

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL

KAN ve İDRAR ÖRNEKLERİNDE LC/MS/MS ile AB-CHMINACA ve
METABOLİTLERİNİN TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA BETÜL ÇIĞMAN

İSTANBUL, 2019



İstanbul, 17 Haziran 2019

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Fatma Betül ÇIĞMAN'ın,

“Kan ve İdrar Örneklerinde LC/MS/MS ile AB-CHMINACA ve Metabolitlerinin Tayini”

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.


Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL
Jüri Başkanı
Danışmanı


Prof. Dr. Ümit Naci GÜNDOĞMUŞ
Üye


Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN
Üye

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL

KAN ve İDRAR ÖRNEKLERİNDE LC/MS/MS ile AB-CHMINACA ve
METABOLİTLERİNİN TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA BETÜL ÇIĞMAN

İSTANBUL, 2019

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL'a, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU'na, Adli Tıp Kurumu Başkanı Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK'e, Adli Tıp Kurumu Başkan Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Hızır ASLIYÜKSEK'e, Kimya İhtisas Dairesi Başkanı İsmail ATEŞ'e, katkılarından dolayı Dr. Oya YETER'e ve Dr. Yeter EROL ÖZTÜRK'e, desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarıma, dostlarıma ve aileme teşekkür ederim.

Fatma Betül ÇIĞMAN

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ ve AMAÇ	13
2.GENEL BİLGİLER	16
2.1 Sentetik Kannabinoidler	16
2.2 AB-CHMINACA	21
2.2.1 Farmakokinetik özellikleri	23
2.2.2 Farmakodinamik özellikleri	26
2.2.3 Toksikolojik etkileri	29
2.2.4 Yasal Düzenlemeler	31
2.2.5 Analiz yöntemleri	32
2.3 LC/MS/MS Yöntemi	33
3.GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler	39
3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, çözücüler ve çözeltiler	40
3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	40
3.2.2 Çözeltiler	40
3.3 Biyolojik Örnekler	42
3.4 Kan ve İdrar Örneklerinin Hazırlanması	42
3.5 LC/MS/MS Sistemi Çalışma Şartları	44
3.5.1 Likit sistem özellikleri	44
3.5.2 MS sistemi özellikleri	45
3.6 Validasyon Çalışmaları	47

3.6.1 Seçicilik çalışmaları	47
3.6.2 Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi	47
3.6.3 Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	48
3.6.4 Geri kazanım.....	48
3.6.5 Kesinlik.....	49
3.6.6 Kararlılık.....	49
3.7 İstatiksel Analiz	49
4.BULGULAR	50
4.1 Metot Validasyonu	50
4.1.1 Seçicilik.....	50
4.1.2 Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi.....	54
4.1.3 Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	58
4.1.4 Geri kazanım.....	60
4.1.5 Kesinlik.....	61
4.1.6 Kararlılık.....	63
5.TARTIŞMA	64
6.SONUÇ	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	79
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLolar LİSTESİ

Tablo I. LC/MS/MS likit sistemi akış özellikleri.....	45
Tablo II. AB-CHMINACA ve metabolitleri ile AB-PINACA-d9'a ait MS/MS değerleri ve alikonma zamanları.....	46
Tablo III. Linearite çalışması sonucunda elde edilmiş olan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kalibrasyon eğrisi denklemi, doğrusal aralık ve korelasyon katsayısı.....	58
Tablo IV. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda LOD ve LOQ değerleri.....	59
Tablo V. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kan örneklerindeki analitlerin geri kazanım ve matriks etkisi değerleri.....	61
Tablo VI. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait idrar örneklerindeki analitlerin geri kazanım ve matriks etkisi değerleri.....	61
Tablo VII. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri-n=6.....	62
Tablo VIII. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri-n=6.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: a) THC ve b) HU-210 maddelerinin kimyasal yapıları.....	17
Şekil 2: Farklı ambalaj ve paketler.....	18
Şekil 3: AB-CHMINACA maddesinin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 4: AB-CHMINACA'nın olası <i>in vitro</i> metabolizasyonu.....	24
Şekil 5: a) AB-CHMINACA-M1A, b) AB-CHMINACA-M2 ve c) AB-PINACA-d9 maddelerinin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 6: LC/MS/MS blok diyagramı.....	34
Şekil 7: ESI iyon kaynağı ile oluşan iyonların kapilere girişi.....	36
Şekil 8: ESI iyon kaynağında iyonların oluşturulması.....	37
Şekil 9: LC/MS/MS sisteminde quadrupollerin dizilimi.....	37
Şekil 10: Kan/idrar örneklerinin SPE basamakları.....	44
Şekil 11: Kör kan numunesi total iyon kromatogramı-TIC.....	50
Şekil 12: Kör idrar numunesi total iyon kromatogramı-TIC.....	50
Şekil 13: a) AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 ve d) AB-PINACA-d9 maddelerinin kör kan numunesinde alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramı.....	51
Şekil 14: a) AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 ve d) AB-PINACA-d9 maddelerinin kör idrar numunesinde alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramı.....	52

Şekil 15: a) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış kan örneği total iyon kromatogramı b) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış kan örneğinde AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları.....	53
Şekil 16: a) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar örneği total iyon kromatogramı b) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar örneğinde AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları.....	54
Şekil 17: AB-CHMINACA kan kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 18: AB-CHMINACA-M1A kan kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 19: AB-CHMINACA-M2 kan kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 20: AB-CHMINACA idrar kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 21: AB-CHMINACA-M1A idrar kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 22: AB-CHMINACA-M2 kan kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 23: 0.3 ng/mL katım yapılmış kan örneğinde a)AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 maddelerinin S/N değerleri.....	59
Şekil 24: 0.15 ng/mL katım yapılmış idrar örneğinde a)AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 maddelerinin S/N değerleri.....	60

KISALTMALAR ve SEMBOLLER

µg/mL	Milyonda bir birim
µL	Mikrolitre
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu
CB1	Kannabinoid 1
CB2	Kannabinoid 2
CE	Parçalanma enerjisi
CP	Sikloheksilfenol
DC	Doğru akım
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
ESI-LC/MS/MS	Elektrosprey iyonizasyonlu-likit kromatografi/tandem kütle spektrometrisi
EtAc	Etil asetat
EWS	Erken uyarı sistemi
GC/MS	Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi
HLM	İnsan karaciğer mikrozomu
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IPA	2-Propanol

IR	Kızılötesi spektroskopi
IS	İç standart
LC/HR-MS	Likit kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi
LC/MS/MS	Likit kromatografi/tandem kütle spektrometrisi
LC/QTOF-MS	Likit kromatografi/kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
LC/TOF-MS	Likit kromatografi/uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
LLE	Sıvı faz ekstraksiyonu
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
m/z	Kütle/yük
mg	Miligram
mL	Mililitre
MRM	Çoklu reaksiyon görüntüleme
MS	Kütle spektrometrisi
MSS	Merkezi sinir sistemi
ng/mL	Milyarda bir birim
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
rCYP	İnsan rekombinant sitokrom
RF	Radyofrekans

rpm	Dakikadaki dönme sayısı
RSD	Bağıl standart sapma
SK	Sentetik kannabinoid
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
SWGTOX	Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu
THC	Δ^9 -Tetrahidrokannabinol
TIC	Total iyon kromatogramı
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi

ÖZET

Sentetik kannabinoidler, esrarın temel psikoaktif bileşeni olan Δ 9-Tetrahidrokannabinol ile aynı reseptörlere etki ederek esrara benzer etki oluşturan maddelerdir. İlk olarak bilim insanları tarafından yeni ilaç geliştirme çalışmaları için endokannabinoid sistemi araştırma amaçlı sentezlenen sentetik kannabinoidler, 2004 yılı itibariyle “Spice” markası adı altında satılan bitkisel karışımlar olarak illegal uyuşturucu pazarında yerini almıştır. Üreticiler tarafından kimyasal yapılarında gerçekleştirilen ufak modifikasyonlar sonucu maddelerin rutin uyuşturucu analizlerinde tespiti güçleşmektedir. Bu durum üreticilerin sentetik kannabinoidleri “esrara yasal alternatif” adı altında kolayca pazarlamalarına olanak vermektedir. Sürekli değiştirilen kimyasal yapıları neticesinde artan madde çeşitliliği ile sentetik kannabinoidler, son yıllarda yeni psikoaktif maddelerin en geniş alt grubu haline gelmişlerdir.

Sentetik kannabinoidler özellikle gençler arasında oldukça popüler olmalarına rağmen, farmakolojik, toksikolojik özellikleri ve biyolojik örneklerde tespitlerine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Bu yüksek lisans tezi, bir sentetik kannabinoid olan AB-CHMINACA ve ana metabolitlerinin (AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2) kanda ve idrarda katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak LC/MS/MS’te spesifik ve güvenilir bir şekilde tespit ve kantitasyonunu kapsayan bir metot geliştirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık tüm analitler için 0.990’dan yüksek korelasyon katsayısı değerleri ile 0.5-25 ng/mL olarak bulunmuştur. Tespit limiti (LOD) kan ve idrar örnekleri için 0.22 – 0.39 ng/mL aralığındadır. %RSD değerleri; günüçi tekrarlanabilirlik çalışmaları için %10’un altında, günlerarası tekrarlanabilirlik çalışmaları için ise %12’nin altında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri 76.0% - %123.8, matriks etkisi değerleri ise 77.7% - 123.4% aralığında bulunmuştur. Ekstrakte edilen maddeler gözlem süresi (24 saat) boyunca otoörnekleyicide kararlı (\leq % 10) kalmışlardır.

Çalışılmış olan validasyon parametresi değerlerinin tümü, toksikolojik analizlerin validasyonuna yönelik hazırlanan uluslararası rehberlerin kabul aralıkları içerisinde. Böylece metodun, AB-CHMINACA ve metabolitlerinin kan ve idrar örneklerinde tespiti ve tayinine yönelik geçerliliği ispatlanmıştır. Metodumuz adli olguların aydınlatılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: AB-CHMINACA, AB-CHMINACA metabolitleri, LC/MS/MS, Kan, İdrar, Sentetik kannabinoidler, Spice, Bonzai

ABSTRACT

Synthetic cannabinoids (SCs) are substances that mimic effects of cannabis by acting on the same receptors as delta-9-tetrahydrocannabinol which is the principle psychoactive ingredient of cannabis. Originally, they were synthesized by researchers to investigate the mechanism of endocannabinoid system in order to develop new pharmaceuticals. Since 2004, these chemicals have become available on illegal drug market as “herbal smoking mixtures” under the brand name “Spice”. With a slight alteration in the chemical structure of existing illegal substances producers make these newly synthesized compounds difficult to be detected or identified in routine drug analysis, thus suppliers can easily sell SCs as “legal” alternative to marijuana on the illicit drug market. As a result of consistently increasing diversity in the chemical structures of SC's, they have become the largest subgroup of new psychoactive substances (NPSs) in recent years.

Although SCs have become very popular especially among young people, studies concerning their pharmacological, toxicological properties and their detection in biological samples are very limited.

This master thesis was conducted to develop a specific and reliable method for detection and quantification of the SC AB-CHMINACA and its main metabolites (AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2) in blood and urine samples by using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry techniques. The linear ranges were found 0.5-25 ng/mL for all analytes with a correlation coefficient greater than 0.990. The limit of detections (LOD) were between 0.22 – 0.39 ng/mL for blood and urine. %RSD values were found lower than %10 for intraday precision assays and lower than %12 for interday precision assays. Recovery values were in the ranges of 76.0% - %123.8. Matrix effect values were found

between 77.7 % and 123.4 %. Processed samples were stable (\leq % 10) under autosampler conditions for observation time (24 hours).

Since all of the studied validation parameter values were within the acceptance interval given by international guidelines for forensic toxicological analysis, the proposed method was proved to be suitable for detection and quantification of AB-CHMINACA and metabolites in blood and urine samples. This method will make an important contribution to enlighten forensic cases.

Key words: AB-CHMINACA, AB-CHMINACA metabolites, LC/MS/MS, Blood, Urine, Synthetic cannabinoids, Spice, Bonzai

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İplik ve yakıt üretiminden bitkisel tedavi ve dini ayinlere kadar oldukça farklı amaçlarla tüketilen kenevir, Orta Asya kökenli bir bitkidir. Yüzyıllar içinde dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilip kullanılmıştır. Kenevir bitkisinin Türkiye’de daha ziyade “esrar”, yurtdışında ise “marijuana” olarak bilinen *Cannabis sativa* ve *Cannabis indica* türleri, kullanıcılarında yol açtığı psikoaktif etki dolayısıyla uyuşturucu madde olarak da kullanım alanı bulmuştur (1-2).

Çin İmparatoru Shen-Nung tarafından M.Ö. 2737’de yazılmış olduğuna inanılan notların derlendiği tıp kitabında; esrarın gut, sıtma ve romatizma üzerinde tedavi edici etkisi olduğundan bahsedilmiştir. Günümüzde dünya genelinde kullanımı en yaygın uyuşturucu madde olan esrarın, psikoaktif etkilerinden dolayı kullanımına da ilk kez aynı kitapta yer verilmiştir (1-4).

Esrarın psikoaktif etkisinden sorumlu etkin maddesi olan Δ^9 -Tetrahidrokannabinol’ün (THC) esrardan izolasyonu 1964 yılında gerçekleştirilmiş ve bunu takip eden yıllarda THC’nin etki ettiği reseptörler üzerine yapılan çalışmalar sonucunda Kannabinoid 1 (CB1) ve Kannabinoid 2 (CB2) reseptörleri keşfedilmiştir (5-6). Kannabinoid reseptörlerinin keşfinden sonra bilim insanları, kullanıldığında esrar benzeri psikoaktif etkilere sebep olmayan fakat terapötik etkileri bakımından esrara benzerlik göstermesi beklenen ilaç araştırmaları için CB1 ve CB2 reseptörlerine etki eden maddeler sentezlemişlerdir (6).

1980’li yıllarda Huffman ve ark., endokannabinoidlerin yapısını ve vücuttaki etki mekanizmasını aydınlatmak amacı ile araştırmalarında kullanılmak üzere “JWH” serisi olarak adlandırılan bileşikler sentezlemişlerdir (7). Sentetik kannabinoidler (SK), ilk olarak 2004 yılında uyuşturucu olarak kullanılması amacıyla merdiven altı laboratuvarlar tarafından üretilmiş ve internet yolu ile “Spice” olarak adlandırılan bitki karışımları halinde piyasaya sürülmüşlerdir. 2008 yılında, bu bitki karışımlarını kullananlarda görülen psikoaktif etkinin

bitkilere ilave edilmiş bir SK olan JWH 018'den kaynaklanmış olduğu raporlanmış ve bunun sonucunda pek çok ülkede 2009 yılında JWH 018 kullanımının yasaklanmasına yönelik yasal düzenlenmelere gidilmiştir (8). Maddenin yasa kapsamına girmesinden kısa bir süre sonra yeni nesil SK'ler piyasada görülmeye başlamıştır. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) verilerine göre, 2009'da 9 adet olarak bildirilen tespit edilmiş SK çeşidi, kanunlara takılmama amaçlı sürekli değiştirilen kimyasal yapıları neticesinde, 2017 yılının sonlarında 179 adete ulaşmıştır. 2016 yılı itibariyle sentetik esrarlar yeni psikoaktif maddelerin en geniş grubu haline gelmiştir (9).

Kullanıcılarda esrar benzeri psikoaktif etki oluşturan bu maddelerin ucuz olması sebebiyle kolay temin edilebilmesi ve yasa kapsamına girmemesi için sürekli değiştirilen kimyasal yapılarıyla rutin analizlerde tespitinin zor olması gibi cazip yanlarının bulunması, SK'leri kısa zaman içerisinde özellikle gençler arasında oldukça popüler hale getirmiştir (10).

Üretim sırasında bitkiye spreylenen madde için belirli bir konsantrasyon standardı olmaması, çözücüyü kurutma aşamasında kontaminasyona karşı önlem alınmaması ve bunlara ek olarak maddelerin etkisini güçlendirmek veya yan etkilerini gidermek amaçlı konulan çeşitli katkı maddelerinin varlığı gibi olumsuz faktörler toksikolojik açıdan önem arz etmektedir (8).

Bu teze konu olan AB-CHMINACA (N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide) 2009 yılında Pfizer firması tarafından bilimsel amaçlı sentezlenmiş ve ilk kez 2014 yılında illegal ürünlerde tespit edilmiş olan indazol karboksamid grubuna ait bir SK'dir (11). Ülkemizde, 15/09/2014 tarihinde 6800 Sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla 2313 Sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun'un kapsamına alınmıştır (12).

Öngörülemeyen toksisitelerinin ve bağımlılık potansiyellerinin toplum sağlığı açısından risk teşkil etmesi sebebiyle SK'lerin biyolojik örneklerde tespit edilmesini sağlayan metotların

geliştirilmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada elektrosprey iyonizasyonlu-likit kromatografi/tandem kütle spektrometrisi (ESI-LC/MS/MS) cihazı kullanılarak kanda ve idrarda AB-CHMINACA ve metabolitlerinin tayini; seçici, hassas ve güvenilir bir analitik metot geliştirilmesi ve geliştirilen metodun validasyonu amaçlanmıştır.

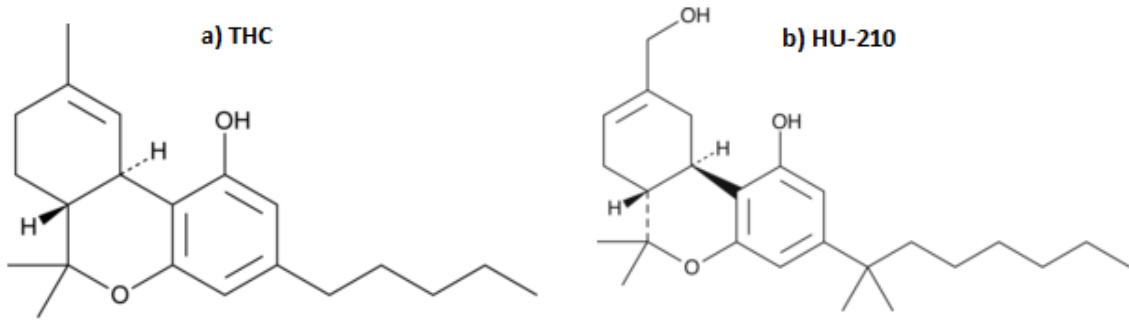


2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sentetik Kannabinoidler

SK'ler, THC ile aynı kannabinoid reseptörlerine olan affinitelerinden dolayı ilk olarak bilim insanları tarafından THC'nin spesifik etki mekanizmasını araştırma ve yeni terapötik madde bulma çalışmalarında potansiyel bulundurmaları gerekçesiyle araştırma kimyasalları olarak üretilen psikoaktif etkili maddelerdir (10).

Bilim insanlarının; “klasik kannabinoidler” olarak sınıflandırılan dibenzofuran halkalı THC analoglarını üretme çalışmaları, THC'nin izolasyonunun gerçekleştirildiği yıllarda başlamıştır. Bu amaçla yapılan ilk çalışmalar sonucunda, 1960'larda yapı bakımından THC'ye benzer olan ilk SK'ler sentezlenmiştir. Hebrew Üniversitesindeki araştırmacılar tarafından geliştirilen ve üniversitenin baş harfleri ile isimlendirilen HU-210, esrarın 100 katı potansiyele sahip sentezi zor olan klasik kannabinoidlerdendir (Şekil 1). 1970'li yıllarda, “non-klasik kannabinoidler” sınıfına dâhil olan sikloheksilfenol (CP) yapılı SK'ler Pfizer firması tarafından geliştirilmişlerdir. Bu maddelerden biri olan CP-47,497 sentezinin kolay olması ve CB1 reseptör aktivitesinin yüksek olmasından dolayı popülerlik kazanmıştır. John William Huffman ve çalışma ark. 1980'li yıllarda kannabimetik aktiviteye sahip olan aminoalkilindoller olarak da bilinen birçok SK sentezlemiş ve bunları isminin baş harflerini kullanarak isimlendirmişlerdir. JWH serisi bileşiklerin arasında, yüksek farmakolojik aktiviteye sahip olması ve sentezinin kolay olması sebebi ile kötüye kullanılan ilk SK'lerden olan JWH-018 de bulunmaktadır (8,10,13). 2009 yılında, Pfizer firması indazolkarboksamid türevi SK'leri üretmiş ve patentini almıştır (11). Kimyasal isimlerine göre adlandırılan bu grubun üyelerine AB-CHMINACA, MDMB-CHMINACA örnek olarak verilebilir.



