



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SENTETİK KANNABİNOİD AB-PINACA (K3) VE  
METABOLİTLERİNİN İDRAR, TAM KAN VE KURU KAN KARTI  
(DBS) NUMUNELERİNDEN ANALİZİNE YÖNELİK LC-MS/MS  
METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

HAZAL YILMAZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADLİ BİLİMLER ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Oğuz Polat

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fehime Aksungar

İSTANBUL-2023





ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SENTETİK KANNABİNOİD AB-PINACA (K3) VE  
METABOLİTLERİNİN İDRAR, TAM KAN VE KURU KAN KARTI  
(DBS) NUMUNELERİNDEN ANALİZİNE YÖNELİK LC-MS/MS  
METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

HAZAL YILMAZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADLİ BİLİMLER ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Oğuz Polat

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Fehime Aksungar

İSTANBUL-2023

Anabilim Dalı: Adli Bilimler  
Program: Adli Bilimler Tezli Yüksek Lisans  
Tez Başlığı: Sentetik Kannabinoid AB-PINACA (K3) ve Metabolitlerinin İdrar, Tam Kan ve Kuru Kan Kartı (DBS) Numunelerinden Analizine Yönelik LC-MS/MS Metodunun Geliştirilmesi  
Öğrencinin Adı-Soyadı: Hazal Yılmaz  
Savunma Sınavı Tarihi: 14/07/2023

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

|                            |                                                                                |  |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--|
| Üye (Jüri Başkanı)         | Prof. Dr. Oğuz Polat<br>Acıbadem Mehmet Ali<br>Aydınlar Üniversitesi           |  |
| Üye (Tez Danışmanı)        | Prof. Dr. Oğuz Polat<br>Acıbadem Mehmet Ali<br>Aydınlar Üniversitesi           |  |
| Üye (İkinci Tez Danışmanı) | Prof. Dr. Fehime Aksungar<br>Acıbadem Mehmet Ali<br>Aydınlar Üniversitesi      |  |
| Üye                        | Prof. Dr. Işıl Pakiş<br>Acıbadem Mehmet Ali<br>Aydınlar Üniversitesi           |  |
| Üye                        | Prof. Dr. Ersi Abacı<br>Kalfaoğlu<br>T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl<br>Üniversitesi |  |
| Üye                        | Prof. Dr. Mehmet Akif<br>İnancı<br>Marmara Üniversitesi                        |  |

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

13/06/2023

Hazal Yılmaz

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, kıymetli bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyip, bu yolda bana başarı duygusunu hissettiren danışmanım Prof.Dr.Oğuz Polat ve eş danışmanım Prof.Dr.Fehime Aksungar’a,

Eğitim sürecim boyunca değerli bilgi ve birikimlerini aktaran Prof. Dr. Işıl Pakiş’e,

Eğitim ve tez çalışmam süresince desteğini her zaman hissettiğim Ar-Ge Müdürüm Dr.Gökçe Göksu Gürsu’ya, değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşarak tezime önemli katkılar sağlayan ve beni bu yola teşvik eden Proje Müdürüm Dr.Murat Emrah Maviş’e ve SEM ailesine,

Her daim yanımda olup, beni bu süreçte de yalnız bırakmayan ve bugünlere gelmemdeki en büyük destekçim, sevgili annem Günnur Ezmez’e ve ablalarım,

Her kararımdayanımda olan ve kararlarıma giden yolda benimle beraber adım atan eşim Akın Yılmaz’a,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimle...

.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| BEYAN.....                                                                  | iii |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....                                                      | iv  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                           | v   |
| KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ .....                                          | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                       | ix  |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                       | xii |
| ÖZET.....                                                                   | 1   |
| ABSTRACT .....                                                              | 2   |
| 1 GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                        | 3   |
| 1.1 Giriş.....                                                              | 3   |
| 1.2 Amaç .....                                                              | 3   |
| 2 GENEL BİLGİLER .....                                                      | 5   |
| 2.1 Uyuşturucu Nedir? .....                                                 | 5   |
| 2.2 Adli Toksikoloji.....                                                   | 7   |
| 2.3 Sentetik Kannabinoidler .....                                           | 10  |
| 2.4 Sentetik Kannabinoidlerin Adli Bilimler Açısından Önemi.....            | 12  |
| 2.4.1 Adli kontrol ve kısıtlamaları.....                                    | 14  |
| 2.5 AB-PINACA (K3) .....                                                    | 16  |
| 2.6 Uyuşturucu Tespitinde Kullanılan Analiz Yöntemleri ve Biyomatrisler ... | 18  |
| 2.7 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analiz Yöntemi      | 21  |
| 2.8 Biyomatrisler .....                                                     | 22  |
| 3 GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                     | 26  |
| 3.1 Kimyasallar ve Materyaller .....                                        | 26  |
| 3.2 Kalibratör, Kalite Kontrol ve İç Standart Hazırlığı .....               | 26  |
| 3.3 LC-MS/MS Analiz Metodu.....                                             | 27  |
| 3.4 Analitik Kolon, Hareketli Faz Kompozisyon ve Akış Denemeleri.....       | 35  |
| 3.5 Validasyon .....                                                        | 63  |
| 3.5.1 Doğrusallık (Linearity R <sup>2</sup> ) çalışmaları.....              | 63  |
| 3.5.2 En düşük tespit (LOD) ve teşhis limitleri (LOQ).....                  | 64  |
| 3.5.3 Geri kazanım (recovery %) .....                                       | 65  |
| 3.5.4 Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik (RSD %).....              | 65  |
| 3.5.5 Stabilité .....                                                       | 66  |
| 3.5.6 Seçicilik (selectivity) ve özgüllük (specifity) .....                 | 67  |

|          |                       |           |
|----------|-----------------------|-----------|
| <b>4</b> | <b>TARTIşMA.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>5</b> | <b>SONUÇ .....</b>    | <b>72</b> |
| <b>6</b> | <b>KAYNAKLAR.....</b> | <b>74</b> |
| <b>7</b> | <b>ÖZGEÇMİş .....</b> | <b>79</b> |



## KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>AB</b>       | Avrupa Birliği                                                   |
| <b>ATK</b>      | Adli Tıp Kurumu                                                  |
| <b>BM</b>       | Birleşmiş Milletler                                              |
| <b>BÜGEM</b>    | Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü                                  |
| <b>CB1,CB2</b>  | Kannabinoid Reseptörleri                                         |
| <b>CE</b>       | Parçalanma Voltajı                                               |
| <b>DBS</b>      | Kuru Kan Kartı (Dried Blood Spot)                                |
| <b>EGM</b>      | Emniyet Genel Müdürlüğü                                          |
| <b>EMCDDA</b>   | Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi       |
| <b>ESI</b>      | Elektrosprey İyon Kaynağı,                                       |
| <b>EWS</b>      | Avrupa Birliği Erken Uyarı Sistemini                             |
| <b>FV</b>       | Fragmentor Voltajı                                               |
| <b>GC-MS</b>    | Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi                          |
| <b>GMGM</b>     | Sahil Güvenlik Komutanlığı ve Gümrükler Muhafaza Genel Müdürlüğü |
| <b>ICD-11</b>   | Uluslararası Hastalık Sınıflandırması El Kitabı                  |
| <b>INCB</b>     | Uluslararası Narkotik Kontrol Kurulu                             |
| <b>JGK</b>      | Jandarma Genel Komutanlığı                                       |
| <b>LC-MS/MS</b> | Kütle Dedektörlü Sıvı Kromatografisi                             |
| <b>LOD</b>      | En Düşük Tespit Limiti                                           |
| <b>LOQ</b>      | En Düşük Teşhis Limiti                                           |
| <b>MASAK</b>    | Mali Suçları Araştırma Kurulu                                    |
| <b>MDMA</b>     | Ekstazi                                                          |
| <b>MRM</b>      | Çoklu Reaksiyon İzleme Modu                                      |
| <b>MS</b>       | Kütle Dedeksiyonu                                                |
| <b>QC</b>       | İç Kalite Kontrol                                                |
| <b>RSD</b>      | Tekrarlanabilirlik                                               |
| <b>SKN</b>      | Sentetik Kannabinoid                                             |
| <b>SKT</b>      | Sentetik Katinon                                                 |
| <b>SPE</b>      | Katı Faz Ekstraksiyon                                            |

|              |                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>TCK</b>   | Türk Ceza Kanunu                                            |
| <b>THC</b>   | Tetrahidrokanabinol                                         |
| <b>TİTCK</b> | Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu                          |
| <b>TMO</b>   | Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü                     |
| <b>TUBİM</b> | Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi |
| <b>UNODC</b> | Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi                 |
| <b>YPM</b>   | Yeni Psikoaktif Maddelerin                                  |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. LC-MS/MS sisteminin çalışma prensibi .....                                                                  | 22 |
| Şekil 2. Hedef analitlerin öncül iyon optimizasyonu .....                                                            | 29 |
| Şekil 3. Hedef analitlerin fragmentor voltaj optimizasyonu .....                                                     | 30 |
| Şekil 4. Hedef analitlerin ürün iyon optimizasyonu.....                                                              | 31 |
| Şekil 5. AB-PINACA ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu .....                                     | 32 |
| Şekil 6. AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu .....                | 32 |
| Şekil 7. AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu .....                | 33 |
| Şekil 8. AB-PINACA N-pentanoik asit ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu .....                    | 33 |
| Şekil 9. AB-PINACA-D9 ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu                                        | 34 |
| Şekil 10. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K1a-d).....                       | 36 |
| Şekil 11. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K2a-c) .....                      | 37 |
| Şekil 12. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K1a ve K2c).....                  | 37 |
| Şekil 13. K1a ve K2c kolonlarında izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı.....                                    | 38 |
| Şekil 14. K1a kolonunda 4 farklı mobil faz akış hızı enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları kıyaslaması ..... | 39 |
| Şekil 15. K1a kolonunda 3 farklı kolon sıcaklığı enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları kıyaslaması .....     | 39 |
| Şekil 16. K1a kolonunda toplam iyon kromatogramı kıyaslaması (G0-6) .....                                            | 40 |
| Şekil 17. K1a kolonunda izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı kıyaslaması (G0-3).....                           | 41 |
| Şekil 18. K1a ve K3 kolonlarının toplam iyon ve izomerlerinin ekstrakte edilmiş kromatogramları .....                | 42 |

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 19. K3 kolonunda 10 ve 2 µl enjeksiyon hacimlerinin toplam iyon ve izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramları kıyaslaması..... | 42 |
| Şekil 20. K3 kolonunda toplam iyon kromatogramı kıyaslaması (G3-6).....                                                                 | 43 |
| Şekil 21. K3 kolonunda G3-6 programlarında hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı kıyaslaması .....                           | 44 |
| Şekil 22. K3 kolonunda G6 programında 2 farklı mobil faz B toplam iyon kromatogram kıyaslaması .....                                    | 45 |
| Şekil 23. K3 kolonunda G6 programında 2 farklı mobil faz B hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması .....            | 45 |
| Şekil 24. K3 kolonunda %10 su içeren metanol mobil faz B G6-7 toplam iyon kromatogram kıyaslaması .....                                 | 46 |
| Şekil 25. K3 kolonunda %10 su içeren metanol mobil faz B G6-7 izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması.....                | 47 |
| Şekil 26. K3 kolonunda G7 programında 2 farklı mobil faz B toplam iyon kromatogram kıyaslaması .....                                    | 48 |
| Şekil 27. K3 kolonunda G7 programında 2 farklı mobil faz B hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması .....            | 48 |
| Şekil 28. K3 kolonunda asetonitril mobil faz B G7-8 toplam iyon kromatogram kıyaslaması.....                                            | 49 |
| Şekil 29. K3 kolonunda setonitril mobil faz B G7-8 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması .....                    | 50 |
| Şekil 30. K3 kolonunda G8 programında 2 farklı mobil faz akış hızının toplam iyon kromatogram kıyaslaması .....                         | 51 |
| Şekil 31. K3 kolonunda G8 programında 2 farklı mobil faz akış hızının hedef analitler ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması .....   | 51 |
| Şekil 32. Tam kan matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (PÇ1-6).....                                                         | 54 |
| Şekil 33. Tam kan matrisi için hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması (PÇ1-6).....                                 | 54 |
| Şekil 34. İzomerlerin bireysel standart enjeksiyonlarının ekstrakte edilmiş kromatogramları.....                                        | 55 |
| Şekil 35. İdrar matrisi için ID1-6 toplam iyon kromatogram kıyaslaması .....                                                            | 57 |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 36. İdrar matrisi için ID1-6 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması.....                   | 57 |
| Şekil 37. DBS matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (DE1-6).....                                           | 59 |
| Şekil 38. DBS matrisi için hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması (DE1-6).....                   | 60 |
| Şekil 39. DBS matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (DE6-7).....                                           | 61 |
| Şekil 40. DBS matrisi için DE6-7 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması.....                     | 61 |
| Şekil 41. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinin blank enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları.....                | 62 |
| Şekil 42. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinde her bir hedef analit için kalibrasyon eğrileri ve $R^2$ değerleri ..... | 64 |

## TABLÖLER LİSTESİ

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Optimizasyon analitik koşulları .....                                                       | 28 |
| Tablo 2. Analitik metodun MRM tablosu .....                                                          | 35 |
| Tablo 3. K1a kolonunda deneme mobil faz akış programları .....                                       | 40 |
| Tablo 4. K3 kolonunda deneme mobil faz akış programları .....                                        | 43 |
| Tablo 5. G7 mobil faz akış programı .....                                                            | 46 |
| Tablo 6. G8 mobil faz akış programı .....                                                            | 49 |
| Tablo 7. Analitik metod LC koşulları ve MRM parametreleri .....                                      | 52 |
| Tablo 8. Tam kan matrisinin protein çöktürme reaktifleri .....                                       | 53 |
| Tablo 9. İdrar matrisi için seyreltici reaktifler .....                                              | 56 |
| Tablo 10. DBS matrisi için ekstraksiyon reaktifleri .....                                            | 59 |
| Tablo 11. Analitik metodun MRM tablosu .....                                                         | 63 |
| Tablo 12. Tam kan, idrar ve DBS matrisleri için oluşturulan kalibrasyon değerleri ..                 | 64 |
| Tablo 13. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinde kalite kontrol materyallerinin konsantrasyonları ..... | 65 |
| Tablo 14. Tam kan, idrar ve DBS matrislerine ait validasyon değerleri .....                          | 66 |
| Tablo 15. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinin vial stabilitesi .....                                 | 67 |

## ÖZET

### **Sentetik Kannabinoid AB-PINACA (K3) ve Metabolitlerinin İdrar, Tam Kan ve Kuru Kan Kartı (DBS) Numunelerinden Analizine Yönelik LC-MS/MS Metodunun Geliştirilmesi**

Psikoaktif maddeler, asıl olarak merkezi sinir sisteminde etkisini gösteren ve beyin işlevlerini değiştirerek algıda, davranışta geçici değişikliklere neden olan kimyasal maddelerdir. 2000’li yılların başından itibaren, “yasal kafa yapıcı maddeler”, “tasarım maddeler”, olarak bilinen yeni psikoaktif maddelerin (YPM) ortaya çıkmasıyla kötüye kullanılan madde çeşidi ve kullanım potansiyeli ivmelenerek artmıştır. YPM’ler geleneksel uyuşturucu sınıflarından olmadığı için tespit edilene kadar herhangi bir yasal kısıtlılığı bulunmamaktadır. İki basamaklı analiz prensibine dayalı olan toksikoloji analizlerinden ilk basamakta çoğunlukla immunoassay temelli analiz yöntemi kullanılmaktadır. Ancak immunoassay temelli analiz yöntemleri bilinen maddelerin uyuşturucu analizlerinde öncü pozitif/negatif sonuç verme ötesine geçemediği gibi YPM’lerin analizinde de oldukça kısıtlı alanda kalmaktadır. İkinci basamakta ise enstrümental yöntemlere dayanan, kantitatif olarak, madde varlığının doğrulandığı, miktarının ölçüldüğü doğrulama analizleri uygulanmaktadır. Adli toksikoloji laboratuvarlarında genellikle idrar, tam kan ve doku örnekleri analiz edilmektedir. Alternatif matris olarak karşımıza çıkan kuru kan kartının (DBS) kullanılması, geleneksel "tüp içi" örneklemeye kıyasla sunduğu avantajları nedeniyle, psikoaktif bileşiklerin kantitatif biyoanalizi içinde önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Çalışma kapsamında oluşturulan metodoloji geleneksel matrisler olan idrar ve tam kan numunelerinin yanı sıra alternatif matris olan DBS örneklerinde AB-PINACA (K3) ve metabolitlerini eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayinini gerçekleştirecek kütle dedektörlü sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) temelli metodoloji geliştirilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Adli bilimler, Yeni psikoaktif maddeler, AB-PINACA, LC-MS/MS, Kuru kan kartı.

## ABSTRACT

### **Development of LC-MS/MS Method for Analysis of Synthetic Cannabinoid AB-PINACA (K3) and Its Metabolites from Urine, Whole Blood and Dry Blood Card (DBS) Samples**

Psychoactive substances are chemical compounds that primarily affect the central nervous system, causing temporary changes in perception, behavior by altering the brain's functions. The emergence of new psychoactive substances (NPS) known as "legal highs," "designer drugs," since the early 2000s has accelerated the proliferation and potential for substance abuse. NPS do not fall under traditional drug classifications, and therefore, they do not have any legal restrictions until they are identified. At this point, there is a constantly renewed database, especially in forensic toxicology laboratories. Toxicology analyses, which are based on a two-tiered analysis principle, commonly utilize immunoassay-based methods in the first tier. However, immunoassay-based methods are limited to providing preliminary positive/negative results for known substances in drug analyses and also have limited applicability in the analysis of NPS. The second tier involves quantitative confirmation analyses based on instrumental methods, which confirm the presence and measure the quantity of the substance. Forensic toxicology laboratories generally analyze urine, whole blood, and tissue samples. The use of dried blood spot (DBS) cards as an alternative matrix has gained significant attention in the quantitative bioanalysis of psychoactive compounds due to the advantages it offers compared to traditional "in-tube" sampling. In this study, a mass spectrometry-based liquid chromatography (LC-MS/MS) methodology was developed to simultaneously perform qualitative and quantitative determination of AB-PINACA (K3) and its metabolites in both traditional matrices, such as urine and whole blood samples, and the alternative matrix, DBS samples.

**Keywords:** Forensic science, New psychoactive substances, AB-PINACA, LC-MS/MS, Dried blood spot.

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1 Giriş

Yeni psikoaktif maddeler (YPM), Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Bürosu (UNODC) tarafından “1961 Narkotik İlaçlar Tek Sözleşmesi veya 1971 ile kontrol edilmeyen, saf biçimde veya bir müstahzar halinde kötüye kullanım maddeleri olarak tanımlanmaktadır. UNODC ayrıca “yeni” teriminin mutlaka yeni buluşlara değil, piyasada yakın zamanda bulunabilen maddelere atıfta bulunduğunu belirtmektedir. Terapötik amaçlı geliştirilmiş çok sayıda YPM’nin daha sonra geleneksel yasadışı psikoaktif maddelere yasal alternatifler haline gelmiş olup, öforik etkileri nedeniyle kötüye kullanıldığı ve yoğun şekilde istismar edildiği görülmektedir. Bu çerçevede, toksikoloji laboratuvarları çeşitli biyolojik materyallerde YPM’lerin konsantrasyonunu hassas ve seçici analitik metotlarla tespit etmekle görevlidir (1). YPM’lerin tanımlanmasındaki zorluklarla bağlantılı artan polis nöbetleri, farklı numune substratlarında bilinmeyen bileşikler belirleyebilen hedeflenmemiş analitik yöntemlere ilgi uyandırmıştır. Bu nedenle, YPM’lerin kontrolü ve tanımlanması için zaman açısından etkili metodolojilerin araştırılması, şu anda uyuşturucu kaçakçılığını durdurma ihtiyacının motive ettiği bir çabadır (2). Yapılan bu çalışma ile kan, DBS ve idrar örneklerinden ithal malzeme olan katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşu kullanmaksızın, ulusal mevzuatlardaki molekül yapıları dikkate alınarak belirlenen sentetik kannabinoid olan AB-PINACA ve bu maddenin metabolitlerinin analizi hedeflenmiştir. Bu bağlamda doğrudan ve eş zamanlı analiz gerçekleştirebilen LC-MS/MS temelli güvenilir bir metot geliştirilmiştir.

## 1.2 Amaç

Bilinen ve yasalar tarafından kontrol altına alınmış olan narkotik ve psikotrop maddelerin dışında, bu maddelere benzer etkiler gösteren ancak herhangi bir yasal kısıtlılığı olmayan YPM’lerin görülme sıklığı tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de giderek artmaktadır. Biyolojik matrislerde düşük konsantrasyonlarda olabilecek bu tür bileşiklerin tespiti ve doğru ölçümü büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda

immünolojik testler, hızlı sonuçlanması ve invaziv olmayan numunelendirmeye imkan tanınması nedeniyle ilk tercih edilen analiz tekniğı olmaktadır. Ancak, ticari olarak temin edilebilen immünolojik testler, sınırlı sayıda YPM'nin analizini gerçekleştirirken aynı zamanda duyarlılık yönünden zayıf ve çapraz reaksiyon olasılığının yüksek olması sebebiyle raporların güvenilirliğine gölge düşürmektedir. Bu noktada, oldukça hassas ve spesifik analiz metotlarının geliştirilmesini olanak sunan LC-MS/MS tekniğı esaslı, AB-PINACA ve metabolitlerini kapsayan bir analitik çözüm amaçlanmıştır.



## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Uyuşturucu Nedir?

Madde terimi, çoğunlukla psikoaktif etkilerine bağlı kötüye kullanım veya bağımlılık gibi kullanım bozukluklarına sebep olan moleküller için kullanılmaktadır. Uyuşturucular ve kötüye kullanılan ilaçlar, ürettikleri hoş etkilerin bir sonucu olarak, başka amaçlarla kullanılan maddelerdir. Uyuşturucular, "psikoaktif" maddeler grubunu oluşturmaktadır ki bu maddeler, beyin ve merkezi sinir sistemi üzerinde birincil etkileri vardır. Psikoaktif ilaçlar, insan beyninde doğal olarak oluşan ve nörotransmitterler adı verilen moleküllere kimyasal olarak benzemektedirler. Benzerlik nedeniyle psikoaktif ilaçlar, beyni yabancı maddelerden korumak için var olan kan-beyin bariyerini geçmektedir ve bir kez beyinde serbest kalmayı uyarak, salınımı inhibe ederek, geri alımı bloke ederek veya beynin kendisindeki nörotransmitterleri taklit ederek etkilerini üretmektedir. İlaç üretiminde kullanılan aktif farmasötik bileşenlerin kalitesinin güvence altına alınması için, Avrupa Farmakopesinin analitik gereklilikleri bir kılavuz görevi görür ve bağlayıcı bir karaktere sahiptir (3-7). Uyuşturucu madde Dünya Sağlık Örgütü'nün, 11. revizyonu olan Uluslararası Hastalık Sınıflandırması El Kitabı'nda (ICD-11), vücuda girdiğinde davranışsal, ruhsal ve beden üzerinde değişikliklere sebep olarak, bağımlılık yapan kimyasallar olarak geçmektedir. Bu maddeler tıp kaynaklarında psikoaktif madde olarak geçmektedir (8). Günümüzde yasadışı madde kullanımı, eğlence amaçlı psikoaktif maddeler alan gençleri, içerdiği riskleri algılamadan özellikle etkileyen, eğlence ile bağlantılı bir olgudur. Esrar, kokain ve MDMA/ekstazi bu sırada en çok tüketilen yasa dışı maddelerdir (9).

Son yıllarda esrar, kokain, metamfetamin gibi geleneksel uyuşturucuların yanında, bu uyuşturucu maddeleri taklit eden YPM'lerin ortaya çıkmasıyla birlikte uyuşturucu pazarında muazzam bir değişiklik meydana gelmiştir. "Yasal uyuşturucu maddeler" veya "araştırma kimyasalları" olarak pazarlanan YPM'lerin sayısı hızla artması halk sağlığı için ciddi risk teşkil etmektedir. Yasal bir kısıtlılığın olmaması ve kolay temin edilebilmesi bu maddelerin piyasaya arzını giderek arttırmaktadır (10-

12). Benzodiazepinler, opiatlar, opioidler, esrar, kokain, amfetamin tipi uyarıcılar, sentetik katinonlar, sentetik kannabinoidler, ikame edilmiş fenetilaminler, piperazinler, triptaminler, piperidinler, zolpidem, ketamin ve ilgili maddeler dahil olmak üzere psikoaktif maddeler, dünya çapında sıklıkla kötüye kullanılmaktadır ve ana odak noktası olmaktadır (13,14),

“Tasarım ilaçları” yani YPM terimi ilk olarak, iyi bilinen kötüye kullanılan ilaçların el altından değiştirilmesinden türetilen, yasal kontrolün dışında kalırken farmakolojik etkilerini koruyan veya artıran yeni maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu terim şu anda endüstriyel veya akademik araştırmalardan kaynaklanan ancak asla tıbbi onay almayan maddeleri içerecek şekilde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (15).

YPM’ler, piyasaya sürülmeden önce klinik değerlendirmeye tabi değildir. Yalnızca bir kaza, aşırı doz veya şüpheli ölümle sonuçlanan bir olay meydana geldiğinde bir YPM sınıflandırılabilir ve yasal olarak kontrol edilebilir veya tıbbi kullanımı tanımlanabilmektedir. 2005 gibi erken bir tarihte, Avrupa Birliği üyesi ve aday ülkelerde madde kullanımı ve bağımlılığı hakkında objektif, güvenilir ve karşılaştırılabilir bilgi toplanması, analizi, paylaşımı ve kullanımı amacıyla kurulan; Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA), YPM için Avrupa Birliği Erken Uyarı Sistemini (EWS) geliştirdi. EMCDDA verilerine göre YPM sayıları 2005'ten 2007'ye kadar 35'e, 2014'ten 2016'ya kadar 265'e yükselmiştir (EMCDDA 2017). Ayrıca, Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC), 2009-2016 yılları arasında 109 ülke ve bölgeden kümülatif toplam 739 farklı YPM raporu aldı. YPM’ler “banyo tuzları”, “bitki gıdaları” veya “gübre” gibi isimler altında satılırken, uyuşturucu kullanımı mevzuatını atlatmak için “insan tüketimi için değil” olarak etiketlenmektedir. 2018-2020 yılları arasında, Avrupa'da 730 YPM izlenmiş ve ek olarak 55 YPM ilk kez tespit edilmiştir. Ayrıca EMCDDA, YPM kaçakçılığına ilişkin bilgiler içeren yıllık Avrupa Uyuşturucu Raporunu da sunmaktadır (16-18).

Türkiye’de ise Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) ulusal irtibat noktası olarak faaliyet göstermektedir. EWS kapsamında

Ülkemizde görülen ve görülme riski yüksek olan YPM'ler ile mücadele faaliyetlerini gerçekleştirilmesi için risk değerlendirmeleri yapılarak 2313 sayılı Kanun kapsamına alınma süreci takip edilmektedir. Uyuşturucu kaakılığındaki üç ana rotadan (Kuzey-Güney-Balkan Rotaları) ve son derece önemli bir güzergah olan "Balkan Rotası" zerinde bulunan Türkiye, Asya'da üretilen ve Avrupa'ya transfer edilen başta eroin olmak üzere afyon türevleri kaçakçılığında ve aynı bölgede son yıllarda imalatı ve kaçakçılığı artmaya devam eden metamfetaminde, yanı sıra Avrupa'da üretilen ve Asya'ya sevkiyatı yapılan sentetik uyuşturucu ve bu uyuşturucu maddelerin üretiminde kullanılan kimyasaların kaçakçılığında geçiş ve hedef ülkedir. Balkan rotası eroin dahil diğer opiyatların Avrupa'ya kaçakçılığında on yıllardır en sık kullanılan rotadır. Eroinin AB'ye girişinde Balkan rotasının kilit bir koridor olma özelliğini sürdürdüğü, bu nedenle de Türkiye'nin eroinin AB pazarlarına girişinin önlenmesi iim merkezi bir öneme sahip olduğu 2019 Avrupa Uyuşturucu Pazarları Raporu'nda da belirtilmiştir. Geçmiş yıllarda olduğu gibi halen ülkemiz kolluk birimleri tarafından tüm AB ülkelerinden daha fazla miktarda eroin yakalaması gerçekleştirilmektedir. 2020 yılında AB lkelerinde ele geçirilen eroin miktarı 5.1 ton iken Türk güvenlik gleri tarafından yakalanan eroin miktarı 13.8 tondur. Türkiye 2020 yılında 14 ton eroin ele geçirilmesiyle, dünyada en çok eroin yakalanan üçüncü ülke olmuştur (19).

## **2.2 Adli Toksikoloji**

Toksik ajanların sayısı, başta ilaçlar olmak üzere kötüye kullanılan ilaçlar, bitkiler ve mantarlardan gelen doğal toksinler ile pestisitler ve ev kimyasalları dahil, oldukça fazladır. Adli toksikoloji, tıbbi bir bağlamda biyolojik ve ilgili örneklerde ilaçların ve diğer yabancı bileşiklerin ve bunların metabolitlerinin saptanması, tanımlanması ve ölçülmesiyle ilgilenmektedir. Klinik ve adli toksikolojide, doping kontrolünde, yasaklı maddelerin, zehirlerin ve bunların metabolitlerinin analizlerinin kesin olarak yapılması gerekmektedir. Bu disiplinin doğası ve analitik sonuçların hukuki sonuçları nedeniyle, doğruluk, güvenilirlik ve geçerlilik temel hususlardır. Etkin bir toksikolojik analiz, madde kullanımının teşhisi ve tedavisinde en önemli basamaklardan biridir (20,21).

Adli toksikoloji analiz testleri bağımlılık yapan maddelere göre sınıflandırılmaktadır. Bu testler hem antemortem hem de postmortem evrelerinde, farklı biyolojik örnekler ile çalışılabilmektedir. Toksikolojik analizlerde izole edilen maddelerin nitel (kalitatif) analizleri için genel tarama testleri kullanılmaktadır. Sağlık hizmetleri, işyeri ve ceza gerektiren ortamlarda sıkça kullanılan uyuşturucu testi, son 10 yılda yaygınlaşmıştır (22,23).

