılan toksikolojik çalışmalar

BOS numunesi, MSS'ye etki eden ilaç ya da madde maruziyetlerinin tespitinde de oldukça değerli sonuçlar sağlamaktadır. Korunaklı bir ortamda olması nedeniyle de özellikle postmortemde diğer vücut sıvılarının bulunamadığı, ileri derecede çürümüş cesetler ya da travmatik ölümlerde BOS analizleri kıymet kazanmaktadır. Kapalı bir ortamda olduğundan ölüm sonrası, diğer vücut sıvılarına kıyasla daha az değişime uğrar, kontaminasyondan ve çürümelerden daha az etkilenir, dolayısıyla uzun süre korunaklı kalır.

Yapılan çalışmalar, BOS analizlerinde tespit edilen bazı narkotikmiktarlarının kanda bulunan konsantrasyonlarla anlamlı korelasyon verdiğini göstermiştir (1, 3, 61). Kan ve perikardiyal sıvılarda belirlenen konsantrasyonların, BOS'ta belirlenen konsantrasyonlarla kıyaslandığı bir postmortem çalışmada, 103 olguda toksikolojik veriler araştırılmıştır. GC-MS sistemi ile yapılan çalışma sonuçlarında çeşitli narkotiklerin BOS, kan ve perikard sıvısı konsantrasyonları arasında oldukça anlamlı bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (3). Kan ve BOS numunelerinde belirlenen konsantrasyon miktarlarının karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise yine GC-MS sistemi ile analiz edilen numunelerde bulunan miktarlar arasında anlamlı ilişki elde edilmiştir (1). Bu bulgular, BOS'un adli toksikolojide kanın alternatifi

olduğu kadar farmakolojik/toksikokinetik ve postmortem yeniden dağılımların araştırılmasında da yararlı olduğunu göstermektedir.

Barbieri ve ark. 1992 yılında erkek sıçanlara farklı dozlarda kokain uygulayarak kan ve BOS örneklerini belli aralıklarla toplamış, bu matrislerde GC-MS sistemi ile yapılan analizler sonucu bulunan kokain ve BE miktarlarına göre BOS/plazma oranlarını incelemişlerdir. Uyguladıkları kokain miktarının artmasıyla BOS'ta kokain ve BE konsantrasyonlarının arttığını ve BOS/plazma oranlarının uygulanan kokainin farklı dozlarında birbirine oldukça benzer olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları bu çalışmala ile kokainin vücuda alım dozuna paralel şekilde BOS içerisine geçtiğini ve kanın bulunamadığı ya da postmortem yeniden dağılımın gerçekleştiği olgularda BOS numunesinin oldukça kıymetli bir vücut sıvısı olduğunu göstermişlerdir (61).

2014 yılında Alvear ve ark. 2009-2011 yılları arasında yapılan otopsilerden BOS, diğer birçok vücut sıvısı ve doku numuneleri alarak kokain ve BE miktarlarını araştırmak için katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniğini kullanarak GC-MS'te yöntem geliştirmişlerdir (62). Yine Serrano Alvear ve ark. 2016 yılında 25 adli olgudan içlerinde BOS numunesinin de olduğu farklı nörolojik vücut sıvılarını toplayarak kokain ve BE miktarlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda BOS numunesi kana iyi bir alternatif örnekleme kaynağı olarak gösterilmiştir (63).

BOS numunesi yalnızca kana alternatif matris olması ile değil, analizi yapılan diğer vücut sıvılarındaki sonuçları doğrulamak adına da oldukça önem taşımaktadır. Pragst ve ark. tarafından 1999 yılında gerçekleştirilen çalışmada eroin kullanımına bağlı 29 ölümlü olgu incelenmiş, bu olguların göz içi sıvılarında ve BOS örneklerinde belirlenen 6-asetilmorfinin (6-AM) verileri ile idrarlarında belirlenen 6-AM verileri karşılaştırılmıştır. Bulunan sonuçlara göre 6-AM için BOS ve göz içi sıvısı analizinin, idrar testinin negatif olduğu durumlarda bile pozitif sonuçlar verebildiği bildirilmektedir (64).

Staeheli ve ark. tarafından 2015 yılında gerçekleştirilen oldukça kapsamlı çalışmada adli bir olgudan içlerinde BOS numunesin de olduğu toplamda 11 farklı vücut sıvısı ve dokusu alınarak her birinden 83 farklı analiti tayin edebilmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) tekniği ile LC-MS/MS ile yöntem geliştirilmiş, ve yöntem validasyon parametlerelerini uygunlukla tamamlamıştır. (65).

Tüm bu çalışmalar, BOS örneğinin adli toksikoloji açısından madde analizi araştırmak için kana alternatif bir matris, postmortem yeniden dağılım araştırmalarında alternatif bir vücut sıvısı ve diğer vücut sıvılarındaki negatif sonuçların kontrolü olarak kıymetli bir numune olduğunu göstermektedir.

Vücuttan BOS numunesi alımı

Vücuttan BOS örneğinin alımı, lomber ponksiyon olarak adlandırılan omurga kanalındaki subaraknoid boşluğa hipodermik bir iğne enjekte edilmesi ile gerçekleşir. Antemortem olgularda lokal anestezi altında numune alımı gerçekleştirilir. Postmortemde iğne aspirasyonuna alternatif olarak kafatası çıkarıldıktan sonra ventriküllerden aspire edilmesi de kullanılabilir.

2.3. Kromatografi

Yunanca renk yazımı anlamına gelen “khramoma” ve yazmak anlamına gelen “graphe” sözcüklerinin birleşmesiyle oluşan kromatografi terimi “renk yazımı” anlamındadır. 20. yüzyılın başlarında Rus botanikçisi Mikhail Tsvet’in bitki pigmentleri üzerinde yaptığı ayırma çalışması sonucunda bulunmuş, 1906’da yayınlanan makalesinde de ilk kez kullanmıştır. Geçmişten günümüze, A. J. P. Martin ve R. L. M. Synge 1952 yılında, Fenn J. B. ve Tanaka K. 2002 yılında kromatografi alanındaki çalışmaları ile Kimya Dalında Nobel Bilim Ödülü almışlardır. Günümüzde kozmetik, gıda, sağlık, sanayi, tarım gibi birçok alanda kromatografi teknikleri kullanılmaktadır (66, 67).

Bugün, uygun bir çözücü ortamına konulan karışımın içerdiği maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı ve saflaştırıldığı ayırma tekniği olarak tanımlanmaktadır. Karışımların sıvı içerisindeki çözünürlüklerinden ya da katı yüzeylere tutunma farklılıklarından yararlanılarak ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırarak tanımlayabildiğinden ve hedeflenen numunenin miktarını ölçebildiğinden bilim dünyasının çalışmalarını kolaylaştırmaktadır (66-68).

Tüm kromatografik tekniklerde "sabit faz" ve "hareketli faz" olmak üzere iki faz bulunur. Ayrılması istenilen karışımdaki maddeler hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden sürüklenir. Maddelerin hareketli faz yardımıyla sürüklenirken sabit faz ile etkileşime girerek sabit faza farklı ölçülerde tutunmaya çalışması her bir maddenin sabit fazı farklı sürelerde terk etmesine neden olur. Böylece karışım içerisindeki maddeler birbirlerinden ayrılmış, ayrı ayrı toplanmış ve tanımlanmış olur. Maddelerin sisteme girmesinden itibaren sabit fazı terk ederek ayrılması arasında geçen süreye alıkonma zamanı (retention time, RT) denir ve dakika cinsinden tanımlanan bu süre sabit analitik koşullar altında her kimyasal madde için parmak izi niteliği taşır (66-69).

Kromatografik tekniklerde 3 temel unsur vardır:

Sabit faz: Hareketli faz içerisinden gelen numunenin etkileşime girerek alıkonulduğu, bir kolon içerisine veya düz bir yüzeye tutturulmuş fazdır. Sabit faz, hareketli fazla karışmayan bir sıvı da olabilir. Daima katı veya katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı tabakasından oluşan sabit faz, hareketsiz faz veya durgun faz olarak da adlandırılabilmektedir.

Hareketli faz: Mobil faz ya da sürükleyici faz olarak da adlandırılabilen bu faz, karışımı sabit fazın üzerinden veya arasından geçirerek taşıyan çözücüdür. Daima sıvı veya gazdan oluşan bu faz, genellikle su/sulu tampon çözeltiler ve metanol/asetonitril ile oluşturulan çözeltilerdir. Ayrıştırma tekniğinde hareketli faz seçiminde, kullanılacak sabit fazın ve analizi yapılacak numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine dikkat edilmelidir.

Sabit faz, hareketli faz ve karışımda yer alan maddeler arasındaki etkileşimin türü: Moleküllerin birbirinden ayrılmasında ana basamak olan bu etkileşim, 'yüzey tutunması veya adsorpsiyon' ile 'çözünürlük' kavramlarıdır. Sabit fazın fiziksel haline göre reaksiyon alan bu etkileşim türünde eğer ki sabit faz katı ise karışımdaki maddeler ile sabit faz arasında 'adsorpsiyon', eğer ki sabit faz sıvı ise karışımdaki maddeler ile sabit faz arasında 'çözünme yani dağılma' etkileşimi gerçekleşmektedir (66-68).

Esas olarak adsorbsiyon ve dağılma mekanizmaları üzerinden yürüyen kromatografik teknikler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Tablo II'de kromatografik tekniklerin ayrılma mekanizmalarına göre, uygulama biçimine göre, faz tiplerine göre sınıflandırılmaları gösterilmektedir.

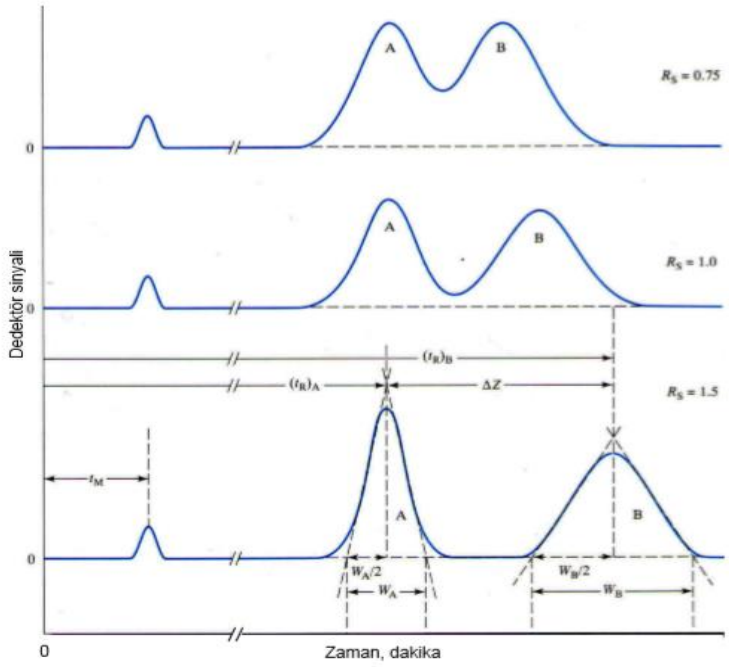
Tablo II. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Ayrılma Mekanizmalarına Göre	**Uygulama Biçimine Göre**	**Faz Tiplerine Göre**
1.Adsorpsiyon Kromatografisi 2.Dağılma (Partisyon) Kromatografisi 3.İyon Değiştirme Kromatografisi 4.Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi 5.İyon Çifti Kromatografisi 6.Afinite Kromatografisi	1.Düzlemsel Kromatografi a. Kâğıt Kromatografisi b. İnce Tabaka Kromatografisi 2. Kolon Kromatografisi a. Gaz Kromatografisi b. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	1.Sıvı Kromatografisi a. Sıvı-Katı Kromatografisi b. Sıvı-Sıvı Kromatografisi 2.Gaz Kromatografisi a. Gaz-Katı Kromatografisi b. Gaz-Sıvı Kromatografisi

2.3.1. Sıvı kromatografisi (liquid chromatography; LC)

Birçok ayırma tekniğinin iyileştirilmiş ve hızlandırılmış hali olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, karışım içerisindeki maddelerin kısa sürede analizini ve saflaştırmasını yapabilmektedir. Bu teknikle çok küçük miktarlarda bulunan maddeyi dahi tanımlamak ve ölçmek mümkündür. Uçucu olmayan maddelerde etkindir ve sabit faz genellikle küçük çaplı,

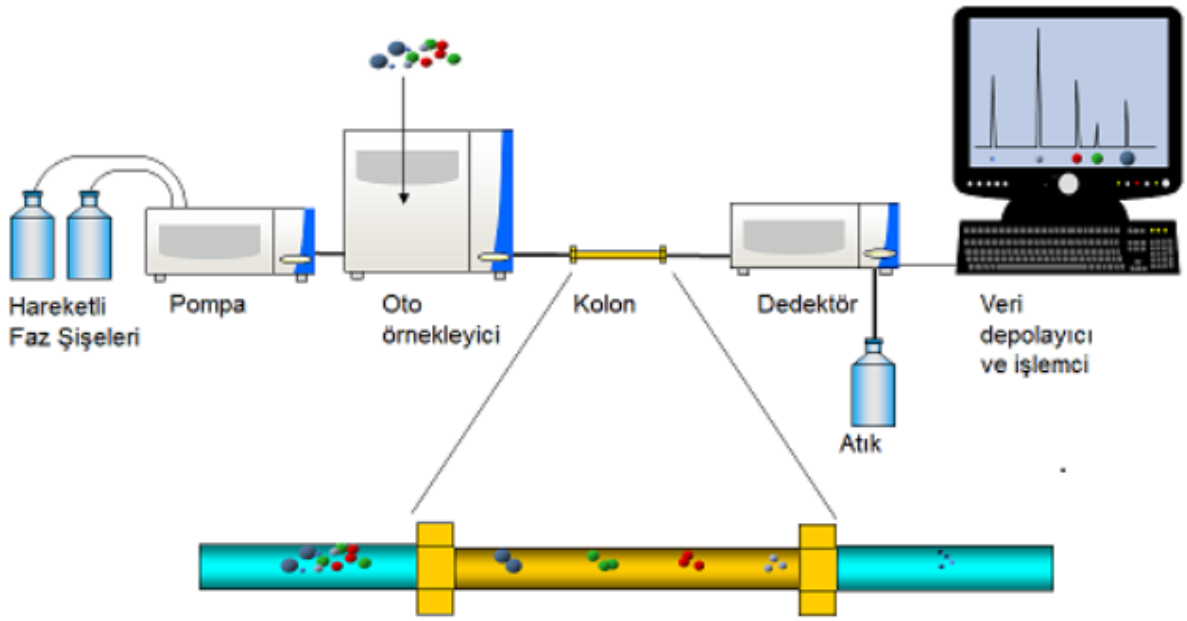
küçük boylu, silindirik bir katı kolondur. Kolonun içerisinde katı dolgu maddeleri bulunmaktadır ve bu dolgu maddelerinin tanecik boyutu ne kadar küçük olursa sıvı olan hareketli faz ile katı sabit faz birbirleri ile o kadar iyi etkileşir. Böylelikle kolonun etkinliği artmış olur. Kromatografide bir kolonun iki veya daha fazla maddeyi birbirlerinden ayırabilme gücüne rezolüsyon denir ve ile R_S ile gösterilir. Teorik olarak, piklerin alıkonma zamanları arasındaki farkın, ortalama pik genişliğine oranıdır. Şekil 6'da gösterildiği gibi, rezolüsyon arttıkça analizin doğruluğu artar. En etkin kolonlar, en keskin pikleri oluşturan ve yayılmayı önleyerek daha iyi ayrışım yapan, rezolüsyonu yüksek olan kolonlardır. Ayrıca kolon içinde bulunan dolgu maddesi çok çeşitli olacağından, yapılacak analize özgü kolon seçimi de çalışmanın etkinliğini artıracaktır (67, 70, 71).



Şekil 6: Üç farklı ayırma gücü için kromatogram (72)

Şekil 7'de gösterilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemine numune verilmeden önce aranılan maddeye ve matrikse uygun örnek hazırlama yöntemi ile numune sıvı hale getirilerek cihaza enjekte edilir. Numune, mobil faz olarak adlandırılan hareketli sıvı fazla birlikte bir pompa yardımıyla kolon içerisine itilir. Pompa, bu sıvı karışımının sistemde

kolon ve dedektör boyunca sabit akışını sağlar. Sistemde bu akış boyunca hareket için sisteme bir basınç uygulanır. Çünkü kolon içi dolgu maddeleri çok sıkıdır ve basınç uygulanmadığı takdirde ayrımı istenilen maddenin belirli bir hızla geçmesi mümkün değildir. Aranılan maddeler basıncın ve kolona tutunma farklılıklarının etkisiyle karışım içerisinde bulunan diğer maddelerden farklı hızlarla ayrılarak sabit fazın hemen arkasında bulunan detektöre farklı hızlarda ulaşır. Maddenin kolona tutunma veya adsorpsiyon süresi arttıkça alıkonulma süresi de artar. Dedektörde miktar tayini yapılır ve detektörden çıktığında kaydedici tarafından pik olarak görüntülenir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde dedektör, kütle spektrometresi (mass spektrofotometri MS), floresan (FD), ultraviyole (UV), kızıl ötesi (IR) ya da başka dedektörler olabilir. Analizini edilmek istenilen karışımın özelliklerine uygun bir dedektör seçilir (66, 70, 71).

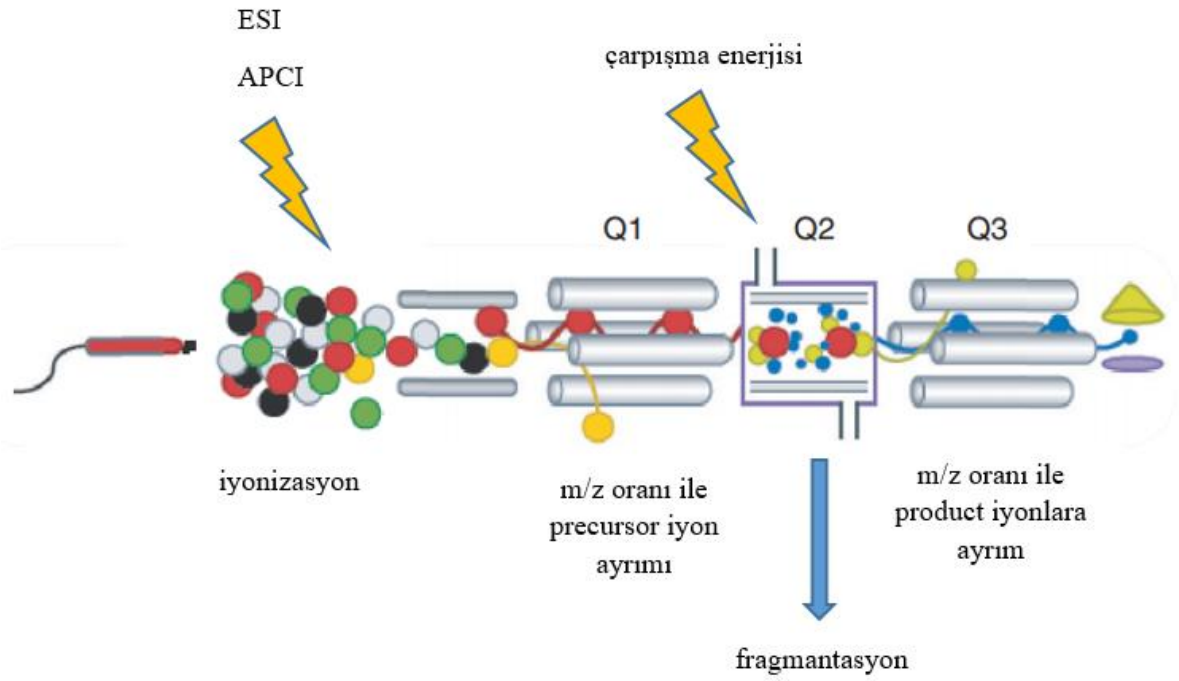


Şekil 7: Sıvı kromatografisi sistemi (73)

Hassasiyeti ve duyarlılığı yüksek, hızlı analize elverişli sıvı kromatografisi, biyokimyasal analizler, gıda analizleri, çevre kirleticilerinin analizleri, endüstriyel analizler gibi birçok alanda kullanıma elverişlidir (71, 74).

2.3.2. LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)

Sıvı kromatografisinde dedektör olarak ardışık kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılması sonucu elde edilen sistemdir. İki tane kütle analizörünün birbirlerine bağlandığı MS/MS, LC'de ayrışan analitleri iyonlaştırarak tanımlar. Genellikle elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI) olmak üzere iki iyon kaynağı içerir. Analizlerde büyük oranda ESI kullanılır. Analize verilen numunenin molekülleri kolondan çıktıktan sonra MS/MS içerisinde ilk olarak sistemin girişinde bulunan iyonizasyon bölmesine girer ve burada ESI ve/veya APCI ile iyonlaşma başlar. Daha sonra, Şekil 8'de gösterildiği gibi, moleküller kuadrupol 1 (Q1) olarak adlandırılan ilk kütle analizöründe kütle/yük (m/z) oranlarına göre ana iyonlarına (product ion) ayrılır. Ayrılan iyonlara çarpışma hücresinde (Q2) yüksek saflıkta inert bir gaz ve çarpışma enerjisi (collision energy; CE) uygulanarak daha küçük parçalanma sağlanır ve belli bir m/z oranına sahip iyonlar seçilerek daha küçük iyonlara (product ions) parçalanır. Bu iyonlar da kuadrupol 3 (Q3) kütle analizöründe tespit edilir. Son olarak detektöre iletilen farklı kütlelerdeki ayrılan iyonlar ile kütle spektrumları elde edilir. Bu hassasiyet ile LC-MS/MS, bir matris içindeki birden çok analite ait düşük orandaki kütle farklılıklarını algılar ve benzer m/z oranına sahip iyonları dahi tespit edilebilir. Uçucu olmayan bileşiklerin tespit ve tayin analizinde kullanılabilen sistem; çok düşük miktardaki madde analizlerinde dahi kısa sürede sonuç vermesi bakımından hassasiyeti yüksek, sonuçları kesin, duyarlı ve avantajlıdır.



