

**JWH-122 VE JWH-122 N-(4-HİDROKSİPENTİL)
METABOLİTİNİN
LC-MS/MS İLE KANDA TAYİNİ**

Murat YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. NURİYE AKBAY

2017

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

JWH-122 VE JWH-122 N-(4-HİDROKSİPENTİL)
METABOLİTİNİN
LC-MS/MS İLE KANDA TAYİNİ

MURAT YILMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI: Doç. Dr. Nuriye AKBAY

TEKİRDAĞ-2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Doç. Dr. NURİYE AKBAY danışmanlığında, Murat YILMAZ tarafından hazırlanan “JWH-122 VE JWH-122 N-(4-HİDROKSİPENTİL) METABOLİTİNİN LC-MS/MS İLE KANDA TAYİNİ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı :

İmza :

Üye :

İmza :

Üye :

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JWH-122 VE JWH-122 N-(4-HİDROKSİPENTİL) METABOLİTİNİN LC-MS/MS İLE KANDA TAYİNİ

Murat YILMAZ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nuriye AKBAY

Kannabinoidlerin kullanımını kemoterapi tedavisi gören hastalarda istenmeyen yan etkilerin oluşumunu engellemek için laboratuvarında sentezlenmeleri ile başlamıştır. Son yıllarda uyuşturucu kullanımında sentetik kannabinoidlerin (SK) öne çıktığı görülmektedir. Sentetik kannabinoidler organik bir çözücü içerisinde çözülerek bitkisel örneklerin üzerine farklı derişimlerde püskürtülerek kullanılır. Her bir ambalaj içerisinde aynı derişimde olmadıkları takdirde sentetik kannabinoid kullanımı ölümlere sebep olabilmektedir. Sentetik kannabinoidlere özgü düzenlemelerin bulunmaması kullanımlarının günden güne artmasına neden olmaktadır. Artan tüketimleri ile birlikte dozaj ve içerik açısından yapılarının tam olarak bilinmemesi ciddi bir problem haline gelmektedir.

JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddelerinin sıvı-sıvı ekstraksiyonunu takiben LC-MS/MS analizi ile kanda tayini ve kantitasyonu amacıyla spesifik ve güvenilir bir metot geliştirilmiştir. Metodun doğrusallık (0.05 – 50 ng/mL), seçicilik, gün içi ve günlerarası kesinlik (< 10%), geri kazanım (% 70-80), teşhis sınırı (LOD) (0,041-0,061ng/mL), ve tayin alt sınırı (LOQ) (0,058-0,076ng/mL) parametreleri açısından validasyonu yapılmıştır. Ayrıca matriks, stabilite ve proses etkileri de incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil), LC-MS/MS, kan

2017, 40 Sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION of JWH-122, JWH-122 N-(4-hydroxypentyl) in BLOOD by LC-MS/MS

Murat YILMAZ

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Nuriye AKBAY

Usage of cannabinoids has been started by synthesis in laboratories to prevent the undesirable side effects of chemotherapy on patients. Synthetic cannabinoids (SC) are taking place on the frontline of drug use. Synthetic cannabinoids are used by spraying on vegetative samples in different concentrations after solvation in an organic solvent. Synthetic cannabinoids can cause death in case it has different concentrations in every package. The lack of specific regulations for cannabinoids provides an opportunity increase of usage day by day. Associated with increase consumption of cannabinoids, unclear knowledge of their dosage and content are becoming a serious problem.

A specific and reliable method has been developed for the detection and quantification of JWH-122, JWH-122 N-(4-hydroxypentyl) in blood using solid-phase extraction followed by LC–MS/MS analysis. The method has been validated in terms of linearity (0.05 – 50 ng/mL), selectivity, intra-assay and inter-assay precision (< 10%), recovery (% 70-80), limits of detection (LOD) (0,041-0,061ng/mL), and quantification (LOQ) (0,058-0,076ng/mL). Matrix effects, stability, and process efficiency were also assessed.