Şekil 1: a) THC ve b) HU-210 maddelerinin kimyasal yapıları

(Kaynak: <https://www.caymanchem.com/product/12068>, <https://www.caymanchem.com/product/90082>)

SK'lerin bilimsel amaçlı sentezlenmesi dışında illegal laboratuvarlar tarafından eğlence amaçlı kullanımına yönelik bitki potpurisi şeklinde üretilip “Spice”, “K2”, “Bonzai” gibi markaların adı altında internet ortamından satışına başlanması 2004 yılını bulmuştur. Genellikle bitkisel bir karışımın üzerine aseton veya metanol gibi uçucu çözümlerde çözülmüş maddenin püskürtülmesi ve kurutulan bu bitki karışımının ortalama 0.4-3.0 gr olacak şekilde paketlenip “bitkisel tütsü” adı altında piyasaya sürümü ile satışı gerçekleştirilmektedir (8). Ürünler, bozulmayı geciktirmesi ve özellikle gençlerin ilgisini çekmesi gibi amaçlar ile dikkat çekici alüminyum paketlerde satılmaktadır (Şekil 2). Yasal kontrollere takılmadan geçmesi için paketlerin üzerinde “insan kullanımı için değildir” veya “doğal”, “bitkisel” gibi yazılar bulunmakta ve içindekiler kısmı gerçekte paket içinde olanları yansıtmayıp SK varlığından bahsedilmemektedir (14). Kullanıldığı ilk dönemlerde yasa koyucular tarafından psikoaktif etkilerinin olduğu bilinmeyen ve haliyle kullanımında yasal bir kısıtlılık bulunmayan bu maddelerin üretim yerlerinin Çin gibi uzak doğu ülkeleri olduğu ve buradan dünya geneline yayıldığı düşünülmektedir (8, 15). Satıcılar tarafından “yasal marijuana” veya “yasal kafa yapıcı” şeklinde lanse edilen bu maddelerin paketlerinin üzerinde içerik olarak çeşitli bitkilerden bahsedilmekte oluşu görüldükleri ilk dönemde psikoaktif etkilerin bitkilerden kaynaklandığını düşündürmüştür (6). Paketlerde genellikle psikoaktif etkiye yol açmayan

bitkilerin varlığının belirtilip nadiren doğal psikoaktif alkaloidler içeren bazı bitkilerin varlığından bahsedilmesi ve kullanıcılarda oluşan etkinin bu bitkilerin oluşturabileceğinden fazla olması zamanla şüphe uyandırmıştır (6, 16). Almanya’da bulunan bir ilaç şirketi olan THC Pharm 2008 yılında “Spice” markası altındaki bitki karışımlarının neden olduğu psikoaktif etkiden sorumlu maddeyi araştırma amaçlı bir çalışma yapmış ve araştırmanın sonucunda psikoaktif özelliğin bitkisel kaynaklı olmadığı, bitki üzerinde çözülmüş halde bulunan bir SK olan JWH-018 bileşiğinden kaynaklandığını belirtmiştir (6). Bu rapordan kısa bir süre sonra başka “Spice” ürünleri üzerinde yapılan araştırmaların neticesinde yine bir SK olan CP-47,497’nin C8 homologunun varlığı tespit edilmiştir (6). Bu gelişme ile bu bitki karışımları yasa koyucuların dikkatini çekmiş ve 2009 yılı itibariyle tespit edilen SK’ler çeşitli ülkelerde yasa kapsamına alınmaya başlanmıştır (6).



Şekil 2: Farklı ambalaj ve paketler

(Kaynak: <https://hereshelpinc.com/synthetic-marijuana/>)

Piyasaya sürüldüğü ilk yıllarda benzin istasyonları, sigara dükkânları gibi halka açık alanlarda herhangi bir yasal engele takılmadan satılabilen SK'lerin otoritelerin dikkatini çekmesi sonucu "yasal" statüsünü kaybetmesi satıcıları yeni türevlerini üretmeye yöneltmiştir. Maddenin yasa kapsamına alınmasını takiben kimyasal yapısında ufak modifikasyonlar yapılarak üretilmiş yeni analogların piyasaya sürülmesi yaklaşımı yasa kapsamına alınan tüm SK'ler için devam etmiştir (10, 14). Bu durumun sonucunda, EMCDDA verilerine göre SK'ler 2016 yılından itibaren yeni psikoaktif maddelerin en geniş alt grubu haline gelmiştir (9).

SK'lerin merdivenaltı laboratuvarlar tarafından üretilirken belirli bir standart prosedüre uyulmaması çeşitli toksikolojik sorunları beraberinde getirmektedir. Bitki karışımlarının içeriğini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalar aynı markaya ait farklı paketlerin içerisinde bulunan SK cinsinin, çeşidinin ve madde konsantrasyonlarının paketten pakete değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır (9,16). Bitkisel karışımların kontaminasyona açık bir ortamda hazırlanıp kurutuluyor olmaları ve maddelerin psikoaktif etkisini arttırmak veya yan etkilerini azaltmak amaçlı konulan katkı maddelerinin varlığı risk faktörünü arttırmaktadır (14). Piyasadaki "Bonzai" paketlerinde aktif SK'in yanında; THC, O-desmetiltramadol, harmin/harmalin, tokoferol, nikotin, oleamid, kafein ve brodifakum gibi opioidlerden fare zehirine kadar değişebilen bir yelpazede farklı maddeler bulunabilmektedir (16, 17). Aynı marka altındaki paketlerin içerisinde farklı miktarda ve içerikte ürün, katkı maddeleri, kontaminantlar bulunması kullanıcılar açısından yanıltıcı olmakta; kişinin aynı oluşunu düşünüp daha önce kullanmış olduğu ürün ile aynı paketi kullanması toksisite ile sonuçlanabilmektedir.

SK'lerin kötüye kullanımı toplum sağlığı ve güvenliği açısından akut ve uzun dönemli sorunlarla bağdaştırılmaktadır. Kullanıcı üzerindeki total etkisi çeşitli parametrelerden etkilenebilmektedir. SK'lerin birçoğunun CB1-CB2 reseptörleri tam agonisti olmalarına karşın

esrarın kısmı agonist olması, etkilerinin de esrara nazaran daha çok olması ile ilişkilendirilmektedir (18). Yapılan çalışmalar sonucunda SK'lerin temel idrar metabolitlerinin hidroksil metabolitleri ve bunu takip eden glukranidasyon şeklinde gerçekleştiği literatürde yer almıştır. Hidroksillenmiş metabolitlerin oluşmasından yola çıkarak CYP'nin SK'lerin biyotransformasyonunda rol aldığı kabul görmüştür. UGT enzimleri de glukronidleşme basamağında görev almaktadır. THC'nin bilinen tek aktif metaboliti olan 11-hydroxy- Δ^9 -THC ana maddeden daha düşük CB1 reseptör affinitesine sahip iken bazı SK'lerin hidroksillenmiş metabolitleri yüksek CB1 reseptör affinitesi göstermektedir. Oluşan aktif metabolitlerin başka SK'ler ile eklentik veya sinerjetik etkileşimi SK kaynaklı yan etkilerin fazla oluşu ile bağlantılı olarak düşünülebilir. SK'lerin kendileri gibi P450 isoformlarının substratları olan başka ilaçlarla birlikte kullanımları söz konusu olduğunda, aynı polimorfik enzimi paylaşımından kaynaklı çeşitli ilaç-ilaç etkileşimlerine sebep olma potansiyeli mevcuttur (19).

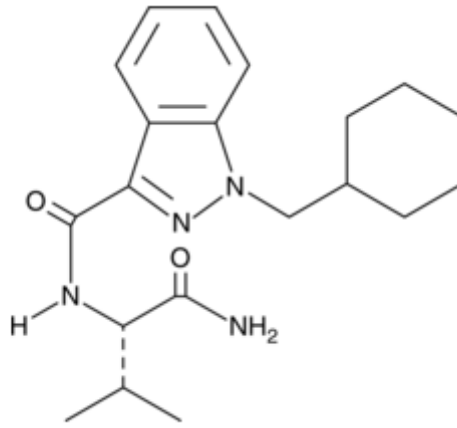
SK'lerin bağımlılık geliştirme potansiyelinin klasik THC'ye oranla daha yüksek olduğu bilinmektedir. Madde yoksunluğu kaynaklı belirtiler; SK kullanım miktarı veya kullanılan maddenin potansiyeli gibi farklı parametrelere de bağlı olarak vakaya göre hafiften ciddiye değişkenlik gösterebilmektedir. Baş ağrısı, terleme, diare, bulantı, göğüs ağrısı, taşikardi, miyalji, kasılma nöbetleri gibi fizyolojik semptomlar; anksiyete, ajitasyon, insomnia, paranoya, halüsinasyon, delüsyon, intihar düşüncesi/girişimi gibi psikolojik semptomlar SK yoksunluğuna bağlı gelişen belirtilerden bazılarıdır (20). Kronik SK kullananlarda esrara benzer veya daha şiddetli yoksunluk sendromu görülebilmektedir (13,21). Tolerans çabuk gelişebildiğinden beklenen etkiyi elde etmek amaçlı maddenin fazla alınması toksisiteye neden olabilmektedir (8).

Ucuz olmaları, kaçakçılığının kolay olması, tespitinin zor olması ve etkisinin esrardan daha güçlü olduğu yönündeki duyumlardan dolayı evsizler ve mahkûmlar gibi bazı hassas gruplar için oluşturduğu tehlike özellikle endişe vericidir (9).

2.2 AB-CHMINACA

AB-CHMINACA; indazol yapısında bir SK reseptör agonisti olup diğer SK'ler gibi esrarın psikoaktif bileşeni olan THC'nin kannabimetik etkisini taklit etmek amacıyla üretilmiştir. İlk defa 2009 yılında Pfizer firması tarafından bilimsel amaçlar ile sentezlenip patenti alınan bu maddenin, yasadışı yollarla üretilip uluslararası uyuşturucu pazarına girmesi 2014 yılına denk gelmektedir (11,22,23).

Şekil 3'te moleküler formülü $C_{20}H_{28}N_4O_2$ olan AB-CHMINACA maddesinin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 3: AB-CHMINACA maddesinin kimyasal yapısı

(Kaynak: <https://www.caymanchem.com/product/15434>)

Maddenin bilinen adı yapısal özelliklerinden yola çıkılarak elde edilmiştir: metil amino butanon bağlantılı grubu (AB), siklo heksil metil kuyruk (CHM), indazol çekirdek (INA) ve karboksamid bağlayıcı (CA) (24).

AB-CHMINACA sikloheksil metil grubunun indazol halkasındaki azotlara bağlanmasına göre değişen iki pozisyonel izomere sahiptir. Longworth ve ark. piyasadaki AB-CHMINACA içeren ürünlerde bulunabilen pozisyonel izomerin (AB-CHMINACA 2-izomer) kannabimetik etkisinden dolayı bilinçli üretilip üretilmediği veya yapım aşamasından kaynaklı bir safsızlık olup olmadığını konusunu araştırmak için, AB-CHMINACA ve yapısal izomerini sentezlemiş ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda yüksek CB1 ve CB2 affinitesine sahip olduğu bilinen AB-CHMINACA'nın aksine yapısal izomerinin her iki reseptöre karşı da çok düşük düzeyde agonist potansiyeli gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu durum ve her iki maddenin üretimi için aynı ana çıkış maddesinin kullanıldığı da göz önüne alındığında, maddenin yapısal izomerinin merdiven altı laboratuvarlarda üretim aşamasında düzgün saflaştıramama kaynaklı bir impürite olarak maddenin yanında bulunduğu sonucuna varmışlardır (25).

Madde, kiral merkeze sahip olmasından dolayı (R)- ve (S)- enantiomerlerine sahiptir. Pfizer firması tarafından ilk üretilen halinin (S)- konfigürasyonunda olması ve sentezinde kullanılan kimyasallar sonucunda (S)- izomerinin oluşmasının beklenmesi, piyasada bulunan ürünlerin daha çok (S)- enantiomer yapısında olduğunu düşündürmektedir (24). AB-CHMINACA'nın stereokimyasının kannabinoid reseptör aktivitesini nasıl etkilediğine dair bir çalışma bulunmamaktadır.

Saf halinde beyaz kristal yapıda toz bir madde görünümünde olan AB-CHMINACA, uygun bir çözücüde çözülüp çeşitli otlara püskürtülmesi yoluyla hazırlanarak paketlenip piyasaya sürülmektedir (26-27). Bu şekilde hazırlanan ot karışımlarının Bonzai, Jamaican Gold Supreme, Diablo, Bomb! Marley, Vertex, Aromatic Potpuri, Manga Xtreme, V.I.P, Love R&B gibi çeşitli markaların adı altında satışı tespit edilmiştir. Toz formunda, elektronik sigaralarda kullanılmak üzere sıvı halde veya kâğıda emdirilmiş şekilde satışı mevcuttur (24,27,28).

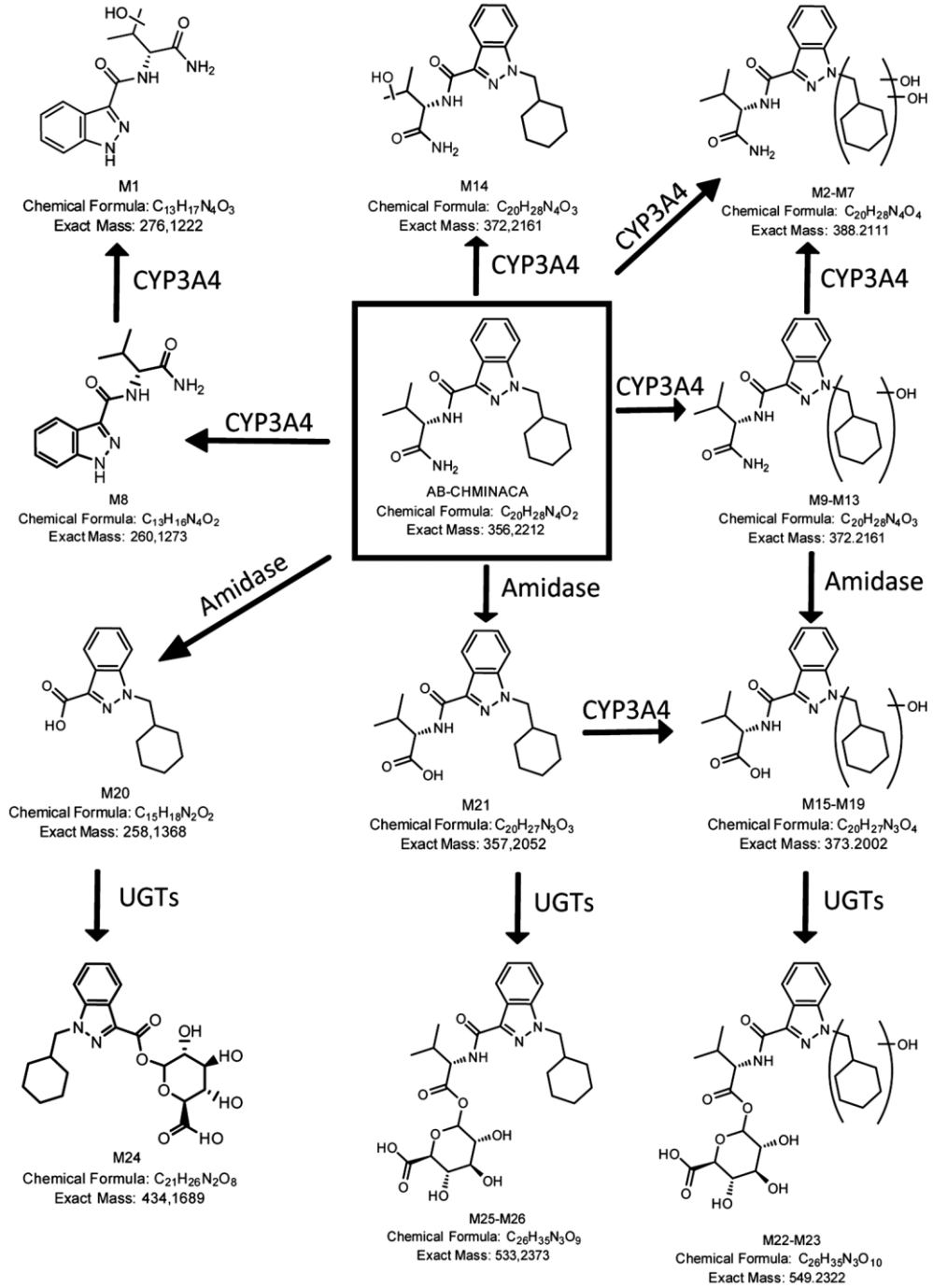
Bitkisel karışım halinde satılan formlarının bazılarında başka SK'lerin varlığı tespit edilmiştir. Avrupa SK pazarını araştırma amaçlı Ağustos 2014-Haziran 2017 tarihleri arasında 975 adet sigara olarak içilmeye uygun ürünün analizi yapılmış ve sonucunda bu ürünlerin %15'inin AB-CHMINACA içerdiği tespit edilmiştir. AB-CHMINACA içeren ürünlerin %72'sinde maddenin tek başına bulunduğu, %19'unda beraberinde başka bir SK'in de bulunduğu, %9'unda ise AB-CHMINACA yanında birden fazla SK bulunduğu belirtilmiştir. Bitkisel karışımların bazılarında; amfetamin, pentedron, clefedron gibi sitimülanlara rastlandığı da olmuştur. Bu ürünlerin paketlerinde içerikleri belirtilmediğinden kullanıcılar çoğunlukla AB-CHMINACA kullandığının bilincinde olmadan maddeyi kullanmaktadır (24).

AB-CHMINACA kullanıcıları; diğer SK'lerin kullanıcıları gibi uyuşturucu bağımlıları, eğlence amaçlı kullananlar, esrara "yasal" alternatif olarak kullananlar, deneyim edinme amaçlı kullananlar ya da rutin uyuşturucu testlerini atlatmak amaçlı kullananlar olarak belirtilebilir.

2.2.1 Farmakokinetik özellikleri

AB-CHMINACA'nın ilk *in vitro* ve *in vivo* insan metabolizma çalışması Erratico ve ark. tarafından insan karaciğer mikrozomu (HLM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşan metabolitleri tespit etmek için likit kromatografi/kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (LC/QTOF-MS) cihazı kullanılmış ve çalışma sonucunda toplamda 26 metabolitin varlığı belirlenmiştir. Bu metabolitlerden sikloheksil halkanın monohidroksillenmesi (M9-M14) ve amidaz ile karboksil oluşturması (M21) olmak üzere iki tanesi ana metabolitler olarak değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak 6 adet dihidroksil metaboliti, 5 adet M21'in monohidroksil metaboliti ve 5 adet glukronit metaboliti oluşmuştur (Şekil 4). Çalışmanın ikinci kısmında 7 adet insan rekombinant CYP (rCYPs) enzimi kullanılmıştır ve rCYP3A4'ün AB-CHMINACA metabolizmasında rol oynayan esas CYP enzimi olduğu belirlenmiştir. Son olarak, gerçek bir kullanıcıya ait idrar örneği analiz edilmiş ve tespit edilen metabolitlerin *in*

vitro çalışma ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Böylece *in vitro* modelin *in vivo* metabolizma için önemli bir gösterge olduğu tespit edilmiştir (22).