Şekil 8: MS/MS şeması (75)

Eser miktarda analiti tayin edebilmesi, kantitaif analizlere uygunluğu, sonuçlarının kesinliği ve yüksek ayrım gücü, az miktarda örnekle dahi çalışılabilmesi, yüksek duyarlılığa sahip olması, hızlı analize elverişli oluşu, ölçüm aralığının geniş olması avantajları ile LC-MS/MS sistemi; ilaç, gıda, tarım, adli bilimler gibi birçok alanda kullanıma elverişlidir. Ancak tecrübeli bir analist tarafından kullanıma uygun olan bu sistemde, aranılacak analitin kimyasal özellikleri ve çalışılacak matrisin nitelikleri iyi araştırılmalı, matrise ve analite özgü kolon seçilmeli, cihazın basınç, sıcaklık, akış gibi parametreleri en uygun şekilde belirlenmelidir (76, 77).

Adli Bilimler alt dalı olan Adli Toksikoloji laboratuvarlarında LC-MS/MS analiz için oldukça sık tercih edilen bir analitik sistemdir. BOS, göz içi sıvısı gibi çoğunlukla az miktarda elde edilebilen örneklerle dahi çalışmaya elverişli olma, tek sefere mahsus maruziyetlerde ya da maruziyet üzerinden zaman geçen durumlarda vücutta aranılacak analitin az miktarda olmasına rağmen kantitatif analize kolaylıkla uyarlanabilme, türevlendirme gibi ek çalışma basamakları gerektirmeden kısa sürede analizi

sonuçlandırabilme, olay yerinde uzun süre bekleyen ve çevre koşullarına karşı dayanıklılığı düşük bileşikleri tespit edebilme, postmortem olgularda toksik maddelerin ölüm üzerindeki etkisini araştırmada cevap verebilme, matris içerisinde tek enjeksiyon ile çoklu analit tayini yapabilme özellikleri sayesinde Adli Toksikoloji laboratuvarlarının önemli analitik sistemleridir. Verimliliği, hassasiyeti, kesinliği ve duyarlılığı ile özellikle son yıllarda sık tercih edilmektedir.

2.4. Analitik Yöntemlerin Validasyon (Geçerli Kılma) Çalışması

Validasyon (geçerli kılma), bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunu ve performansını bir takım değişkenlere göre test ederek yazılı olarak ortaya koymak olarak tanımlanmadır. Validayon çalışmaları ile deneylerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanır ve yöntemin kesin, doğru, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu kanıtlanmış olur. Çalışmaların öncesinde, metodun uygulanacağı analitik sistemin performansının test edilerek uygunluğunun doğrulanması şarttır.

Validasyon çalışmaları:

- Bir analiz için yeni metot geliştirildiğinde,
- Kullanılmakta olan metotta değişiklik (ekleme/çıkartma) yapıldığında,
- Valide edilmiş bir metot başka bir laboratuvarda kullanılacağında,
- Valide edilmiş bir metot ile farklı bir analist çalışma yapacağında,
- Valide edilmiş bir metot farklı bir analitik sistemde kullanılacağında,
- İç ve dış kalite kontrol faaliyetleri sonunda metotun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında gerçekleştirilir (12, 78, 79).

Metot geliştirmede kullanılan validasyon parametreleri; doğruluk, gerçeklik, kesinlik, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, seçicilik, hassasiyet, çalışma aralığı, doğrusallık, tespit limiti, tayin limiti ve sağlamlık olarak sayılmaktadır.

2.4.1. Doğruluk (accuracy)

Analitik yöntemde elde edilen deney sonucu ile kabul edilen referans değer arasındaki yakınlık derecesidir. Yöntemin doğruluğu niteleyici bir kavramdır, rakamsal olarak ifade edilmez. Sistemli ve rastgele hata sonuçları değerlendirilir ve yöntemin doğruluğu belirlenir. Bir ölçüm yönteminin doğruluğunu tanımlamak için gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki bileşenden bahsedilir.

2.4.1.1. Gerçeklik (trueness)

Analiz sonuçlarının büyük bir serisinden elde edilen ortalama değer ile kabul edilen bir referans değer arasındaki yakınlık derecesidir. Genellikle toplam sistematik hata (bias) cinsinden ifade edilir. Bu hesaplama için; sertifikalı referans değeri, referans metot değeri, yeterlilik testleri ve geri kazanım çalışmaları kullanılır.

Geri kazanım (Recovery): Geri kazanım için en az 6 tekrar yapılır ve %70-120 aralığında olması gereklidir (80).

- Sertifikalı referans standart ile geri kazanım çalışması:

$$\%\text{Geri Kazanım} = \frac{Cgözlenen}{Cref} * 100$$

Cgözlenen: referans standart ile yapılan analiz sonuçlarının ortalaması

Cref: referans standartın sertifika değeri

- Kirletilmiş matris ile geri kazanım çalışması: Matris ortamına belirlenen miktarlarda analizi yapılan madde eklenir (spike).

$$\%\text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Cgözlenen} - \text{Cmatris}}{Cspike} * 100$$

Cgözlenen: kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçlarının ortalaması

Cmatris: kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçlarının ortalaması

Cspike: Spike için kullanılan analit miktarı

2.4.1.2. Kesinlik (precision)

Analiz sonuçlarının tekrar çalışılması sonucu elde edilen sonuçlar arasındaki yakınlık derecesidir. Bu sonuçlar arasındaki değişimi; analist, analitik sistem, kalibrasyon, ortam koşulları, analiz ölçümleri arasında geçen süre etkilemektedir. Kesinlik sadece rastgele hataların dağılımına bağlıdır, doğru değere bağlı değildir. Standart sapma (S) ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) ile ifade edilir. Fomüller aşağıda gösterilmiştir. Ölçüm aralığında en az 3 farklı seviyede 6-15 tekrar yapılması tercih edilir (12, 81-83).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(C_i - \bar{C})}{N-1}}$$

S : standart sapma

$\sum$: toplam

C_i: yapılan i'inci ölçüm değeri

$\bar{C}$: ölçümlerin ortalaması

N^0: ölçüm sayısı

% Bağıl standart sapma (%RSD) = $\frac{S}{\bar{C}} \times 100$

S :standart sapma

$\bar{C}$: numune ortalaması

Tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar üretilebilirlik (reproducibility) olarak iki bileşenden oluşur:

Tekrarlanabilirlik (repeatability): Yöntemin; aynı laboratuvarda, aynı analitik sistemle, aynı analist tarafından, aynı gün içerisinde yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığıdır.

‘r’ ile gösterilir ve ölçüm sonuçlarının standart sapması (Sr) veya yüzde bağıl standart sapması (%RSDr) hesaplanarak ifade edilir (79).

Tekrarüretilebilirlik (reproducibility): Farklı laboratuvarlarda, farklı analitik sistemlerde, farklı analistler tarafından, farklı malzemeler kullanarak, farklı günlerde yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. ‘R’ ile gösterilir ve ölçüm sonuçlarının standart sapması (SR) ve yüzde bağıl standart sapması (%RSDR) hesaplanarak ifade edilir (79).

2.4.2. Seçicilik (selectivity)

Seçicilik, bir yöntemin aranılan analiti onunla benzer özellik gösteren diğer girişim kaynakları arasından belirleme yeteneğidir. Seçici yöntem analite özgüdür ve başka analitlerin de olduğu numuneden aranılan analiti ayırt edebilir (84).

Seçicilik kontrolü için;

- Kirletilmemiş (kör, blank) ve girişime neden olabilecek maddeler ile kirletilmiş iki örnek birlikte analiz edilerek,
- Aranılan analitle girişim yapabileceği düşünülen maddeler ile kirletilmiş numuneler analiz edilerek girişim olup olmadığı değerlendirilir.

2.4.3. Hassasiyet (sensitivity)

Hassasiyet, birim miktar için analitik sistemin verdiği sinyalin büyüklüğü olarak ifade edilir. Bir ölçüm sisteminin veya metodun hassasiyeti, o metot veya sistemle yapılacak analizin en düşük tayin sınırını belirler ve kalibrasyon grafiğinin eğiminden hesaplanabilir. Kalibrasyon grafiğinin eğimi sistemin hassasiyetini verir.

$$\text{Hassasiyet} = \frac{Ölçüm\ sinyali}{Konsantrasyon}$$

2.4.4. Doğrusallık (lineerlik) ve çalışma aralığı (range)

Doğrusallık, belirli konsantrasyon aralıklarında yapılan ölçüm sonuçlarının sinyal/konsantrasyon oranının bağlantılı olarak artması anlamına gelmektedir ve kalibrasyon eğrisi ile gösterilir. Kalibrasyon grafiğini çizebilmek için en az 6 farklı derişimde ve her bir derişim noktası birbirinden bağımsız hazırlanmış 3 tekrarlı olacak şekilde analitik sistemde çalışma yapılmalıdır. Belirlenen referans konsantrasyonlara karşı sistemden elde edilen ölçüm sonuçları ile kalibrasyon grafiği çizilir. Grafikten elde edilen eğrinin öncelikle denlemi (y=ax+b), korelasyon katsayısı (r) belirlenir. Korelasyon katsayısının karesi (r^2) incelenmelidir, ±1'e yakınlığı kalibrasyon grafiğinin doğrusallığını ifade eder ve ≥0,99 sonucu kabul edilebilir. (85). Yapılan analizlerde çalışma aralığının alt sınırı tayin limiti (LoQ) iken üst sınırı değişken olup doğrusallığın bozulmaya başladığı konsantrasyon noktası veya doğrusal sonuçlar içerisinde olsa dahi çalışılacak numune içerisinde aranılan analitin miktarına bağlı olarak belirlenebilir. Çalışma aralığı, kullanılacak yöntemin uygulama aralığıdır ve yöntemin lineer olduğu aralıkta olmalıdır.

2.4.5. Tespit limiti (limit of detection, LoD) ve tayin limiti (limit of quantitation, LoQ)

Algılama limiti olarak da ifade edibilen LoD, aranılan analitin varlığını ortaya çıkarmanın mümkün olduğu en düşük konsantrasyondur. Bulunan sonuç ile kantitatif bulgular arasında değerlendirilmez, yalnızca kalitatif sonuçtur. Aranılan analit miktarı kesin olarak belirlenemez ancak analitin varlığı tespit edilir.

Ölçüm limiti veya LoQ ise kabul edilebilir kesinlik ve gerçeklikle ölçülen en düşük analit konsantrasyonunu ifade etmektedir. Kantitatif sonuç verilebilen en düşük değerdir ve doğrusallık sınırlarının en alt derişimi ya da daha da alt derişim değeridir.

LoD ve LoQ değerleri 3 farklı şekilde hesaplanabilir:

- Sinyal / Gürültü oranı ile

Analizi yapılan numunede aranılan analitin kromatogram eldesi ile sonuca gidilebilir. Bulunan kromatogram sinyalinin (S) gürültü (noise, N) ile oranı 3,3 olduğunda LoD değeri, 10 olduğunda ise LoQ değeri kabul edilir.

LoD = 3,3*S/N

LoQ = 10*S/N

- Kör numuneye standart ekleyerek

  LoD = 3*S + C

  LoQ = 10*S + C

  S: standart sapma

  C: ortalama konsantrasyon

- Kalibrasyon grafiği ile

  LoD = 3*S/b

  LoQ =10*S/b

  S: doğrunun standart sapması

  b:doğrunun eğimi

Tüm hesaplama yöntemleri en az 10 tekrarlı çalışılmalı ve elde edilen LoD, LoQ değerleri mutlaka doğrulanmalıdır (79-81).

2.4.6. Sağlamlık (robustness/ruggedness)

Sağlamlık çalışmaları, analitik yöntemde planlı değişiklikler yaparak laboratuvardan kaynaklanan bazı küçük sapmaları ve bunların analiz sonuçları üzerine etkisinin incelenmesidir. Değişikliklerin analiz sonuçları üzerine etkisi azaldıkça yöntemin sağlamlığı artar. Numune miktarı, ekstraksiyon süresi, üretim tarihi ve markası farklı kimyasallar, kolon sıcaklığı, analist, pH, sıcaklık, basınç, iyonik güç, akış hızı, uçuculuk, çözelti saklama koşulları gibi faktörler tek tek değiştirilerek yöntem üzerine etkisi araştırılır.

Değiştirildiğinde sonuçları önemli ölçüde etkileyen parametrelerin metot protokolünde açık bir şekilde tanımlanması gerekmektedir (81).

3. Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, dünyada kullanım sıklığı oldukça yüksek bir yasa dışı madde olan kokain ve kokainin ana metaboliti BE maddelerinin, yBOS içerisinden kantitatif analizi için LS-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirilmiştir.

3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve ekipmanlar

Laboratuvarda yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan standart maddeler, kimyasallar ve markaları Tablo III'de gösterilmiştir.

Tablo III. Deneysel çalışmalarda kullanılan referans standartlar ve kimyasallar

Kimyasal	Marka
Kokain	Lipomed
Kokain-d3	Lipomed
BE	Lipomed
BE-d3	Lipomed
Formik asit	Merck
Metanol	Supelco
Etil asetat	Merck
Amonyum format	Sigma-Aldrich
NaCI	Riedel-de Haen
KCI	Sigma
$CaCI_2 \cdot 2H_2O$	Riedel-de Haen
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Lachema
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Merck
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Merck
Albumin	Fluka

Laboratuvarda yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan araç, gereç ve analitik sistemler Tablo IV'te gösterilmiştir.

Tablo IV. Deneysel çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman	Marka/Model
HPLC sistemi	Shimadzu 2040C
MS/MS sistemi	Shimadzu 8045
Azot jeneratörü	Peak Scientific Genius 1051
Yazılım; Versiyon	Lab Solutions; 5.97
Analitik kolon	Restek Raptor Biphenyl C_{18} 2,7 µm 100 × 2,1 mm
Guard kolon	Welch 3 µm 4,6 ×10 mm
SPE kartuş	Oasis HLB 60 mg; 3 mL
SPE manifoldu	Cerex 48
Azot altında uçurma düzeneği	Gyrozen HyperVap HV-300
Ultra saf su (USS) cihazı	Elga Purelab Flex
Ultrasonik banyo düzeneği	Sonorex
Santrifüj	Hettich Universal 320R
Vorteks	Isolab
Hassas terazi	Mettler Toledo
Manyetik karıştırıcı	IKA RCT Standard
pHmetre	Hanna Edge
Buzdolabı (+4 ºC ve -20 ºC)	Sharp
Derin dondurucu (-80 ºC)	Hettich
Otomatik pipet	Eppendorf
Pipet ucu	Isolab
Erlen	Isolab
Balonjoje	Isolab
Vial	Isolab
Falkon tüpler	Isolab (15 ve 50 mL)

3.2. Referans standart maddelerden stok çözeltilerin hazırlanması

Kullanılan tüm ara stoklar ve kalibrasyon çözeltileri, ana stok çözeltilerinden seyreltilerek günlük olarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin tamamı -20 ºC'de balonjoje içerisinde kapağı parafilmlenerek muhafaza edildi.

3.2.1. Kokain ve BE standart çözeltileri

Ana stok kokain çözeltisi (100 µg/mL): 1 mg kokain katı referans standartı tartılıp 10 mL balonjoje içerisinde metanol ile çözülerek hazırlandı.

Ana stok BE çözeltisi (100 µg/mL): 1 mg BE katı referans standartı tartılıp 10 mL balonjoje içerisinde metanol ile çözülerek hazırlandı.

Ana stok standart mix çözeltisi (1 µg/mL): 100 µg/mL ana stok çözeltilerinin her birinden 100 µL alınıp balonjoje içerisinde metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Ara stok standart mix çözeltisi (50 ng/mL): 1 µg/mL ana stok mix çözeltisinden 25 µL alınıp üzerine 975 µL metanol eklenerek vial içerisinde seyreltildi.

Ara stok standart mix çözeltisi (5 ng/mL): 50 ng/mL ana stok mix çözeltisinden 100 µL alınıp üzerine 900 µL metanol eklenerek vial içerisinde seyreltildi.

Ara stok standart mix çözeltisi (500 pg/mL): 5 ng/mL ana stok mix çözeltisinden 100 µL alınıp üzerine 900 µL metanol eklenerek vial içerisinde seyreltildi.

3.2.2. Kokain-d3 ve BE-d3 iç standart çözeltileri

Ana stok kokain-d3 çözeltisi (10 µg/mL): Konsantrasyonu 1000 µg/mL olan referans standart çözeltisinden 50 µL alınıp 5 mL balonjoje içerisinde metanol ile çözülerek hazırlandı.

Ana stok BE-d3 çözeltisi (10 µg/mL): Konsantrasyonu 1000 µg/mL olan referans standart çözeltisinden 50 µL alınıp 5 mL balonjoje içerisinde metanol ile çözülerek hazırlandı.

Ana stok iç standart mix çözeltisi (250 ng/mL): 10 µg/mL ana stok çözeltilerinin her birinden 250 µL alınıp balonjoje içerisinde metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.3. yBOS numunesinin hazırlanması

Bu çalışmada gerçek numune yerine onu taklit eden yBOS örneği kullanılmıştır. Hastalardan gerçek BOS örneği toplanarak çalışma yapılmadığından etik kurul onayı gerekmemiştir. yBOS hazırlama yönteminde literatüre bağlı kalınmış, gerçek BOS numunesine en yakın

matrisi hazırlamak adına prosedürler modifiye edilmiştir (56, 86). Tablo V'te belirtilen miktarlarda kimyasallar tartılarak iki ayrı balonjoje içerisinde A ve B çözeltileri oluşturulmuştur. Çözeltiler hazırlanırken, içerisinde belli bir miktar USS bulunan balonjoje içerisine tartılan kimyasallar eklenmiş, kimyasalların tamamen çözünmesinin ardından son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen tuz karışımı olan A çözeltisi ve tampon karışımı olan B çözeltilerinin tamamı erlen içerisinde 1:1 oranında karıştırılmıştır. Son karışım içerisine 198,23 mg dekstroz monohidrat ve 100 mg albümin eklenerek 15 dk manyetik karıştırıcı ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan yBOS numunesi ağzı parafilmlenmiş şekilde +4 ºC'de muhafaza edilmiştir. Bu sıcaklıkta 4 haftaya kadar bozunmadığı bilinen numune, her kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilerek bulanıklaşma veya çökelme belirtisi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Tablo V. yBOS hazırlamada kullanılan kimyasallar ve miktarları

Çözelti	Kimyasal Maddeler	Tartım miktarı (mg)
A	NaCI	1732
	KCI	44,88
	$CaCI_2 \cdot 2H_2O$	41,2
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	32,6
B	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	28,42
	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	6,1

3.4. Numune hazırlama yöntemi

Bu çalışmada yBOS matrisi içerisinden aranılan analitlerin çekitlenmesinde en uygun yöntemi bulabilmek için 2 farklı ekstraksiyon denemesi yapılmıştır. Her iki çalışma da kendi içerisinde ikiye ayrılıp farklı miktarlarda yBOS kullanılarak analiz için en uygun miktarla çalışmaya devam edilmiştir.

3.4.1. LLE yöntemi

LLE yönteminde kullanılmak üzere 2 farklı başlangıç miktarında (500 ve 1000 µL) yBOS belirlendi. Belirlenen her bir miktar için, yöntemin geçerlilliğini kontrol etmek adına 3 tane kirletilmiş 1 tane kirletilmemiş numune hazırlandı. Kirletilmiş numunelerin içerisindeki kokain ve BE miktarı orta bir konsantrasyon olacak şekilde 20 ng/mL olarak belirlendi. Matris etkisiyle gelebilecek girişim kaynaklarını gözlemleyebilmek için yBOS ile hazırlanan numunelerin aynısı çeşme suyu (ÇS) ile de hazırlandı. Toplamda 16 numune analiz edildi.