Key Words: JWH-122, JWH-122 N-(4-hydroxypentyl), LC-MS/MS, blood

2017, 40 Pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ ONAYI.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Sentetik Kannabinoidler	5
2.2. Farmakolojik Özellikleri.....	7
2.3. Toksikolojik Özellikleri	8
2.4. Yasal Kısıtlamalar.....	11
2.5. Analiz Yöntemleri.....	13
2.6. JWH 122.....	14
2.7. LC-MSMS Yöntemi.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Aletler ve Diğer Gereçler	19
3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	20
3.3. Çözeltiler.....	20
3.3.1. İç Standart (IS) çözeltileri.....	20
3.3.2. Standart Çözeltiler.....	20
3.3.3. Kalibrasyon Çözeltileri.....	21
3.3.4. Ekstraksiyonda Kullanılan Çözeltiler.....	21
3.3.5. Mobil Fazlar.....	21
3.4. Kan Örneklerin Hazırlanması.....	21
3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları.....	22
3.5.1. Sıvı Sistem Özellikleri.....	22
3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri.....	22
3.6. Validasyon Çalışmaları.....	23
3.6.1. Seçicilik Çalışmaları	23
3.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	23
3.6.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	24
3.6.4. Geri Kazanım	24
3.6.5. Kesinlik.....	25
3.6.6. Kararlılık.....	25
3.6.7. İstatistiksel Analiz.....	25

4. BULGULAR	26
4.1. Metot Validasyonu	26
4.1.1. Seçicilik.....	26
4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	27
4.1.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı LOQ).....	29
4.1.4. Geri Kazanım	31
4.1.5. Kesinlik	32
4.1.6. Kararlılık	32
5. TARTIŞMA.....	33
6. KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	40

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ile ilgili yapılan çalışmalar materyal numune hazırlama yöntemleri, analiz yöntemleri.....	13
Tablo 3.1:	LC-MS/MS sıvı sistemi akış özellikleri	21
Tablo 3.2:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve JWH 018-D9 infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsor İyon, CE (Parçalanma Enerjisi), Fragmentor Voltaj (Parçalanma Voltajı) ve Alıkonma zamanı değerleri.....	22
Tablo 4.1:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) için kanda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve belirleme katsayıları.....	28
Tablo 4.2:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) maddeleri için kanda elde edilen LOD (ng/mL) ve LOQ (ng/mL) değerleri (n=10).....	30
Tablo 4.3:	Kanda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).....	30
Tablo 4.4:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kanda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=10).....	31
Tablo 4.5:	JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kanda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri (n=10).....	31

ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Farklı alkil gruplarına farklı maddelerin gelmesi ile oluşan sentetik kannabinoid çeşitliliği.....	6
Şekil 2.2 : Farklı isim ve ambalalardaki sentetik kannabinoidler.....	7
Şekil 2.3 : 27845 sayılı ve 13.02.2011 tarihli resmi gazete.....	11
Şekil 2.4 : (a) JWH-122 (Naftalen-1-il-(1-bütülinol-3-il)metanon), (b)JWH-122 N-(4-Hidroksipentil), (c)JWH -122 N-(5-Hidroksipentil), (d)JWH 018-D9 kimyasal yapıları	14
Şekil 2.5 : JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve JWH-122 N-(5-hidroksipentil)' in kromatogramları.....	15
Şekil 2.6 : Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC-MS/MS	17
Şekil 4.1 : A) JWH-122 (Boş Kanda) B) JWH 122 N-4-hidroksipentil (Boş Kanda).....	25
Şekil 4.2 : C) JWH-122 (0.5ng/mL) D) JWH 122 N-(4-hidroksipentil) (0.5ng/ml).....	26
Şekil 4.3 : Kanda (A)JWH-122 JWH ve (B)122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kalibrasyon eğrileri	27
Şekil 4.4 : Katım yapılmış kan örneğinde (A)JWH-122 ve (B)JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) ve (C) JWH 018-D9 (D) için S/N değerleri (0.1ng/ml).....	29

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{g/mL}$	Milyonda Bir Birim
EMCDDA	Avrupa Suistimal edilen madde Ve Suistimal edilen madde Bağımlılığı İzleme Merkezi
ESI	Elektro Sprey İyonizasyon
EWS	Erken Uyarı Sistemi
gr	Gram
IS	İç Standart
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi
LOD	Teşhis Sınırı
LQD	Tayin Alt Sınırı
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
MRM	Çoklu Reaksiyon Görüntüleme
MS	Kütle Spektrometresi
MW	Moleküler Ağırlık
m/z	Kütle/yük
ng/mL	Milyarda Bir Birim
RF	Radyo Frekans
rpm	Dakikada Katedilen Dairesel Aç
RSD	Bağıl Standart Sapma
THC	Tetrahidrokannabinol
UPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
μl	Mikrolitre