Şekil 4: AB-CHMINACA'nın olası *in vitro* metabolizasyonu

(Kaynak: Erratico ve ark. 2015)

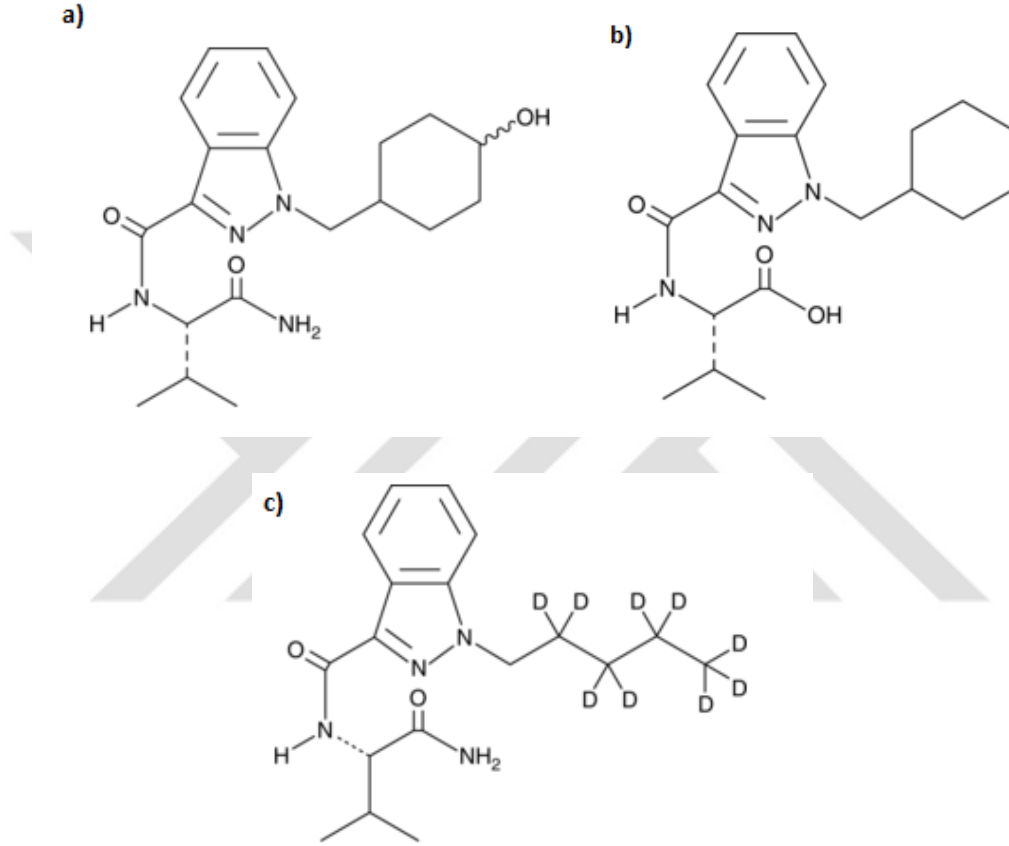
Hasegawa ve ark., modifiye bir Quechers yöntemi ile hazırlanan kan, idrar ve çeşitli doku örneklerinde AB-CHMINACA'nın likit kromatografi/tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) ile tespitine yönelik çoklu SK zehirlenmesi sonucu gerçekleşen ölüm vakasına ait çalışma yapmışlar ve sonucunda kan ve idrarda maddeyi tespit edememişlerdir. Yağ dokusunda ise yüksek konsantrasyonda bulunduğu için maddenin kendisinin tespiti için yağ dokusunun önemli bir vücut örneği olduğu vurgusunda bulunmuşlardır (29). Daha sonra, olası idrar metabolitlerini tespit etme amaçlı bir çalışma yapmışlar ve sonucunda idrarda AB-CHMINACA-M1 ve AB-CHMINACA-M3 metabolitlerini tespit edebilmişlerdir (30). Bu çalışmada tespit edilen metabolitler, Erratico'nun çalışmasındaki metabolitler ile uyumluluk göstermiştir.

Sim ve ark., AB-CHMINACA ve 6 metabolitini saç örneklerinde tespit etmeye yönelik bir analitik metot geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Şüphelilerden alınan gerçek örnekleri LC/MS/MS cihazı ile geliştirmiş oldukları metoda göre analiz ettikleri çalışmaları sonucunda, maddenin kendisini ve saç örneklerinde daha düşük konsantrasyonlarda bulunan amid hidrolizleri sonucu oluşan iki metabolitini (AB-CHMINACA-M2, AB-CHMINACA-M4) tespit edebilmişlerdir. Çalışılan tüm örnekler için maddenin M2 metaboliti, M4 metabolitinden yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (31)

Madde için önerilen biyotransformasyon yolları; sikloheksil halkanın hidroksillenmesi, terminal amidin hidrolizi, sekonder amidin hidrolizi ve izopropil grubunun oksitlenmesi veya hidroksillenmesidir (32).

Literatürdeki metabolitlerin isimlendirilmeleri çalışmayı gerçekleştiren gruba göre değişmiş olmakla birlikte önerilen metabolitlerin kimyasal yapıları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Tez çalışmasında yukarıdaki çalışmalar referans alınarak, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 metabolitleri kullanılmıştır.

İç standart olarak AB-CHMINACA ile benzer kimyasal yapıda bulunması nedeni ile çevresel koşullardan aynı şekilde etkilenmesi beklenen kararlı döteryumlu yapıdaki AB-PINACA-d9 kullanılmıştır. Metabolitlerin ve iç standartın kimyasal yapısı Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5: a) AB-CHMINACA-M1A, b) AB-CHMINACA-M2 ve c) AB-PINACA-d9 maddelerinin kimyasal yapıları

(Kaynak: <https://www.caymanchem.com/product/16387>, <https://www.caymanchem.com/product/16389>, <https://www.caymanchem.com/product/15057>)

2.2.2 Farmakodinamik özellikleri

Endokannabinoid sistemin bir parçası olan CB1 ve CB2 reseptörlerinin her ikisi de G-protein bağlı reseptörlerdendir. Sahip oldukları farklı aminoasit dizilimi, sinyal mekanizması, doku dağılımı ve belirli potent agonist ve antagonistlere karşı olan farklı hassasiyet ve

seçicilikleri; CB1 ve CB2 reseptörlerini birbirinden farklı kılmıştır. CB1 reseptörleri en çok nörotransmitter salınımını inhibe edebilecekleri merkez ve periferik nöronların uçlarında bulunurken, CB2 reseptörleri bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır (6,33,34). CB1 reseptör aktivitesi esrarın ağrı kesme, anksiyete kontrolü, duygu-durum değişiklikleri, öğrenme ve hafıza gibi çeşitli fizyolojik etkilerinden sorumludur. CB1 reseptörünün psikoaktif etkilere aracılık ettiği ve CB1 reseptörü bağlanma affinitesi ve potansiyelinin psikoaktif etkilerle bağıntılı olduğu bilinmektedir (33-35). THC psikoaktif etkisini CB1 reseptörlerinde kısmi agonist olarak göstermektedir. CB2 reseptörü üzerinde de kısmi agonist etkisi bulunan THC'nin bu reseptör agonistliği ile immün sisteme dair etkilere neden olduğu düşünülmektedir. SK'lerin çoğu ise THC'den farklı olarak CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinde tam agonist etki ve yüksek affinite göstermektedir (25). Bu durum, THC ile aynı etkiyi göstermeleri için gerekli olan SK dozunun daha düşük olması ile sonuçlanmaktadır.

AB-CHMINACA'nın farmakodinamik özelliklerinin öğrenilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak Wiley ve ark., AB-CHMINACA'yı da içeren üç adet karboksamid türevi SK'in *in vitro* ve *in vivo* etkilerini gözlemlemek adına fareler üzerinde deneyler yapmışlardır. Maddenin CB1 ve CB2 reseptörlerine bağlandığı ve reseptörleri aktivite edip lokomotor supresyon, antinosiseptif etki, katalepsi ve hipotermiye sebebiyet verdiği görülmüştür. CB1 reseptör bağlanma affinitesinin tam agonist olduğu gözlemlenmiştir. THC diskriminasyon deneyi de yapılmış sonucunda maddenin doza bağımlı tam subsitasyon gösterdiği belirtilmiştir (36).

THC ve SK'lere maruz bırakılan farelerdeki spontane aktivite, katalepsi, hipotermi ve analjezinin düzeyinin ölçüldüğü tetrad testi bu maddelerin canlılar üzerindeki etkilerin anlaşılması için kullanılan bir yöntemdir (37). Wiley ve ark. bu amaçla çalışmaların bir sonraki aşamasında fareler üzerinde tetrad testini uygulamışlar ve sonucunda THC, AB-CHMINACA

ve AB-PINACA'nın kannabinoid etkiler bakımından tetrad testinde tam profil gösterdiği sonucuna varmışlardır. Buna ek olarak AB-CHMINACA'nın THC'ye göre 11-58 kat daha potent olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda, AB-CHMINACA'nın kuvvetli ve etkili bir psikoaktif CB1 reseptör agonisti olduğunu ve insanda bağımlılık oluşturabilme potansiyelinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (36).

2017'de Cannaert ve ark., yapmış oldukları CB1 ve CB2 reseptör aktivasyonu çalışmalarının sonucunda AB-CHMINACA'nın JWH-018'den daha potent olduğunu belirtmişlerdir (38).

SK'lerin hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarının, genellikle enjeksiyon yöntemiyle verilen maddelerin hayvanlar üzerindeki etkilerini inceleme şeklinde gerçekleşmiş olmasından fakat SK'lerin insanlarda kullanımının genellikle solunum yoluyla olmasından dolayı Lefever farelere buhar yoluyla maddeyi vererek bir çalışma yapmıştır. AB-CHMINACA'nın aerosol halinde uygulama sonucunda oluşan etkileri, tam kannabinoid profil göstermesi bakımından enjeksiyon yoluyla uygulama ile aynı sonucu vermiştir. Çalışmanın bulguları, aerosola maruz kalmanın maddenin etki göstermeye başlaması için gerekli olan süreyi kısalttığını fakat bununla beraber etki sürecinin de daha kısa olmasına neden olduğunu göstermiştir (39).

Franz ve ark., saç örneklerinde AB-CHMINACA'nın analizine yönelik kapsamlı bir araştırma yapmışlardır. Dışarıdan AB-CHMINACA bulaştırılarak kirletilen ve sonra farklı koşullarda saklanıp analizi yapılan saç örneklerinin hepsinde maddenin kendisi ve metabolitini (AB-CHMINACA-M2) gözlemlemişlerdir. Bu durum saçta birikmiş olan ana madde AB-CHMINACA'nın kararsız amid yapısı nedeniyle sonradan hidrolize olabileceğini göstermiştir. Aynı çalışmanın farklı koşullarda gerçekleştirilmiş deney şartlarının sonuçları, degradasyonun sıcaklıkla beraber artan bir eğilimde olduğunu fakat ışığa maruz kalmanın maddenin metabolizasyonu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Çalışma sonuçlarına ek

olarak, degradasyonun saç matriksine bağılı olarak, saça yapılan uygulamalar veya melanin miktarına göre değişebileceğini fakat kesin sonuca varmak için başka çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir (40).

2.2.3 Toksikolojik etkileri

THC'nin akut toksikolojik etkilerinden olan taşikardi, yanlış zaman algısı, korku, endişe, halüsinasyon, paranoya gibi etkilerin benzerleri SK'lerde de görülmekle birlikte bazı vakalarda daha şiddetli etkilerin görüldüğü de olmuştur. Esrarla kıyaslandığında ölümle sonuçlanan zehirlenme vakalarına daha sık rastlanmaktadır. Zehirlenmeler bilinç kaybı, hafıza kaybı, kardiyovasküler etkiler, ajitasyon, deliryum, davranış bozuklukları şeklinde kendini gösterebilmektedir. Ani ölümle sonuçlanan vakalar da mevcuttur (29). SK'lerin kannabinoid reseptörlere karşı farklı derecelerdeki bağlanma afiniteleri ve reseptör seçicilikleri, bu maddelerin hafif taşikardiden psikoza ve en son ölüme kadar değişebilen farklı etkilerinin sebebi olarak gösterilebilir (32). AB-CHMINACA kullanımı kaynaklı gelişmesi muhtemel toksik, karsinojenik-mutajenik etki ve üreme kaynaklı problemler hakkında bilgi veren bir güvenlik dokümanı bulunmamaktadır. AB-CHMINACA kullanımının yan etki olarak psikoz, nöbet ve hata ölümle ilişkili olduğunu bildirir pek çok çalışma literatürde mevcuttur.

EMCDDA verilerine göre 2014-2017 arasında 37 adet ölüm vakasında AB-CHMINACA'ya maruziyet durumu mevcuttur. Bu vakalardan 7'sinde AB-CHMINACA ölüm nedeni veya ölüme katkısı olan bir neden olarak belirtilmiştir. Vakaların 6'sında AB-CHMINACA'dan başka madde bulunamamıştır. Ölenlerden 24 tanesi erkek, 1 tanesi kadın olarak belirtilmiş; 6 tanesinin cinsiyeti ise belirtilmemiştir. 24 erkeğin yaşlarının ortalaması 29.7 olup yaşları 16-66 arasında değişmektedir. Ölen kadın 38 yaşındadır (24).

2014 yılında Florida'da SK kullanımı sonrası acil servise başvuran hastaların sayısının iki hafta gibi kısa bir süre diliminde oldukça fazla olması dikkat çekmiştir. Bu hastaların

24'ünde akut deliryum görülmüş, 14'ünün ise nöbet geçirdiği raporlanmıştır. 5 hasta için solunum desteği ve yoğun bakım koşullarında tedaviye ihtiyaç duyulmuştur. Halüsinasyon da görüldüğü belirtilen bir diğer etki olmuştur. Yapılan analizler sonucunda 21 vakanın 15'inde AB-CHMINACA veya metabolitlerine rastlanmıştır (32).

Literatürde yer alan çalışmalarda; denge bozukluğu, aşırı halsizlik, sersemlik, istifra, genişlemiş gözbebeği ve ağız kuruluğu AB-CHMINACA kullanımı sonrası görülen belirtilere örnek verilmekle birlikte en sık görülen klinik semptomların merkezi sinir sistemini (MSS) baskılama, taşikardi ve disoryantasyon olduğu belirtilmiştir (41-42).

2015'in 6 aylık bir periyodunda acil servise eğlence amaçlı madde kullanımına bağlı akut intoksikasyon şüphesi ile başvuranlar üzerinde istatistiki bir çalışma gerçekleştirilmiş ve bunun sonucunda başvuranların %10'unda SK pozitif bulunmuş; MDMB-CHMINACA ve AB-CHMINACA'nın en sık rastlanılan SK'lerden olduğunu raporlamıştır. Buna ek olarak çalışmada AB-CHMINACA'nın kardiyovasküler, nöropsikiyatrik ve nörotoksik etkiye neden olan bir SK olduğundan bahsedilmiştir (43).

Diyabetik ketoasidozise bağlı gerçekleşen bir ölüm vakasında aralarında AB-CHMINACA'nın da bulunduğu 11 adet SK'in varlığı tespit edilmiştir. Ölümün, madde etkisi altında toksisiteye uğrayan bireyin insülin enjeksiyonunu atlamasından kaynaklı gelişen hiperglisemi sonucu mu yoksa kullanılan SK'lerin hiperglisemiye neden olmaları kaynaklı mı gerçekleştiği bir netlik kazanmamıştır (42).

Bir başka ölümle sonuçlanan vakada, AB-CHMINACA kardiyojenik olmayan pulmoner ödem ile ilişkilendirilmiştir. Kanın analizi sonucunda yüksek konsantrasyonlarda AB-CHMINACA ve AB-CHMINACA-M2 metaboliti; eser miktarlarda başka SK'ler tespit edilmiştir. Kandaki AB-CHMINACA-M2 metabolitinin ana maddeye oranının yüksek olması,

metabolizasyonun hızlı gerçekleştiğine ve AB-CHMINACA-M2 metabolitinin kantitasyonunun önemine işaret etmektedir (44).

Vaka analizlerine dayanarak yapılan literatür çalışmalarına göre AB-CHMINACA bağlantılı ölümler; kalp yetmezliği sonucu, çoklu organ yetmezliği sonucu ve solunum sisteminin iflasından kaynaklanma şeklinde gerçekleşmiştir (32,44-47).

Kullanımları sonrası gerçekleşen ölüm oranları dikkate alındığında, AB-CHMINACA'nın toksisite potansiyelinin önceki SK'lere göre daha yüksek olduğu sonucuna varılabilmektedir (25,41).

2.2.4 Yasal düzenlemeler

Yeni psikoaktif maddeler; 1961 “Birleşmiş Milletler Uyuşturucu Maddeler Tek Sözleşmesi” (Single Convention on Narcotic Drugs) ve 1971 “Birleşmiş Milletler Psikotrop Maddeler Sözleşmesi” (Convention on Psychotropic Substances) ile kontrol altına alınmamış olan fakat saf veya hazırlanmış hali ile, kontrol altına alınmış olan narkotik maddelere benzer kamu sağlığı tehdidi barındırma olasılığı bulunduran “yeni narkotik ilaçlar” ile “yeni psikotrop ilaçlar” alt gruplarından oluşan maddelerdir. Yeni psikoaktif maddelerin en geniş üyesi olan SK'lerin bu uluslararası kontrol sözleşmelerinde yer almıyor olması, maddelerin kısıtlanmaları ile ilgili yasal mevzuatın ülkelere göre değişkenlik göstermesine neden olmaktadır (24).

EMCDDA, büyüyen uyuşturucu sorununu ele almak için sağlam veriler sağlamak ve Avrupa'nın uyuşturucu sorunlarının niteliğini anlayarak bunlara daha iyi yanıt vermesine yardımcı olmak üzere 1993 yılında kurulmuş ve 1995'te faaliyete geçmiştir. EMCDDA; yeni psikoaktif maddelerin tespiti, değerlendirilmesi ve kontrolüne yönelik tedbirler alınabilmesi için “erken uyarı sistemini” (EWS) kurmuştur (8). Bu sistem ile tespit edilen uyuşturucular ile ilgili tüm veriler en kısa sürede üye ülkelerle paylaşılmaktadır. Türkiye bu sisteme 2006 yılında dâhil olmuştur.

Avrupa'da SK'lerin 2008 yılında ilk kez tespit edilmesinin ardından Almanya 2009 yılı başlarında bu maddeleri yasaklayan ilk Avrupa ülkesi olmuş ve bunu takiple Avrupa Birliği ülkelerinin birçoğu da SK'leri kısıtlamaya yönelik yasal düzenlemeye gitmiştir (8). SK'ler Türkiye'de ilk kez 2010 yılında yakalanmıştır. 2011 yılında yasal düzenlemeye gidilmiş ve 14'ü SK olan 19 yeni uyuşturucu madde Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun hükümlerine tabi tutulmuştur. Takip eden yıllarda yasanın kapsamı, eklenen yeni uyuşturucularla genişletilmiştir. 2014 yılında, ülkemiz için hızla yayılan bir tehdit halini alan yeni nesil uyuşturucu maddelerle daha etkin mücadele edilebilmesi adına "jenerik yasa" hazırlama çalışmaları başlatılmıştır. Ülkemizde 2015'te yürürlüğe giren jenerik sınıflandırma ile yeni sentetik uyuşturucular adlarının yasada belirtilmesine gerek kalmaksızın sadece ana yapılarının ve bu ana yapıya bağlanabilecek olası fonksiyonel grupların yasada yer alması ile 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına girmektedir (48). AB-CHMINACA, 15.09.2014 tarihli ve 2014/6800 sayılı Bakanlar Kurulu kararı ile yasa kapsamına alınan psikoaktif maddelerdendir (12).

