

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

JWH-018 VE METABOLİTLERİNİN LC-MS/MS İLE KAN VE İDRARDA
TAYİNLERİ

YETER EROL ÖZTÜRK

DANIŞMAN
PROF.DR. BUKET ALPERTUNGA

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Yeter Erol tarafından hazırlanan JWH-018 ve Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

26 / 11 / 2014

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA

İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

2.Prof.Dr. MÜNEVVER AÇIKKOL

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü

3.Doç.Dr. GÜL ÖZHAN

İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

4.

5.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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.

Yeter EROL ÖZTÜRK



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danıŐmanım Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA' ya, Adli Tıp Kurumu BaŐkanı Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK' e, katkılarından dolayı Dr. Oya YETER' e, desteğini esirgemeyen aileme ve eŐim Serkan ÖZTÜRK' e, dostlarım Gülter AKYOL YILMAZ, NeŐe SAVAŐ, Fulya ÖZSOY ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu alıŐma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:28809.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	I
BEYAN	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLOLAR LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sentetik Kannabinoidler	3
2.2. JWH-018	5
2.2.1. Farmakokinetik Özellikleri	5
2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	7
2.2.3. Toksikolojik Etkileri.....	10
2.2.3.1. Akut Etkileri.....	10
2.2.3.2. Uzun Dönem Etkileri	12
2.2.4. Yasal Kısıtlamalar	12
2.2.5. Analiz yöntemleri	15
2.3. LC-MS/MS Yöntemi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler	30
3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	30
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	30
3.2.2. Çözeltiler	31
3.3. Biyolojik Örnekler.....	34
3.4. Kan ve İdrar Örneklerin Hazırlanması	34
3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Şartları	35
3.5.1. Likit Sistem Özellikleri.....	35
3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri	36
3.6. Validasyon Çalışmaları.....	38
3.6.1. Seçicilik Çalışmaları.....	39

3.6.2.	Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	39
3.6.3.	Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	40
3.6.4.	Geri Kazanım.....	40
3.6.5.	Kesinlik.....	41
3.6.6.	Kararlılık	41
3.7.	İstatistiksel Analiz	41
4.	BULGULAR	42
4.1.	Metot Validasyonu	42
4.1.1.	Seçicilik	42
4.1.2.	Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	46
4.1.3.	Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı LOQ).....	48
4.1.4.	Geri Kazanım.....	51
4.1.5.	Kesinlik.....	52
4.1.6.	Kararlılık	53
5.	TARTIŞMA.....	55
	KAYNAKLAR.....	59
	ETİK KURUL KARARI	68
	ÖZGEÇMİŞ	69

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: JWH-018 ve metabolitlerinin materyal, numune hazırlama yöntemi, tayin sınırları ile ilgili yapılan çalışmalar	16
Tablo 3-1: LC-MS/MS likit sistemi akış özellikleri	36
Tablo 3-2: JWH-018, Metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsor İyon, DP(Kümeleşme Önleyici Potansiyel) ,EP(Giriş Potansiyeli), CE(Parçalanma Enerjisi), CXP(Parçalanma Çıkış Enerjisi) ve Alıkonma zamanı değerleri.....	37
Tablo 4-1: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve korelasyon katsayıları.....	48
Tablo 4-2: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD ve LOQ değerleri (n=10).....	51
Tablo 4-3: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kanda geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).....	51
Tablo 4-4: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için idrarda geri kazanım ,matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).....	52
Tablo 4-5: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=10).	52
Tablo 4-6: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.....	53
Tablo 4-7: JWH-018:-20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi.	53
Tablo 4-8: JWH-018 N-Pentanoik Asit: -20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi.	54
Tablo 4-9: JWH-018 N-(5-hidroksipentil):-20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi. 54	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: “Headshop”lar ve internet üzerinden satılan farklı ambalaj ve isimli sentetik kannabinoidler.....	4
Şekil 2-2: JWH-018’in Kimyasal Yapısı (Naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanon).....	5
Şekil 2-3: JWH-018 N-pentanoik asit(a),JWH-018 N-(5-hidroksipentil)(b) ve 7	7
Şekil 2-4: Fosfolipidler ve araşidonik asit bağımlı biyokimyasal proseslerde THC ve kannabinoidlerin etkileri.....	8
Şekil 2-5: JWH-018 metabolizması ve CB1 ve CB2 reseptörleri üzerindeki etkileri.....	9
Şekil 2-6: 2005-2012 yılları arasında EMCDDA EWS verileri [42].	13
Şekil 2-7: 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı resmi gazete [44].	14
Şekil 2-8: LC-MS/MS sistemi	21
Şekil 2-9: Adli Tıp Kurumu’nda kullanılan LC-MS/MS sistemi temel bileşenleri	22
Şekil 2-10: Analitik kolonda ayırma mekanizması	23
Şekil 2-11: “İyon kaynağı” ve bileşenleri.....	24
Şekil 2-12: İyon kaynağında moleküler iyon oluşumu.....	25
Şekil 2-13: LC-MS/MS cihazında kullanılan ESI ve APCI propları	26
Şekil 2-14: Kütle analizörü çalışma prensibi	27
Şekil 2-15: LC-MS/MS moleküler iyon parçalanması ve parçalanma ürünü oluşumu.....	28
Şekil 2-16: Kuadrupoller ve sıralanma şekilleri.....	29
Şekil 3-1: Kan/İdrar örneklerinin SPE yöntemi ile ekstraksiyonu	35
Şekil 3-2: İnfüzyon sırasında moleküler iyondan elde edilmiş JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B), JWH-018 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) maddelerine ait iyon spektrumları	38
Şekil 4-1: Kör kan numunesi total kromatogramı(TIC).....	42
Şekil 4-2: Kör idrar numunesi total kromatogramı(TIC).....	42
Şekil 4-3: Kör kan numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı	43
Şekil 4-4: Kör idrar numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı.....	43
Şekil 4-5: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış kan numunesi total kromatogramı.....	44
Şekil 4-6: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış idrar numunesi total kromatogramı	44

Şekil 4-7: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış kanda JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları	45
Şekil 4-8: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış idrarda JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları	45
Şekil 4-9: JWH-018 kan kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4-10: JWH-018 N-Pentanoik Asit kan kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 4-11: JWH-018 N-(5-hidroksipentil) kan kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 4-12: JWH-018 idrar kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 4-13: JWH-018 N-Pentanoik Asit idrar kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 4-14: JWH-018 N-(5-hidroksipentil) idrar kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4-15: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B),JWH-018 N-(5-hidroksipentil)(C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.1 ng/mL)	49
Şekil 4-16: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B),JWH-018 N-(5-hidroksipentil)(C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.075 ng/mL)	50

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

$\mu\text{g/mL}$	Milyonda Bir Birim
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonlaştırma
CE	Parçalanma Enerjisi
CXP	Parçalanma Çıkış Enerjisi
DC	Doğrusal Akım
DP	Kümeleşme Önleyici Potansiyel
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu Ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
EP	Giriş Potansiyeli
ESI	Elektro Sprey İyonizasyon
EWS	Erken Uyarı Sistemi
GC/MS	Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
gr	Gram
IS	İnternal Standart
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi
LLQD	Kantitatif analiz alt sınırı
LOD	Teşhis Sınırı
LQD	Tayin Alt Sınırı
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
MRM	Çoklu Reaksiyon Görüntüleme
MS	Kütle Spektrometresi
MW	Moleküler Ağırlık
ng/mL	Milyarda Bir Birim
RF	Radyo Frekans
rpm	Dakikada Katedilen Dairesel Aç
RSD	Bağıl Standart Sapma
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
THC	Tetrahidrokannabinol
TIC	Total İyon Kromatogramı
UPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
μl	Mikrolitre

ÖZET

Erol Öztürk, Y. (2014). JWH-018 ve Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Başlangıçta esrarın etkilerini araştırmak üzere geliştirilen sentetik kannabinoidler şimdilerde esrara alternatif olarak kullanılmaktadır. CB1 ve CB2 kannabinoid reseptörlerine değişik derecelerde afinite gösteren farklı kimyasal yapılarda birçok sentetik kannabinoid bilinmektedir. Sentetik kannabinoid içeren bitkisel karışımlar *Spice, Yucatan Fire, Smoke, Sence, Skunk* ve *Space* gibi ticari isimlerle ve "Tütsü" olarak satılmaktadırlar.

JWH-018 ve ana metabolitlerinin kan ve idrar örneklerinde tayini için katı faz ekstraksiyonu ve likit kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak hassas ve spesifik bir metot geliştirilmiştir. Tüm analitler için doğrusal aralık 0.1–50 ng/mL olarak bulunmuştur. Kan ve idrar için tayin alt sınırı (LOD) değerleri 0.08 ve 0.14 ng/mL arasındadır. Ekstraksiyon etkinliği % 85.20 ve % 97.64 arasında değişmektedir. Gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirlik belirsizlik değerleri % 2- 8.8 aralığında bulunmuştur. JWH-018 ve metabolitleri kan, idrar ve metanol içerisinde incelenen koşullarda stabildir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, JWH-018, metabolitleri, kan, idrar

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:28809.

ABSTRACT

Erol Oztürk, Y. (2014). Determination of JWH-018 and metabolites in blood and urine with LC-MS/MS. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

First developed to study the cannabinoid receptor system, various synthetic chemicals are now being used recreationally as an alternative to cannabis. There are known lots of synthetic cannabinoids have varying degrees of affinity to CB1 and CB2 cannabinoid receptors with different chemical structures. These chemicals are named “herbal incense” and marketed with trade names as *Spice*, *Yucatan Fire*, *Smoke*, *Sence*, *Skunk* and *Space*.

A sensitive and specific method was developed using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the quantification and confirmation JWH-018 and its main metabolites in urine and blood. The linear range was found 0.1–50 ng/mL for all analytes. The range of detection limit was between 0.08 and 0.14 ng/mL for the blood and urine. The extraction efficiency ranged from 85.20% to 97.64%. Within and between-run imprecision was between 2% and 8.8%. JWH-018 and its metabolites were stable in blood, urine and in methanol under all conditions.

Key Words: LC-MS/MS, JWH-018, metabolites, blood, urine

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Project No: 28809.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

M.Ö. 2737 yılında ilk olarak Çin İmparatoru Shen-Nung kendi yazılarında esrarın malarya ve romatizma üzerindeki etkilerine dikkat çekerek esrarın yararlarından bahsetmiştir [1].

1964 yılında tetrahidrokannabinolün (THC) kenevir bitkisinden izolasyonunu takiben 1980'li yıllarda endokannabinoid reseptörleri CB1 ve CB2 keşfedilmiştir ve reseptörlerin etkilerini incelemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. 1990'lı yıllarda Huffman ve arkadaşları bu çalışmalarda kullanılmak üzere "JWH" olarak isimlendirilen bileşikler sentezlemişlerdir. 2004 yılında "Spice" diye adlandırılan ve sentetik kannabinoidleri içeren bitki karışımları internet yoluyla kullanıma sunulmuştur [2].

"Bu günlerde gençlerin partilerinde popüler hale gelen yeni bir ürün var ve bu ne bira ne de reçeteli bir ilaç. Bu gençleri uçuran bitkisel bir ürün ve tamamen yasal. Bu ürün K2 "Spice", bir çeşit sentetik esrar, içildiğinde esrar kadar uçuruyor. "K2" , "Spice" online ya da lokal dükkanlardan bulabilirsiniz"

Yukarıdaki cümle "Spice" isimli ürünün internet üzerinden pazarlanması amacıyla yazılmış bir reklam cümlesidir [2]. Spice Gold, Spice Silver, Spice Diamond, Spice Arctic Synergy, Tropical Spice ve Spice Egypt, Yuacatan Fire, Smoke, Sence ve ChillX gibi aynı içeriğe sahip olduğu iddia edilen ürünler bu markette yer almaktadır [3].

Birçok ülkede yasa dışı madde sentez laboratuvarları, henüz yasal düzenlemelerin dışında kalan ve ilaç izleme programlarında tespit edilmeyen bu grup maddeleri yasa koyucuları atlatmak, uyuşturucunun ticaretinin ve taşınmasının kolaylaşması bakımından iyi bir alternatif olarak görmüşlerdir. Şimdilerde "headshop"lar ve internet siteleri üzerinden farklı kombinasyonlarda (JWH-, CP-, HU-, AM-) bir dizi ürün satışa sunulmuştur. İçeriklerinin ve piyasa isimlerinin sürekli değişiyor olması bu ürünleri bir fenomen haline getirmiştir [4-8].

İlk olarak 2008 yılı sonlarında “*Spice*” ürünlerinde JWH-018 olarak adlandırılan sentetik kannabinoid tespit edilmiş ve 2009 yılı başlarından itibaren Avrupa Birliği Ülkelerinde JWH-018 içeren ürünler yasaklanmaya başlanmıştır.

“*Spice*” ürünlerinin kannabinoid tarzı etkiye sahip olması diğer denetime tabi ya da yasaklı narkotik maddelerde olduğu gibi suiistimal edilme risklerini arttırmakta, reklamlar aracılığıyla yasal oldukları izlenimi verilerek gençler ve buluş çağındakilerin kullanımı özendirilmektedir. Bu ürünlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan zehirlenme ve ölüm vakalarında son günlerde büyük artış gözlenmektedir.

Bu nedenle sentetik kannabinoidlerin kan ve idrarda tayin edilmesini sağlayan metotların geliştirilmesi önemlidir. Bu çalışmanın amacı yasa kapsamına yeni alınan JWH-018 maddesinin metabolitleri yardımıyla izlenmesi ve rapor edilmesini sağlayan seçici, güvenilir, tespit sınırı düşük ve ekonomik bir metot tasarlanması ve uygulanmasıdır. Ayrıca kan ve idrar matrislerinde kararlılık çalışmaları da yapılarak literatüre katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Kannabinoidler

Son dönemlere kadar sentetik türevler geleneksel terapötiklerin farmakolojik özelliklerini geliştirmek veya esrar ve kubar esrarın spesifik mekanizmasını araştırmak üzere dizayn edilmişlerdir [9,10]. Sentetik kannabinoidler sentezleyen kişi ya da kurumların ön ekleri ile isimlendirilmiş dört ana gruptan (JWH, HU, CP, AM) oluşmaktadır..2004'ten itibaren sokak kimyacıları kontrole tabi ya da yasaklı olmayan ve aynı zamanda farmakolojik olarak en az esrar kadar etkili ürünler tasarlamaya başlamışlardır [10].

Bu maddelerden JWH-018 ilk olarak 1980'li yıllarda medikal kimyacı John William Huffman tarafından vücutta endokannabinoidlerin yapısını ve etki mekanizmasını incelemek üzere geliştirilmiştir. Huffman bir ilaç üzerine Ulusal Uyuşturucu Bağımlılığı Enstitüsü tarafından desteklenen bir çalışmaya başlamış ve ilk olarak "K2" , "Spice"de kullanılmış olan sentetik esrarları sentezlenmiştir. JWH serisi kannabinoidler (Δ^9 -THC)'nin yapısının bilgisayar üzerinden geliştirilmesiyle sentezlenmişlerdir [1].

JWH'lara ek olarak "Spice" içinde bulunan diğer sentetik maddelerden HU-210 1960'larda Raphael Mechoulam tarafından Hebrew Üniversitesinde sentezlenmiş klasik bir kannabinoiddir. Bu madde yapısal olarak Δ^9 -THC'ye benziyor olmasına rağmen reseptör afinitesi daha yüksektir. Fakat sentezlenmesi oldukça zordur. Siklofenol ("CP") 1970'lerde Pfizer firması tarafından sentezlenmiş non-klasik kannabinoiddir. CP-47,497'in sentezlenmesi kolaydır ve reseptör afinitesi oldukça yüksek olduğu için daha popülerdir. Diğer indol türevi "AM" bileşikleri Alexandros Makriyannis tarafından sentezlenmiştir [11,12].

Esrara alternatif bu karışımların dikkat çekmeden kullanılmasını sağlamak amacıyla ambalajlarında ve pazarlanmalarında, ürünün insan kullanımına yönelik olmadığına ilişkin bilgiler yer almıştır. Bu karışımları

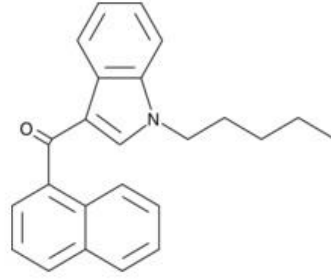
kullananlar etkilerin esrar benzeri olduğunu söylemesine rağmen esrar tespit edilmemiştir ve meydana gelen narkotik etkilerin sentetik esrarlardan ya da eklenen diğer bitkilerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Ayrıca etkilerini güçlendirmek ya da yan etkilerini gidermek üzere karışımlara katkı maddesi olarak *tokoferol*, *oleamid*, aromatik maddeler (*etilvanilin*, *eugenol* ve *eukaliptol*) gibi kimyasallar eklendiği ve sentetik kannabinoidlerin de uygun bir solventle çözülerek bitki karışımlarına sprey şeklinde uygulandığı düşünülmüştür [11]. Spreylenmiş bu bitki karışımları, bozulmayı önleyici alüminyum ambalaj içerisine konularak pazarlanmaktadır. Farklı ambalajlar ve farklı isimlerle piyasaya sürülmüş olan sentetik kannabinoid örnekleri Şekil 2-1’de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: “Headshop”lar ve internet üzerinden satılan farklı ambalaj ve isimli sentetik kannabinoidler.

2.2. JWH-018

JWH-018 “sentetik kannabinoid” grubunun en çok bilinen ismidir. İlk olarak kannabinoid reseptörleri ile ilgili araştırmalar için sentezlenmiş olan madde, daha sonra sokak kimyacıları tarafından sentezlenmeye başlanmıştır. Bu maddenin kimyasal yapısı ile ilgili elde edilen bilgiler sınırlıdır. Lipofilik ve non-polar özellikteki JWH-018’in kimyasal yapısı Şekil 2-2’de verilmiştir.



Şekil 2-2: JWH-018’in Kimyasal Yapısı (Naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanon)

2.2.1. Farmakokinetik Özellikleri

Grigoryev ve ark.’ları JWH-018 kullanan gönüllüler ve JWH-018 maddesine maruz bırakılan farelerin idrar örneklerinde JWH-018 metabolitlerini incelemişler ve izlenebilir idrar metabolitlerin monohidroksil metabolitleri olduğunu gözlemlemişlerdir [13]. Möller ve ark.’nın karaciğer mikrozomal enzimlerini kullanarak yaptığı in vitro çalışmada idrarda gözlenen metabolitlerin in vivo çalışmalarla benzer olduğu ve Faz I metabolitlerinin kolaylıkla izlenebildiği, JWH-018’e rastlanmadığı belirtilmiştir [14]. Wintermeyer ve ark.’larının sitokrom P-450 enzimleri kullanarak yaptığı çalışmada bulunan metabolitler daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olmakla beraber bazı farklılıklara da rastlanmıştır [15]. Bu farklılıkların idrar konsantrasyonları ve örnek hazırlanma prosedürlerine bağlı olabileceği söylenmiştir [15]. Chimalakonda ve ark.’larının yaptığı in vitro çalışmada Faz I karboksil ve hidroksil metabolitlerinin idrarda majör atılım ürünleri olduğu gözlemlenmiştir [16]. Moran ve ark.’ları idrardaki karboksil ve hidroksil

metabolitlerinin maddelerin tespitinde parmak izi olarak kullanılabileceğini söylemiştir [17]. Sobolevsky ve ark.'larının kullanıcılardan topladığı idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada, JWH-018'in indol halkasındaki ve N-alkil zincirindeki hidroksilasyon sonucu oluşan metabolitlerinin tarama metodunda kullanılmak için en uygun metabolitler olduğu belirtilmiştir [18].