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Nuriye AKBAY' a, Adli Tıp Kurumu Başkanı Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK' e desteğini esirgemeyen ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Haziran 2017

Murat YILMAZ
Kimyager

1.GİRİŞ

Anavatamı Orta Asya olan kenevir geniş kullanım alanı ile dikkat çeken bir bitki türüdür. Kenevirin saplarındaki liflerden üretilen iplik dokuma ve kumaş yapımında kullanılmaktadır. Liflerinin uzun ve dayanıklı olması nedeni ile elde edilen iplik özellikle halat ve ağ yapımında tercih edilmektedir. Tıp ve kozmetik alanında yapraklarından faydalanılan bitkinin tohumunun yağlı olması yakıt olarak kullanımına da olanak sağlamaktadır. Bunların yanısıra tohumlarından boya ve sabun yapımında faydalanılırken bitkisel hammadde olan hamurlu kısmı ise kâğıt yapımında kullanılabilir. Selüloz bakımından zengin bir odunsu bitki olan kenevirin bir dönümünden elde edilen kâğıt hamuru 4 dönüm ağaca denk gelmektedir.

İlk olarak 1930'larda ABD'de çıkarılan "Marihuana Vergi Yasası" ile yetiştirilmesine kısıtlamalar getirilen kenevir zamanla tüm dünyada yasaklanmıştır. Kenevir üretiminin yasaklanmasında öncülük eden grupların petrol ve ilaç endüstrisiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Dişi kenevirin goncalı üst kısımlarında yüksek oranda bulunan ve yaygın adı esrar olan tetra-hidro-kanabinol (THC) maddesi bu bitkinin yasaklanma nedeni olarak gösterilmektedir. Buna karşın Hollanda'da kullanımı ve yetiştirilmesinin serbest olduğu bilinmektedir.

Kenevir bitkisinin "*Cannabis sativa/Cannabis indica/Cannabis ruderalis*" çiçeklerinden ve tohumlarından elde edilen esrar, bitkinin kullanıldığında insana keyif ve sarhoşluk hissi veren kısımlarıdır. Eldesi ise kenevir bitkisinin "*Cannabis sativa/Cannabis indica*" türlerinin dişi eşeyli bitkilerinin sömek adı verilen tohumlarının işlenmesi ile gerçekleştirilir. Esrarda en fazla bulunan ve esrarın farmakolojik etkilerinden sorumlu olan etkin ana madde Δ^9 -Tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC)'dür. İşleme esnasında dişi kenevir bitkisinin THC içeren kısımları gölgede kurutularak ezilir. Ezilen bitkinin elenmesi ile ince toz halindeki kısım ayrılır. Bu eleme sonucu elde edilen ince toz halindeki madde "toz esrar" olarak adlandırılır. Bu tozun ısıtılıp kalıp haline getirilmesi ile elde edilen plaka şeklindeki haline de "takoz esrar" adı verilir. En ince toz elekten geçirilince altta kalan esrar birinci kalite esrardır. Bu esrara kubar olarak adlandırılır. Günümüzde üreticilerin kendilerine özel ürettikleri esrar dışında piyasada tek kalite esrar bulunmaktadır. Bunun nedeni eleme işleminde zaman kazanmak için tek elek tipi kullanılmasıdır.

Dünya genelinde esrar farklı isimlerle karşımıza çıkmaktadır. Kuzey Amerika'da esrar yerine Meksika'dan gelmiş olması nedeni ile İspanyolca bir kelime olan marihuana kullanılır. Jamaika'da *ganja*, Fransa'da ise *gannavuri* olarak bilinir. Ülkemizde ise ot, cigaralık, derman, tek/çift kâğıtlı, gogo, üçlü gibi adlar kullanılır. Ancak bu tanımlamaların bazıları esasında kenevirin tercümesidir. Bu yüzden kenevir ve esrar dilimizde hep birbirine karıştırılır (Gundersen 2012).