2.2.5 Analiz yöntemleri

SK içeren ürünlerin üretimi, satışı ve kullanımında gerçekleşen son yıllardaki dikkat çeken artış, bu maddelerin piyasadaki ürünlerde ve vücut sıvılarında hassas ve seçici metotlar kullanılarak tespitini toplum sağlığıyla ilgili kaygılar nedeni ile zaruri hale getirmiştir. Bu amaçla öncelikle maddelerin kimyasal yapılarını tayin etmek için nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), LC/MS/MS, gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS), likit kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (LC/HR-MS), kızılötesi spektroskopi (IR) gibi yöntemler kullanılmaktadır (49-50). Bitkisel karışımlardaki maddenin tespiti için geniş kütüphanesinden dolayı GC/MS veya yüksek hassasiyet ve kütle kesinliğinden dolayı likit kromatografi/uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (LC/TOF-MS) genellikle tercih

edilmektedir (23,49-52). SK'lerin kullanıcıların biyolojik örneklerinde tespiti toksikolojik ve adli açıdan ayrıca önem arz etmektedir. Bu maddelerin yüksek potansiyele sahip olmaları nedeniyle vücutta düşük konsantrasyonlarda bulunuyor olmaları, deteksiyon pencerelerini daraltmakta ve tespitlerini güçleştirmektedir. Maddeler piyasada görüldükleri ilk zamanlarda metabolitleri hakkında literatürde bilgi olmadığı için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarının yapılması ve daha sonra belirlenen metabolitlerin referans madde olarak üretilmesi için belirli bir süre geçmesi gerekmektedir (53-54). LC/MS/MS yöntemi yüksek hassasiyetinden dolayı kanda ve idrarda ng/mL seviyesinde bulunan SK'lerin kendilerinin ve metabolitlerinin izlenmesi için genellikle tercih edilen yöntemdir. Bu amaçla nadiren GC/MS kullanılmakta, LC/HR-MS ise geriye dönük bilinmeyen madde analizine imkân verdiği için tercih sebebi olabilmektedir (54).

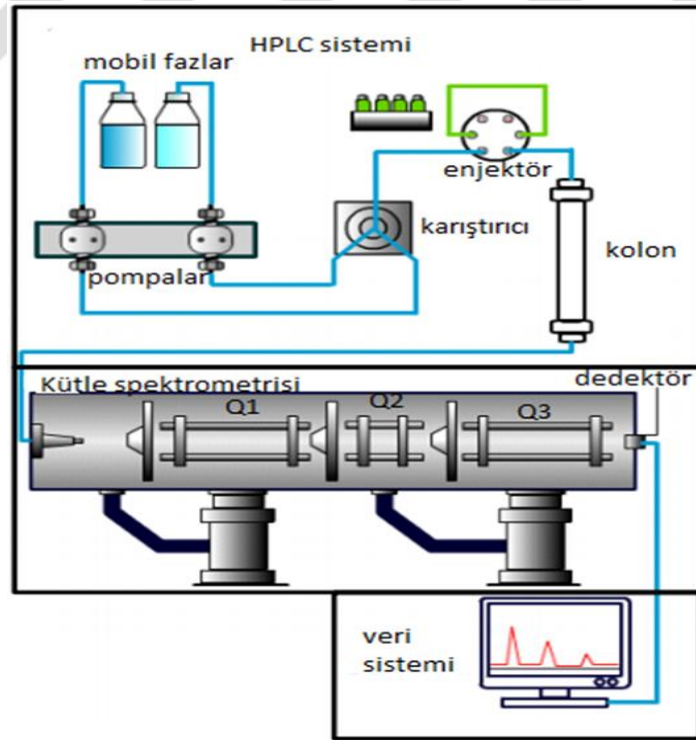
2.3 LC/MS/MS Yöntemi

Hızlı analiz süresi, yüksek hassasiyet ve seçicilik LC/MS/MS'i tercih edilen bir yöntem haline getirmiştir.

Kütle Spektrometrisi (MS) molekülleri ayırt etme açısından hassas ve seçici bir yöntem olmasına karşın maddeleri sadece kütle/yük (m/z) oranına göre tespit ettiğinden ve aynı m/z değerine sahip birçok madde bulunma durumundan dolayı farklı maddeler de barındıran kompleks matrikslerde analitin MS'e gönderilmeden önce ortamdan seçici olarak ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla üretilmiş olan likit kromatografi/kütle spektrometrisi yönteminde iki seçici teknik olan likit kromatografisi ve MS birlikte kullanılır. Analiz edilecek örnekteki maddeler önce likit kromatografi kısmında fizikokimyasal özelliklerine göre yüksek seçicilikle birbirlerinden ve matriksten ayrılırlar ve sonra MS kısmına gönderilirler; burada yüklenen maddeler kuadropollerdeki elektrostatik alan tarafından sahip oldukları m/z değerlerine göre seçici bir şekilde ayrılıp iyon enerjisini elektriksel enerjiye çeviren dedektör tarafından tespit edilirler (55-56).

LC/MS/MS sisteminin ana bileşenleri:

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



Şekil 6: LC/MS/MS blok diyagramı

(Kaynak: <http://www.ecs.umass.edu/eve/background/methods/chemical/Openlit/Chromacademy%20LCMS%20Intro.pdf>)

Likit kromatografi: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), karışım içerisinde bulunan bileşenleri ayırmak için sıvı mobil faz kullanan enstrümental analiz yöntemidir. Analitlerin ayırımı için metotta belirtilen uygun mobil faz kompozisyonunu ve basıncını sağlayan HPLC/ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) pompa sistemi yardımı ile istenilen mobil faz akışı sabit bir şekilde sisteme verilir. Maddenin, örnekleyicide enjekte edilmesi ile beraber mobil fazda çözülmesi gerçekleşir. Ayırımın gerçekleştiği analitik kolon, ayrılması istenilen maddelerin cinsine göre seçilip kullanılan farklı polariteler ve farklı mikron boyutlarında partikül bulundurabilen katı dolgu maddelerinden oluşan silindirik metalik çubuklardır. Örnekler fizikokimyasal özelliklerine göre kolonun içerisinde bulunan dolgu maddeleri ile etkileşime girerler. Bu etkileşimin kuvvetli olması maddenin sabit faz olan kolonda daha uzun süre tutunması ile sonuçlanır. Fizikokimyasal özellikleri bakımından kolonun dolgu maddesi ile etkileşimi az olan maddeler yüksek basınçlı mobil fazın da yardımı ile kolonu çabuk terk etmekte ve böylece HPLC sistemlerinde maddelerin fizikokimyasal özelliklerine göre ayırımı gerçekleştirilmektedir.

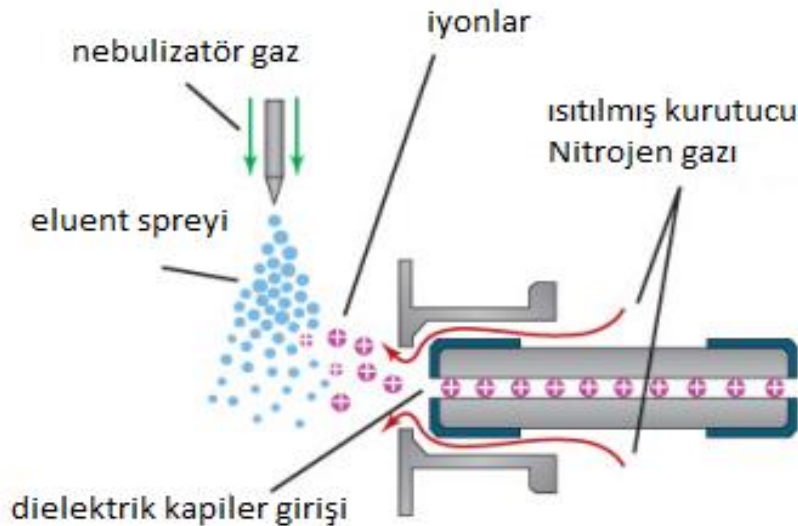
LC/MS/MS sistemlerinde maddeler fizikokimyasal özelliklerine göre kolondan farklı alıkonma zamanlarında çıkarlar ve iyonizasyonun gerçekleşeceği iyon kaynağına giderler.

Kütle spektrometrisi: Maddelerin elektrostatik alanda yönlendirilebilmesi için gaz fazında bulunmaları ve yüklü olmaları gerekmektedir Maddenin MS'e uygun olması için likit kromatografiden çıkan solventte çözülmüş katı fazdaki maddeler ve solvent MS'e gelmeden önce buharlaştırılır. Kütle sistemine girmeden önce maddeler iyon kaynağına gönderilir, burada gaz fazına getirilen maddeler kimyasal yapılarına göre + veya - olacak şekilde iyonlaşır.

İyon kaynağı kütle dedektörüne gönderilen örnek bileşenlerinin buharlaşmasını ve iyon formuna geçmesini sağlar. En çok kullanılan iyon kaynakları elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve

atmosferik basınç kimyasal iyonizasyondur (APCI). APCI polaritesi düşük olan ve sıcaklık ile bozulmayan maddelerin tespitinde tercih edilmektedir.

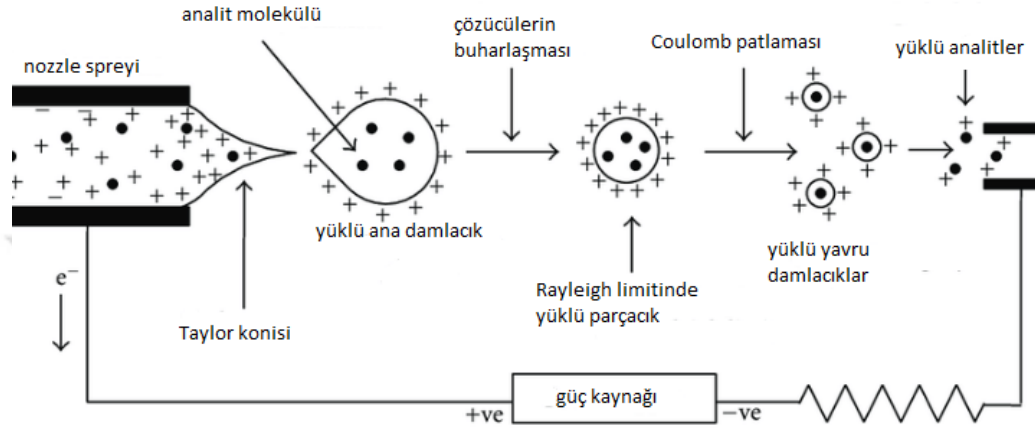
ESI atmosferik basınçta gerçekleşir. Kolondan farklı alıkonma zamanlarına göre farklı zamanlarda çıkan maddeler paslanmaz çelikten kapiler bir iğne vasıtasıyla ESI kaynağına girerler (Şekil 7). Kapiler iğne ile onun etrafını saran elektrodun arasında 3-5kV gibi yüksek potansiyel fark oluşturulur ve bunun sonucunda sıvı haldeki maddenin bu yüksek voltajdaki iğneden geçmesi yüklenmiş analitleri de içeren spreyci damlacıkları oluşturur. Elektrodun iki yanında bulunan yüksek sıcaklık veren ısıtıcılar ve kurutucu azot gazı varlığı çözücülerin buharlaşmasını sağlar. Çözücülerin uçması sonucu spreyciden çıkan damlacıklar küçülür ve küçüldükçe yük oranı artan damlacıklar yüzey geriliminin yükü daha fazla kaldıramayacağı “rayleigh limiti”ne kadar küçülmeye devam ederler. Bu noktadan sonra ise damlacıkların parçalanıp küçülmesi ile sonuçlanan “coulomb patlaması” yaşanır. Bu proses oluşan küçük damlacıklar ile solventin tamamen uçması ve sonucunda sadece yüklü analitin kalması durumu gerçekleşene kadar devam eder (Şekil 8).



Şekil 7: ESI iyon kaynağı ile oluşan iyonların kapilere girişi

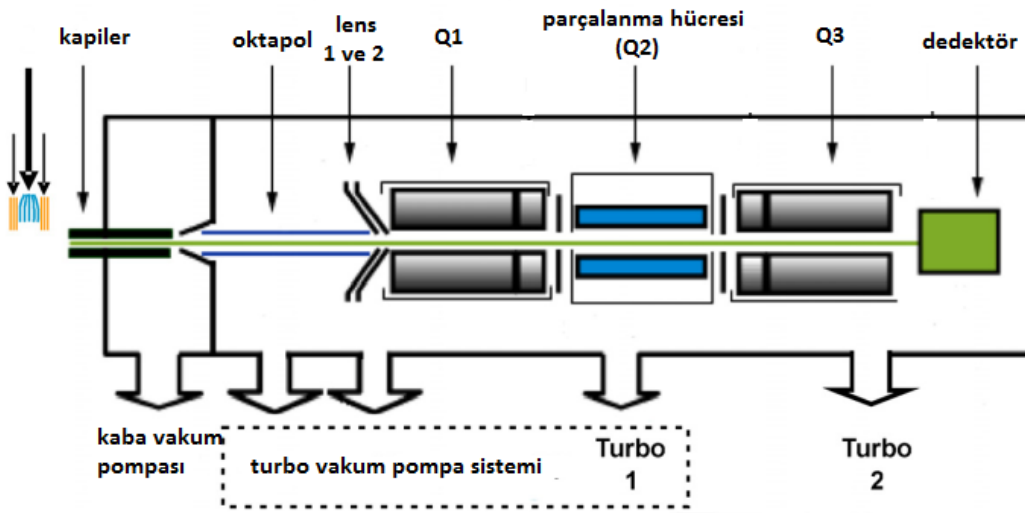
(Kaynak: <https://www.parti-clesciences.com/news/technical-briefs/2009/mass-spectrometry-bioanalysis.html>)

İyon haline gelen maddelerin kuadropoller içerisinde atmosfer bileşenleri ile çarpışmadan serbestçe bir yol izleyebilmeleri için kütle analizörlerinin yüksek vakum ortamında çalışması gerekmektedir. Vakum ortamını sağlamak için bir adet kaba vakum pompası ve iki adet cihaza entegre turbo moleküler vakum pompası bulunmaktadır.



Şekil 8: ESI iyon kaynağında iyonların oluşturulması

(Kaynak: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758)



Şekil 9: LC/MS/MS sisteminde quadropollerin dizilimi

(Kaynak: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/K3335-90206_QQQ_Concepts.pdf)

İyon haline gelen örnekler odaklanmayı sağlayan lenslerin yardımı ile kütle analizörü bölümüne alınmaktadır. Kütle analizörleri, gaz fazındaki iyonların m/z oranına göre ayırt edilmesini sağlarlar. İyon kaynağında solventten ayrılan analit iyonları elektrostatik alan tarafından MS'e doğru çekilirler. İyonlar orifis'ten girdikten sonra radyo frekans uygulanarak odaklanmanın sağlandığı iyon yolundan geçerek Q1'e ulaşırlar. Q1'de seçilen ana iyonlar fragmentlerine ayrılmak üzere parçalanma hücresi olan Q2'ye ulaşır. Q2'de uygulanan belirlenen parçalanma enerjisi ve azot veya argon gibi inert parçalama gazı ile parçalanmış iyonlar yavru iyonların filtrelenmesinin gerçekleştiği Q3'e doğru gönderilirler (Şekil 9).

Kuadrupoller 4 adet silindirik metal çubuktan oluşurlar. Bu çubukların karşılıklı olanları birbirlerine elektriksel olarak bağlı bulunmaktadır. Bir çift elektroda pozitif doğru akım (DC) uygulanırken diğer çiftte negatif DC uygulanmaktadır. Bu elektrodların hepsine aynı zamanda sürekli değişen radyofrekanslı (RF) alternatif akım potansiyeli uygulanır. Kuadrupol sistemine giren iyon ile kuadrupol çubukları arasında meydana gelen elektriksel etkileşim sonucunda iyon kendisine en yakın zıt yüklü çubuğa doğru yönelir. RF voltajının, karşılıklı çubuklar aynı polaritede kalacak şekilde çubuk çiftlerinin polaritesini sürekli olarak değiştirmesi iyonun her seferinde kendisine göre zıt yüklü en yakın çubuğa yönelmesini ve böylece oluşan potansiyel farkın da varlığında iyonların kuadrupoller arasında helezonik bir hareketle ilerlemesi gerçekleştirir. Her bir RF/DC potansiyelinde yalnızca belirli bir m/z oranına sahip iyon kuadrupolde kararlı bir yol izleyip ilerleyebilir.

Ayrılmış olan moleküller, iyon enerjilerini elektriksel sinyale çeviren detektöre doğru giderler. LC/MS/MS sistemlerinde genellikle elektron çoğaltıcı dedektörler kullanılmaktadır (electromultiplier). Son olarak, yazılım sayesinde detektörden gelen analog sinyallerin dijital sinyallere dönüştürülmesi ile veriler elde edilmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışması, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Enstrümental Analiz ve Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca etik açıdan uygun oluşuna ilişkin 09/11/2017 tarih ve 421500 sayılı karar ektedir.

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler

Kütle (MS/MS) Sistemi:	Agilent 6460 Jetstream Triple Quadrupole MS
Likit (LC) Sistem:	Agilent Infinity 1290 UHPLC
Analitik Kolon:	Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4.6×150 mm, 2.7 µ)
Yazılım:	Mass Hunter- Versiyon B.07.00
Azot Jeneratörü:	Peak-Scientific
Hassas Terazî:	Mettler Toledo
Mikro Pipetler:	Eppendorf
Vorteks:	VWR
Santrifüj:	Hettich Rotina 380R
Derin Dondurucu:	Uğur
Buzdolabı:	Samsung
SPE Manifoldu:	Biotage Pressure ⁺ 48
Azot Evaporatörü:	Teknosem
Ultrasonik Banyo:	Wise Clean
SPE Kartuşu:	OASIS HLB 3cc (60 mg)

Cam ve plastik deney tüpleri

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

Ultra Saf Su:	Merck
Metanol:	Merck
Asetonitril (ACN):	Merck
Etil Asetat (EtAc):	Panreac
2-Propanol (IPA):	VWR
Amonyum Asetat:	Biosolve
Formik Asit:	Chem-Lab
AB-CHMINACA standartı:	Cayman
AB-CHMINACA-M1A standartı:	Cayman
AB-CHMINACA-M2 standartı:	Cayman
AB-PINACA-d9 (IS):	Cayman

3.2.2 Çözeltiler

İç Standart (IS) çözeltileri:

Stok IS (10 µg/mL) çözeltisi: 500 µg AB-PINACA-d9 50 mL metanolde çözülmüştür.

Ara Stok IS (500 ng/mL) çözeltisi: Stok iç standart çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 20 mL'ye tamamlanmıştır.

AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 standart çözeltileri:

Ana stok çözeltisi (100 µg/mL): 1 mg standart AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 10 mL metanolde çözülmüştür.

Ara stok çözeltisi (1 µg/mL): Ana çözeltilerden 1 mL alınıp metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Kan ve idrar katım örneklerinin hazırlanması için:

Kan katım örneklerine eklenecek 3; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır:

İdrar katım örneklerine eklenecek 1.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır:

250 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözeltilerden 2.5 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

100 ng/mL standart çözelti: Ara stok çözeltilerden 2 mL alınıp metanol ile 20 mL'ye tamamlanmıştır.

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

25 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözeltilerden 0.5 mL alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlanmıştır.

10 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözeltilerden 0.2 mL alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlanmıştır.

5 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözeltilerden 0.5 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

3 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözeltilerden 0.3 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

1.5 ng/mL standart çözelti: 100 ng/mL'lik çözeltilerden 0.15 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

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

Ekstraksiyonda kullanılan çözeltiler:

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

IPA:ACN:EtAc (2:2:6) çözeltisi: LC/MS analizine uygun saflıktaki 20 mL IPA, 20 mL ACN ve 60 mL EtAc son hacmi 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

Çözeltiler örneklerin çalışıldığı gün taze olarak hazırlanmıştır.

Mobil Fazlar:

1 M Amonyum asetat çözeltisi: LC/MS analizine uygun saflıkta amonyum asetatın 7.71 gr tartılarak su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Mobil Faz A: 1 M amonyum asetat çözeltisinden 5 mL, 98-100% saflıkta formik asitten 2.5 mL ve yüksek saflıktaki metanolden 125 mL alınarak saf su ile 2500 mL'ye tamamlanmıştır.