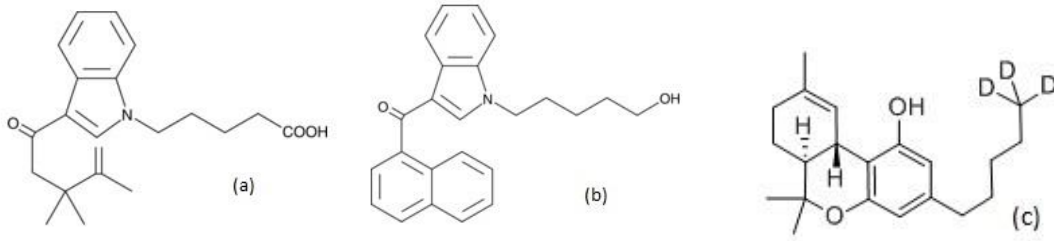
Sentetik kannabinoidlerin insanlarda farmakokinetik ve farmakodinamik profilleri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan vaka çalışmalarında oral ya da inhalasyon yoluyla alımlardaki tahmini biyoyararlanımları ve bu şekilde alıma bağlı etkilerinden bahsedilmektedir. Bu tez yazılana dek yayınlanmış rektal ya da parenteral vaka yayını bulunmamaktadır. Spesifik metabolik yolları, detoksifikasyon ve atılım reaksiyonları hala tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak hepatik sitokrom P450 oksidasyonunu takiben glukuronik asit konjugasyonu ve böbrekten atılımı ile biten bir farmokokinetiği olduğu düşünülmektedir [19]. Sentetik kannabinoid metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 izoenzimleri tanımlanmamış olmasına rağmen, konjugasyondan sorumlu ana UDP-glukuronoziltransferazlar UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT1A10 ve UGT2B7 olarak tanımlanmıştır [16].

Alınan JWH-018'in %90'undan fazlasının alımdan sonraki üç saatte biyotransformasyona uğradığı düşünülmektedir [20]. Bu gruptan benzer bir maddede yapılan ilk in vitro çalışmalarda ana maddenin N-dealkilasyonla ve hidroksilasyonla ana metabolitlere dönüştüğü görülmüştür. Meydana gelen Faz I metabolitlerinin bir ya da birkaç tanesinin atılım sırasında da aktif olabileceği yönünde görüşler vardır [16]. Bu da JWH-018 gibi sentetik maddelerin daha ciddi yan etkilere sahip oluşunun bir açıklaması olarak kabul edilebilir.

Tez çalışmasında, yukarıdaki çalışmalar referans olarak alınarak JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5- hidroksipentil) metabolitleri kullanılmıştır.

IS (İç standart) olarak kimyasal yapı bakımından JWH benzeri olan delta-9-tetrahydrocannabinol-d3 (THC-d3) kullanılmıştır. Yapısal olarak JWH-018 ve

metabolitlerine benzediği için çevresel koşullardan aynı şekilde etkilenmektedir. Döteryumlu yapı nedeniyle oldukça karardır. Moleküler ağırlığı ve parçalanma iyonları sayesinde standart maddelerden kolaylıkla ayrılabilir. Bu maddelerin kimyasal formülleri aşağıdaki Şekil 2-3’de gösterilmiştir.



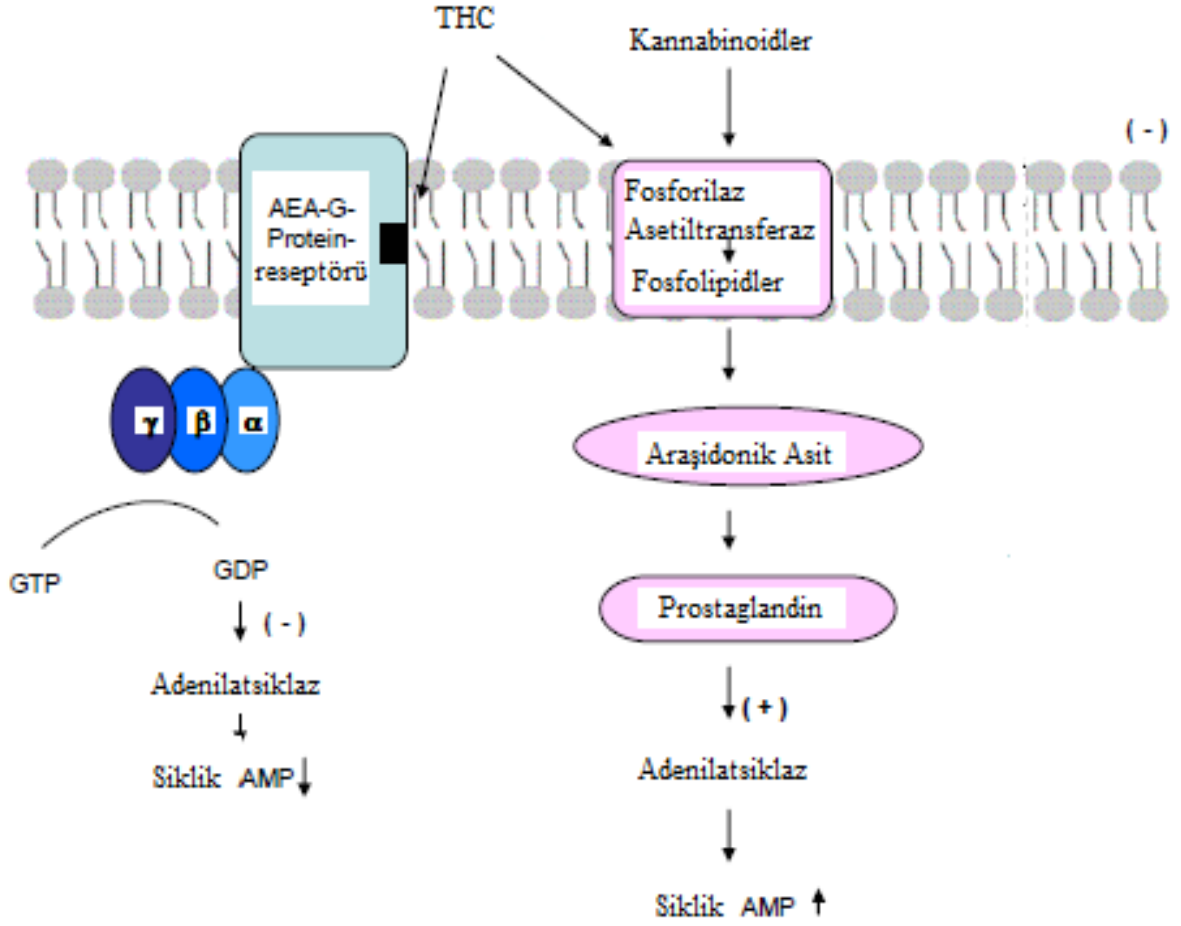
Şekil 2-3: JWH-018 N-pentanoik asit(a),JWH-018 N-(5-hidroksipentil)(b) ve THC-d3(c) kimyasal yapıları.

2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri

Kannabinoid analogları CB1 and CB2 reseptörleri üzerinde agonist etki gösterirler. CB1 Kannabinoid reseptörleri beyinde yer alan en fazla G-protein bağlı reseptörlerdir ve γ -amino butirik asit (GABA) ve glutamat nörotransmisyonunun modülasyonu konusunda önemli bir rol oynarlar. Ayrıca kannabinoid reseptörler genellikle diğer reseptörler ile heterodimerler oluştururlar. Kannabinoid ve opioid reseptörler arasında meydana geldiği bilinen bu etkileşim etkili ağrı kontrolü konusunda farmasötik stratejilerin geliştirilmesi konusunda bir hedef oluşturmuştur. Fakat sentetik kannabinoidler ve opiyatların etkileşimleri hakkında henüz herhangi bir bilgi yoktur [21-23].

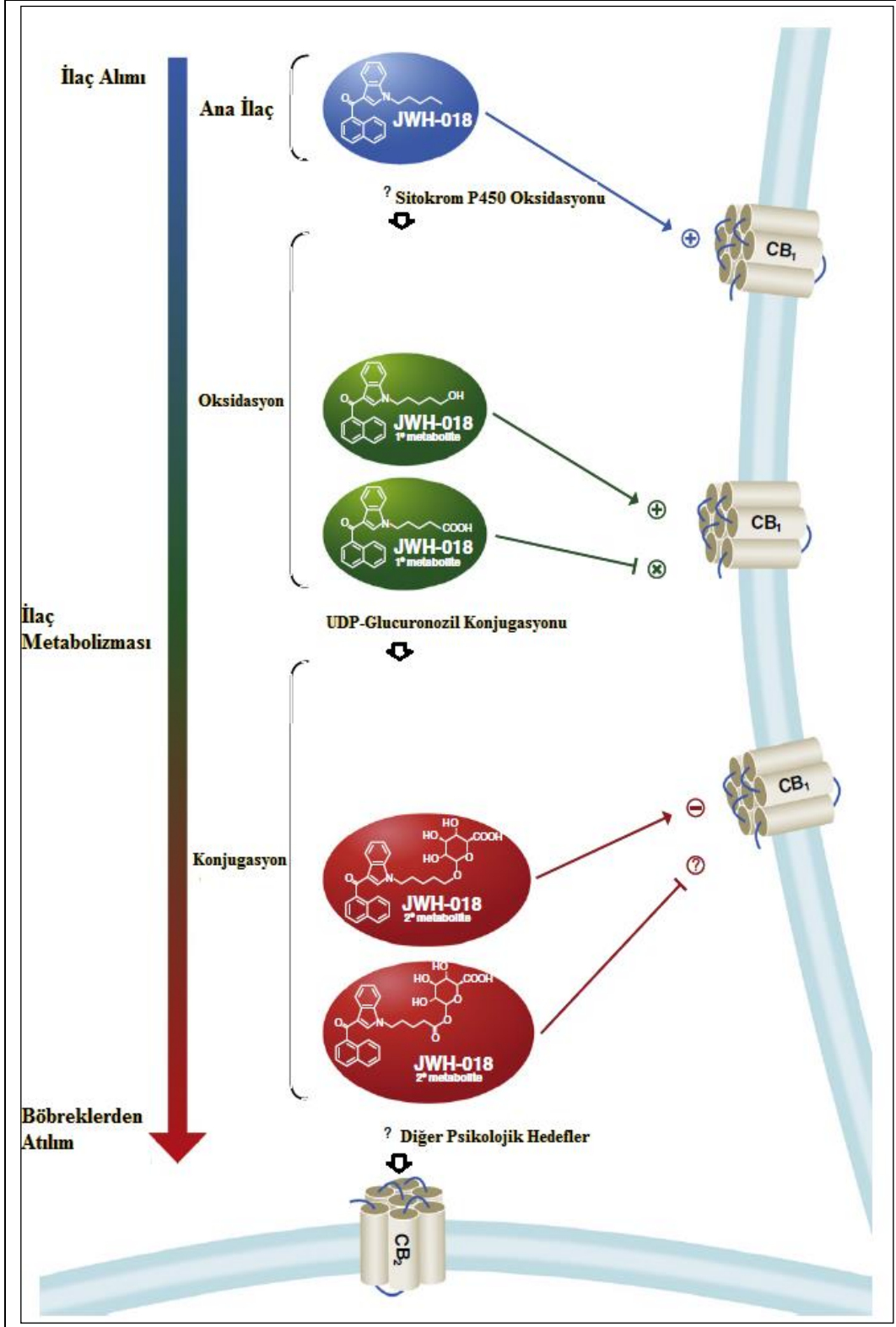
JWH-018 THC ile karşılaştırıldığında CB1 reseptörü için 4 CB2 reseptörü için ise 10 kat daha yüksek bir reseptör afinitesine sahiptir [3]. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda JWH-018 maddesinin lokomotif aktiviteyi azalttığı, analjezi, hipotermi ve katalepsi gibi THC'nin neden olduğu etkilere benzer etkilere neden olduğu görülmüştür.

THC ve kannabinoidler için olası biyokimyasal yollar Şekil 2-4'de gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Fosfolipidler ve araşidonik asit bağımlı biyokimyasal proseslerde THC ve kannabinoidlerin etkileri

Şekil 2-5'de JWH-018 maddesinin kannabinoid reseptörler üzerindeki etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2-5: JWH-018 metabolizması ve CB1 ve CB2 reseptörleri üzerindeki etkileri. *(+)Agonist, (-) Antagonist bağlanma afinitesini ve (X) Bağlanma afinitesi olmadığını işaret eder.

2.2.3. Toksikolojik Etkileri

2.2.3.1. Akut Etkileri

JWH-018 EMCDDA tarafından EWS ile rapor edilmiş ilk sentetik kannabinoiddir [24]. Kullanıcılarla ilgili herhangi bir klinik bulgusu olmamasına rağmen “Spice” kullanmış olan kişiler deneyimlerini internet sayfalarında “chat” odaları aracılığıyla paylaşmıştır [25]. Kullanıcıların paylaştığı yorumlara göre etkileri “insan beyninin ön tarafında gözlerin arkasında basınç (esrarla aynı etkiler), bulanıklık, duygu ve durum iyileşmesi” olarak tanımlanmıştır [26]. Aynı gün içerisinde tekrar tekrar kullanan kişi artan bir etki hissetmiştir. Gün sonunda kişi “sarhoş, yorgun ve sersemlemiş” hissetmiştir. Kişi sentetik kannabinoidi esrar kadar ilginç bulmuştur. Diğer bir kullanıcı 4mg JWH-018’i eritmiş ve içmiştir. Bu kişi “vücutta esrardan biraz daha farklı farklı bir enerji dalgası olduğu” gibi bir yorumda bulunmuştur. Başka bir konuşmada kullanıcı 10 mg JWH-018 kullanmış ve “kaygı” hissettiğini belirtmiştir. İki küçük doz JWH-018 içen bir başka kullanıcı “güçlü madde” olarak tanımlamıştır [26].

JWH-018’in de dahil olduğu kannabinoidlerin ana kullanım nedeni öfori etkisidir [6]. Kişi madde kullanımına bağlı olarak umursamaz, mutlu ve rahatlamış bir ruh haline sahip olabilir, fakat bu rüya disfori, endişe, psikoz, paranoya ve panik duygusuyla sonlanabilir. Ayrıca madde kullanımının sonrasında depresyon ve stres kendini gösterebilir. Eğer bu madde düzenli olarak kullanılıyorsa kişi psikolojik olarak bağımlı, kronik olarak durgun ve sosyal yaşamdan kopuk bir ruh haline bürünebilir. Artan dozlar halüsinasyon ve gerçeklik duygusunun kaybı gibi sonuçlara neden olabilir [6].

JWH-018, THC’ye benzer etkiler gösteren bir merkezi sinir sistemi etkileyicisidir ve intoksikasyonun ileri aşamalarında uyuşukluğa neden olur. Madde kullanımı reaksiyon süresini uzatır ve hafıza problemlerine neden olur. Odaklanma, sürüş kabiliyeti ve karışık bilgilerin algılanması gibi yetiler ayrıca

zarar görür. Bu problemler kişi intoksikasyon yaşamamış olsa bile haftalarca sürebilir [9].

JWH-018 CB1 reseptörleri üzerindeki agonist etkisi Δ^9 -THC'den daha yüksektir [27, 28]. Bu da kişilerin esrar benzeri etkiye sahip olduğunu düşünerek kullandıkları ürünlerin neden aşırı yan etkilere ve toksisiteye sebep olduğunu açıklamaktadır. Esrarın yüksek dozlarda alındığında bile "K2" kullanımında rapor edilen felç ya da kalıcı kalp hasarı gibi etkilere neden olmuyor olmasının sebebinin daha zayıf olan reseptör afinitesi olduğu düşünülmektedir [29]. JWH-018'in yan etkileri ile ilgili veriler hala sınırlıdır [30].

JWH-018 kullanımına bağlı olarak en sık rapor edilen psikoaktif ve fiziksel bulgular, psikoz riskinde artış, alımdan 1 saat sonra meydana gelen ataklar, nöbet, genel konvulsiyonlar, anksiyete, ajitasyon, asabiyet, hafızada meydana gelen değişiklikler, sedasyon, akıl karışıklıkları, taşikardi, ritim bozukluğu, bradikardi, göğüs ağrısı, uyuşukluk, halüsinasyonlar, mide bulantısı, kusma, pupillerde dilatasyon olarak sıralanmıştır [9, 31] .

Yetişkinlere ait vaka raporlarında psikoaktif etkilerin hoş ve arzu edilen öforiden anksiyeteye ve bilinçte azalmaya kadar giden bir sınıflandırma yapılabilmekte ve bu bulgular hayvanlarda yapılan in vivo çalışmalarla da desteklenmektedir [32 -35].

Son dönemlerde bazı vakalarda farklı ve önemli toksisite bulguları tanımlanmıştır. Bir vakada alımdan 30 dk sonra hareket etmekte zorluk yaşayan hastanın idrarında JWH-018 varlığı saptanmıştır [36]. Daha önce herhangi bir madde suistimali öyküsü bulunmayan 17 yaşındaki gençte madde alımından yarım saat sonra şiddetli göğüs ağrıları meydana gelmiştir [37]. Ambalaj içinde yeşil bir madde kullandıklarını beyan eden askeri personelde GC/MS ile idrarda yapılan taramada uyuşturucular negatif bulunmuş fakat

taramada JWH aranmamıştır. Ancak hastalardaki ajitasyon ve sedasyon gibi bulgular JWH kullanımı ihtimalini düşündürmüştür [38].

Yapılan son çalışmalarla birlikte CP-55,940, CP-47,497 ve CP-47,497-C8 maddelerinin sitotoksik etkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu maddelerin doza bağımlı olarak kaspaz kaskadını indükleyerek ya da CB1 reseptörlerini yönlendirerek hücrelerde apoptoza neden oldukları saptanmıştır [39]. Sitotoksiste konusunda JWH-018 ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

2.2.3.2. Uzun Dönem Etkileri

Sentetik kannabinoidlerin uzun süreli kullanımına bağlı toksisitesi ile bilgiler yetersizdir. Ancak kronik kullanımdan kaynaklanan etkilerinde THC benzeri olduğu düşünülmektedir.

Sağlıklı erkekler arasında yapılan bir çalışmada uzun süreli kullanıma bağlı olarak (toplamda 4 art arda kez kullanımdan 3 hafta düzenli kullanıma kadar değişen zamanlarda) duyuşsal ve görsel halüsinasyonlardan paranoid düşlere, düşünce kilitlemelerinden konuşma bozukluklarına, anksiyeteden uyuma sorunlarına, stupora, intihar fikirlerinin oluşmasına kadar uzanan psikoz saptanmıştır [40, 41].

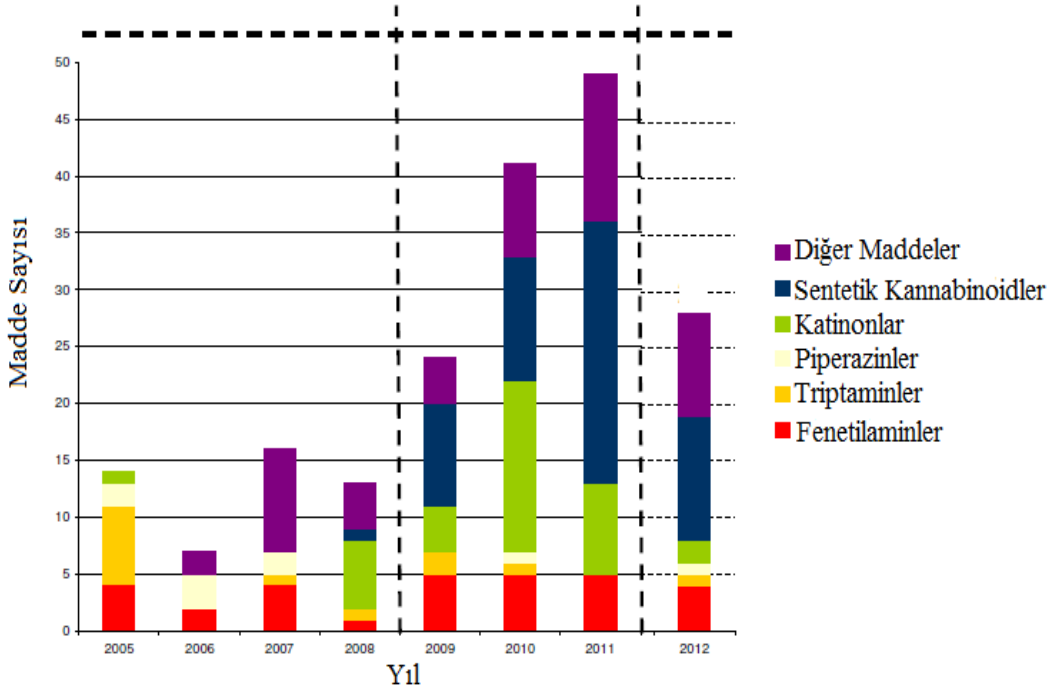
20 yaşında bir gençte 8 ay boyunca her gün kullanımın ardından tolerans geliştiği görülmüştür. Yoksunluk döneminde “içsel huzurun bozulması, eksiklik, gece kâbusları, aşırı terleme, baş ağrısı, mide bulantısı ve çarpıntı” yaşadığını belirtmiştir [18].