Adli nedenlerle uyuşturucu madde testinin amacı, mevcut tüm ilaçların hassas, spesifik ve kesin bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktır. Tanımı gereği, adli testler cezai soruşturma aşamasında kullanılır ve bu nedenle numune bütünlüğü, gözaltı zinciri dokümantasyonu ve yasal testle aynı şekilde bir referans ilaç analizi yöntemi ile uyuşturucu kimlik doğrulaması kriterlerini karşılamalıdır (24). Yasadışı uyuşturucuların alkolle ve bazen de farmasötikler ve kontrol edilmeyen maddelerle kombinasyonunu içeren çoklu uyuşturucu kullanımı, Avrupa'da uyuşturucu kullanımının baskın modeli haline gelmiştir. Uyuşturucu etkisi altında araç kullanma şüphesiyle bırakılan sürücüler üzerinde yapılan çalışmalarda, vakaların% 80'inden fazlasında alkol dışında bir psikoaktif madde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, zehirlenmenin izlenmesi için plazma gibi biyolojik matrislerdeki farklı kötüye kullanım ilaçlarının verimli bir şekilde belirlenmesi için güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç vardır (9).

Bir adli laboratuvar tarafından yapılan analiz sonuçları rapor edildiğinde veya mahkemede sunulduğunda, testin yetkili bir laboratuvar tarafından yapıldığına ve sonuçların doğru ve güvenilir olduğuna dair açık bir beklenti vardır. Bu noktada, mahkemelerin herhangi bir laboratuvarın "doğru cevabı" almaya yetkili olup olmadığını nasıl bilebileceği sorusu önem arz etmeye başlamıştır. Bu bağlamda, herhangi bir laboratuvarın kusursuz performans göstereceğini garanti etmenin bir yolu olmamakla birlikte, idari inceleme ve yerinde denetimin ardından laboratuvarın akreditasyonu, güvenilirliği sağlamak ve uygun standartları belirlemek için önemli bir adımdır. Adli bir toksikoloji laboratuvarının onaylanmış kalite ve yönetim yapılarına uygunluğu şu anda birçok ülkede analitik sonuçlarını ve raporlarını kabul edebilmek için zorunludur. Bireysel vakalarda bulunabilecek temelde sınırsız sayıda uyuşturucu

madde ve ilaç olduğundan, adli toksikoloji, bu maddelerin tespit yöntemlerini tamamlamak, iyileştirmek ve kaliteyi artırma ile yakın ilişkisini göstermek için sürekli çaba sarf edilmesi gereken bilimsel bir disiplindir (25).

Adli toksikolojide, kontrol altındaki maddelere maruz kalmanın doğrulanması, ateşli silah ruhsatları için bilgi sağlanması, çocuk velayeti, ölüm vakaları, zehirlenme vakaları ve uyuşturucu kullanımı/bağımlılığı gibi tıbbi veya yasal soruşturmalarda gerekli analizler gerçekleştirilmektedir. Bu analizler, yanlış bir pozitifin ciddi sonuçlara yol açabileceği güvenlik ve gözetim zinciri, analitik prosedürler, yöntem kalibrasyonu ve doğrulama, raporlar gibi kısıtlı yönergeleri ve laboratuvar prosedürlerini takip etmektedir (26,27).

Adli toksikoloji genel olarak üç ana sektöre ayrılmaktadır:

- İşyerinin gerektirdiği istihdam öncesi uyuşturucu taramaları veya uyuşturucu taramaları ile ilgili işyeri veya istihdam öncesi testler.
- Ölen bireyler üzerinde toksikoloji testi ile ilgilenen ölüm sonrası toksikoloji ve otopsi sürecinin rutin bir parçasıdır. Postmortem soruşturmada asıl amaç ölüm nedenini tespit etmek ve koşullarını açıklığa kavuşturmadır. Ölüm sonrası toksikoloji, sadece ölüm sonrası vücuttaki toksik maddenin varlığını ve miktarını belirlemeyi değil, aynı zamanda kimyasal değişim ve seyreltme dahil vücudun doğal süreçlerinin maddeyi nasıl etkilediğini de içermektedir.
- İnsan performansı veya davranışını değiştiren maddelerin yokluğunu veya varlığını aydınlatmak için insan performans testi veya suçlu toksikoloji kullanılır. Bu, cezai suçların araştırılmasındaki belirleyiciler veya toksikolojik faktörlerle ilgilenmek, alkol veya uyuşturucu etkisi altında araba kullanmak, uyuşturucu kullanırken suç işlemek veya cinsel saldırı gibi bir kişiye karşı işlenen bir suçta bulunmaktır.

Bu nedenle, adli toksikologların çalışması, küçük miktarlarda uyuşturucu madde/ilaçlar ve bunların metabolitlerinin bir matrinden izole edilmesi, saflaştırılması ve miktarının belirlenmesi nedeniyle oldukça karmaşık kabul edilir. Bireysel adli

toksikoloji numuneleri, toplamadan nakliye, analizden ve sonuç raporlamaya kadar tüm adımlar sırasında bozunma, kontaminasyon, taşıma ve/veya hasar olasılığını azaltacak şekilde kullanılmalıdır. Örneklerin toksikoloji laboratuvarına konvansiyonel nakliyesi, manuel teslimatı, postayla gönderileri veya özel bir kurye hizmetini içermektedir ve bu süreçte örneklerin alındığı yerden laboratuvara kadar eşlik edecek bir gözetim zinciri formu tasarlanmalıdır (28).

## 2.3 Sentetik Kannabinoidler

YPM'ler, çok çeşitli farklı ilaç sınıflarını içerir. Sentetik kannabinoidler (SKN) grubu, en büyük ve kimyasal olarak en çeşitli olan gruptur (29). SKN'ler, endokannabinoid sistemi keşfetmek için araştırma araçları ve potansiyel terapötikler olarak geliştirilen heterojen bir bileşik grubudur. İlk SKN'ler, sikloheksilfenoller, 1960'larda kanabinoid reseptörlerini lokalize etmek için  $\Delta^9$  THC'nin kimyasal yapısını modüle ederek sentezlendi ve bu sentezdeki amaç esrarın immünomodülasyon, iştahın düzenlenmesi, bağımlılık konusundaki potansiyel tıbbi faydalarını incelemektir (30). Farmakolojik özellikleri nedeniyle klinik alanda tıbbi potansiyellerini değerlendirmenin yanı sıra kanabinoid etkilerini ayrıntılı bir şekilde artırmak için laboratuvar koşullarında üretilmektedirler. Son yıllarda SKN'ler, bağımlılık yapıcı özelliklerine rağmen hem Türkiye'de hem de dünyada giderek artan bir şekilde kötüye kullanılmaktadır. SKN'ler 2000'li yılların başından itibaren laboratuvarlarda sentezlendikten sonra kurutulmuş bitkiler üzerine püskürtülerek kenevire alternatif olarak satılmaktadır. SKN'ler ülkemizde "Bonzai ve Jamaica", Avrupa'da "Spice" ve ABD'de "K2" olarak bilinmektedir (31).

Kannabinoid reseptörlerinde (CB1 ve CB2) aktivitelerini ve bunların terapötik ajanlar olarak potansiyel kullanımlarını incelemek için orijinal olarak sentezlenen SKN'ler, esrarın ana psikoaktif bileşeni olan  $\Delta^9$  tetrahidrokanabinolün ( $\Delta^9$ -THC, THC) etkilerini taklit etmektedir. Sentetik kannabinoid JWH-018'in floroalkil versiyonu olan AM-2201 incelenmiş ve JWH-018'den daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Bu da flor varlığının bağlanma afinitesi üzerindeki etkisini göstermektedir. CB1 reseptörleri için optimum afinite, R grubu olarak bir n-pentil

grubunun varlığında bulunmuştur. Potens, daha kısa (3 veya daha az karbon uzunluğunda) veya daha uzun (6 veya daha uzun karbonlu) ile azalmıştır. Bu nedenle, piyasadaki SKN'lerin çoğunun, psikoaktif etkilerini en üst düzeye çıkarmak için bir n-pentil veya bir 5-floropentil grubu içermesi şaşırtıcı değildir. Çalışmalar, hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak yararlı olduklarını göstermiştir. Ancak, güçlü CB1 ve CB2 reseptör aktivitesi, esrarın birincil psikoaktif bileşeni olan  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol ile aynı etkilerin çoğunu ortaya çıkardığı için kötüye kullanım potansiyelinin de temelini oluşturmaktadır. Kanabinoid reseptör agonistleri, kimyasal yapılarına göre altı ana gruba ayrılır: sikloheksilfenoller (kannabisikloheksanol ve CP-47.497 gibi), klasik kannabinoidler (HU-210 gibi), naftoilindoller (JWH-018 ve JWH-073 gibi), fenilasetilindoller (JWH-250/JWH-203 gibi), benzilindoller (AM-694/RCS-4 gibi) ve naftoilnaftalenler (CB-13 gibi). Bu sınıflardaki birçok ek analog, kimyasal yapıyı biraz değiştirerek sentezlenebilmektedir. SKN kötüye kullanımı ve artan sayıda acil servis ziyaretleri konusunda artan endişe, dünya çapındaki kolluk kuvvetlerinin bu bileşiklerin birçoğunu yasaklamasına neden olmaktadır.

Temmuz 2012'den sonra UR-144, XLR-11, AKB-48, PB-22, 5F-PB-22, AB-CHMINACA, AB-PINACA ve THJ-2201 geçici olarak dünyada kontrollü madde listesine eklenmiştir. Bu bileşiklerin planlanmasından bu yana, yasa dışı piyasada yapısal olarak farklı yeni SKN grupları görünmeye başladı. Bu kanabinimetik madde türleri, indazol kannabinoidler olarak sınıflandırılır ve FUBINACA, ADBICA, PINACA gibi bileşikler ve bu bileşiklerin çoklu varyasyonlarını içermektedir. Bu SKN'ler, daha önce açıklanan grupların hiçbirine girmemektedir. SKN'lerin planlanmasındaki artışla birlikte, uyuşturucu testi laboratuvarları, ortaya çıkan analitleri dahil etmek için yöntemler geliştirmede proaktif bir yaklaşım benimsemeye başlamıştır. SKN ürünlerinin değişen bileşimi, bu bileşikleri tespit etmekle görevli analitik laboratuvarlar için önemli bir zorluktur. Özellikle idrar örneklerinde SKN testlerine yönelik ek bir zorluk, bu bileşiklerin kapsamlı biyotransformasyonudur. Ana kannabinoid bileşikler genellikle idrar örneklerinde saptanamaz. Maddeler vücuda alındıktan sonra; kimyasal yapısı değişmeden ana molekül veya değiştirildikten sonra metabolit olarak vücuttan atılırlar. Metabolitler, yarı ömürlerinin ana molekülden daha uzun olması, daha geniş saptama penceresine sahip olmasına neden olmaktadır.

Genel olarak, SKN'ler için gözlemlenen iki Faz I metabolik yol vardır. Birincisi, molekülün çeşitli yerlerinde, ancak ağırlıklı olarak alifatik yan zincirler boyunca meydana gelebilen hidroksilasyondur (esas olarak monohidroksilasyon). Bu hidroksilasyonu genellikle karşılık gelen karboksilik aside oksidasyon izlemektedir. İkinci ana metabolik yol, amid veya ester fonksiyonel grupları ile bileşiklerin karboksilik asit metabolitlerine hidrolizidir. Bu bağlamda metabolitleri tespit etme yeteneği, SKN testi için kritik öneme sahiptir (32,33).

#### **2.4 Sentetik Kannabinoidlerin Adli Bilimler Açısından Önemi**

Uyuşturucuların kötüye kullanılması çok sayıda tıbbi, sosyal ve yasal sorunla ilişkilidir. Bu nedenle, "kötüye kullanım ilaçları" testi, adli toksikoloji ve ilgili alanlarda önemli bir görevdir. Genellikle ya bir akut ilaç etkisini doğrulamak (örneğin, uyuşturucu etkisinde araç kullanırken) ya da uyuşturucu yoksunluğunu izlemek (örneğin, işyerinde uyuşturucu testinde) için yapılmaktadır. Son yıllarda, uyuşturucu pazarında yeni bir trend olarak YPM'ler giderek daha önemli hale gelmiştir. Çünkü bu maddeler ne resmi olarak terapötik kullanım için kayıtlı ne de kontrollü maddeler olarak planlanmamıştır. Geleneksel uyuşturucu maddelerle karşılaştırıldığında YPM ucuzdur, elde edilmesi kolaydır ve birçok ülkede regüle olmamasından dolayı özellikle gençler arasında cazip konuma ulaşmıştır. SKN'ler (Ucuz sentetik esrar, birinci sırada) ve sentetik katinon (SKT) lar (Metamfetamin, kokain veya ekstazi'ye (MDMA) yasal alternatifler, ikinci sırada) uyuşturucu pazarındaki en popüler ve en bol bulunan YPM sınıflarını temsil etmektedir (34-36).

YPM'lerin tanınması ve tedavisi, sağlık hizmeti sağlayıcıları için birçok zorluk oluşturmaktadır. Genel toksikoloji bilgisi, akut zehirlenme ve doz aşımını tanımada anahtardır; ancak YPM'ler için toksisitenin teşhis edilmesi zor olabilir çünkü bunların çoğu geleneksel uyuşturucu testi ile tespit edilememektedir. Bu noktada da toksikoloji laboratuvarlarında geniş dedeksiyon yelpazesine sahip güvenilir, seçici analitik metotlara ihtiyaç giderek artmaktadır. Yeni kötüye kullanılan ilaçlarla zehirlenmenin teşhis ve tedavisi zor olsa da, bu hastaların tedavisine diğer toksikoloji vakalarına

benzer şekilde yaklaşılmalıdır. Genel yönetim, değişen mental durum nedeniyle yapılması zor olabilecek ayrıntılı bir öykü ve fiziki muayene ile birlikte destekleyici bakımdan oluşmalıdır. İlk olarak 1967'de üretilen SKN'lerin popülaritesi hızla artarak devam etmektedir. İlk olarak 2000'lerin ortalarında Avrupa'da kötüye kullanılan bir uyuşturucu olarak kullanılan SKN'ler, 2008'de Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmıştır. Sentetik katinonlara benzer şekilde, sıklıkla “insan tüketimi için değildir” ibaresini taşıyan folyo paketlerde tütsü olarak pazarlanır ve solunabilir, yutulabilir ve enjekte edilebilmektedir (37).

2000'lerin başından itibaren dünya gündemini oldukça meşgul eden YPM'lerin küresel düzeyde çeşitliliği ve kullanımında artışlar kaydedilmekte, bu tür uyuşturucuların kaynağı olarak ise Uzak Doğu Asya öne çıkmaktadır. Bu küresel tabloda ülkemiz hiçbir yasa dışı uyuşturucu maddenin ana üretim alanlarından biri olarak gösterilmemesinin yanında, Türkiye'nin Balkan Rotası üzerinde bulunması Asya'da üretilen uyuşturucu maddelerin Avrupa'ya taşınmasında kritik bir öneme sahiptir. Ülkemizde uyuşturucu maddelerin arzı ile mücadelede; Emniyet Genel Müdürlüğü (EGM), Jandarma Genel Komutanlığı (JGK), Sahil Güvenlik Komutanlığı ve Gümrükler Muhafaza Genel Müdürlüğü (GMGM) etkin görev almaktadır. Bu kurumların yanında Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü (TMO), Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü (BÜGEM), Adli Tıp Kurumu (ATK), Mali Suçları Araştırma Kurulu (MASAK) ve Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) gibi kurumlar da uyuşturucu ile mücadelede önemli görevler üstlenmektedir.

2020 yılında olduğu gibi 2021 yılında da pandemiye rağmen gerçekleşen uyuşturucu olaylarında artış eğilimi sürmüştür. Güvenlik güçlerimizce Türkiye genelinde 2020 yılında 159.268, 2021 yılında ise %35,5 artışla 215.771 olaya müdahale edilmiştir. Bu olaylarda bir önceki yıla göre %27,2 artışla 294.604 şüpheli yakalanmıştır. Türkiye'de 2021 yılında 30.063 sentetik kannabinoid olayı gerçekleşmiştir. Bu olaylarda 41.056 şüpheli yakalanmış ve sokaklarda bonzai adıyla bilinen 2.251 kg sentetik kannabinoid ele geçirilmiştir. Bu miktar 2019 yılında 723 kg, 2020 yılında ise 1737 kg'dır. 2021 yılında yakalama miktarlarında bir önceki yıla göre %29,6 oranında artış gerçekleşmiştir. Yakalanan 2.251 kg sentetik kannabinoidin

109,4 kg ham madde olarak yakalanmıştır. 1 kg ham madde ile kullanıma yönelik 330 kg'dan 1 tona kadar ürün elde edilebilmektedir. SKN olay sayılarının suç türlerine göre dağılımı incelendiğinde ise; 2019 yılında %83,1'i TCK191, %16,9'u TCK188, 2020 yılında %80,9'u TCK191, %19,1'i TCK188, 2021 yılında ise %83,4'ü TCK191, %16,6'sının TCK188 suçu olduğu görülmektedir (19).

#### **2.4.1 Adli kontrol ve kısıtlamaları**

Türkiye, küresel uyuşturucu kontrol sisteminin temel sütunları olarak kabul edilen, 1961 Tek Sözleşmesi, 1971 Psikotrop Maddeler Sözleşmesi, 1988 Birleşmiş Milletler (BM) Uyuşturucu ve Psikotrop Maddelerin Kaçakçılığı ile Mücadele Sözleşmesi ve 1961 Tek Sözleşmesini tadil eden 1972 Protokolü olmak üzere uyuşturucu ile mücadele alanında yürürlükte olan uluslararası sözleşmelere taraf bir ülkedir. Ülkemiz bu sözleşmelerden kaynaklanan sorumluluklarını etkin olarak yerine getirmenin ötesinde başta BM olmak üzere diğer uluslararası organizasyonların şemsiyesi altında yürütülen proje ve faaliyetlere de hem donör hem de katılımcı olarak destek vermektedir. Küresel uyuşturucu kontrol sistemi ile uyumlu olarak ülkemizde uyuşturucu ile mücadele alanında hazırlanan yasal düzenlemeler birçok farklı kanunda yer alsa da bu alanda hazırlanmış temel kanuni düzenlemeleri üç ana başlık altında incelemek mümkündür;

- 26 Eylül 2004 tarihli ve 5237 sayılı Türk Ceza Kanunu (TCK),  
TCK Md. 188 uyuşturucu veya uyarıcı madde imal ve ticareti,  
TCK Md. 190 uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanılmasını kolaylaştırmak,  
TCK Md. 191 kullanmak için uyuşturucu veya uyarıcı madde satın almak,  
kabul etmek veya bulundurmak ya da uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanmak,
- 03 Mart 1986 tarihli ve 3298 sayılı Uyuşturucu Maddelerle İlgili Kanun.
- 12 Haziran 1933 tarihli ve 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun.

Bununla birlikte, uyuşturucu suçları için etkin pişmanlık hükümlerine de 5237 sayılı Türk Ceza Kanununun 192. maddesinde yer verilmiştir.

Uyuşturucu ile mücadele kapsamında faaliyet gösteren UNODC, Uluslararası Narkotik Kontrol Kurulu (INCB) ve EMCDDA gibi uluslararası kuruluşlarca yayınlanan rapor ve benzeri dokümanlarda uyuşturucu sorunun küresel ve bölgesel boyutta neden olduğu sorunlar ve tehditler kapsamlı olarak sunulmaktadır.

YPM’ler küresel uyuşturucu pazarlarına daha fazla talep olması için sıklıkla yasal psikoaktif maddeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat etkileri kokain, esrar, eroin, LSD, ekstazi, metamfetamin gibi uluslararası kontrollere tabi geleneksel uyuşturucu ve uyarıcılarla benzerlik göstermektedir. Birçoğu, etken maddeleri de dahil olmak üzere BM 1961 ve 1971 Sözleşmelerinde yer almaması sebebiyle yeni psikoaktif maddeler olarak tanımlanmaktadır. 2021-Aralık’a kadar, son 15 yılda küresel boyutta toplam 1.127 YPM tespit edilmiş, 2021 yılı sonu itibariyle 302 psikoaktif madde yasa kapsamına alınmıştır (UNODC, 2022a, s. 91). Türkiye’nin TUBİM aracılığıyla bir parçası olduğu EMCDDA EWS’nde Avrupa’da 2021 yılı sonu itibariyle takip edilen YPM sayısı 880’dir. Bunlardan 52’si ilk kez 2021 yılında tespit edilmiştir. 2020 yılında Avrupa uyuşturucu pazarlarında 360’ın üzerinde YPM tespit edilmiştir (EMCDDA, 2022, s. 37).

EWS kapsamındaki ilgili kurumlar ülkede yeni bir madde ile karşılaştıklarında bu YPM’ler İçin Rapor Formunu doldurarak TUBİM’e göndermektedir. Maddeler ile ilgili EMCDDA, UNODC ve INCB ile irtibata geçilip madde ve maddenin türevleri hakkında bilgiler toplanmakta ve ilgili toplantılarda hem uluslararası kuruluşlar hem de kurumlarımızca tespit edilen YPM’lerin ülkemiz için oluşturacağı riskler değerlendirilip uygun görülenlerin 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına alınma süreci başlatılmaktadır. 2015 yılında hayata geçirilen Jenerik Sınıflandırma Sistemi ile de YPM’lerin birçoğunun daha ülkemizde görülmeden kanun kapsamına alınması sağlanabilmektedir. Bu yönde, TUBİM Erken Uyarı Sistemi Ulusal Çalışma Grubu 2021 yılında 27’ncisi Haziran ve 28’incisi de Eylül ayında olmak üzere iki toplantı gerçekteştirmiş, bu toplantılar neticesinde; yasa

kapsamına alınmasına karar verilen 43 madde Resmi Gazetede yayınlanarak 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına alınmıştır. Bu aşamada 2008 yılından 31.12.2021 tarihine kadar toplam 971 yeni psikoaktif madde 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına alınmıştır. Bu 971 maddenin 291 tanesini SKN'ler oluşturmaktadır (19).

## **2.5 AB-PINACA (K3)**

SKN'lere bağlı akut zehirlenmelerde, esrara göre yüksek affinitede olmasının yanında, daha çok uyarıcı ve semptomimetik madde kullanımında görülenlere de benzer yan etkiler görülebilmektedir. Bu yan etkiler, sıklıkla terleme, titreme, bulantı, kusma, iştah farklılaşması, hipertansiyon/hipotansiyon, taşikardi, bradikardi, solunum depresyonu, psikomotor ajitasyon, sedasyon gibi belirtilerden oluşmaktadır. Bu etkilerden taşikardi, kusma, ataksi, sedasyon, gibi belirtiler hafif/orta düzeyde sınıflandırılırken; ajitasyon, koma, psikoz, nöbet, bradikardi ve akut böbrek hasarı gibi yan etkiler daha ciddi semptomlar olarak sınıflandırılmıştır. Ancak AB-PINACA özelinde ve SKN'lerin uzun süre kullanımına bağlı semptomlar hakkında, çok sayıda veri bulunmasa da yapılan çalışmalar esrar benzeri psikoaktif etkilerinin yanı sıra, kırmızı konjunktiva, dilatasyon, bozulmuş motor ve kognitif aktivite ve tansiyon artışı gibi, kardiovasküler semptomların görülebileceğini bildirmektedir (38).

Sürekli olarak ortaya çıkan SKN, toksikoloji analizi yapan laboratuvarlar için, mevcut analitik yöntemlerle tespit edilemediğinden büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Bu nedenle, klinik ve adli tıp laboratuvarları sonuç olarak yeni SKN'leri belirlemek için güncellenmiş yöntemlerin geliştirilmesi ve doğrulanmasıyla yükümlü olmaktadır (39).

SKN'lerin ilk ortaya çıkışından bu yana, insan karaciğer mikrozomları, insan hepatositleri ve/veya geleneksel örneklerle yapılan birçok metabolizma çalışması, bunların metabolik yollarını aydınlatmıştır. En popüler yapısal modifikasyon, pentilindol/pentilindazole sentetik kannabinoidlerin 5-pentil pozisyonundaki flor ikamesidir, bu genellikle potensi artırır. Yeni SKN'ler ve bunların 5 floro analogları

arasında JWH-122/MAM2201, AM679/AM694, UR-144/XLR-11, NNEI/5F-NNEI, PB-22/5F-PB-22, APICA/STS135, AKB48/5F-AKB48 ve THJ-018/THJ-2201 yer alır. JWH-018/AM2201, JWH-122/MAM2201, UR-144/ XLR-11, PB-22/5F-PB-22 ve AKB48/5F-AKB48 için, floro olmayan bileşikler genellikle tercihen pentil zinciri, 5-fluoro analoglarının ana metabolitleri ise genellikle 5-hidroksipentil ve pentanoik asit metabolitleridir. Pfizer Inc. tarafından geliştirilen AB-PINACA (N-[(2S)-1-Amino-3-metil-1-oksobutan-2-il]-1-pentil-1H-indazol-3-karboksamid) (patent WO /2009/106980- indazol türevleri) sentetik bir kannabinoid reseptör agonisti olarak, tıbbi ortamların dışında sentetik bir bileşen olarak ve çeşitli marka adları altında satılan bitkisel sigara karışımlarında bulunmuştur. 2013 yılında, 5-floro analogu N-(1-amino-3-metil-1-oksobutan-2-il)-1-(5-floropentil)-1H-indazol-3-karboksamid (5F-AB-PINACA) rapor edildi. AB-PINACA gizlice üretilir ve "araştırma kimyasalı" olarak piyasada yer almaktadır. Saf haliyle, ancak çoğunlukla bir bitki matrisine eklenen sentetik bir bileşen olarak, AB-PINACA genellikle sigara içilerek tüketilmektedir. In vivo çalışmalar, AB-PINACA'nın esrarın doğal bileşeninden 2 ila 14 kat daha güçlü olduğunu göstermiştir. Ayrıca AB-PINACA'nın herhangi bir terapötik kullanımı tanınmadığından, halk sağlığı ve toplum için ciddi bir risk teşkil edmektedir (16,40).

SKN'ler, ksenobiyotiklerdir ve doğal olmayan bileşikleri vücuttan uzaklaştırmak için kapsamlı bir metabolizma ve klirens maruz kalmaktadır. Bağırsak, akciğer, beyin ve böbrek gibi diğer organlar da ilaç biyotransformasyonuna dahil olabilmektedir, ancak özellikle karaciğer SKN metabolizması için en önemli organdır. İlaç metabolizması, detoksifikasyona ve insan vücudundan yabancı bileşiklerin atılmasına yol açabilmektedir. Bazı durumlarda ise biyoaktivasyona yol açarak daha güçlü toksikolojik etkilere neden olmaktadır. SKN'lerin birçok hidroksillenmiş metabolitlerinin, tüketicilere ana SKN'nin kendisinden daha fazla toksisite gösterdiği görülmüştür. SKN metabolit verileri, klinik ve adli tıp laboratuvarlarını tarama yöntemlerine yeni SKN belirteçlerini dahil etme ve biyolojik örneklerde bunların varlığını araştırma ve spesifik SKN alımını doğrulama yetkisi vermektedir. Diğer bir fayda da, uyuşturucu satıcılarının sentez çabalarını en uygun hedef metabolitlere odaklamaya teşvik etmektir. Bu durum da analistlerin bu konudaki öngörülerine yol gösterici olmaktadır (39,41).

## 2.6 Uyuşturucu Tespitinde Kullanılan Analiz Yöntemleri ve Biyomatrisler

Son yıllarda YPM'lerin dünya çapındaki artışı, adli ve klinik laboratuvarlar için büyük problem haline gelmiştir. YPM terminolojisi yeni ilaçların yaratılmasını ima ediyor gibi görünse de, bu maddelerin çoğu iyi bilinen psikoaktif ilaçların moleküler yapılarının değiştirilmesiyle üretilmekte ve ev kokuları, banyo tuzları, tütsü, şifalı bitkiler gibi isimler altında satılmaktadır. 2020 yılı itibariyle esrar dünya çapında en sık kullanılan uyuşturucu haline gelmiştir. Kullanımı, varsayılan bireyin bilişsel ve psikomotor yeteneğinin bozulması ile ilişkilidir. Daha güçlü kanabimimetik etkileri nedeniyle, bu ilaçların alımıyla bağlantılı olarak daha fazla bilişsel ve psikomotor bozukluk, nöbetler, psikoz, doku yaralanması ve ölüm vakaları gözlemlenmiştir. Veriler, bu ilaçların artan kullanımı nedeniyle bazen ölümle sonuçlanan kazaların sayısında artış olduğunu göstermiştir. Bu noktada bu tür psikoaktif maddelerin kullanımının artması göz önüne alındığında, özellikle adli tıp laboratuvarlarının topladığı biyolojik matrisdeki tespit edilecek maddenin kararlılığından emin olmaları kritik bir öneme sahiptir. Tespit edilecek analitin bozulması adli vakalar sırasında en önemli endişe nedenlerinden biridir. Bu bileşikler, aslında, numunedeki kannabinoidlerin nihai bozunmasına veya azalmasına yol açan çok sayıda işleme tabidir. Bu tür işlemler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, eşlenik oluşumu, yüzey kaplarına adsorpsiyon, mikrobiyal etki, termal ayrışma ve numune hazırlık hataları yer almaktadır. Bu nedenle, numune saklama koşulları adli toksikoloji analizi için önemlidir. Yasadışı uyuşturucu kullanımı, HIV enfeksiyonunun en yaygın ikinci yolu olmaya devam etmektedir. Uyuşturucu bağımlılığı, uyuşturucu etkisi altında araç kullanma, hamile kadınların uyuşturucu kullanımı durumunda yenidoğanın uyuşturucuya maruz kalma gibi durumlarda uyuşturucu kullanımının tespiti için çeşitli analitik teknikler ve biyolojik matrisler kullanılmıştır (4,16,42).

Toksikoloji disiplini altında kanun ve adalet için uygulanma alanı bulan adli toksikoloji ilgili kişilerin yasaklı ya da kontrole tabii maddelerin ve bu maddelerin metabolitlerinin biyolojik matrislerde analizi ile madde kullanımının adli olarak değerlendirmesini kapsamaktadır.

Adli toksikolojinin üç ana disiplini;

- Ölüm Soruşturma Toksikolojisi (Postmortem Toksikoloji)
- İnsan Performans/Davranış Toksikolojisi
- Adli Amaçlı Madde Testi: İşyeri madde testi(workplace Drug Testing), Askeriye, Denetimli Serbestlik, Doping Kontrolü, şeklindedir.