Mobil Faz B: LC/MS analizine uygun saflıkta metanol

Mobil fazlar her analizden önce taze hazırlanmış, 10 dk ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edilmiş ve kullanılmıştır.

3.3 Biyolojik Örnekler

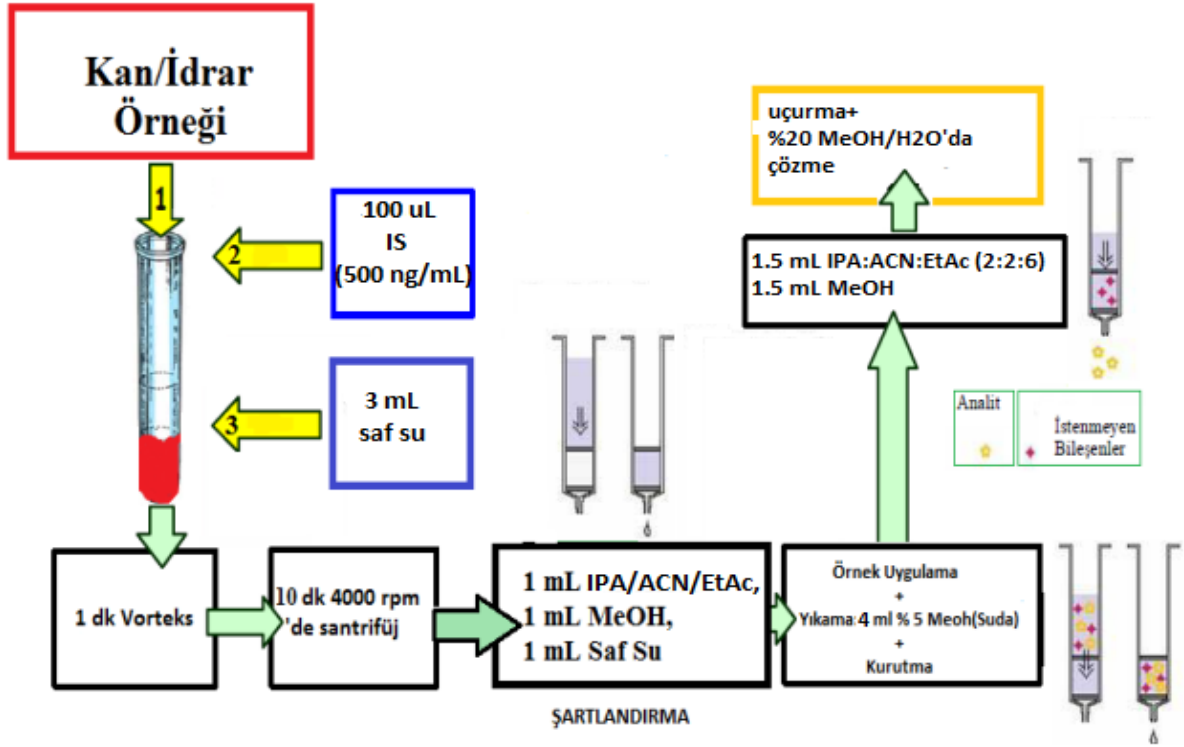
Kızılay Kan Merkezinden bağışlanan tam kan örnekleri sodyum florürlü tüplere alınıp analiz gününe dek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. İdrar örnekleri uyuşturucu kullanım şüphesi olmayan gönüllülerden alınmış ve analize dek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4 Kan ve İdrar Örneklerinin Hazırlanması

Örnekler; Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi Enstrümental Analiz ve Araştırma Laboratuvarı tarafından SK'lerin analizi için kullanılmakta olan numune hazırlama metodunun modifikasyonu ile oluşturulmuş, katı-faz ekstraksiyonuna (SPE) dayanan bir yöntem ile

hazırlanmıştır. Uyuşturucu madde içermediği bilinen katım yapılacak kan ve idrar örneklerinden 800 µL alınarak üzerine 100 µL IS (500 ng/mL) ile 100 µL istenen konsantrasyonda standart çözelti karışımı eklenmiştir. Hazırlanan 1 mL'lik karışım üzerine 3 mL saf su eklenerek çalışılacak örneğin hacmi 4 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek, vorteks ile 1 dakika karıştırıldıktan sonra 10 dakika süre ile 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Oasis HLB kartuşu sırasıyla 1 mL IPA:ACN:EtAc (2:2:6) çözeltisi, 1 mL metanol ve 1 mL saf su ile şartlandırılmış ardından örnek kartuşa yüklenmiş ve yaklaşık 2 mL/dk hız ile kartuştan geçirilmiştir. Numune yüklenmesinin ardından 4 mL %5 metanol/su karışımı ile yıkanan kartuş 20 dakika süre ile azot altında kurutmaya bırakılmıştır. Analitlerin elüsyonu için önce 1.5 mL IPA:ACN:EtAc (2:2:6) karışımı daha sonra ise 1.5 mL metanol kartuştan geçirilmiştir. Azot gazı ile tamamen kuruyana kadar uçurulan eluat 500 µL %20'lik metanol/su karışımında çözülerek LC/MS/MS cihazında çalışılmıştır

Kör olarak kullanılacak idrar ve kan örneklerinden 900 µL alınarak üzerine 100 µL IS eklenmiştir. Hazırlanan 1 mL örnek üzerine 3 mL saf su eklenmiş ve örnek vorteks yardımı ile 1 dakika karıştırılmıştır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüje tabi tutulduktan sonra yukarıda anlatıldığı gibi uygulanan SPE metodu ile örnekler analize hazır hale gelmiştir. Şekil10'da örneklerin hazırlanma basamakları özetlenmiştir.



Şekil 10: Kan/idrar örneklerinin SPE basamakları

3.5 LC/MS/MS Sistemi Çalışma Şartları

3.5.1 Likit sistem özellikleri

Akış hızı:	0.6 mL/dk
Basınç üst limiti:	600 bar
Enjeksiyon hacmi:	10 µL
Analiz süresi:	16 dk
Kolon fırını sıcaklığı:	40 °C
Mobil faz A:	2 mM Amonyum asetat, % 0.1 Formik asit, 5 % Metanol (suda)
Mobil Faz B:	100 % Metanol

Tablo I'de UPLC zamana bağılı akış diyagramı verilmiştir.

Tablo I. LC/MS/MS likit sistemi akış özellikleri

Zaman (dk)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)	Akış (mL/dk)	Max basınç limiti (bar)
0.0	90	10	0.6	600
0.3	90	10	0.6	600
3.0	20	80	0.6	600
7.0	5	95	0.6	600
9.0	5	95	0.6	600
9.1	90	10	0.6	600

3.5.2 MS sistemi özellikleri

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

MS 1 sıcaklığı: 100 °C

MS 2 sıcaklığı: 100 °C

Tarama modu: Dinamik MRM (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)

AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve iç standart olarak kullanılan AB-PINACA-d9 maddelerinin infüzyonu sonucu elde edilen prekürsör iyon, fragmentör voltajı, parçalanma enerjisi (CE), oluşan fragmentler ve maddelerin alıkonma zamanları Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. AB-CHMINACA ve metabolitleri ile AB-PINACA-d9'a ait MS/MS değerleri ve alıkonma zamanları

Kimyasal isim	Moleküler kütle (g/mol)	Prekürsör iyon (m/z)	Fragment*	CE (Volt)	Fragmentör voltaj	Alıkonma zamanı (dk)
AB-CHMINACA	356.3	357.3	<u>312.2</u>	10	120	8.1
			241.1	25		
AB-CHMINACA-M1A	372.2	373.2	<u>328.1</u>	12	90	6
			257.1	24		
AB-CHMINACA-M2	357.2	358.2	<u>312.1</u>	12	121	8.5
			241.1	20		
AB-PINACA-d9	339.3	340.3	<u>295.2</u>	10	112	7.4
			224.2	20		

*Kantitasyon için altı çizili fragmentler kullanılmıştır.

3.6 Validasyon Çalışmaları

AB-CHMINACA ve metabolitlerinin (AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2) kan ve idrar örneklerinde kantitatif tayini amaçlı çalışılan metodun validasyonu SWGTOX (Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu) ve diğer uluslararası validasyon rehberlerine uygun olarak yapılmıştır (57-59). Validasyon kapsamında seçicilik, doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), geri kazanım, kesinlik ve kararlılık çalışmaları validasyon parametreleri olarak belirlenmiştir.

3.6.1 Seçicilik çalışmaları

Matriksten gelebilecek olası girişimleri gözlemlemek adına seçicilik çalışması yapılmıştır. Bu amaçla analit içermediği bilinen farklı kaynaklardan elde edilmiş kör kan ve idrar örnekleri 10'ar ($n \geq 6$) kez çalışılmıştır. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 için belirlenen alıkonma zamanında matriks veya çözücü kaynaklı girişim olup olmadığı incelenmiştir.

3.6.2 Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi

Metodun kantitatif olarak doğru sonuç verdiği konsantrasyon aralığının belirlenmesi amacıyla doğrusal aralık belirlenmiştir.

Doğrusallık çalışması için analiti ve kullanılan iç standartı içermediği bilinen boş kan ve idrar örneklerine standart çözeltilerden 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25 ng/mL konsantrasyonları sağlanacak şekilde ilave edilerek Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi örnekler hazırlanıp çalışılmıştır. Her bir konsantrasyon için birbirinden bağımsız 6 ($n \geq 5$) kan ve idrar örneği hazırlanmış ve ekstraksiyonu yapılmıştır. Konsantrasyonlar ile konsantrasyonlara karşılık gelen analit pik alanı ve IS pik alanı ilişkisi kullanılarak doğrusal bir grafik çizilmiş ve kalibrasyon eğrisine ait "linear regresyon formülü" ve "korelasyon katsayısı" yazılım tarafından otomatik olarak verilmiştir.

Validasyon rehberine göre (r^2) >0,99 metodun çalışılan linear aralık için doğrusal olduğunu göstermektedir.

3.6.3 Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

LOD; analit sinyalinin gürültüden güvenilir bir biçimde ayırt edilebildiği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. Bu konsantrasyon belirlenirken sinyalin gürültüye oranının en az üçe denk geldiği konsantrasyon olarak belirlenmesi beklenir.

LOQ ise kalibrasyon eğrisinin en alt noktasına tekabül ediyor olup analit miktarının belli kesinlik ve doğrulukta güvenilir olarak verilebileceği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanabilir.

LOD ve LOQ değerini belirleyebilmek için 10'ar adet kör kan ve idrar örneği çalışılmış ve aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

$$\text{LOD} = X_{bl} + 3 S_{bl}$$

$$\text{LOQ} = X_{bl} + 10 S_{bl}$$

X_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin standart sapması

3.6.4 Geri kazanım

Validasyon çalışmasında, geri kazanım ve matriks etkisi değerlerinin hesaplanmaları Matuszewski ve ark.'nın yöntemine uygun olarak yapılmıştır (60). Bu kapsamda; düşük (0.5 ng/mL) ve yüksek (25 ng/mL) konsantrasyonlarda AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 standart çözeltileri ile yapılan ölçümler (A), kör kan ve idrar örneklerinin ekstraksiyonu sonrası eluata 0.5 ng/mL ve 25 ng/mL konsantrasyonlarında AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 standartlarının eklenmesiyle oluşan çözeltilerde yapılan ölçümler (B) ve son olarak ekstraksiyon işlemi başında son

konsantrasyonlar 0.5 ng/mL ve 25 ng/mL olacak şekilde katım yapılarak hazırlanan kan ve idrar örnekleriyle yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası eluatta yapılan ölçümler (C) değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar kan ve idrar örneklerinde 6 bağımsız tekrarla yapılmıştır. Geri kazanım ve matriks etkisi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

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

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = C/B \times 100$$

3.6.5 Kesinlik

Kesinlik parametresi çalışmaları gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (yeniden üretilebilirlik) olmak üzere düşük, orta ve yüksek üç farklı konsantrasyonda (0.5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL) katım yapılmış örnekler ile ve her konsantrasyondan altı tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

3.6.6 Kararlılık

Çalışma kapsamında ekstrakte edilmiş örneklerin içerisinde bulunan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin oto örnekleyicideki kararlılığı izlenmiştir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda (0.5 ng/mL, 25 ng/mL) hazırlanan kan ve idrar örnekleri ekstrakte edilmiş ve elde edilen eluatlar homojen olacak şekilde farklı viallere bölünüp oto örnekleyiciye konulmuştur. 6 saatlik periyotlar halinde toplamda 24 saat boyunca 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılan örneklerin ilk enjeksiyonu ile daha sonra gerçekleştirilenlerin alan değerleri karşılaştırılıp değişim ölçülmüştür.

3.7 İstatiksel Analiz

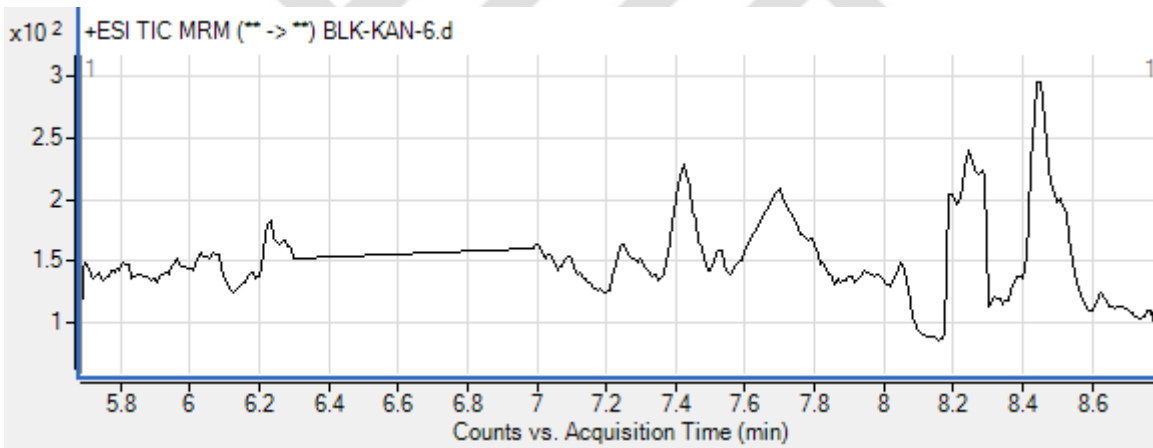
Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 (2011, Amerika Birleşik Devletleri) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

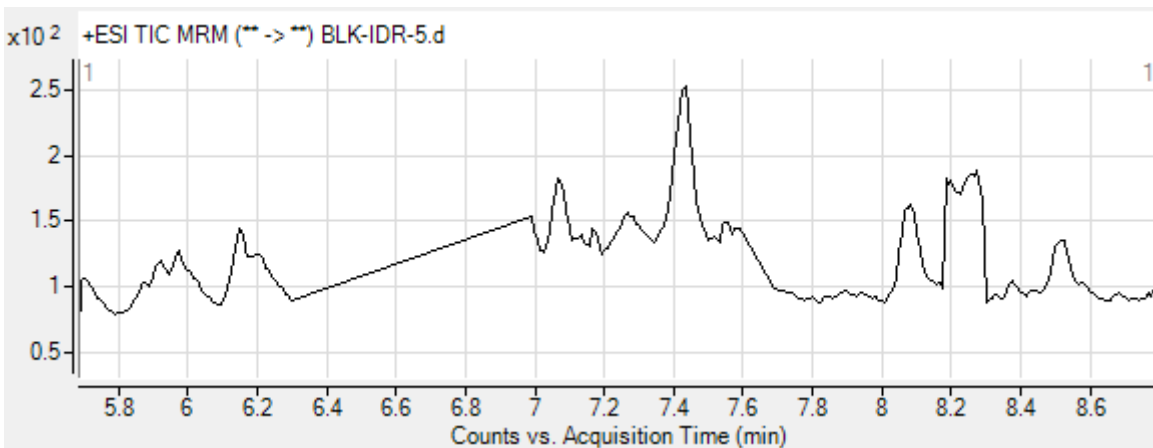
4.1 Metot Validasyonu

4.1.1 Seçicilik

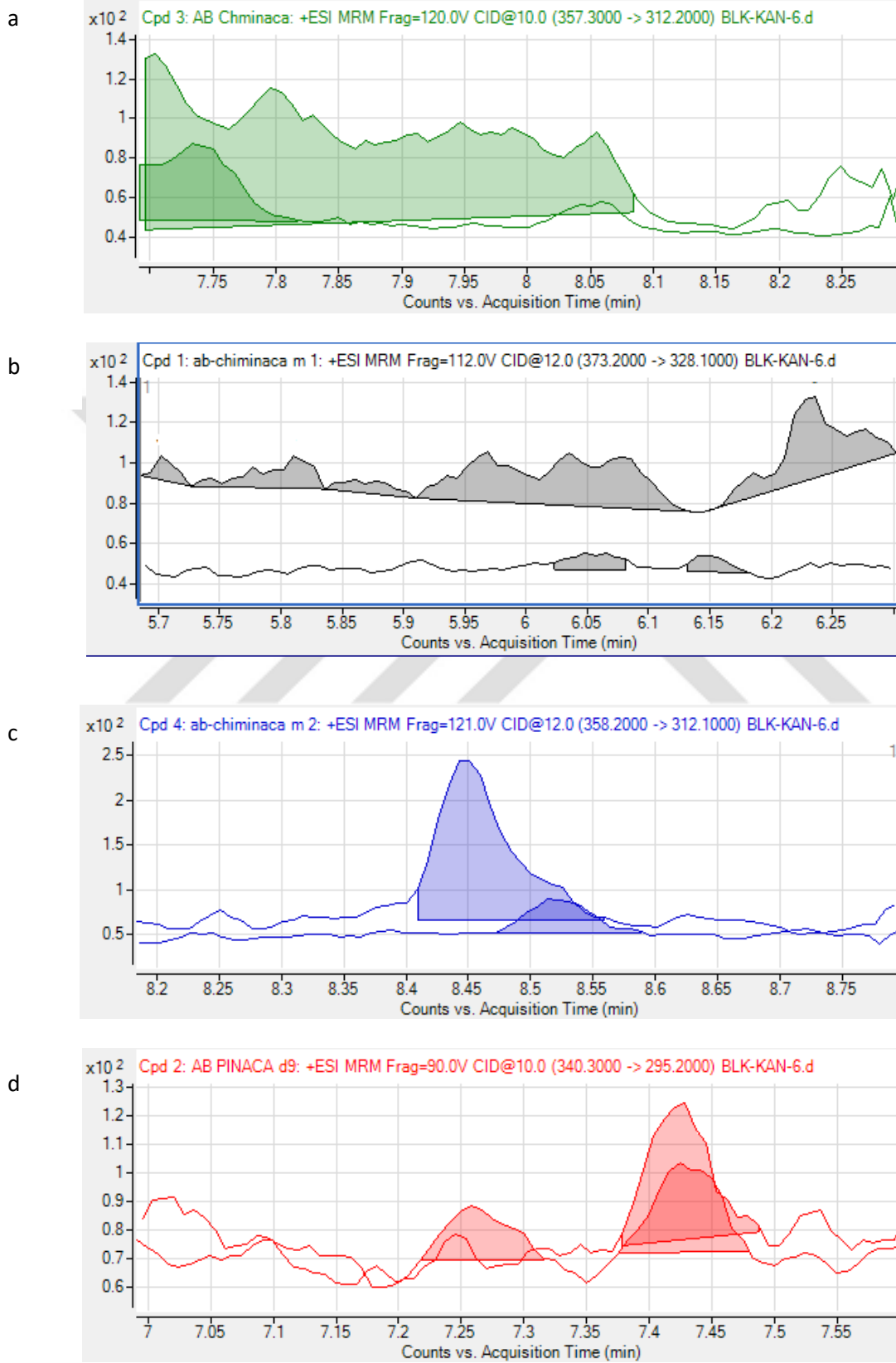
Bölüm 3.4 ve 3.6.1'e uygun şekilde çalışılan kör kan ve idrar örneklerinin kromatogramlarında; AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddeleri için belirlenen alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim tespit edilmemiştir. Şekil 11'de kör kan örneğine ait total iyon kromatogramı, Şekil 12'de kör idrar örneğine ait total iyon kromatogramı verilmiştir. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve AB-PINACA-d9 maddeleri için belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları kör kan örneği için Şekil 13'te kör idrar örneği için ise Şekil 14'te gösterilmiştir.