2.2.4. Yasal Kısıtlamalar

Ülkemizin de üyesi olduğu Avrupa Birliğı ülkelerinde de uyuşturucu maddeler ciddi bir problem teşkil etmektedir. Bu problemin çözümüne katkıda bulunmak amacıyla 1993 yılında EMCDDA kurulmuş ve 1995 yılında aktif

olarak çalışmaya başlamıştır. Ülkemiz 2006 yılından itibaren bu sistemi kullanmaya başlamıştır. EMCDDA daha sonra uyuşturucu pazarını kontrol ederek yeni pazarlanan psikoaktif maddelerin olabildiğince hızlı bir şekilde yasa kapsamına alınmasını sağlamak amacıyla EWS' i kurmuştur. Konsey Kararı (2005/387/JHA) ile ülkeler ve kurumlar arası bilgi alışverişini hızlandırmıştır.

Şekil 2-6'de 2005-2012 yılları arasında EMCDDA tarafından EWS sistemi ile bildirilen yeni ve yasa kapsamına alınması istenen psikoaktif maddeler gösterilmektedir.



Şekil 2-6: 2005-2012 yılları arasında EMCDDA EWS verileri [42].

Avrupa Birliği ülkelerinden İngiltere, Estonya, Lüksemburg, Romanya, Danimarka, Almanya, Fransa, İrlanda, Litvanya, Letonya, Avusturya, Polonya, İsveç ve İtalya'da bu maddelerin bir kısmı ve tamamı yasaklanmıştır. Bu ülkelerden bir kısmı madde isimleri ile kapsam belirlerken bir kısmı "jenerik yasası" adı altında kimyasal yapıdaki değişiklik gözetilmeksizin bu grupta üretilen tüm maddeleri yasaklamıştır [43].

Ülkemiz de 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı resmi gazetede yayınlanan 07.01.2011 tarih, 1310 sayılı Bakanlar Kurulu kararı JWH-018'i kanun tarafından kullanılması, bulundurulması, üretilmesi ve ticaretinin yasak olduğu uyuşturucu ve uyarıcı maddeler listesine sokmuştur. Şekil 2-7'da bu tarihte yasa kapsamına alınmış maddeler gösterilmektedir

Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü

13 Şubat 2011 PAZAR **Resmî Gazete** Sayı : 27845

BAKANLAR KURULU KARARI

Karar Sayısı : 2011/1310

Ekli listede yer alan maddelerin 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun hükümlerine tabi tutulması; Sağlık Bakanlığının 22/12/2010 tarihli ve 86106 sayılı yazısı üzerine, adı geçen Kanunun 19 uncu maddesine göre, Bakanlar Kurulu'nca 7/1/2011 tarihinde kararlaştırılmıştır.

Abdullah GÜL
CUMHURBAŞKANI

Recep Tayyip ERDOĞAN Başbakan			
C. ÇİÇEK Devlet Bak. ve Başb. Yrd.	B. ARINÇ Devlet Bak. ve Başb. Yrd.	A. BABACAN Devlet Bak. ve Başb. Yrd.	M. AYDIN Devlet Bakanı
H. YAZICI Devlet Bakanı	F. N. ÖZAK Devlet Bakanı	M. Z. ÇAĞLAYAN Devlet Bakanı	F. ÇELİK Devlet Bakanı
E. BAĞIŞ Devlet Bakanı	S. A. KAVAF Devlet Bakanı	C. YILMAZ Devlet Bakanı	S. ERGİN Adalet Bakanı
M. V. GÖNÜL Millî Savunma Bakanı	B. ATALAY İçişleri Bakanı	A. DAVUTOĞLU Dışişleri Bakanı	M. ŞİMŞEK Maliye Bakanı
N. ÇUBUKÇU Millî Eğitim Bakanı	M. DEMİR Bayındırlık ve İskân Bakanı	R. AKDAĞ Sağlık Bakanı	B. YILDIRIM Ulaştırma Bakanı
M. M. EKER Tarım ve Köyişleri Bakanı	Ö. DİNÇER Çalışma ve Sos. Güv. Bakanı	N. ERGÜN Sanayi ve Ticaret Bakanı	T. YILDIZ Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanı
E. GÜNAY Kültür ve Turizm Bakanı		V. EROĞLU Çevre ve Orman Bakanı	

**7/1/2011 TARİHLİ VE 2011/1310 SAYILI
KARARNAMENİN EKİ**

LİSTE

- 1- Fenetilamin grubu maddelerden:
 - a) 2 C-B (4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine)
 - b) 2C-P.
- 2- Sentetik kannabinoidlerden:
 - a) JWH-018
 - b) CP 47,497
 - c) JWH-073
 - ç) HU-210
 - d) JWH-200
 - e) JWH-250
 - f) JWH-398
 - g) JWH-081
 - ğ) JWH-073 methyl derivate
 - h) JWH-015
 - i) JWH-122
 - j) JWH-203
 - j) JWH-210
 - k) JWH-019
- 3- Cathinone.
- 4- Cathine.
- 5- Catha Edulis isimli bitki.

Şekil 2-7: 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı resmi gazete [44].

Jenerik yasalar çıkartılarak, üretilmiş olan tüm sentetik kannabinoidlerin yasaklanması uyuşturucu piyasasındaki gelişimi yavaşlatmak açısından etkili bir çözüm gibi görülmektedir.

2.2.5. Analiz yöntemleri

JWH-018 ve benzeri diğer ürünlerin artan popülariteleri ve muhtemel risk potansiyelleri, bu ürünlerin ve kullanıcılarının izlenmesini adli toksikoloji bakımından zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla, öncelikle kimyasalların nitelik ve nicelik tayini yapılmıştır [11, 13, 45-47]. Bu grup maddelerin tanımlanması için GC/MS, LC-MS/MS, NMR ve LC-LQT Orbitrap teknikleri tercih edilmektedir.

GC/MS, bitkisel karışımlar içerisinde maddelerin tanımlanması ve tespiti için uygun bir tekniktir. Sürekli güncellenen kütüphanesi ve karışımlar içerisindeki birçok maddeyi aynı anda ayırma ve tanımlama özelliği bu tekniği iyi bir seçim haline dönüştürmektedir. Alkan miks standardı ile oluşturulmuş kütüphanelerde maddelerin yaklaşık alıkonma zamanları da tahmin edilebildiğinden standart olmaksızın tespiti sağlanmaktadır.

JWH-018 ve benzeri diğer ürünlerin bitkisel karışımlar içerisinde tayinlerinden sonra metabolizmaları ve metabolitlerinin tayini ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır [1, 9, 13-18, 48-63,65]. Son olarak maddelerin ve metabolitlerinin biyolojik örneklerde izlenmesi ve raporlanması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Kanda yarılanma ömürlerinin kısa olması ve konsantrasyonların “ng/mL” sevişinde olması nedeniyle maddelerin ve metabolitlerinin izlenmeleri ancak LC-MS/MS ile mümkün olmaktadır. Tablo 2-1 de JWH-018 ve metabolitleri ile ilgili yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2-1: JWH-018 ve metabolitlerinin materyal, numune hazırlama yöntemi, tayin sınırları ile ilgili yapılan çalışmalar

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
1	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5-Hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	GC-MS/MS LC-MS/MS	-	[18]
2	JWH-018	Serum	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD (0.07ng/mL)	[5]
3	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksi pentil)	İnsan Karaciğer Mikrozomu	Katı Faz Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[15]
4	JWH-018	Serum	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LLOQ (0.3ng/mL)	[52]
5	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksi pentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	GC-MS/MS HPLC-MS/MS	-	[53]
6	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksi pentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS GC/MS	-	[13]

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
7	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Seyreltme	LC-MS/MS	-	[17]
8	JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	NMR, LC-MS/MS	LOD(0.1ng/mL) LOD(0.1ng/mL)	[1]
9	JWH-018 JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Katı Faz Ekstraksiyonu	NMR, LC-MS/MS	LLOQ(0.13ng/mL)	[54]
10	JWH-018	Tam Kan	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD (0.006 ng/mL)	[49]
11	JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(0.1ng/mL) LOD(0.01 ng/mL)	[55]
12	JWH-018 JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[56]

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
13	JWH-018	Fare Kanı ve dokusu	Protein Çöktürme	HPLC-MS/MS	LOQ(1 ng/mL)	[57]
14	JWH-018	Tam Kan	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(0.01 ng/mL)	[58]
15	JWH-018	Kan	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[59]
16	JWH-018	Saç	Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOQ(5 pg/mg)	[60]
17	JWH-018	Fare Kanı	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	HPLC-MS/MS	LOQ(1 ng/mL)	[50]
18	JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOQ(4 ng/mL) LOQ(4 ng/mL)	[61]

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
19	JWH-018	Vucüt Sıvısı	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	UHPLC-MS/MS	-	[62]
20	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(1 ng/mL) LOD(2.5 ng/mL) LOD(0.5 ng/mL)	[63]
21	JWH-018 N-Pentanoik Asit	İdrar	Katı Faz Ekstraksiyonu+ Türevlendirme	GC/MS	-	[64]
22	JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Katı Faz Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(0.1 ng/mL) LOD(0.025 ng/mL)	[65]
23	JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(0.1ng/mL) LOD(0.1ng/mL)	[51]
24	JWH-018 JWH-018 N-Pentanoik Asit JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD(0.1ng/mL)	[14]

2.3. LC-MS/MS Yöntemi

LC-MS/MS, likit kromatografi (LC) cihazı ile kütle spektrometresi (MS) cihazlarının bir araya getirilmesiyle oluşturulmuş bir laboratuvar teknolojisidir. Sistemin likit kromatografisi kısmında, kolon çözünmüş her organik maddeyi ayırabilmekte, kütle spektrometresi ile de ayrılmış bu maddeler iyonlaştırılarak moleküler iyonlar oluşturulmaktadır. Sistem iyonlaşmış ana molekül için ayırt edici bir parçalanma meydana getirir.

Analitik kimya laboratuvarlarında kullanılan dört tip LC-MS cihaz türü bulunmaktadır. İlk ve en eski tür kütle analizörleri üzerinde RF ve DC voltajları uygulanan, iyonları ayırmaya ve parçalamaya yarayan ve ters yüklü kuadrupol ya da oktapol silindirik çubuklarının bulunduğu **Likit Kromatografi Kütle Spektrometresi**, ikinci sistem bu kuadrupol ya da oktopollere ek olarak iyon zenginleştirme yapan bir analizör daha bulunduran **İyon Tuzağı Kütle Spektrometresi**, üçüncü sistem iyonları yük-kütle oranına göre ayıran **Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi** ve dördüncü sistem ise sahip olduğu iyon tuzağı sisteminde kütle-yük oranına göre topladığı kütlelere enerji verip bir üst enerji sınıfına çıkmasını sağlayıp daha sonra kendi enerji sınıfına dönerken yaydığı enerjisi **Fourier transform** yazılımıyla ölçüp molekülün kütlesini belirleyen sistemdir. Bu kombinasyonların tümü öncelikli olarak maddenin kütlesinin tespiti için kullanılmaktadır. Daha sonra meydana getirdikleri parçalanma ürünleri ile maddelerin parmak izi belirlenmektedir. Bu parmak izine bakılarak maddelerin tanımlanması ve kütüphane verisi olarak kullanılması mümkün olmaktadır. Bu kütüphaneler GC/MS kütüphanelerinden farklı olarak cihazlara özgüdür [66].

LC-MS/MS sistemlerin ana bileşenleri:

- 1-HPLC-UPLC pompa sistemi,
- 2-Ayırmayı sağlayan bir analitik kolon
- 3-İyon kaynağı

4-Ms vakum sistemi

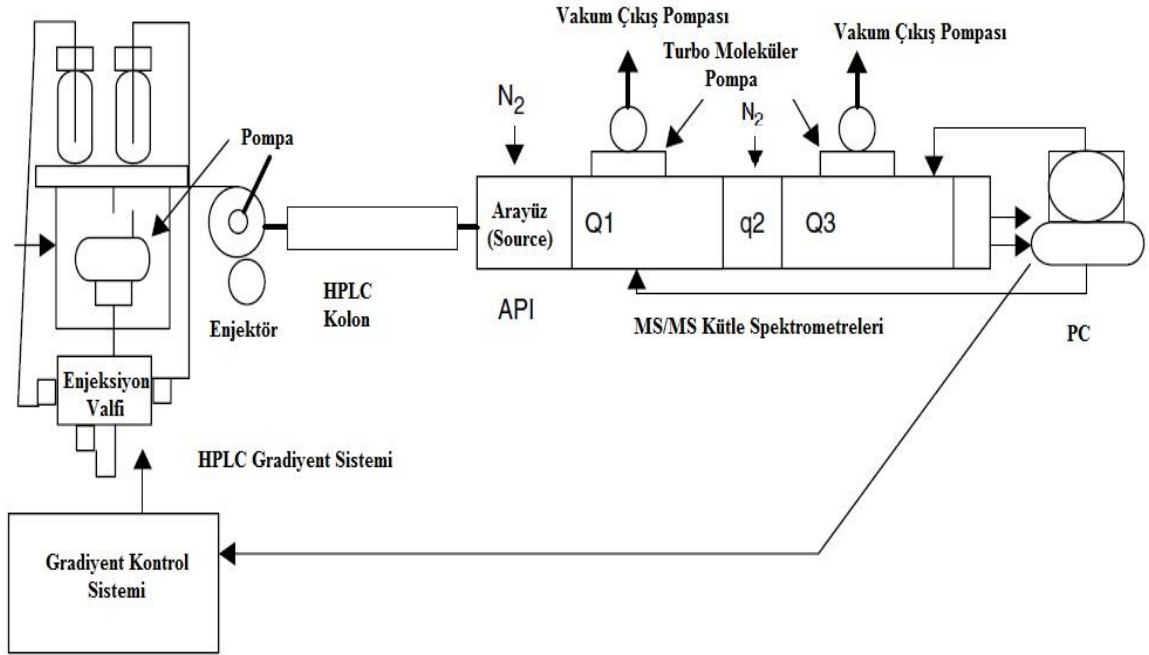
5-Odaklanma lensleri

6-Analizör

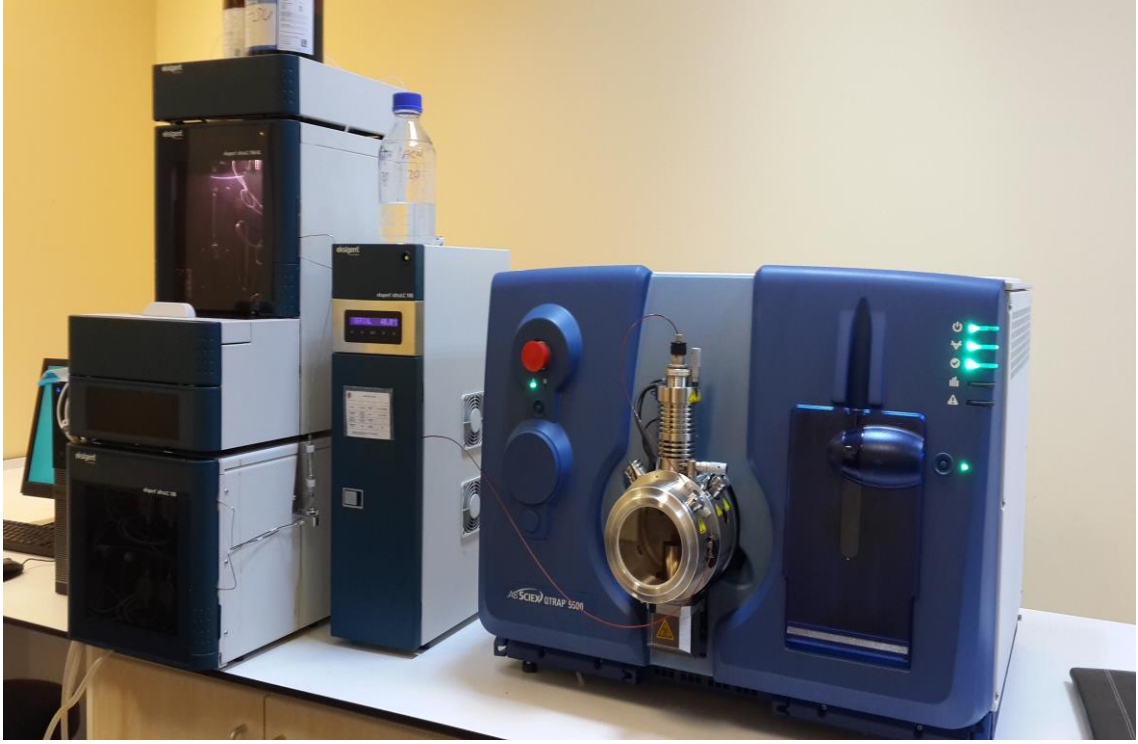
7-Dedektör

8-Veri kontrol sistemi(Yazılım)'dan oluşmaktadır [66].

Şekil 2-8'de LC-MS/MS temel bileşenleri ve Şekil 2-9'da Adli Tıp Kurumu'nda kullanılan LC-MS/MS sistemi temel bileşenleri gösterilmiştir.



Şekil 2-8: LC-MS/MS sistemi

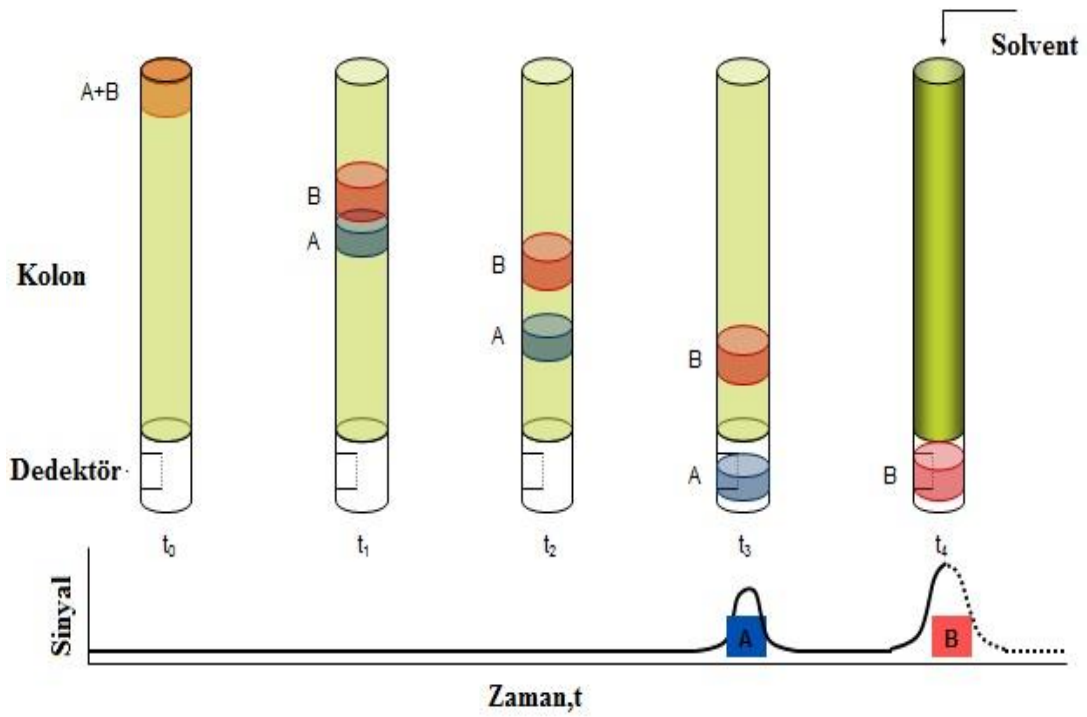


Şekil 2-9: Adli Tıp Kurumu'nda kullanılan LC-MS/MS sistemi temel bileşenleri

Bir HPLC bileşeni olan **pompa**; depolanmış olan mobil fazdan alarak çeşitli filtrelerden geçirir ve kolon bileşenin oluşturduğu basıncı aşmak üzere çözücüye basınçlandırır. Eğer sistem degasser (çözünmüş gaz giderici) sisteme sahip değil ise daha önce çözücüde çözünmüş gazların giderilmesi önemlidir. Daha sonra çözücüye enjektöre doğru yönlendirir. Mobil faz ya da mobil faza benzer bir çözücüde çözülmüş olan örnek otomatik örnekleyici sayesinde mobil faz akışının içine eklenir.

Kolon; başlıca ayırımın sağlandığı kısımdır. Mobil Faz(Hareketli Faz) depo edildiği yerden kolona ve dedektöre doğru pompalanır.