Devletin madde ile mücadelede daha etkin önlemler alma kararı ile yaygın, kolay ulaşılabilir, tarama ile doğrulama şeklinde iki basamaklı madde analizleri uygulama gereği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla tıbbi laboratuvarlar (Sağlık Bakanlığı ve Üniversitelere bağlı); mevzuat değişikliği ile madde analizleri yapmaya görevlendirilmiş, madde analizleri hakkında uyulması gereken kalite gereklilikleri yayınlanmış ve madde analizlerinin ücretlendirilmesi (Sağlık Uygulamaları Tebliği-SUT) için gerekli adımlar atılmıştır. Genel olarak, kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilen bağımlılık yapıcı madde gruplarından, kimyasal, alkol, biyolojik, otopside sistematik toksikoloji, özel istekle yapılan, uçucu toksik madde, zehirli metal, hemoglobin ve narkotik analizler başlıca adli analizleridir. Bu analizlerin yöntemleri ise 4 gruba ayrılabilir, bunlar; mikroskopik incelemeler, kimyasal renk analizleri, kromatografik yöntemler ve immünojenik yöntemlerdir. İlaç tanımlama ve/veya miktar tayini için onaylanmış çok çeşitli teknikler vardır. Bu tekniklerin her birinin dikkate alınması gereken çeşitli ilişkili artıları ve eksileri bulunmaktadır (22,43). İki basamaklı uyuşturucu madde kullanım testlerine yönelik yaygın yaklaşım, bir immünoassay taraması ve ardından sonuçların kütle dedeksiyonlu (MS) kromatografik sistem ile doğrulanmasını içermektedir.

- Tarama testleri genellikle doğrulama testlerine kıyasla daha düşük duyarlılığa ve/veya özgüllüğe sahiptir. Tarama test yöntemlerinin birincil faydası, daha hızlı geri dönüş süresidir (hızlı sonuç); bu, madde kullanımı ile davranışı daha anlamlı bir şekilde ilişkilendirebilecek hızlı bir terapötik yanıt sağlamaktadır. Tarama testlerinde en sık kullanılan yöntem olan immünojenik testler, bir numunede spesifik bir ilaç (örn., Metadon), metabolit (örn., 6-MAM) veya bileşikler sınıfı (örn., Morfini saptayan opiatlar) ile bağlanmak üzere

tasarlanmış antikorları kullanmaktadır. İmmünolojik testler, belirli antikorlara ve kullanılan eşik değerlerine (cut-off) bağlı olarak değişen hassasiyet ve özgüllük derecelerine sahiptir. İmmünoassay analizler, hassasiyet ve ilgilenilen bileşiklerin metabolitlerin spesifik olmayan interferansları açısından sakıncaları barındırmaktadır. İmmünolojik testlerle yürütülen tüm ilk testlerin varsayımsal olduğu düşünülmelidir. İmmünolojik test teknikleri yalnızca yararlı ön klinik bilgi sağlamakta, ancak sonuçlar, kromatografi gibi bağımsız bir kimyasal teknikle onaylanana kadar "varsayımsal pozitif/negatif" olarak görülmektedir. Örneğin, yapılan çalışmalar sonucunda Bupropion'un (öncelikle depresif bozuklukları tedavi etmenin yanı sıra sigarayı bırakmayı desteklemek için kullanılan bir ilaç), pozitif metilendioksimethamphetamine (MDMA-ekstazi) test sonuçlarına yol açtığı bilinmektedir (21,44,45).

- Doğrulama testlerinde ise tarama testlerin aksine belirli ilaçları, metabolitlerini ve/veya ilaç miktarlarını tanımlayabilen yüksek hassasiyet ve spesifikliğe sahip bir yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Tarama testleri istenen kalite performansını karşılayamazlar; bu sebeple basamaklı analiz stratejisi uygulanmaktadır. Ceza verme (adli), işten atma (mali) veya toplumda dışlanma (sosyal) gibi sonuçları olabilecek kararlarda test yönteminin analiti daha kesin ve savunulabilir şekilde saptaması gerekmektedir. Bu noktada ikinci basamak olan doğrulama testlerinde enstrümental yöntemlere dayanan, kantitatif olarak, madde varlığının doğrulandığı ve miktarının ölçüldüğü analizler uygulanmaktadır. Florokinolon antibiyotikler, enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve önceki nesil opiat immünolojik testleriyle çapraz reaksiyona girdiği daha önce doğrulanmıştır. Yapılan bir çalışma, levofloksasinin, iki opioid (buprenorfin ve morfin) için modern immünolojik testlerle çapraz reaksiyona girdiğini ve moksifloksasinin ise amfetamin/metamfetamin testiyle çapraz reaksiyona girdiğini göstermektedir.

Terapötik kullanımla uyumlu florokinolonların idrar konsantrasyonları, pozitiflik için yaygın olarak kullanılan eşik değerlerin üzerinde sonuçlar üretmiştir. Bu, öncül pozitif idrar ilaç taramalarının doğrulama testinin gerekliliğinin altını çizmektedir. Bu

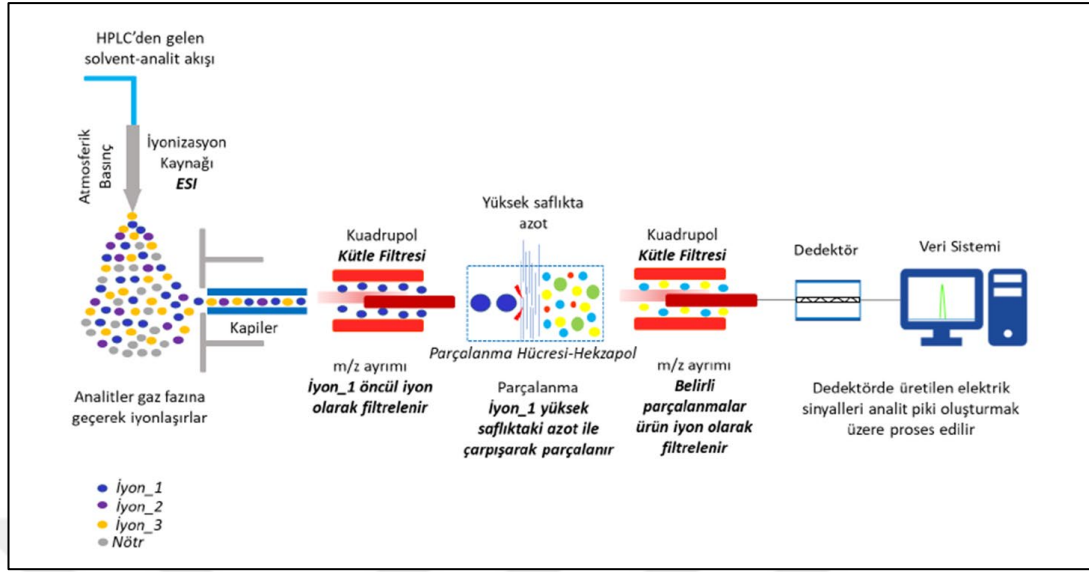
amaçla kullanılan ve günümüzde en çok tercih edilen teknik duyarlılığı ve seçiciliği ile ön plana çıkan ardışık kütle dedektörlü sıvı kromatografi (LC-MS/MS) sistemleri ve ek olarak türevlendirme işlemleri yapılarak kullanılan gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) sistemleridir (46).

## 2.7 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analiz Yöntemi

Kütle spektrometresinin analitik özgülüğü ilgilenilen iyonların kütle-yük oranını ( $m/z$ ) belirleyerek "moleküler ölçek üzerinde tartma" yeteneğine dayanmaktadır. En basit haliyle, MS ilgilenilen analitin bir çeşit moleküler parmak izini sağlamaktadır. MS'yi araştırma laboratuvarından klinik laboratuvara taşıyan önemli itici güç, Nimitz uçak gemisinde meydana gelen kazadır (1981). Kazanın hemen ardından yapılan immünolojik testler, personelden alınan idrar numunelerinin büyük çoğunluğunda marihuana metabolitleri için pozitif olduğunu göstermiştir. Bu vaka, Başkan Reagan'ı ordudaki uyuşturucu kullanımına dair sıfır tolerans politikası geliştirmeye teşvik etmiştir. İmmünolojik testler çok sayıda yanlış pozitif sonuca neden olduğundan sonuçlar GC-MS ile teyit edilene kadar "varsayılan" kabul edilmeye başlanmıştır.

GC-MS'nin birincil sınırlaması, analitlerin uçucu olması zorunluluğudur. Bu nedenle çoğu klinik analizde, analitleri yeterince uçucu hale getirmek üzere bir kimyasal türevlendirme ile birlikte çoklu ekstraksiyon/safılaştırma aşamaları gerektirmesidir. GC-MS analizi için gerekli olan kapsamlı örnek hazırlama şemaları, düşük verim ve yüksek maliyet nedeniyle MS'nin klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımını sınırlandırmıştır. Sonraki yıllarda, MS hızlı teknik gelişim göstererek fizik ve kimya bilimlerinde yaygın olarak kullanılan bir analitik teknik haline geldi (47,48).

LC-MS/MS'nin yüksek duyarlılık ve çoklu analit potansiyeli ile birlikte yüksek özgülük, onu rutin uygulamalar için kullanılan geleneksel yöntemlere karşı güçlü alternatif olarak sunmuştur. Son derece özel bir analitik teknik olan LC-MS/MS (Şekil 1), klinik laboratuvarlarda giderek artan bir şekilde rutin bir teşhis aracı olarak kabul edilmektedir (49).



Şekil 1. LC-MS/MS sisteminin çalışma prensibi

LC-MS/MS sisteminde çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak eş zamanlı çeşitli kütle geçişlerinin kantitatif ölçümü sağlanabilmektedir. Biyolojik materyallerin hedef analit dışındaki bileşenlerinden ve numune hazırlık aşamalarında kullanılan reaktiflerden kaynaklanabilecek matriks etkisi, analite uygun bir iç standart kullanımıyla kompanse edilerek miktarlandırma işleminin doğruluğu kuvvetlendirilmektedir. Adli toksikolojide doğrulama testlerinde kullanılan LC-MS/MS sisteminin immunoassay metotlara göre en önemli avantajları, daha seçici ve spesifik olması, bir analiz süresi içinde görüntüleme, tanımlama, doğrulama ve miktarlandırma yapabilmesi ve kompleks biyolojik sıvılarda çoklu analitlerin ölçümüne olanak sağlamasıdır. GC-MS tekniğine göre avantajları ise; çok daha kısa analiz süresi, basit ve hızlı numune hazırlığı, türevlendirme yapmadan analiz imkanı sunmasının yanı sıra daha yüksek hassasiyet özelliğine sahip olmasıdır. Bir diğer ve önemli avantajı, adli toksikolojide önemli bir nokta olan alternatif biyomatrislere uygulanabilir olmasıdır.

## 2.8 Biyomatrisler

Adli bilimlerde canlı olgularda en sık kullanılan biyolojik materyaller kan ve idrar matrisleri olup, bunlara ek olarak oral sıvı, saç, yeni doğanlar için göbek kordonu, plasenta, mekonyum, tırnak gibi diğer biyolojik numuneleri kapsayan çalışmalar mevcuttur. Postmortem adli toksikolojide alternatif matrisler, özellikle kan, idrar veya saç gibi yaygın matrisler mevcut değilse (örn. Yanma durumunda) veya kontamine (örn. Kanlı saç) daha fazla önem kazanmaktadır. Mide içeriği, kas, vitröz mizah, karaciğer, safra veya beyin dokusu gibi diğer örnekler analiz için kullanılabilir (50).

İdrar biyolojik örnek olarak kolay alınması, yapısının kan gibi karmaşık olmaması, maddenin metabolitlerinin uzun süre saptanmasına fırsat veren geniş bir pencereye sahip olması gibi avantajları nedeniyle adli toksikolojide tercih edilen bir biyolojik materyaldir. İdrar örneğinin alınması aşamasının hileli girişimlere açık olması önemli bir kısıtlılık oluşturmaktadır. Örnek alımı yakın gözetim altında “Emniyet & Gözetim Zincirine” (Chain of Custody) uyularak yapılmalıdır. Emniyet ve gözetim zincirine uyularak yapılsa dahi, olgularda kişinin değişik yollarla aldığı farklı maddelerle idrar kimyasında değişiklikler oluşturarak yapılan hileli girişimlerin saptanmasına yeterli olmamaktadır.

Günümüzde internet sayesinde ulaşımı, satın alması oldukça kolay olan, “Madde testini geçmek içindir” şeklinde pazarlanan ürünlerin satışı giderek artmaya devam etmektedir. Eylül 2002’de, Google’ın “Madde testini geçmek için” ifadesiyle yaptığı arama 158.000 sonuç vermiştir. Mayıs 2005’te aynı arama 1.210.000 sonuca ulaşmıştır. 2018 tarih itibarıyla 43.100.000 arama sonucu elde edilmektedir. İdrar örneklerinde birden fazla benzer madde kullanan bağımlılar için, kullanılan maddelerin tiplerini belirlemek zordur. Bu hedef madde ve metabolitleri için seçimliliği yüksek olan LC-MS/MS tekniği kullanılır. Ancak idrar matrisinin en büyük avantajı, maddelerin atılım yolu olması nedeniyle, özellikle uyuşturucuların metabolitleri açısından görece geniş analit paternine ve daha yüksek analit konsantrasyonuna sahip olmasıdır.

Kanda yapılan toksikolojik analizlerinin ise idrar örneklerine göre en önemli üstünlüğü kişinin madde etkisi altında olduğunu gösterebilen bir biyolojik materyal olmasıdır. Madde konsantrasyonu ile madde maruziyeti arasındaki doğru orantı nedeniyle zehirlenme durumlarında tercih edilmektedir. Böylece, maddenin dozu ve yarılanma ömrü hakkında yaklaşık olarak bilgi edinilebilmektedir. Doz ile etki arasında ilişki bulunduğu için doz belirlendiğinde etkinin de şiddeti tespit edilebilmektedir. Ama uyuşturucu maddeler kısa sürede metabolitlerine dönüşerek vücuttan atıldığı için saptama penceresi kısadır. Bu sebeple, kanda madde analizlerinde şüphelenilen maddenin metabolitlerinden ziyade ana molekülün analizine yoğunlaşılmaktadır. Kan örneklerinin bazı dezavantajları vardır. Bunlar, kan alma işleminin invaziv olması ve bu durumun enfeksiyon, kanama gibi komplikasyonlara yol açmabilmesidir. Ayrıca kan alma eğitimi gerektirmekte ve kısıtlı miktarda temin edilmektedir (51,52).

Alternatif numune tiplerinin alınması hileye karşı uygulanabilecek stratejilerdendir. Daha küçük miktarlarda numune alımıyla birlikte minimal invaziv, kullanışlı ve uygun maliyetli bir teşhis için, potansiyeli genişletme yeteneğine sahip olduğundan mikro-örnekleme diyagnostik alanda önemli bir rol oynamaktadır. Mikro-örnekleme örneği olan DBS tekniği, ilk olarak yenidoğan tarama programlarında kullanılmaya başlanmış bununla birlikte metabolik-endokrin tanı, terapötik ilaç izleme ve toksikolojik, serolojik ve moleküler biyoloji çalışmaları dahil olmak üzere uygulama sayısı her geçen gün artmaktadır. Adli toksikoloji alanında, DBS testi uyuşturucu maddeler, psikoaktif maddeler analizinde de kullanılmaya başlanmıştır. DBS hızlı, basit, ekonomik, minimal invaziv bir şekilde (damar yoluyla elde edilen kan örneklerinin aksine) toplanabildikleri ve hastanın akut durumu hakkında bilgi sağlayabildikleri için (idrar, ağız sıvısı ve saç örneklerinin aksine) klinik ve adli toksikolojide yararlı bir matris olarak görülmektedir. Mikroörnekleme DBS'nin kullanımının öne çıkan faydası, geleneksel analizler için gerekli olan 1 mL kana kıyasla 100 µL'den az olan, numune gereksinimidir. DBS kullanmanın bir başka avantajı, laborantlar için sıvı kan numunelerine göre daha düşük biyolojik tehlike riskidir, bu da HIV/AIDS ve diğer bulaşıcı patojenlerin enfeksiyon riskini en aza indirmesidir. Ayrıca, numunelerdeki uyuşturucu madde stabilitesi, bu maddelerin

ve/veya metabolitlerine ilişkin konsantrasyon değerlerini doğru raporlamada önem arz etmektedir. Bu bağlamda, tam kandaki analitlerin bozunma oranının genellikle DBS'de gözlemlenenden daha yüksek olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır. DBS tipi örneklerde bir grup YPM'nin 90 güne kadar tespit edilebilir olduğu kanıtlanmıştır (53-57).

Adli toksikolojide, suiistimal edilen maddelerin analizinde alınan biyolojik örnek emniyet ve gözetim zinciri izlenerek laboratuvar ortamına getirilmekte ve uygun bir ayırma işleminin ardından duyarlı ve seçici bir yöntemle ölçüme geçilmektedir. Eğer, bir kişi akut zehirlenme belirtileri gösteriyorsa veya l bulunursa, elinde şüpheli bir yasa dışı madde varsa, bu materyalde YPM de dahil olmak üzere herhangi bir uyuşturucuyu tanımlamak, zehirlenmenin nedenini aydınlatmak için bazı ipuçları sağlamaktadır. Öte yandan, bir ülkeye sevk edilen malzemelerde YPM tespit edilirse, bu bilgiler bu maddeler için uluslararası yasa dışı pazarın izlenmesine yardımcı olmaktadır.

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kimyasallar ve Materyaller

Kütle dedeksiyonu (MS/MS) optimizasyon çalışmalarında, Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) firmasından tedarik edilen AB-PINACA, ve metabolitleri olan AB-PINACA N-(4-hidroksipentil), AB-PINACA N-(5-hidroksipentil), AB-PINACA N-pentanoik asit ve AB-PINACA-D9 tekli standartları kullanıldı. Tam kan ve DBS matrisli çalışmalarda TSC Group firmasından temin edilen at kanı; idrar matrisli çalışmalarda ise Mensis firmasından tedarik edilen sentetik idrar kullanıldı.

LC-MS kalite asetonitril, LC-MS kalite metanol, formik asit (%98 saflıkta), trikloroasetik asit (TCA) ve çinko sülfat heptahidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (%99 saflıkta) bileşikleri Merck (Darmstadt, Almanya), amonyum asetat (%98 saflıkta) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından tedarik edildi. HPLC kalite su ise Elga Purelab Classic saf su cihazı kullanılarak hazırlandı.

#### 3.2 Kalibratör, Kalite Kontrol ve İç Standart Hazırlığı

Kalibratörler için 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 6 seviye, iç kalite kontroller (QC-1-2-3) için ise 25, 125 ve 200 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 3 seviye çalışma standartı saf su kullanılarak hazırlandı. Bu çalışma standartları tam kan ve DBS matrisi için at kanı ile; idrar matrisi için sentetik idrar ile 10 kat seyreltilerek 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyon değerlerine sahip matris etkili kalibratörler elde edildi. Aynı işlemler QC'ler üretimi için de uygulanarak sırasıyla, 2,5, 12,5 ve 75 ng/mL konsantrasyonlu QC-1, QC-2 ve QC-3 elde edildi. DBS matrisi için, tam kan matrisli numuneler mikroörnekleme imkanı sunan HemaXis DB10 (DBS System SA, Switzerland) kartlarına emdirilerek hazırlandı. Hazırlanan kalibratörlere ve iç kalite kontrollere metot geliştirme sürecinde belirlenen numune hazırlık prosedürü uygulandı. Kantitasyon işleminde izomerlerin doğru integrasyonu için alıkonma zamanları netleştirildi. Bu amaç için, AB-PINACA N-(4-

hidroksipentil), AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) standartlarına ait bireysel standartlardan enjeksiyonlar verildi. Çalışma kapsamında metanol içerisinde 1000 ng/mL konsantrasyonundaki AB-PINACA-D9 iç standart kullanıldı.

### 3.3 LC-MS/MS Analiz Metodu

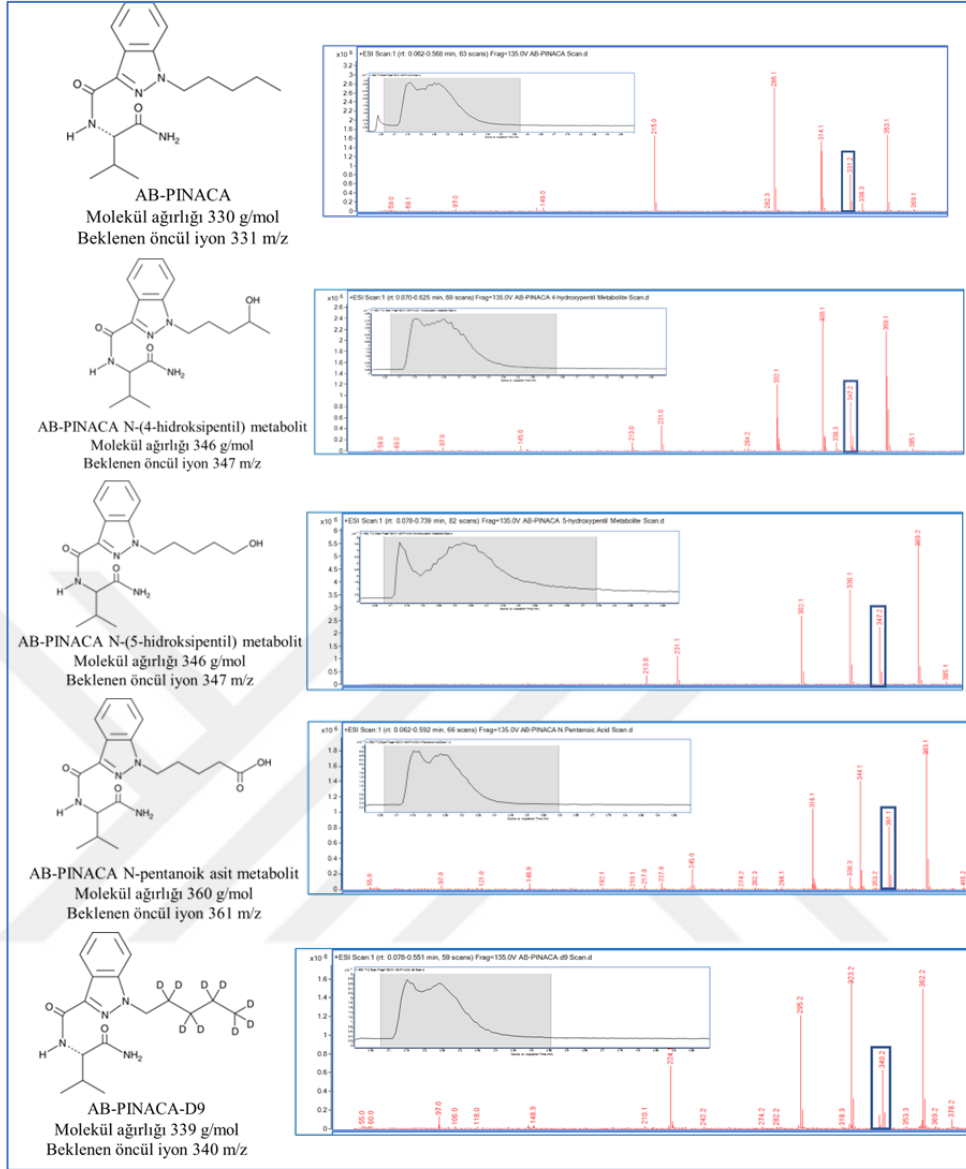
Analiz metodu geliştirme süreci Agilent Technologies (Santa Clara, CA, A.B.D) marka 1290 High Speed Pump (G7120A), 1260 Vial Sampler (G7129A) ve 1260 MCT Infinity II (G7116A) modüllerine sahip HPLC sisteminde ve bu sisteme bağlı elektrosprey iyon kaynaklı Ultivo Triple Quadrupole LC/MS (G6465 LC/TQ) enstrümanında optimizasyon kılavuzuna (58) göre yürütüldü. AB-PINACA, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil), AB-PINACA N-(5-hidroksipentil), AB-PINACA N-pentanoik asit ve AB-PINACA-d<sub>9</sub> bileşiklerinin MS/MS optimizasyon parametreleri doğrudan kütle spektrometresine infüzyon yoluyla tayin edilmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak, saf standartların ve iç standartın uygun çözücüyle çözelti haline getirildi. Optimizasyon için ilgili standartlar metanol içerisinde çözüldükten sonra, 10 µg/mL konsantrasyonlarındaki bireysel standartlar yine metanol kullanılarak hazırlandı. Bireysel solüsyonlar, direkt kütle dedektörüne infüze edilerek (FIA tekniği) MS/MS optimizasyonu aşamasına geçildi. Elektrosprey iyon kaynağı (ESI) yerleşik Agilent Ultivo sisteminde yürütülmeye başlanan bu aşamada sırasıyla; iyonlaşma polaritesi, öncül iyon (precursor/parent ion), fragmentor voltajı (FV), ürün iyonlar (product/daughter ions) ve parçalanma voltajları (CE) her bileşik için belirlendi.

Optimizasyon aşamasında aşağıdaki (Tablo 1) analitik koşullar referans alınmıştır (59,60);

Tablo 1. Optimizasyon analitik koşulları

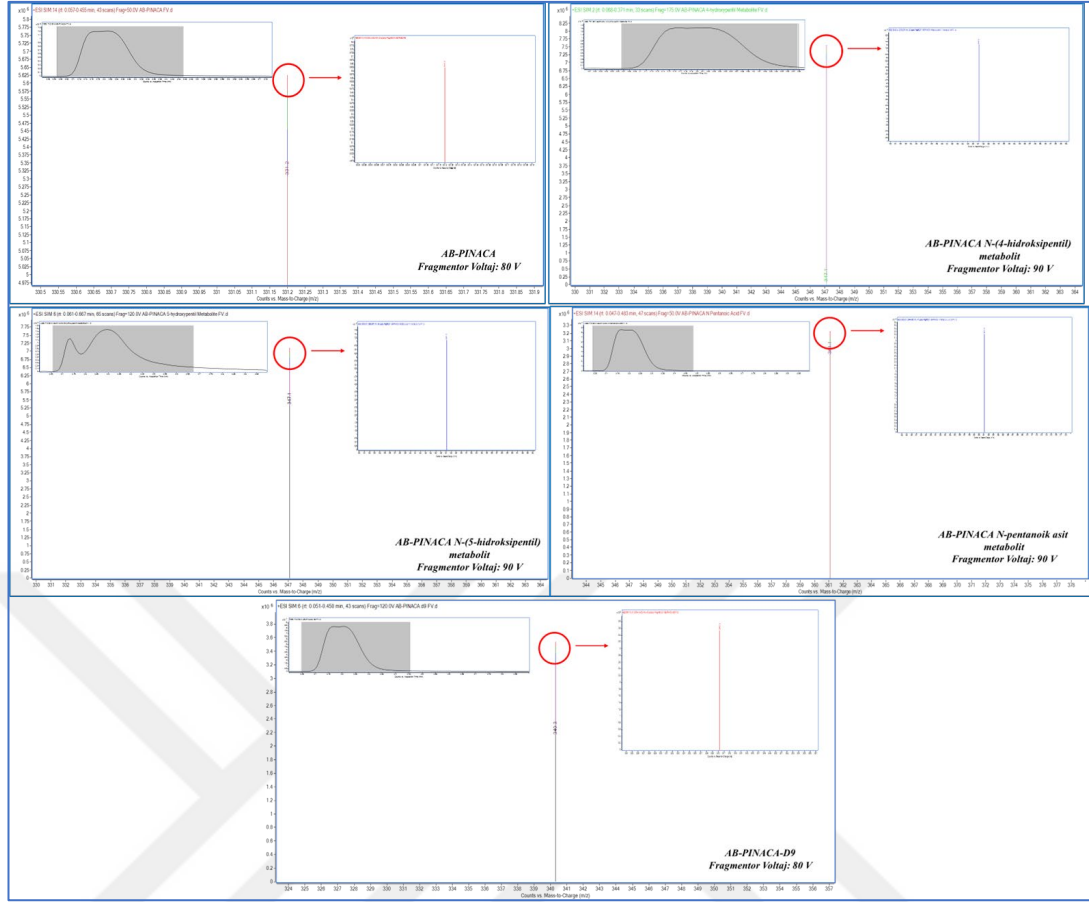
|                                   |                                  |            |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------|
| <b>Mobil Faz A</b>                | %0.1 formik asit, Su:MeOH (95:5) |            |
| <b>Mobil Faz B</b>                | %0.1 formik asit MeOH:Su (95:5)  |            |
| <b>Kolon Sıcaklığı</b>            | 20 °C                            |            |
| <b>Enjeksiyon Hacmi</b>           | 10 µL                            |            |
| <b>İyon Kaynağı Parametreleri</b> | <i>Gaz Sıcaklığı</i>             | 350 °C     |
|                                   | <i>Gaz Akış Hızı</i>             | 10 ml/dk   |
|                                   | <i>Kılıf Gaz Sıcaklığı</i>       | 400 °C     |
|                                   | <i>Kılıf Gaz Akış Hızı</i>       | 11 ml/dk   |
|                                   | <i>Nebulizer</i>                 | 55 psi     |
|                                   | <i>Kapiler Voltaj</i>            | 5000 V (+) |
|                                   | <i>Nozzle Voltaj</i>             | 1000 V (+) |

MS/MS optimizasyon çalışmasının birinci aşaması iyonlaşma polaritesidir. Çalışma kapmasındaki tüm bileşiklerin kimyasal yapısı ve literatür incelendiğinde, beklendiği üzere pozitif bir iyonlaşma (proton bağlama) gözlemlendi. İkinci aşamada öncül iyon tespitleri yapıldı.



Şekil 2. Hedef analitlerin öncül iyon optimizasyonu

Öncül iyon belirlenmesinde beklenildiği ve ilgili spekturumlar incelenmesi üzerine, AB-PINACA 331.2 m/z, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) metaboliti ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) metaboliti 347.1 m/z, AB-PINACA N-pentanoik asit metaboliti 361.1 m/z ve AB-PINACA-D9 340.3 m/z öncül iyonları kaydedildi. Öncül iyon belirlenmesinin akabinde üçüncü aşamada her bir maddenin öncül iyonlarına farklı voltajların uygulanmasıyla, azami sayıda öncül iyonunun parçalanma hücresine (collision cell) geçişi için gerekli optimum voltajları (Fragmentor voltaj (FV)) tespit edildi.