Esrar, ağız yoluyla veya sigara içinde inhalasyonla alınır. Ağız yolundan alındığında etkisi 3-4 saatte belirginleşirken, inhalasyon yoluyla etkisi hemen başlar. Esrarın etkin maddesi olan THC lipofilik bir maddedir ve karaciğerde önemli ölçüde metabolize edilir. Yağ dokusunda birikim özelliğine sahip olan maddenin eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 30 saatdir. Karaciğerde aktif metaboliti olan 11-Hidroksi-THC'ye ve bazı inaktif metabolitlere dönüşür. Metabolitler vücuttan idrarla ve biraz da safra ile atılır (Uzay 2006).

Esrar kullanımına bağlı açlık, ağız kuruluğu, gözlerde kızarma kan basıncının artması ve alınan miktara bağlı olarak çarpıntı sık görülen etkilerdir. Bazı kullanıcılarda dikkat ve tepkilerde yavaşlamaya sebep olurken bazılarında ise bunun aksine kaygı, yoğun korku hissi, sıkıntı veya panik ataklara yol açabilir. Esrarın kronik kullanımında erkeklerde testosteron düzeyi ve sperm sayısında azalma, kadınlarda kısırlık ve yeni doğan bebeğin düşük doğum ağırlığına sahip olması gözlenen etkilerdendir.

Esrarın kişi üzerine etkisi birçok değişkene bağlıdır. Bunlardan bazıları içilecek esrarın gücü, içecek olanın esrardan beklentisinin ne olduğu, beraber alınan alkol ya da başka maddenin varlığı ve kullanıcının esrarı alış şeklidir. Esrarın huzursuzluk, uykusuzluk ve tahammülsüzlük gibi psikolojik ve fizyolojik yoksunluk belirtileri vardır. Bunların yanısıra taşikardi, hipertansiyon, göz içi basıncında azalma, dış uyaranları algılamada güçlükler, hafıza kaybı ve zaman algısının kaybolması gibi etkileri de bilinmektedir (Vural 2002).

Kenevir içerisindeki THC ilk olarak 1964 yılında Raphael Mechoulam ve arkadaşları tarafından bitkiden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Castaneto vd. 2014). 1980'li yıllarda kannabinoid reseptörlerinin keşfi ise terapötik amaçla kullanımının araştırılması gündeme gelmiştir. Analjezik ve antiinflamatuvar gibi etkileri olan ve esrarın yan etkilerine sahip olmayan kannabinoid reseptör agonistlerinin üretimleri

için çalışmalar yapılmıştır (Lindsay vd. 2012). Kannabinoidlerin sentezi kemoterapi tedavisindeki kusma ve aşırı kilo kaybı gibi yan etkileri azaltmak üzere tasarlanan maddelerin araştırılması sırasında gerçekleştirilmiştir. Uzun yıllar kötüye kullanımları düşük seviyede olsada bu keşif son yıllarda büyük artış gösteren yeni psikoaktif madde üretiminin temeli sayılabilir. Literatürde 1997 yılından bu yana 200'den fazla yeni psikoaktif madde tanımlanmıştır. 1990'lı yıllarda tanımlana JWH maddeleri olarak bilinen naftoilindoller, naftoilpiroller ve kannabinoid reseptör aktivitesine sahip maddeler sentetik kannabinoidlerin (SK) temel bileşni haline gelmiştir. Piyasada yasal kafa yapıcılar olarak karşımıza çıkan SK'ler son yılların krizi haline gelmiştir. Klasik kannabinoidler THC'nin dibenzofuran yapısının kırılmasıyla sentezlenmiştir (Young vd. 2012). Endokannabinoid esrara benzer olarak CB1 ve CB2 reseptörlerinin üzerinde de etki göstermektedir (Znalezona vd. 2015). Maddeler kimyasal yapıları esrara benzerlik gösremesede farmakolojik etkileri esrara benzerdir (Wiebelhaus vd. 2012).