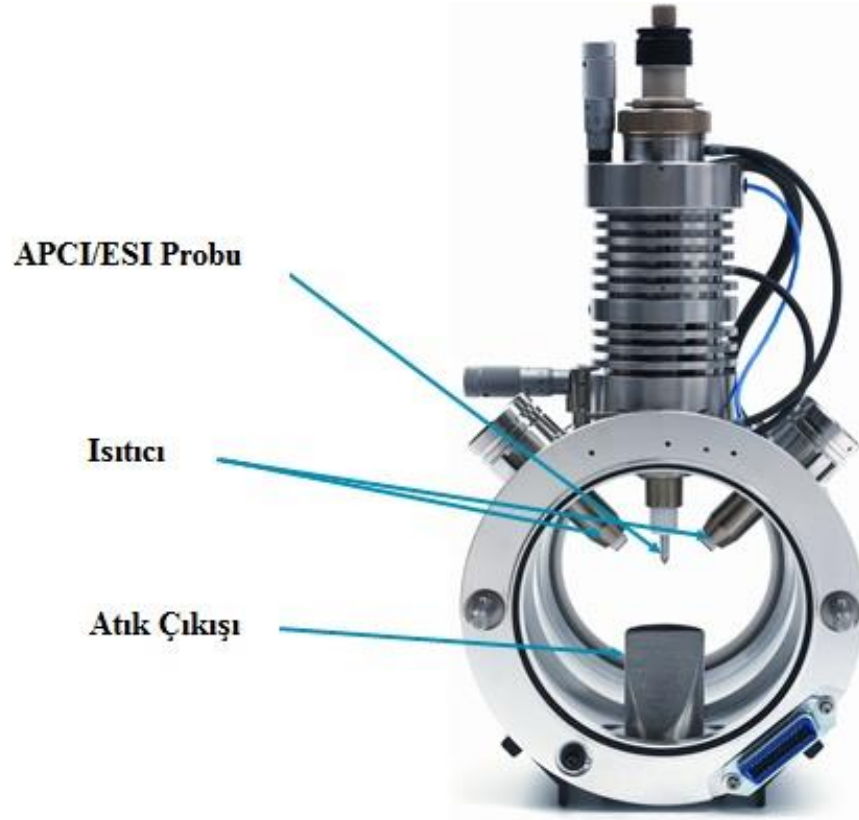
Örnek mobil faz içerisinde çözünür ve dolgu malzemesi ile etkileşime girer ve kolon içerisinde denge ayrılması meydana geldikten sonra Şekil 2-10'da görüldüğü gibi kolon çıkışına doğru ilerler



Şekil 2-10: Analitik kolonda ayırma mekanizması

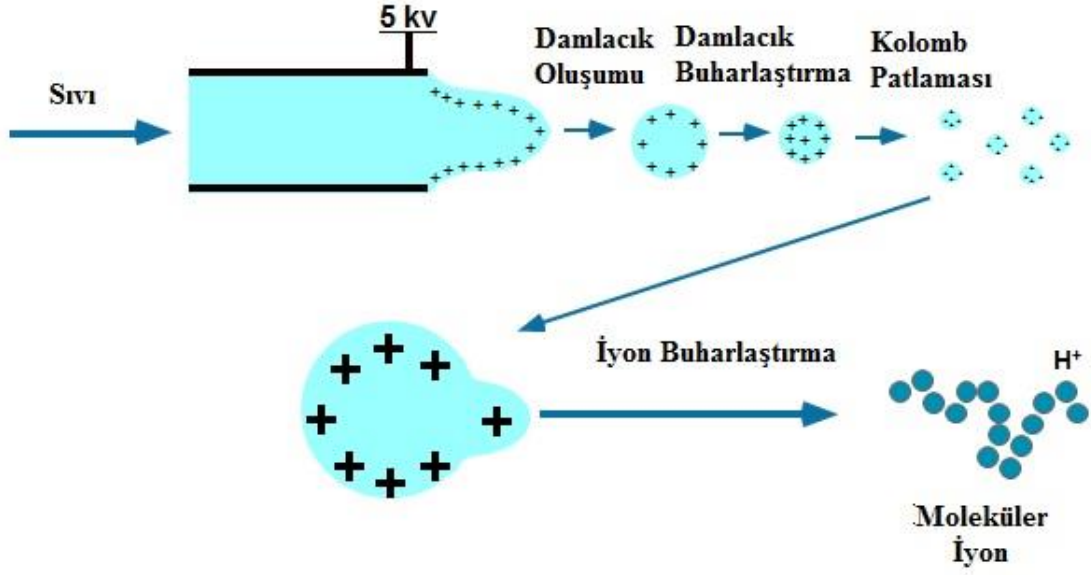
Madde yapısına uygun olarak seçilmiş kolonda ayırım sağlandıktan sonra maddeler bu sırayla dedektöre ulaşırlar ve dedektörde sinyal oluşumuna neden olurlar.

Şekil 2-11’da gösterilen iyon kaynağı sistemin bir diğer bileşenidir. **İyon kaynağı** kolondan taşınan akıştaki buharlaşabilen maddeleri uzaklaştırırken aynı zamanda istenen analitleri sistemde tutacak şekilde dizayn edilmiştir. İyon kaynağının ilk temel işlevi; denge basıncın düşürülmesi, sisteme akışı taşıyan kapilerin ısıtılması ve spreyleyici kullanılarak akışın buharlaştırılarak buharlaşmayan bileşenlerin uzaklaştırılmasıdır.



Şekil 2-11: "İyon kaynağı" ve bileşenleri

İyon kaynağının ikinci temel işlevi de eluat içerisindeki yüksüz iyonlara yük kazandırmaktır. Kütle dedektörleri yüklenmiş moleküllerin kütle-yük oranına uygun olarak ayrılması prensibine göre çalışmaktadır. Kütlelerin içinde hareket ettiği kapiler üzerine buharlaştırma işleminin sonunda voltaj uygulanarak analitlerin yük kazanması sağlanmaktadır. İyon kaynağında moleküler iyon oluşumu Şekil 2-12’de gösterilmiştir.



Şekil 2-12: İyon kaynağında moleküler iyon oluşumu

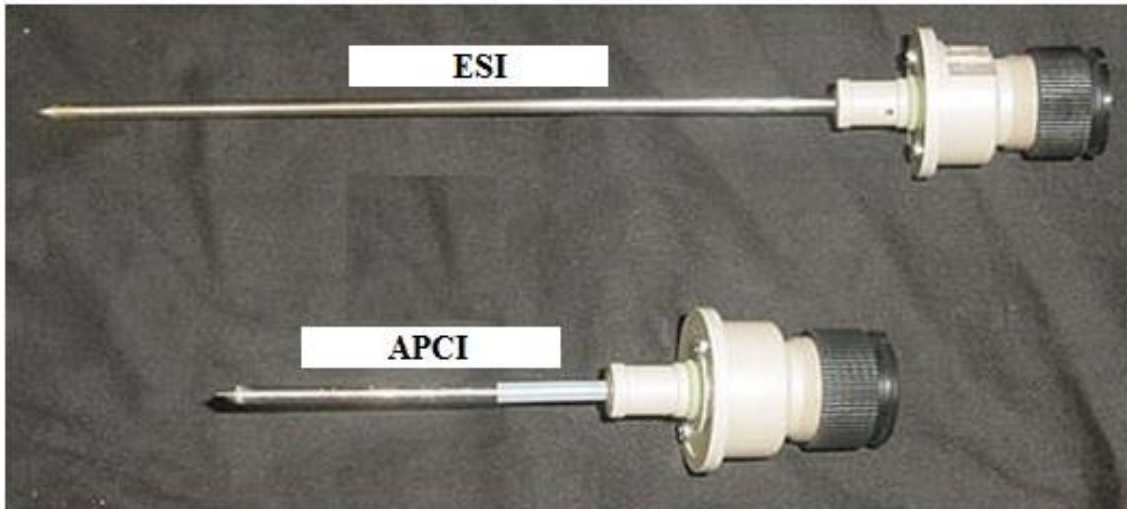
Bu sistemde farklı iyonlaştırma problemleri kullanılmaktadır. En çok kullanılanlar elektrosprey (ES) ve atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI) türleridir. Satılan ticari ürünlerin bir çoğunda iyon kaynağı problemleri bir arada bulunurlar. APCI daha az polar maddeler için kullanılır.

Elektrosprey arayüzü (ES) genelde polar yapılı, kolay iyonlaşabilen ve yapıcı kolay parçalanabilen maddeler için iyi bir tercihtir. Parçalama tekniği basittir ve parçalanma çok az miktarda olur. Bu birimde iyonlaşma likit kısımdan yollanan solventin içinden geçtiği dışarıdan ısıtılan kapiler tübe 3-4 kV potansiyel uygulanmasıyla sağlanır. Isınan ve aynı zamanda yük kazanan damlacıkların çapı küçüldüğü sırada nozül içerisinden sisteme spreyleyilir. Bazı ticari modellerde nozül etrafında içinden inert gazın geçtiği ve buharlaşmayı kolaylaştıran bir başka tüp daha bulunmaktadır. Çalışılan kütle aralığı cihazın modeline ve markasına göre değişmekle birlikte genelde 10 ile 10000 amu (atomik kütle birimi) arasında değişmektedir [66].

LC-MS/MS sistemlerinde sadece yüklü ve seçilmiş iyonların sisteme girişini sağlamak üzere sarmallanmış yolaklar ya da perde plakaları (curtain plate) kullanırlar.

Bu arayüz ayrıca küçülen damlaları buharlaştırmak için inert bir gaz beslemesi yapar ve ayrıca solventten ayrılan maddeleri iyonize edebilmek için "coronal discharge" iğnesi ile 25 kV voltaj uygular. Çarpışma plakası iyonları kütle analizörüne yollamak için iğne tarafından uygulanan voltajın tam tersi bir voltaj uygular [66].

APCI ve ESI arayüzlerinin en önemli problemi bu arayüzlerin bütün maddeleri iyonize edemiyor olmasıdır. Bu problemlerin çözümü için önemli olan analiz edilecek maddenin yapısını bilmek ve uygun olan arayüzü kullanmaktır. Şekil 2-13'de yaygın olarak kullanılan iki tür prob gösterilmiştir.

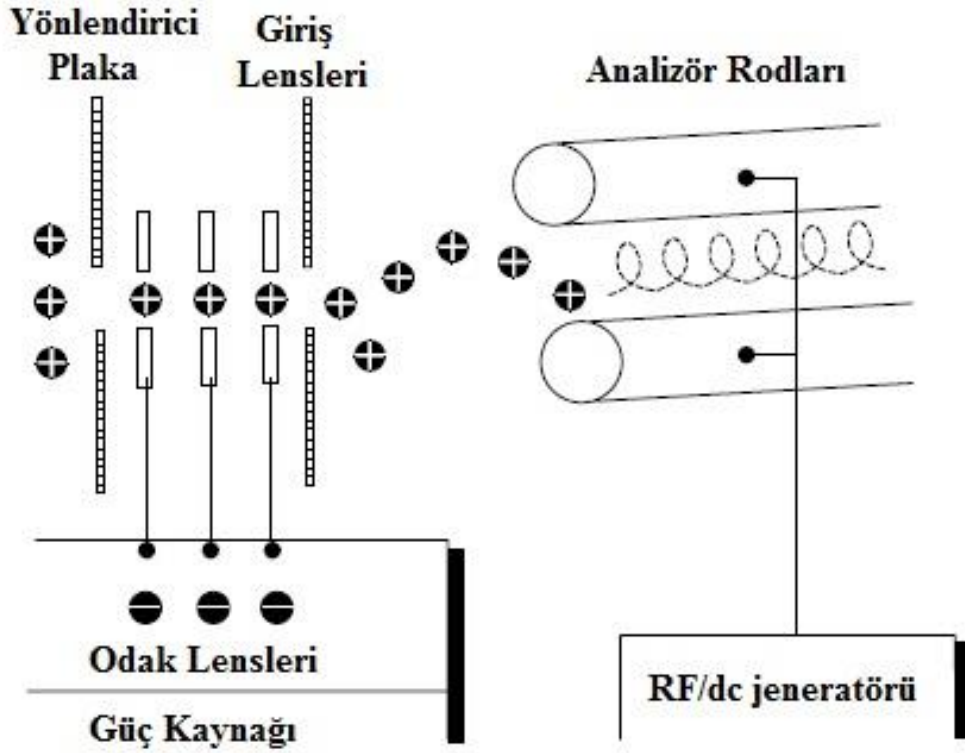


Şekil 2-13: LC-MS/MS cihazında kullanılan ESI ve APCI propları

Vakum pompaları; maddelerin hava ile çarpışmasını engellemek üzere ortamda sağlanması gereken vakumu ($<10^{-5}$ 'ten 10^{-7} torr'a kadar) üretirler. İyonize maddeler hava molekülleri ile çarpıştıklarında kütle analizörlerine kadar ulaşmaları mümkün olmamaktadır. Bu sistemde çalışan iki adet vakum pompası bulunmaktadır. Çünkü tek başına bir pompanın bu vakumu sağlaması

mümkün değildir. Vakum iki kademedede sağlanmaktadır. İlk pompa (roughing) 10^{-4} torr vakum sağlamaktadır. İkinci pompa (turbo molecular) ise 10^{-5} ile 10^{-7} torr vakuma kadar inebilmektedir. Sistemde iki adet turbo moleküler pompa bulunmaktadır. Pompalardan birisi iyon kaynağını atmosfer basıncında tutarken ikinci pompa sadece analizör kısmının vakum değerini sabit tutmak için çalışmaktadır [66].

Örnek iyonlaştıktan sonra üzerinde ters yük bulunan **lenslerle**, aynı yüklü silindirik çubuklardan oluşan kütle analizörü kısmına alınmaktadır. Şekil 2-14'de kütle analizör silindirik çubukları gösterilmiştir.



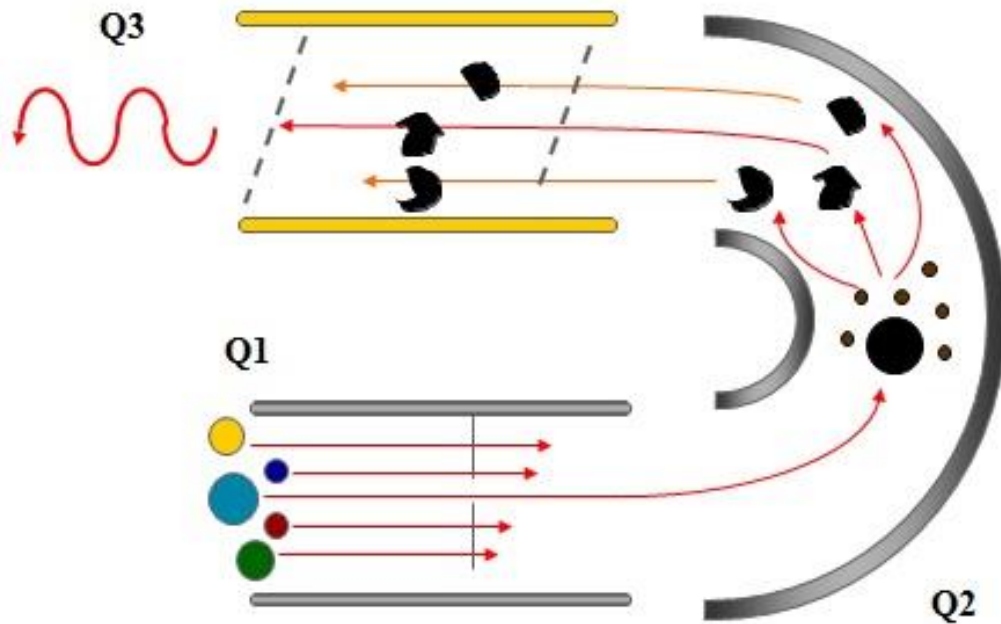
Şekil 2-14: Kütle analizörü çalışma prensibi

Analizördeki silindirik çubukların üzerine DC voltajı uygulanır ve hemen ardından uygulanan RF voltajı ile kütlelerine göre seçilen iyonlar kuadrupol içerisinden dedektöre taşınırlar. Dedektöre taşınan iyonlar dedektör yüzeyine çarparak bir sinyal oluşturur. Bu sinyaller yükseltici tarafından

bilgisayara gönderilir. Kuadrupoller analizör içerisinde seramik bileziklerle birbirine tutturulmuştur. Karşılıklı silindirik çubuklar üzerine aynı DC voltajı uygulanırken bitişik silindirik çubuklarda tam tersi bir voltaj uygulanır [66].

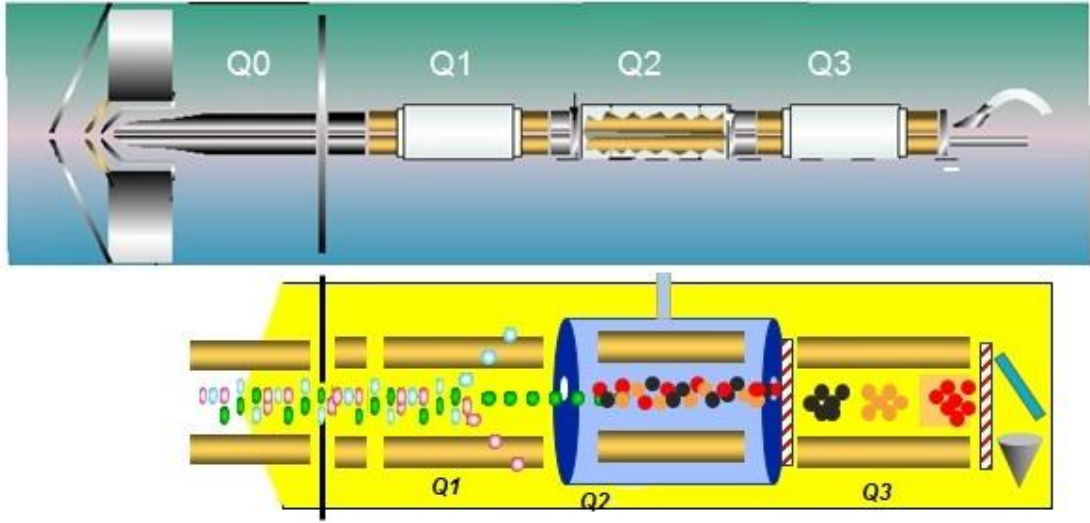
İyonlar silindirik çubuklar arasında değişen RF voltajlarına bağlı olarak sarmal şeklinde ileri doğru hareket ederler.

Şekil 2-15'da moleküler iyonun parçalanması ve fragment oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2-15: LC-MS/MS moleküler iyon parçalanması ve parçalanma ürünü oluşumu.

MS/MS analizörü genellikle iki kütle spektrometresi analizörü ve bir parçalanma hücresinden oluşur. Hedef iyon ilk kuadrupol tarafından seçilerek parçalanmasını indüklemek için inert gaz dolu ikinci hücreye gönderilir. Parçalanmış iyonlar ayırmak ve dedekte edilmek üzere üçüncü kuadrupole yollarırlar. LC-MS/MS'ler iki tarama kuadrupolü (Q1 ve Q3) ve bir adet parçalanma hücresinden (Q2) oluşmaktadır. Şekil 2-16'de kuadrupoller ve sıralama şekilleri gösterilmiştir.



Şekil 2-16: Kuadrupoller ve sıralanma şekilleri

Dedektör membranına çarpan yüklü her partikül diğer taraftan bir elektron salınmasını sağlar. Bu elektronlar dedektörün kaplı duvarına çarparak her seferinde çoklu elektronları serbest bırakır. Bu elektronların kaskadı, sinyalleri amflike eder ve her bir temasın veri sistemine sinyal olarak aktarılmasını sağlar. Bu sinyaller veri işlenirken kütlenin dedektörde oluşturduğu sinyal yoğunluğuna karşı zaman olarak gösterilerek TIC'leri (Toplam İyon Kromatogramı) oluşturur. Kütle spektrometresi kuadrupollerden gönderilen RF sinyallerinin analizöre sürüklenmesi sayesinde analizin her saniyesinde geçen kütle-iyon oranlarını da bilmektedir. Bu veri belirli saniye boyunca yapılan taramalarla birleştirilerek ana kütle ve parçalanma ürünlerinin belirlenmesini sağlar.