Şekil 3. Hedef analitlerin fragmentor voltaj optimizasyonu

FV değerinin belirlenmesinde, cihaz SIM (selected ion monitoring) modunda çalıştırılarak çoklu sayıda (50-200 V aralığında) voltaj değeri (spektrumda farklı renklerle temsil edilen) eş zamanlı incelendi. En yüksek sinyalin alındığı voltaj değeri her bir bileşik için FV değeri olarak atandı. FV değeri AB-PINACA ve AB-PINACA-D9 için 80 V, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil), AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-pentanoik asit metabolitleri için 90 V olarak belirlendi.

MS/MS optimizasyon çalışmasının dördüncü aşamasında pozitif polaritede ilgili bileşiğin öncül iyonuna belirlenen optimum FV uygulanarak parçalanma hücreesine yönlendirildi ve ürün iyonları adayları tespit edildi. Bu adaylar arasında, moleküler yapısına uygun ve literatür verileriyle örtüşen iyon geçişleri, ürün iyonlar olarak belirlendi. Bu aşamada birbirlerinin izomerleri olan AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) metabolitleri için spesifik

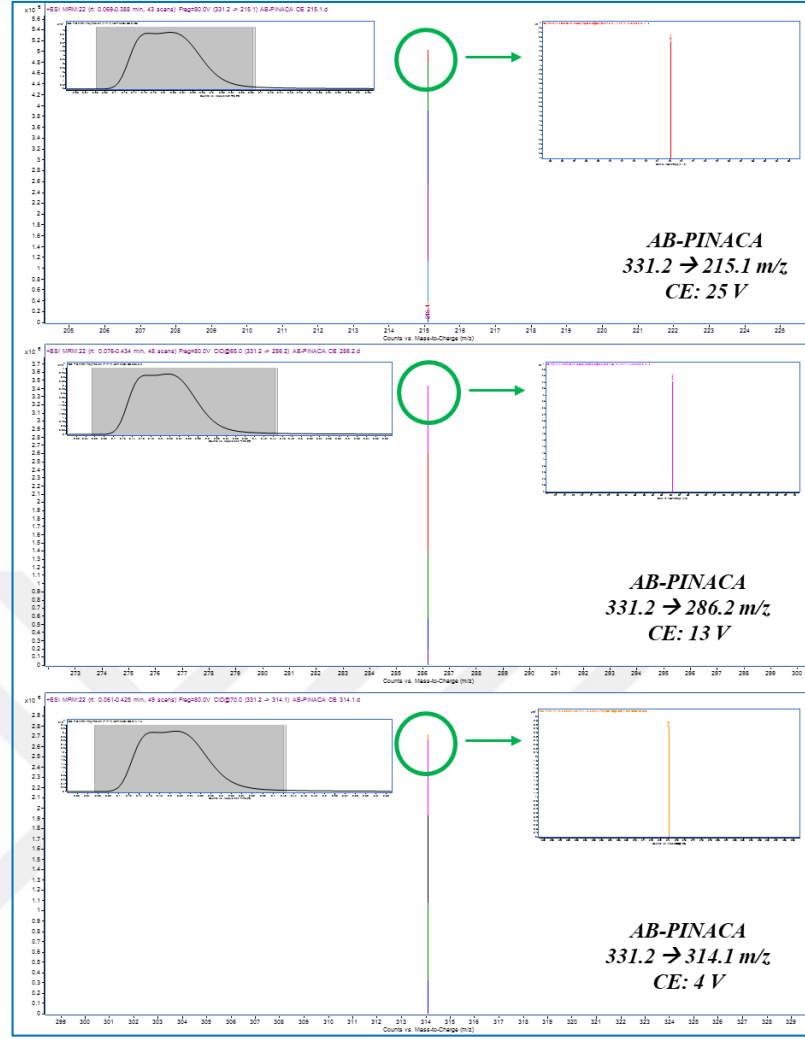
parçalanma ürün iyonları tespit edildi. Bu adım çalışmanın kantitasyon kısmında önemli bir nokta oldu.



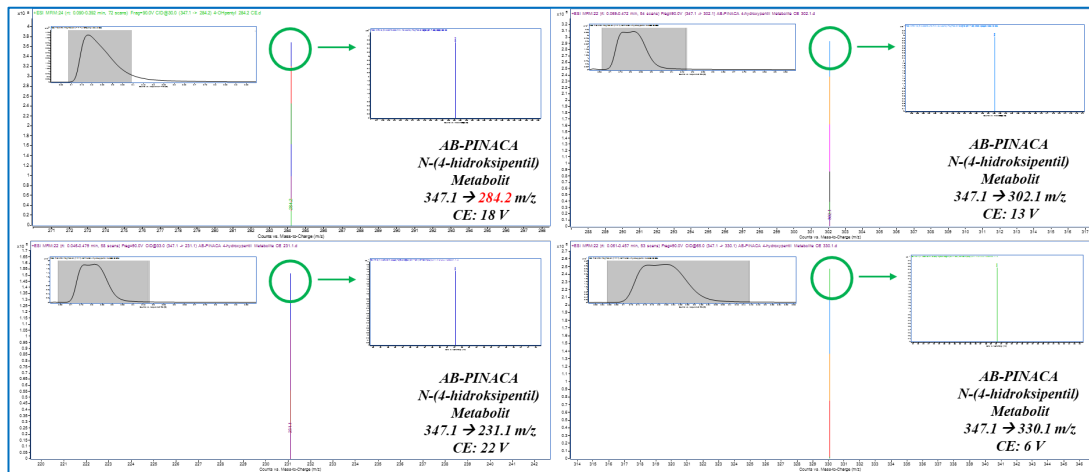
Şekil 4. Hedef analitlerin ürün iyon optimizasyonu

Yapılan bu çalışmanın neticesinde, AB-PINACA için 331.2 → 215.1 m/z, 331.2 → 286.1 ve 331.2 → 314.2; AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) için 347.1 → 284.2 m/z, 347.1 → 230.1 m/z, 347.1 → 302.1 m/z ve 347.1 → 330.2 m/z; AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) için 347.1 → 229.9 m/z, 347.1 → 230.1 m/z, 347.1 → 302.1 m/z ve 347.1 → 330.2 m/z; AB-PINACA N-pentanoik asit için 361.1 → 298.1 m/z, 361.1 → 316.1 m/z ve 361.1 → 344.1 m/z ve AB-PINACA-D9 için ise 340.3 → 224.2 m/z, 340.3 → 295.2 m/z ve 340.3 → 323.2 m/z kütle geçişleri ürün iyonlar olarak atandı.

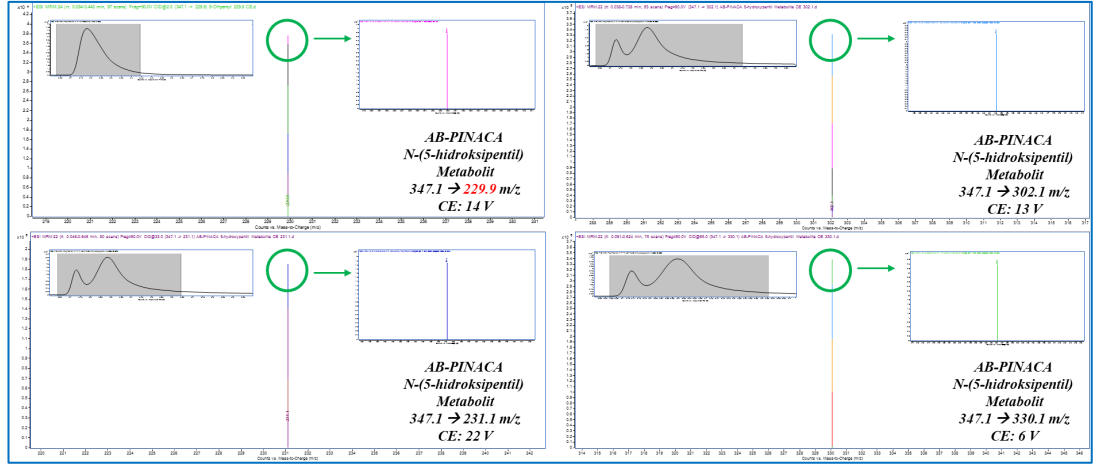
Optimizasyonun beşinci aşamasında ise her bir analitiğin belirlenen her bir ürün iyonuna ait optimum parçalanma voltajını belirlemek üzere çoklu (0-70 V aralığında) voltaj değerleri uygulandı.



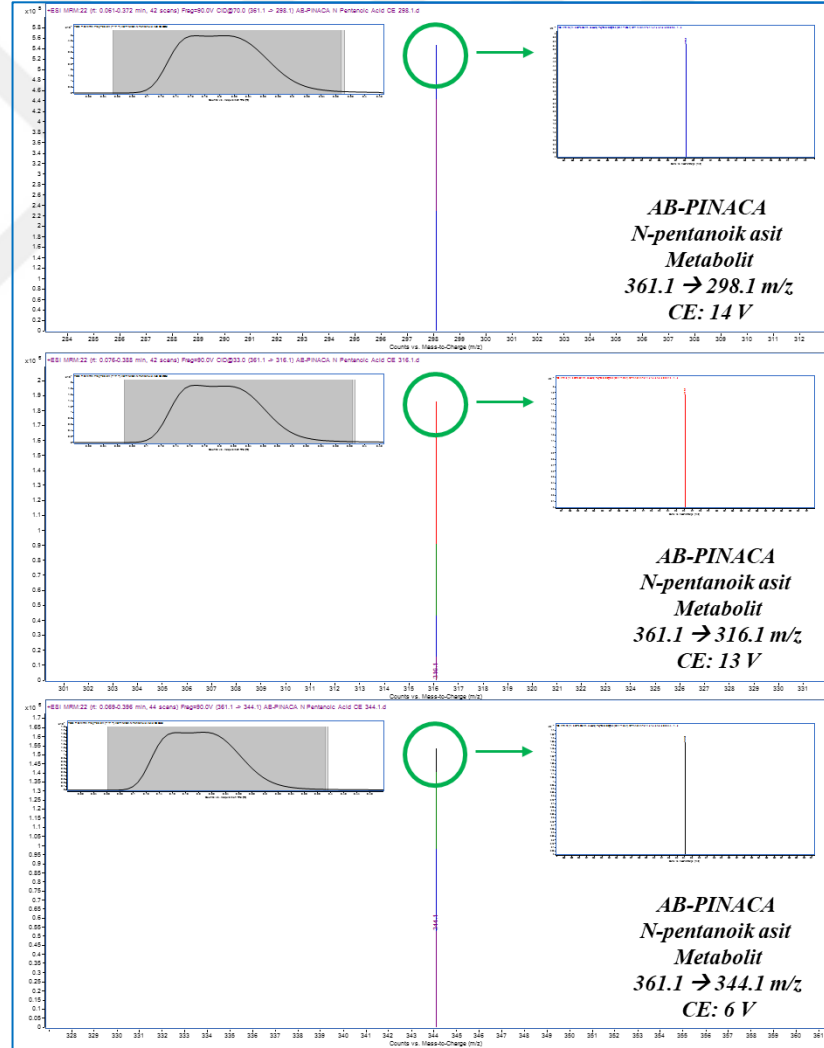
Şekil 5. AB-PINACA ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu



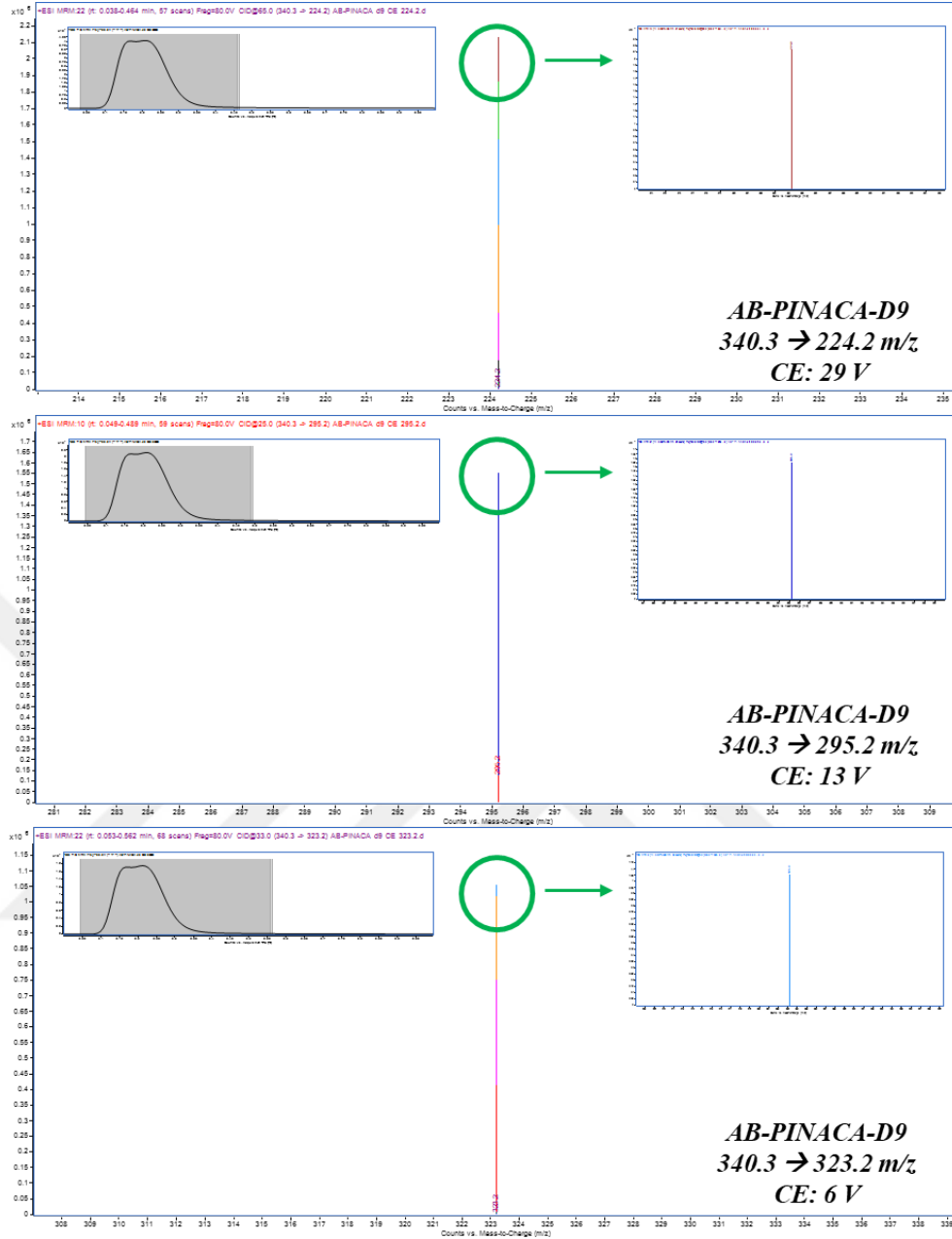
Şekil 6. AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu



Şekil 7. AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu



Şekil 8. AB-PINACA N-pentanoik asit ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu



Şekil 9. AB-PINACA-D9 ürün iyonlarının parçalanma voltajlarının optimizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışması tamamlandığında analitik metodun, her bir bileşiğin öncül iyonlarının ve bu öncül iyonların en yüksek düzeyde parçalanma hücreğine geçişi için gerekli optimum parçalanmasını sağlayan FV değerlerinin, ürün iyonlarının ve her bir ürün iyonunun parçalanması için gerekli olan CE değerlerinin MRM tablosu (Tablo 2) oluşturuldu.

Tablo 2. Analitik metodun MRM tablosu

| <i>Analit</i>                       | <i>Öncül İyon<br/>(m/z)</i> | <i>Ürün İyon<br/>(m/z)</i> | <i>FV<sup>1</sup><br/>(V)</i> | <i>CE<sup>2</sup><br/>(V)</i> | <i>Polarite</i> |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| AB-PINACA                           | 331.2                       | 215.1                      | 80                            | 25                            | Pozitif         |
| AB-PINACA                           | 331.2                       | 314.1                      | 80                            | 4                             | Pozitif         |
| AB-PINACA                           | 331.2                       | 286.2                      | 80                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil)      | 347.1                       | 284.2                      | 90                            | 18                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil)      | 347.1                       | 231.1                      | 90                            | 22                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil)      | 347.1                       | 302.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil)      | 347.1                       | 330.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil)      | 347.1                       | 229.9                      | 90                            | 14                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil)      | 347.1                       | 231.1                      | 90                            | 22                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil)      | 347.1                       | 302.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil)      | 347.1                       | 330.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| AB-PINACA N-pentanoik asit          | 361.1                       | 316.1                      | 90                            | 14                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-pentanoik asit          | 361.1                       | 298.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-pentanoik asit          | 361.1                       | 344.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)          | 340.3                       | 224.2                      | 80                            | 29                            | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)          | 340.3                       | 295.2                      | 80                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)          | 340.3                       | 323.2                      | 80                            | 6                             | Pozitif         |
| <sup>1</sup> FV: Fragmentor Voltajı |                             |                            |                               |                               |                 |
| <sup>2</sup> CE: Parçalanma Voltajı |                             |                            |                               |                               |                 |

### 3.4 Analitik Kolon, Hareketli Faz Kompozisyon ve Akış Denemeleri

İlk kromatografik çalışmalarda literatür ve bileşiklerin polar yapıları gön önüne alındığında 2 ayrı grup kolon tipiyle denemelere başlandı. Deneme başlangıç noktası için hareketli fazlar ve MS/MS parametreleri optimizasyonun yapıldığı koşullarda sabit tutuldu ve tüm denemeler metanol içerisinde 50 ng/mL konsantrasyonlu dörtlü standart (AB-PINACA, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil), AB-PINACA N-(5-hidroksipentil), AB-PINACA N-pentanoik asit) ve 25 ng/mL konsantrasyonda AB-PINACA-D9 karışımı ile yapıldı. İlk deneme grubu için Zorbax SB-C18 türünde 4 analitik kolon (K1a-d) kullanıldı.

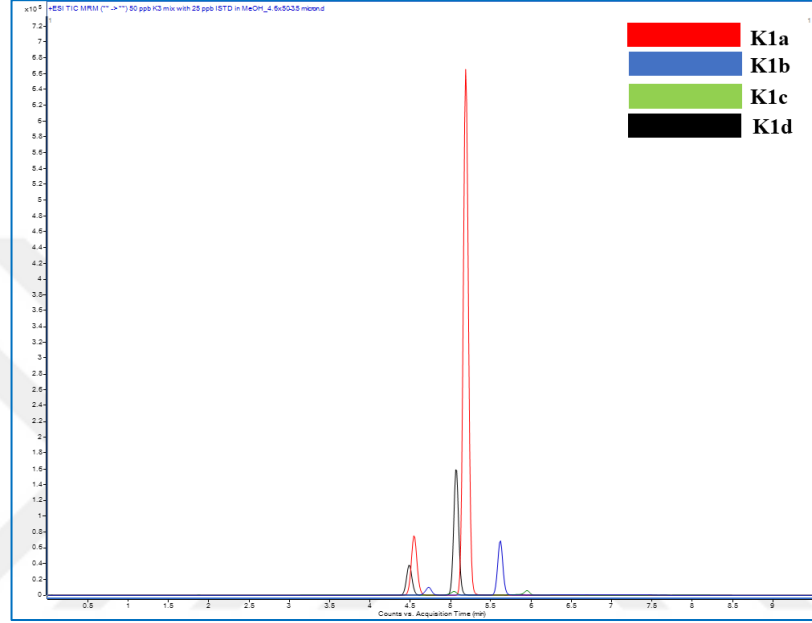
**K1a:** Agilent Zorbax SB C-18 3.0x30 mm 1.8 micron (PN 824975-302)

**K1b:** Agilent Zorbax SB C-18 4.6x50 mm 3.5 micron (PN 835975-902)

**K1c:** Agilent Zorbax SB C-18 4.6x100 mm 3.5 micron (PN 861953-902)

**K1d:** Agilent Zorbax SB C-18 2.1x50 mm 1.8 micron (PN 822700-902)

K1a-d kolon grubu ile yapılan enjeksiyonların toplam iyon ve ekstrakte edilmiş kromatogramlar incelendiğinde, en yüksek alanda toplam iyon kromatogramı elde edilen analitik kolon K1a oldu.



Şekil 10. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K1a-d)

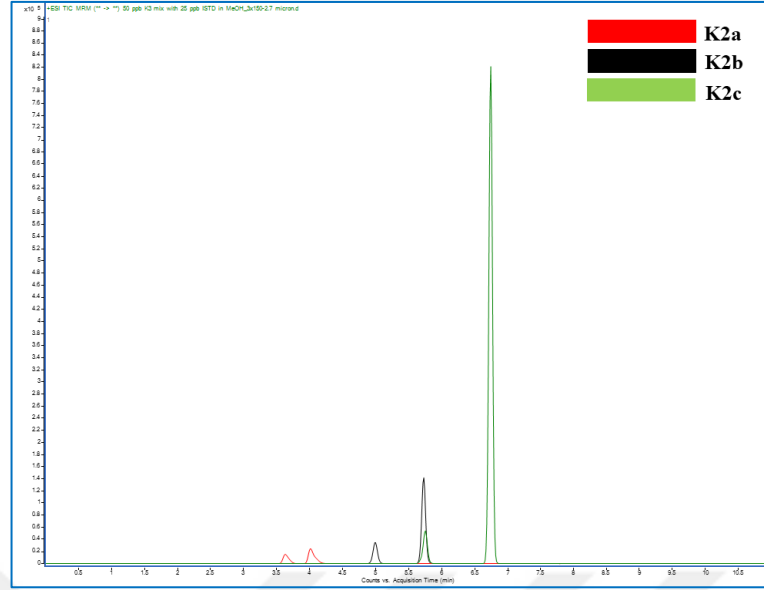
İkinci deneme grubu için InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 türünde 3 analitik kolon (K2a-c) kullanıldı.

**K2a:** Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2.1x50 mm 2.7 micron (PN 699775-902)

**K2b:** Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2.1x100 mm 2.7 micron (PN 695775-902)

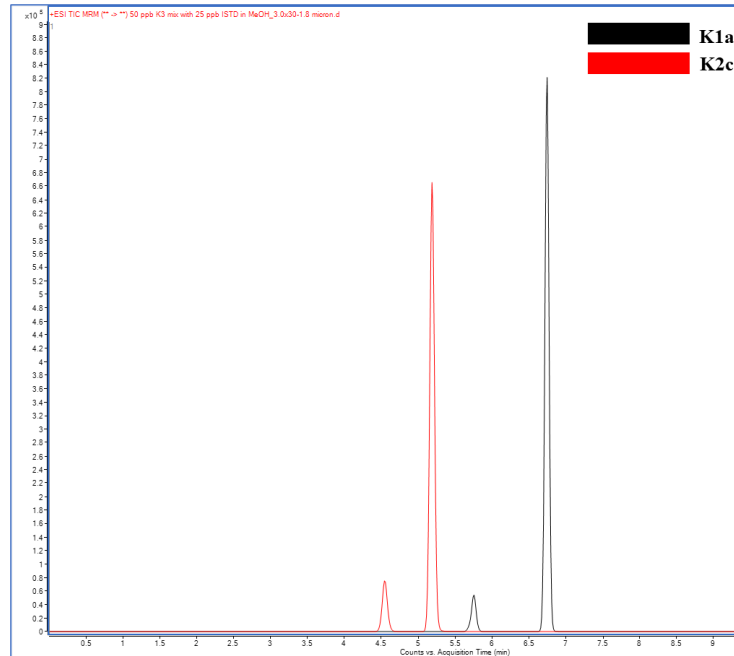
**K2c:** Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 3.0x150 mm 2.7 micron (PN 693975-302)

K2a-c kolon grubu ile yapılan enjeksiyonların toplam iyon ve ekstrakte edilmiş kromatogramlar incelendiğinde, en yüksek alanda toplam iyon kromatogramı elde edilen analitik kolon K2c oldu.



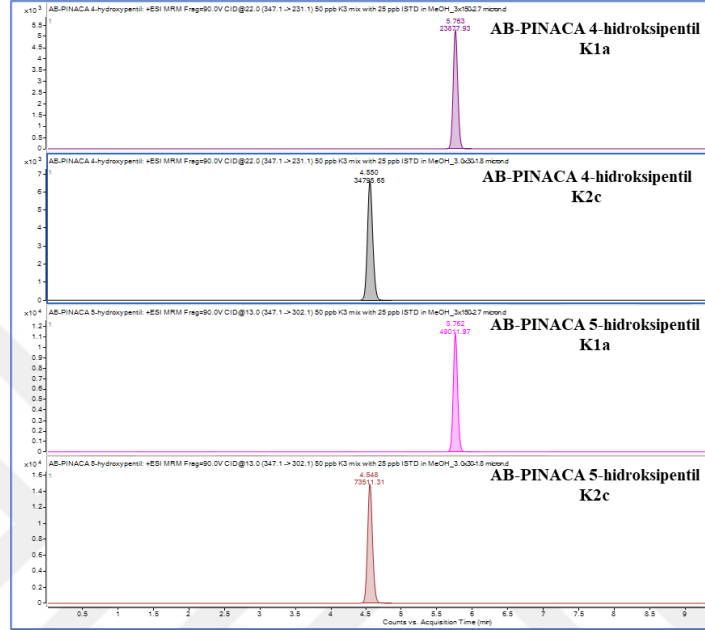
Şekil 11. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K2a-c)

Her iki analitik kolon grubunda en iyi total iyon kromatogramı elde edilen enjeksiyonların toplam iyon ve ekstrakte edilmiş kromatogramlar incelendiğinde, en yüksek alanda toplam iyon kromatogramı elde edilen analitik kolon K1a oldu.



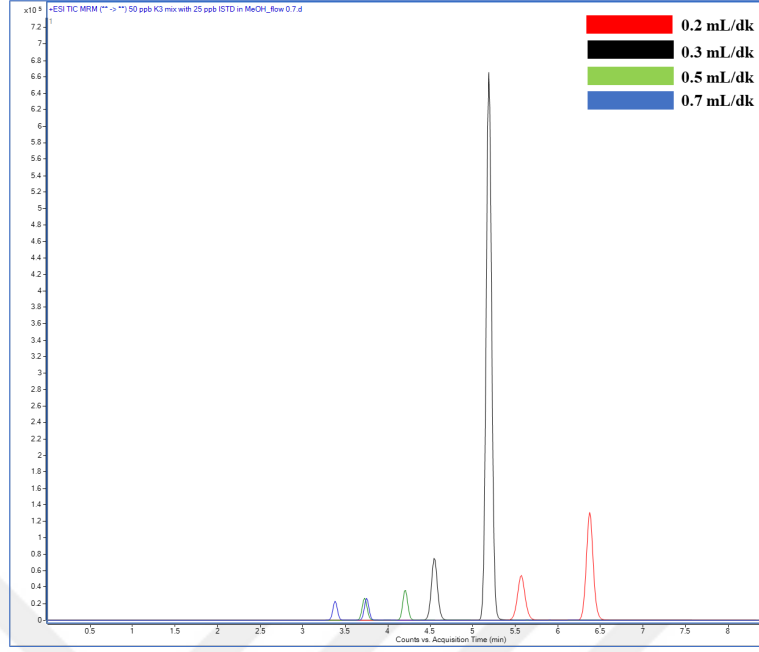
Şekil 12. 50 ng/mL standart enjeksiyonuna ait toplam iyon kromatogram kıyaslaması (K1a ve K2c)

Her iki kolon grubunda en yüksek performansı gösteren iki kolon türünün toplam iyon kromatogramları ekstrakte edildiğinde heriki türde de birbirinin izomeri olan AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N(5-hidroksipentil) metabolitlerinin kromatografik ayrımının gerçekleşmediği gözlemlendi (Şekil 13).



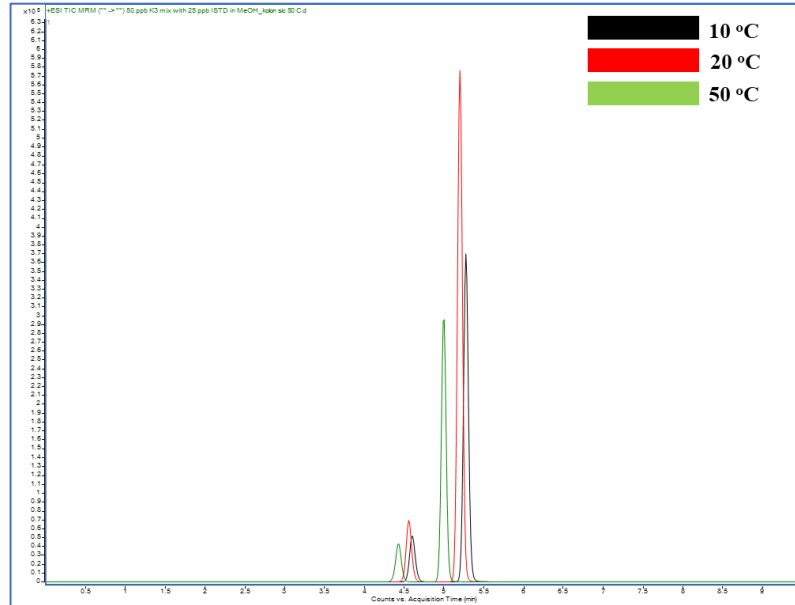
Şekil 13. K1a ve K2c kolonlarında izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı

Çalışmanın bu noktasında daha yüksek performans gösteren K1a ile çalışmalara devam edilmeye karar verildi. Bu aşamada ise izomerlerin kromatografik ayrımı üzerinde bir seri çalışma yapıldı. Bu çalışmalar için ilk adımda K1a ile mevcut koşullardan hareketli fazın analitik metot boyunca akış miktarı değiştirilerek mevcut koşul da dahil olmak üzere toplamda dört farklı (0.2, 0.3, 0.5 ve 0.7 mL) deneme yapıldı. Denemeler sonunda enjeksiyonların toplam iyon ve ekstrakte edilmiş iyon kromatogramların alanları incelendiğinde, en yüksek alanda toplam iyon kromatogramı elde edilen akış 0.3 mL/dk oldu. Ancak izomerlerin ayrımı hala gerçekleşmedi.