2004 yılında ilk olarak "K2" ve "spice" isimleriyle ilk sentetik kannabinoid içeren bitkisel ürünler piyasaya sürülmüştür (Vardakou vd. 2010). İnternet üzerinden satışları yapılan bu maddeler "legal high" ya da "herbal incense" isimleri ile piyasada satılmışlardır (Fantegrossi vd. 2014) Her ne kadar satışı yapılan ürünlerin üzerlerinde "insan tüketimi için değildir" ibaresi bulunsada kulaktan kulağa yayılarak tüketimi artmıştır. Ambalajların üzerine içeriklerinin yazılması zorunlu olmadığından yasal denetimleri kandırmak kolay olmuştur. Üzerlerinde farklı kelimeler kullanılarak satışının yapılması da kullanan kişilerde "zararsız" izlenimi yaratmaktadır. Sentetik kannabinoidler organik solventler ile çözüldürüldükten sonra bitkisel karışımın üzerine spreylenebilir ve kurutulularak ambalajlanır. Bu işlemler merdiven altı olarak tabir edilen yerlerde yapıldığında spreyleme işleminin sonucunda değişik derişimlerde ürünler ortaya çıkmaktadır. Spreylenen maddenin derişimlerinin farklı olmasından dolayı, aynı isimli ürünün farklı yan etkilerinin olabileceği hatta ölümle sonuçlanacak toksik etkilerin ortaya çıkabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Üretimlerinin ve eldelerinin oldukça kolay ve ucuz olması sentetik kannabinoidleri uyuşturucu kullanmaya eğilimli genç ve ergenler arasında cazip hale getirmektedir.

Kalp ve merkezi sinir sistemi üzerindeki toksik etkileri belirlenen bu madderi kullanan kişilerin hastaneye başvuruları ve ölümleri gün geçtikçe hızlı bir şekilde artış göstermektedir (Seely vd. 2012). Amerikan Zehir Kontrolü Derneği'ne (AAPCC)

sentetik kannabinoid zehirlenmesi sebebi ile 2009 yılında 53 başvuru yapılmışken, sentetik kannabinoid zehirlenmesi sebebi ile 2011 yılında 1300 başvuru yapılmıştır (Fattore vd. 2011). ABD' de acil servislere sentetik kannabinoid kullanımı ile alakalı başvurularda çocuk ve gençler çoğunluktadır. 2010 yılında madde kullanımına bağlı başvuruların dörtte üçünü 12-19 yaş arasındaki çocuklar oluşturmaktadır (Anonim 2015a)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Kannabinoidler

Sentetik kannabinoidler genel olarak, Avrupa’da “Spice”, ABD’de “K2”, Türkiye’de ise “Bonzai” ya da “Jamaika” olarak adlandırılırlar. Tipik olarak, otsu bitkilerin oluşturduğu karışımın üzerine püskürtülmek sureti ile oluşan ve bir kaç farklı SK’i içeren ve daha sonra bunları kullananlar tarafından kannabise benzer biçimde içilen “bitkisel sigara karışımlarıdır” (Vardaku vd. 2010 ve Auwarter vd. 2009). Bunlar Avrupa, ABD ve Japonya’da internet üzerinden temin edilerek çok yaygın olarak kullanılmaktadır. “Spice” tipi sentetik kannabinoidlerin ambalajlarının üzerinde “bitki karışımları” ve “insan tüketimi için değildir” şeklinde bir ibareler bulunmakta ve tütsü ya da bitki büyüme düzenleyicisi gibi farklı amaçlar için üretilmiş gibi pazarlanmaktadır. Bu karışımların tamamen bitkisel olduğu söylenece de SK reseptör agonistleriyle karıştırıldıkları için tüketilmelerinden sonra güçlü bir kanabimimetik etki göstermektedirler (Auwarter vd. 2009). Miktar ve içerik açısından yapıları tam olarak bilinmeyen bu maddelerin yaygın kullanımı ve bu maddelere özgü düzenlemelerin bulunmaması kötüye kullanılan tasarım maddeler olarak SK’lerin tüketimini büyük oranda arttırmaktadır. Bu durum kamu sağlığı kurumları için günden güne daha ciddi bir problem haline gelmektedir (Merola vd. 2012)