Son sistem bileşeni bilgisayar tabanlı bir yazılım sistemi bilgisayardır. **Yazılım** kütle dedektöründen gönderilen analog sinyalin dijital sinyale dönüştürülerek veri oluşturulması ve işlenmesi için kullanılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Enstrümantal Analiz ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler

Likit Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS):

Likit Sistem	Eksigent Expert 100 XL
Kütle (MS/MS) Sistem	ABSCIEX API 5500 Q-Trap
Kolon	Restek Allure PFP, 4 μ , 50 mm x 1 mm
Yazılım	Analyst 1.6.2.
Hassas Terazi	Mettler Toledo
Mikro Pipetler	Eppendorf
Vorteks	VWR
Derin Dondurucu	Uğur
Buzdolabı	Samsung
Santrifüj	Hettich Rotina 380R
Ultrasonik Banyo	İntersonic
SPE manifoldu	UCT
SPE kartuşu	Oasis HLB 3 mL 60 mcg
0.22 μ m 13 mm PTFE filtre	Agela Technologies
Cam ve plastik deney tüpleri	

3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Asetik asit	Merck
Amonyak	Merck
Amonyum format	Sigma Aldrich
Asetonitril	Panreac

Ultra saf su	Panreac
Metanol	Panreac
Formik asit	Merck
Etil Asetat	Panreac
JWH-018 standardı	THC Pharm
JWH-018 N-Pentanoik Asit standardı	Cayman
JWH-018 N-(5-hidroksipentil) standardı	Cayman
THC-d3	Lipomed

3.2.2. Çözeltiler

Ana stok çözeltisi (100 µg/mL): 10 mg standart JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) 100 mL metanolde çözüldü.

Ara stok çözeltisi (1 µg/mL): Ana çözeltiden 1 mL alınıp metanol ile 100 mL ye tamamlandı.

Kalibrasyon standart çözeltileri:

Standart madde analizi için 0.075; 0.1; 0.25; 0.50;1; 2.5; 5;10; 25 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlandı:

50 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözeltiden 1 mL alınıp metanol ile 20 mL'ye tamamlandı.

25 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözeltiden 0.5 mL alınıp metanol ile 20mL'ye tamamlandı.

10 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözeltiden 0.2 mL alınıp metanol ile 20 mL'ye tamamlandı.

5 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözeltiden 1 mL alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlandı.

2.5 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözeltiden 0.25 mL alınıp metanol ile 1 mL'ye tamamlandı.

1 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözeltiden 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

0.5 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözülden 0.5 mL alınıp metanol ile 10mL'ye tamamlandı.

0.25 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözülden 0.25 ml alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

0.1 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözülden 0.1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

0.075 ng/mL standart çözelti: 10 ng/mL'lik çözülden 0.075 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Kan ve idrar katım örnekleri için:

Kan katım örnekleri için 0.75; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözümler hazırlandı:

İdrar katım örnekleri için 1; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözümler hazırlandı:

500 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözülden 1 mL alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlandı.

250 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözülden 0.25 mL alınıp metanol ile 1 mL'ye tamamlandı.

100 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözülden 0.1 mL alınıp metanol ile 1 mL'ye tamamlandı.

50 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözülden 1 mL alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlandı.

25 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözülden 0.25 mL alınıp metanol ile 1 mL'ye tamamlandı.

10 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözülden 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

5 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözülden 0.5 mL alınıp metanol ile 20mL'ye tamamlandı.

2.5 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözümden 0.25 mL alınıp metanol ile 20 mL'ye tamamlandı.

1 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözümden 0.1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

0.75 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözümden 0.075 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

İç Standard (IS) çözeltileri:

Stok İç Standard çözeltisi (10 µg/mL): 1mg/mL'lik THC-d3 çözümlerinden 1 mL alınıp metanol ile 100 mL'ye tamamlandı.

Ara Stok İç Standard çözeltisi (500 ng/mL): Stok iç standart çözümlerinden 500 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Tüm standart çözeltiler kullanımdan önce taze olarak hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

Ekstraksiyonda kullanılan çözeltiler:

% 5'lik metanol (suda) çözeltisi: LC/MS analizine uygun saflıkta metanolden 5 ml alınarak LC/MS analizine uygun saflıkta saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Çözeltiler taze hazırlanarak kullanıldı.

Mobil Fazların Hazırlanması:

1 M Amonyum format çözeltisi: %99.7 saflıkta amonyum formattan 3.17 gr tartıldı ve su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Mobil Faz A: 1M amonyum format çözümlerinden 2 mL ve %99.8 saflıkta formik asitten 2 mL alınarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Mobil Faz B: 1M amonyum format çözümlerinden 2 mL ve %99.8 saflıkta formik asitten 2 mL alınarak LC/MS analizine uygun saflıkta asetonitril ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Mobil fazlar her analizden önce taze hazırlandı ve 10 dk ultrasonik banyoda kullanıma hazır duruma getirildi.

3.3. Biyolojik Örnekler

Tam kan örnekleri Kızılay Kan Merkezinden temin edilerek sodyum florürlü tüplerde analizde kullanılabilmek üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

İdrar örnekleri uyuşturucu kullanım şüphesi olmayan gönüllülerden toplanarak bir havuz oluşturulmuş ve analizde kullanılabilmek üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Kan ve İdrar Örneklerin Hazırlanması

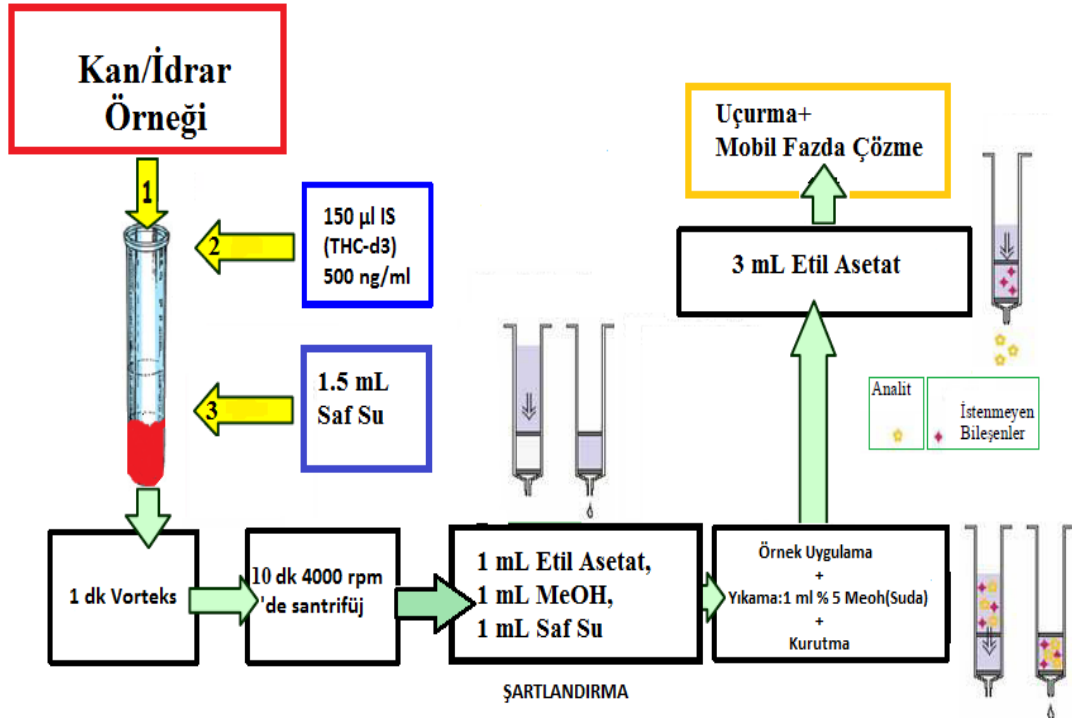
Kan ve idrar örneklerinin hazırlanmasında sentetik kannabinoidlerin analizi için Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi Enstrümental Analiz Laboratuvarında geliştirilmiş katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

Uyuşturucu madde içermediği bilinen kan ve idrar örneklerinden 1.2 mL alınarak üzerine 150 µL IS (500 ng/mL) ve 150 µL istenilen düzeye uygun metanol ile hazırlanmış standart çözelti karışımı eklendi. Hazırlanan 1.5 mL karışım üzerine 1.5 mL distile su eklenerek toplam örnek hacmi 3 mL'ye tamamlandı. Örnek vorteks yardımı ile 1 dk karıştırıldıktan sonra 10 dk süre ile 4000 rpm'de santrifüj edildi.

Oasis HLB kartuşu sırasıyla 1 mL etil asetat, 1 mL metanol ve 1 mL saf su ile şartlandırıldı. Örnek kartuştan yaklaşık 2 mL/dk hızla geçirildi. Kartuş 1 mL %5'lik metanol ile yıkandıktan sonra 20 dk süre ile kartuştan azot gazı geçirilerek kurutuldu. Kartuştan 3 mL etil asetat geçirilerek analizi yapılacak bileşenlerin elüsyonu yapıldı. Toplanan eluent azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu. 1mL mobil faz A ile çözülerek 0.22 µm PTFE filtreden geçirildikten sonra LC-MS/MS'de analiz edildi.

Kör olarak kullanılacak kan ve idrar örneklerinden 1.35 mL alınarak üzerine üzerine 150µL IS (500 ng/mL) eklendi. Hazırlanan 1.5 mL örnek üzerine 1.5 mL distile su eklenerek toplam örnek miktarı 3 mL'ye tamamlandı. Örnek vorteks yardımı ile 1 dk karıştırıldıktan sonra 10 dk süre ile 4000 rpm'de santrifüj edildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde analize hazırlandı.

Örneklerin hazırlanması Şekil 3-1’de özetlenmiştir.



Şekil 3-1: Kan/İdrar örneklerinin SPE yöntemi ile ekstraksiyonu

3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Şartları

3.5.1. Likit Sistem Özellikleri

Akış hızı	1 mL/dk, basınç limiti: 1000 bar
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Analiz süresi	8 dk
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Mobil Faz A	%0.2 Formik Asit 2 mM Amonyum Format (Suda)
Mobil Faz B	%0.2 Formik Asit 2 mM Amonyum Format (ACN’de)

Tablo 3.1’de UPLC üzerinde uygulanan akış diyagramı gösterilmiştir.

Tablo 3-1: LC-MS/MS likit sistemi akış özellikleri

Zaman Tablosu	Zaman (dk)	Akış (mL/dk)	Mobil Faz A(%)	Mobil Faz B(%)
1	0.00	1	90	10
2	2.00	1	90	10
3	5.00	1	15	85
4	5.10	1	5	95
5	6.00	1	5	95
6	6.10	1	90	10
7	7.30	1	90	10

3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri

Perdeleme Gazı	Azot
Perdeleme Gazı(CUR)	20 psig,
İyon Kaynağı Sıcaklığı(TEM)	550 °C,
İyon Kaynağı Gaz I(GS1)	60 psig,
İyon Kaynağı Gaz II(GS2)	40 psig,
Parçalanma Gazı(CAD)	Yüksek
İyon Sprey Voltajı(IS)	4500 Volt
Hedef iyon tarama zamanı	35s
Tarama Modu	Seçili Reaksiyon Görüntüleme (SRM)

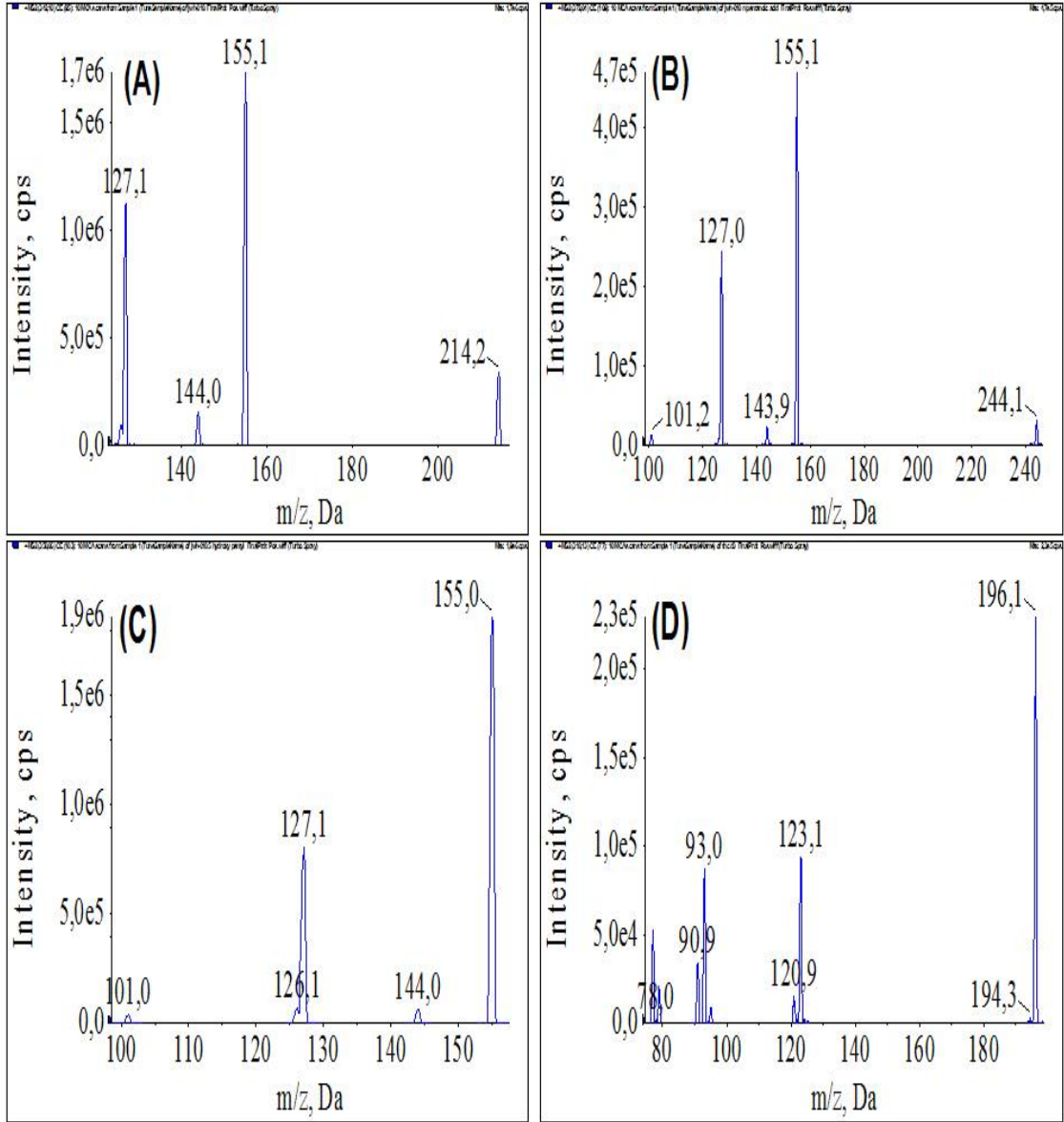
Tablo 3-2 de JWH-018 ve metabolitlerine ait MS/MS metot değerleri verilmiştir.

Tablo 3-2: JWH-018, Metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsor İyon, DP(Kümeleşme Önleyici Potansiyel) ,EP(Giriş Potansiyeli), CE(Parçalanma Enerjisi), CXP(Parçalanma ıkış Enerjisi) ve Alıkonma zamanı değerleri.

Kimyasal İsim	Moleküler kütle (g/mol)	Prekürsor İyon (m/z)	Fragment	DP (Volt)	EP (Volt)	CE (Volt)	CXP (Volt)	Alıkonma zamanı (dk)
JWH-018	341,4	342,1	<u>155.1</u>	80	10	31	10	4.8
			127.1	80	10	57	8	4.8
			214.2	80	10	31	14	4.8
JWH-018 N-Pentanoik Asit	371,5	372,0	<u>155.1</u>	80	10	31	10	4.2
			127.0	80	10	51	8	4.2
			143.9	80	10	47	8	4.2
JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	357,4	358,1	<u>155.0</u>	80	10	27	8	4.2
			127.1	80	10	51	8	4.2
			144.0	80	10	37	8	4.2
THC-d3	317,4	318,1	<u>196.1</u>	110	10	29	16	4.8
			123.1	110	10	47	12	4.8
			93.0	110	10	31	4	4.8

*Altı izgili fragmentler kantitasyon için kullanılmıştır.

Standart maddeler mobil faz içerisinde cihazın iyon kaynağına direkt enjekte edilerek spektrumları alınmış ve Şekil 3-2'de sırasıyla JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 için moleküler İyon parçalanma kromatogramları verilmiştir.



Şekil 3-2: İnfüzyon sırasında moleküler iyondan elde edilmiş JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B), JWH-018 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) maddelerine ait iyon spektrumları

3.6. Validasyon Çalışmaları

Uygulanan yöntemin laboratuvar şartları altındaki validasyon çalışmaları FDA(Gıda ve İlaç Uygulamaları) Biyoanalitik Metot Validasyonu Rehberine [68] uygun olarak yapılmıştır. Bu rehber kapsamında aşağıdaki parametreler çalışılmıştır.

- Seçicilik
- Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi
- Teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)
- Geri kazanım
- Kesinlik
- Kararlılık

3.6.1. Seçicilik Çalışmaları

Çalışılan biyolojik örneklerden kaynaklanabilecek olası girişimlerin gözlemlenmesi amacıyla kör kan ve idrar örnekleri 10'ar ($n \geq 6$) kez örneklenerek LC-MS/MS ile analiz edildi. Kromatogramlarda JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) için belirlenen alıkonma zamanlarında matriksten ve çözücüden kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığı incelendi.

3.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Metodun kantitatif olarak doğru sonuç verdiği konsantrasyon aralığının saptanması için doğrusal aralık belirlenmiştir. Kan ve idrar örneklerine standart çözeltilerden 0.1; 0.25; 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 ng/mL konsantrasyonlar sağlanacak şekilde ilave edilerek 3.4 de anlatıldığı şekilde çalışmaya devam edilmiştir. Her bir konsantrasyon için bağımsız iki kan ve idrar örneği hazırlanmış ve ekstre edilmiştir. Kromatogramlarda her bir analit için elde edilen pik alanları ile IS pik alanı kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Lineer regresyon katsayısı yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar grafiksel olarak verilmiş ve "linear regresyon formülü" ile "korelasyon katsayısı" belirtilmiştir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilmiştir. Korelasyon katsayısı $>0,99$ olmalıdır.

3.6.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Dedektör tarafından belirlenebilen analite ait sinyalin geri plandaki analize engel olabilen etkenlerden (noise) ayırt edilebildiği en düşük miktar o maddenin teşhis sınırıdır. Buna ek olarak analiz edilen madde ile ilgili güvenilir kantitatif sonucun elde edilebildiği en düşük konsantrasyon değeri de o maddenin tayin alt sınırıdır.

Teşhis ve tayin alt sınırı değerleri;

$$\text{LOD} = \bar{X}_{bl} + 3 S_{bl}$$

$$\text{LOQ} = \bar{X}_{bl} + 10 S_{bl}$$

\bar{X}_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin standart sapması,
formülleri ile hesaplanmıştır.

3.6.4. Geri Kazanım

Geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerlerinin hesaplanmaları Matuszewski ve ark.'na [69] uygun olarak yapılmıştır. Bu kapsamda; 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5- hidroksipentil) standart çözeltileri ile yapılan ölçümler (A), kör kan ve idrar örneklerinin ekstraksiyonu sonrası eluata 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5- hidroksipentil) standartlarının eklenmesiyle oluşan çözeltilerde yapılan ölçümler (B) ve son olarak ekstraksiyon işlemi başında son konsantrasyonlar 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL olacak şekilde katım yapılarak hazırlanan kan ve idrar örnekleriyle yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası eluatta yapılan ölçümler (C) değerlendirildi. Kan ve idrar örneklerindeki geri kazanım çalışmaları her konsantrasyonda 6 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Matriks Etkisi (%) = $B/A \times 100$

Geri Kazanım (%) = $C/B \times 100$

Proses Etkinliği (%) = $C/A \times 100$

Formüllerini ile hesaplanmıştır.

3.6.5. Kesinlik

Kesinlik parametresi çalışmaları gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (yeniden üretilebilirlik) olarak düşük, orta ve yüksek üç farklı konsantrasyonda (0.1 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL) katım yapılmış örnekler ile ve her konsantrasyonda on tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

3.6.6. Kararlılık

JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5- hidroksipentil) maddelerinin metanol ve de biyolojik matriksler içindeki kararlılığı oda sıcaklığı, +4° C ve -20 °C sıcaklıklarında 20 gün boyunca izlenmiştir. Ölçüm günü stok çözeltiden taze örnek hazırlanarak alan değerlerindeki değişim ölçülmüştür.