Şekil 14. K1a kolonunda 4 farklı mobil faz akış hızı enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları kıyaslaması

İzomerlerin ayrımını gözlemlemek için kolon sıcaklığının optimizasyonu adına üç farklı sıcaklıkta (10, 20 ve 50 °C) bir seri enjeksiyon verildi. Verilen enjeksiyonların incelenmesi ile alan kapsamında en iyi sonuç 20 °C de alındı. Fakat izomerlerin kromatografik ayrımı hala gözlemlenemedi.

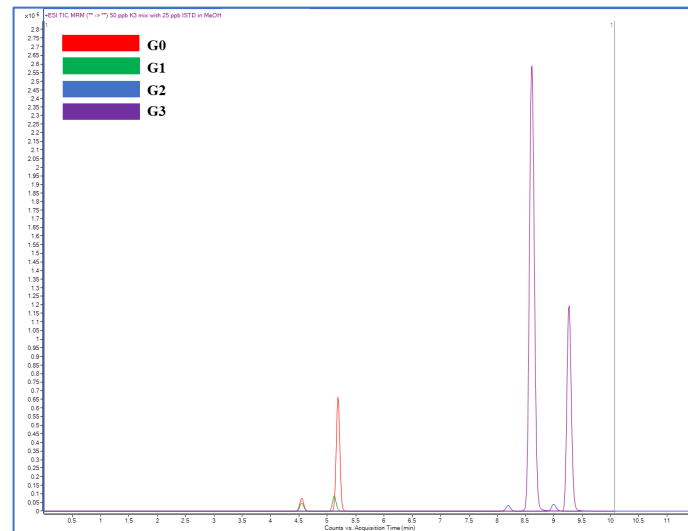


Şekil 15. K1a kolonunda 3 farklı kolon sıcaklığı enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları kıyaslaması

Kolon sıcaklığı denemelerinin akabinde ayırımın gözlemlenebilmesi için 0.3 mL/dk akış hızı sabit tutularak mobil faz akış programı denemeleri yapıldı (G0-3). (Tablo 3). Total iyon kromatogramları incelendiğinde G3 programı oldukça yüksek alan verdi (Şekil 16).

Tablo 3. K1a kolonunda deneme mobil faz akış programları

| <i>G0 programı</i> |                        |                        | <i>G1 programı</i> |                        |                        |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Süre (dk)</i>   | <i>Mobil Faz A (%)</i> | <i>Mobil Faz B (%)</i> | <i>Süre (dk)</i>   | <i>Mobil Faz A (%)</i> | <i>Mobil Faz B (%)</i> |
| 0.0                | 100                    | 0                      | 0.0                | 100                    | 0                      |
| 1.0                | 100                    | 0                      | 1.0                | 100                    | 0                      |
| 1.1                | 70                     | 30                     | 1.1                | 70                     | 30                     |
| 2.5                | 50                     | 50                     | 2.5                | 50                     | 50                     |
| 2.6                | 20                     | 80                     | 2.6                | 20                     | 80                     |
| 5.0                | 0                      | 100                    | 3.5                | 10                     | 90                     |
| 6.0                | 0                      | 100                    | 3.6                | 5                      | 95                     |
| 6.1                | 100                    | 0                      | 5.0                | 0                      | 100                    |
|                    |                        |                        | 6.0                | 0                      | 100                    |
|                    |                        |                        | 6.1                | 100                    | 0                      |
| <i>G2 programı</i> |                        |                        | <i>G3 programı</i> |                        |                        |
| <i>Süre (dk)</i>   | <i>Mobil Faz A (%)</i> | <i>Mobil Faz B (%)</i> | <i>Süre (dk)</i>   | <i>Mobil Faz A (%)</i> | <i>Mobil Faz B (%)</i> |
| 0.0                | 98                     | 2                      | 0.0                | 100                    | 0                      |
| 1.0                | 98                     | 2                      | 2.0                | 100                    | 0                      |
| 3.0                | 88                     | 12                     | 3.0                | 94                     | 6                      |
| 6.0                | 42                     | 58                     | 4.0                | 88                     | 12                     |
| 7.5                | 2                      | 98                     | 5.0                | 76                     | 24                     |
| 7.6                | 98                     | 2                      | 6.0                | 52                     | 48                     |
|                    |                        |                        | 7.0                | 20                     | 80                     |
|                    |                        |                        | 8.0                | 0                      | 100                    |
|                    |                        |                        | 8.1                | 100                    | 0                      |



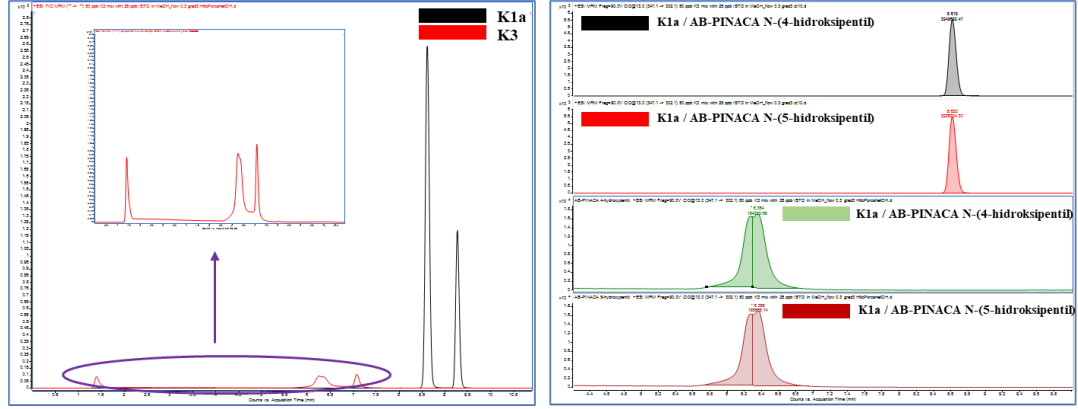
Şekil 16. K1a kolonunda toplam iyon kromatogramı kıyaslaması (G0-6)

İlk gradient denemelerinde analitlerin alanlarında yükselme gözlemlense de A B-PINACA N(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N(5-hidroksipentil) metabolitlerinin kromatografik ayırımına ulaşılamadı (Şekil 17).



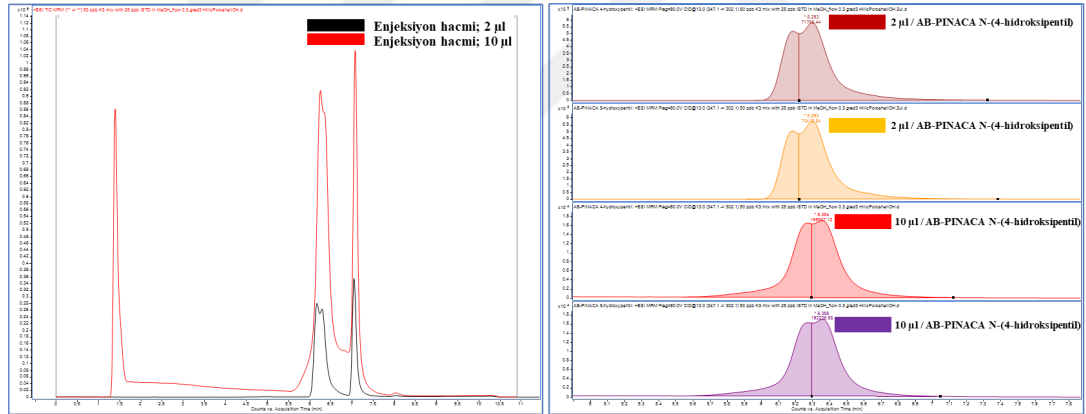
Şekil 17. K1a kolonunda izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı kıyaslaması (G0-3)

Literatürde benzeri çalışmalarda kullanılan ve çalışmanın başında seçilen C18 türündeki konvensiyonel analitik kolonlarda çalışma kapsamındaki AB-PINACA'nın N(4-hidroksipentil) ve N(5-hidroksipentil) metabolitlerinin kromatografik ayırımı sağlanamadı. Bu noktada, hem polar yapıda hem de hidroksil grupları içeren analitik kolon olan Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 (PN 683775-601) (K3) analitik kolonu ile çalışmalara başlandı. Verilen enjeksiyonda K1a'da ayırımın olmadığı metabolitlerin ayırımının sağlandığı gözlemlendi (Şekil 18).



Şekil 18. K1a ve K3 kolonlarının toplam iyon ve izomerlerinin ekstrakte edilmiş kromatogramları

K3 ile verilen ve ayırımın gözlemlendiği enjeksiyonda yüksek baseline olduğunun tespitinin ardından 10 µl olan enjeksiyon hacmi 2 µl'ye düşürüldüğünde baseline görüntüsünün ortadan kalktığı ve ayırma pozitif katkı sağladığı tespit edildi (Şekil 19).

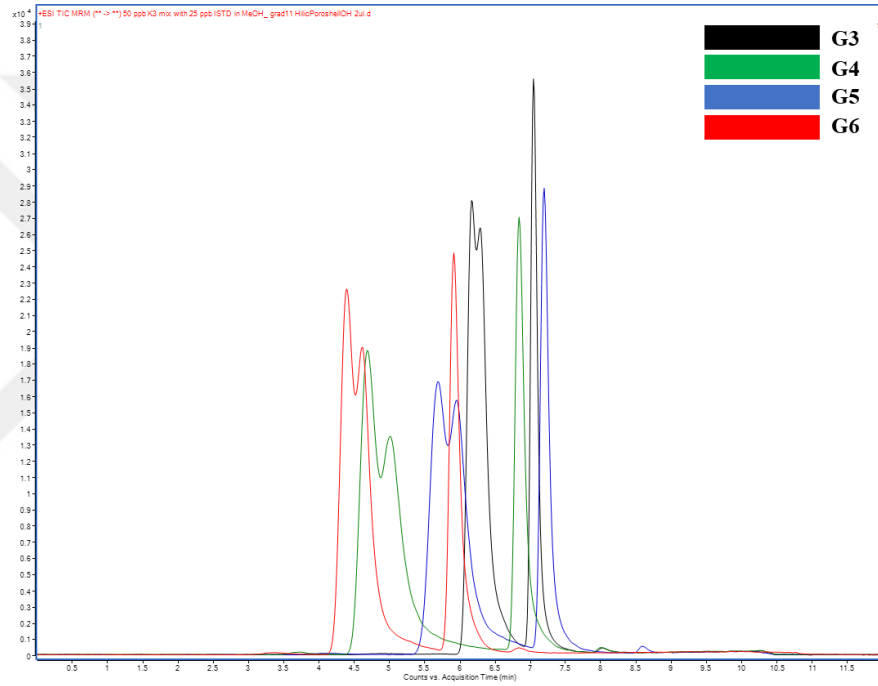


Şekil 19. K3 kolonunda 10 ve 2 µl enjeksiyon hacimlerinin toplam iyon ve izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogramları kıyaslaması

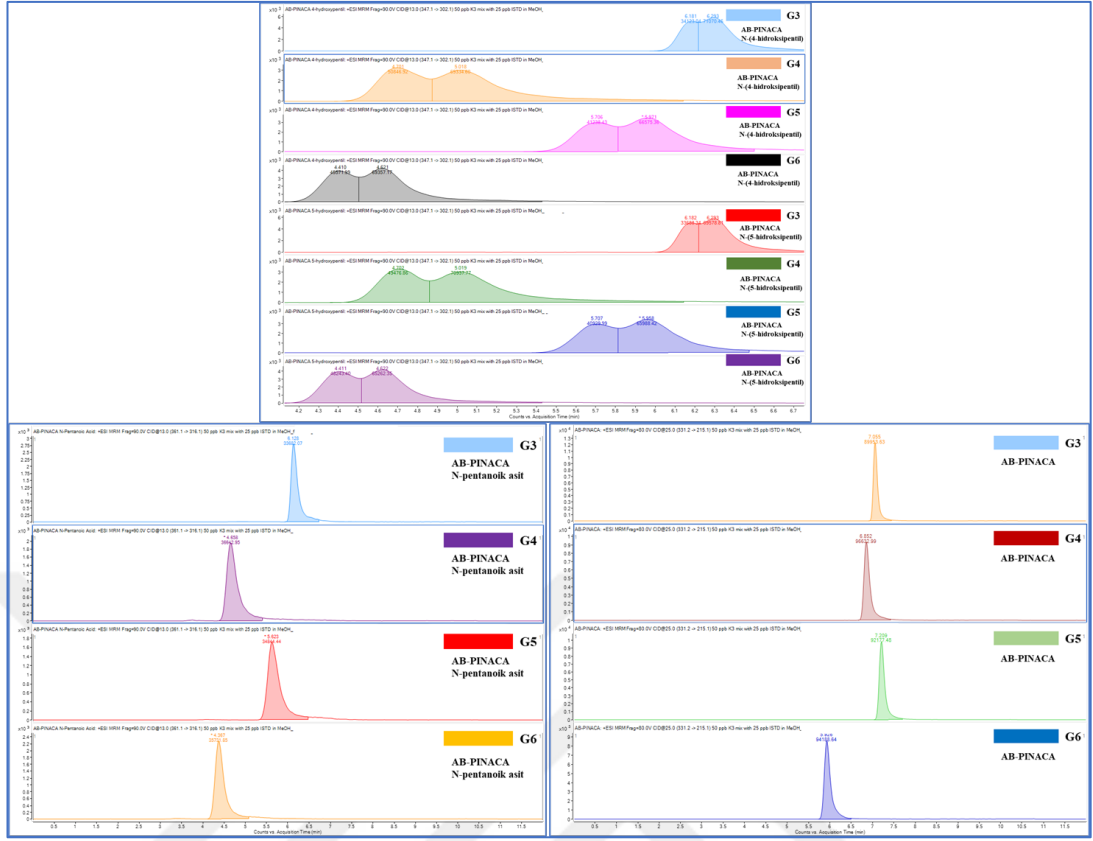
K3 ile mevcut ayırımın optimize edilmesi aşamasında K1a'da yüksek alan elde edilen G3 dahil bir kaç farklı daha mobil faz akış programları uygulandı (G4-6) (Tablo 4). Uygulanan bu gradient programı neticesinde elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde; başlangıç koşulundaki mobil faz sisteminine G6 akış programı entegre edildiğinde oldukça iyi kromatogramlar (Şekil 20) elde edildi.

Tablo 4. K3 kolonunda deneme mobil faz akış programları

| G4 programı |                 |                 | G5 programı |                 |                 | G6 programı |                 |                 |
|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Süre (dk)   | Mobil Faz A (%) | Mobil Faz B (%) | Süre (dk)   | Mobil Faz A (%) | Mobil Faz B (%) | Süre (dk)   | Mobil Faz A (%) | Mobil Faz B (%) |
| 0.0         | 99              | 1               | 0.0         | 99              | 1               | 0.0         | 98              | 2               |
| 2.0         | 95              | 5               | 2.0         | 99              | 1               | 1.0         | 98              | 2               |
| 3.0         | 94              | 6               | 3.0         | 95              | 5               | 2.5         | 90              | 10              |
| 4.0         | 88              | 12              | 4.0         | 90              | 10              | 3.5         | 85              | 15              |
| 5.0         | 76              | 24              | 6.0         | 70              | 30              | 4.0         | 70              | 30              |
| 6.0         | 52              | 48              | 7.0         | 30              | 70              | 6.0         | 30              | 70              |
| 7.0         | 20              | 80              | 8.0         | 0               | 100             | 7.0         | 15              | 85              |
| 8.0         | 0               | 100             | 8.1         | 99              | 1               | 8.0         | 0               | 100             |
| 8.1         | 99              | 1               |             |                 |                 | 8.1         | 98              | 2               |

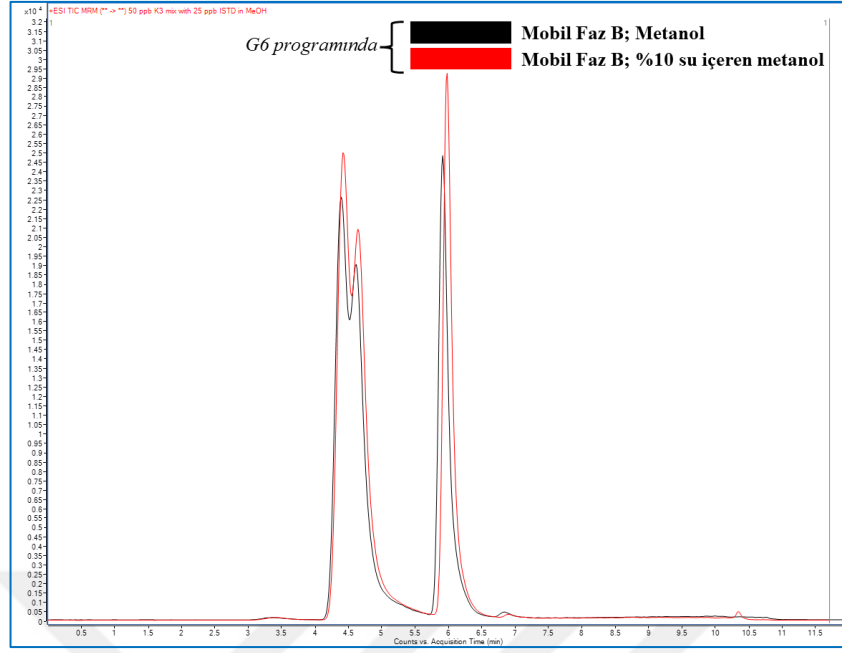


Şekil 20. K3 kolonunda toplam iyon kromatogramı kıyaslaması (G3-6)

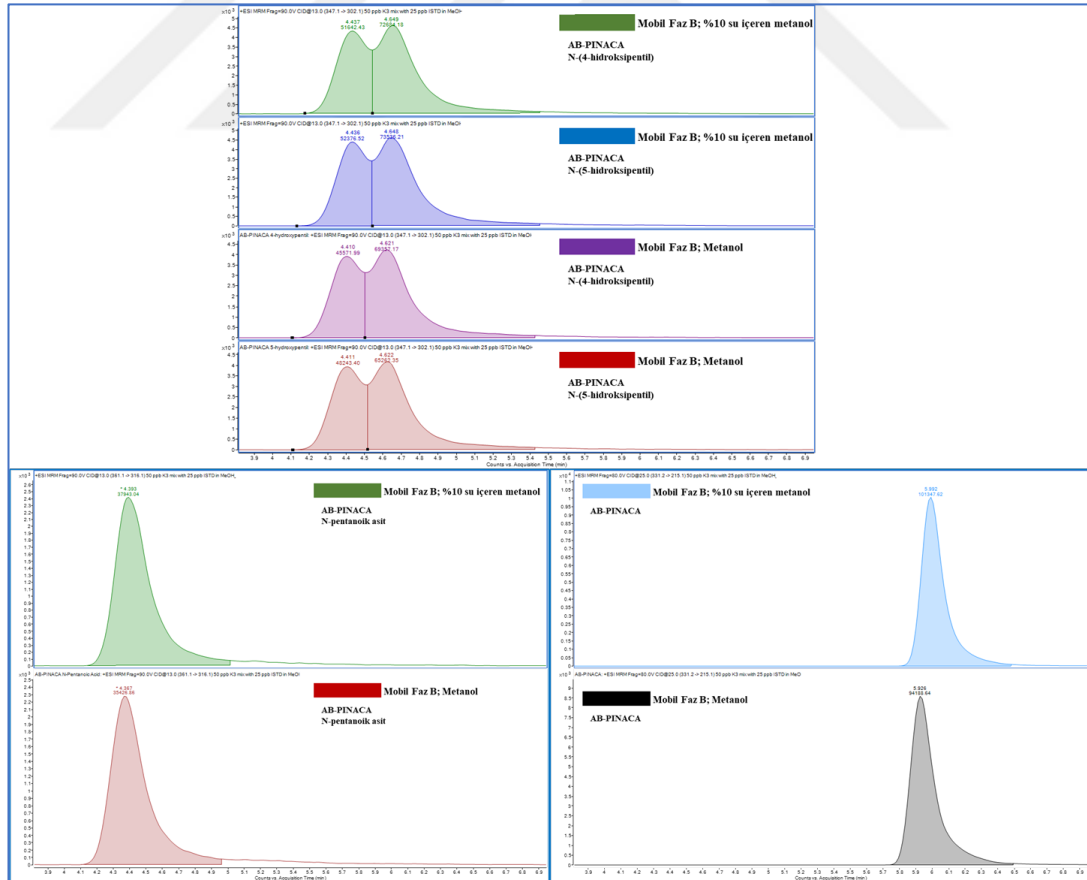


Şekil 21. K3 kolonunda G3-6 programlarında hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogramı kıyaslaması

Çalışmanın bu aşamasında hedeflenen analitlerin kolonda tutunma davranışlarının alan ve metabolitlerin ayırımına etkisini gözlemlemek için yalnızca metanolden oluşan mobil faz B'ye %10 oranında su eklenerek enjeksiyon verildi. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, hedef analitlerin alanlarında bir miktar artış gözlemlendi (Şekil 22; Şekil 23).



Şekil 22. K3 kolonunda G6 programında 2 farklı mobil faz B toplam iyon kromatogram kıyaslaması

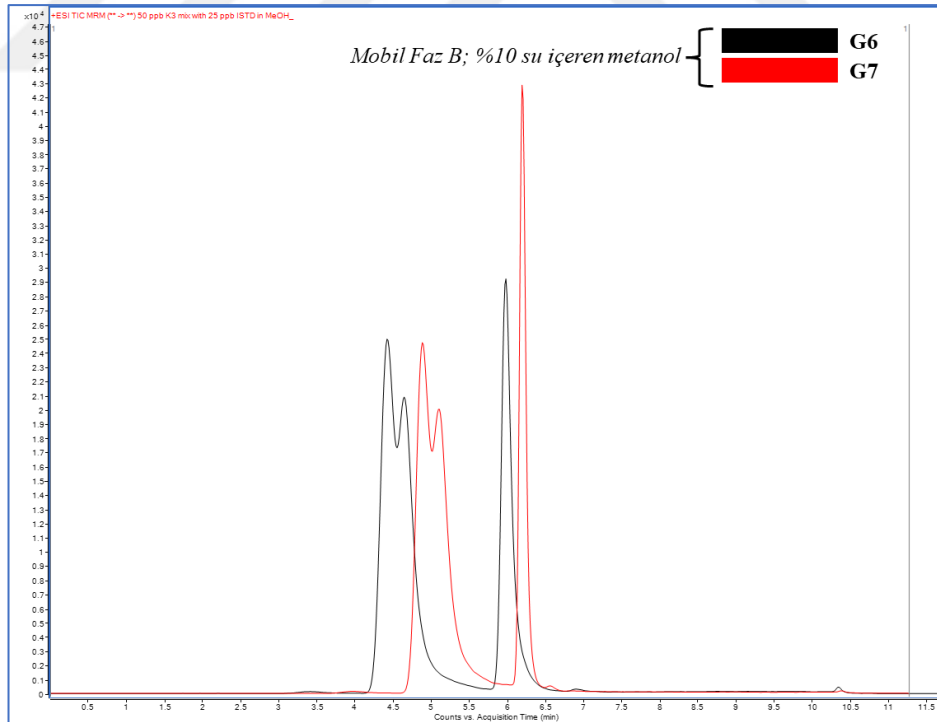


Şekil 23. K3 kolonunda G6 programında 2 farklı mobil faz B hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

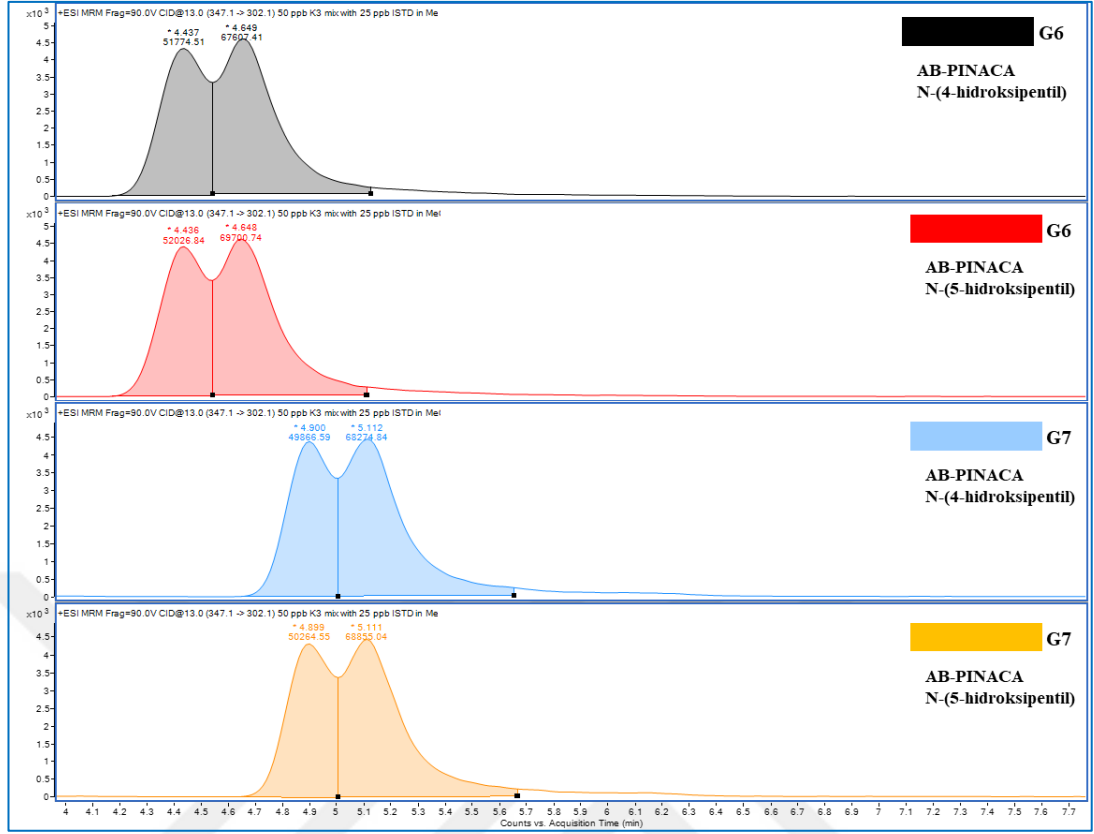
Mobil faz B'ye eklenen %10 su sistemiyle hedef analitlerin kolona tutunmalarını artıracak şekilde bir mobil faz akışı programı (G7) (Tablo 5) ile enjeksiyon verilerek kıyaslama yapıldı (Şekil 24). G7 programı ile özellikle izomer metabolitlerin kolonda tutunmaları artarak alanlarında artış tespit edildi (Şekil 24; Şekil25).

Tablo 5. G7 mobil faz akış programı

| <b>G7 programı</b>   |                            |                            |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Süre<br/>(dk)</b> | <b>Mobil Faz A<br/>(%)</b> | <b>Mobil Faz B<br/>(%)</b> |
| 0.0                  | 99                         | 1                          |
| 1.0                  | 99                         | 1                          |
| 2.5                  | 92                         | 8                          |
| 3.5                  | 88                         | 12                         |
| 5.0                  | 18                         | 82                         |
| 7.0                  | 0                          | 100                        |
| 8.0                  | 0                          | 100                        |
| 8.1                  | 99                         | 1                          |

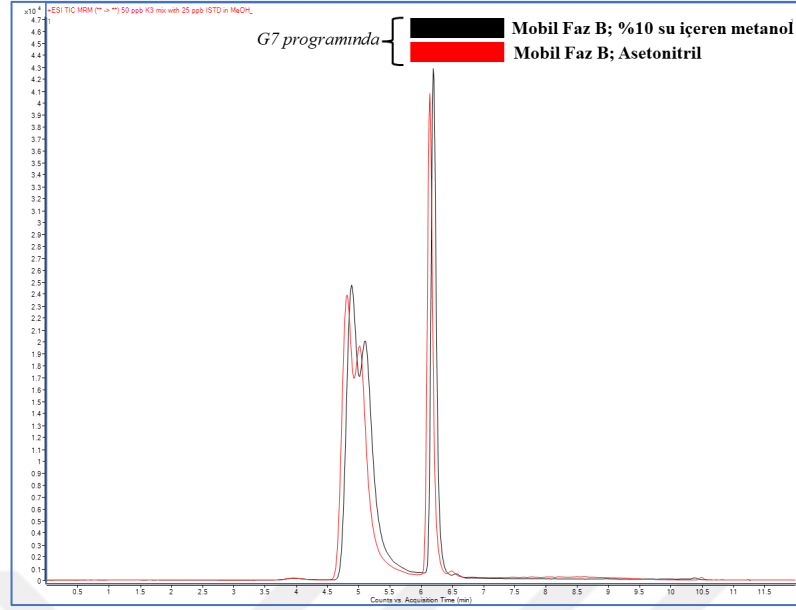


Şekil 24. K3 kolonunda %10 su içeren metanol mobil faz B G6-7 toplam iyon kromatogram kıyaslaması

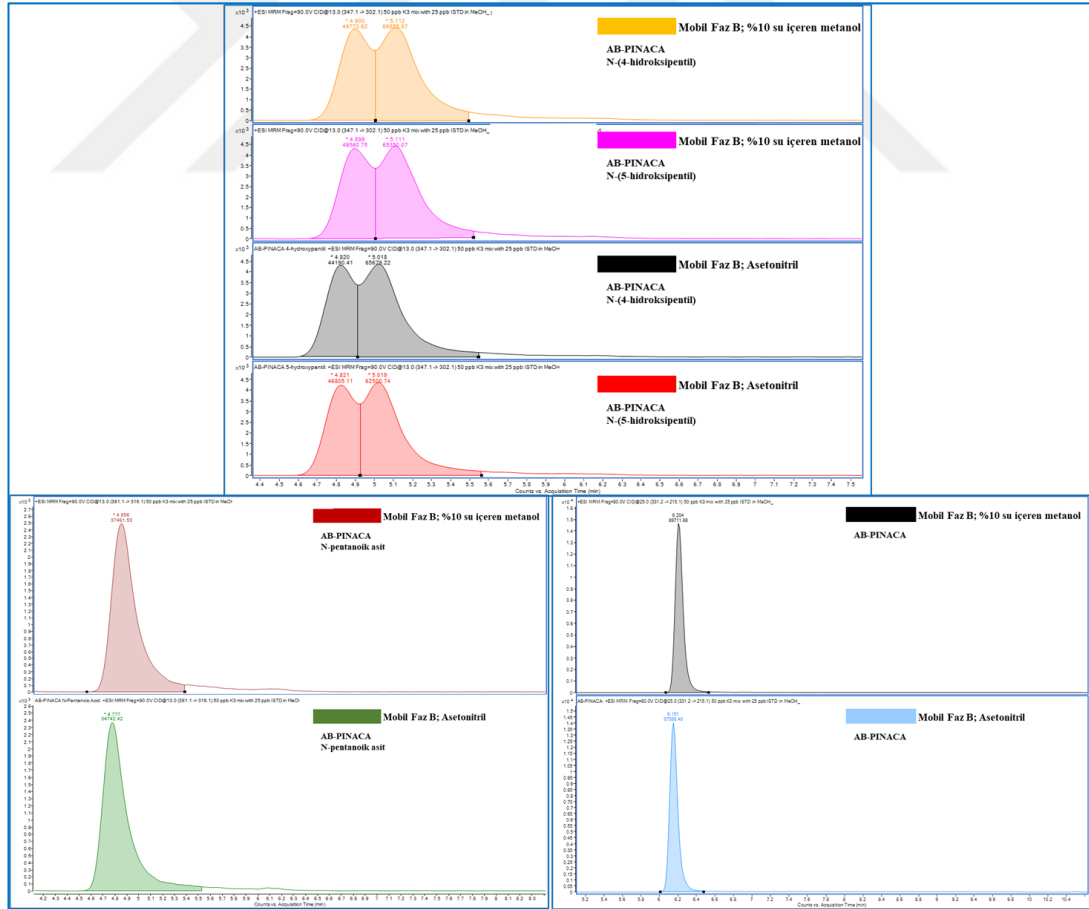


Şekil 25. K3 kolonunda %10 su içeren metanol mobil faz B G6-7 izomerlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

Çalışmalara devam edilen ve izomer ayrımlarında önemli bir adım atılmasını sağlayan K3, hidrofilik etkileşim analitik kolonu olarak bilinen HILIC türü özelliği sebebiyle, kolon tıkanmalarının ve madde kayıplarının önüne geçilmesi adına mobil faz sisteminde organik faz olarak asetonitril kullanılma denemesi yapıldı. Bu denemeler sonucunda incelenen kromatogramlar hedef analitlerin alanlarında küçük de olsa pozitif yönde bir değişim olduğunu gösterdi (Şekil 26; Şekil 27).