- Blank ve spike numuneleri hazırlandı

Blank-1: 1 tane 500 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix eklendi

Spike-1 (20 ng/mL): 3 tane 500 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix ve 2 µL 1 µg/mL standart mix eklendi

Blank-2: 1 tane 1000 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix eklendi

Spike-2 (20 ng/mL): 3 tane 1000 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix ve 2 µL 1 µg/mL standart mix eklendi

- Hazırlanan 16 numune homojenize olması için vortekslendi
- Tüm numunelerin üzerine ayrı ayrı 0,2 M ve 7,41 pH değerinde hazırlanmış sodyum fosfat tamponundan 250 µL eklendi
- 1:1 oranında karıştırılmış etil asetet:n-heptan karışımından 800 µL eklendi
- Vortekslendi ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi
- Santrifüj sonrası oluşan üst fazdan 750 µL alındı ve 40 ^{o}C'de azot altında uçuruldu
- Uçurma sonrası 1:1 oranında karıştırılmış mobil faz A ve B karışımından 100 µL eklendi
- Vortekslendi, viale alındı ve LC-MS/MS sisteminde analiz edildi

Sodyum fosfat tamponu hazırlama (0,2 M ve 7,41 pH): 1 L balonjoje içerisinde 21,63 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ve 12,25 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartılarak USS içerisinde çözdürüldü. Tartılan

kimyasalların tartımı sonrası pH değeri 6,84 bulundu. Yaklaşık 10-15 mL 1 M NaOH kullanarak kontrollü şekilde pH değeri 7,41'e yükseltildi.

3.4.2. SPE yöntemi

SPE yönteminde kullanılmak üzere 2 farklı başlangıç miktarında (500 ve 1000 µL) yBOS belirlendi. Belirlenen her bir miktar için, yöntemin geçerlilliğini kontrol etmek adına 3 tane kirletilmiş 1 tane kirletilmemiş numune hazırlandı. Kirletilmiş numunelerin içerisindeki kokain ve BE miktarı orta bir konsantrasyon olacak şekilde 20 ng/mL, iç standart mix miktarı 25 ng/mL olarak belirlendi. Matris etkisiyle gelebilecek girişim kaynaklarını gözlemleyebilmek için yBOS ile hazırlanan numunelerin aynısı ÇS ile de hazırlandı. SPE çalışmalarının tamamı Şekil 9'da gösterilen pozitif SPE manifoldu ile yapıldı. Toplamda 16 numune analiz edildi.

- Blank ve spike numuneleri hazırlandı

Blank-1: 1 tane 500 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix eklendi

Spike-1 (20 ng/mL): 3 tane 500 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix ve 2 µL 1 µg/mL standart mix eklendi

Blank-2: 1 tane 1000 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix eklendi

Spike-2 (20 ng/mL): 3 tane 1000 µL yBOS/ÇS içerisine; 10 µL 250 ng/mL iç standart mix ve 2 µL 1 µg/mL standart mix eklendi

- 2 mL etil asetat + 2 mL metanol + 2 mL USS ile kartuş şartlandı
- Vortekslenen numuneler şartlanması tamamlanan kartuşlara ayrı ayrı yüklendi
- Numuneler SPE kartuşlarından geçtikten sonra, USS içerisinde hazırlanmış %5'lik metanol ile 2*2 mL ile yerçekimi hızında kartuşlar yıkandı
- Yıkama sonrası kartuşlar 5000 rpm ve 18 °C'de 5 dk santrifüj edilerek kurutuldu
- Elüsyon basamağı 2*1 mL metanol + 2*1 mL etil asetat kullanılarak falkon tüplerde toplandı

- Elüe edilen numuneler 40 ^{o}C'de azot altında uçuruldu
- Uçurma sonrası 1:1 oranında karıştırılmış mobil faz A ve B karışımından 100 µL eklendi
- Vortekslendi, viale alındı ve LC-MS/MS sisteminde analiz edildi



Şekil 9: SPE ekstraksiyon manifoldu

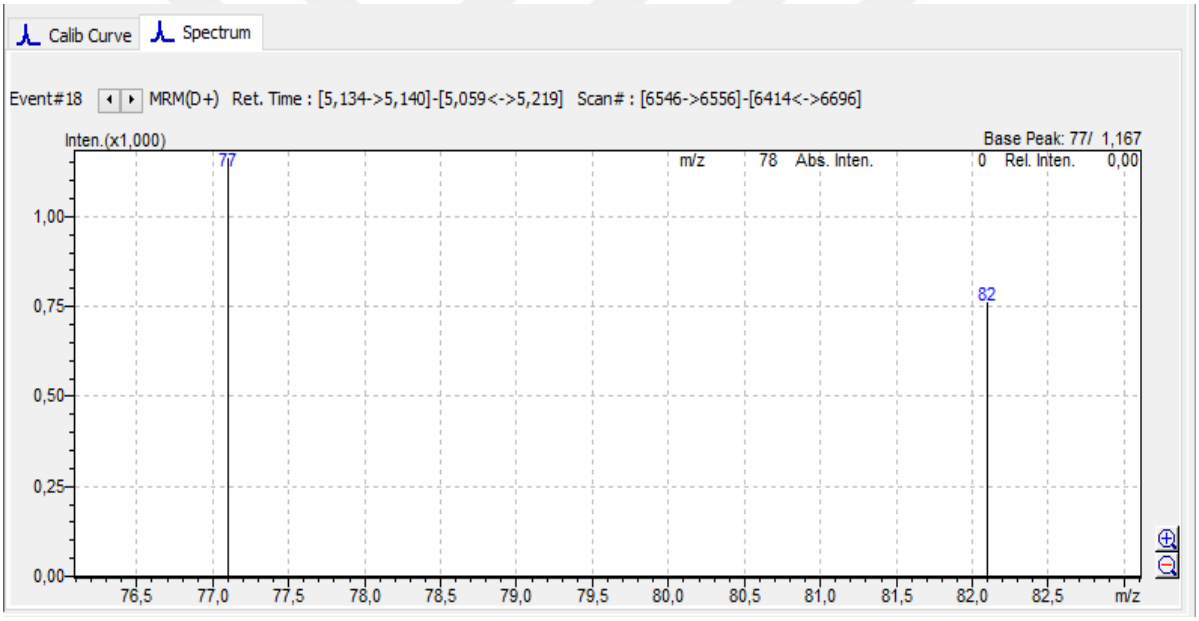
3.5. LC-MS/MS sistem koşulları

LC-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirilirken öncelikle kokain, kokain-d3, BE ve BE-d3 referans standart maddelerinin çoklu reaksiyon izleme (Multiple Reaction Monitoring, MRM) çalışması yapılmıştır. Yapılan MRM çalışmalarının sonuçları Tablo VI'da, kokaine ait spektrum Şekil 10'da, kokain-d3'e ait spektrum Şekil 11'de, BE'ye ait spektrum Şekil 12'de ve BE-d3'e ait spektrum Şekil 13'te gösterilmiştir.

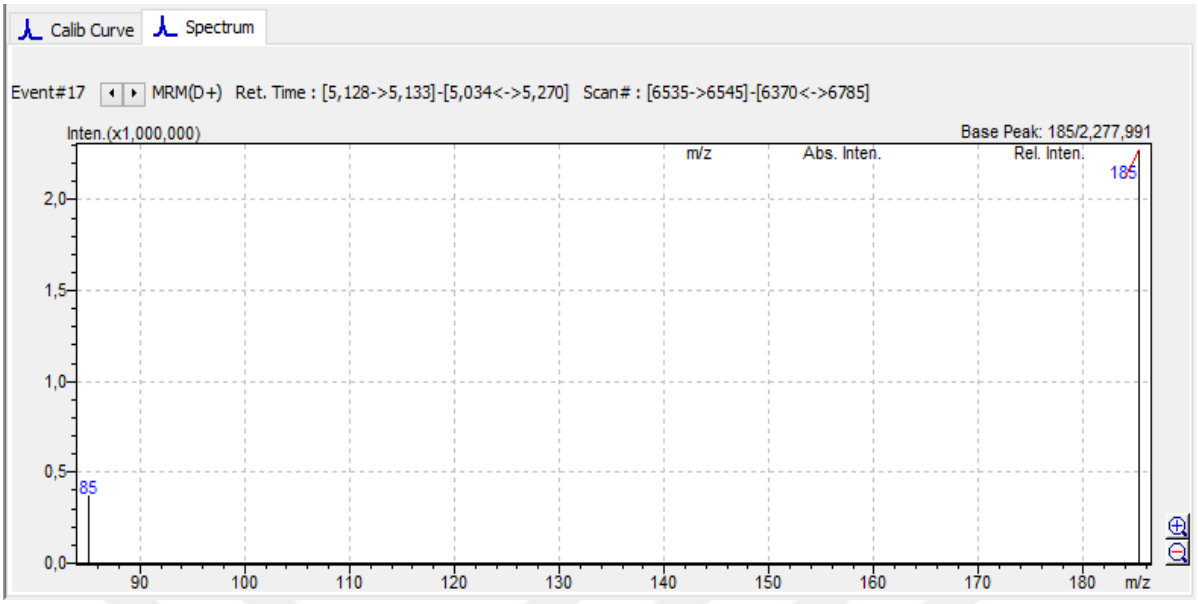
Tablo VI. Referans standartların MRM çalışmaları

	Q1	Q3	DT (ms)	CE (V)	RT (dk)
Kokain	304,0	82,1 77,1	16,0	-31,0 -55,0	5,082
Kokain-d3	307,0	185,3 85,1	16,0	-20,0 -31,0	5,076
BE	289,9	168,3 105,2	16,0	-19,0 -30,0	4,834
BE-d3	293,1	171,2	34,0	-19,0	4,813

*Q: Kuadrupol, DT: Dwell time; bekleme süresi, CE: Collision energy; çarpışma enerjisi, RT: Retention time; alıkonma zamanı



Şekil 10: Kokaine ait LC-MS/MS spektrumu



Şekil 11: Kokain-d3'e ait LC-MS/MS spektrumu

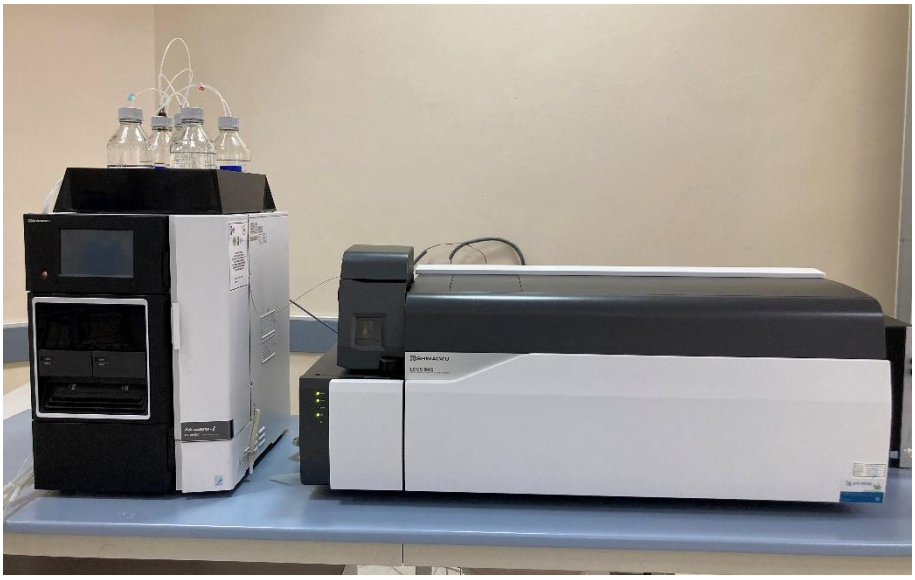


Şekil 12: BE'ye ait LC-MS/MS spektrumu



Şekil 13: BE-d3'e ait LC-MS/MS spektrumu

Yapılan önceki çalışmalardan ve maddelerin kimyasal özelliklerinden yola çıkarak kokain ve BE için uygun mobil faz, kolon ve Şekil 14'te gösterilen LC-MS/MS parametreleri ayarlanmıştır. Sisteme ait parametrelerin tamamı Tablo VII'de gösterilmiştir. Sistem parametreleri ayarlandıktan sonra rezolüsyonu yüksek pikler elde edilerek maddelere ait RT belirlenmiştir (Tablo VI). Oluşturulan yönteme ait mobil fazın zamana göre değişimi Tablo VIII'de gösterilmiştir.



Şekil 14: Deneysel çalışmaların analiz edildiği LC-MS/MS sistemi

Tablo VII. LC-MS/MS sistem koşulları

İyon kaynağı	ESI, pozitif mod
Dedektör voltajı	1,98 kV
DL sıcaklığı	250 °C
Arayüz sıcaklığı	300 °C
Numune sıcaklığı	18 °C
Akış hızı	0,4 mL/dk
Analiz süresi	17 dk
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Kolon fırın sıcaklığı	50 °C
Maksimum sıcaklık	90 °C
Mobil faz A	1 L USS içerisinde %0,1 formik asit + 2 mM amonyum format
Mobil faz B	1 L metanol içerisinde %0,1 formik asit + 2 mM amonyum format

Tablo VIII. Mobil fazın zamana bağlı değişimi

Süre	**Çözücü**	**Hacim**
2.00	B	% 40
8.00	B	%95
9.00	Akış	0,4 µL
9.01	Akış	0,5 µL
13.00	B	% 95
13.01	B	% 5
14.00	Akış	0,5 µL
14.01	Akış	0,4 µL
17.00	Stop	

3.6. Validasyon çalışmaları

3.6.1. Seçicilik

Seçicilik çalışmaları iki basamakta gerçekleştirildi. İlk olarak, içerisinde analit olmayan metanol çözücüsü ile içerisinde kokain, BE ve iç standart analitlerinin her birinin 25 ng/mL

konsantrasyonda olduğu metanol çözeltisi sistemde analiz edildi. Analiz sonrası piklerin karşılaştırılması ile çözücü kaynaklı girişim olup olmadığı değerlendirildi. İkinci olarak, ÇS ve yBOS içerisine kokain, BE ve iç standart analitlerinin her birinin konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde spike edildi. Belirlenen ekstraksiyon yöntemi ile çalışılan numuneler sistemde analiz edildi. Analiz sonrası piklerin karşılaştırılması ile matristen kaynaklanan girişim olup olmadığı değerlendirildi.

3.6.2. Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları için metanol içerisinde kokain ve BE içeren 9 farklı konsantrasyon değeri belirlendi. 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50 ve 100 ng/mL olarak belirlenen her bir noktanın ve 1 adet kör çözeltinin (blank, yalnızca iç standart içeren metanol) içerisine konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde iç standart mixi eklendi. Kör çözeltiden başlayıp artan konsantrasyonlar şeklinde devam edecek şekilde 3'er tekrarlı LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Kirliliği önlemek adına, her okutulan konsantrasyon noktasından sonra boş metanol sisteme verildi.

Metanol içerisinde yapılan doğrulsallık çalışmalarına ilaveten, analiz sonuçlarının doğruluğunu artırmak adına matris içerisinde doğrulsallık çalışmaları yapıldı. yBOS numuneleri içerisine 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50 ve 100 ng/mL kokain ve BE spike edildi. Belirlenen her bir noktanın ve 1 adet kör çözeltinin (blank, yalnızca iç standart içeren yBOS) içerisine konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde iç standart mixi eklendi. Vortekslendikten sonra belirlenen ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanmış 10 numune çalışıldı. Numunelere yapılan spike konsantrasyonları, ekstaksiyon sonrası nihai hacme (100 µL) göre hesaplandı. Kör çözeltiden başlayıp artan konsantrasyonlar şeklinde devam edecek şekilde 3'er tekrarlı LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Kirliliği önlemek adına, her okutulan konsantrasyon noktasından sonra boş metanol sisteme verildi.

3.6.3. LoD ve LoQ

LoD ve LoQ çalışmaları için, doğrusallık çalışmalarında kullanılan en düşük konsantrasyon konsantrasyonun (0,2 ng/mL) altında 4 nokta seçilerek S/N oranına göre değerlendirme yapıldı. Kokain ve B konsantrasyonu 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 ng/mL olarak belirlenen bu noktaların her birinin içerisine konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde iç standart mixi eklendi. Seçilen 4 nokta ve kör numune hem metanol içerisinde hem yBOS içerisinde ayrı ayrı 10 tekrarlı hazırlandı. Metanol içerisinde hazırlanan numuneler metanol çözeltisi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ile, yBOS içerisinde hazırlanan numuneler ise belirlenen ekstraksiyon yöntemi ile çalışıldıktan sonra hem metanol çözeltisi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ile hem de yBOS ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ile analiz edildi. Ölçüm sonuçları, Bölüm 2.4.5.'te açıklanan S/N hesaplama formüllerinden yararlanılarak hesaplandı. Metanol ve yBOS içerisinde LoD ve LoQ değerleri belirlendikten sonra, 6 tekrarlı LoD, LoQ değeri ve 1 kör numune ayrıca hazırlanıp 3'er defa analiz edilerek LoD ve LoQ değerlerinin doğrulaması yapıldı.

3.6.4. Doğruluk

Doğruluk çalışmasının alt parametrelerinden olan kesinlik için tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik, gerçeklik için ise geri kazanım çalışmaları yapıldı.

Tekrarlanabilirlik çalışması için, hem kokaini hem de BE'yi içeren düşük (0,5 ng/mL), orta (5 ng/mL) ve yüksek (25 ng/mL) olmak üzere 3 farklı konsantrasyon değeri belirlendi. Aynı laboratuvarda aynı analist tarafından eş zamanlı olarak 1 tane kör numune ve 6'şar tekrarlı 3 farklı konsantrasyon değeri yBOS matrisinde hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası her bir numune 3'er defa aynı sistemde yBOS matrisiyle hazırlanmış kalibrasyon grafiği ile analiz edildi.

Tekrarüretilebilirlik çalışması, farklı sistem, farklı laboratuvar ve farklı analist imkanları olmadığından aynı analist tarafından aynı laboratuvarda aynı sistemde farklı günlerde

gerçekleştirilerek elde edildi. Tekrarlanabilirlik çalışmalarının tamamı 7 gün sonra tekrar edildi. Yalnızca bir parametre değiştirilerek yapılan tekrarüretilebilirlik çalışması ara kesinlik olarak tanımlandı.

Elde edilen sonuçlar S ve %RSD ile değerlendirildi. Deneysel çalışmaların uygunluğu için %RSD değerinin < %20 olması hedeflendi (80).

Geri kazanım çalışmaları kesinlik çalışması altında yapılan tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları üzerinden değerlendirildi. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçların tamamı ile geri kazanım hesaplamaları yapıldı. Deneysel çalışmaların uygunluğu için geri kazanım değerlerinin %70-120 aralığında olması hedeflendi.

3.6.5. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için yBOS numune miktarı değiştirildi. 500 ve 1000 µL yBOS başlangıç miktarı alınarak, her numune içerisine 20 ng/mL konsantrasyonda kokain ve BE ile 25 ng/mL konsantrasyonda iç standart mixi spike edildi. Her biri için 3 tekrarlı numune hazırlandı ve spike sonrası belirlenen ekstraksiyon yöntemi uygulanıp sistemde 3 okuma yapıldı.

3.6.6. Stabilite

Stabilite çalışması için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlikte hazırlanan numuneler değerlendirildi. Tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki 6 tekrarlı numunenin, her bir konsantrasyon için 3 tekrarı -20 ºC'de 3 tekrarı ise -80 ºC'de saklandı. Ara kesinlik çalışması için hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki 6 tekrarlı numunenin, her bir konsantrasyon için 3 tekrarı +4 ºC'de 3 tekrarı ise oda koşullarında saklandı. Farklı sıcaklıklarda bekletilen numunelerin analiz sonuçlarında meydana gelebilecek değişimleri gözlemlemek adına numuneler analize verildikleri vialler içerisinde kapakları değiştirilip parafilmlenerek 1 hafta bekletildi. Analiz öncesi oda sıcaklığına

getirilip vortekslenerek 3’er tekrarlı okuma ile sisteme verildi. Analiz sonuçları arasındaki değişim hesabı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\%\text{Stabilite} = \frac{Cilk}{Cson} * 100$$

C_{ilk}: ilk analizde tayin edilen kokain ve BE miktarlarının ortalaması

C_{son}: 1 hafta sonraki analizde tayin edilen kokain ve BE miktarlarının ortalaması

4. Bulgular

4.1. Ekstraksiyon yöntemi

Yapılan 2 farklı ekstraksiyon denemesine ait ortalama, S, %RSD ve %geri kazanım sonuçları Tablo IX ve Tablo X'da gösterilmiştir.

Tablo IX. Kokaine ait LLE ve SPE ile yapılan çalışma sonuçları

Ekstraksiyon yöntemi	**LLE**		**SPE**	
Spike edilen kokain miktarı	**20 ng/mL**		**20 ng/mL**	
Başlangıç yBOS miktarı	**500 µL**	**1000 µL**	**500 µL**	**1000 µL**
Ortalama	21,172	18,224	21,400	18,869
S	0,459	0,563	0,853	0,048
%RSD	2,167	3,089	4,032	0,254
%GK	105,860	91,120	107,000	94,345

*S: Standart sapma, %RSD: Yüzde bağıl standart sapma, %GK: yüzde geri kazanım

Tablo X. BE'ye ait LLE ve SPE ile yapılan çalışma sonuçları

Ekstraksiyon yöntemi	**LLE**		**SPE**	
Spike edilen kokain miktarı	**20 ng/mL**		**20 ng/mL**	
Başlangıç yBOS miktarı	**500 µL**	**1000 µL**	**500 µL**	**1000 µL**
Ortalama	20,467	21,150	20,793	18,320
S	4,315	12,502	0,552	0,079
%RSD	21,082	59,111	2,654	0,431
%GK	102,335	105,75	103,965	91,600

*S: Standart sapma, %RSD: Yüzde bağıl standart sapma, %GK: yüzde geri kazanım

Yapılan 2 farklı ekstaksiyon çalışması sonucu kokain analitini yBOS matrisinden çekitlemek için LLE ve SPE yöntemlerinin her ikisi de uygun bulunurken BE analitini yBOS matrisinden çekitlemek için LLE yöntemi uygun bulunmamıştır. LLE yönteminde BE için yüksek S değeri ve %RSD >20 bulunmuştur. Bu nedenle sonuçların verimliliği adına bundan sonraki tüm basamaklar belirlenen SPE yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

4.2. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını kontrol etmek için yBOS numune miktarı değiştirilerek çalışmalar yapıldı. 500 ve 1000 µL yBOS başlangıç miktarı ile yapılan sağlamlık çalışma sonuçlarını karşılaştırmak için t testi uygulandı ve Tablo XI'de gösterilmekte olan sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. Bu basamaktan sonra, klinikte BOS numunesine ait örnek hacminin bulunabilirliğinin zor olabilme ihtimaline karşı düşük miktar olan 500 µL ile çalışmalara devam edildi.