3.7. İstatistiksel Analiz

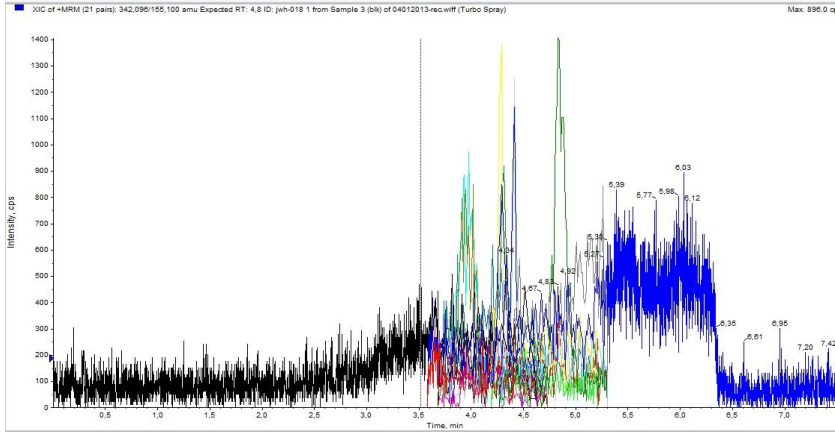
Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 paket programını kullanılmıştır.

4. BULGULAR

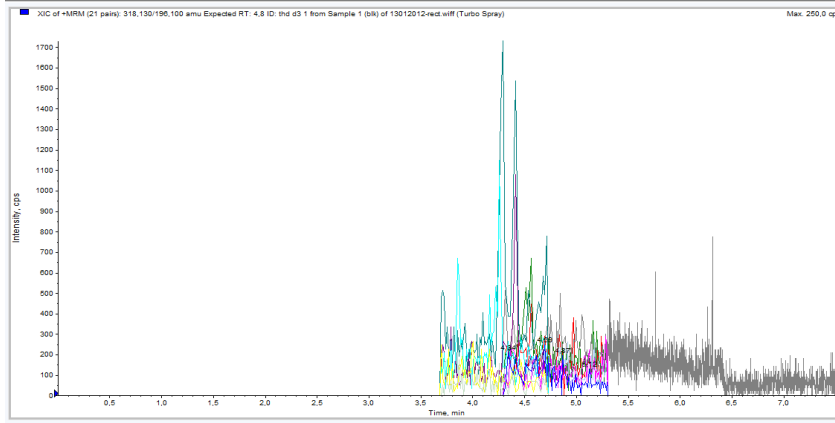
4.1. Metot Validasyonu

4.1.1. Seçicilik

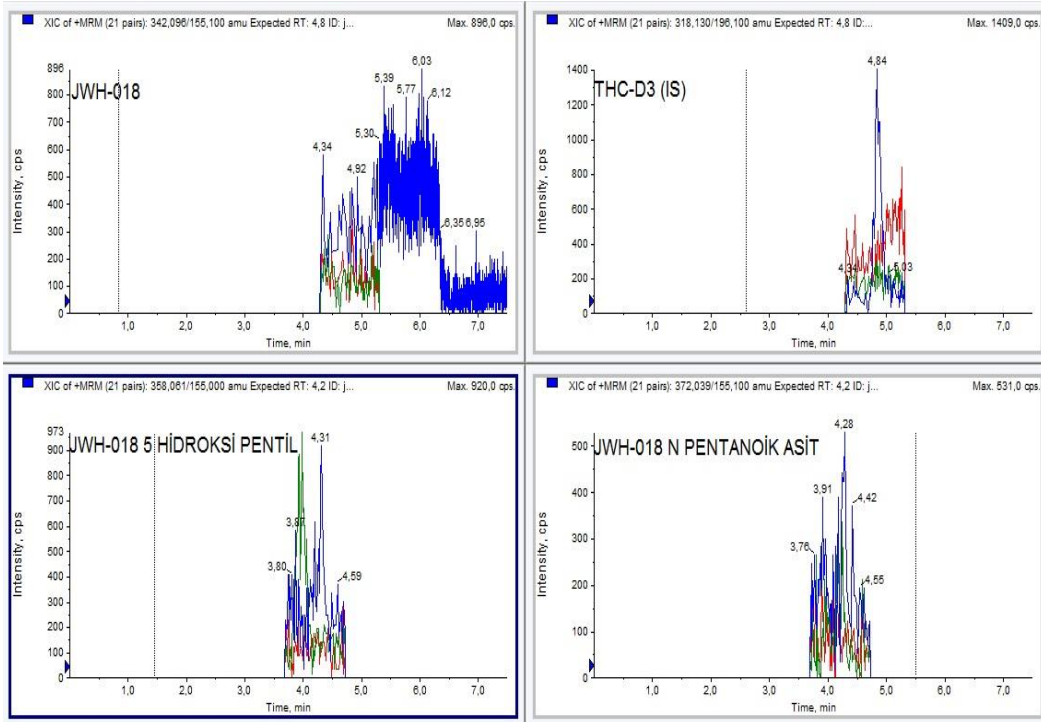
3.4 ve 3.6.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen kromatogramlarda, maddeler için belirlenen alıkonma zamanlarında kör kan ve idrar numunelerde hiçbir girişim tespit edilmemiştir. Şekil 4-1'de kan kör numune kromatogramı, Şekil 4-2'de idrar kör numune kromatogramı ile Şekil 4-3'de kör kan numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı, Şekil 4-4'de kör idrar numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı gösterilmiştir.



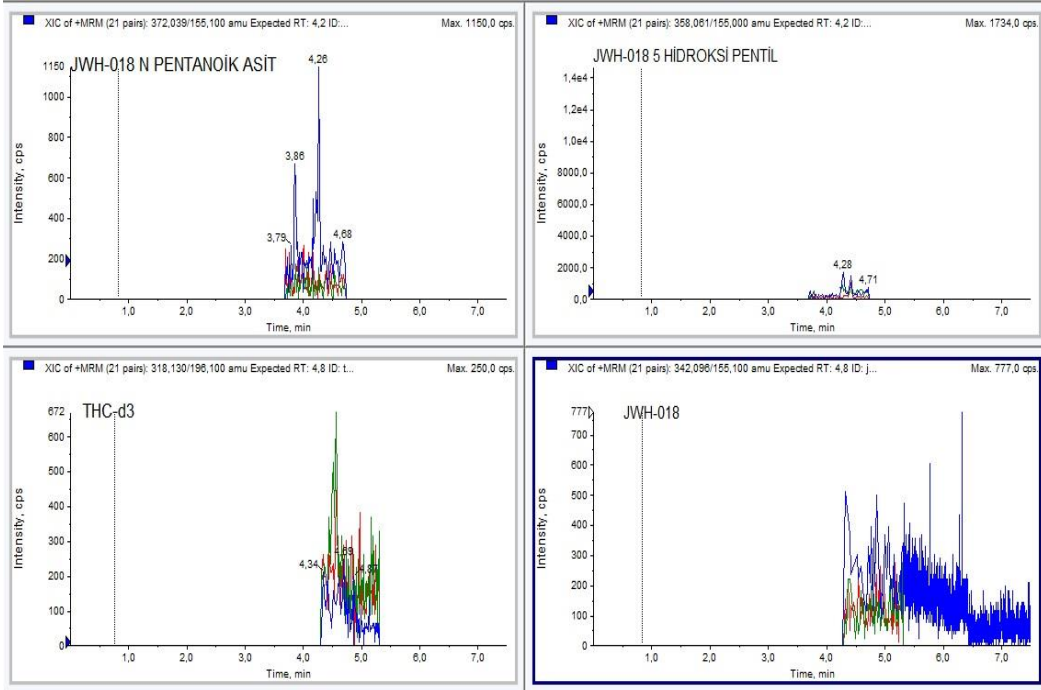
Şekil 4-1: Kör kan numunesi total kromatogramı(TIC)



Şekil 4-2: Kör idrar numunesi total kromatogramı(TIC)

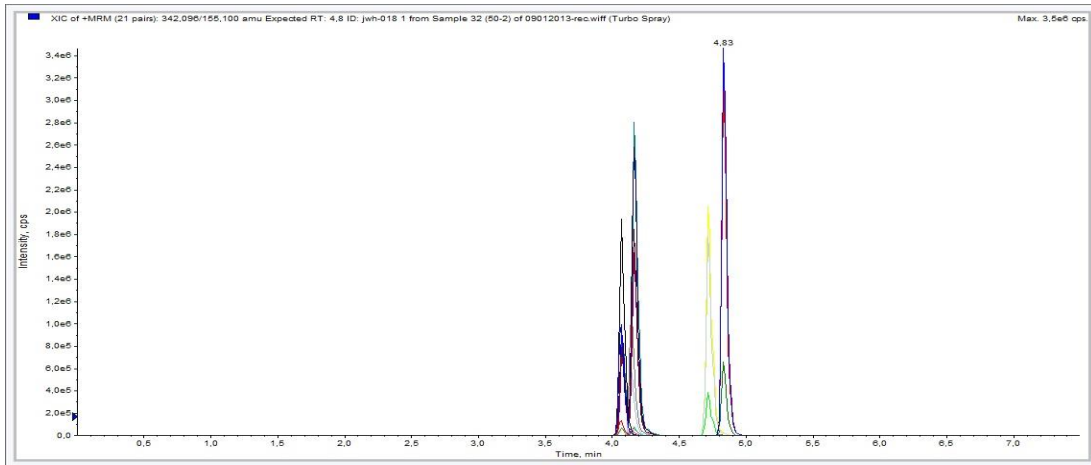


Şekil 4-3: Kör kan numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı

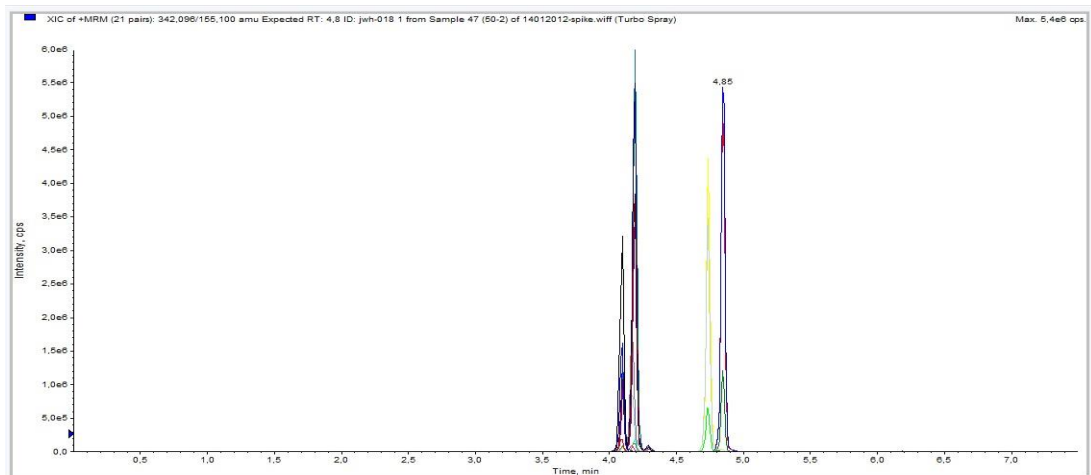


Şekil 4-4: Kör idrar numunesinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5- hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramı

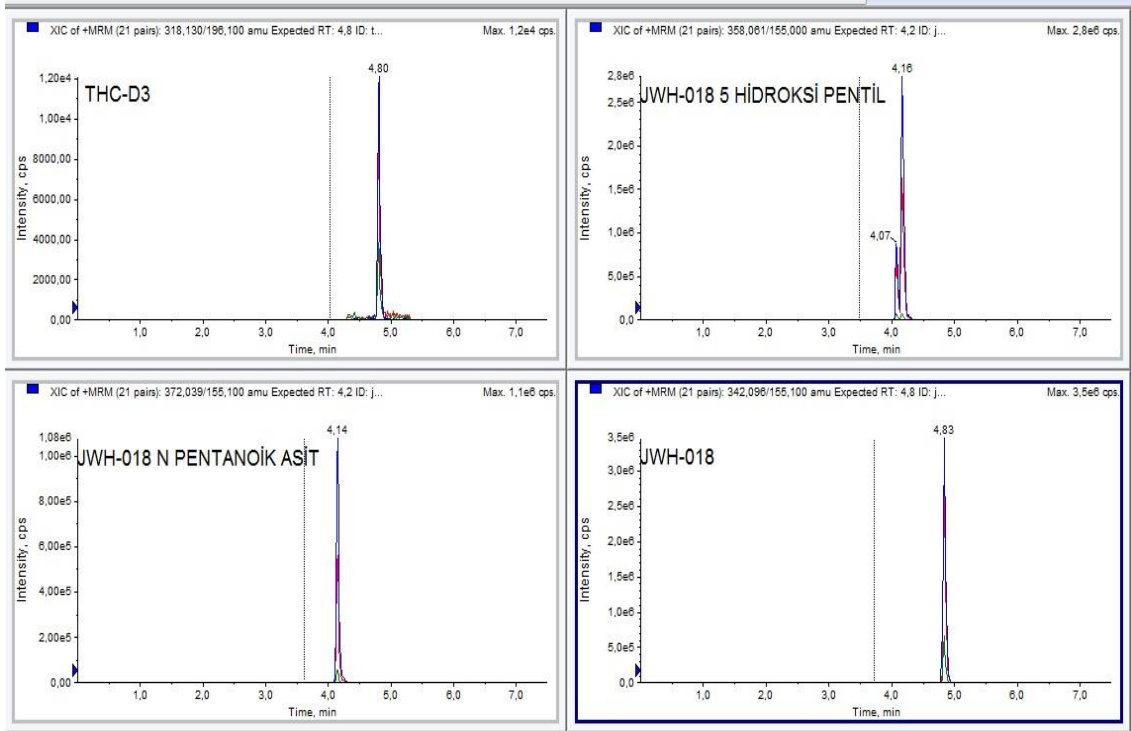
Şekil 4-5’de 50 ng/mL stok standart çözeltisi ile katım yapılmış kan total kromatogramı, Şekil 4-6’de 50 ng/mL stok standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar total kromatogramı ile Şekil 4-7’de 50 ng/mL stok standart çözeltisi ile katım yapılmış kan örneğinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları ve Şekil 4-8’de 50 ng/mL stok standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar örneklerinde JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları gösterilmiştir.



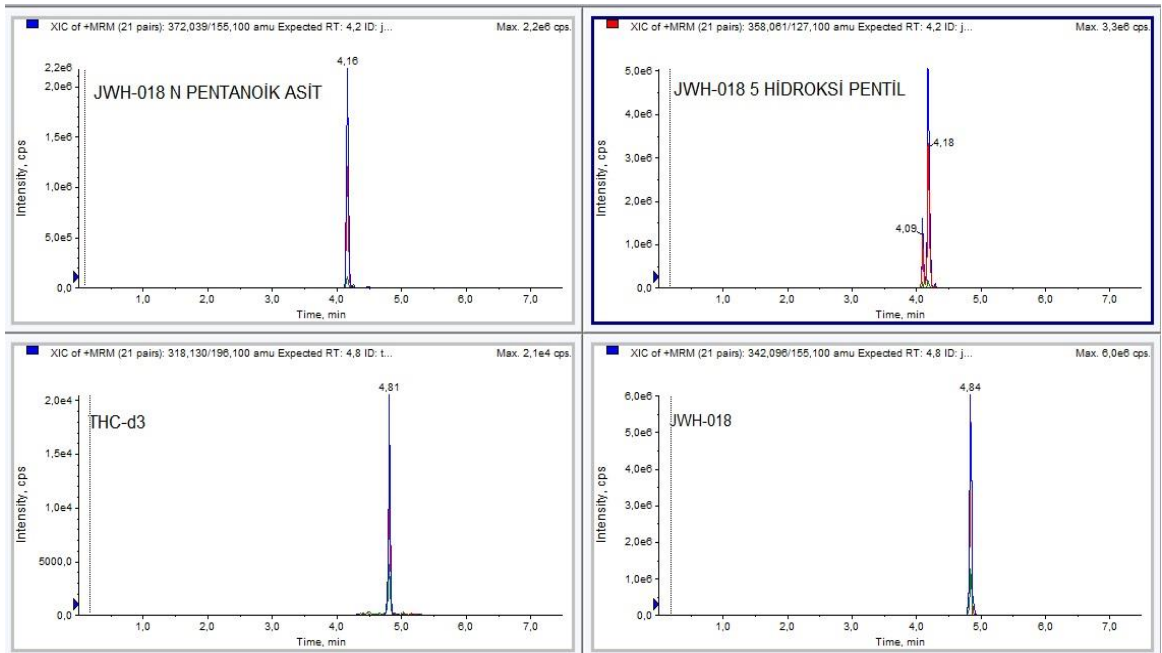
Şekil 4-5: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış kan numunesi total kromatogramı



Şekil 4-6: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış idrar numunesi total kromatogramı



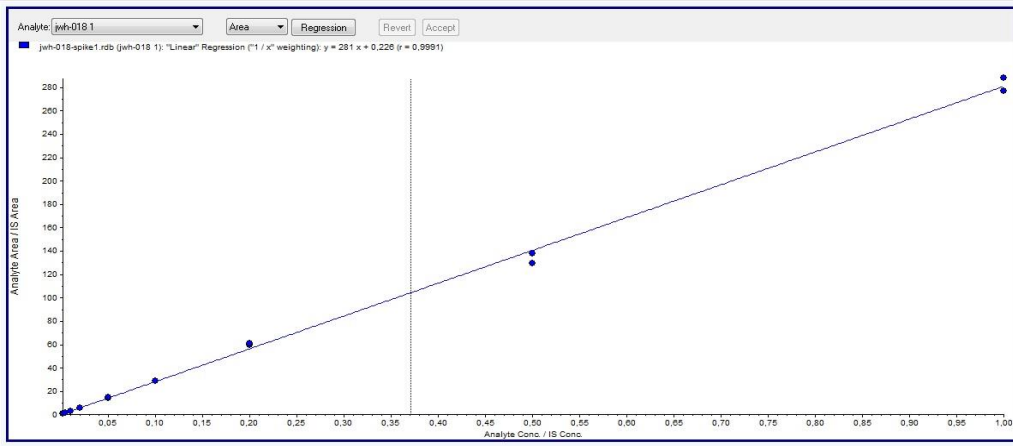
Şekil 4-7: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış kanda JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları



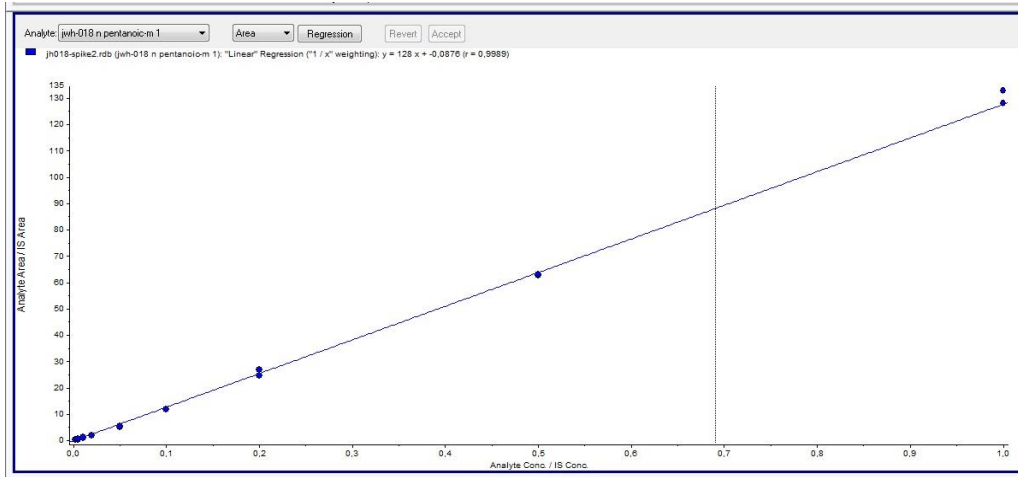
Şekil 4-8: 50 ng/mL standart stok çözeltisi ile katım yapılmış idrarda JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit, JWH-018 N-(5-hidroksipentil) ve THC-d3 alıkonma zamanlarında MRM kromatogramları