Şekil 26. K3 kolonunda G7 programında 2 farklı mobil faz B toplam iyon kromatogram kıyaslaması

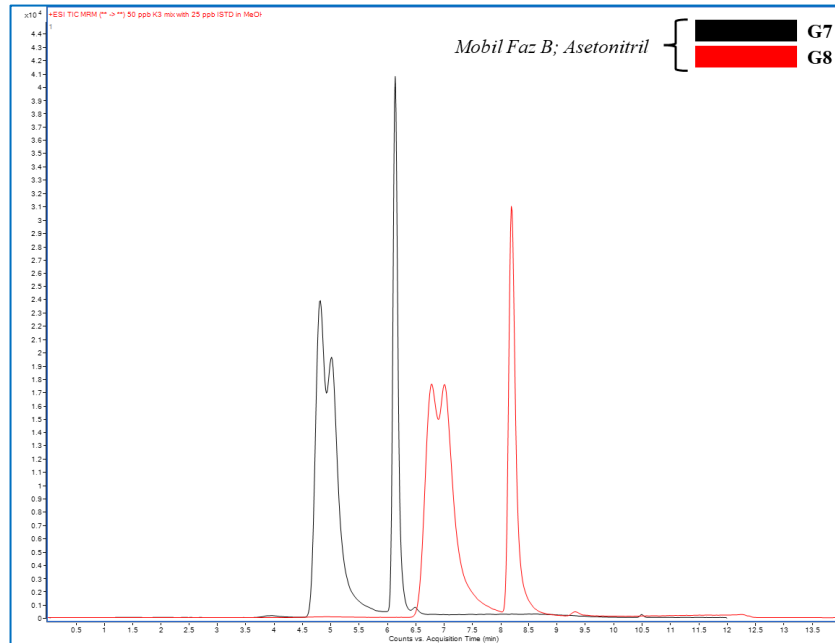


Şekil 27. K3 kolonunda G7 programında 2 farklı mobil faz B hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

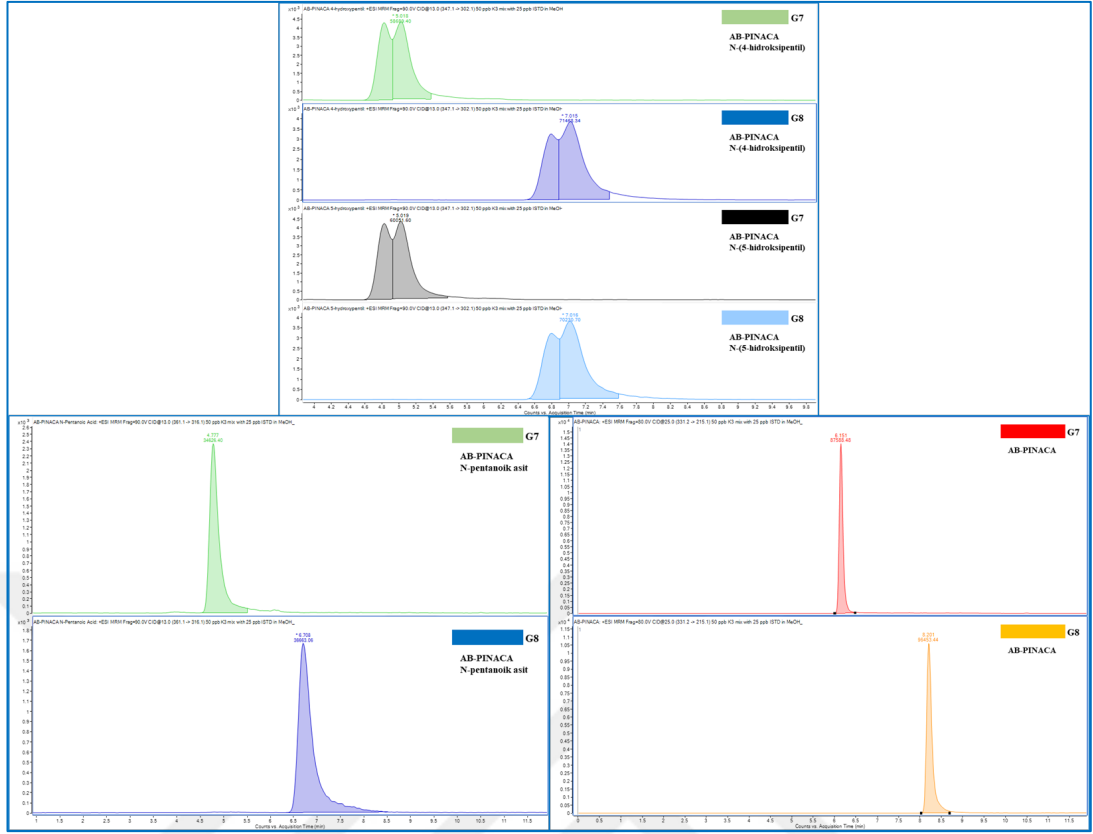
Bu noktada çalışmalara kolon performansının devamlılığı için asetonitrille devam edildi. Belirlenen yeni mobil faz B ile kolonu b hattına daha uzun dakikalarda G7'ye göre yavaş bir arttırımla doyurarak yeni bir mobil faz akış programı (G8) (Tablo 6) oluşturuldu. G8 programı ile verilen enjeksiyon incelendiğinde ise hedef analitlerin kolonda tutulum süresi uzatılarak görece daha yüksek alanlı sinyaller elde edildi (Şekil 28; Şekil 29).

Tablo 6. G8 mobil faz akış programı

| <b>G8 programı</b> |                        |                        |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Süre (dk)</b>   | <b>Mobil Faz A (%)</b> | <b>Mobil Faz B (%)</b> |
| 0.0                | 100                    | 0                      |
| 2.0                | 100                    | 0                      |
| 3.0                | 97                     | 3                      |
| 4.0                | 95                     | 5                      |
| 5.0                | 90                     | 10                     |
| 6.0                | 80                     | 20                     |
| 7.0                | 60                     | 40                     |
| 8.0                | 40                     | 60                     |
| 9.0                | 20                     | 80                     |
| 10.0               | 0                      | 100                    |
| 10.1               | 100                    | 0                      |

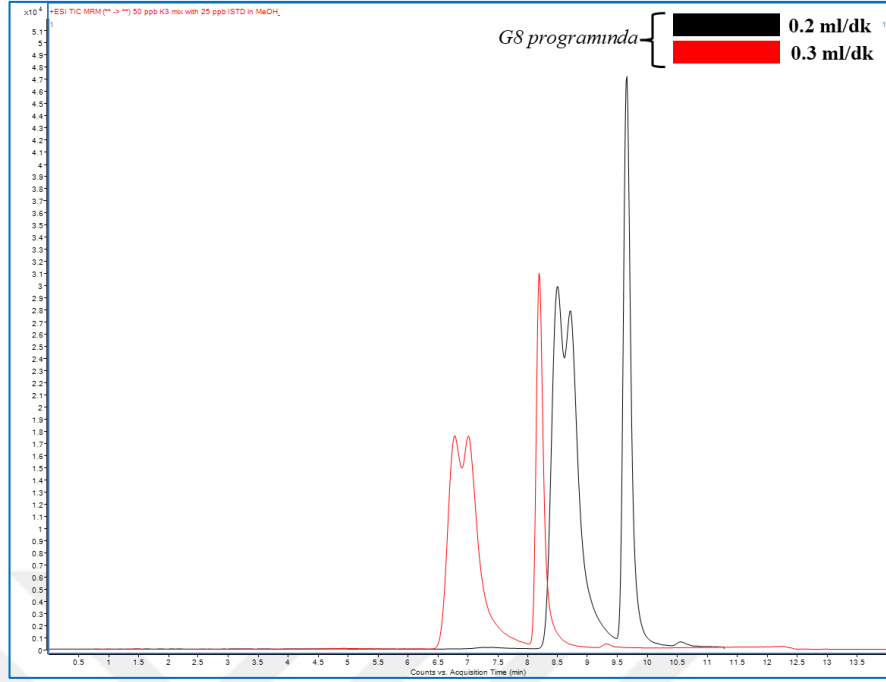


Şekil 28. K3 kolonunda asetonitril mobil faz B G7-8 toplam iyon kromatogram kıyaslaması



Şekil 29. K3 kolonunda setonitril mobil faz B G7-8 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

Geliştirilen analitik metodun optimizasyonunun son aşamasında ise mobil faz akış programının akış hızı 0.2 ml/dk yapılarak enjeksiyon verildi. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde hedef analitlerin alanlarının yaklaşık 2 katına çıktığı görüldü (Şekil 30; Şekil 31).



Şekil 30. K3 kolonunda G8 programında 2 farklı mobil faz akış hızının toplam iyon kromatogram kıyaslaması



Şekil 31. K3 kolonunda G8 programında 2 farklı mobil faz akış hızının hedef analitler ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

Çalışmanın bu aşamasında AB-PINACA ve üç metabolitinin eş zamanlı kantitatif ölçümünü sağlayacak LC-MS/MS analiz metodunun optimum LC koşulları ile MS/MS parametrelerinin optimum değerleri belirlenmiş oldu. Geliştirilen analiz metodunun unsurları ve parametre değerleri Tablo 7’de belirtildiği şekildedir.

Tablo 7. Analitik metot LC koşulları ve MRM parametreleri

|                            |                                             |                 |                 |
|----------------------------|---------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Mobil Faz A                | %0.1 Formik Asit_Su:Metanol (95:5)          |                 |                 |
| Mobil Faz B                | Asetonitril                                 |                 |                 |
| Analitik Kolon             | Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 |                 |                 |
| Kolon Sıcaklığı            | 20 °C                                       |                 |                 |
| LC Akış Programı           | Süre (dk)                                   | Mobil Faz A (%) | Mobil Faz B (%) |
|                            | 0.0                                         | 100             | 0               |
|                            | 2.0                                         | 100             | 0               |
|                            | 3.0                                         | 97              | 3               |
|                            | 4.0                                         | 95              | 5               |
|                            | 5.0                                         | 90              | 10              |
|                            | 6.0                                         | 80              | 20              |
|                            | 7.0                                         | 60              | 40              |
|                            | 8.0                                         | 40              | 60              |
|                            | 9.0                                         | 20              | 80              |
|                            | 10.0                                        | 0               | 100             |
|                            | 10.1                                        | 100             | 0               |
| LC Akış Hızı               | 0.2 ml/dk                                   |                 |                 |
| Enjeksiyon Hacmi           | 2 µL                                        |                 |                 |
| İyon Kaynağı Parametreleri | Gaz Sıcaklığı                               | 350 °C          |                 |
|                            | Gaz Akış Hızı                               | 10 ml/dk        |                 |
|                            | Kılıf Gaz Sıcaklığı                         | 400 °C          |                 |
|                            | Kılıf Gaz Akış Hızı                         | 10 ml/dk        |                 |
|                            | Nebulizer                                   | 55 psi          |                 |
|                            | Kapiler Voltaj                              | 5000 V (+)      |                 |
|                            | Nozzle Voltaj                               | 1000 V (+)      |                 |
| Analiz Modu                | MRM                                         |                 |                 |

Analitik metodunun belirlenme aşamasından sonra çalışmalara vekil matris ortamında devam edildi.

#### Tam kan numuneleri için yapılan çalışmalar;

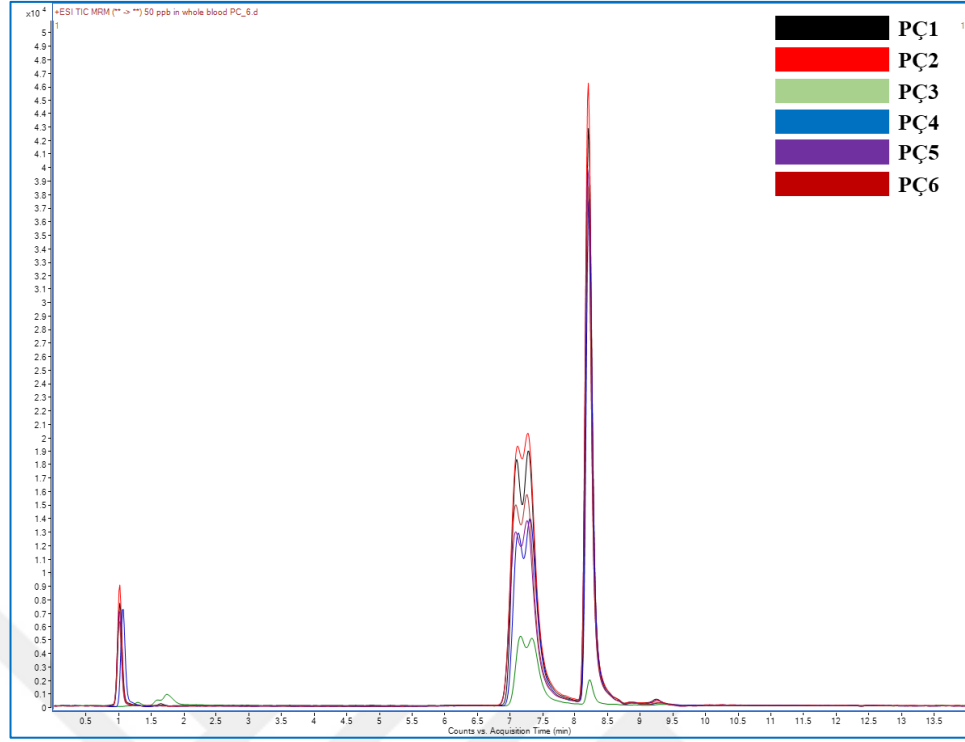
Tam kan matrisi için ilk olarak tam kan matrisinde maliyeti düşük, az işlemli ve tekrarlanabilirliği daha yüksek “protein çöktür ve enjekte et” yaklaşımı takip edildi.

Bu bağlamda, 50 ng/mL konsantrasyonlu hazırlanan “at kanı” (TSC Group) temelli numune, çeşitli protein çöktürücü reaktiflerin (PÇ) etkinliğinin incelenmesinde kullanılmıştır. Reaktif etkinliklerinin kıyaslanmasında, pik sinyali şiddeti (en yüksek pik alanına ulaşarak hassasiyeti artırma), pik simetrisi (pikin doğru integre edilmesini sağlama) ve izomerlerin rezolüsyonu (AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) analitlerini ayırma) kriterleri esas alınmıştır. Bu çerçevede, 6 farklı protein çöktürme reaktifi (PÇ1-6) (Tablo 8) aşağıdaki numune hazırlık prosedüründe uygulanmış ve edinilen kromatogramlar (Şekil 32;Şekil 33) kalitatif olarak incelenmiştir.

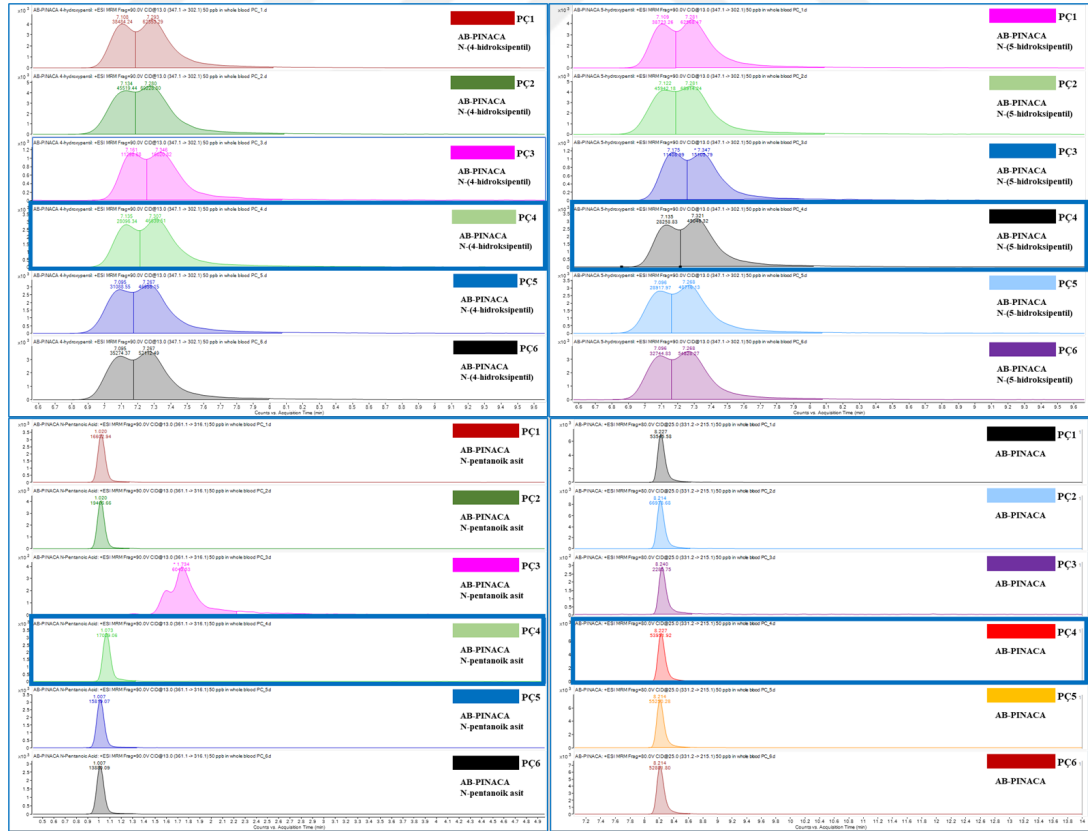
Numune hazırlık prosedürü (tam kan): 50 µL 50 ng/mL konsantrasyonlu numune üzerine 25 µL 300 ng/mL konsantrasyonundaki iç standart (AB-PINACA d9) eklendikten sonra, 225 µL protein çöktürücü reaktif eklenip 10 sn vorteks yapıldı ve 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatant kısmı LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Tablo 8. Tam kan matrisinin protein çöktürme reaktifleri

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>PÇ1</b> | Metanol                                                   |
| <b>PÇ2</b> | Asetonitril                                               |
| <b>PÇ3</b> | % 10 Trikloroasetik Asit (TCA)_Su                         |
| <b>PÇ4</b> | 15 g ZnSO <sub>4</sub> , 300 mL su, 700 mL metanol        |
| <b>PÇ5</b> | 2-propanol:Metanol:Asetonitril (8:20:72)                  |
| <b>PÇ6</b> | [%0.1 Formik Asit _Su:Metanol (95:5)]:[Asetonitril] (1:5) |

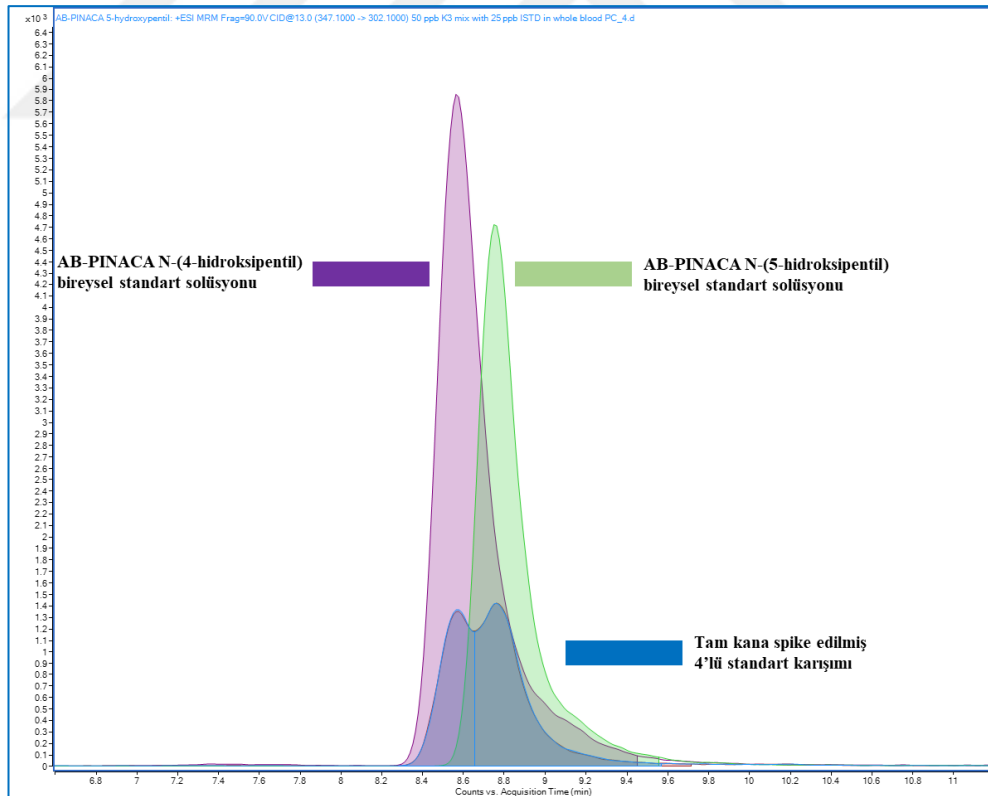


Şekil 32. Tam kan matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (PÇ1-6)



Şekil 33. Tam kan matrisi için hedef analizlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması (PÇ1-6)

Yapılan bu çalışmaların sonucunda, en uygun reaktifin PÇ4 olduğuna karar verildi. Belirlenen optimum koşullar altında bir seri kalibrasyon noktaları belirlenerek kantitasyon çalışmalarına geçildi. Bu aşamada kalibratörler için 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 6 seviye, iç kalite kontroller için ise 25, 125 ve 750 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 3 seviye çalışma standartı metanol kullanılarak hazırlandı. Bu çalışma standartları at kanı ile 10 kat seyreltilerek 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyon değerlerine sahip matris etkili kalibratörler elde edildi. Aynı işlemler iç kalite kontrollerin üretimi için de uygulanarak sırasıyla, 2.5, 12.5 ve 75 ng/mL konsantrasyonlu QC-1, QC-2 ve QC-3 elde edildi. Hazırlanan kalibratörlere ve iç kalite kontrollere belirlenen numune hazırlık prosedürü uygulandı. Kantitasyon işleminde izomerlerin doğru integrasyonu için alıkonma zamanları netleştirildi. Bu amaç için, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) standartlarına ait bireysel standartlardan enjeksiyonlar verildi (Şekil 34.).



Şekil 34. İzomerlerin bireysel standart enjeksiyonlarının ekstrakte edilmiş kromatogramları

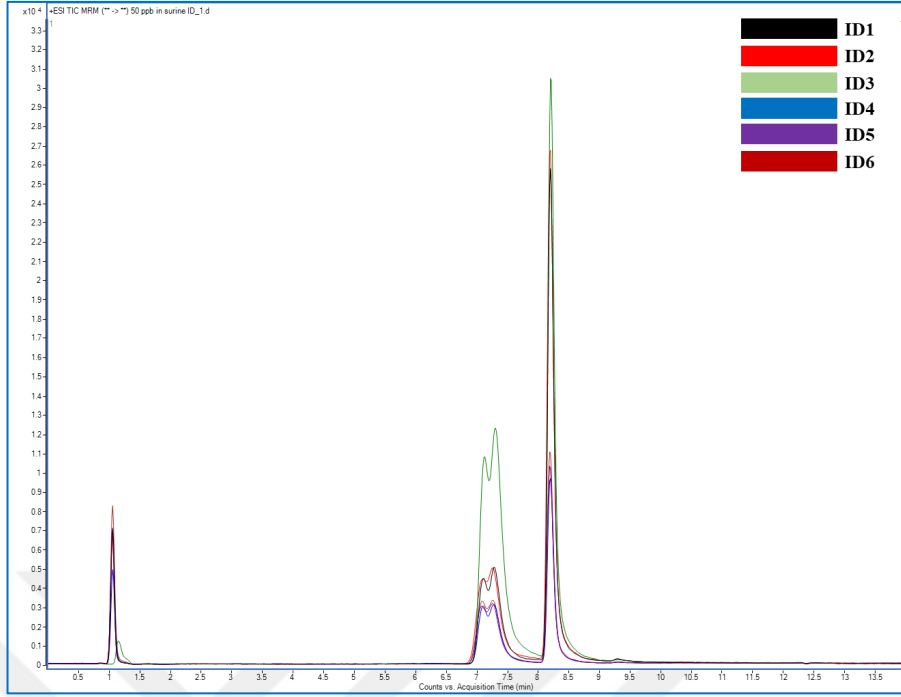
### İdrar numuneleri için yapılan çalışmalar;

İdrar matrisi için maliyeti düşük, az işlemli ve tekrarlanabilirliği daha yüksek “seyrelet ve enjekte et” yaklaşımı izlendi. Bu bağlamda, 50 ng/mL konsantrasyonlu hazırlanan “sentetik idrar” (Mensis Surine720L) temelli numune, çeşitli seyreltici reaktiflerin (ID) etkinliğinin incelenmesinde kullanılmıştır. Reaktif etkinliklerinin kıyaslanmasında, pik sinyali şiddeti (en yüksek pik alanına ulaşarak hassasiyeti artırma), pik simetrisi (pikin doğru integre edilmesini sağlama) ve izomerlerin rezolüsyonu (AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) analitlerini ayırma) kriterleri esas alınmıştır. Bu çerçevede, 6 farklı seyreltici reaktifle (ID1-6) (Tablo 9) aşağıdaki numune hazırlık prosedürü uygulanmış ve edinilen kromatogramlar (Şekil 35; Şekil 36) kalitatif olarak incelenmiştir.

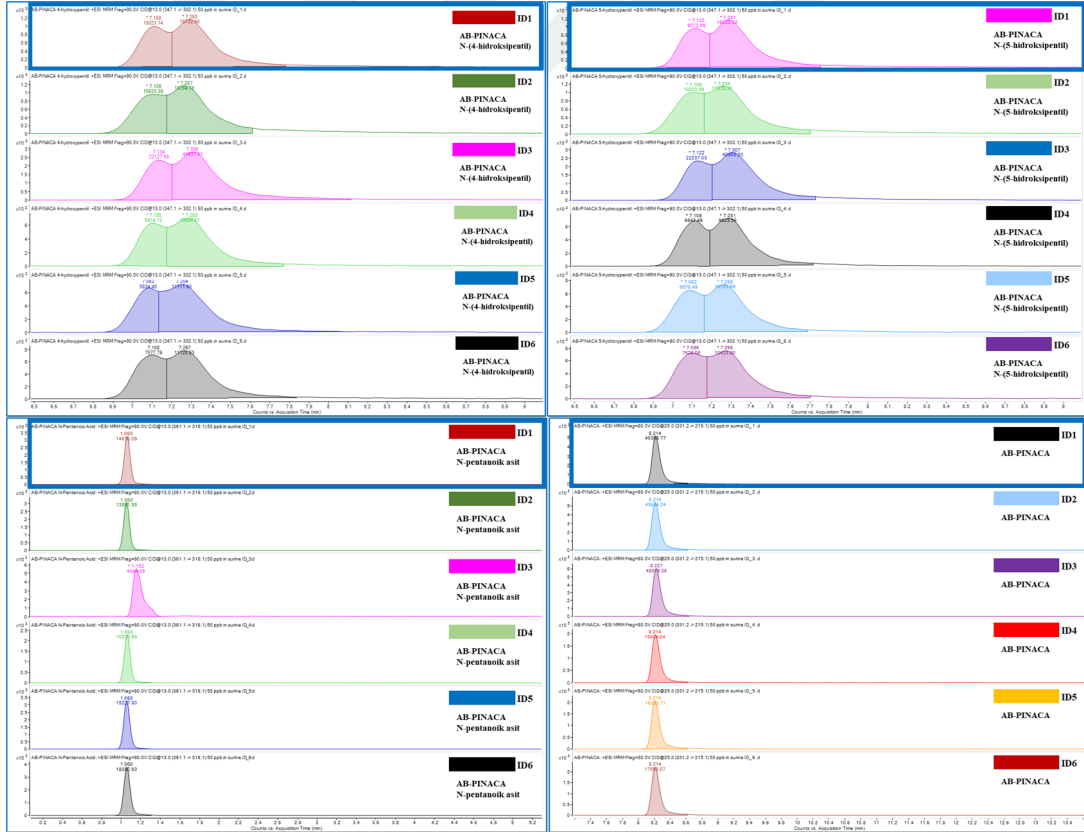
Numune hazırlık prosedürü (idrar): 50 µL 50 ng/mL konsantrasyonlu numune üzerine 25 µL 300 ng/ml konsantrasyonundaki iç standart (AB-PINACA d9) eklendikten sonra, 225 µL seyreltici reaktif eklenip 10 sn vorteks yapıldı ve LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Tablo 9. İdrar matrisi için seyreltici reaktifler

|            |                                                          |
|------------|----------------------------------------------------------|
| <b>ID1</b> | Metanol                                                  |
| <b>ID2</b> | Asetonitril                                              |
| <b>ID3</b> | % 0.5 Formik Asit_Su                                     |
| <b>ID4</b> | Su:Metanol (30:70)                                       |
| <b>ID5</b> | 2-propanol:Metanol:Asetonitril (8:20:72)                 |
| <b>ID6</b> | [%0.1 Formik Asit_Su:Metanol (95:5)]:[Asetonitril] (1:5) |



Şekil 35. İdrar matrisi için ID1-6 toplam iyon kromatogram kıyaslaması



Şekil 36. İdrar matrisi için ID1-6 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

Yapılan bu çalışmaların sonucunda, en uygun reaktifin ID1 olduğuna karar verildi. Belirlenen optimum koşullar altında bir seri kalibrasyon noktaları belirlenerek kantitasyon çalışmalarına geçildi. Bu aşamada kalibratörler için 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 6 seviye, iç kalite kontroller için ise 25, 125 ve 750 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 3 seviye çalışma standartı metanol kullanılarak hazırlandı. Bu çalışma standartları sentetik idrar ile 10 kat seyreltilerek 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyon değerlerine sahip matris etkili kalibratörler elde edildi. Aynı işlemler iç kalite kontrollerin üretimi için de uygulanarak sırasıyla, 2.5, 12.5 ve 75 ng/mL konsantrasyonlu QC-1, QC-2 ve QC-3 elde edildi. Hazırlanan kalibratörlere ve iç kalite kontrollere belirlenen numune hazırlık prosedürü uygulandı.