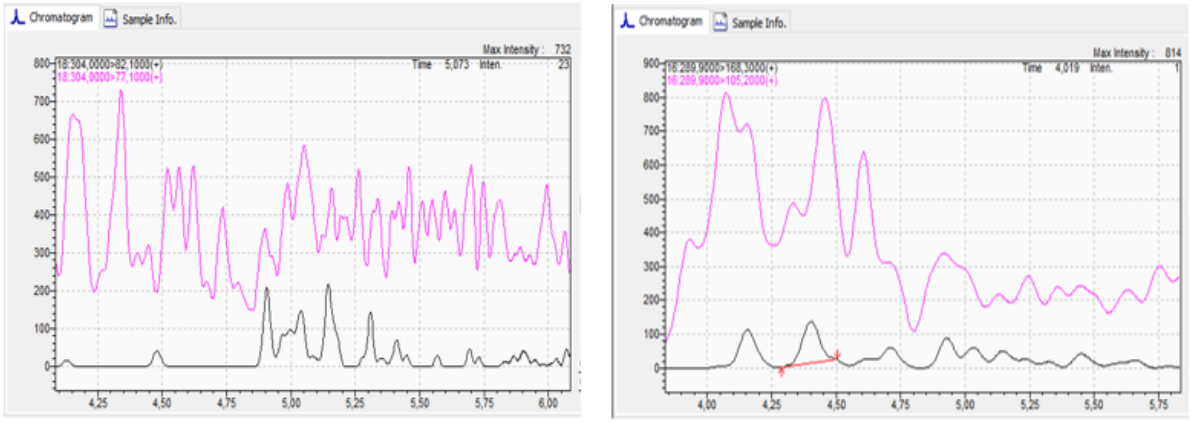
Tablo XI. Numune miktarının yöntem üzerine etkisi

Ölçüm ortalaması	**Kokain**			**BE**		
	20 ng/mL	**t-test**	**t-kritik**	**20 ng/mL**	**t-test**	**t-kritik**
Ort$_{500\ \mu L}$	21,400	7,347	2,570	20,793	10,945	2,570
Ort$_{1000\ \mu L}$	18,869			18,320		

*Ort: Ortalama

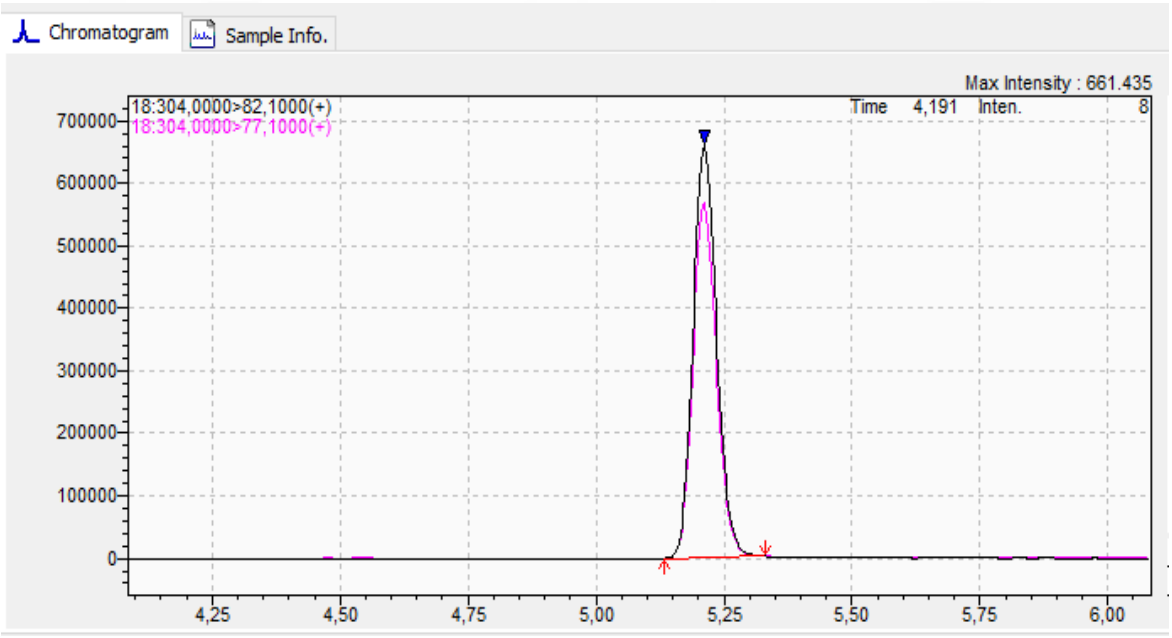
4.3. Seçicilik

Seçicilik çalışmalarının sonuçlarında kokain ve BE için belirlenen RT değerinde girişim gözlenmemiştir. Seçicilik çalışmasının ilk basamağı olarak metanol çözücüsü ile yapılan çalışma sonuçları; içerisinde analit olmayan metanol çözücüsüne ait kromatogram Şekil 15'te, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda kokain bulunan metanol çözücüsüne ait kromatogram Şekil 16'da, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda BE bulunan metanol çözücüsüne ait kromatogram Şekil 17'de, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda kokain-d3 bulunan metanol çözücüsüne ait kromatogram Şekil 18'de, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda BE-d3 bulunan metanol çözücüsüne ait kromatogram ise Şekil 19'da gösterilmektedir.

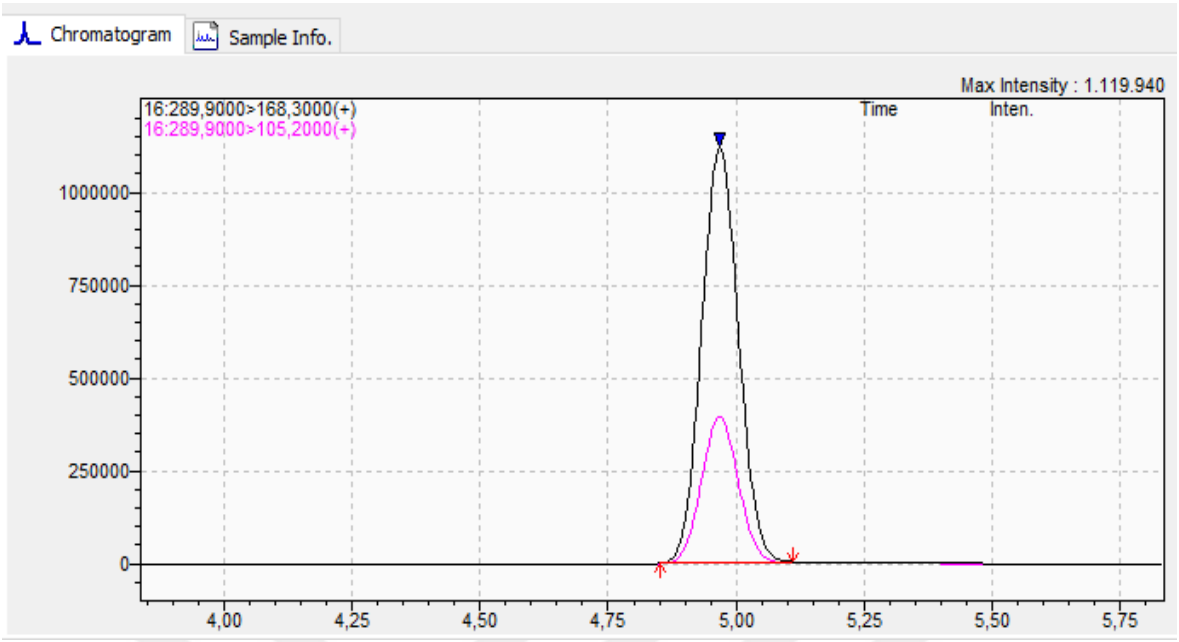


(a) (b)

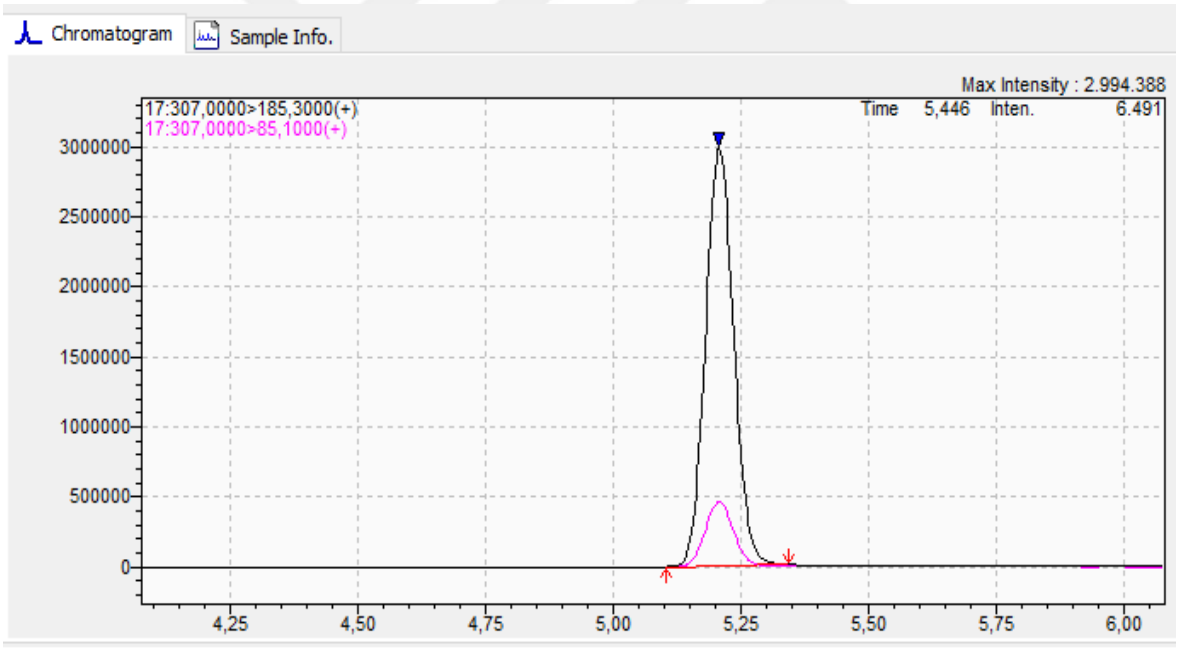
Şekil 15: (a) Kokain, (b) BE için analit içermeyen metanole ait kromatogramlar



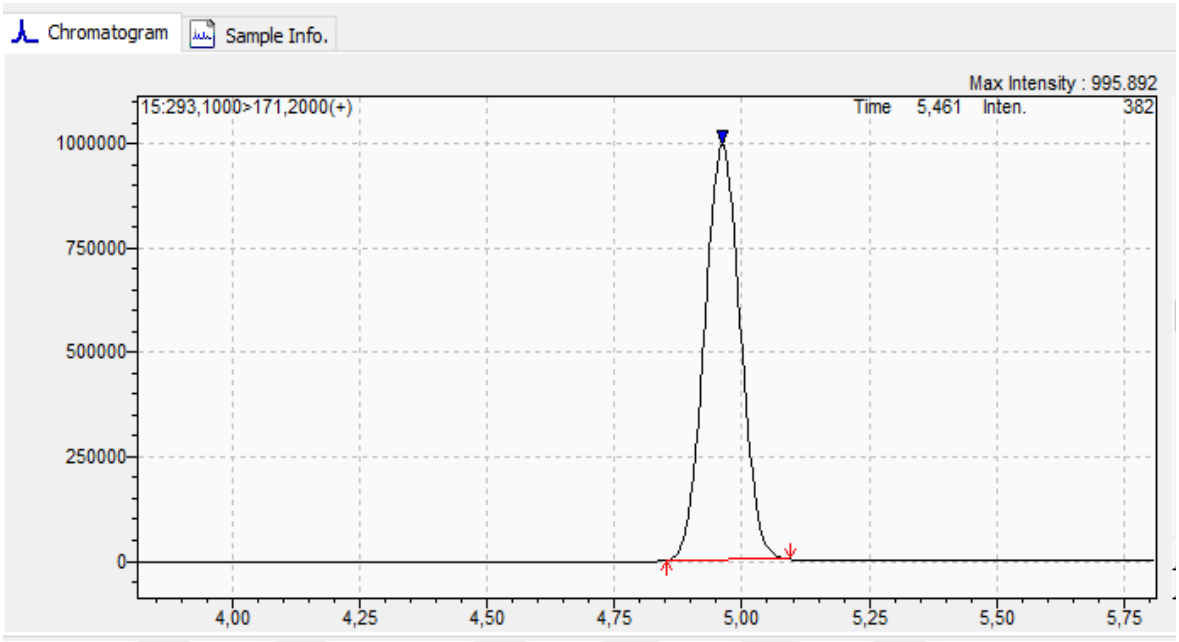
Şekil 16: 25 ng/mL kokain içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram



Şekil 17: 25 ng/mL BE içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram

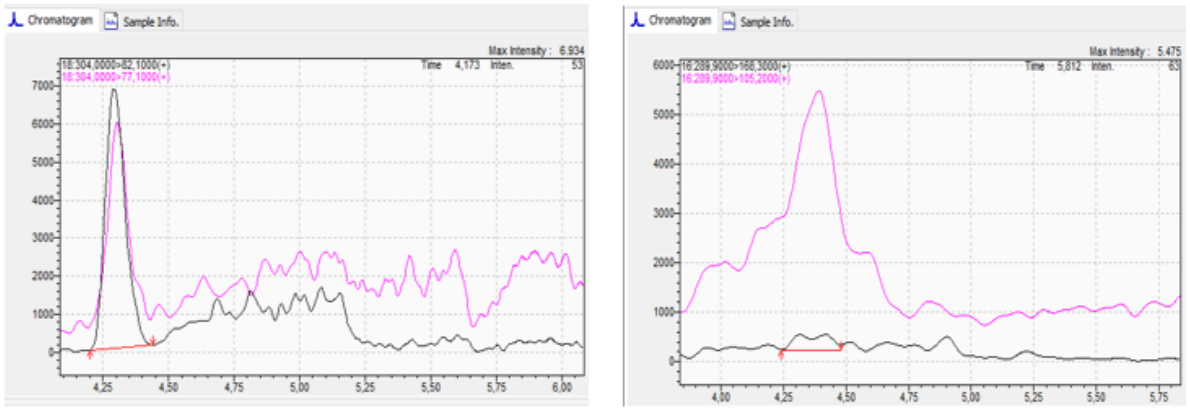


Şekil 18: 25 ng/mL kokain-d3 içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram



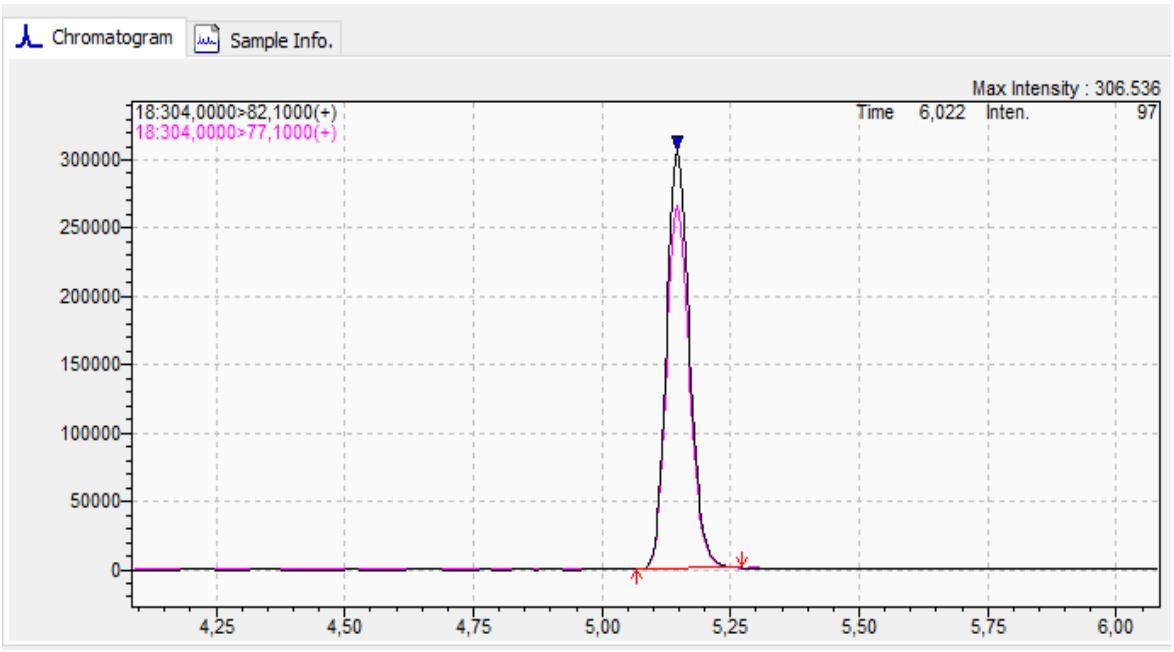
Şekil 19: 25 ng/mL BE-d3 içeren metanol çözücüsüne ait kromatogram

İkinci basamak olarak yBOS matrisinde yapılan seçicilik çalışmaları; içerisinde hiçbir analit bulunmayan yBOS numunesine ait kromatogram Şekil 20'de, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda kokain bulunan yBOS numunesine ait kromatogram Şekil 21'de, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda BE bulunan yBOS numunesine ait kromatogram Şekil 22'de, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda kokain-d3 bulunan yBOS numunesine ait kromatogram Şekil 23'te, içerisinde 25 ng/mL konsantrasyonda BE-d3 bulunan yBOS numunesine ait kromatogram ise Şekil 24'te gösterilmektedir. Kokain, BE ve iç standartlar yBOS numunelerine SPE ekstraksiyonu öncesinde eklenmiştir. Tüm bu sonuçlar, organik çözücü olarak kullanılan metanole ve yBOS matrisine ilişkin herhangi bir girişim olmadığını göstermiştir.