4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

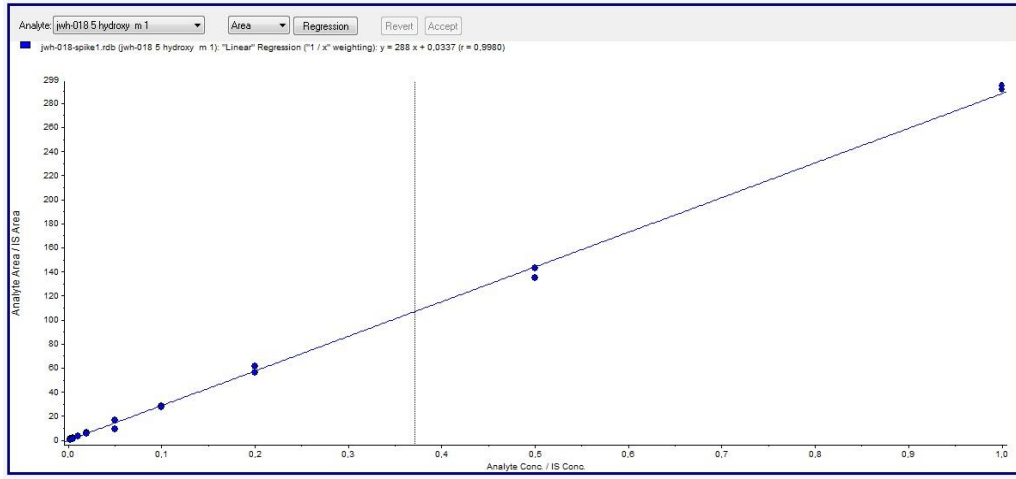
3.4 ve 3.6.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen örnekler ile metodun doğrusal aralığının hesaplanması için 0.1; 0.25; 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 ve 50 ng/mL konsantrasyonlar sağlanacak şekilde örneklere karşılık gelen pik alanı ile IS pik alanı arasında grafik çizildi. Dokuz farklı konsantrasyondan her birinde iki ölçüm yapılmıştır. Şekil 4-9, Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12, Şekil 4-13 ve Şekil 4-14 'da JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



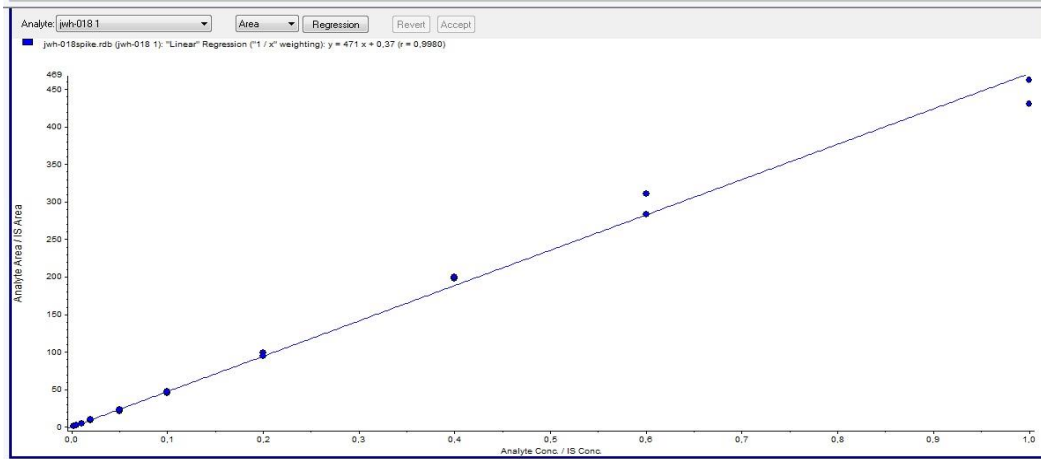
Şekil 4-9: JWH-018 kan kalibrasyon eğrisi



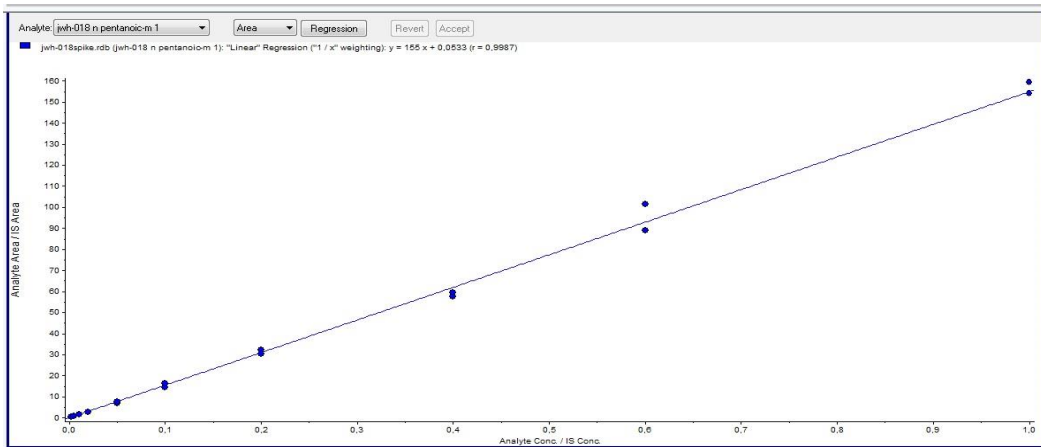
Şekil 4-10: JWH-018 N-Pentanoik Asit kan kalibrasyon eğrisi



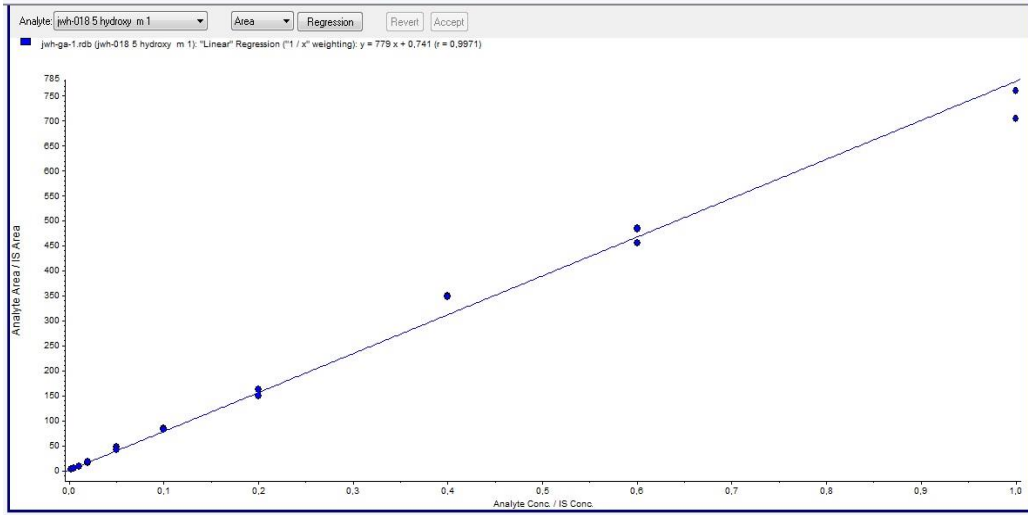
Şekil 4-11: JWH-018 N-(5-hidroksipentil) kan kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-12: JWH-018 idrar kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-13: JWH-018 N-Pentanoik Asit idrar kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-14: JWH-018 N-(5-hidroksipentil) idrar kalibrasyon eğrisi

JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, lineer dinamik aralığı ve korelasyon katsayıları Tablo 4-1’de verilmiştir.

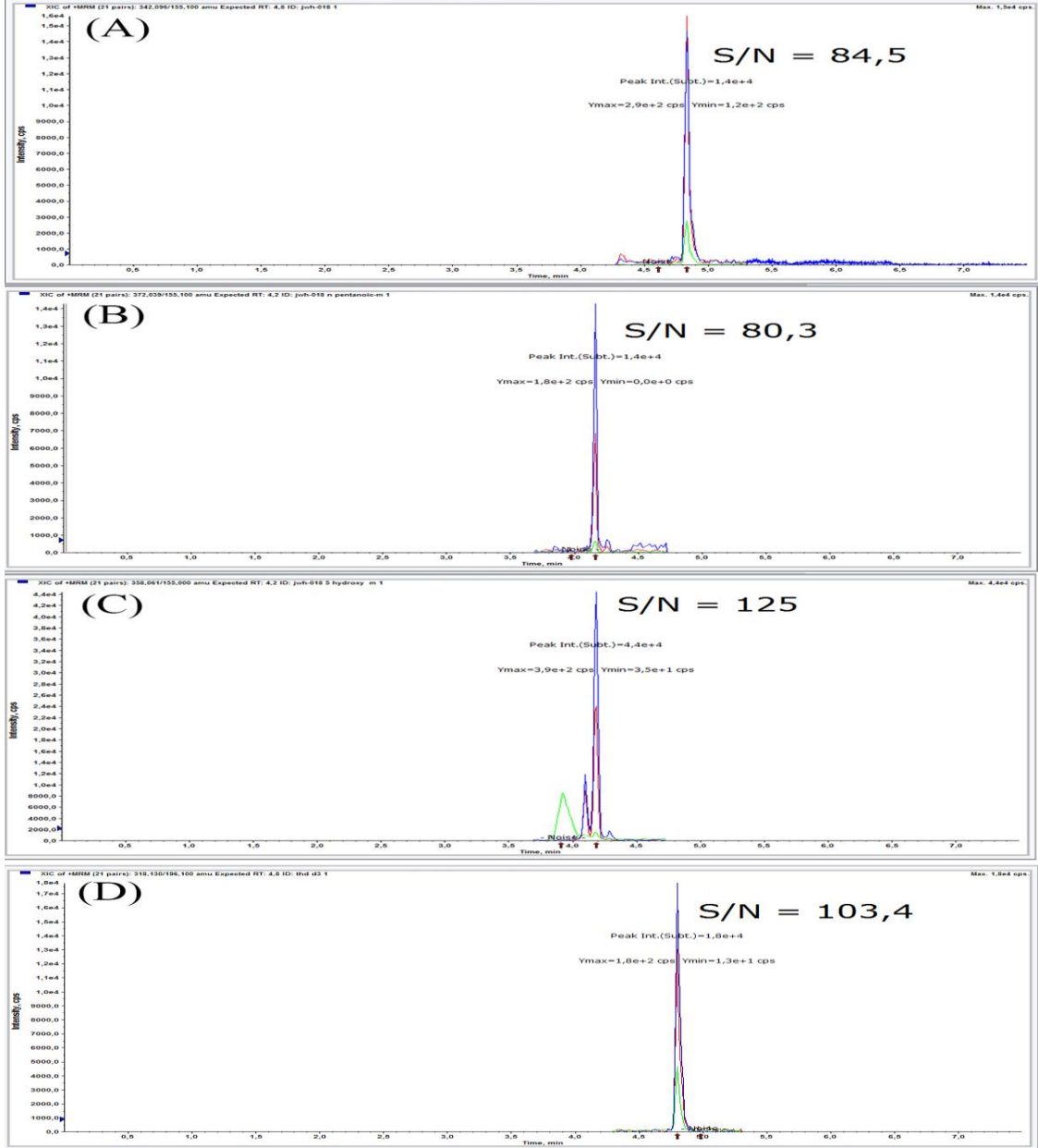
Tablo 4-1: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve korelasyon katsayıları

	Madde	Doğrusal Aralık	Denklem	Korelasyon Katsayısı(r^2)
KAN	JWH-018	0.1-50 ng/mL	$y=281x+0.226$	0.999
	JWH-018 N-pentanoik asit	0.1-50 ng/mL	$y=128x+0.0876$	0.999
	JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	0.1-50 ng/mL	$y=288x+0.037$	0.998
İDRAR	JWH-018	0.1-50 ng/mL	$y=471x+0.37$	0.998
	JWH-018 N-pentanoik asit	0.1-50 ng/mL	$y=155x+0.0533$	0.999
	JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	0.1-50 ng/mL	$y=779x+0.741$	0.997

4.1.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı LOQ)

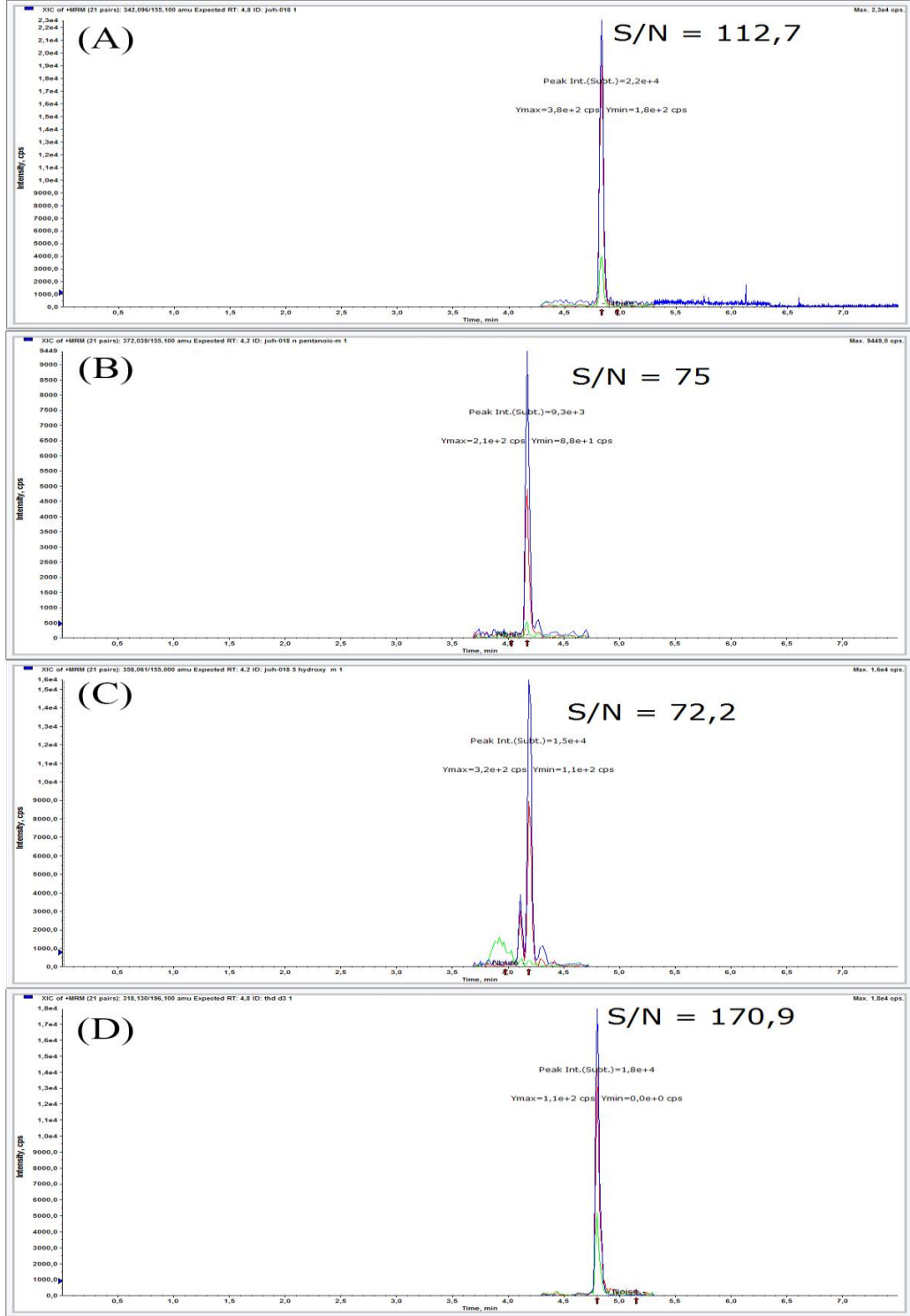
3.4 ve 3.6.3.’de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen S/N (Sinyal/Gürültü) oranı en az 3 şartını taşıyan kan için 0.1 ng/mL, idrar için 0.075 ng/mL konsantrasyonlarında JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) içeren kan ve idrar örnekleri (n=10) çalışılarak teşhis sınırı

ve tayin alt sınırı değerleri belirlenmiştir. Şekil 4-15’de katım yapılmış kanda 0.1ng/mL’de analitlerin S/N değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4-15: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B), JWH-018 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.1 ng/mL)

Şekil 4-16’da katım yapılmış 0.075 ng/mL’de analitlerin S/N değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4-16: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-018 (A), JWH-018 N-Pentanoik Asit (B), JWH-018 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.075 ng/mL)

Tablo 4-2' de analiz edilen JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD ve LOQ değerleri verilmiştir.

Tablo 4-2: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD ve LOQ değerleri (n=10)

Madde	KAN		İDRAR	
	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)
JWH-018	0.12	0.16	0.09	0.12
JWH-018 N-Pentanoik Asit	0.12	0.18	0.08	0.10
JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	0.14	0.21	0.10	0.15

4.1.4. Geri Kazanım

3.4 ve 3.6.4.'de anlatıldığı şekilde, doğrusal aralık içinde bulunan en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri sırasıyla Tablo 4-3 ve 4-4' de verilmiştir.

Tablo 4-3: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kanda geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).

	Konsantrasyon (ng/mL)	JWH-018	JWH-018 N-Pentanoik Asit	JWH-018 N-(5-hidroksipentil)
Geri Kazanım (%)	0.1	97.6	95.7	93.5
	5	94.5	94.8	92.0
	50	91.2	93.3	86.5
Matriks Etkisi (%)	0.1	89.5	87.4	91.7
	5	93.6	88.2	89.7
	50	95.9	93.5	89.7
Proses Etkinliği (%)	0.1	81.6	81.6	79.4
	5	88.4	83.6	82.5
	50	93.6	89.5	83.9

Tablo 4-4: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için idrarda geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).

	Konsantrasyon (ng/mL)	JWH-018	JWH-018 N- Pentanoik Asit	JWH-018 N-(5- hidroksipentil)
Geri Kazanım (%)	0.1	95.5	94.8	92.2
	5	93.9	93.4	89.4
	50	90.9	92.4	85.2
Matriks Etkisi (%)	0.1	88.9	93.2	101.0
	5	83.0	94.7	97.1
	50	85.9	92.2	94.4
Proses Etkinliği (%)	0.1	80.9	86.1	86.0
	5	79.3	88.5	86.8
	50	80.7	87.5	87.1

4.1.5. Kesinlik

3.4 ve 3.6.5.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak hesaplanan kesinlik parametresi gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası tekrarlanabilirlik (yeniden üretilebilirlik) değerleri Tablo 4-5' de ve Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-5: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=10).

Madde	KAN(RSD)			İDRAR(RSD)		
	0.1 ng/mL	5ng/mL	50ng/mL	0.1ng/mL	5ng/mL	50ng/mL
JWH-018	5.8	3.8	3.7	7.3	4.8	4.7
JWH-018 N- Pentanoik Asit	8.1	3.2	3.3	5.1	2	2.1
JWH-018 N-(5- hidroksipentil)	8.8	4.7	4.2	6.1	3.2	2.9

Tablo 4-6: JWH-018, JWH-018 N-Pentanoik Asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddeleri için kan ve idrarda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.

Madde	KAN(RSD)			İDRAR(RSD)		
	0.1ng/mL	5ng/mL	50ng/mL	0.1ng/mL	5ng/mL	50ng/mL
JWH-018	4.3	2.2	3.6	5.3	2.7	4.5
JWH-018 N-pentanoik asit	8.6	2.2	4.5	5.5	1.4	2.9
JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	8.6	4.4	4.6	5.9	3.1	3.2

4.1.6. Kararlılık

3.4 ve 3.6.6.'de anlatıldığı şekilde yapılan kararlılık çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 4-7, Tablo 4-8 ve Tablo 4-9'da verilmiştir. Örneklerde izlenen aralıkta alan değerlerinde anlamlı bir değişiklik(± 10) izlenmemiştir

Tablo 4-7: JWH-018:-20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi.

Madde Adı	Sıcaklık (°C)	Gün	% DEĞİŞİM									
			Kan			İdrar			Metanol			
			0.1	5	50	0.1	5	50	0.1	5	50	
JWH-018	-20	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	4	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	Oda Sıcaklığı	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.

*D.İ.:Değişiklik izlenmedi.

Tablo 4-8: JWH-018 N-Pentanoik Asit: -20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi.

Madde Adı	Sıcaklık (°C)	Gün	% DEĞİŞİM									
			Kan			İdrar			Metanol			
			0.1	5	50	0.1	5	50	0.1	5	50	
JWH-018 N-pentanoik asit	-20	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	4	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	Oda Sıcaklığı	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.

Tablo 4-9: JWH-018 N-(5-hidroksipentil):-20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda 0.1ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında kararlılığın ölçülmesi.

Madde Adı	Sıcaklık (°C)	Gün	% DEĞİŞİM									
			Kan			İdrar			Metanol			
			0.1	5	50	0.1	5	50	0.1	5	50	
JWH-018 N-(5-hidroksipentil)	-20	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	4	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
	Oda Sıcaklığı	t1	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t2	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t3	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t5	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.
		t20	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.	*D.İ.

5. TARTIŞMA

Madde suiistimali dünyada ve ülkemizde toplumun farklı kesimlerini doğrudan veya dolaylı olarak olumsuz etkilemekte olan büyük bir sosyal problemdir. Madde suiistimali; şiddet, çocuk suiistimali, madde etkisi altında araç kullanma gibi çeşitli suçlar ile iş gücü kaybı gibi sosyal sorunlar yanında kullanıcılarla ilgili birçok sağlık problemlerine de yol açmaktadır.