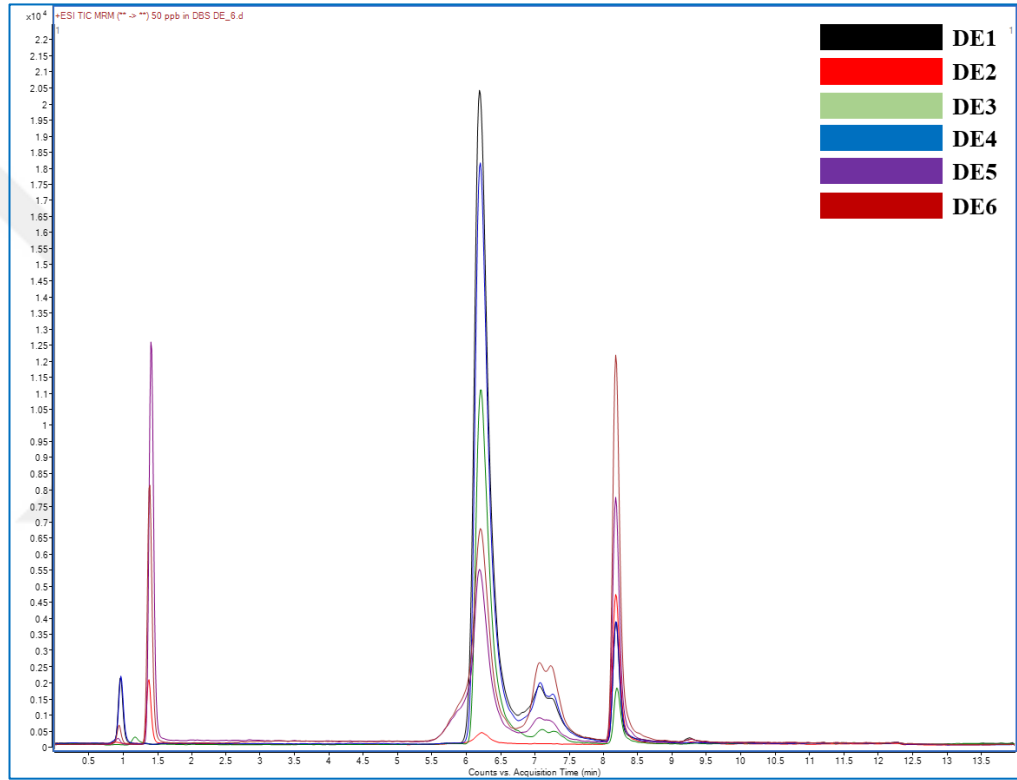
### **DBS numuneleri için yapılan çalışmalar;**

DBS matrisi için de diğer matrislerde olduğu gibi maliyeti düşük, az işlemli ve tekrarlanabilirliği daha yüksek “ekstrakte et ve enjekte et” yaklaşımı izlendi. Bu bağlamda, 50 ng/mL konsantrasyonlu hazırlanan at kanı (TCS Group) temelli numune Hemaxis mikroörnekleyici karta emdirilip kurutulduktan sonra 3 mm’lik punch alınarak, çeşitli ekstraksiyon reaktiflerin (DE) etkinliğinin incelenmesinde kullanılmıştır. Reaktif etkinliklerinin kıyaslanmasında, pik sinyali şiddeti (en yüksek pik alanına ulaşarak hassasiyeti artırma), pik simetrisi (pikin doğru integre edilmesini sağlama) ve izomerlerin rezolüsyonu (AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) analitlerini ayırma) kriterleri esas alınmıştır. Bu çerçevede, 7 farklı seyreltici reaktifle (DE1-7) (Tablo 10) aşağıdaki numune hazırlık prosedürü uygulanmış ve edinilen kromatogramlar (Şekil 37; Şekil 38) kalitatif olarak incelenmiştir.

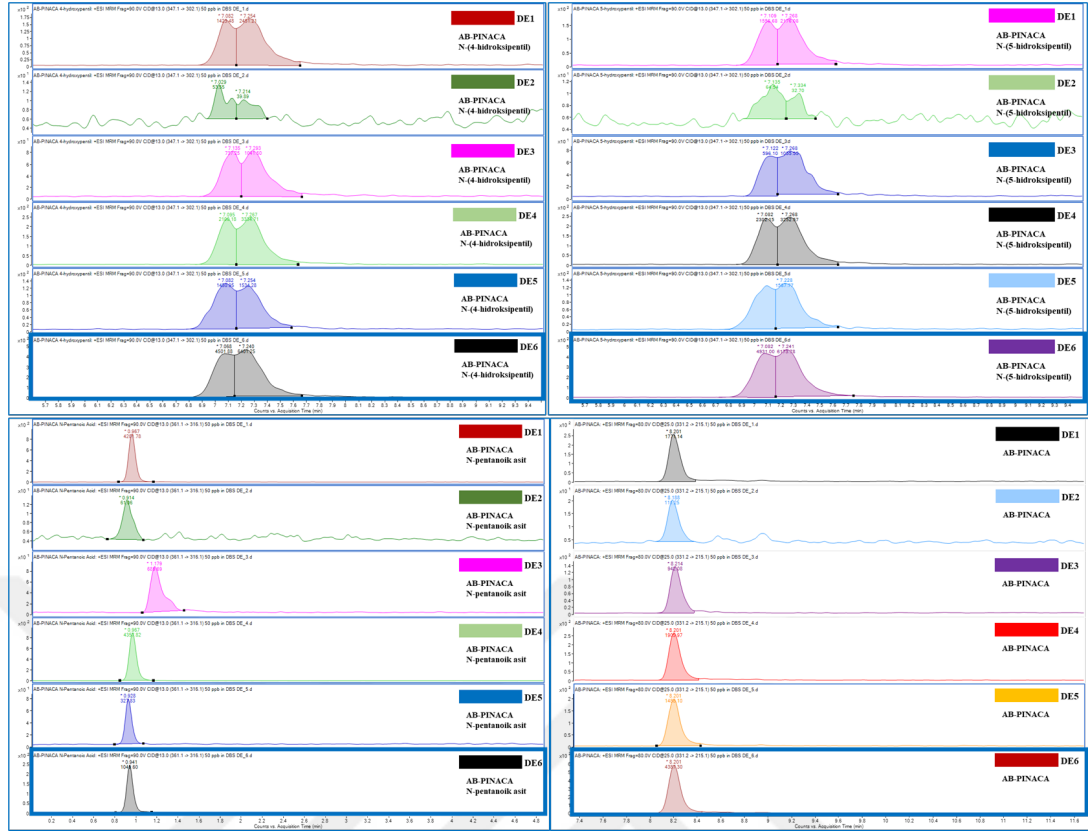
Numune hazırlık prosedürü (DBS): 3 mm punchlanan 50 ng/ml konsantrasyonlu numune üzerine 300 ng/ml konsantrasyonundaki iç standart (AB-PINACA d9) içeren ekstraksiyon reaktifinden 200 µl eklenip 15 dk oda sıcaklığında karıştırıldı ve LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Tablo 10. DBS matrisi için ekstraksiyon reaktifleri

|     |                                                          |
|-----|----------------------------------------------------------|
| DE1 | Metanol                                                  |
| DE2 | Asetonitril                                              |
| DE3 | % 0.5 Formik Asit Su                                     |
| DE4 | Su:Metanol (30:70)                                       |
| DE5 | 2-propanol:Metanol:Asetonitril (8:20:72)                 |
| DE6 | [%0.1 Formik Asit Su:Metanol (95:5)]:[Asetonitril] (1:5) |
| DE7 | [%0.1 Formik Asit Su:Metanol (95:5)]:[Asetonitril] (1:3) |

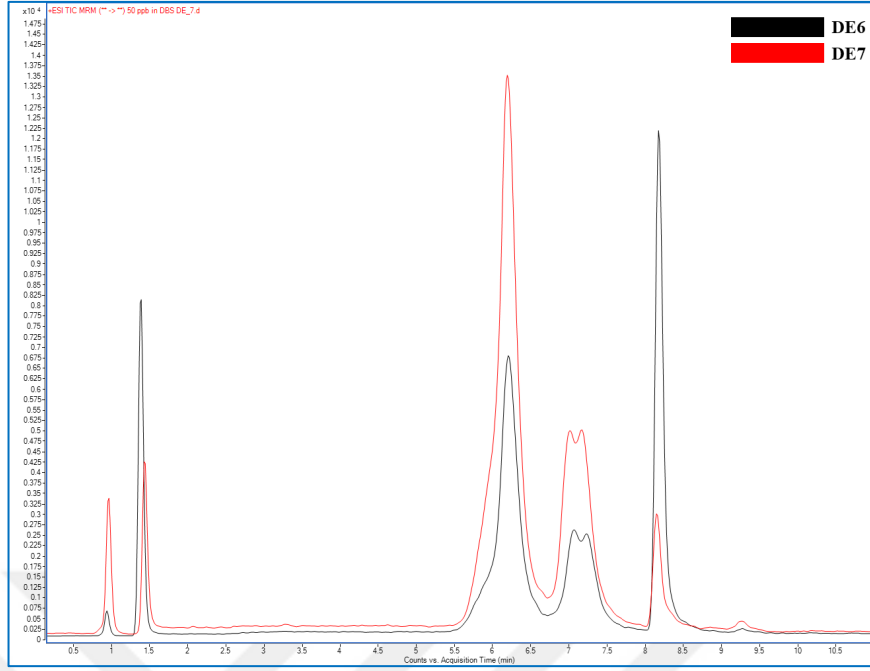


Şekil 37. DBS matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (DE1-6)



Şekil 38. DBS matrisi için hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması (DE1-6)

DBS ekstraksiyon reaktiflerin ilk 6'sı incelendiğinde en iyi ekstraksiyon performansını sağlayan reaktif DE6 oldu. Ancak incelenen kromatogramlar özellikle AB-PINACA N-pentanoik asit'in pik alanları saf solventle ekstrakte edildiğinde oldukça yüksek olduğunu gösterdi. Bu gözlemlerin ışığında alternatif bir DE7 hazırlandı. Bu hazırlıkta DE6'da sulu faz ve organik faz oranı 1:5 iken DE7'de bu oran 1:3'e çekilerek yeniden numune hazırlığı yapıldı ve LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.



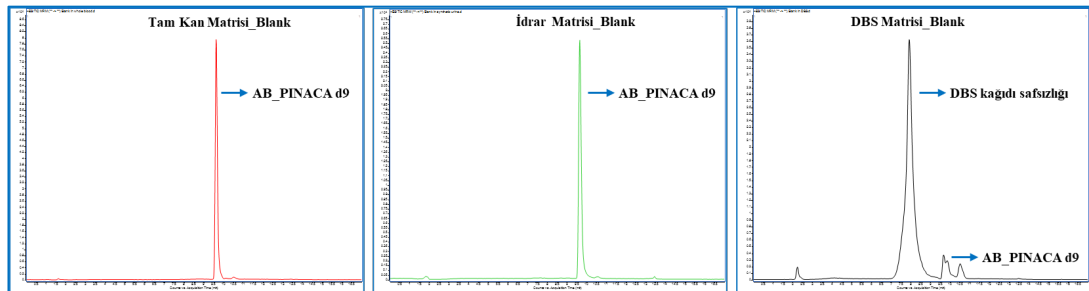
Şekil 39. DBS matrisi için toplam iyon kromatogram kıyaslaması (DE6-7)



Şekil 40. DBS matrisi için DE6-7 hedef analitlerin ekstrakte edilmiş kromatogram kıyaslaması

DBS matrisin için yapılan bu ikinci çalışma sonucunda, en uygun reaktifin DE7 olduğuna karar verildi. Belirlenen optimum koşullar altında bir seri kalibrasyon noktaları belirlenerek kantitasyon çalışmalarına geçildi. Bu aşamada kalibratörler için 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 6 seviye, iç kalite kontroller için ise 25, 125 ve 750 ng/mL konsantrasyonlu toplamda 3 seviye çalışma standartı metanol kullanılarak hazırlandı. Bu çalışma standartları at kanı ile 10 kat seyreltilerek 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyon değerlerine sahip matris etkili kalibratörler elde edildi. Aynı işlemler iç kalite kontrollerin üretimi için de uygulanarak sırasıyla, 2.5, 12.5 ve 75 ng/mL konsantrasyonlu QC-1, QC-2 ve QC-3 elde edildi. At kanı içerisine hazırlanan bu kalibratör ve kontroller mikroörnekleyici olan Hemaxis kartlara emdirildi ve oda sıcaklığında 1 gün boyunca kurumaya bırakıldı. Hazırlanan kalibratörlere ve iç kalite kontrollere belirlenen numune hazırlık prosedürü uygulandı.

Tüm matrisler için kalibratörler oluşturulurken kullanılan vekil matrislere (at kanı, sentetik idrar, DBS) (blank), içerisine standart karışımları eklenmeden numune hazırlığı uygulandı ve akabinde LC-MS/MS sistemine enjekte edildi. İncelenen enjeksiyonlarda hedef analitlerin olmadığı görüldü. Yalnızca DBS matrisindeki blank enjeksiyonunda kullanılan DBS kağıdından safsızlık piki çıktığı belirlendi, ancak bu safsızlık piki hedef analitlerin alıkonma zamanları ile eşleşmediğinden kantitatif ve kalitatif analizi etkilemedi (Şekil 41).



Şekil 41. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinin blank enjeksiyonlarının toplam iyon kromatogramları

Analitik metotta her üç matris için, her bir hedef analite ait en az 3 öncül-ürün iyon optimize edildi. Bunlardan bir ürün iyon kantitasyon için kullanılırken diğer ürün iyonlar kalitatif analiz için kullanıldı (Tablo 11).

Tablo 11. Analitik metodun MRM tablosu

| <i>Analit</i>                                                              | <i>Öncül İyon<br/>(m/z)</i> | <i>Ürün İyon<br/>(m/z)</i> | <i>FV<sup>1</sup><br/>(V)</i> | <i>CE<sup>2</sup><br/>(V)</i> | <i>Polarite</i> |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| <b>AB-PINACA (kantitatif)</b>                                              | <b>331.2</b>                | <b>215.1</b>               | <b>80</b>                     | <b>25</b>                     | <b>Pozitif</b>  |
| AB-PINACA (kalitatif)                                                      | 331.2                       | 314.1                      | 80                            | 4                             | Pozitif         |
| AB-PINACA (kalitatif)                                                      | 331.2                       | 286.2                      | 80                            | 13                            | Pozitif         |
| <b>AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) (kantitatif)</b>                         | <b>347.1</b>                | <b>284.2</b>               | <b>90</b>                     | <b>18</b>                     | <b>Pozitif</b>  |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 231.1                      | 90                            | 22                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 302.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 330.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| <b>AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) (kantitatif)</b>                         | <b>347.1</b>                | <b>229.9</b>               | <b>90</b>                     | <b>14</b>                     | <b>Pozitif</b>  |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 231.1                      | 90                            | 22                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 302.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) (kalitatif)                                 | 347.1                       | 330.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| <b>AB-PINACA N-pentanoik asit (kantitatif)</b>                             | <b>361.1</b>                | <b>316.1</b>               | <b>90</b>                     | <b>14</b>                     | <b>Pozitif</b>  |
| AB-PINACA N-pentanoik asit (kalitatif)                                     | 361.1                       | 298.1                      | 90                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA N-pentanoik asit (kalitatif)                                     | 361.1                       | 344.1                      | 90                            | 6                             | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)                                                 | 340.3                       | 224.2                      | 80                            | 29                            | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)                                                 | 340.3                       | 295.2                      | 80                            | 13                            | Pozitif         |
| AB-PINACA-d9 (iç standart)                                                 | 340.3                       | 323.2                      | 80                            | 6                             | Pozitif         |
| <sup>1</sup> FV: Fragmentor Voltajı<br><sup>2</sup> CE: Parçalanma Voltajı |                             |                            |                               |                               |                 |

### 3.5 Validasyon

Çalışma boyunca hedef biyomatrisler (tam kan, idrar ve DBS) için geliştirilmiş LC-MS/MS tekniğine dayalı analitik metotların validasyonları, validasyon kılavuzları (61,62) dikkate alınarak amaca uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çerçevede yürütülen faaliyetler ve kapsamı şu şekildedir;

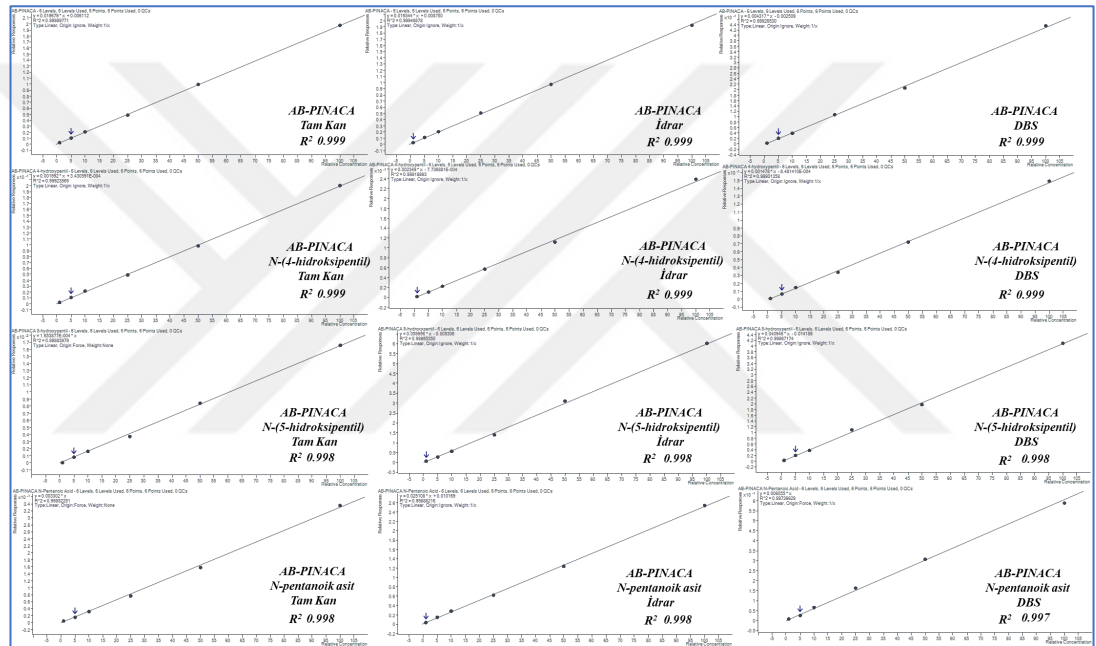
#### 3.5.1 Doğrusallık (Linearity R<sup>2</sup>) çalışmaları

İlgili matris için seviyeleri önceden belirlenmiş kalibratörler analiz edilerek R<sup>2</sup> değerleri tespit edildi. Kabul kriteri olarak R<sup>2</sup> ≥ 0.99 belirlendi.

Her üç matris için Tablo 12’de belirtilen 6 seviye matris etkili kalibratör kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiş ve doğrusallık açısından değerlendirildi.

Tablo 12. Tam kan, idrar ve DBS matrisleri için oluşturulan kalibrasyon değerleri

| <i>Analit</i>                  | <i>Kalibrasyon Değerleri (ng/mL)</i> |                 |                 |                 |                 |                 |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                | <i>Seviye-1</i>                      | <i>Seviye-2</i> | <i>Seviye-3</i> | <i>Seviye-4</i> | <i>Seviye-5</i> | <i>Seviye-6</i> |
| AB-PINACA                      | 1                                    | 5               | 10              | 25              | 50              | 100             |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) | 1                                    | 5               | 10              | 25              | 50              | 100             |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) | 1                                    | 5               | 10              | 25              | 50              | 100             |
| AB-PINACA N-pentanoik asit     | 1                                    | 5               | 10              | 25              | 50              | 100             |



Şekil 42. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinde her bir hedef analit için kalibrasyon eğrileri ve  $R^2$  değerleri

Çalışmanın doğrusallık verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, kabul kriteri olan  $R^2 \geq 0.99$  koşulunu tam kan, idrar ve DBS matrisleri için sağlamaktadır.

### 3.5.2 En düşük tespit (LOD) ve teşhis limitleri (LOQ)

Matris etkili hazırlanan kalibratörlerden en düşük seviyeli olanı 10 defa analiz edilerek, standart sapma verileri elde edildi. Bu veriler kullanılarak LOD ( $SD \times 3$ ) ve LOQ ( $SD \times 10$ ) değerlerine ulaşıldı. Tespit edilen LOD ve LOQ değerlerinin, ilgili

matrisdeki en düşük seviyeli kalibrasyonun konsantrasyon değerinden yüksek olmaması kabul kriteri olarak belirlenmiş olup çalışma verileri incelendiğinde her üç matrisde her bir analit için bu kabul kriterini sağlamaktadır.

### 3.5.3 Geri kazanım (recovery %)

İlgili matris temelince hazırlanan düşük, orta ve yüksek seviyeli kalite kontrol materyallerinin (QC) her biri 10 defa analiz edilerek ortalama % geri kazanım değerleri bulundu. Kabul kriteri olarak %85-115 değer aralığı kullanıldı. Her bir matris için yapılan çalışmada Tablo 13’de verilen konsantrasyondaki QC’ler kullanıldı.

Tablo 13. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinde kalite kontrol materyallerinin konsantrasyonları

| <i>Analit</i>                  | <i>QC Değerleri<sup>1</sup></i> |                 |                 |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
|                                | <i>Seviye-1</i>                 | <i>Seviye-2</i> | <i>Seviye-3</i> |
| AB-PINACA                      | 2.5                             | 12.5            | 75              |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) | 2.5                             | 12.5            | 75              |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) | 2.5                             | 12.5            | 75              |
| AB-PINACA N-pentanoik asit     | 2.5                             | 12.5            | 75              |
| <sup>1</sup>                   | QC: Kalite Kontrol Materyali    |                 |                 |

### 3.5.4 Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik (RSD %)

İlgili matris temelince hazırlanan düşük, orta ve yüksek seviyeli kalibratörlerin düşük, orta ve yüksek olarak belirlenen üç seviye için, toplam 3 gün boyunca 10 defa analiz edilerek hesaplamalar gerçekleştirildi. Bu süreçte, analist\_1’in 2 gün boyunca yaptığı çalışmalardan, günleriçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik %RSD değeri, ortalama analiz sonucu ve SD değerleri kullanılarak tespit edildi. Analist\_1 ve 2’nin ayrı günlerde yaptığı çalışmaların sonuçları üzerinden ise tekrarüretilebilirlik %RSD değeri, ortalama analiz sonucu ve SD değerleri kullanılarak tespit edildi. Kabul kriteri olarak ise %RSD ≤15.0 değeri esas alındı. Çalışma kapsamında her matris için kalibratör seviyeleri 3-4-5, konsantrasyonları sırasıyla 10, 25, 50 ng/ml, kullanıldı ve kabul kriterleri sağlandı.

Geri kazanım ile tekrarlanabilirlik/tekrarüretilebilirlik çalışmaları sırasıyla doğruluk ve kesinlik çalışmaları olarak tamamlandı.

Validasyon çalışmasının tam kan, idrar ve DBS matrislerinin her biri için doğrusalılık, LOD, LOQ, geri kazanım ve RSD% değerleri Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 14. Tam kan, idrar ve DBS matrislerine ait validasyon değerleri

| TAM KAN                        |       |         |      |        |             |      |        |                |       |        |                |                |
|--------------------------------|-------|---------|------|--------|-------------|------|--------|----------------|-------|--------|----------------|----------------|
| Analit                         | R²    | Günlüğü |      |        | Günlerarası |      |        | Geri Kazanım % |       |        | LOQ<br>(ng/ml) | LOD<br>(ng/ml) |
|                                |       | RSD %   |      |        | RSD %       |      |        |                |       |        |                |                |
|                                |       | Düşük   | Orta | Yüksek | Düşük       | Orta | Yüksek | Düşük          | Orta  | Yüksek |                |                |
| AB-PINACA                      | 0.999 | 1.22    | 0.92 | 1.11   | 1.31        | 1.64 | 1.33   | 104.09         | 99.11 | 96.16  | 0.24           | 0.07           |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) | 0.999 | 1.95    | 1.79 | 1.97   | 1.99        | 2.04 | 2.10   | 97.37          | 99.59 | 98.42  | 0.71           | 0.21           |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) | 0.998 | 3.13    | 3.94 | 1.43   | 3.53        | 4.08 | 1.47   | 99.57          | 99.51 | 99.60  | 0.58           | 0.17           |
| AB-PINACA N-pentanoik asit     | 0.998 | 5.63    | 2.23 | 2.07   | 5.89        | 2.35 | 2.08   | 101.46         | 99.33 | 99.94  | 0.60           | 0.18           |
| İDRAR                          |       |         |      |        |             |      |        |                |       |        |                |                |
| Analit                         | R²    | Günlüğü |      |        | Günlerarası |      |        | Geri Kazanım % |       |        | LOQ<br>(ng/ml) | LOD<br>(ng/ml) |
|                                |       | RSD %   |      |        | RSD %       |      |        |                |       |        |                |                |
|                                |       | Düşük   | Orta | Yüksek | Düşük       | Orta | Yüksek | Düşük          | Orta  | Yüksek |                |                |
| AB-PINACA                      | 0.999 | 1.51    | 2.51 | 2.24   | 2.08        | 3.31 | 2.28   | 89.07          | 92.82 | 99.43  | 0.34           | 0.10           |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) | 0.999 | 1.08    | 2.53 | 1.37   | 2.45        | 2.79 | 3.59   | 98.02          | 96.86 | 98.59  | 0.75           | 0.22           |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) | 0.998 | 3.60    | 1.71 | 2.32   | 3.75        | 3.10 | 2.36   | 93.27          | 97.34 | 97.68  | 0.53           | 0.16           |
| AB-PINACA N-pentanoik asit     | 0.998 | 2.06    | 1.81 | 1.85   | 4.94        | 2.69 | 1.98   | 96.68          | 98.22 | 98.50  | 0.88           | 0.26           |
| DBS                            |       |         |      |        |             |      |        |                |       |        |                |                |
| Analit                         | R²    | Günlüğü |      |        | Günlerarası |      |        | Geri Kazanım % |       |        | LOQ<br>(ng/ml) | LOD<br>(ng/ml) |
|                                |       | RSD %   |      |        | RSD %       |      |        |                |       |        |                |                |
|                                |       | Düşük   | Orta | Yüksek | Düşük       | Orta | Yüksek | Düşük          | Orta  | Yüksek |                |                |
| AB-PINACA                      | 0.999 | 2.47    | 1.83 | 2.56   | 2.73        | 2.79 | 2.59   | 98.14          | 98.52 | 98.92  | 0.64           | 0.19           |
| AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) | 0.999 | 5.50    | 4.03 | 3.11   | 5.61        | 4.19 | 3.19   | 97.70          | 96.22 | 99.85  | 0.61           | 0.18           |
| AB-PINACA N-(5-hidroksipentil) | 0.998 | 5.04    | 4.71 | 2.02   | 5.23        | 4.75 | 2.11   | 95.89          | 96.02 | 99.14  | 0.66           | 0.19           |
| AB-PINACA N-pentanoik asit     | 0.997 | 2.26    | 4.15 | 2.97   | 2.54        | 5.03 | 3.06   | 95.43          | 96.03 | 98.24  | 0.80           | 0.24           |

R<sup>2</sup>; doğrusalılık, %RSD; tekrarüretilebilirlik, LOQ; en düşük teşhis limiti, LOD; en düşük tespit limiti

### 3.5.5 Stabilité

İlgili matris temelince hazırlanmış kalibratörlerden belirlenen 50 ng/ml konsantrasyonundaki numuneye, numune hazırlığı uygulanmış ve şeffaf viallere aktarılmıştır. Işıklandırması kapalı ve 8°C’ye ayarlı otoörnekleyici ünitesinde 24 saat içerisinde çeşitli zaman periyotlarında tekrar analiz edilerek kantitatif değerleri saptanmıştır. Bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalamasının nominal değerin ± %15’i içinde kalması kriter olarak alınmıştır.