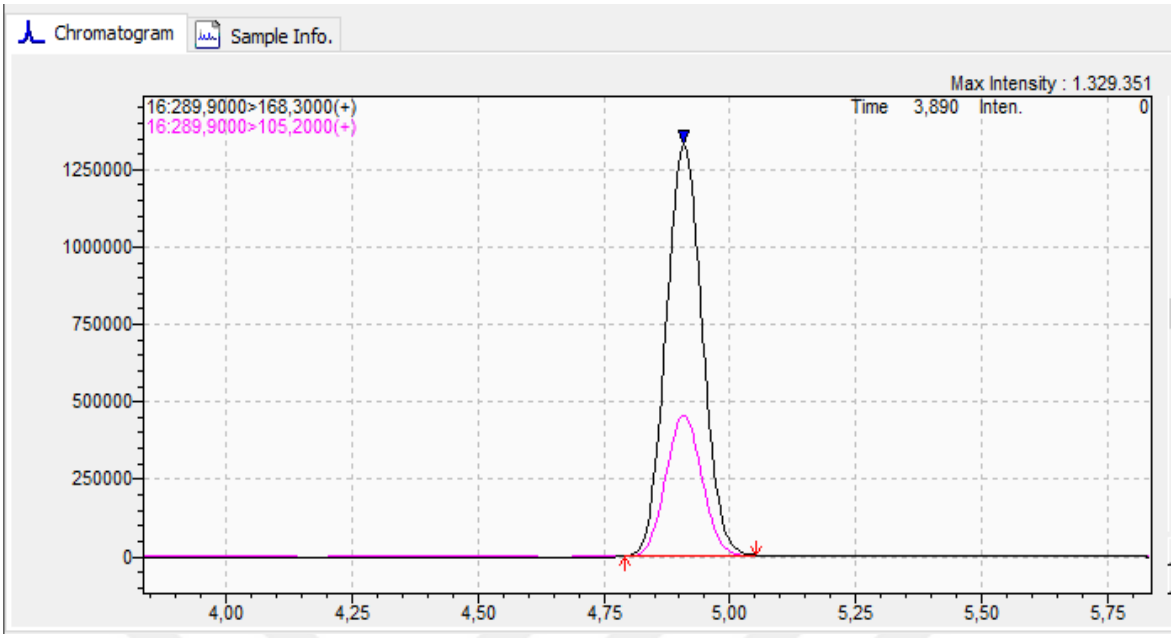


(a) (b)

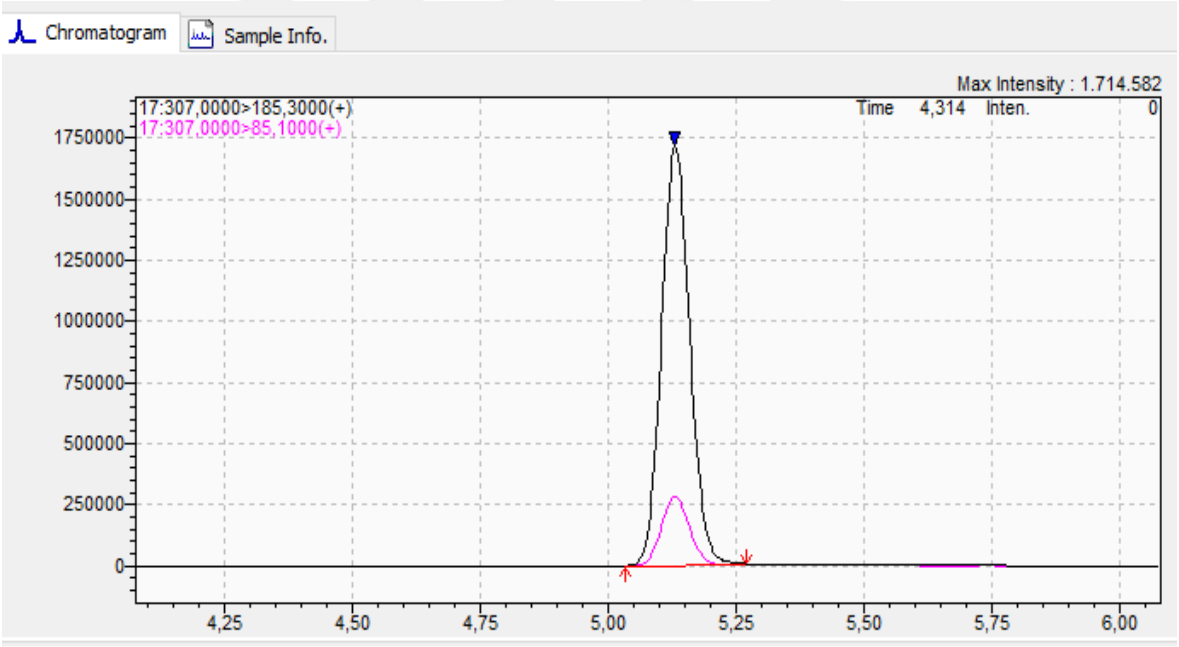
Şekil 20: (a) Kokain, (b) BE için analit içermeyen yBOS'a ait kromatogramlar



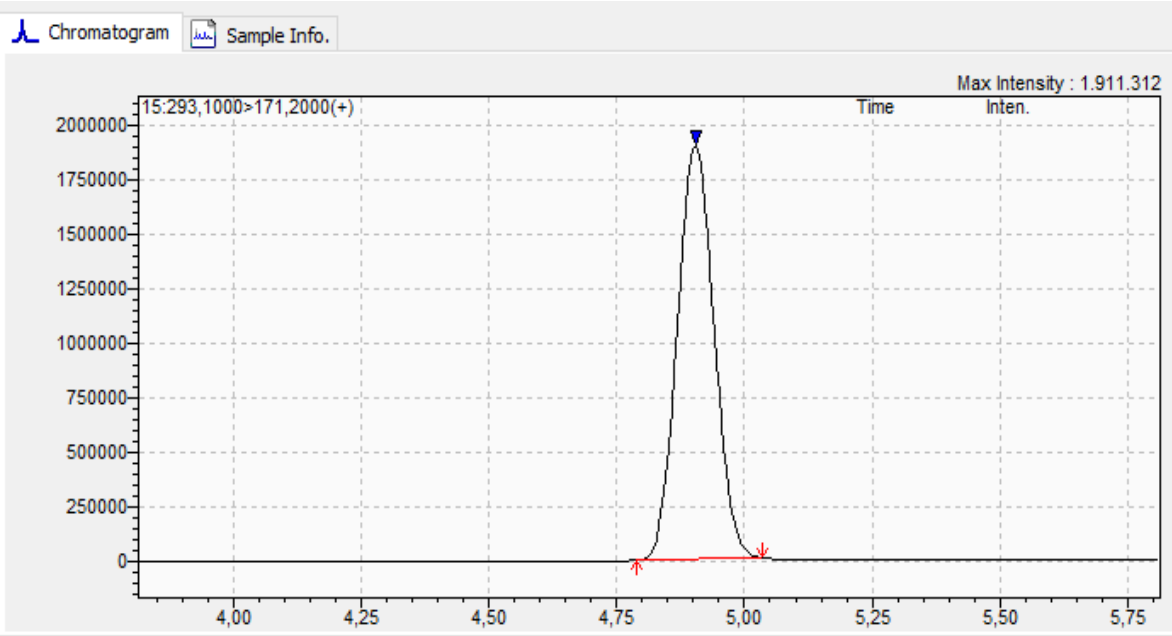
Şekil 21: 25 ng/mL kokain içeren yBOS matrisine ait kromatogram



Şekil 22: 25 ng/mL BE içeren yBOS matrisine ait kromatogram



Şekil 23: 25 ng/mL kokain-d3 içeren yBOS matrisine ait kromatogram

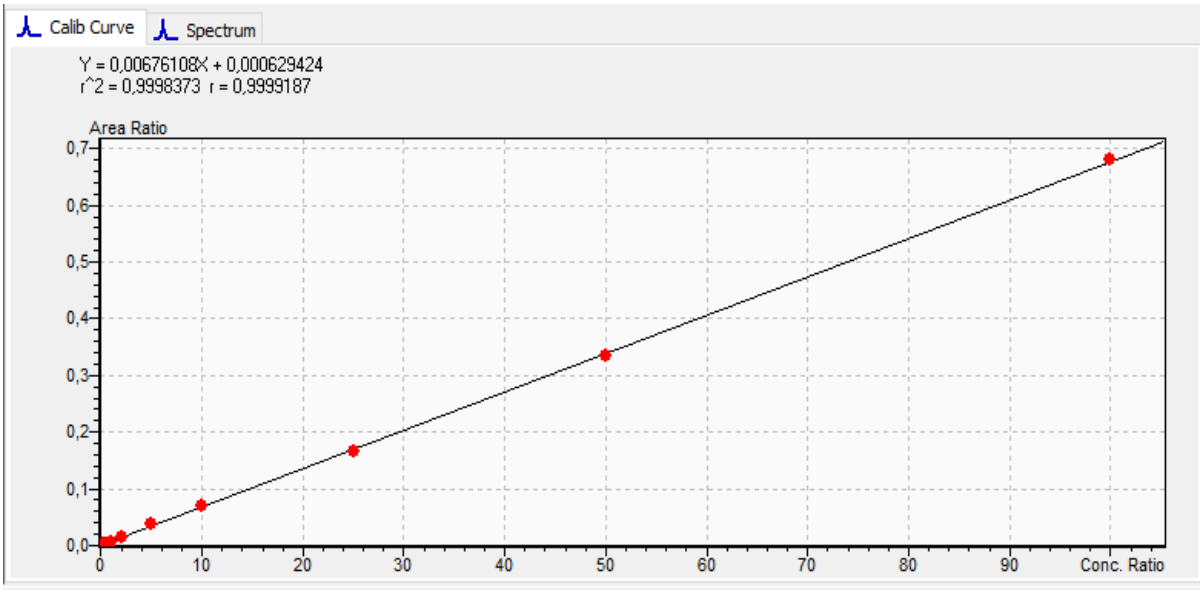


Şekil 24: 25 ng/mL BE-d3 içeren yBOS matrisine ait kromatogram

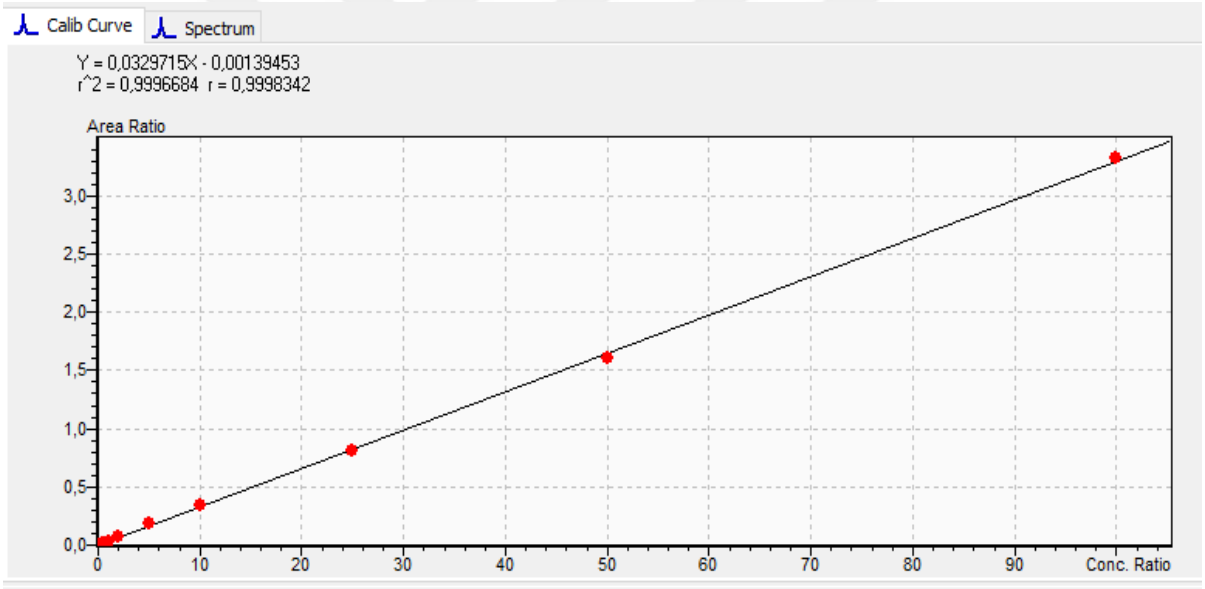
Çözücü olarak kullanılan metanolün ve içerisinde analit bulunmayan yBOS numunesinin kromatogram sonuçlarında pik oluşturmaması, girişime neden olmadığının ve seçiciliğin iyi olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

4.4. Çalışma aralığı (kalibrasyon grafiği)

Çalışma aralığını belirlemek için metanol içerisinde hazırlanan doğrusallık noktalarından kokain için 0,2-100 ng/mL; BE için 0,5-100 ng/mL aralığı ile kalibrasyon grafiği çizdirilerek belirlendi. Kalibrasyon grafikleri, kromatogramlardaki analite ait pik alanının iç standarda ait pik alanına oranına bağlı oluşturuldu. Metanol çözücüsü içerisinde hazırlanan kokaine ait 9 noktalı kalibrasyon grafiği Şekil 25'te, BE'ye ait 8 noktalı kalibrasyon grafiği Şekil 26'da gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiklerine ait doğru denklemleri ve r^2 değerleri LC-MS/MS sisteminin yazılımı yardımı ile hesaplandı. Kokain için r^2 değeri 0,999 ve doğru denklermi y=0,00676108x + 0,000629424; benzeoilekgonin için r^2 değeri 0,999 ve doğru denklemi y=0,0329715x + 0,00139453 olarak belirlendi.



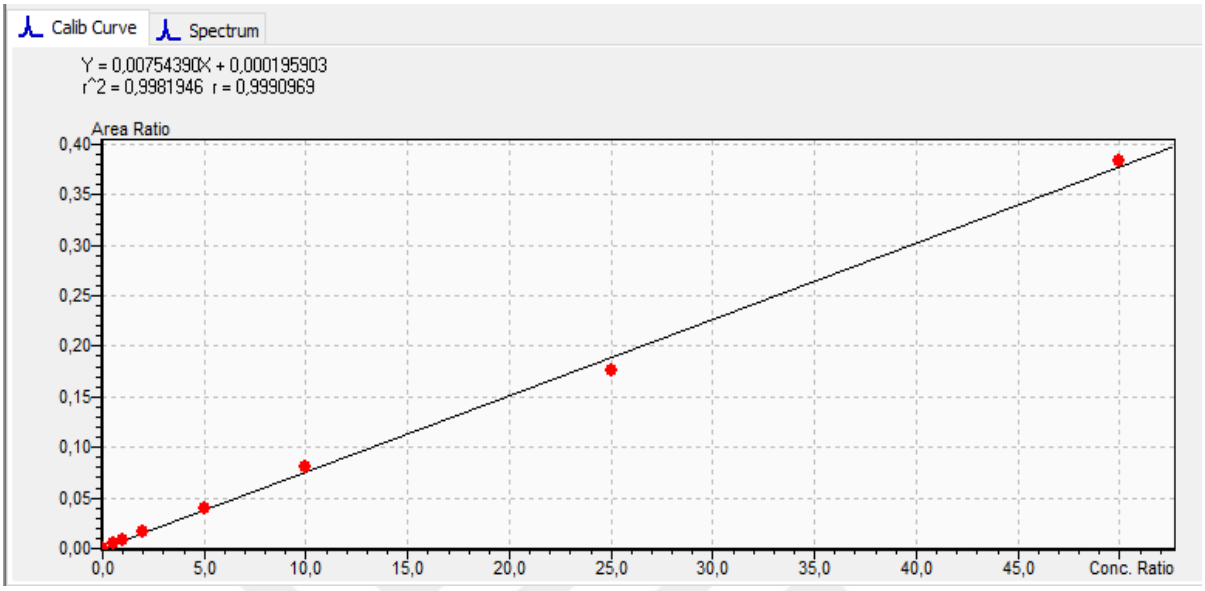
Şekil 25: Kokain için metanol çözücüsünde elde edilmiş kalibrasyon grafiği



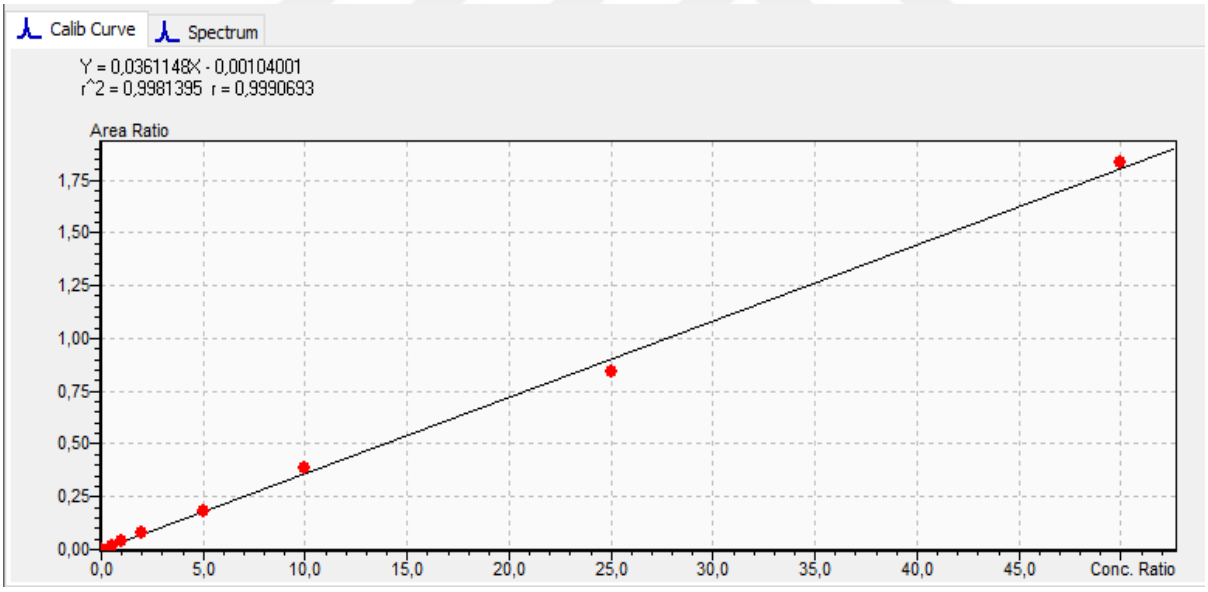
Şekil 26: BE için metanol çözücüsünde elde edilmiş kalibrasyon grafiği

Matriks etkisini dengelemek üzere yBOS matrisi içerisinde hazırlanan doğrusallık noktalarından kokain için 0,5-50 ng/mL; BE için 0,5-50 ng/mL aralığı ile kalibrasyon grafiği çizdirilerek çalışma aralığı belirlendi. yBOS matrisi içerisinde hazırlanan kokaine ait 7 noktalı kalibrasyon grafiği Şekil 27'de, BE'ye ait 7 noktalı kalibrasyon grafiği Şekil 28'de gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiklerine ait doğru denklemleri ve r^2 değerleri LC-MS/MS sisteminin yazılımı yardımı ile hesaplandı. Kokain için r^2 değeri 0,998 ve doğru denklermi

y=0,00754390x + 0,000195903; benzeoilekgonin için r^2 değeri 0,998 ve doğru denklemi y=0,0361148x + 0,00104001 olarak belirlendi.



Şekil 27: Kokain için yBOS matrisinde elde edilmiş kalibrasyon grafiği



Şekil 28: BE için yBOS matrisinde elde edilmiş kalibrasyon grafiği

Matris etkisi

Doğrusallık çalışmaları için hazırlanan metanol çözücüsü ve yBOS numunesi içerisindeki 5 ng/mL ve 25 ng/mL kokain ve BE sonuçları, matrisin analit konsantrasyonu ölçümüne etkisini değerlendirmek üzere kullanılmıştır. Değerlendirmeler elde edilen piklerin alanları

üzerinden yapılmıştır. Metanol ve yBOS içerisindeki analiz sonuçlarından elde edilen pik alanlarına t-testi uygulanmış, sonuçlar Tablo XII'de gösterilmiştir.

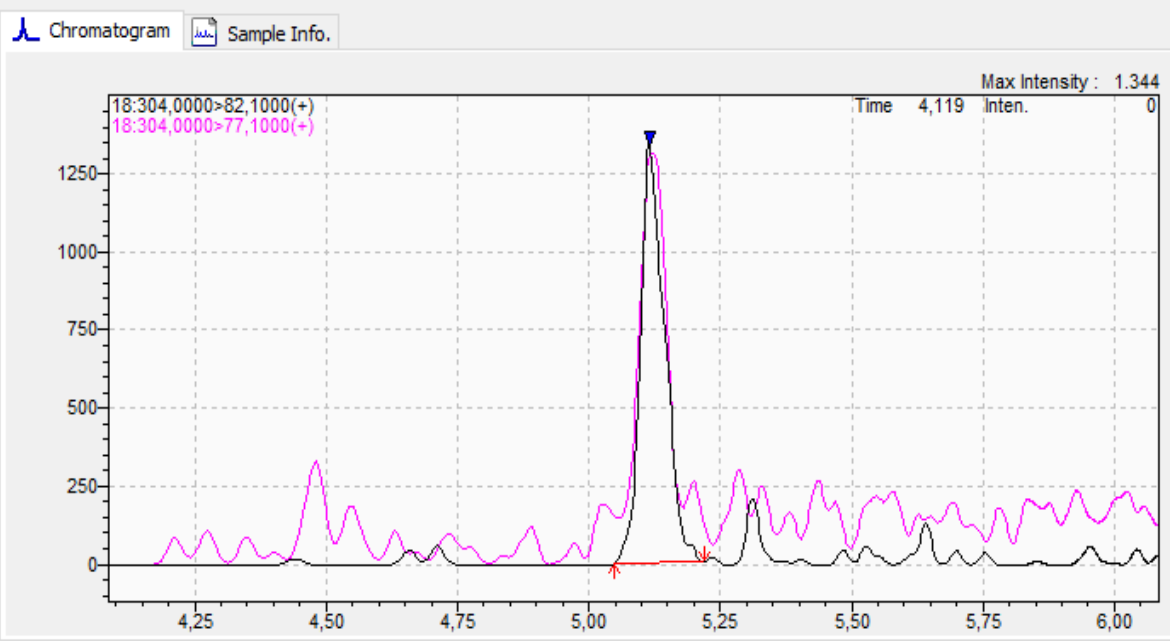
Tablo XII. Matris etkisinin değerlendirildiği analiz sonuçları

	Kokain			**BE**		
	Metanol içerisinde	**yBOS içerisinde**	**t-test**	**Metanol içerisinde**	**yBOS içerisinde**	**t-test**
5 ng/mL için alan	468131	202132	0,000131	1234810	1145963	0,001516
	479667	204295		1237981	1143982	
	479986	202186		1262968	1167549	
25 ng/mL için alan	2115881	947736	0,000229	5605466	6638053	0,006688
	2087586	961477		5574595	6661944	
	2161961	954076		5880790	6564339	

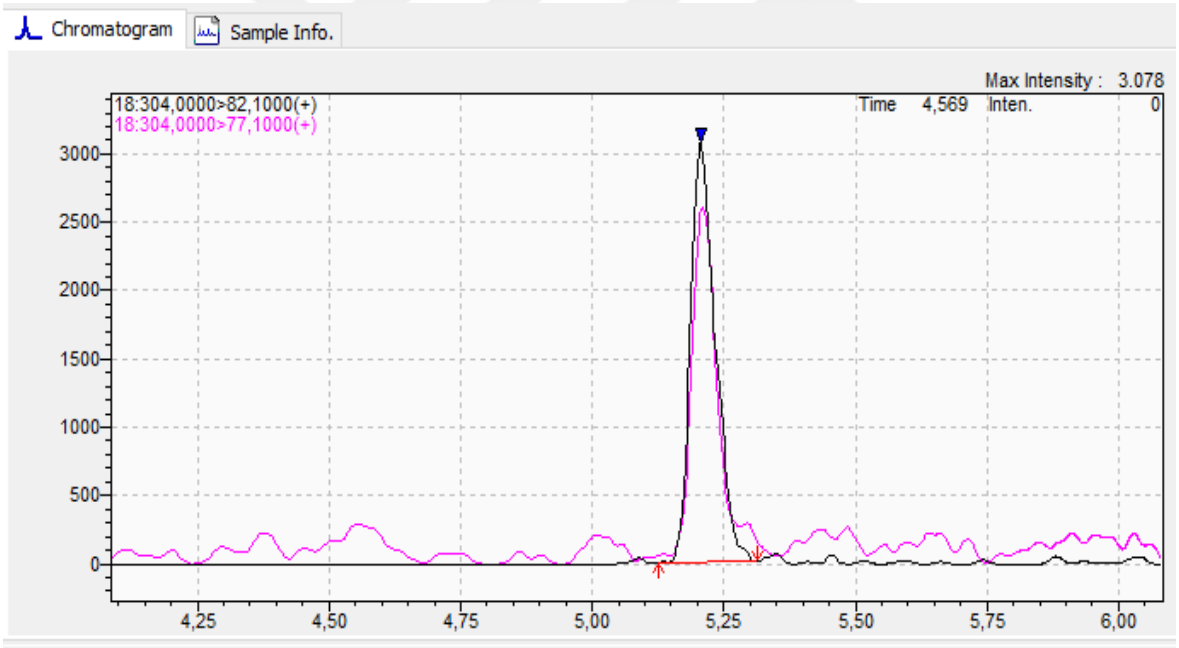
Metanol ve yBOS içerisindeki analitlere ait 5 ng/mL ve 25 ng/mL pik alanları arasında yapılan t-test sonuçları ($p < 0,05$) arasında anlamlı fark bulunmuştur. Matriks etkisini en aza indirgemek ve geliştirilen yöntemin doğruluğunu uygun şartlarda kontrol edebilmek adına bu adımdan sonraki tüm çalışmalar yBOS numunesi ile hazırlanmış kalibrasyon grafiği kullanılarak yapılmıştır.