Sentetik kannabinoidler birbirilerine benzer kimyasal yapıları olan maddelerdir. İnsan hücrelerinde bulunan CB1 veya CB2 olarak bilinen kannabinoid reseptörlerine bağlanabilen yapısal özelliğe sahiptirler. CB1 reseptörü çoğunlukla beyin ve omurilikte yer alır. Kannabisin karakteristik, fizyolojik ve özellikle psikotropik etkilerinden sorumludur. CB2 reseptörü daha çok dalakta ve immun sistem hücrelerinde yer alır. İmmun düzenleyici etkilere aracılık eder. Sentetik kannabinoidler fonksiyonel olarak kannabisteki ana aktif maddeye benzerdir ve sigara gibi içildiğinde marihuananın etkisini taklit eder. Bu maddeler kannabinoid reseptör agonistlerine daha fazla eğilimlidir ve son 40 yıldır ağrıyı dindirme amaçlı terapötik ajanlar olarak geliştirilmişlerdir. Bazı sentetik kannabinoidler CB1 ve CB2 reseptörlerine THC’den daha yüksek veya eş afinite gösterirler. Ancak bu ilaçların psikoaktif etkilerinden selektif terapötik özelliklerini izole etmek çok zordur. Ayrıca bu ilaçların kannabislerden

daha potent olduğu bulunmuştur (Seely vd. 2011).

Sentetik kannabinoidler moleküllerin kimyasal yapılarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (Gluodenis, 2011, Penn vd. 2011).

Klasik sentetik kannabinoidler: THC, kannabisin diğeri bileşenleri ve onlarla yapısal olarak ilişkili sentetik analogları HU-210, AM-906, AM-411 ve O-1184

Klasik olmayan sentetik kannabinoidler: Siklokekzilfenol veya CP-47,497-C8; CP-55,940; CP-55,244 gibi 3-arilsikloheksanoller

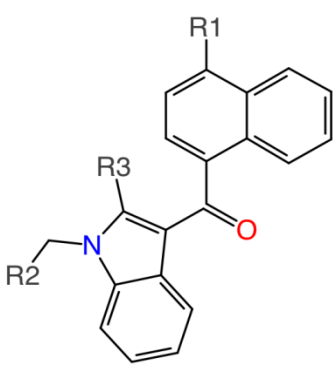
Hibrid kannabinoidler: Klasik olan veya olmayan kannabinoidlerin yapısal özelliklerinin kombinasyonları AM-4030

Aminoalkilindoller (AAIs): Naftoyilindollere bölünenler (JWH-018, JWH-073, JWH-398, JWH-015, JWH-122, JWH-210, JWH-081, JWH-200, WIN-55,212); fenilasetilindoller (JWH-250, JWH-251); naftilmetilindoller ve benzoilindoller (pravadoline, AM-694, RSC-4)

Endokannabinoidler: Anandamide ve onların sentetik analogları gibi endokannabinoidler (methanandamide)

Diğeri: Diarilpirazoller (selektif CB1 anta-gonisti Rimonabant), naftoilpiroller (JWH-307), naftilmetilindenler veya naphthalene-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl) methanone (CRA-13), indazol karboksamid (APINICA)

Yeni nesil sentetik kannabinoidlerin genel yapısı Şekil 2.1'de görülmektedir. Yeni maddelerin sentezinde farklı alkil gruplarının yapıya girmesi yeterli olduğundan üretimleri çok kolay hale gelmektedir.

	Maddenin Adı	R1	R2	R3
		AM-1220	H	1-metil-2-piperidin
	AM-2201	H	4-florobutil	H
	JWH-015	H	C2H5	CH3
	JWH-018	H	C4H9	H
	JWH-073	H	C3H7	H
	JWH-081	CH3O	C4H9	H
	JWH-122	CH3	C4H9	H
	JWH-210	H	C2H5	H
	JWH-398	Cl	C4H9	H

Şekil 0.1 Farklı alkil gruplarının yapıya girmesi ile oluşan sentetik kannabinoid çeşitliliği.

Hem sentetik kannabinoidler hem de Δ 9-THC esas olarak CB1 ve CB2 reseptörleri üzerine etki etse de kimyasal ve farmakolojik olarak farklıdır. Δ 9-THC'ün kısmi agonist plato etkisi vardır ve kullanılan madde artışı etkide fark yaratmaz. SK'ler beyinde ve diğer periferik organlarda Δ 9-THC ile aynı kannabinoid reseptörlere bağlanırlar. Beyindeki etkilerini bunlar da CB1 reseptörleri aracılığı ile yaparlar. SK'ler tam agonisttir. Reseptörlere yüksek potens ve afinite gösterirler. Bu nedenle dozda artış plato etkisi olmadan etkide artışa neden olur. SK'in psikoaktif etkileri THC'e benzemesine karşın, doğada var olan kannabinoidlere göre etkileri çok daha güçlüdür (Gluodenis 2011).