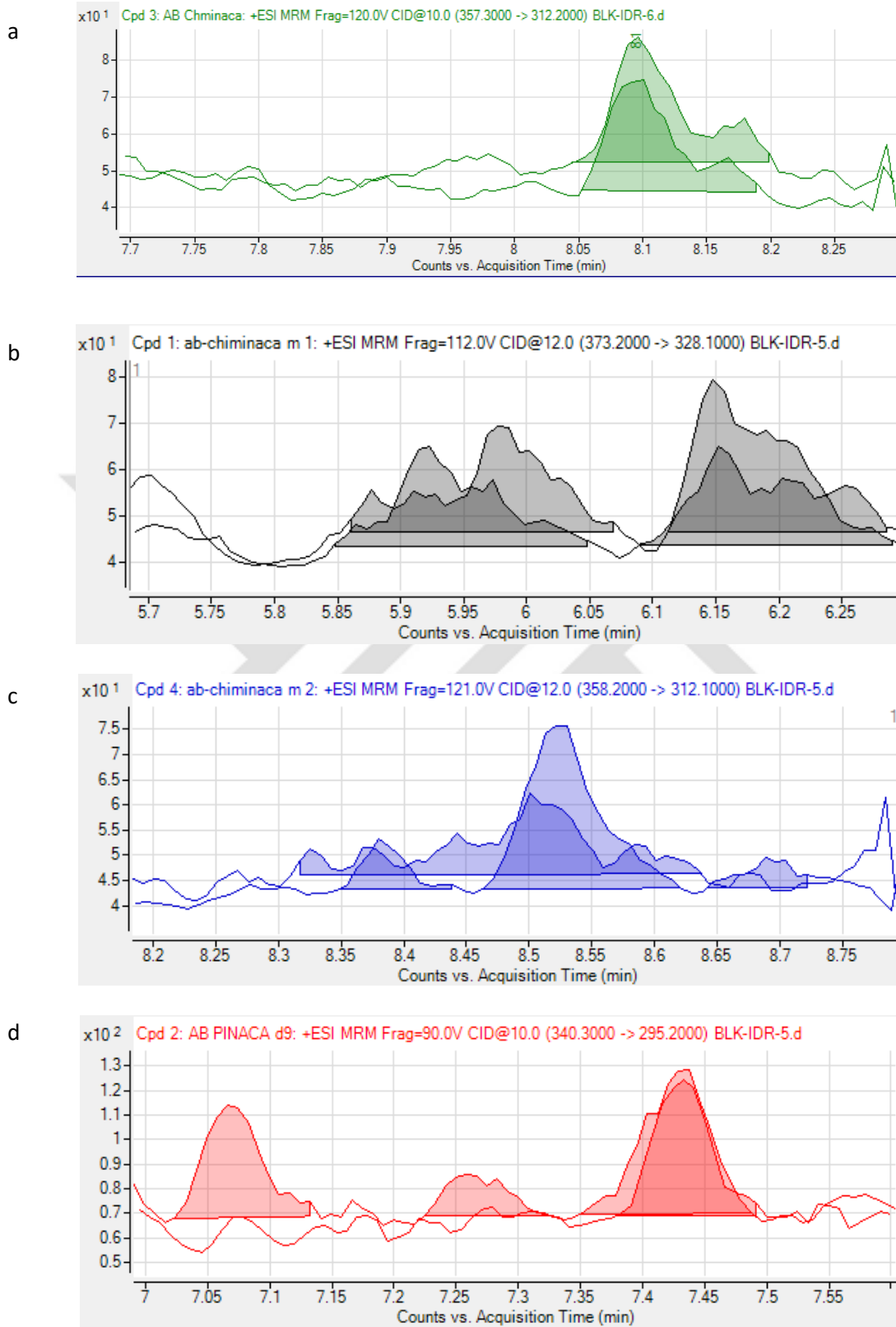
Şekil 11: Kör kan numunesi total iyon kromatogramı-TIC



Şekil 12: Kör idrar numunesi total iyon kromatogramı-TIC

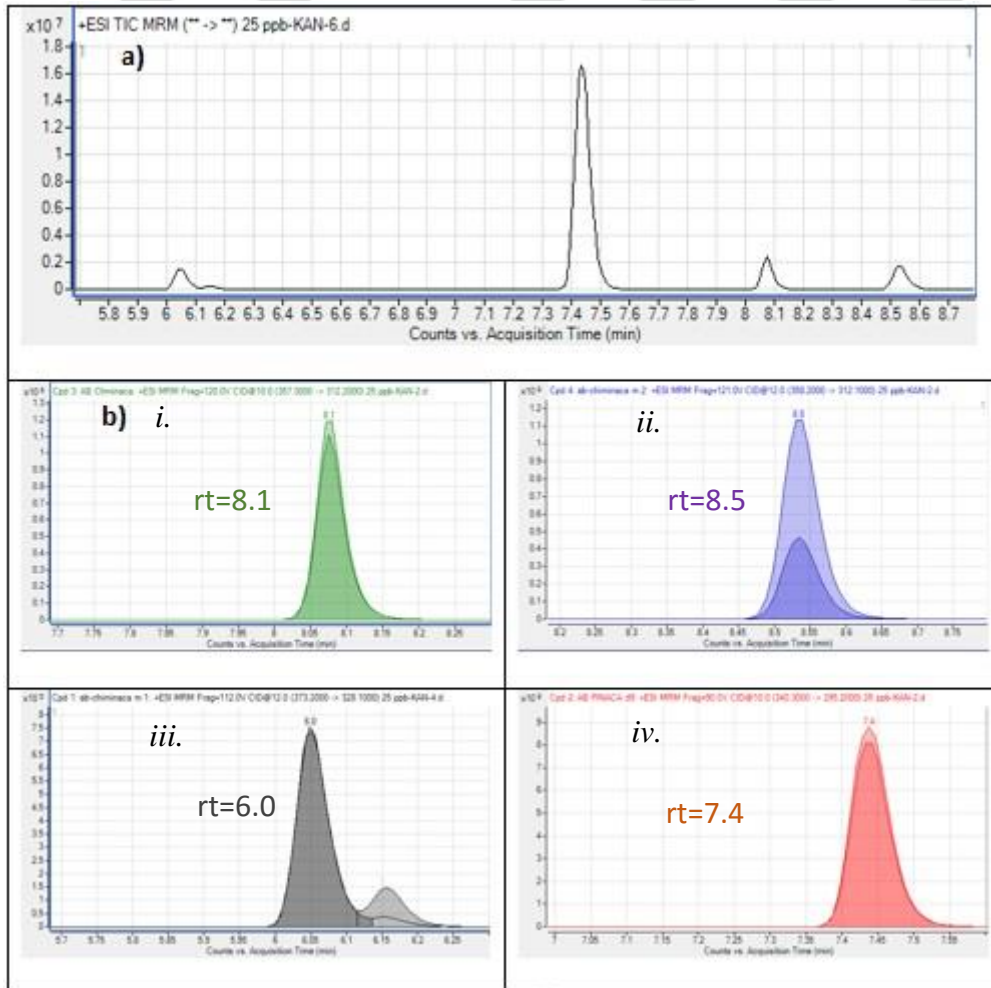


Şekil 13: a) AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 ve d) AB-PINACA-d9 maddelerinin kör kan numunesinde alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramı

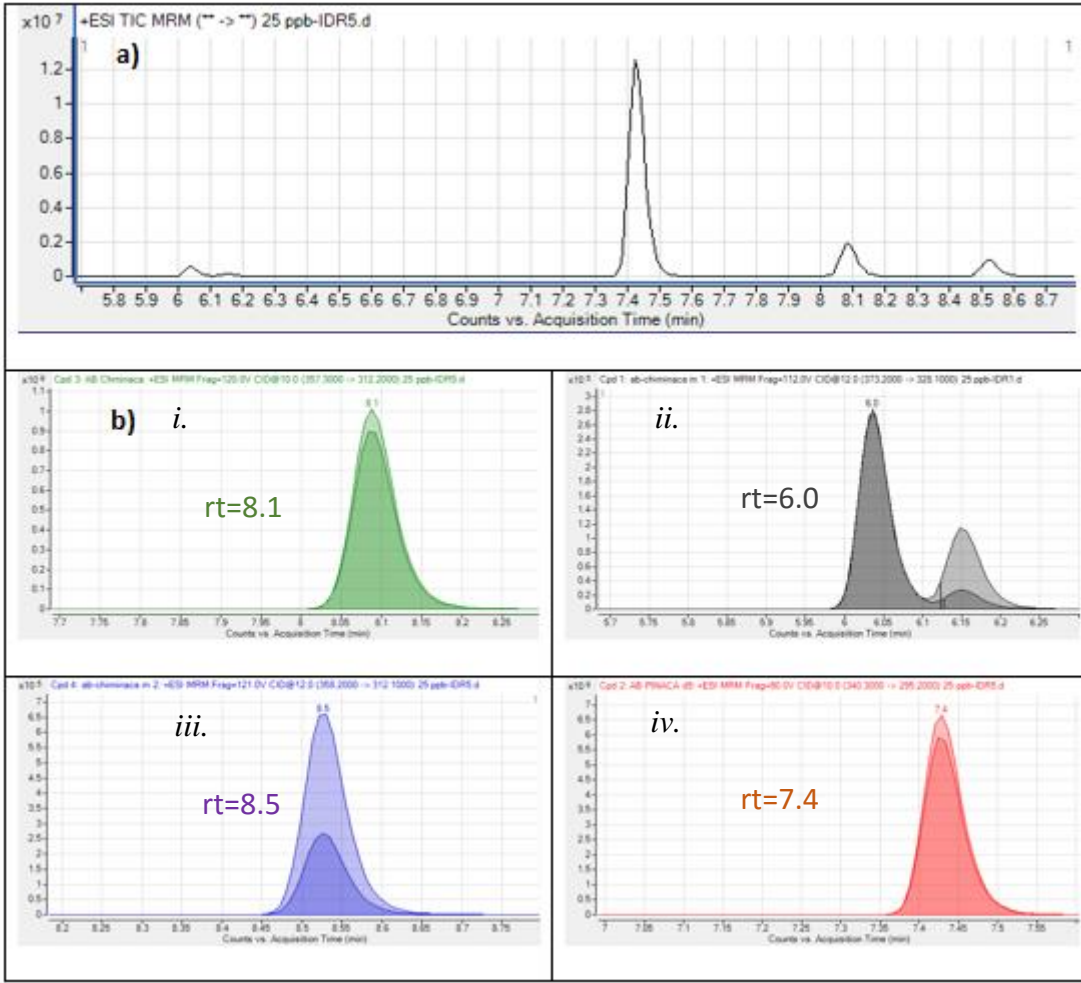


Şekil 14: a) AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 ve d) AB-PINACA-d9 maddelerinin kör idrar numunesinde alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramı

Şekil 15'te konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde katım yapılmış kan örneğine ait total iyon kromatogramı (a) ve bu kan örneğinde bulunan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları (b) verilmiştir. Şekil 16'da ise konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde katım yapılmış idrar örneğine ait total iyon kromatogramı (a) ve bu idrar örneğinde bulunan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 ve AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları (b) verilmiştir.



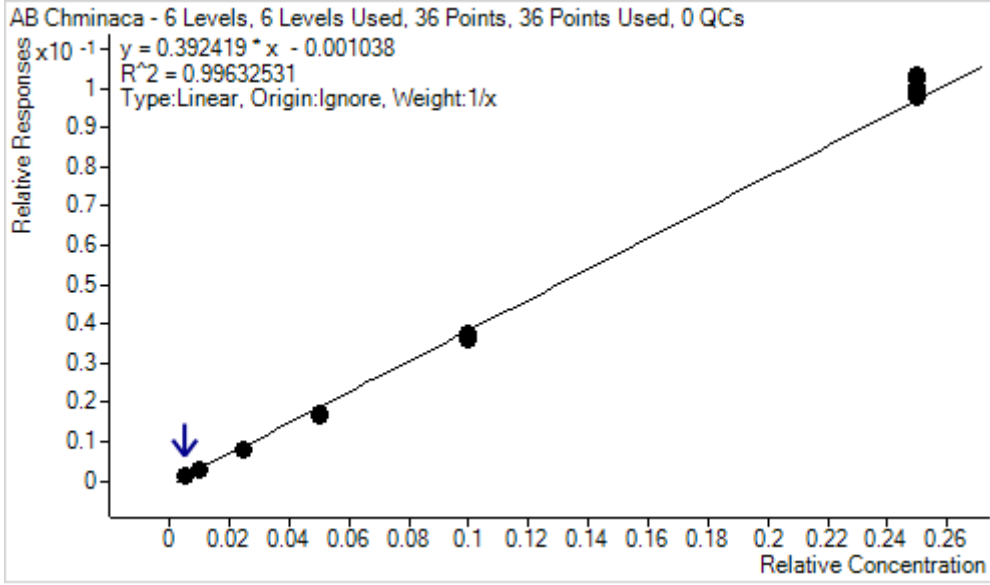
Şekil 15: a) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış kan örneği total iyon kromatogramı b) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış kan örneğinde i. AB-CHMINACA, ii. AB-CHMINACA-M2, iii. AB-CHMINACA-M1A ve iv. AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları



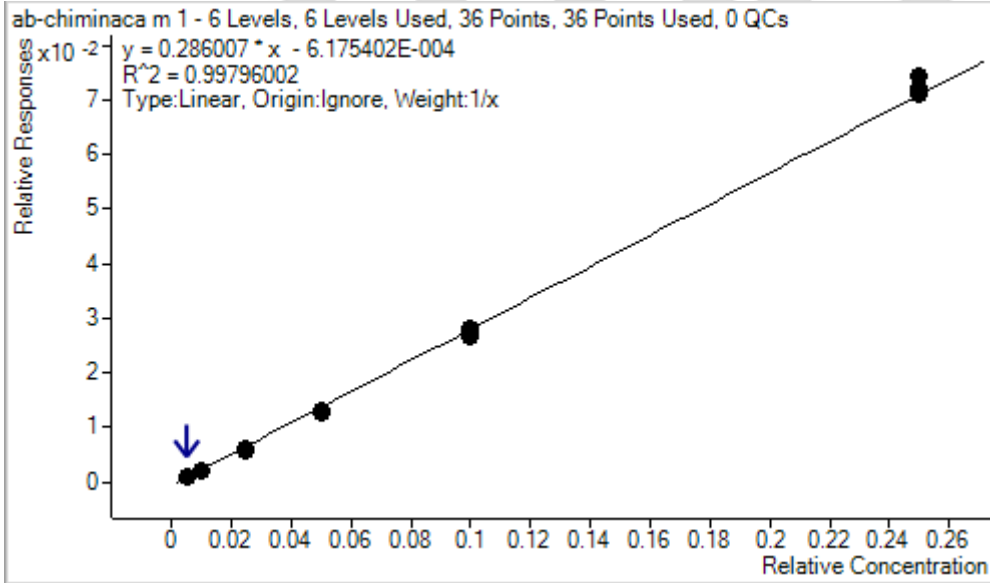
Şekil 16: a) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar örneği total iyon kromatogramı b) 25 ng/mL standart çözeltisi ile katım yapılmış idrar örneğinde *i.* AB-CHMINACA, *ii.* AB-CHMINACA-M1A, *iii.* AB-CHMINACA-M2 ve *iv.* AB-PINACA-d9 maddelerinin belirlenen alıkonma zamanlarındaki MRM kromatogramları

4.1.2 Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi

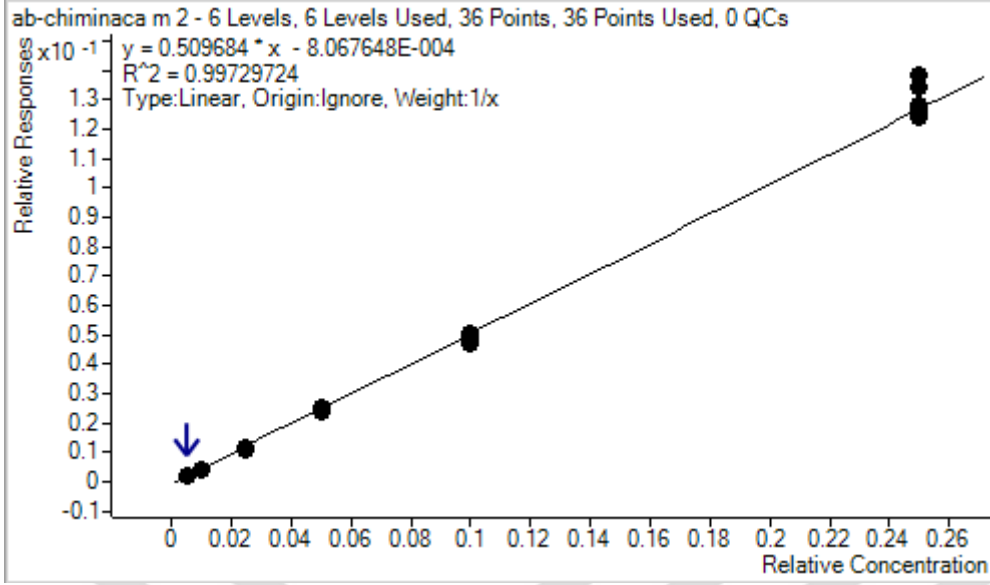
Konsantrasyonları 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25 ng/mL olacak şekilde standart çözeltiler ile katım yapılarak hazırlanan kan ve idrar örnekleri bölüm 3.4 ve 3.6.2'de belirtildiği gibi çalışılmıştır. 6 konsantrasyonun her biri 6 tekrarlı olacak şekilde toplamda 36 bağımsız örnek çalışması yapılmıştır. Metodun doğrusallığını hesaplamak için analit konsantrasyonu/IS konsantrasyonu ve analit alanı/IS alanı arasındaki bağıntının grafiği çizilmiştir. Şekil 17, 18, 19, 20, 21 ve 22'de sırasıyla AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddeleri için kan ve idrar örneklerine ait kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



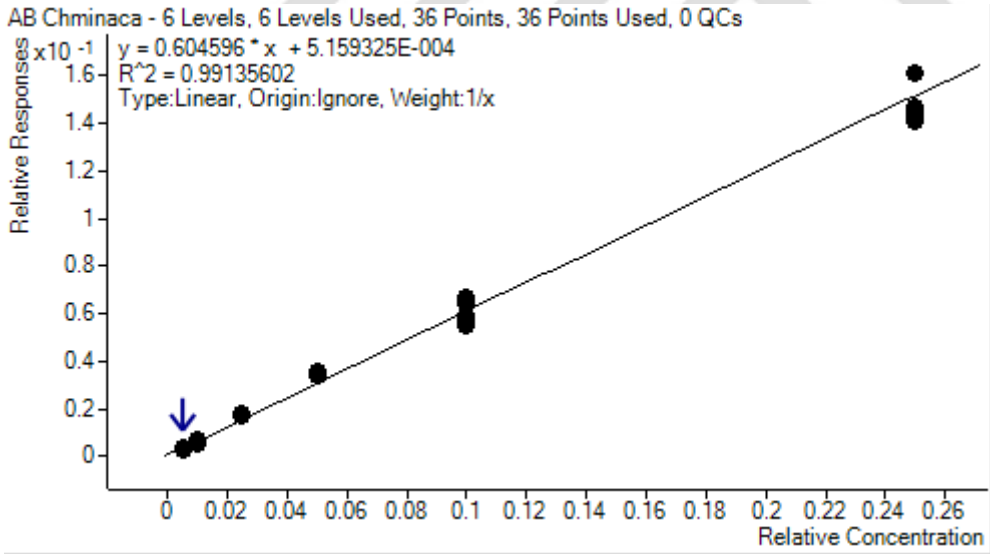
Şekil 17: AB-CHMINACA kan kalibrasyon eğrisi