4.5. LoD ve LoQ sonuçları

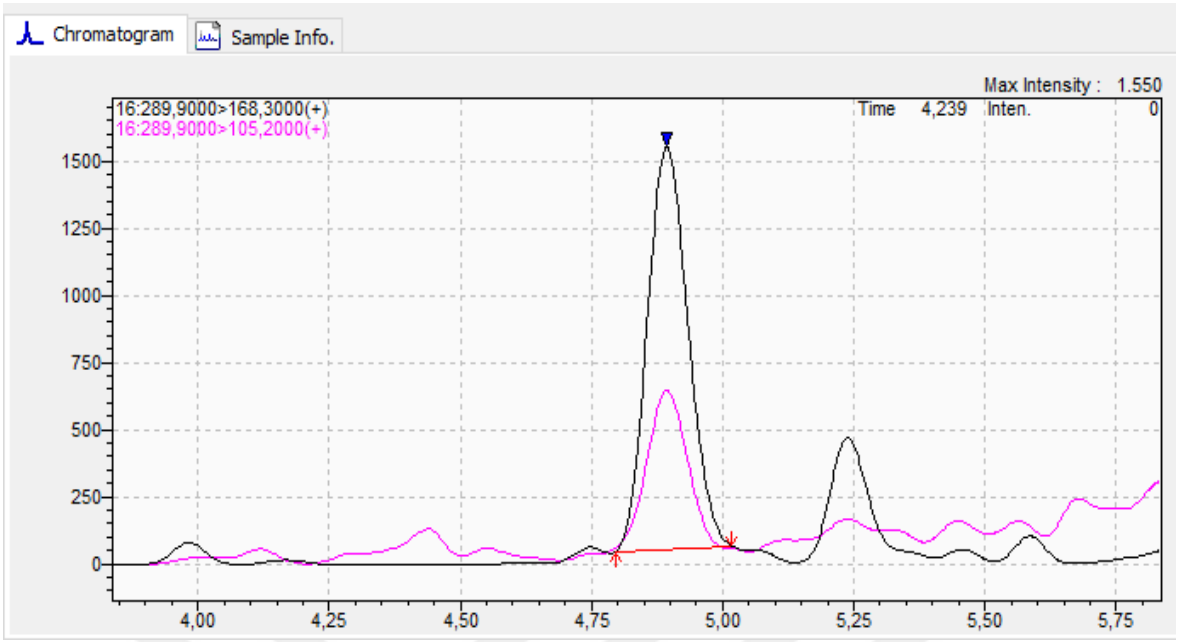
Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi kokain ve BE için 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 ng/mL ve kör numune sonuçları S/N oranına göre değerlendirildi. Metanol çözücüsü içerisinde hazırlanmış kokaine ait kromatogramlara göre LoD 0,01 ng/mL (Şekil 29) LoQ 0,05 ng/mL (Şekil 30); BE'ye ait kromatogramlara göre LoD 0,01 ng/mL (Şekil 31) LoQ 0,05 ng/mL (Şekil 32) kabul edildi.



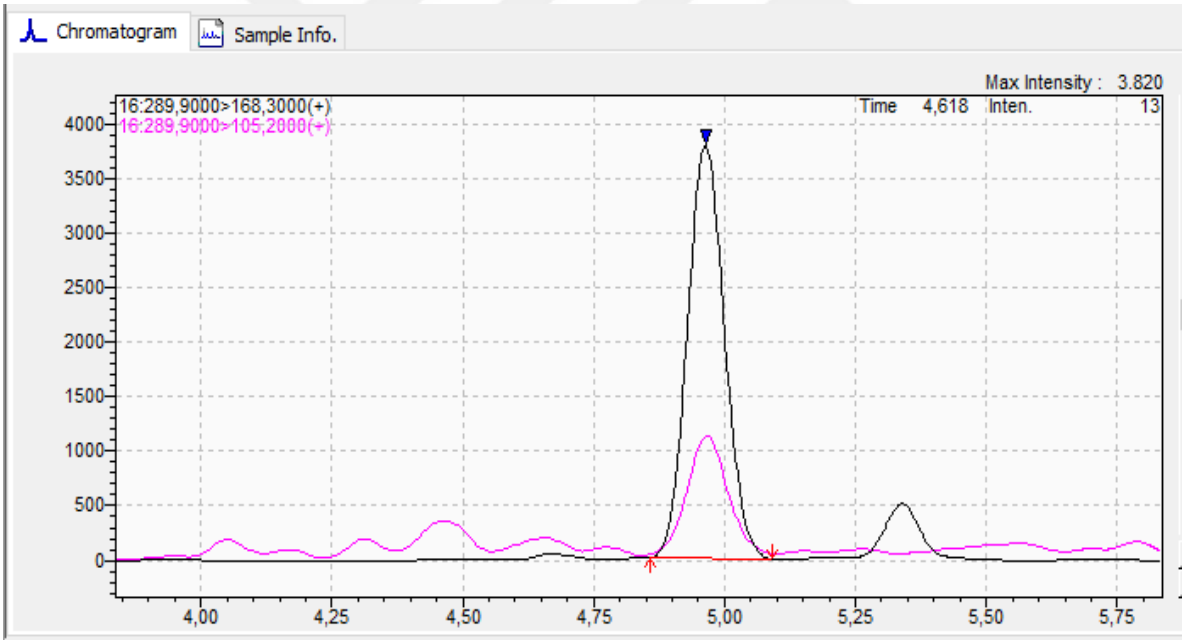
Şekil 29: Metanol içerisinde 0,01 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoD)



Şekil 30: Metanol içerisinde 0,05 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoQ)



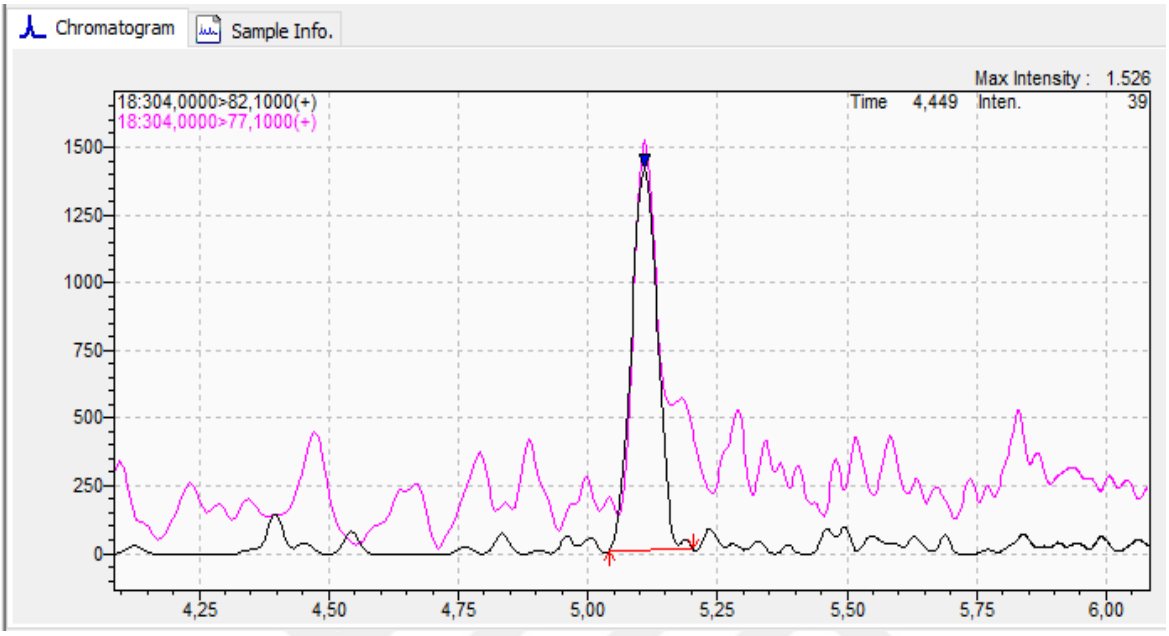
Şekil 31: Metanol içerisinde 0,01 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoD)



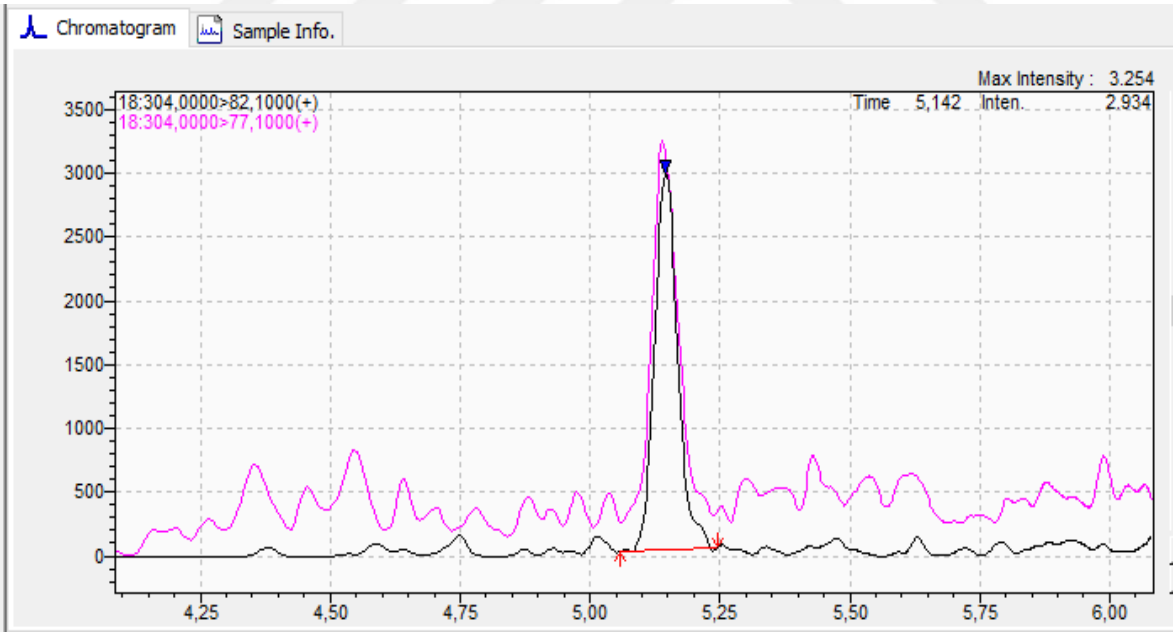
Şekil 32: Metanol içerisinde 0,05 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoQ)

yBOS matrisi içerisinde hazırlanmış 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 ng/mL ve kör numune hem metanol çözücüsü ile hem yBOS matrisi ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinde analiz edildi. Analiz sonuçları arasında bir fark gözlemlenmedi. Matris ve ekstraksiyon etkisini daha iyi gözlemlemek adına yBOS matrisi ile oluşurulan kalibrasyon graifiğinde analiz edilen numune sonuçları dikkate alındı. yBOS matrisi içerisinde hazırlanmış kokaine ait

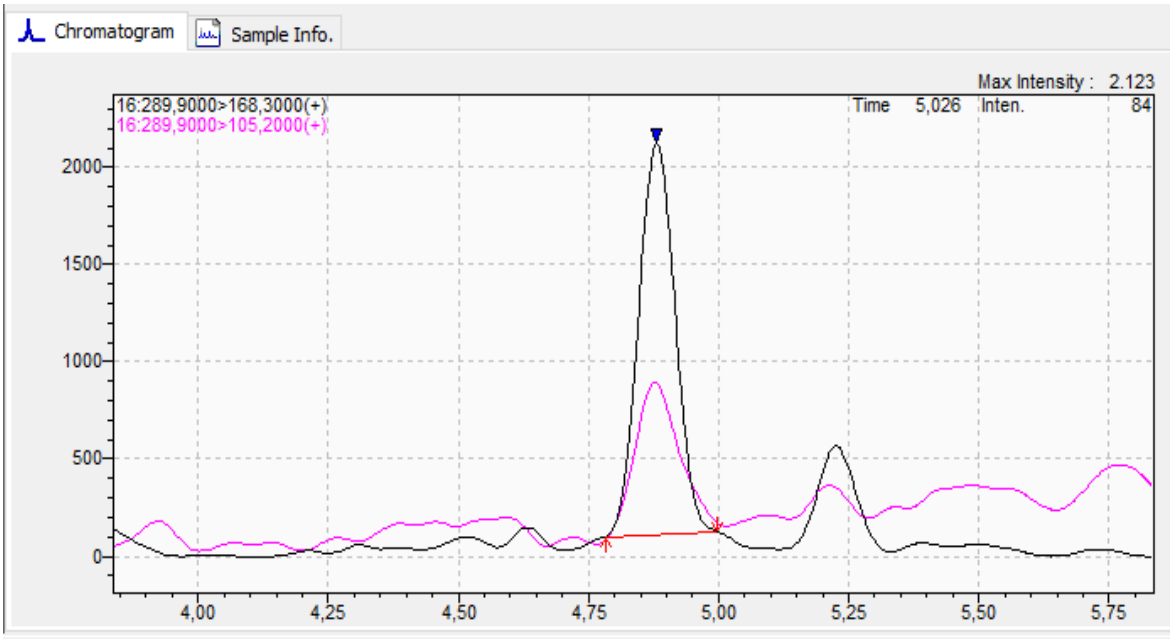
kromatogramlara göre LoD 0,02 ng/mL (Şekil 33) LoQ 0,1 ng/mL (Şekil 34); BE'ye ait kromatogramlara göre LoD 0,01 ng/mL (Şekil 35) LoQ 0,05 ng/mL (Şekil 36) kabul edildi.



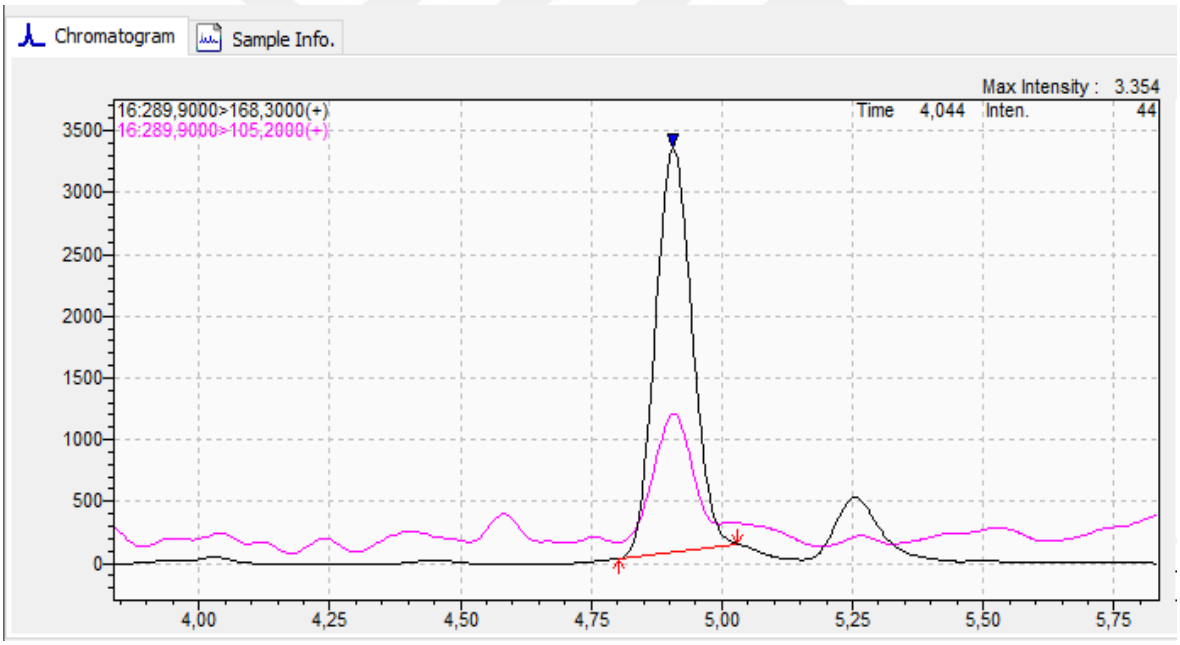
Şekil 33: yBOS içerisinde 0,02 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoD)



Şekil 34: yBOS içerisinde 0,1 ng/mL kokaine ait kromatogram (LoQ)



Şekil 35: yBOS içerisinde 0,01 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoD)



Şekil 36: yBOS içerisinde 0,05 ng/mL BE'ye ait kromatogram (LoQ)

Belirlenen değerler Bölüm 3.6.3'te anlatıldığı gibi 6 tekrarlı hazırlanarak her bir numune 3 okumayla analiz edildi ve doğrulandı.

4.6. Doğruluk

yBOS matrisinde SPE ile ekstraksiyonu yapılan kokain ve BE maddelerine ait kesinlik çalışması parametrelerinden tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo XIII'te gösterilmiştir. yBOS

matrisiyle hazırlanana kör numune sonuçlarında pik tespit edilmediğinden kantitatif değerlendirmelerde dikkate alınmamıştır.

Tablo XIII. Kokain ve BE'nin tekrarlanabilirlik sonuçları

	Kokain			**BE**		
	0,5 ng/mL	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**	**0,5 ng/mL**	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**
1. tekrar	0,561	5,040	24,075	0,625	5,045	24,256
	0,607	5,118	24,147	0,625	5,063	24,116
	0,660	5,030	24,295	0,661	5,014	24,612
2.tekrar	0,523	5,207	22,317	0,561	5,179	24,315
	0,584	4,948	22,184	0,591	5,125	24,485
	0,561	5,040	22,144	0,575	5,137	24,276
3. tekrar	0,511	5,091	23,946	0,510	5,295	23,634
	0,574	5,301	23,702	0,509	5,256	23,781
	0,513	5,371	23,901	0,590	5,244	23,831
4. tekrar	0,511	5,782	26,574	0,597	5,941	26,214
	0,554	5,812	26,655	0,560	5,876	26,975
	0,549	5,795	26,976	0,509	5,948	25,898
5. tekrar	0,699	4,545	25,135	0,518	4,680	25,664
	0,617	4,633	25,194	0,553	4,671	25,489
	0,614	4,531	24,174	0,510	4,636	25,847
6. tekrar	0,571	4,718	22,555	0,502	4,706	24,109
	0,575	4,749	22,225	0,513	4,848	24,640
	0,542	4,867	22,117	0,518	4,769	24,568
Ortalama	0,573	5,087	24,017	0,557	5,135	24,817
S	0,051	0,405	1,606	0,049	0,421	0,956
%RSD	8,900	7,961	6,686	8,797	8,198	3,852

*S: Standart sapma, %RSD: Yüzde bağıl standart sapma

Tekrarlanabilirlik çalışmasından 7 gün sonra aynı şartlarda gerçekleştirilen ara kesinlik sonuçları Tablo XIV'te gösterilmiştir.