Tablo 15. Tam kan, idrar ve DBS matrislerinin vial stabilitesi

| TAM KAN                    |                      |                   |           |                                    |           |                                    |           |                                    |           |
|----------------------------|----------------------|-------------------|-----------|------------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|
| Stabilite (Saat)           | Hedef değeri (ng/mL) | AB-PINACA (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-4-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-5-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA N-pentanoik asit (ng/mL) | Sapma (%) |
| Vial stabilite 0h Tam Kan  | 50                   | 50.24             | 100.48    | 49.10                              | 98.20     | 50.92                              | 101.84    | 50.71                              | 101.42    |
| Vial stabilite 2h Tam Kan  | 50                   | 49.17             | 98.34     | 48.78                              | 97.56     | 50.26                              | 100.52    | 50.30                              | 100.60    |
| Vial stabilite 6h Tam Kan  | 50                   | 50.07             | 100.14    | 48.74                              | 97.48     | 50.56                              | 101.12    | 50.77                              | 101.54    |
| Vial stabilite 12h Tam Kan | 50                   | 49.43             | 98.86     | 51.16                              | 102.32    | 50.75                              | 101.50    | 50.56                              | 101.12    |
| Vial stabilite 18h Tam Kan | 50                   | 50.03             | 100.06    | 48.46                              | 96.92     | 50.82                              | 101.64    | 49.87                              | 99.74     |
| Vial stabilite 24h Tam Kan | 50                   | 50.13             | 100.26    | 49.87                              | 99.74     | 50.86                              | 101.72    | 47.92                              | 95.84     |
| İDRAR                      |                      |                   |           |                                    |           |                                    |           |                                    |           |
| Stabilite (Saat)           | Hedef değeri (ng/mL) | AB-PINACA (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-4-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-5-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA N-pentanoik asit (ng/mL) | Sapma (%) |
| Vial stabilite 0h İdrar    | 50                   | 49.55             | 99.10     | 48.99                              | 97.98     | 49.78                              | 99.56     | 49.82                              | 99.64     |
| Vial stabilite 2h İdrar    | 50                   | 49.74             | 99.48     | 49.29                              | 98.58     | 49.11                              | 98.22     | 50.25                              | 100.50    |
| Vial stabilite 6h İdrar    | 50                   | 49.07             | 98.14     | 50.38                              | 100.76    | 48.90                              | 97.80     | 48.53                              | 97.06     |
| Vial stabilite 12h İdrar   | 50                   | 48.82             | 97.64     | 49.10                              | 98.20     | 49.01                              | 98.02     | 48.22                              | 96.44     |
| Vial stabilite 18h İdrar   | 50                   | 49.43             | 98.86     | 49.07                              | 98.14     | 49.40                              | 98.80     | 48.11                              | 96.22     |
| Vial stabilite 24h İdrar   | 50                   | 48.27             | 96.54     | 49.05                              | 98.10     | 48.26                              | 96.52     | 47.50                              | 95.00     |
| DBS                        |                      |                   |           |                                    |           |                                    |           |                                    |           |
| Stabilite (Saat)           | Hedef değeri (ng/mL) | AB-PINACA (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-4-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA-5-hidroksipentil (ng/mL) | Sapma (%) | AB-PINACA N-pentanoik asit (ng/mL) | Sapma (%) |
| Vial stabilite 0h DBS      | 50                   | 50.41             | 100.82    | 50.40                              | 100.80    | 50.36                              | 100.72    | 50.75                              | 101.50    |
| Vial stabilite 2h DBS      | 50                   | 50.39             | 100.78    | 51.35                              | 102.70    | 49.39                              | 98.78     | 49.84                              | 99.68     |
| Vial stabilite 6h DBS      | 50                   | 50.19             | 100.38    | 49.35                              | 98.70     | 48.35                              | 96.70     | 49.35                              | 98.70     |
| Vial stabilite 12h DBS     | 50                   | 49.73             | 99.46     | 49.14                              | 98.28     | 49.48                              | 98.96     | 49.10                              | 98.20     |
| Vial stabilite 18h DBS     | 50                   | 48.85             | 97.70     | 48.57                              | 97.14     | 48.47                              | 96.94     | 48.49                              | 96.98     |
| Vial stabilite 24h DBS     | 50                   | 48.30             | 96.60     | 48.64                              | 97.28     | 48.18                              | 96.36     | 47.74                              | 95.48     |

### 3.5.6 Seçicilik (selectivity) ve özgüllük (specificity)

Sentetik matrisler geliştirilmiş numune hazırlık protokolüne enjeksiyona hazır hale getirilerek, çalışma kapsamındaki analitlerin alıkonma zamanında dedeksiyon sinyalinin olup olmadığı incelenmiştir ve olası benzer yapı/kütle geçişli interferansların olmadığı görülmüştür.

## 4 TARTIŞMA

Esrardaki birincil psikoaktif bileşik olan THC, CB1 ve CB2 beyin kannabinoid reseptörleri ile etkileşerek aktivitesini göstermektedir. THC'nin sentetik analogları içildiğinde, aynı reseptörleri bağlayarak esrarın psikotropik etkilerini taklit etmektedir, ancak çeşitli psikiyatrik semptomlara ek olarak merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem disfonksiyonu gibi bir dizi ciddi yan etki göstermektedir (63).

SKN'lerin genellikle diğer eğlence amaçlı uyuşturucular veya alkolle birlikte alınması, gözlemlenen etkilerin belirli bir ürüne atfedilmesini zorlaştırmaktadır. SKN'ler başlangıçta kötü amaçlı tüketim için değil, terapötik kullanım için ilaçlar olarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte, etkilerinin klasik kanabinoidlere benzemesinin yanı sıra özel bir mevzuatın olmaması, yeni moleküllerin sentezi ve kolay elde edilmesi nedeniyle rekreasyonel tüketimlerinin artmasına sebep olmuştur. 2000'li yıllarda SKN'ler yasa dışı amaçlarla kullanılmaya başlanmış ve bu tip bileşikler de içeren bitkisel ürün karışımları birçok Avrupa ülkesinde dağıtılmaya başlanmıştır. Bu maddeler çoğunlukla Çin'deki kimya şirketleri tarafından sentezlenmekte ve daha sonra bitkisel ürünler ve organik çözücüler ile karıştırılarak toz halinde Avrupa'ya ihraç edilmektedir. Türkiye de bu transfer yolları açısından Balkan Rotası üzerinde olması sebebiyle kritik bir öneme sahiptir.

Ayrıca, rutin toksikoloji tarama prosedürleri, özellikle esrar tespiti için hedeflenenler, YPM'lerin varlığını tespit edememektedir. Biyolojik örneklerde bunların tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için daha spesifik ve daha hassas yöntemler gerekmektedir. YPM'lerin çeşitliliğindeki artış, rutin laboratuvarların veritabanlarının sürekli güncellenmesi gerekliliği ile analitik zorluk oluşturmaktadır. Geleneksel tarama testleri, spesifik olmayan immünoanalizlere dayandıkları için yanılabilmektedir. Enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan florokinolon antibiyotiklerin, önceki nesil opiat immünolojik testleriyle çapraz reaksiyona girdiği daha önce doğrulanmıştır. Yapılan bir çalışma, levofloksasinin, iki opioid (buprenorfin ve morfin) için modern immünolojik testlerle çapraz reaksiyona girdiğini ve moksifloksasinin ise amfetamin/metamfetamin testiyle çapraz reaksiyona girdiğini

göstermektedir. Terapötik kullanımla uyumlu florokinolonların idrar konsantrasyonları, pozitiflik için yaygın olarak kullanılan eşik değerlerin üzerinde sonuçlar üretmiştir. Bu, öncül pozitif idrar ilaç taramalarının doğrulama testinin gerekliliğinin altını çizmektedir. Günümüzde SKN'leri ve metabolitleri belirlemek için oldukça spesifik ve hassas analitik tekniklerin kullanılması zorunludur ve analiz edilecek biyolojik numunenin dikkatli bir şekilde seçilmesi de önemlidir.

Yapılan bilimsel çalışmalarda biyolojik örneklerde SKN'lerin tayini için, kütle spektrometrik detektörlere (GC-MS ve LC-MS) bağlı gaz veya sıvı kromatografisi yöntemleri tarif edilmiştir. GC-MS yönteminde ana molekülleri tespit edebilmek için numune hazırlık aşamasında türevlendirme işlemi gerekmektedir. Türevlendirme işlemi de hem zaman alıcı hem de maliyetli bir adımdır. Bu işlemi takiben GC-MS analizlerinde sonuç alma süreci 1 saati bulabilmektedir. GC-MS'e karşılık, LC-MS/MS tabanlı prosedürlerin, metabolitler için özel avantajlarla birlikte SKN'lerin tanımlanması ve miktar tayininde baskın olması şaşırtıcı değildir. Bunun yanı sıra, SKN'lerin hidrosillenmiş metabolitleri benzer geçişlere sahip olabilir ve bu aşamada LC-MS/MS yönteminde uygun analitik kolon ile kromatografik olarak ayrılmaları sağlanabilmektedir. Bu ayırım özellikle idrar matrisinde sıkça karşımıza çıkan metabolitlerinin tespitine hatta miktarlandırılmasına olanak sağlamaktadır. Yüksek duyarlılığı ve seçiciliği, kullanım kolaylığı ve geniş analitik uygulanabilirliği nedeniyle, LC-MS/MS, immunolojik testlerle tespit edilemeyen analitlerin taranması ve doğrulanmasında yaygın olarak tercih edilmektedir (46,64).

2020 yılında (Carmen T. Mulet ve ark.) ve 2019 yılında ( Franziska Gaunitz ve ark.) yapılan çalışmalarda SKN ve metabolitlerini analiz edebilen LC-MS/MS metodolojisi geliştirilmiştir. Ancak yüksek maliyet ve uzun ön işleme sebep olan SPE kullanılmış ve tek enjeksiyon/eş zamanlı analiz yerine raporlama süresini uzatan iki ayrı enjeksiyon uygulanmıştır.

Çalışma kapsamında, numune hazırlık protokolü; düşük maliyet ve kısa sürede raporlama anlayışı benimsenerek, tam kan matrisi için “protein çöktür ve enjekte et”, idrar matrisi için “seyrelt ve enjekte et” ve DBS matrisi için ise “ektrakte et ve enjekte

et” prensibinde oluşturulmuştur. Bu prensipler doğrultusunda hiç bir matris numune hazırlığında SPE kullanılmadan, AB-PINACA ve metabolitleri tek enjeksiyonda eş zamanlı analiz temelinde LC-MS/MS metodoloji tamamlanmıştır.

DBS, hızlı, basit numune alımı ve oda sıcaklığında saklama/transfer koşulları sağlamasının yanında, kantitatif ölçümler için DBS örneklerinin kullanılması, kan viskozitesi (hematokrit) ve spot homojenliği arasındaki farklar nedeniyle analitik sonucu etkileyebilmektedir. Çünkü doğrudan parmak ucuyla kağıda emdirilecek kanın tam miktarı belli değildir. Bunun çözümü için, çalışma kapsamında da kullanılan Hemaxis volümetrik aparat, belirli miktarda kanın toplanmasını sağlamakta ve bir spotun 10 µL kan içerdiği bilinmektedir. Analiz sırasında spotun tamamı kullanıldığında hematokrit problemi ortadan kalkmaktadır. Küçük kan hacimlerinin kullanılmasıyla ilişkili ekstra bir zorluk, bileşiklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için oldukça hassas tekniklere duyulan ihtiyaçtır. İmmünolojik testler bazı durumlarda DBS analizi için kullanılabilmesine rağmen, spesifik olmayan bağlanmaya ve endojen bileşenlerle ve/veya yapısal olarak ilgili uyuşturucular/ilaçlar ve metabolitlerle çapraz reaktiviteye tabidirler. Bu noktada, LC-MS/MS teknikleri oldukça hassas ve spesifik analiz metotlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

DBS ile elde edilen ümit verici sonuçlar, DBS örneklemesinin hızlı niteliği ve DBS numunesinin kararlılığı (her ikisi de uyuşturucu etkisi altında olan vakalarda kilit öneme sahiptir) gibi belirli avantajlarıyla birleştirildiğinde, DBS analizinin gelecekteki yol kenarı uyuşturucu testlerinde rol oynayabileceği öngörülmektedir (65). DBS metodolojisinde iç standart içeren ekstraksiyon solüsyonunun kullanılması, ekstraksiyon geri kazanımındaki olası varyasyonları telafi ederek, kantitatif analiz sonucunu etkileyen tüm numune hazırlık aşamalarından ve matristen kaynaklanan faktörleri safdışı bırakmaktadır (56).

DBS matrisinin en kritik dezavantajı ise adli toksikolojide delil materyalleri (kan, idrar, saç, tırnak, organ sıvısı, organ, kemik vb.) arasında bulunmamasıdır. Bu sebeple yol kenarı kontrollerinde, denetimli serbestlikte, iş yeri testi, doping kontrolü, olay yeri gibi alanlarda geleneksel biyolojik materyaller delil olarak toplanmaktadır. Ancak

toksikoloji alanında gelişen teknoloji ve artan çalışmalar doğrultusunda, gelecek yıllarda DBS matrisinin bu materyaller arasına girmesi sürpriz olmayacaktır. Çalışmaya dahil edilen bu matris gelecek çalışmalara örnek teşkil edecektir.



## 5 SONUÇ

Geleneksel doğal uyuşturucuların yanı sıra YPM'lerin, özellikle son 20 yıldır hem dünya genelinde hem de Balkan Rotası'nda bulunan Türkiye'de kullanımı artmıştır. Bu artış toplumsal ve sosyal sağlığı tehdit etmektedir. YPM'ler molekül yapılarının piyasaya sürüldükten sonra bir adli kontrole yakalanmasının akabinde aydınlatılabilmesi sebebiyle yetkililer tarafından kontrolü zorlaşmaktadır. Kimyasal yapılarının saptanmasının ardından yasaklı madde listesine alınan YPM'lerin adli bir olayda kalitatif ve kantitatif analizi delil niteliğindedir. Çalışma kapsamında geliştirilen metodoloji YPM sınıfının en yaygın kullanımına sahip AB-PINACA ve metabolitlerinin tam kan, idrar ve DBS matrislerinde eş zamanlı analizine imkan sunmaktadır. Bu ve benzeri analiz yöntemlerinin artışı, uyuşturucu madde ile mücadelede önemli bir adımdır. Yine çalışma kapsamında alternatif matris olan DBS'in kullanılması, olay yerinden kolay numune alımına olanak sağlama hususundaki çalışmalara dikkat çekmektedir.

Geliştirilen hassas, özgül ve seçici olan LC-MS/MS metodolojisi validasyon kılavuzlarına uygun şekilde valide edilerek, her bir matris ve analit için LOQ değerleri 0,9 ng/mL konsantrasyonun altında bulunmuştur. Yine her bir matris ve analit için validasyon kapsamında geri kazanım değerleri %95-100 arasında tespit edilirken, tekrarlanabilirlik değerleri (%RSD) ise %6'nın altındadır. Böylece ilgili kılavuzlarda vurgulanan kabul kriterleri sağlanmıştır. Validasyon çalışmasının yanında, her bir numune hazırlık sonrası enjeksiyon süreci için vial stabilite testi yapılmıştır. Elde edilen veriler hedef moleküllerin vial içerisinde 24 saat stabil kaldığını göstermiştir.

Çalışmanın analitik anlamdaki en önemli zorluğu, birbirinin izomeri olan, AB-PINACA N-(4-hidroksipentil) ve AB-PINACA N(5-hidroksipentil) metabolitlerinin kromatografik ayrımıydı. Bu aşamada ayrıma uygun analitik kolon, uygun mobil faz akış programı yapılan bir seri deneme sonunda belirlenmiştir.

Çapraz reaksiyonların analiz sonuçlarının güvenilirliğine gölge düşürdüğü immunolojik esaslı analitik tekniklerden, kromatografik temelli analiz çözümlerine

geçiş her geçen gün artmaktadır. Kütle spektrometrisi, çeşitli hastalıkların tanısına yönelik spesifik biyobelirteç keşfine olanak tanıdığı gibi, ilgili biyomateriyaldeki hedefli biyobelirteçlerin izlenmesine ve konsantrasyonlarının tayinine de imkân sunabilmektedir. Bununla birlikte ilaç düzeyi takibini, uyuşturucu madde ve kötüye kullanılan ilaçların tespitine imkan sağlamaktadır. Bilimsel gelişmeler ışığında dinamik bir süreci temsil eden bu tür çalışmalar, uyuşturucu madde dedeksiyonuna ve metabolizmasının incelenmesine yönelik yeni ufuklar açabilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de, kromatografi ve kütle dedeksiyon prensiplerine dayanan analitik metotlara yönelim ivme kazanmaktadır.

LC-MS/MS tekniği özellikle hedefli analiz imkanı sağlayarak, kompleks matrislerde konsantrasyonları oldukça düşük analitlerin hassas ve doğru şekilde ölçümünü gerçekleştirebilmektedir. Alternatif matris DBS'den, birkaç mikrolitre kanda bulunan düşük miktarlarda analiti saptamak için hassas analitik tekniklere gereksinim bulunmaktadır. Geliştirilen analiz metodu, tam kan ve idrar gibi geleneksel örneklerinin yanısıra, özellikle daha az invaziv yolla ve anlık toplanabilen ve analit kararlılığını yükselten DBS örneklerine de uygulanmıştır. DBS numunesi soğutulmadan gönderilip depolanabilmekte, bu da daha kolay ve daha düşük maliyetli lojistik sağlamaktadır. Diğer yandan, çalışma kapsamında tam kan, idrar ve DBS biyomatrisleri için reaktifli türevlendirme, solvent tüketimini zaruri kılan sıvı-sıvı ekstraksiyon veya katı faz ekstraksiyonu gibi laboratuvar adımlarına gerek duymadan gerçekleştirilen numune hazırlıkları çevre dostu ve etkin maliyetli nitelikte olmuştur.

## 6 KAYNAKLAR

1. Félix Zapata, José Manuel Matey, Gemma Montalvo, Carmen García-Ruiz, “Chemical Classification of New Psychoactive Substances (NPS)”, Microchemical Journal, 2020.
2. Jorge J. Zacca, Gabriella H. Giudice, Mônica P. Souza, Luíza N.B. Caldas, Maurício L. Vieira, Angelo H.L. Machado, “Development and Validation of Analytical Method for Identification of New Psychoactive Substances Using Linear Retention Indexes and Gas Chromatography-Mass Spectrometry”, Journal of Chromatography A, 2021.
3. Tuncay Küme, Çiğdem Karakükcü, Aslı Pınar, Hakan Coşkun, “Yasadışı ve Kötüye Kullanılan Madde Analizlerinin Kapsamı, Kalite ve Güvenlik Gereklilikleri”, Türk Psikiyatri Dergisi 2017.
4. Nikhil Mali, Manisha Karpe and Vilasrao Kadam, “A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse”, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011.
5. Marie Katrine Klose Nielsen, Sys Stybe Johansen, Petur Weihe Dalsgaard, Kristian Linnet, “Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOFMS”, Forensic Science International, 2010.
6. Anne Marie Ciobanu, Daniela Baconi, Cristian Bălălu, Carolina Negrei, Miriana Stan, Maria Bărcă, “Toxicological analysis of some drugs of abuse in biological samples”, Journal of Mind and Medical Sciences, 2015.
7. Markus Zilker, Fritz Sörgel, Ulrike Holzgrabe, “A long-time stability study of 50 drug substances representing common drug classes of pharmaceutical use”, Drug Test Anal, 2019.
8. [www.yesilay.org.tr](http://www.yesilay.org.tr)
9. P. Fern´andez, M. Gonz´alez, M. Regenjo, A.M. Ares, A.M. Fern´andez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, “Analysis of Drugs of Abuse i Human Plasma Using Microextraction by Packed Sorbents and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography”, Journal of Chromatography A, 2017.
10. João L. Gonçalves, Vera L. Alves, Joselin Aguiar, Helena M. Teixeira & José S. Câmara “Synthetic cathinones: an evolving class of new psychoactive substances” Critical Reviews in Toxicology, 2019.
11. Pınar Efeoğlu Özşeker, Aybike Dip, Nebile Dağhoğlu, Mete Korkut Gülmen “Sentetik kannabinoidler: Yeni nesil esrar”, Türk Aile Hek Derg 2017; 21 (1): 34-40.
12. Laureen J Marinetti ve Heather M Antonides “Analysis of Synthetic Cathinones Commonly Found in Bath Salts in Human Performance and Postmortem Toxicology: Method Development, Drug Distribution and Interpretation of Results” Journal of Analytical Toxicology 2013;37:135–146.
13. Yongho Shin, Tae Yeon Kong, Jae Cheol Cheong, Jin Young Kim, Jae Il Lee, Hye Suk Lee, “Simultaneous determination of 75 abuse drugs including amphetamines, benzodiazepines, cocaine, opioids, piperazines, zolpidem and metabolites in human hair samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry”, Biomedical Chromatography. 2019;33:e4600, 2019.

14. Elham Alahyari, Mehrdad Setareh, Ahmad Shekari, Gholamreza Roozbehani, Kambiz Soltaninejad, "Analysis of opioids in postmortem urine samples by dispersive liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography with photo diode array detection", Alahyari et al. Egyptian Journal of Forensic Sciences (2018) 8:13, 2018.
15. Dino Luethi, Matthias E. Liechti, "Designer drugs: mechanism of action and adverse effects", Archives of Toxicology, 2020.
16. Nadia Arbouche, Jean-Sebastien Raul1, Delphine Garnier, Pascal Kintz, Alice Ameline, "Testing for AB-PINACA in human hair: Distribution in head hair versus pubic hair", Drug Test Anal., 2019.
17. Kelly Francisco da Cunha, Karina Diniz Oliveira, Marilyn A. Huestis, Jose Luiz Costa, "Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC–MS–MS", J Anal Toxicol., 2020.
18. Leandro Nóbrega, Ricardo Jorge Dinis-Oliveira, "The synthetic cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP): pharmacokinetic and pharmacodynamic clinical and forensic aspects", Drug Metabolism Reviews, 2018.
19. Türkiye Uyuşturucu Raporu, Eğilimler ve Gelişmeler, EGM Yayın Katalog No: 752, NDB Yayınları: 40, Yayın No: 2022/7, 1. Baskı, 2022.
20. Yi He and Marta Concheiro-Guisan "Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology", Biomedical Chromatography. 2019.
21. Karen E. Moeller et al., "Clinical Interpretation of Urine Drug Tests: What Clinicians Need to Know About Urine Drug Screens" Mayo Clin Proc. n May 2017.
22. Nazife Doğan, "Adli Toksikolojik Analiz Testlerinin Kalite Yönetim Sürecine Uygunluğu", İstanbul, 2019.
23. Moeller, K. E., Lee, K. C., & Kissack, J. C., "Urine Drug Screening: Practical Guide for Clinicians", Mayo Clinic Proceedings, 2008.
24. Gifford Lum, MD, Barry Mushlin, "Urine Drug Testing: Approaches to Screening and Confirmation Testing", 2004.
25. "Forensic Toxicology-Chapter 14", Fundamentals of Forensic Science, 2015.
26. Carla Ferreira, Cathy Paulino, Alexandre Quintas "Extraction Procedures for Hair Forensic Toxicological Analysis: A Mini-Review" Chemical Research in Toxicology, 2019.
27. Markus R Baumgartner "Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis?", Bioanalysis, 2014.
28. Sahar Y. Issa, "Forensic Toxicology, Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?", Intechopen, 2019.
29. Carolina Noble, Annelies Cannaert<sup>2,3</sup>, Kristian Linnet, Christophe P. Stove, "Application of an activity-based receptor bioassay to investigate the in vitro activity of selected indole- and indazole-3-carboxamide-based synthetic cannabinoids at CB1 and CB2 receptors", Drug Testing and Analysis, 2019.

30. Asmaa A. Hashem, Suzan M. Mahmoud, Rasha E. Abou Anza, Walaa G. Abdelhamid, "Pattern of Acute Synthetic Cannabinoids Toxicity in Patients Presented to the Poison Control Center of Ain Shams University Hospitals", *Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*, 2021.
31. Ersin Göl, İsmet Çok, "Assessment of Types of Synthetic Cannabinoids in Narcotic Cases Assessed By the Council of Forensic Medicine Between 2011-2015, Ankara,Turkey.", *Forensic Science Internatinol*, 2017.
32. Vincenzo Abbate, Michael Schwenk, Brandon C. Presley and Nahoko Uchiyama, "The ongoing challenge of novel psychoactive drugs of abuse. Part I. Synthetic cannabinoids (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.* 2018.
33. Damon Borg, Anna Tverdovsky, Richard Stripp, "A Fast and Comprehensive Analysis of 32 Synthetic Cannabinoids Using Agilent Triple Quadrupole LC-MS-MS", *Journal of Analytical Toxicology*, 2016.
34. Carmen T. Mulet, Anamary Tarifa, Anthony P. DeCaprio "Comprehensive analysis of synthetic cannabinoids and metabolites in oral fluid by online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020.
35. Laureen J Marinetti ve Heather M Antonides "Analysis of Synthetic Cathinones Commonly Found in Bath Salts in Human Performance and Postmortem Toxicology: Method Development, Drug Distribution and Interpretation of Results" *Journal of Analytical Toxicology* 2013.
36. Frank T Peters, "Drugs of abuse: type and methods of analysis-Chapter 7", *Future Science*, 2013.
37. Megan A. Rech, Elisabeth Donahey, Jacqueline M. Cappiello Dziedzic, Laura Oh, Elizabeth Greenhalgh, "New Drugs of Abuse", *Pharmacotherapy*, 2014.
38. Aslıhan Okan İbiloğlu, Abdullah Atlı, Mehmet Güneş, "Sentetik Kannabinoidler", *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2017.
39. Xingxing Diao, Marilyn A. Huestis, "Approaches, Challenges and Advances in Metabolism of New Synthetic Cannabinoids and Identification of Optimal Urinary Marker Metabolites", *Clinical Pharmacology&Therapeutics*, 2016.
40. Ariane Wohlfarth, Marisol S. Castaneto, Mingshe Zhu, Shaokun Pang, Karl B. Scheidweiler, Robert Kronstrand, Marilyn A. Huestis, "Pentylindole/Pentylindazole Synthetic Cannabinoids and Their 5-Fluoro Analogs Produce Different Primary Metabolites: Metabolite Profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA", *The AAPS Journal*, 2015.
41. Esther F.A. Brandon, Christiaan D. Raap, Irma Meijerman, Jos H. Beijnen, Jan H.M. Schellens, "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013.
42. Elias Djilali, Lucia Pappalardo, Anna Maria Posadino, Roberta Giordo, Gianfranco Pintus, "Effects of the Storage Conditions on the Stability of Natural and Synthetic Cannabis in Biological Matrices for Forensic Toxicology Analysis: An Update from the Literature", *Metabolites*, 2022.

43. Kanai K, Takekawa K, Kumamoto T, Ishikawa T, Ohmori T. "Simultaneous analysis of six phenethylamine-type designer drugs by TLC, LC-MS, and GCMS.", *Forensic Toxicol.* 2008.
44. Jessica M. Boyda, S.M. Hossein Sadrzadeh, "Limitations of immunoassays for screening of drugs of abuse in urine: issues of false positive and false negative results", *Accurate Results in the Clinical Laboratory*, Second Edition, 2019.
45. Raimo A. Ketola, Pirkko Kriikku, "Drug concentrations in post-mortem specimens", *Drug Testing and Analysis* 2019.
46. Colby J. M., "Commonly used fluoroquinolones cross-react with urine drug screens for opiates, buprenorphine, and amphetamines", *Clin Biochem.* 2019.
47. Paul J. Jannetto and Robert L. Fitzgerald, "Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory", *Clinical Chemistry*, 2016.
48. Arpino, Patrick J. Trying to arrange a difficult marriage: A report on the workshop on liquid chromatography mass spectrometry, held in Montreux, Switzerland, 22-23 October 1981, *Biological Mass Spectrometry*, Volume 9, Issue 4, 1982.
49. Johannes M.W. van den Ouweland, Ido P. Kema "The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory", *Journal of Chromatography B*, 2012.
50. Kerstin Henkel et al., "Full validation of a method for the determination of drugs of abuse in non-mineralized dental biofilm using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to postmortem samples", *Talanta*, Volume 176, 2018.
51. Dilek Kaya-Akyüzlü, Zeliha Kayaaltı, "Kan, Saç, İdrar ve Solunum Havası Örneklerinin Bağımlılık Yapan Maddelerin Analizinde Kullanımı", *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2015.
52. Gallardo E, Barroso M, Queiroz JA. "LC-MS: A powerful tool in workplace drug testing." *Drug Test Anal* 2009;1:109–15, 2009.
53. Abdulaziz A. Aldubayyan, Erika Castrignanò, Simon Elliott, Vincenzo Abbate, "Stability of synthetic cathinones in clinical and forensic toxicological analysis—Where are we now?", *Drug Test Anal.* 2021.
54. Yang Wang, Yan Shi, Yingjia Yu, Lizhu Chen, Jiebing Jiang, Jiakun Long, Ping Xiang, Gengli Duan, "Screening of Synthetic Cathinones and Metabolites in Dried Blood Spots by UPLC–MS–MS" *Journal of Analytical Toxicology*, 2020.
55. Cagdas Ufuk Kacargil, Nebile Daglioglu, Smail Ethem Goren "Determination of Illicit Drugs in Dried Blood Spots by LC–MS/MS Method: Validation and Application to Real Samples", 2020, *Chromatographia*.
56. Sara Odoardi, Luca Anzillotti, Sabina Strano-Rossi "Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC–MS/MS analysis of drugs of abuse", *Forensic Science International* 243, 2014.
57. Matteo Moretti et al., "Determination of Antidepressants and Antipsychotics in Dried Blood Spots (DBSs) Collected from Post-Mortem Samples and Evaluation of the Stability over a Three-Month Period", *Molecules* 2019.
58. "MassHunter Data Acquisition for 6400 Series Triple Quad LC/MS Familiarization Guide"

59. Pandopulos ve ark. 'A Sensitive Method for the Recovery and Analysis of Cannabinoids from Wastewater', *Talanta*, 2020.
60. Borg ve ark. 'A Fast and Comprehensive Analysis of 32 Synthetic Cannabinoids Using Agilent Triple Quadrupole LC-MS-MS', *Journal of Analytical Toxicology*, 2016.
61. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Biopharmaceutics, May 2018.
62. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis Step5, EMA/CHMP/ICH/172948/2019.
63. Michele Protti, James Rudge, Angelo Eliseo Sberna, Gilberto Gerra, Laura Mercolini, "Dried haematic microsamples and LC-MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids", *Journal of Chromatography B*, 2016.
64. Tiago Rosado, Joana Gonçalves, Angelo Luis, Sara Malaca, Sofia Soares, Duarte Nuno Vieira, Mario Barroso, Eugenia Gallardo, "Synthetic cannabinoids in biological specimens: a review of current analytical methods and sample preparation techniques", *Bioanalysis*, 2018.
65. Nele Sadones, Sara Capiou, Pieter MM De Kesel, Willy E Lambert, Christophe P Stove "Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots", *Bioanalysis*, 2014.

## 7 ÖZGEÇMİŞ