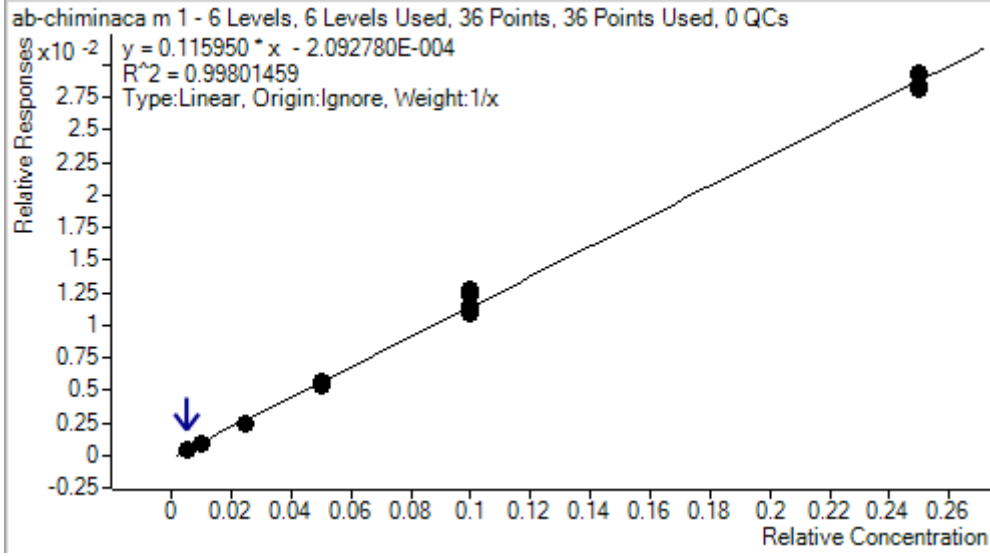
Şekil 18: AB-CHMINACA-M1A kan kalibrasyon eğrisi



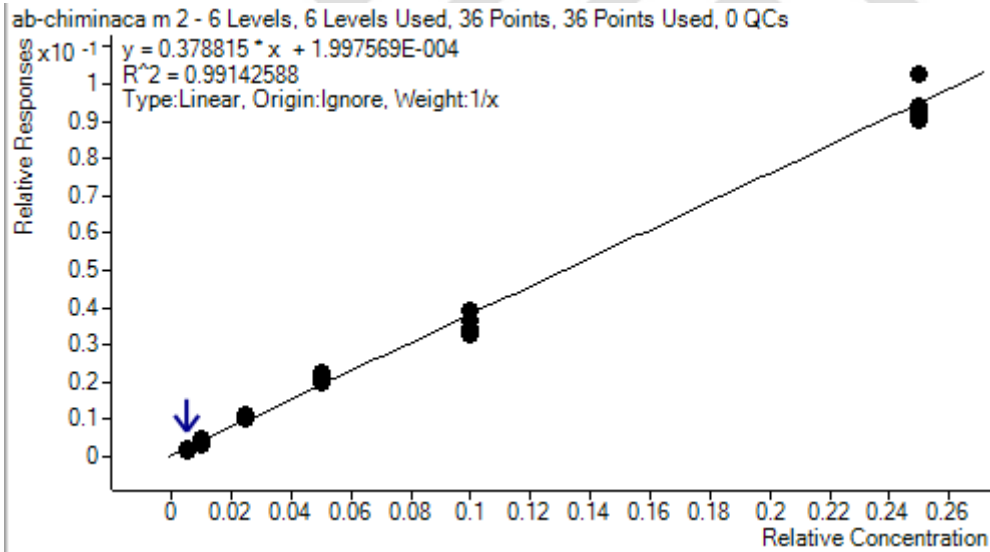
Şekil 19: AB-CHMINACA-M2 kan kalibrasyon eğrisi



Şekil 20: AB-CHMINACA idrar kalibrasyon eğrisi



Şekil 21: AB-CHMINACA-M1A idrar kalibrasyon eğrisi



Şekil 22: AB-CHMINACA-M2 kan kalibrasyon eğrisi

Linearite çalışması sonucunda elde edilmiş olan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kalibrasyon eğrisi denklemi, doğrusal aralık ve korelasyon katsayısı Tablo III'te verilmiştir.

Tablo III. Linearite çalışması sonucunda elde edilmiş olan AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kalibrasyon eğrisi denklemi, doğrusal aralık ve korelasyon katsayısı

	Madde	Doğrusal Aralık	Denklem	Korelasyon Katsayısı (r²)
KAN	AB-CHMINACA	0.5-25 ng/mL	$y=0.3924x-0.0010$	0.996
	AB-CHMINACA-M1A	0.5-25 ng/mL	$y=0.2860x-0.0006$	0.998
	AB-CHMINACA-M2	0.5-25 ng/mL	$y=0.5097x-0.0008$	0.997
İDRAR	AB-CHMINACA	0.5-25 ng/mL	$y=0.6046x+0.0005$	0.991
	AB-CHMINACA-M1A	0.5-25 ng/mL	$y=0.1160x-0.0002$	0.998
	AB-CHMINACA-M2	0.5-25 ng/mL	$y=0.3788x+0.0002$	0.991

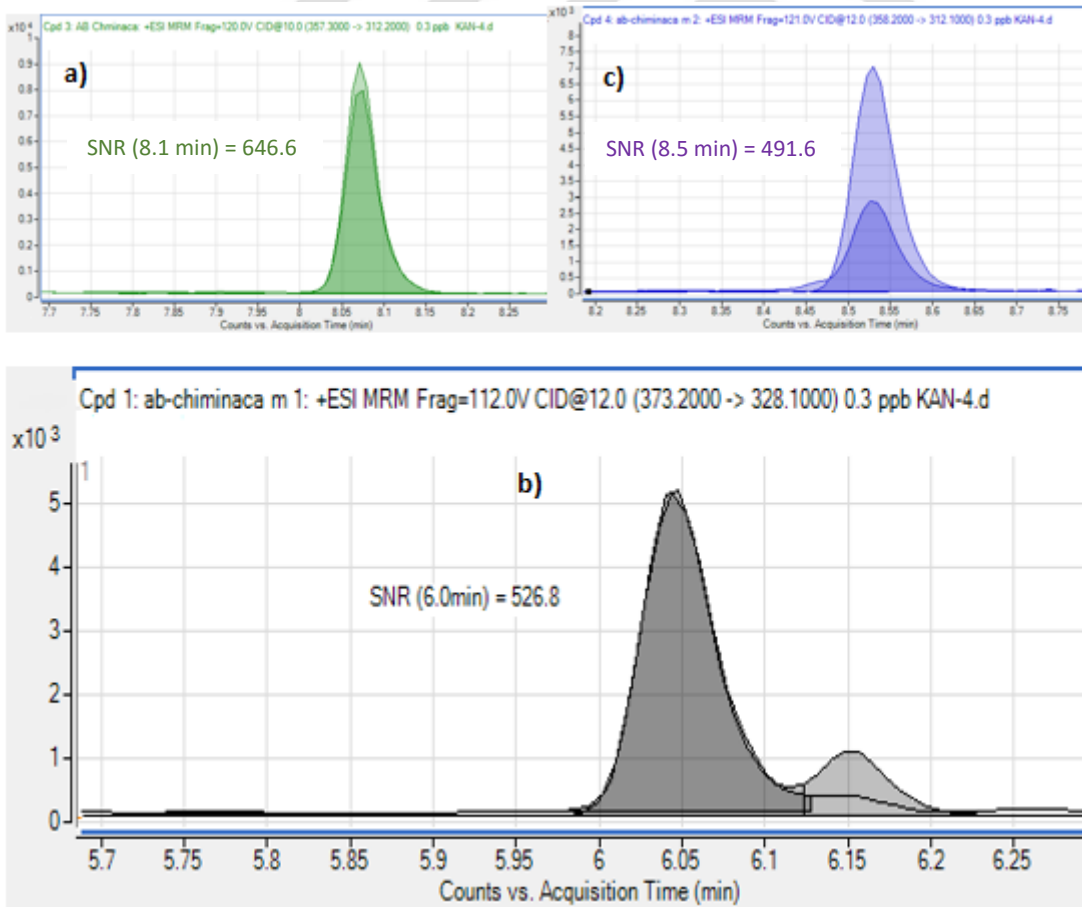
4.1.3 Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

LOD ve LOQ değerleri; S/N oranının en az 3 olduğu konsantrasyonlar dikkate alınarak bölüm 3.4 ve 3.6.3'te belirtildiği gibi hazırlanan kan ve idrar örnekleri çalışılarak bulunmuştur. Kan örnekleri için 0.3 ng/mL, idrar örnekleri için ise 0.15 ng/mL konsantrasyonunda hazırlanan örneklerin çalışılması sonucu (n=10) belirlenen AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin LOD ve LOQ değerleri Tablo IV'te verilmiştir.

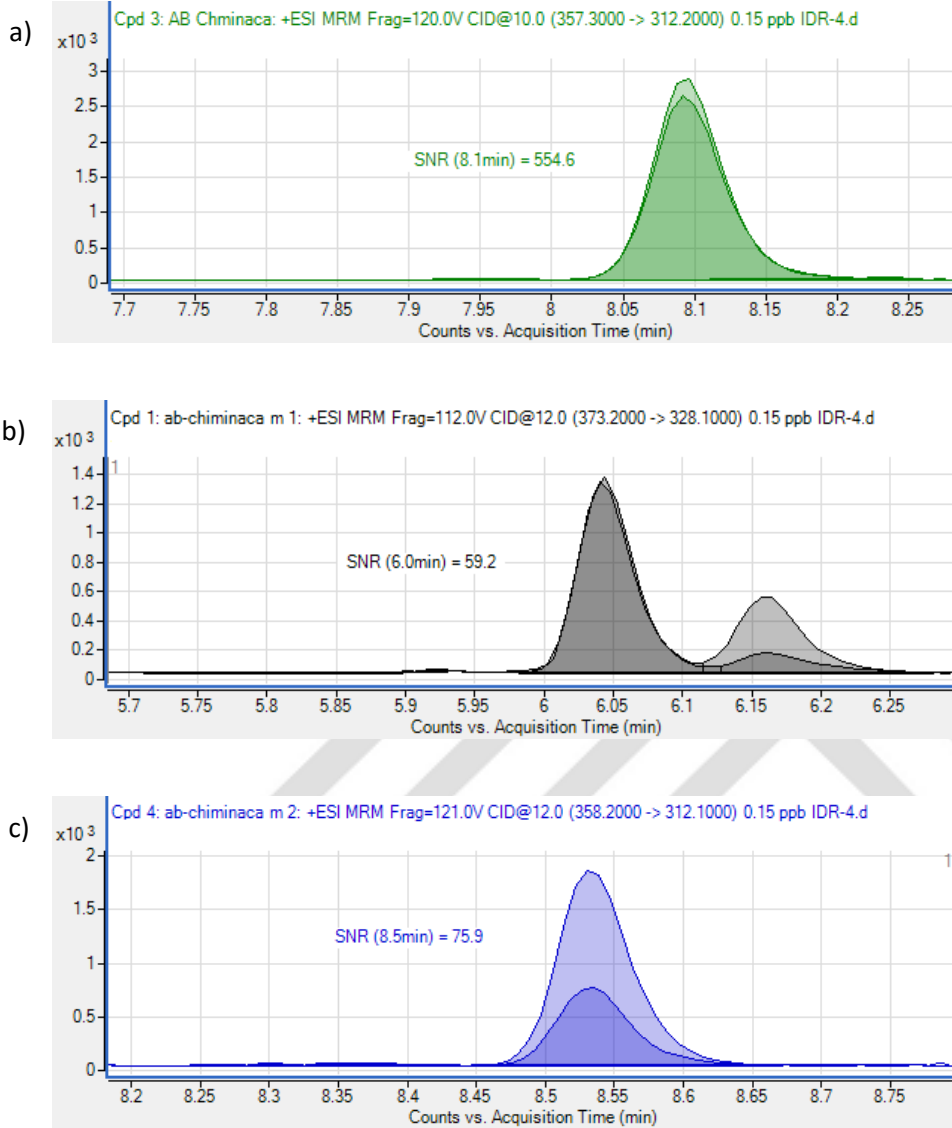
Tablo IV. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda LOD ve LOQ değerleri

Madde	Kan		İdrar	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
AB-CHMINACA	0.39	0.42	0.22	0.42
AB-CHMINACA-M1A	0.37	0.45	0.30	0.49
AB-CHMINACA-M2	0.34	0.49	0.23	0.44

Şekil 23'te 0.3 ng/mL standart katımı yapılmış kan örneklerinde analitlerin S/N oranları gösterilmiştir.



Şekil 23: 0.3 ng/mL katım yapılmış kan örneğinde a)AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 maddelerinin S/N değerleri



Şekil 24: 0.15 ng/mL katım yapılmış idrar örneğinde a)AB-CHMINACA, b) AB-CHMINACA-M1A, c) AB-CHMINACA-M2 maddelerinin S/N değerleri

4.1.4 Geri kazanım

Düşük ve yüksek konsantrasyonlar (0.5 ng/mL-25 ng/mL) kullanılarak bölüm 3.4 ve 3.6.4'te bahsedildiği şekilde hazırlanan (n=6) kan ve idrar örneklerindeki analitlerin geri kazanım ve matris etkisi değerleri Tablo V ve VI'da verilmiştir.

Tablo V. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kan örneklerindeki analitlerin geri kazanım ve matriks etkisi değerleri

Kan	Konsantrasyon (ng/mL)	AB- CHMINACA	AB- CHMINACA- M1A	AB- CHMINACA- M2
Geri kazanım (%)	0.5	92.8	88.5	76.1
	25	91.8	91.5	82.8
Matriks etkisi (%)	0.5	84.9	123.4	110.5
	25	81.7	108.0	109.7

Tablo VI. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait idrar örneklerindeki analitlerin geri kazanım ve matriks etkisi değerleri

İdrar	Konsantrasyon (ng/mL)	AB- CHMINACA	AB- CHMINACA- M1A	AB- CHMINACA- M2
Geri kazanım (%)	0.5	79.2	85.6	123.8
	25	79.4	97.3	114.9
Matriks etkisi (%)	0.5	77.7	103.2	88.4
	25	98.3	121.8	103.1

4.1.5 Kesinlik

Bölüm 3.4 ve 3.6.5'e uygun olarak hazırlanan düşük, orta ve yüksek konsantrasyondaki (0.5 ng/mL- 10 ng/mL- 25 ng/mL) kan ve idrar örnekleri ile gün içi ve günler arası kesinlik

çalışmaları yapılmıştır. Tablo VII'de kan için yapılan kesinlik çalışması sonuçları, Tablo VIII'de ise idrar için yapılan kesinlik çalışması sonuçları verilmiştir.

Tablo VII. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri-n=6

Madde	Kan (RSD)			İDRAR (RSD)		
	0.5 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL	0.5 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL
AB-CHMINACA	0.9	1.4	1.1	8.0	8.0	5.2
AB-CHMINACA-M1A	2.1	1.4	1.9	4.3	5.7	1.9
AB-CHMINACA-M2	4.2	2.6	3.4	9.5	6.4	4.6

Tablo VIII. AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerinin kan ve idrarda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri-n=6

Madde	Kan (RSD)			İDRAR (RSD)		
	0.5 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL	0.5 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL
AB-CHMINACA	2.7	2.3	2	11.5	8.3	6.4
AB-CHMINACA-M1A	3.1	2.8	2.1	6.9	5.8	3.7
AB-CHMINACA-M2	8.5	3.9	6.6	7.5	9.4	7.2

4.1.6 Kararlılık

Kararlılık çalışması kapsamında oto örnekleyicide bekleyen proses edilmiş örneklerdeki analitlerin zamana bağlı alan değişimi 24 saatlik zaman dilimi için izlenmiştir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda (0.5 ng/mL-25 ng/mL) hazırlanan kan ve idrar örnekleri bölüm 3.4 ve 3.6.6'ya uygun olarak çalışılmıştır. Örneklerin izlenen zaman aralığı içerisinde alan değerlerinde anlamlı bir değişiklik (\geq % 10) gözlenmemiştir.



5. TARTIŞMA

Uyuşturucu madde kullanımı; beden ve ruh sağlığını bozmakla beraber sosyal, adli, ekonomik ve toksikolojik sorunlara yol açan çok boyutlu toplumsal bir problemdir. Son yıllarda rutin uyuşturucu testlerinde taranan klasik uyuşturucuların dışında kalan yeni uyuşturucu maddelerin kullanılması, madde suistimali sorununu daha ciddi boyutlara taşımıştır.

Yeni nesil psikoaktif maddelerin alt grubunda yer alan SK'ler, madde çeşitliliği ve yüksek kullanım oranları ile bu grubun önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. SK'ler ilk olarak bilim insanları tarafından endokannabinoid sistemi araştırma ve yeni ilaçlar geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere üretilen kannabinoid reseptör agonistleridir. Bilimsel amaçla üretilen ilk SK'den yaklaşık 40 yıl kadar sonra Çin kaynaklı olduğu düşünülen merdivenaltı laboratuvarlar tarafından esrarın temel psikoaktif bileşeni olan THC'nin etkilerini taklit etmeleri dolayısı ile SK'lerin uyuşturucu madde olarak üretimine ve satışına başlanmıştır (8).

Genellikle, toz halinde bulunan saf maddenin uygun çözücülerde çözülüp çeşitli bitkilerin üzerine spreyleneceği ve kurutulduktan sonra "Bonzai", "Spice", "K2" gibi markaların adı altında paketlenmesi şeklinde satışı gerçekleştirilmektedir. Bu paketlerin üzerinde "insan kullanımı için değildir.", "bitkisel karışım" gibi dikkat çekmemek amaçlı yazılmış ifadelerin bulunması ve içeriklerinin gizlenmesi SK'lerin illegal piyasada yerini aldığı bilinen ilk yıl olan 2004 yılı civarında yasal otoriteleri yanıltmış ve bu durum maddelerin uyuşturucu pazarında denetime takılmadan varlığını göstermesi ile sonuçlanmıştır. SK içeren ürünleri kullananların klasik uyuşturucu testlerine ve yasalara takılmadan "kafa yapıcı" madde etkisinde bulunabilmeleri, bu maddelerin kısa zaman içerisinde "esrara yasal alternatif" olarak ün kazanmalarına ve özellikle gençler arasında popüler olmalarına neden olmuştur. Bir süre sonra, bitkisel karışımları kullananların esrara benzer etkisinin olduğu yönünde paylaştıkları deneyimler dikkat çekmiş ve karışımların içerisinde paketlerinde belirtilenden fazlası olduğu

fark edilmiştir. Psikoaktif madde tespitine yönelik ilk çalışmalar THC'nin varlığını bulmaya yönelik olmuş fakat çalışmalar sonucunda THC bulunamayınca aynı etkiye neden olabilecek başka maddelerin araştırılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar sonuç vermiş ve ilk kez 2008 yılında Almanya'da bulunan bir ilaç firması tarafından bitkisel karışımların içerisinde bir SK olan JWH-018'in varlığı tespit edilmiştir. Bu durum geniş yankı uyandırmış ve 2009 yılı itibariyle çeşitli ülkelerde tespit edilmiş SK'ler yasaklı maddeler sınıfına dâhil edilmiştir. Piyasada yer alan SK'lerin yasa kapsamına girmesi ile illegal laboratuvarlar tarafından bu maddelerin kimyasal yapılarında ufak değişiklikler yapılarak ikinci nesil olarak adlandırılan yeni SK'ler üretilmiş ve böylece yasalardan kaçma durumu devam ettirilmiştir. Günümüzde hala devam etmekte olan bu döngü neticesinde SK'ler kimyasal çeşitlilik ve kullanım oranı bakımından yeni psikoaktif maddelerin en geniş üyesi haline gelmiştir (6,8-10,14).