Tablo XIV. Kokain ve BE'nin ara kesinlik sonuçları

	Kokain			**BE**		
	0,5 ng/mL	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**	**0,5 ng/mL**	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**
1. tekrar	0,579	4,738	24,710	0,598	4,677	23,930
	0,548	4,781	24,979	0,608	4,692	23,692
	0,581	4,753	24,735	0,607	4,683	23,761
2.tekrar	0,550	5,317	24,082	0,578	5,230	23,320
	0,539	5,360	24,379	0,568	5,238	23,287
	0,581	5,370	23,899	0,587	5,177	23,115
3. tekrar	0,677	4,988	24,916	0,487	4,823	24,542
	0,732	4,952	25,075	0,481	4,801	24,412
	0,625	4,821	25,025	0,491	4,767	24,380
4. tekrar	0,595	4,839	24,840	0,498	4,662	24,051
	0,554	4,765	24,777	0,507	4,751	23,918
	0,587	4,867	24,488	0,526	4,667	24,063
5. tekrar	0,581	4,385	26,280	0,532	4,264	25,667
	0,570	4,320	26,239	0,593	4,320	25,273
	0,575	4,327	26,508	0,593	4,142	25,229
6. tekrar	0,646	4,595	23,578	0,534	4,415	23,083
	0,619	4,622	23,818	0,516	4,403	22,951
	0,613	4,571	23,621	0,522	4,412	22,967
Ortalama	0,597	4,798	24,774	0,545	4,673	23,980
S	0,048	0,319	0,867	0,045	0,318	0,820
%RSD	8,040	6,648	3,499	8,256	6,805	3,419

*S: Standart sapma, %RSD: Yüzde bağıl standart sapma

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının ortalamalar üzerinden birbirleri ile karşılaştırıldığı sonuçlar Tablo XV'te verilmiştir.

Tablo XV. Kokain ve BE'nin günler arası fark sonuçları

	Kokain			**BE**		
	0,5 ng/mL	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**	**0,5 ng/mL**	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**
Ort$_{tekrarlanabilirlik}$	0,573	5,087	24,017	0,557	5,135	24,817
Ort$_{arakesinlik}$	0,597	4,798	24,774	0,545	4,673	23,980
Ortalama	0,585	4,942	24,395	0,551	4,904	24,398
S	0,016	0,204	0,535	0,008	0,326	0,591
%RSD	2,735	4,127	2,193	1,451	6,647	2,422

*Ort: Ortalama, S: Standart sapma, %RSD: Yüzde bağıl standart sapma

Gerçeklik çalışması için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları üzerinden geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır. Kokaine ait ortalama sonuçların %geri kazanım hesaplamaları Tablo XVI'da, BE'ye ait ortalama sonuçların %geri kazanım hesaplamaları Tablo XVII'de gösterilmiştir.

Tablo XVI. Kokainin %geri kazanım sonuçları

	Kokain					
	0,5 ng/mL	**%GK**	**5 ng/mL**	**%GK**	**25 ng/mL**	**%GK**
Ort$_{tekrarlanabilirlik}$	0,573	114,600	5,087	101,740	24,017	96,068
Ort$_{arakesinlik}$	0,597	119,400	4,798	95,960	24,774	99,096

*Ort: Ortalama

Tablo XVII. BE'nin %geri kazanım sonuçları

	BE					
	0,5 ng/mL	**%GK**	**5 ng/mL**	**%GK**	**25 ng/mL**	**%GK**
Ort$_{tekrarlanabilirlik}$	0,557	111,400	5,135	102,700	24,817	99,268
Ort$_{arakesinlik}$	0,545	109,000	4,673	93,460	23,980	95,92

*Ort: Ortalama

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçları hem kendi içerisinde hem de birbirleriyle karşılaştırıldıklarında 3 konsantrasyonda da %RSD değeri <20 olduğundan ve geri kazanım çalışmaları %70-120 aralığında bulunduğundan doğruluk çalışmaları uygun kabul edildi.

4.7. Stabilite

Stabilite çalışması için; tekrarlanabilirlik ve ara kesinlikte hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki 6'şardan toplamda 12 tekrarlı numunenin, her bir konsantrasyon için 3'er tekrarı oda sıcaklığı, +4 ºC, -20 ºC ve -80 ºC'de 1 hafta saklandı. 1 hafta sonrasında aynı sistemde analiz edildi. Tablo XVIII ve Tablo XIX'da stabilite değerlendirmek için gösterilen %değişim sonuçları, ekstraksiyon sonrası hemen gerçekleşen ilk okuma ve farklı koşullarda 1 hafta saklandıktan sonra analiz edilen son okumaların ortalamalarına göre hazırlandı.

Tablo XVIII. Kokain içeren yBOS numunelerinin stabilite sonuçları

Numune bekleme koşulları		**0,5 ng/mL**	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**
Oda sıcaklığı	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,593	4,587	24,905
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,587	4,581	24,982
	%Değişim	0,00006	0,00006	0,00077
+4 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,601	5,008	24,644
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,608	4,991	24,524
	%Değişim	0,00007	0,00017	0,0012
-20 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,566	5,127	23,412
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,571	5,203	23,228
	%Değişim	0,00005	0,00076	0,00184
-80 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,581	5,048	24,622
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,547	4,990	24,309
	%Değişim	0,00034	0,00058	0,00313

*Ort: Ortalama

Tablo XIX. BE içeren yBOS numunelerinin stabilite sonuçları

Numune bekleme koşulları		**0,5 ng/mL**	**5 ng/mL**	**25 ng/mL**
Oda sıcaklığı	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,535	4,448	24,133
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,510	4,277	23,199
	%Değişim	0,00025	0,00171	0,00934
+4 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,556	4,898	23,826
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,539	4,700	23,013
	%Değişim	0,00017	0,00198	0,00813
-20 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,583	5,150	24,145
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,574	5,158	24,503
	%Değişim	0,00009	0,0008	0,00358
-80 ºC	**Ort$_{\text{ilk okuma}}$**	0,531	5,119	25,489
	Ort$_{\text{son okuma}}$	0,507	4,998	24,954
	%Değişim	0,00024	0,00121	0,00535

*Ort: Ortalama

Değişim değerleri %1'in altında olduğundan numunlerin tüm saklama koşullarında (oda sıcaklığı, +4 ºC, -20 ºC ve -80 ºC) 7 günlük süre için kararlı olduğu bulundu.

5. Tartışma

Kullanımı her geçen gün artan kokainin, dopamin, noradrenalin ve serotonin geri-alınımını engelleyerek mezolimbik yolu etkilediği ve bağımlılık yaptığı bilinmektedir. Kısa bir kullanım süresinden sonra bile bağımlılığın ortaya çıkma riski çok yüksektir. Vücuda alım şekline göre değişkenlik göstermekle birlikte etkisi saniyeler içinde başlar, en yüksek seviyeye ise birkaç dakika sonra çıkar. Diğer taraftan, ağır eroin bağımlılık tablosundaki hastaların replasman tedavisi sırasında yoksunluk ile başa çıkmaya çalışırken yoğun kokain tükettikleri de bildirilmektedir. Nadir vakalarda, kokainin ilk kez kullanımında veya sonradan, beklenmedik şekilde ani ölümler de meydana gelebilmektedir. Kokainin ölümlerdeki rolünü belirleyebilmek ve doğru bir şekilde yorumlayabilmek için adli toksikoloji analizlerine kokain ve metabolitlerinin dahil edilmesi kıymetlidir. Bu nedenle toksikolojik analizlerde kokain tespit ve tayinine dair farklı vücut sıvılarında ve daha hassas yöntemler geliştirebilmek ölüm sonrası her iki analitin dağılımını incelemeyi mümkün kılmakta ve adalete katkı açısından oldukça önem arz etmektedir.

Farklı biyolojik matrislerde toksikolojik verilerin elde edilmesi için adli toksikolojide yapılan bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Yapılan çalışmalar postmortem analizlerde sadece kana alternatif olması için değil, aynı zamanda postmortem ilaç redüstribisyonunun ve farmako-/toksikokinetik analizlerin değerlendirilmesi için de önem taşımaktadır. Son dönemde, BOS, kemik içi infüzyon sıvısı, göz içi sıvısı, saç, tırnak gibi farklı biyolojik örneklere ait analiz sonuçlarını değerlendiren çalışmalara ilgi giderek artmaya başlamıştır. Özellikle kapalı ortamda bulunan vücut sıvıları ölümden sonra kandan daha uzun süre korunduğundan ve ölüm sonrası sınırlı kimyasal değişikliğe maruz kaldığından kontaminasyon ve çürümeden daha az etkilenirler. Bu çalışmada da matris olarak değerlendirilen korunaklı BOS numunesi, büyük miktarlarda bulunduğundan ve örnek alımı kolay olduğundan, toksikolojik analizler için avantajlı bir sıvı olarak kabul

edilmiştir. Buna karşın BOS numıunesinin adli otopside toksikolojik analizindeki kısıtlılıkları arasında ise beyin şişmesi nedeniyle sınırlı miktarda numune toplanabilmesi ve kafa yaralanmaları ve serebrovasküler hastalıklar nedeniyle kan kontaminasyonu yer almaktadır (3).

Kokain, ölümden sonra ana metaboliti BE'ye hidroliz olmaya devam eder ve vücut sıvılarındaki miktarı giderek azalır. Bu nedenle ölüm esnasındaki miktarını tespit edebilmek için korunaklı ve postmortem dağılımdan az etkilenen vücut sıvılarında tespit ve tayini giderek daha önemli hale gelmektedir. Kokain kan-beyin bariyerini serbestçe ve hızla geçerken, BE geçemez. Bu nedenle BOS içerisinde tespit edilen BE miktarı, postmortem yeniden dağılımla farklı doku ya da vücut sıvılarından taşınabilecek miktarı değil, burada kokainden metabolize olan miktarı göstermektedir (87).

Birçok ilacın ve yasadışı maddenin BOS içinde tayin edilen konsantrasyonlarının kan içinde tayin edilen konsantrasyonlarına korelasyonunu inceleyen çalışmalar artmakta ve BOS'un kana alternatif numune olduğuna dair anlamlı bulgular elde edilmektedir (1, 3). İlaveten, BOS/kan korelasyonunun araştırması adına kokaine özgü çalışmalar da yapılmıştır. Barbieri ve ark.'nın sıçanlar üzerinde yaptıkları, farklı dozlarda kokain enjekte edildikten sonra belirli aralıklarla kan ve BOS numune toplayarak kokain ve BE için BOS/plazma oranlarını araştırdıkları çalışma ile BOS numunesinin kanın elde edilemediği postmortem olgulardaki önemini vurgulamıştır (61).

Kokain ve metabolitlerinin farklı biyolojik matrislerde tayinine yönelik gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GS-MS) ve LC-MS/MS başta olmak üzere pek çok analitik sistemin kullanıldığı bilinmektedir. Alvear ve ark. 2014 yılında içlerinde BOS'un da olduğu birçok vücut sıvısı ve dokusundan kokain ve BE tayini yapabilmek için SPE tekniği ile GC-MS sisteminde yöntem geliştirmişlerdir (62). Ayrıca, Staeheli ve ark. 2015 yılında yine BOS numunesini de kapsayan çoklu vücut sıvısı ve dokusundan içlerinde kokain ve BE'nin de

olduğu 83 analiti tayin edebilmek için LLE tekniğini kullanarak LC-MS/MS sisteminde yöntem geliştirmişlerdir (65). Bu çalışmalar, alternatif matrislere toksikolojik analizlerde olan ilginin arttığını ve BOS numunesi gibi korunaklı bölgede bulunan vücut sıvılarının olguları doğru yorumlayabilme açısından öneminin ve avantajının dikkat çektiğini göstermektedir. Ancak buna rağmen BOS matrisinde LC-MS/MS sistemi ile kokain ve metabolitlerinin kromatografik olarak validasyon analizine özgü bir çalışma şimdiye kadar bildirilmemiştir. Yüksek hassasiyetli analitik sistemlerle analite özgü yöntem geliştirmenin bulguların doğruluğunu artırdığı düşünüldüğünde yapılan bu yüksek lisans çalışmasının alana önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

LS-MS/MS analitik sistemi yüksek hassasiyeti ile yalnızca kan ve idrarda değil, aynı zamanda tükürük, göz içi sıvısı, ter, tırnak, saç ve diğer vücut sıvı ya da dokuları gibi alternatif matrislerde de düşük konsantrasyonlarda madde tayinine elverişli olduğundan bu sistemle geliştirilen yeni yöntemlerin adli vakaların aydınlatmasında oldukça önemli rol oynayarak adalete hizmet edebileceği düşünülmektedir. Buna ilaveten aranılan analitin herhangi bir biyolojik numune içerisinden tayin edilebilmesinde hassas analitik sistemlerden daha önemlisi, analitin aranılan matris içerisinden olabildiğince yüksek verimlilikte ekstrakte edilebilmesidir. Dolayısıyla alternatif matrisler için geçerliliği kanıtlanmış yöntemler hakkındaki mevcut literatürün hala sınırlı sayıda olmasından dolayı bu tez kapsamında yapılan çalışmanın önemi artmaktadır.

Bu çalışma adli toksikolojide önemli bir yasa dışı madde olan ve lipofilik yapısıyla kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçerek MSS'ye etki eden kokainin ve onun ana metaboliti BE'nin BOS örneklerinde tayin edilmesi ve matris etkisinin anlaşılması için yöntem geliştirmeyi, buna bağlı validasyon parametrelerini açıklamayı amaç edinmiştir. Böylelikle son dönemde adli toksikolojide ilgi uyandıran alternatif matris arayışına katkı sağlaması amaçlanmaktadır. BOS gibi düşük hacme sahip matrislerde maruziyetin doğru ve kesin

şekilde belirlenmesi için yöntemin geçerliliğinin fazla sayıda tekrarla ortaya konması gerektiğinden oldukça fazla miktarda biyolojik numuneye ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçek BOS numunesi ile validasyon çalışmaları yapabilmek için özdeş sıvıya erişebilirlik oldukça güç olduğundan klinik çalışmalarda zaten kullanılmakta olan yBOS hazırlanmış ve tüm çalışmalar hazırlanan bu sıvı ile yapılmıştır. Hazırlanan yBOS numunesi içerisine kokainin ve BE'nin metanol içerisinde hazırlanmış çözeltilerinden farklı miktarlarda spike edilerek, farklı konsantrasyon seviyelerinde analit içeren numuneler elde edilmiştir. Analitler ve kantitatif analizi doğrulamak için kullanılan kokain-d3 ve BE-d3 iç standart maddeleri LC-MS/MS sistemi ile geliştirilen yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Postmortem olgularda BOS içerisinden kokain analizlerinde LLE ve SPE yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Her analitik tekniğin farklı matrislere göre ölçümlerde değişkenlik gösterebildiği bilinmektedir. Bu çalışmada önemli ve aranılan analite özgü ön işlem adımları gerçekleştirildikten sonra yapılan SPE ekstraksiyonun, kokain ve metabolitlerinin yBOS içerisinden analizi için oldukça duyarlı ve seçici olduğu kanıtlanmıştır. yBOS matrisi içerisinden kokain ve ana metaboliti BE'nin SPE ile kolay ve hızlı çekitleme aşamasına sahip, yüksek verimlilikte bir analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Seçiciliği uygun bulunan çalışmaya ait doğrusallık sonuçları Bölüm 4.4'te verilmiştir. Kokain için metanol içerisinde 0,2-100 ng/mL aralığında 9 noktalı ve r^2=0,999 bulunurken yBOS içerisinde 0,5-50 ng/mL aralığında 7 noktalı ve r^2=0,998 bulunmuştur. BE için ise metanol içerisinde 0,5-100 ng/mL aralığında 8 noktalı ve r^2=0,999 bulunurken yBOS içerisinde 0,5-50 ng/mL aralığında 7 noktalı ve r^2=0,998 bulunmuştur. Metanol içerisindeki çözücülerle yapılan kalibrasyon grafiğine ait çalışma aralağının yBOS numunesine kıyasla az da olsa daha geniş aralıklarda olmasına rağmen Tablo XII'de gösterilen matris etkisi kaynaklı çalışmalara yBOS ile hazırlanan kalibrasyon grafikleriyle devam edilmiştir. Matris etkisi altında hazırlanan kalibrasyon grafiklerinin her ikisin de r^2 değerleri > 0,99

bulunmuştur ve analiz için uygundur. SPE ile geliştirilen yöntemde olası ekstraksiyon kayıplarını göz önünde bulundurarak en doğru sonuç almak adına matris etkisiyle hazırlanmış kalibrasyon grafiğine ihtiyaç duyulmuştur.

yBOS içerisindeki LoD ve LoQ değerleri kokain için sırasıyla 0,02 ng/mL ve 0,1 ng/mL; BE için ise sırasıyla 0,01 ng/mL ve 0,05 ng/mL bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmaları düşük (0,5 ng/mL), orta (5 ng/mL) ve yüksek (25 ng/mL) olarak belirlenen 3 farklı konsantrasyonda 6 tekrarlı hazırlanan örnekler üzerinden gerçekleştirilmiştir. yBOS numunesi içerisinden SPE yöntemi ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmalarına ait geri kazanım sonuçları kokain için 0,5 ng/mL konsantrasyonda %114,600±0,051 (%RSD 8,900); 5 ng/mL konsantrasyonda %101,740±0,405 (%RSD 7,961) ve 25 ng/mL konsantrasyonda %96,068±1,606 (%RSD 6,686); BE için ise 0,5 ng/mL konsantrasyonda %111,400±0,049 (%RSD 8,797); 5 ng/mL konsantrasyonda %102,700±0,421 (%RSD 8,198) ve 25 ng/mL konsantrasyonda %99,268±0,956 (%RSD 3,852) bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmaları ile aynı standartlarda 7 gün sonra yapılan ara kesinlik çalışmalarına ait geri kazanım sonuçları kokain için 0,5 ng/mL konsantrasyonda %119,400±0,048 (%RSD 8,040); 5 ng/mL konsantrasyonda %95,960±0,319 (%RSD 6,648) ve 25 ng/mL konsantrasyonda %99,096±0,867 (%RSD 3,499); BE için ise 0,5 ng/mL konsantrasyonda %109,000±0,045 (%RSD 8,256); 5 ng/mL konsantrasyonda %93,460±0,318 (%RSD 6,805) ve 25 ng/mL konsantrasyonda %95,92±0,820 (%RSD 3,419) bulunmuştur. Çalışmadaki geri kazanım oranlarının kabul edilebilir sınırlarda (% 70-120) olduğu görülmüştür. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmalarının her ikisinde de %RSD <20 uygunluğu bulunmuş ve yöntemin tekrar edilebilirliği kanıtlanmıştır. Stabilite çalışmaları için oda sıcaklığı, +4 ºC, -20 ºC ve -80 ºC'de 1 hafta saklanarak analiz edilen ölçüm sonuçları arasındaki % değişim değerleri

tüm konsantasyon basamaklarında hem kokain hem de BE için %1'in altında kaldığından geliştirilen yöntemin stabilitesi böylelikle kanıtlanmış kabul edilmiştir.

Yapılan deneysel çalışmaların önceki çalışmalara kıyasla avantajları bulunmaktadır. Alvear ve ark. tarafından SPE tekniği kullanılarak GC-MS sisteminde geliştirilen yöntemin kalibrasyon grafikleri her iki madde için de 10 ila 200 ng/mL aralığında, Staeheli ve ark. tarafından LLE tekniği kullanılarak LC-MS/MS sisteminde geliştirilen yöntemin kalibrasyon grafikleri ise kokain ve BE için sırasıyla 2-1200 ve 2-1500 ng/mL aralığında çizdirilmiştir. Bu yüksek lisans çalışmasında matris etkisinde 0,5 ng/mL noktasında dahi lineerliğini koruyabilen kalibrasyon grafiği çizdirilebilmiştir. Bu şekilde, kokain ölüm nedeni olmasa bile, kullanımının var olduğu ve vücut içerisinde düşük miktarlarda bulunduğu ölüm olgularındaki miktarın doğru tayin edilebilmesi söz konusudur. Ayrıca kullanım ile numune toplama arasında geçen sürenin artması da kokainin BE'ye dönüşmesinden kaynaklı miktarının azalmasına sebep olacak ve bu durum düşük konsantrasyonlarda çizdirilen kalibrasyon grafiğinin önemini artıracaktır. Alvear ve ark. tarafından geliştirilen yöntemde r^2 değerleri kokain ve BE için sırasıyla 0,985 ve 0,992 bulunurken bizim çalışmamızda matris etkisiyle çizdirilen kalibrasyon grafiklerine ait r^2 değerleri her iki madde için de 0,998 bulunmuştur. Alvear ve ark. tarafından geliştirilen yöntemde kokain için LoD ve LoQ değerleri sırasıyla 0,19 ve 0,62 ng/mL bulunurken bizim çalışmamızda 0,02 ve 0,1 ng/mL bulunmuş; BE için LoD ve LoQ değerleri sırasıyla 0,76 ve 2,55 ng/mL bulunurken bizim çalışmamızda 0,01 ve 0,05 ng/mL bulunmuştur. Alvear ve ark. tarafından geliştirilen yöntemde geri kazanım sonuçları kokain için %97,94±4,63 bulunurken bizim çalışmamızda 25 ng/mL konsantrasyonda %99,096±0,867; BE için %93,76±3,46 bulunurken bizim çalışmamızda 25 ng/mL konsantrasyonda %99,268±0,956 bulunmuştur. Staeheli ve ark. tarafından geliştirilen LLE yöntemi bu çalışmada geliştirilen SPE yöntemi ile eş zamanlı çalışılarak karşılaştırılmış ve

BE için yüksek S değeri ve %RSD >20 bulunmuştur. SPE tekniğinin LLE'ye kıyasla aranılan analit ile girişime neden olabilecek etkenlerden ve matris etkisinden daha iyi ayırt ettiği bilinmektedir. Yöntem parametreleri arasında yapılan bütün karşılaştırmalar bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntemin hassasiyet ve doğruluk açısından avantajlarını ortaya koymaktadır. Literatürlerde karşılaşılan alternatif matrisler içerisinden yapılan toksikolojik taramalara olan ilgi ve öte yandan bu alandaki çalışma azlığı bu tez kapsamında geliştirilen yöntemin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Tek bir matris içerisinde tek bir madde ve metabolite özgü olması da o yöntemin bulgularının doğruluğunu artırmaktadır.