SK'lerin CB1 reseptörlerine olan afinitesi JWH-200'de olduğu gibi Δ 9-THC'e benzer olabilirken (Huffman 2003), JWH-210'da olduğu gibi Δ 9-THC'nin etkisinden 90 kat daha yüksek de olabilir (Huffman vd. 2005).



Şekil 0.2 Farklı isim ve ambalalardaki sentetik kannabinoidler

2.2. Farmakolojik Özellikleri

Doğal kannabiste santral sinir sistemine etki eden esas psikoaktif bileşen $\Delta 9$ -THC'dür. Farmakolojik etkileri hafıza bozuklukları, halüsinasyonlar, bilişsel bozukluk ve uyku bozuklukları olarak ortaya çıkmaktadır. Bu farmakolojik etkilerin insan ve farelerde aynı şekilde kannabinoid reseptörler aracılığı ile oluştuğu bulunmuştur. CB1 ve CB2 olmak üzere tanımlanan iki kannabinoid reseptörü bulunmaktadır. CB1 ve CB2 G proteinine bağlı reseptörlerdir. CB1 reseptörleri, G proteinine bağlı reseptörler arasında beyinde en çok bulunanlar arasındadır (Hajos ve Freund 2002). $\Delta 9$ -THC beyinde etkilerini CB1 reseptör aracılığıyla göstermektedir (Tomiya ve Funada 2011). CB1 reseptörleri kannabinoidlerin duygudurum yükselmesi, panik reaksiyonları ve anksiyete gibi psikoaktif etkilerinin oluşumundan sorumludur. Bu etkiler sonucu görsel ve işitsel algıda azalma, motor fonksiyonda azalma, bellekte ve zaman algısında bozulma gözlenmektedir (Pertwee vd. 1999, Ashton vd. 2008, Wintermeyer vd. 2010). CB2 reseptörleri, CB1 reseptörlerinin oluşturduğu psikoaktif etkiyi yaratmadan inflamasyon ağrısını azaltabilme olasılıkları sebebi ile araştırmaların odak noktası olmuştur. Kannabinoid reseptör agonistlerinin meme kanseri metastazına ve tümör büyümesine (Qamri vd. 2009) etkilerine ek olarak insan PC-3 prostat kanseri hücrelerinin büyümesine etki ettiği de öne sürülmüştür (Olea-Herrero 2009). Kannabinoid reseptörlerine $\Delta 9$ -THC'nin 3 noktalı bağlanması ile açıklanmaktadır. Üç

anahtar bölge naftelen halkası, karbonil grubu ve indol içeriğindeki N-alkil kısmıdır (Aung vd. 2000). Ayrıca, naftelenin yerine metil-, metoksi-, floro-, kloro- ya da bromo- içeren grubun geçmesinin, parçanın aromatik halkadaki yerine ve özelliğine bağlı olarak, CB1 reseptörlerine affinitenin artmasına yol açacağı öne sürülmüştür (Huffman vd. 2005). SK'lerin CB1 reseptörlerine olan afinitesi JWH-200'de olduğu gibi Δ^9 -THC'ninkine benzer olabilirken (Huffman vd. 2003), JWH-210'da olduğu gibi Δ^9 -THC'nin etkisinden 90 kat daha yüksek de olabilir (Huffman vd. 2005). SK'lerin içildikten hemen sonra akciğerlerden absorbe edilmeleri ve kısa sürede beyin gibi diğer organlara dağılımının gerçekleşmesi nedeni ile SK'lerin etkinliği genelde bir kaç dakika içinde başlar (Anonim 2013). Ancak ağız yolu ile kullanım sonrasında, kullanan kişinin gıda alımına, sindirim aktivitesine ve ilk geçiş etkisindeki değişikliklere bağlı olarak etkinin oluşumunda ve başlamasında bir gecikme olabilir (Anonim 2013).