Türkiye'de ilk kez SK yakalanması 2010 yılında gerçekleşmiştir. 2011 yılında yasal düzenlemeye gidilmiş ve piyasada bulunan 14 SK, kimyasal adları verilerek yasaklanmıştır. Her yıl yeni çeşitleri eklenen SK'ler sonraki yıllarda yasaya eklenen yeni maddeleri içeren düzenlemeleri beraberinde getirmiştir. 2015 yılında, maddelerin adları belirtilmeden ana kimyasal yapıları ve bu kimyasal yapılara eklenebilecek olası fonksiyonel gruplar belirtilerek oluşturulan jenerik sınıflandırılma gerçekleştirilmiştir. Yasal süreci hızlandırıcı nitelikte olan jenerik yasa ile çekirdek yapıları ve radikal grupları yasada belirtilen yeni SK'ler tespit edilmeleri ile birlikte vakit kaybetmeksizin Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına alınmış olmaktadır (48).

SK'lerin farmakolojik ve toksikolojik özellikleri ile ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Birçoğu CB1 ve CB2 reseptörü tam agonisti olan maddelerin oluşturdukları fizyolojik ve psikolojik etkiler, kısmi agonist olan THC'ye nazaran daha şiddetlidir. Kronik esrar

tüketenlerde gözlemlenen bağımlılık ve yoksunluk sendromları, uzun süre SK tüketen bireylerde de görülmektedir (13,18,20-21).

SK içeren ürünlerin hazırlanma aşamasında ilkel yöntemlerin kullanılması, maddelerin bitkisel karışımlarda heterojen dağılmasına yol açmakta ve böylece aynı seride hazırlanmış ürünlerin farklı paketlerinde dahi madde konsantrasyonlarının önemli ölçüde farklılık göstermesine neden olmaktadır (40). Bitkinin kendisinden gelebilecek veya laboratuvar çevresinden gelebilecek kontaminasyonlara dikkat edilmemesi, toksikolojik açıdan ayrıca önem arz etmektedir.

Maddelerin potent oluşundan dolayı az miktarlarının beklenen psikotrop etkiyi oluşturabilmesi ve çabuk metabolize olmaları, biyolojik örneklerde tespitlerini zorlaştırmaktadır. Bu durum maddenin kendisi ile birlikte metabolitlerinin de tespitine yönelik hassas, güvenilir analitik metodlar geliştirilmesini önemli kılmaktadır (53-54).

SK'lerden biri olan AB-CHMINACA'nın ilk olarak 2014 yılında uyuşturucu piyasasında görülmesini takiben aynı yıl içerisinde ülkemiz de dâhil pek çok ülkede yasal düzenlemelere gidilmiştir (12,22-23). Maddenin bitkisel ürünlerde tanımlanma çalışmalarının ardından *in vitro* ve *in vivo* metabolizma çalışmaları yapılmış ve AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 maddeleri biyolojik örneklerdeki esas metabolitler olarak tespit edilmiştir (22,29-32).

AB-CHMINACA maddesinin ve/veya metabolitlerinin kan ve/veya idrar örneklerinde tayinine yönelik yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürdeki çalışmaların çoğunda numune hazırlama yöntemi olarak sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemi kullanılmıştır (61-65). Maddelerin analize hazırlanması için SPE metodunun kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (66-67). Enstrümental yöntem olarak genellikle LC/MS/MS yöntemi tercih edilmiş olmakla beraber LC/QTOF-MS ve LC-QTRAP-MS/MS yöntemlerinin kullanıldığı da olmuştur (22,29-

30,32,61-67). Yapılan çalışmalarda AB-CHMINACA için LOD değerleri 0.005 ng/mL ile 1 ng/mL arasında değişmekte, LOQ değerleri ise 0.01 ng/mL ile 10 ng/mL arasında değişmektedir (61-67). Bu çalışmalardan Gunderson ve ark.'nın yapmış oldukları, SPE metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup AB-CHMINACA için %133 ve AB-CHMINACA-M1A için %57 matriks etkisi değerleri ile kabul kriterlerinin dışında kalmıştır (66). Söz konusu çalışma ve LLE ile yapılmış olan başka bir çalışma için hesaplanan matriks etkisi ve/veya geri kazanım değerleri AB-CHMINACA ve/veya metabolitleri için olması gereken aralığın (%75-%125) dışında çıkmış bu yüzden tam validasyon gerçekleştirilemeyip bu maddeler için semi-kantitatif validasyon gerçekleştirildiği belirtilmiştir (45,66).

AB-CHMINACA ve metabolitlerinin kan ve idrar örneklerinde validasyonunu kapsayan bu çalışmamızda temiz eluatlar ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için SPE metodu tercih edilmiştir. IS tekniğinin kullanılması ile yüksek kesinlik elde edilmiş ve numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişmelerle oluşan belirsizlikler en aza indirilmiştir. Validasyon çalışması kapsamında öncelikle AB-CHMINACA ve metabolitlerinin seçiciliği araştırılmış ve maddelerin bulunduğu alıkonma zamanlarında herhangi bir pike rastlanmamıştır.

LOD ve LOQ değerlerini belirlemek için yapılan analizler sonucunda LOD değerleri 0.22 ng/mL – 0.39 ng/mL aralığında, LOQ değerleri ise 0.42 ng/mL – 0.49 ng/mL aralığında bulunmuş olup literatürde yer alan çalışmalar ile uyumluluk göstermiştir.

Doğrusallık çalışması için kan ve idrarda AB-CHMINACA, AB-CHMINACA-M1A ve AB-CHMINACA-M2 maddelerine ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve eğrilerin denkleminde “ r^2 ” değerleri belirlenmiştir. R^2 değerleri 0.991-0.998 arasında değişmekte, doğrusal aralık ise tüm analitler için 0.5 ng/mL – 25 ng/mL konsantrasyonundadır.

%RSD değerleri gün içi tekrarlanabilirlik çalışmalarında %10'dan küçük bulunmuş; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise %12'den küçük bulunmuştur. Kan ve idrar için geri kazanım değerleri 76.0% - %123.8 arasında, matriks etkisi ise 77.7 % - 123.4 % arasında değişmektedir. Ekstrakte edilmiş kan ve idrar rneklelerinin otornekleyci kararlılığı çalışmalarında, t=0'da elde edilen analiz sonuçlarının alan değerleri ile bekletilmiş numunelerin değerleri arasında % 10'dan büyük anlamlı bir değişim gzlenmemiştir.

Tüm validasyon değerleri uluslararası kabul kriterlerinin içinde yer alıyordur değerler literatür ile uyumlu bulunmuştur.



6. SONUÇ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında suistimal edilen bir madde olan AB-CHMINACA ve AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2 metabolitlerinin kan ve idrarda SPE yöntemi kullanılarak hazırlanması ve LC/MS/MS cihazı kullanılarak analizinin yapılması ile validasyonu gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışması kapsamında doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, seçicilik, LOD ve LOQ, kesinlik, geri kazanım, matriks etkisi ve kararlılık çalışmaları yapılmış ve elde edilen değerler literatür ve kabul kriterleri ile uyumlu bulunmuştur. Bu çalışma, AB-CHMINACA ve metabolitlerinin (AB-CHMINACA-M1A, AB-CHMINACA-M2) SPE yöntemi kullanılarak kan ve idrar örneklerinde beraber analiz edildiği ilk çalışmadır. Seçicilik, hassasiyet ve geri kazanım değerleri yüksek, belirsizlik değerleri düşük, doğrusal aralığı geniş ve analiz süresi kısa olan bu yöntemin kullanıcılara ait *ante* ve *postmortem* kan ve idrar örneklerine uygulanabileceği, bağımlılık tedavisi gören kullanıcıların izlenmesine destek olacağı ve olguların aydınlatılması açısından adli bilimlere önemli bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & Biodiversity* 2007;4(8):1614-1648.
2. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry* 2006;28(2):153-157.
3. Abel EL. *Marihuana: the first twelve thousand years*. Springer,1980.
4. United Nations Office on Drugs and Crime. *Word Drug Report 2018*. United Nations Publication. 2018.
5. Gaoni Y, Mechoulam M. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society* 1964; 86(8):1646-1647.
6. Shevyrin VA, Morzherin Y. Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russian Chemical Bulletin* 2015;64(6):1249-1266.
7. Erol Y, Yeter O, Alpertunga B. Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC-MS/MS: monitoring in forensic cases. *Forensic Science International* 2015; 248:88-93.
8. European Monitoring Centre For Drugs And Drug Addiction. *Understanding the spice phenomenon*. Luxembourg:2009.
9. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi. *Avrupa Uyuşturucu Raporu 2018: Eğilimler ve Gelişmeler*, Avrupa Toplulukları Resmi Yayınlar Bşrosu, Lşksemburg:2018.
10. Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012;39(2)234-243.

11. Buchler IP, Hayes MJ, Hegde SG, Hockerman SL, Jones DE, Kortum SW ve ark., Pfizer "Indazole derivatives". Uluslararası patent WO2009106980. 2009.
12. 15.09.2014 tarihli ve 2014/6800 sayılı Bakanlar Kurulu Kararnamesi. 02.10.2014 tarihli ve 29137 sayılı Resmi Gazete.
13. Vardakou I, Pistos C, Spiliopoulou C. Spice. Drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicology Letters* 2010; 197(3):157-162.
14. Fattore L, Fratta W. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2011;5:60 1-12.
15. Kemp AM, Clark MS, Dobbs T, Galli R, Sherman J, Cox R. Top 10 facts you need to know about synthetic cannabinoids: not so nice spice. *The American Journal of Medicine* 2016;129(3):240-244.
16. Dresen S, Ferreirós N, Pütz M, Westphal F, Zimmermann R, Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *Journal of Mass Spectrometry* 2010;45(10):1186-1194.
17. Panigrahi B, Jones BC, Rowe SP. Brodifacoum-contaminated synthetic marijuana: clinical and radiologic manifestations of a public health outbreak causing life-threatening coagulopathy. *Emergency Radiology* 2018;25(6):715-718.
18. Fantegrossi WE, Moran JH, Radomska-Pandya A, Prather PL. Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: mechanism underlying greater toxicity?. *Life Sciences* 2014;97(1):45-54.
19. Tai S, Fantegrossi WE. Pharmacological and toxicological effects of synthetic cannabinoids and their metabolites. Baumann MH, Glennon RA, Wiley JL, editörler. *Neuropharmacology of new psychoactive substances*. Springer,2017;249-262.

20. Grigg J, Manning V, Arunogiri S, Lubman DI. Synthetic cannabinoid use disorder: an update for general psychiatrists. *Australasian Psychiatry* (2019).doi:1039856218822749.
21. Zimmermann US, Winkelmann PR, Pilhatsch M, Nees JA, Spanagel R, Schulz K. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Deutsches Ärzteblatt International* 2009;106(27):464-467.
22. Erratico C, Negreira N, Norouzizadeh H, Covaci A, Neels H, Maudens K ve ark. In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Testing and Analysis* 2015;7(10):866-876.
23. Uchiyama N, Shimokawa Y, Kawamura M, Kikura HR, Hakamatsuka T. Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl) benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products. *Forensic Toxicology* 2014;32(2):266-281.
24. European Monitoring Centre For Drugs And Drug Addiction. Report on the risk assessment of N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-CHMINACA) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances. Luxembourg: Publications Office of the European Union,2018.
25. Longworth M, Banister SD, Mack JB, Glass M, Connor M, Kassiou M. The 2-alkyl-2H-indazole regioisomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, and 5F-AB-PINACA are possible manufacturing impurities with cannabimimetic activities. *Forensic Toxicology* 2016;34(2):286-303.
26. <https://www.lipomed.com/index.php?section=mediadir&cmd=specification&eid=611> (20/04/2019)

27. World Health Organization Expert Committee on Drug Dependence. AB-CHMINACA Review Report Agenda Item 4.1. 2017;1-21.
28. United States Justice Department Drug Enforcement Administration. N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-CHMINACA), N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and [1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl](naphthalen-1-yl)methanone (THJ-2201) Background Information and Evaluation of 'Three Factor Analysis' (Factors 4, 5, and 6) for Temporary Scheduling: Washington, 2014.
29. Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I ve ark. Postmortem distribution of AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB, and diphenidine in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case: usefulness of adipose tissue for detection of the drugs in unchanged forms. *Forensic Toxicology* 2015;33(1):45-53.
30. Wurita A, Hasegawa K, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I ve ark. Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser. *Legal Medicine* 2016;19:113-118.
31. Sim J, Cho HS, Lee J, In S, Kim E. Determination of AB-CHMINACA and its metabolites in human hair and their deposition in hair of abusers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017;140:162-168.
32. Tyndall JA, Gerona R, De Portu G, Trecki J, Elie MC, Lucas J ve ark. An outbreak of acute delirium from exposure to the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Clinical Toxicology* 2015;53(10):950-956.
33. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA ve ark. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Review* 2012;54(2):161-202.

34. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR ve ark. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews* 2010;62(4):588-631.
35. Compton DR, Rice KC, De Costa BR, Razdan RK, Melvin LS, Johnson MR ve ark. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993;265(1):218-226.
36. Wiley JL, Marusich JA, Lefever TW, Antonazzo KR, Wallgren MT, Cortes RA ve ark. AB-CHMINACA, AB-PINACA, and FUBIMINA: affinity and potency of novel synthetic cannabinoids in producing Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-like effects in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2015;354(3):328-339.
37. Martin BR, Compton DR, Thomas BF, Prescott WR, Little PJ, Razdan RK, ve ark. Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1991;40:471-478.
38. Cannaert A, Franz F, Auwärter V, Stove CP. Activity-based detection of consumption of synthetic cannabinoids in authentic urine samples using a stable cannabinoid reporter system. *Analytical Chemistry* 2017;89(17):9527-9536.
39. Lefever TW, Marusich JA, Thomas BF, Barrus DG, Peiper NC, Kevin RC ve ark. Vaping synthetic cannabinoids: a novel preclinical model of e-cigarette use in mice. *Substance Abuse* 2017;11:1-8. doi:1178221817701739.
40. Franz F, Angerer V, Hermanns CM, Auwärter V, Moosmann B. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair—proof of consumption or false friends for interpretation?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016;408(13):3445-3452.

41. Hermanns CM, Müller D, Kithinji J, Angerer V, Franz F, Eyer F ve ark. Acute side effects after consumption of the new synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and MDMB-CHMICA. *Clinical Toxicology* 2018;56(6):404-411.
42. Hess C, Stockhausen S, Kernbach WG, Madea B. Death due to diabetic ketoacidosis: Induction by the consumption of synthetic cannabinoids?. *Forensic Science International* 2015;257:e6-e11.
43. Abouchedid R, Hudson S, Thurtle N, Yamamoto T, Ho JH, Bailey G ve ark. Analytical confirmation of synthetic cannabinoids in a cohort of 179 presentations with acute recreational drug toxicity to an Emergency Department in London, UK in the first half of 2015. *Clinical Toxicology* 2017;55(5):338-345.
44. Maeda H, Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Nagashima E, Yoshida KI. AB-CHMINACA induced sudden death from non-cardiogenic pulmonary edema. *Clinical Toxicology* 2017;56(2):143-145.
45. Angerer V, Jacobi S, Franz F, Auwärter V, Pietsch J. Three fatalities associated with the synthetic cannabinoids 5F-ADB, 5F-PB-22, and AB-CHMINACA. *Forensic Science International* 2017;281:e9-e15.
46. Gieroń J, Adamowicz P. Fatal poisoning with the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA and ethyl alcohol—a case study and literature review. *Problems Forensic Sci* 2016;106:482-495.
47. Trecki J, Gerona RR, Schwartz MD. Synthetic cannabinoid-related illnesses and deaths. *N Engl J Med* 2015;373(2):103-107.
48. Emniyet Genel Müdürlüğü Uyuşturucu ile Mücadele Daire Başkanlığı. Sentetik Kannabinoidler. Ankara: Uyuşturucu ile Mücadele Daire Başkanlığı, 2016.

49. Znaleziiona J, Ginterová P, Petr J, Ondra P, Válka I, Ševčík J ve ark. Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques—a review. *Analytica Chimica Acta* 2015;874:11-25.
50. Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicology* 2015;33(2):175-194.
51. Logan BK, Reinhold LE, Xu A, Diamond FX. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States. *Journal of Forensic Sciences* 2012;57(5):1168-1180.
52. Uchiyama N, Kikura HR, Ogata J, Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International* 2010;198(1-3):31-38.
53. Öztürk YE, Yeter O, Öztürk S, Karakuş G, Ateş İ, Büyük Y, Yurdun T. Detection of metabolites of the new synthetic cannabinoid CUMYL-4CN-BINACA in authentic urine samples and human liver microsomes using high-resolution mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* 2018;10(3):449-459.
54. Castaneto MS, Wohlfarth A, Desrosiers NA, Hartman RL, Gorelick DA ve ark. Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in biological matrices. *Drug Metabolism Reviews* 2015;47(2):124-174.
55. Niessen WM. *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 3.baskı Leiden: CRC press, 2006.
56. National Measurement RSC Analytical Methods Committee. *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements*. 2013.

57. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 2013;37:452-474.
58. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011.
59. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation. 2013.
60. Matuszewski B, Constanzer M, Chavez CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC– MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003;75(13):3019-3030.
61. Minakata K, Yamagishi I, Nozawa H, Hasegawa K, Suzuki M, Gonmori K ve ark. Sensitive identification and quantitation of parent forms of six synthetic cannabinoids in urine samples of human cadavers by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology* 2017;35(2):275-283.
62. Tynon M, Homan J, Kacinko S, Ervin A, McMullin M, Logan BK. Rapid and sensitive Screening and confirmation of thirty-four aminocarbonyl/carboxamide (NACA) and arylindole synthetic cannabinoid drugs in human whole blood. *Drug Testing and Analysis* 2017;9(6):924-934.
63. Ambroziak K, Adamowicz, P. Simple Screening procedure for 72 synthetic cannabinoids in whole blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology* 2018;36(2):280-290.
64. Hess C, Murach J, Krueger L, Scharrenbroch L, Unge, M, Madea B, Sydow K. Simultaneous detection of 93 synthetic cannabinoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and retrospective application to real forensic samples. *Drug Testing and Analysis* 2017;9(5):721-733.

65. Peterson BL, Couper FJ. Concentrations of AB-CHMINACA and AB-PINACA and driving behavior in suspected impaired driving cases. *Journal of Analytical Toxicology* 2015;39(8):642-647.
66. Gundersen POM, Spigset OM. Screening, quantification, and confirmation of synthetic cannabinoid metabolites in urine by UHPLC-QTOF-MS. *Drug Testing and Analysis* 2018;11(1):51-67.
67. Yeter O. Çift yönlü katı-faz ekstraksiyonu ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi ile kan örneklerinde sentetik kannabinoidlerin tayini. *Journal of Forensic Medicine* 2017;31:3.

EKLER

Ek: Etik Kurul Onayı

Tarih ve Sayı: 09/11/2017-421500



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma
Betül ÇIĞMAN'ın etik kurul
kararı A-61

ADLI TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi :20.10.2017 tarih, 86669574-302.14.06-394657 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Münevver AÇIKKOL'un** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma Betül ÇIĞMAN'ın** yürütücülüğünde "**Kan ve İdrar Örneklerinde LC/MS/MS İLE AB-CHMINACA ve Metabolitlerinin Tayini**" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazımız ve ekleri **07 Kasım 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK
Başkan V.

e-İmzalı
Prof. Dr. Feray SAVRUN
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8RA0NFU>

Ayrıntılı bilgi için irübat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

A. Kişisel Bilgiler:

Adı-soyadı:

Fatma Betül ÇIĞMAN

Doğum tarihi:

Yabancı dil bilgisi:

Görev yeri:

E-posta adresi:

Telefon:

B. Eğitim Bilgileri:

C.