Tüm bu deneysel çalışmalar sonucunda yBOS içerisinden kokain ve ana metaboliti BE analizinin, SPE yöntemi kullanılarak LC-MS/MS sistemi ile validasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Diğer analitik sistemlere kıyasla hassasiyeti yüksek olan LC-MS/MS ile 7 basamaklı ve r^2 >0,99 doğrusallıkta yapılan kalibrasyon grafiği ile geniş aralıkta kantitatif analiz yapılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede postmortem olgularda kan örneğinin bulunamadığı durumlarda, düşük protein konsantrasyonları nedeniyle plazmaya özdeşlik gösteren BOS numunesi içerisinden kokain ve ana metaboliti BE tayin edilebilecek ve analiz yöntemi bilimsel kanıtlara dayandırılabilecektir. Ayrıca olguda kan numunesi bulunabilse dahi postmortem yeniden dağılım ile kokain maddesinin kan içerisindeki miktarı doğru sonuç veremeyebilecek ve yanlış yorumlamalara sebep olabileceğinden postmortem yeniden dağılımdan daha az etkilenen BOS numunesi ile analiz sonuçları doğrulanabilecektir. Buna ilevaten postmortem yeniden dağılım durumlarında kan içerisindeki kokain ve BE miktarındaki değişim miktarlarını tespit edebilmek adına da oldukça kıymetli bir matris oluşuyla BOS numunesi ile geliştirilen bu yöntem adli toksikolojiye ve adalete katkı sağlayabilecektir.

Bu çalışmada, kullanımı her geçen gün artan kokain maddesinin ve ana metaboliti BE'nin yBOS numunesi içerisinden kantitatif analizine özgü LC-MS/MS sistemi ile yöntem

geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde, hazırlanan yBOS numunesinde aranılan analitlerin matris içindeki tayin limitleri ve analizdeki etkileri, geri kazanım verimliliği, doğruluk, kesinlik ve stabilite gibi pek çok önemli validasyon parametresi belirlenebilmiştir. Bu sayede düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda tekrarlanabilir, kesin, kabul edilebilir geri kazanım verimlerine sahip ve güvenilir aralıklarda sonuç veren bir yöntem valide edilmiştir. Dolayısıyla kan ve idrar gibi rutin biyolojik örneklerin bulunamadığı postmortem olgularda BOS numunesi içerisinden kokain ve BE analizini mümkün kılacağı düşünülmektedir. Böylelikle bulunan yöntem, incelenen adli vakanın açıklığa kavuşturulmasına yardımcı olacak güvenilir sonuçların elde edilmesine yardımcı olabilecektir. Alternatif matrisler arasında oldukça kıymetli bir numune olan BOS ile yapılmış LC-MS/MS sisteminde kokain ve BE analizi analite özgü bir validasyon çalışması olmadığından bu çalışmanın literatüre katkısının önemli olduğu düşünülmektedir.

6. Sonuç

Bu tez çalışmasında yapılan deneylerle, gerçek numuneye en yakın olacak şekilde yBOS numunesi hazırlanmış ve kötüye kullanımı her geçen gün artan kokainin ve ana metaboliti BE'nin hazırlanan yBOS içerisinden SPE yöntemi ile çekitlemesi yapılarak LC-MS/MS sisteminde kantitatif analize uygun yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışması dahilinde seçicilik, doğruluk, doğrusallık, LoD ve LoQ, sağlamlık ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda kokaine ait diğer metabolitlerin de içinde olduğu, hassasiyeti artırılarak daha düşük tayin limitlerine inilebilen yöntemler geliştirilerek gerçek BOS numunelerinde doğrulanması ve böylelikle geleneksel matrislere karşı alternatif matrislerin toksikolojik analizlerde yaygınlaşmasına katkı sağlanması hedeflenmektedir.

7. Kaynaklar

1. Engelhart, D. A., & Jenkins, A. J. Comparison of drug concentrations in postmortem cerebrospinal fluid and blood specimens. Journal of analytical toxicology 2007; 31(9):581-587.

2. Griffiths, J. L. An investigation of the use of alternative matrices in clinical and forensic toxicology [Doktora tezi]. University of Birmingham, 2013.

3. Tominaga, M., Michiue, T., Ishikawa, T., Inamori-Kawamoto, O., Oritani, S., & Maeda, H. Evaluation of postmortem drug concentrations in cerebrospinal fluid compared with blood and pericardial fluid. Forensic science international 2015; 254:118-125.

4. Cengiz, G., Çeçen, Ş. Ş., & Söylemezoğlu, T. Gc/Ms yöntemi ile idrarda kokain tayini. Ankara ecz fak dergisi 2004; 33(3), 139-149. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000473.

5. Jones AW. Perspectives in drug discovery-12. Cocaine. TIAFT Bulletin 2013; 43:7-13.

6. Goldstein, R. A., DesLauriers, C., Burda, A., & Johnson-Arbor, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. In seminars in diagnostic pathology 2009; 26(1):10-17.

7. United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS). National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. The PLANTS Database. Erişim adresi: http://plants.usda.gov ; http://plants.usda.gov/gallery/pubs/erco41_001_php.jpg (Son erişim tarihi: 8 Haziran 2021).

8. Biondich, A. S., & Joslin, J. D. Coca: High altitude remedy of the ancient Incas. Wilderness & environmental medicine 2015; 26(4):567-571.

9. Saygın, H. U. Psikoaktif bitkilerin tarihi ve farklı bilinç hallerinin psikofarmakolojisi. Ders Kitabı 2016.

10. Özkaya, D. Kokain ve metabolitlerinin insan idrarında analizi [Yüksek lisans tezi]. Ege Üniversitesi, 2016.

11. Altman, A. J., Albert, D. M., & Fournier, G. A. Cocaine's use in ophthalmology: our 100-year heritage. Survey of ophthalmology, 1985; 29(4):300-306.

12. Göl E. GC/FID cihazında kokain metot validasyonu [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi, 2013.

13. Grzybowski A. The history of cocaine in medicine and its importance to the discovery of the different forms of anaesthesia. Klin oczna 2007;109(1-3):101-105.

14. Freye E, Levy JV. Pharmacology and abuse of cocaine, amphetamines, ecstasy and related designer drugs: A comprehensive review on their mode of action, treatment of abuse and intoxication. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer science and business media; 2010.

15. Treadwell, S. D., & Robinson, T. G. Cocaine use and stroke. Postgraduate medical journal 2007; 83(980):389-394.

16. Niemann A. Ueber eine neue organische base in den cocablättern. Archiv der pharmazie 1860;153(2):129-256.

17. Koller C. On the use of cocaine for producing anaesthesia on the eye. Lancet 1884; 2:990-992.

18. Köknel Ö. Modern psikofarmakolojinin ellinci yılında Türkiye'de ve dünyada psikofarmakoloji ve psikofarmakolojik araştırmaların tarihçesi. Klinik psikofarmakoloji bülteni 2002; 12: 201-210.

19. Ernest J. Sigmund Freud: Life and work, Vol 1: The young freud 1856-1900. London: Hogarth press; 1953: 94-96.

20. Erdoğan, D. Nöralterapi: Etki mekanizması, endikasyonları, klinik çalışmalar. Ankara akupunktur 2016; 4(1):22-27.

21. Levine, B., & Kerrigan, S. [editör]. Principles of forensic toxicology (Vol. 2). Washington, DC: American association for clinical chemistry 1999.

22. Drug Enforcement Administration (DEA). USA: Controlled substance schedules and list of controlled substances. Erişim adresi: https://www.dea.gov/druginfo/ds.shtml (Son erişim tarihi: 8 Haziran 2021).

23. Şatır, T. T., Kalyoncu, A., & Pektaş, Ö. Kokain kullanım bozukluğunda birbirini takip iki sürecin değerlendirilmesi. Bağımlılık dergisi 2000: 1(1).

24. Cimete, G. Gebelikte madde kullanımının anne, fetüs ve yenidoğan üzerine etkisi. Anadolu hemşirelik ve sağlık bilimleri dergisi 2010; 5(1).

25. Dökmeci, İ. [editör]. Farmakoloji-ilaç uygulamalarında temel kavramlar: amaç dışı madde kullanımı. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri 1992; 431-443.

26. Vale A. Drugs of abuse (amfetamines, BZP, cannabis, cocaine, GHB, LSD). Medicine 2012; 40(2):84-87.

27. Vale A. Cocaine. Medicine 2007; 35(11):607.

28. Koç S, Tırtıl L, Turan N. Alkol, uyuşturucu, uyarıcı ve benzeri madde entoksikasyonların adli tıbbi özellikleri. Klinik gelişim 2009; 22:133-140.

29. Cone, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. Journal of analytical toxicology 1995; 19(6):459-478.

30. Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K., & Ritter, R. M. Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography B 2004; 806(2):141-150.

31. Hatsukami, D.K., Fischman, M.W. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality?. JAMA 1996; 276(19):1580.

32. Fowler, J.S., Volkow, N.D., Wang, G.J., Gatley, S.J., Logan, J. [11] Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. Nucl med biol. 2001; 28(5):561-572.

33. Sham, B. Perinatal substance abuse. Core curriculum for neonatal intensive care nursing 1999; 523-27

34. Wang, G. J., Wiers, C. E., Shumay, E., Tomasi, D., Yuan, K., Wong, C. T., ... & Volkow, N. D. Expectation effects on brain dopamine responses to methylphenidate in cocaine use disorder. Translational psychiatry 2019; 9(1):93.

35. Ataklı, D., & Atakh, C. Kokain kullanımına bağlı nörolojik komplikasyonlar. Düşünen adam 1993; 6(1-2):57-63.

36. Kampman, K. M., Volpicelli, J. R., Mulvaney, F., Alterman, A. I., Cornish, J., Gariti, P., ... & Luce, D. Effectiveness of propranolol for cocaine dependence treatment may depend on cocaine withdrawal symptom severity. Drug and alcohol dependence 2001; 63(1):69-78.

37. American psychiatric association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. BMC Med, 2013; 1:133-137.

38. Bates, C. K. Medical risks of cocaine use. Western journal of medicine 1988; 148(4):440.

39. Bedford, J. A., Turner, C. E., & Elsohly, H. N. Comparative lethality of coca and cocaine. Pharmacology biochemistry and behavior 1982; 17(5):1087-1088.

40. Karch, S. B., Stephens, B., & Ho, C. H. Relating cocaine blood concentrations to toxicity-an autopsy study of 99 cases. Journal of forensic science 1998; 43(1):41-45.

41. Cohen, S. Recent developments in the abuse of cocaine. Bulletin on narcotics 1984; 36(2):3-14.

42. Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Telang, F., Logan, J., Jayne, M., ... & Swanson, J. M. Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. Neuroimage 2010; 49(3):2536-2543.

43. Maraj, S., Figueredo, V. M., & Lynn Morris, D. Cocaine and the heart. Clinical cardiology: An ınternational ındexed and peer-reviewed journal for advances in the treatment of cardiovascular disease 2010; 33(5):264-269.

44. Havakuk, O., Rezkalla, S. H., & Kloner, R. A. The cardiovascular effects of cocaine. Journal of the american college of cardiology 2017; 70(1):101-113.

45. Richards, J. R., Garber, D., Laurin, E. G., Albertson, T. E., Derlet, R. W., Amsterdam, E. A., ... & Lange, R. A. Treatment of cocaine cardiovascular toxicity: a systematic review. Clinical toxicology 2016; 54(5):345-364.

46. Weis, R. D. Pulmonary disfunction in cocaine smokers. Am j psychiatry 1982; 138:1110-1112.

47. Maraşlı, Ş., & Özcan, A. Serebrospinal sıvının biyokimyasal analizi ve klinikte yararlanma olanakları. Kafkas Üniv. vet. fak. derg 1996; 2(1):13-21.

48. Eşgin, M. Beyin omurilik sıvısının (bos) biokimyasal parametreleri ile cinsiyet ve spinal blok özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılması. [Yüksek lisans tezi]. Akdeniz Üniversitesi, 2013.

49. Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases 2011; 128(6):309-316.

50. Strasinger, S. K., & Di Lorenzo, M. S. Urinalysis and body fluids. FA Davis 2014; s.182.

51. Bergsneider, M. Evolving concepts of cerebrospinal fluid physiology. Neurosurgery clinics of north america 2001; 12(4):631-638.

52. McComb, J. G. Cerebrospinal fluid physiology of the developing fetus. American journal of neuroradiology 1992; 13(2):595-599.

53. May, C., Kaye, J. A., Atack, J. R., Schapiro, M. B., Friedland, R. P., & Rapoport, S. I. Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. Neurology 1990; 40:500-500.

54. Peyron, P. A., Lehmann, S., Delaby, C., Baccino, E., & Hirtz, C. Biochemical markers of time since death in cerebrospinal fluid: a first step towards “Forensomics”. Critical reviews in clinical laboratory sciences 2019; 56(4):274-286.

55. Hajdu, S.I. discovery of the cerebrospinal fluid. Annals of clinical and laboratory science 2003; 33(3):334–6.

56. Zengin, N. Yapay beyin omurilik sıvısında Δ9-THC’nin sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemiyle belirlenmesi. [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, 2020.

57. Formichi, P., Battisti, C., Radi, E., & Federico, A. Cerebrospinal fluid tau, Ass, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. Journal of cellular physiology 2006; 208(1):39-46.

58. Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C. G., Burgess, J. A., Hughes-Frutiger, S., Burkhard, P. R., ... & Hochstrasser, D. F. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. Proteomics 2004; 4(8):2234-2241.

59. Wright, B. L., Lai, J. T., & Sinclair, A. J. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. journal of neurology 2012; 259(8):1530-1545.

60. Hocking, G., & Wildsmith, J. A. W. Intrathecal drug spread. British journal of anaesthesia 2004; 93(4):568-578.

61. Barbieri, E. J., Ferko, A. P., DiGregorio, G. J., & Ruch, E. K. The presence of cocaine and benzoylecgonine in rat cerebrospinal fluid after the intravenous administration of cocaine. Life sciences 1992; 51(22):1739-1746.

62. Alvear, E., von Baer, D., Mardones, C., & Hitschfeld, A. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. Journal of forensic and legal medicine 2014; 23:37-43.

63. Serrano Alvear, E., von Baer, D., Mardones, C., & Rosales, C. V. Cocaine and postmortem levels in neurological tissues. In neuropathology of drug addictions and substance misuse. Academic press 2016; 237-244.

64. Pragst, Fritz, et al. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid-comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. Journal of analytical toxicology 1999; 23(3):168-172.

65. Staeheli, S. N., Poetzsch, M., Kraemer, T., & Steuer, A. E. Development and validation of a dynamic range-extended LC-MS/MS multi-analyte method for 11 different postmortem matrices for redistribution studies applying solvent calibration and additional ^{13}C isotope monitoring. Analytical and bioanalytical chemistry 2015; 407(29):8681-8712.

66. Eser B., Sepici Dinçel A. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi 2018; 2(2):51-57.

67. Emekdaş, G., Güngör, S., Gün, H. ve Kocabeyoğlu, Ö. Kromatografik yöntemler. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1990; 1:108-118.

68. Coşkun, O. Separation techniques: chromatography. Northern Clinics of Istanbul 2016; 3(2):156.

69. Cheremisinoff, N. P. Polymer characterization: laboratory techniques and analysis. William Andrew 1996

70. Regnier, F. E. High-performance liquid chromatography of biopolymers. Science 1983; 222(4621):245-252.

71. Meyer, V. R. Practical high-performance liquid chromatography. John Wiley & Sons 2013.

72. Beşergil, B., Celâl Bayar Üniversitesi. Kromatografiye giriş, [e-makale] Erişim adresi: http://besergil.cbu.edu.tr/24_BOLUM_7.pdf (Son erişim tarihi: 23 Haziran 2021).

73. Erişim adresi: http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yuksek-performans-sivi.html (Son erişim tarihi: 8 Haziran 2021).

74. Gault, V. A. ve McClenaghan, N. H. Understanding bioanalytical chemistry: principles and applications. John Wiley & Sons 2013

75. Chappell, D. L., Lee, A. Y., Castro-Perez, J., Zhou, H., Roddy, T. P., Lassman, M. E., ... & Laterza, O. F. An ultrasensitive method for the quantitation of active and inactive GLP-1 in human plasma via immunoaffinity LC–MS/MS. Bioanalysis 2014; 6(1):33-42.

76. Öztürk S. JWH-073 ve metabolitlerinin LC-MS/MS ile kan ve idrarda tayinleri [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi, 2015.

77. Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) (2018), [Blog yazısı] Erişim adresi: https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/72/sivi-kromatografi-kutle-spektrometresi-lc-msms (Son erişim tarihi: 8 Haziran 2021).

78. Akdağ İ. Metot validasyonu, ölçüm belirsizliği ve önemi (2004) [Power Point Sunumu]. Tübitak UME

79. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Kimyasal ve fiziksel analizlerde metot validasyonu/verifikasyonu rehberi, 2018.

80. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi, 2013.

81. Arpacık, Y. Atık suda kafein analizi için sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi ile yöntem geliştirilmesi. [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi, 2019.

82. Eurachem. Analitik metotların amaca uygunluğu, metodun geçerli kılınması ve ilgili konular için laboratuvar kılavuzu 2.baskı (Türkçe Çeviri), 2018

83. Zazoğlu, S. İmmünolojik analiz (CEDIA) pozitif Sonuçlarının LC/MS/MS yöntemi ile teyidi ve yöntemin validasyonu [Doktora Tezi]. Trabzon: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2011.

84. Yılmaz A., TURKLAB Rehber 01: Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu (2013) 2. Revizyon, Kalibrasyon ve deney laboratuvarları derneği, İstanbul

85. He, K., Echigo, S., Asada, Y., & Itoh, S. Determination of caffeine and its metabolites in wastewater treatment plants using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Sciences 2018; 34(3):349-354.

86. Erişim adresi: https://www.alzet.com/guide-to-use/preparation-of-artificial-csf/ (Son erişim tarihi: 23 Haziran 2021).

87. Bertol, E., Trignano, C., Di Milia, M. G., Di Padua, M., & Mari, F. Cocaine-related deaths: an enigma still under investigation. Forensic science international 2008; 176(2-3):121-123.

8. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

- Ad Soyad: Tuğba TEKİN BÜLBÜL
- Doğum Tarihi:988
- Doğum Yeri:
- GSM:
- E-Posta: @gmail.com

Eğitim Bilgileri

- Yüksek lisans: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, 2019-2021
- Yüksek lisans: Okan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İş Sağlığı ve Güvenliği, 2012-2013
- Lisans: Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya, 2007-2012

Kariyerle İlgili İş Deneyimleri

- İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü / Kimyager (21 Haziran 2016 – Devam ediyor)
- Çukurova Üniversitesi Otomotiv Mühendisliği Bölümü / Kimyager (18 Ağustos 2014 – 7 Haziran 2016)
- Gelişim Ortak Sağlık Güvenlik Birimi Tic. Ltd. Şti. – B Sınıfı İş Güvenliği Uzmanı (23 Eylül 2013 - 15 Ağustos 2014)

Yeterlilikler

- TÜRKLAB Metot Validasyonu ve Verifikasyonu Eğitimi, 2021-İstanbul
- 14. Adli Bilimler Kongresi Katılım Sertifikası, 2017-İzmir
- 2. Uluslararası TURAZ Adli Bilimler Adli Tıp ve Patoloji Kongresi, 2018-İstanbul
- Çapraz Ateş Altında Bilirkişilik (Asistan Gözüyle Çapraz Sorgu) Çalıştayı Katılım Sertifikası, 2017- İzmir
- 2nd TIAFT Regional Meeting in Turkey Katılım Sertifikası, 2016-Antalya
- İş Güvenliği Uzmanlığı Sertifikası (B Sınıfı)
- Kalite Mühendisliği Sertifikası
- ISO 9001 Baş Denetçilik Sertifikası
- İş ve Meslek Danışmanlığı Sertifikası
- Sürücü Belgesi (B Sınıfı)

Yabancı Diller

- İngilizce

Üye Olduğu Dernekler

- The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)
- Adli ve Klinik Toksikoloji Derneği
- Kocaeli Üniversitesi Sualtı Topluluğu (2 yıldız dalıcı)
- İstanbul Kültür ve Sanat Vakfı
- Kimyagerler Derneği