Psikoaktif maddelerin imal ve ticareti yüzyıllardır popülaritesini hiçbir şekilde kaybetmeden devam etmektedir. Yasa koyucunun engelleme ve denetleme çalışmaları her zaman pazarın değişim hızından bir adım geridedir. Sokak kimyacılarının merdiven altı ürettikleri ürünler pazarlandıktan ve piyasada isimleri duyulduktan sonra hukuki süreç devreye girmektedir. Bu yüzden engellenene dek ürünler hedef kitleler tarafından kullanılmaya devam etmekte ve yayılmaktadır.

2004 yılından itibaren sentetik kannabinoidler olarak adlandırılan yeni bir psikoaktif madde grubu kullanıcılar arasında popüler olmuş, internette ve "head shop" denilen dükkanlarda bitkisel karışımlar şeklinde satışa sunulmuştur. Naftoilindoller, sikloheksilfenoller, siklopropilindoller gibi farklı kimyasal gruplara ait tasarım maddeleri olan sentetik kannabinoidler, vücuttaki kannabinoid reseptörleri üzerine doğal ligand olan THC benzeri veya çok daha güçlü affinite gösterirler. Çeşitli karışımlarının bitkisel materyaller üzerine püskürtülmesiyle hazırlanan ve içerdikleri maddelerin ve miktarlarının tam olarak bilinmediği bu ürünlerin tüketimi giderek artmaktadır.

Sentetik kannabinoidlerin farmakolojik ve toksikolojik özellikleri ile ilgili bilinenler oldukça azdır. Etki süreleri, metabolitleri, metabolitlerinin aktiviteleri, birikme özellikleri, etkileşimleri, uzun dönem kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek zararların ortaya çıkarılması ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Birçok maddenin referans standartları henüz bulunamazken

sürekli olarak yeni analoglar piyasaya sürülmektedir. Bu maddeleri kullanmakta olan kişilerin tespiti, bağımlılığının izlenebilmesi, suça karışma riskinin değerlendirilmesi, işlenmiş suçlarda uyuşturucu madde kullanımlarının belirlenebilmesi, farmakokinetik özelliklerinin ve buna bağlı olarak olası risk faktörlerinin belirlenebilmesi için hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu konuda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

Sentetik kannabinoidler içerisinde ilk tanımlanan ve üzerinde en fazla çalışılmış olan madde JWH-018'dir. Varlığı ilk kez 2008 yılı sonlarında Almanya'da tespit edilmiş olan JWH-018' in kötüye kullanımı tüm dünyada hızla artmıştır. ABD' deki zehir danışma merkezlerinin kayıtlarına göre kullanımı 2009 yılı başlarından itibaren artarak devam etmektedir [31]. EMCDDA verileri de bu bilgileri doğrulamaktadır [43]. JWH-018 Türkiye'de ilk kez 2010 yılında yakalanmıştır [67]. Bunu takiben 2011 yılında yasa kapsamına alınmıştır. Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi'nde Eylül 2012-Eylül 2013 tarihleri arasında çalışılan 1914 adli vaka ile bu yöntemle yapılan çalışmada pozitif vakaların %24'ünde JWH-018 ve metabolitlerinden en az bir tanesi tespit edilmiş olup bu oran giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu oluşturulan spektrum veri tabanı sayesinde JWH-018' in laboratuvarlarda tanımlanabilmesi artık mümkün olabilmektedir [11, 27, 45, 46]. Metabolitlerinin belirlenmesi için yapılan hayvan denemeleri ile in vitro çalışmalardan ve kullanıcılardan elde edilen sonuçlardan maddenin ana metabolitlerinin Faz 1 metabolitleri ve özellikle karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) metabolitleri olduğu kabul edilmektedir [13-18, 48, 51, 54-56, 63].

JWH-018 ve metabolitlerinin biyolojik sıvılarda analizleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışmada çoğunlukla sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından LC-MS/MS tekniği kullanılmıştır.

Bu çalışmada JWH-018 ve ana metabolitleri olan JWH-018 N-pentanoik asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil)' in kan ve idrarda tayinleri için katı-faz ekstraksiyonu ve LC-MS/MS yönteminin kullanıldığı kısa, güvenilir ve seçici bir metot geliştirilerek validasyonu yapılmıştır.

Çalışmada öncelikle JWH-018 ve metabolitlerinin kan ve idrarda seçiciliği araştırılmış, kör örneklerde maddelerin alıkonma zamanlarında herhangi bir pik izlenmemiştir.

Çesitli araştırmacılar tarafından JWH-018'in serumda ve kanda sıvı-sıvı ekstraksiyon ve ardından LC-MS/MS ile yapılan analizlerinde bulunan LOD değerleri 0.01 ng/mL ile 0.07ng/mL arasında, LOQ değerleri ise 0.3 ng/mL ile 1 ng/mL arasında değişmektedir [5, 49, 50, 52, 58, 59]. Çalışmamızda tam kanda JWH-018 için tespit edilmiş olan LOD değeri (0.12 ng/mL) ve LOQ değeri (0.16 ng/mL) yapılmış olan çalışmalarla uyumludur.

Teske ve ark.'nın kanda JWH-018 validasyonu ile ilgili yaptığı çalışmada yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle 3-4 saat sonra kanda JWH-018 maddesinin tayininin neredeyse imkansız olduğu söylenmiştir [5]. Poklis ve ark.'ları farelere JWH-018 maddesi vererek kandaki konsantrasyonları LC-MS/MS ile izlenmişler, altı saat sonra JWH-018 konsantrasyonunun 0.13 ng/mL'e düştüğünü gözlemlemişlerdir [50]. Uyuşturucu kullanan kişilerin yakalanması ve biyolojik örneklerin alınması arasında geçen süre çoğu zaman oldukça uzun olduğu için kanda JWH-018 maddesinin tayini oldukça zordur. Bu yüzden metotların Faz I ve Faz II metabolitlerinden en az birini ya da birkaç tanesini içermesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda geliştirilen yöntem ile kanda ve idrarda JWH-18 N-pentanoik asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) metabolitlerinin tayini mümkün olmaktadır.

JWH-018 ile ana metabolitleri olan JWH-018 N-pentanoik asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil)'in idrarda LC-MS/MS ile yapılmış olan analizlerinde metabolitler için bulunan LOD değerleri 0.025 ng/mL ile 0.1 ng/mL arasındadır

[1, 14,51, 65]. Yanes ve ark.'ları idrarda JWH-018 N-pentanoik asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) metabolitleri için LOQ değerini 4 ng/mL olarak hesaplamıştır [61]. Çalışmamızda idrarda JWH-018, JWH-018 ve metabolitleri için tespit edilmiş olan LOD değerleri (0.08-0.1 ng/mL) ve LOQ değerleri (0.1-0.15 ng/mL) yapılmış olan çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda, JWH-018, JWH-018 N-pentanoik asit ve JWH-018 N-(5-hidroksipentil) maddelerine ait kanda ve idrarda oluşturulmuş kalibrasyon eğrilerinin R² değerleri 0.997-0.999 arasında değişmektedir, doğrusal aralıklar ise tüm analitler için 0.1-50 ng/mL'dir.

Kan ve idrar için ortalama geri kazanım değerleri %89.9 - %94.6 aralığında değişmektedir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında RSD değerleri %9 'dan küçük bulunmuştur. Kan, idrar ve metanolde yapılan kararlılık çalışmalarında katım yapılmış örneklerde ve standart alanlarında %10'dan büyük bir değişim gözlenmemiştir. Tüm validasyon sonuçları literatür ve kabul kriterleri ile uyumludur [1, 49, 52] .

Bu çalışma JWH-018 ve metabolitlerinin tam kanda ve idrarda birlikte analiz edildiği ilk çalışmadır. Belirsizlik değerleri oldukça düşük, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım değerleri yüksek ve analiz süresi oldukça kısa olan yöntemin, gerek tarama çalışmalarında JWH-018 ve metabolitlerinin düşük değerlerinin tespiti ve izlenmesi açısından gerekse postmortem örneklerde analizlerinde oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Beuck S, Möller I, Thomas A, Klose A, Schlörer N, Schänzer W ve ark. Structure characterisation of urinary metabolites of the cannabimimetic JWH-018 using chemically synthesised reference material for the support of LC-MS/MS-based drug testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; **401(2)**: 493-505.
2. Tetko IV. ve Bruneau P. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house veribase. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004 ; **93(12)**: 3103-3110.
3. *Synthetic cannabinoids and Spice* [web page on internet]. Erişim 20.05.2011, <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drugprofiles/>.
4. Mustata C ve ark. "Spice" drugs: cannabinoids as a new designer drugs. *Adicciones* 2009; **21(3)**: 181-186.
5. Teske J, Weller JP, Fieguth A, Rothamel T, Schulz Y ve Tröger HD. Sensitive and rapid quantification of cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl) methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2010; **878**: 2659-2663.
6. Every-Palmer S. Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study. *Drug and Alcohol Dependence* 2011; **117**: 152-157.
7. Di Marzo V ve Petrocellis LD. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annual Review of Medicine* 2006;**57**: 553–574.
8. Gerra G, Zaimovic A, Gerra ML, Ciccocioppo R, Cippitelli A, Serpelloni G ve ark. Pharmacology and toxicology of Cannabis derivatives and endocannabinoid agonists. *Recent Patents CNS Drug Discovery* 2010; **5**: 46–52.

9. Seely KA, Lapoint J, Moran JH ve Fattore L. "Spice" drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012; **39**: 234-243.
10. Huffman JW ve ark. Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1994; **4**: 563-566.
11. Hudson S, Ramsey J, King L, Timbers S, Maynard S, Dargan PI, ve ark. Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabimimetics in 'herbal high' products. *Journal of Analytical Toxicology* 2010; **34**: 252-260.
12. Makriyannis A ve Deng H. Cannabimimetic indole derivatives. *WO Patent* 2001;200128557.
13. Grigoryev A, Savchuk S, Melnik A, Moskaleva N, Dzhurko J, Ershov M ve ark. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2011; **879**: 1126-1136.
14. Möller I, Wintermeyer A, Bender K, Jübner M, Thomas A, Krug O, Schanzer W ve Thevis M. Screening for synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Testing and Analysis* 2011; **3**: 609-620.
15. Wintermeyer A, Moller I, Thevis M, Jubner M, Beike J ve ark. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; **398**: 2141-2153.
16. Chimalakonda KC, Bratton SM, Le VH, Yiew KH, Dineva A, Moran CL ve ark. Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073,

- metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition* 2011; **39**: 1967–1976.
17. Moran CL, Le VH, Chimalakonda KC, Smedley AL, Lackey FD, Owen SN ve ark. Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine. *Analytical Chemistry*. 2011; **83** (11): 4228-4236.
 18. Sobolevskii TG, Prasolov IS ve Rodkov GM. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International* 2010; **200(1-3)**: 141–147.
 19. Gronewold A ve Skopp G. A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Science International* 2011; **210**: 7-11.
 20. Zhang Q, Ma P, Cole RB ve Wang G. Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC–MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; **386**: 1345-1355.
 21. Hájos N ve Freund TF. Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chemistry and Physics of Lipids* 2002; **121**: 73–82.
 22. Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T ve ark. mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *Journal of Pharmacological Science* 2008; **108**: 308–319.
 23. Desroches J ve Beaulieu P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Current Drug Targets* 2010; **11**: 462–473.
 24. European Monitoring Centre For Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *EMCDDA Annual Report on the implementation of Council*

- Decision of Europol 2008 2005/387/JHA*[web page on internet]. Erişim 31.10.2012,<http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index132901EN.html>
- 25.** *Synthetic Cannabinoid-Discussion-Take-3*[web page on internet]. Erişim 03.11.2012,<http://www.bluelight.ru/vb/threads/615340-MEGA-Synthetic-Cannabinoid-Discussion-Take-3>
- 26.** Zimmermann US, Winkelmann PR, Pilhatsch M, Nees JA, Spanagel R, ve Schulz K. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "Spice Gold". *Deutsches Ärzteblatt International* 2009; **106**: 464–467.
- 27.** Atwood BK, Huffman J, Straiker A, Mackie K (2010) JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB receptor agonist. *British Journal of Pharmacology* 2010; **160**: 585–593.
- 28.** Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996; **278**: 989–999.
- 29.** St. James Journal 2010. *Doctors concerned over possible link of K2, heart damage*[web page on internet].Erişim 21.10.2012,<http://www.WFAA.com>. Dallas/Fort Worth.
- 30.** Vardakou I, Pistos C ve Spiliopoulou CH. Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicology Letters* 2010; **197**: 157–162.
- 31.** Forrester MB, Kleinschmidt K, Schwarz E ve Young A. Synthetic cannabinoid exposures reported to Texas poison centers. *Journal of Addictive Diseases* 2011; **30**: 351–358.

32. Auwarter V ve ark. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs?. *Journal of Mass Spectrometry* 2009; **44(5)**: 832-837.
33. Muller H ve ark. The synthetic cannabinoid Spice as a trigger for an acute exacerbation of cannabis induced recurrent psychotic episodes. *Schizophrenia Research* 2010; **118(1-3)**: 309-310.
34. Castellanos D, Singh S, Thornton G, Avila M ve Moreno A. Synthetic cannabinoid use: a case series of adolescents. *Journal of Adolescent Health* 2011; **49**: 347-349.
35. Lapoint J, James LP, Moran CL, Nelson LS, Hoffman RS ve Moran JH. Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)* 2011; **49**: 760-764.
36. Young AC ve Schwarz E. Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *The American Journal of Emergency Medicine* 2012; **30**:1320.
37. Simmons JR, Skinner CG, Williams J, Kang CS, Schwartz MD ve Wills BK. Intoxication from smoking "Spice". *Annals of Emergency Medicine* 2011;**57**:187-188.
38. Bebarta VS, Ramirez S, Varney SM. Spice: a new "legal" herbal mixture abused by young active duty military personnel. *Substance Abuse* 2012; **33(2)**: 191-194.
39. Tomiyama K ve Funada M. Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in Spice products: the role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicology Letters* 2011; **207**: 12-17.
40. Hurst D, Loeffler G ve McLay R. Psychosis associated with synthetic cannabinoid agonists: a case series. *The American Journal of Psychiatry* 2011; **168**: 1119.

41. Wiebelhaus JM, Poklis JL, Poklis A, Vann RE, Lichtman AH, Wise LE. Inhalation exposure to smoke from synthetic “marijuana” produces potent cannabimimetic effects in mice. *Drug and Alcohol Dependence* 2012; **126**: 316– 323
42. 2011 Annual report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA[web page on internet]. Erişim 04.08.2012, <http://www.emcdda.europa.eu/>.
43. *Understanding the “Spice” phenomenon* [web page on internet]. Erişim 04.05.2010,http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_80086_EN_”Spice”%20Thematic%20paper%20%E2%80%94%20final%20version.pdf
44. Resmi Gazete.13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazete[web page on internet].Erişim 13.10.2012, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/02/20110213.htm>.
45. Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J ve Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International* 2010; **198** :31–38.
46. Dresen S, Ferreiros N, Pütz M, Westphal F, Zimmermann R ve Auwarter V . Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *Journal of Mass Spectrometry* 2010; **45(10)**: 1186-1194
47. Hudson S, Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis* 2011; **3(7-8)**: 466-478.
48. Logan BK PhD, Kacinko S L. PhD, McMullin MM , Allan X, Middleberg R A. Technical Bulletin: Identification of Primary JWH-018 and JWH-073 Metabolites in Human Urine. *NMS LAB*, 2011.
49. Kacinko SL., Allan X, Homan JW., McMullin M M, Warrington DM ve Logan BK. Development and Validation of a Liquid Chromatography

- Tandem Mass Spectrometry Method for the Identification and Quantification of JWH-018, JWH-073, JWH-019, and JWH-250 in Human Whole Blood. *Journal of Analytical Toxicology* 2011; **35**: 385-393
50. Poklis JL, Amira D, Wise LE, Wiebelhaus JM, Haggerty BJ, Poklis A. Detection and disposition of JWH-018 and JWH-073 in mice after exposure to "Magic Gold" smoke. *Forensic Science International* 2012; **220**: 91-96
 51. Jager AD, Warner JV, Henman M, Ferguson W, Hall A. LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – An Australian perspective. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012; **897**: 22– 31
 52. Dresen S, Kneisel S, Weinmann W, Zimmermann R, and Auswaerter V. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *Journal of Mass Spectrometry* 2011; **46**: 163-171.
 53. Sobolevskii TG, Prasolov IS, Rodchenkov GM. Application of mass spectrometry to the structural identification of the metabolites of the synthetic cannabinoid JWH-018 and the determination of them in human urine. *Journal of Analytical Chemistry* 2011; **66**: 1314-1323
 54. Chimalakonda KC, Moran CL, Kennedy PD, Endres GW, Uzieblo A, Dobrowolski PJ, et al. Solid phase extraction and quantitative measurement of omega and omega-1 metabolites of JWH-018 and JWH-073 in human urine. *Analytical Chemistry* 2011; **83(16)**: 6381-6388
 55. ElSohly MA, Gul W, Elsohly KM, Murphy TP, Madgula VL, Khan SI. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine

- specimens for K2 (JWH-018) metabolites. *Journal of Analytical Toxicology* 2011; **35(7)**: 487-495.
- 56.** Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques. *Journal of Mass Spectrometry* 2012; **47(1)** :54-65.
- 57.** Poklis JL, Amira D, Wise LE, Wiebelhaus JM, Haggerty BJ, Lichtman AH et al. Determination of naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in mouse blood and tissue after inhalation exposure to 'buzz' smoke by HPLC/MS/MS. *Biomedical Chromatography* 2012; **26(11)**: 1393-1398.
- 58.** Shanks KG, Dahn T, Terrell AR. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in postmortem whole blood casework. *Journal of Analytical Toxicology* 2012; **36(3)**: 145-152.
- 59.** Ammann J, McLaren JM, Gerostamoulos D, Beyer J. Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 - Synthetic cannabinoids. *Journal of Analytical Toxicology* 2012; **36(6)**: 372-380.
- 60.** Hutter M, Kneisel S, Auwärter V, Neukamm MA. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012; **903**: 95-101.
- 61.** Yanes EG, Lovett DP. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012; **909**: 42-50.
- 62.** Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Romolo FS, Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of

- designer drugs, "spice" and stimulants in oral fluid. *Journal of Chromatography. A.* 2012; **1258**: 37-42.
- 63.** Wohlfarth A, Scheidweiler KB, Chen X, Liu HF, Huestis MA. Qualitative confirmation of 9 synthetic cannabinoids and 20 metabolites in human urine using LC-MS/MS and library search. *Analytical Chemistry* 2013; **85(7)**: 3730-3738.
- 64.** Emerson B, Durham B, Gidden J, Lay JO Jr. Gas chromatography-mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards. *Forensic Science International* 2013; **229(1-3)**: 1-6.
- 65.** Jang M ve ark. Monitoring of urinary metabolites of JWH-018 and JWH-073 in legal cases. *Forensic Science International* 2013; **231(1-3)**: 13-19
- 66.** Niessen W M A. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Third Edition.* Leiden(NL): CRC Press Taylor & Francis Group; 2006.
- 67.** TÜBİM 2012 *Türkiye Uyuşturucu Raporu* [web page on internet]. Erişim 10.08.2013, http://www.tubim.gov.tr/dosyalar/raporlar/Tubim_Raporu_2012.pdf.
- 68.** FDA Bioanalytical Method Validation Guide 2011. [web page on internet]. Erişim 11.02.2012 , <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>
- 69.** Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Analytical Chemistry* 2003; **75**: 3019–3030.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1327

Tarih : 17.08.2012

Konu : Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA hk,

Sayın Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi

İlgi :İ.Ü. Eczacılık Fakültesinin 11.07.2012 tarihli 116 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Yeter EROL'un yürüteceği 2012/1278-1154 dosya numaralı "JWH-018 ve Metabolitlerinin LC/MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayini" başlıklı tez çalışması kurumumuzun 10.08.2012 tarihli 13 sayılı sayılı toplantısında uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yeter	Soyadı	Erol Öztürk
Doğ.Yeri	Çekerek	Doğ.Tar.	20.07.1982
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	18155590284
Email	yetererol@hotmail.com	Tel	+90 (505) 720 90 19

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lise	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzman	Adli Tıp Kurumu	2007-
2.	Kimya Mühendisi	Petfer Madeni Yağ ve Motor Yağları	2006-2007
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	76	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik, Sinema, Tiyatro, Yemek Pişirmek ve Seyehat