2.3. Toksikolojik Özellikleri

Sentetik kannabinoidler genellikle sigara gibi içilerek kullanılmaktadır. Bütün sentetik kannabinoidler 20-26 karbon atomu içeren, yağda çözünme özelliği olan apolar yapılarıdır. Bu özellikleri nedeni ile sigara gibi içildiklerinde kolayca buharlaşır (Zewilska 2015). Farmakolojik etkilerini hızlı bir şekilde gösterdiklerinden kullanıcılar tarafından bu yol tercih edilir. Ekonomiktir ve literatürde çok az toksikolojik bilgi vardır. Etkileri kullanımından itibaren saatlerce hatta günlerce sürebilir. Davranış bozukluklarına sebep oldukları bilinmektedir. Sadece 0,3 gram alımı dahi 10 dakika içerisinde idrak ile ilgili bozuklukların oluşumuna ve sonrasında algı-durum değişimlerinin meydana gelmesine sebep olabilmektedir. Alımından 2-6 saat sonra çoğu etkisi kaybolmaktadır. Kaydedilen en yaygın akut yan etkiler paranoya, halüsinasyon, sedasyon, psikoz, ağız kuruluğu, örten konjunktival damarların genişlemesi ve iştahta artıştır. Taşikardi, hipertansiyon, nadir olarak da aritmi ve miyokard enfarktüsü kardiyovasküler bulgulardır. Diğer yan etkileri; bulantı, kusma ve akut böbrek hasarıdır. İnternet forumlarında oral yolla tüketim bildirimleri mevcuttur. Yüksek derecede lipofilik olan bu maddelerin suda çözünürlükleri düşük olduğundan bitki çayı olarak kullanımına sık rastlanmaz. Parenteral yolla uygulama şu ana kadar insanlarda kaydedilmemiştir. Sentetik kannabinoidlerin uzun dönem etkileri ile ilgili çalışmalar henüz literatürde bulunmamaktadır (Johnson vd. 2011, Weaver vd. 2015).

Sentetik kannabinoid alımı ile ilişkili tespit edilerek kayda geçen bazı ölüm olayları şunlardır;

59 yaşında bir erkek evde ölümünden sonra femoral kanda yapılan analizde (1,24 µg/l) MAM-2201 tespit edilmiştir (Saito vd. 2013). İsviçre’de 17 yaşında bir erkek sokakta yalnız ölü bulunmuş ve arkadaşı ölmeden önce iki nefes ot çektiğini, ellerinde uyuşma hissettiğini ve başının döndüğünü söylemiştir. Ölen kişinin postmortem femoral kanında (12,3 µg/l) JWH-210 bulunmuştur. Bir diğer vaka olan 26 yaşındaki erkekte ‘methoxe-tamin’ ile birlikte üç sentetik kannabinoid tespit edilmiştir. “Ölüm yüksek dozda ‘methoxetamin’e dayandırılmasına rağmen, tespit edilen AM-694, AM-2201, JWH-018 ölüme katkı sağlamış olabilir.” denmiştir (Castaneto vd. 2014). Yirmi üç yaşında bir erkek AM2201 içtikten sonra şiddetli psikoza girmiş ve ölmüştür. Yapılan toksikolojik analizde postmortem femoral kanında (12µg/l) AM-2201 tespit edilmiştir (Patton vd. 2013). Kaydedilen diğer bir ölüm vakasında, 34 yaşındaki bir erkekte yapılan otopside rutin sistematik toksikolojik analiz için kan ve diğer biyolojik örnekler alınmıştır ve 5F-AMP pozitif bulunmuştur (Shanks ve Behonick 2016).

Bu vakalarda kaydedilen sentetik kannabinoidlerin kandaki konsantrasyonları 1,2-12,3 µg/l’dir. Tespit edilemeyen sentetik kannabioidler veya diğer uyuşturucu maddeler, uygulanma şekli ve dozu, sentetik kannabinoid metabolizmasındaki kişisel farklılıklar ölümü etkileyebilen diğer faktörlerdir (Castaneto vd. 2014).

2.4. Yasal Kısıtlamalar ve Kullanım Sıklığı

SK içerdiği belirtilmeyen bitkisel karışımlar, içeriklerinin doğal olması nedeniyle yasal olarak “head shop” ve “smart shop” denilen yerlerde satılabilmektedir. İnternette popüler hale gelmeleri, uluslararası pazara yayılmalarını sağlamıştır. Ancak çoğu zaman yasal mevzuat, kaynak şirketin ülkesine ve dağıtım noktasına göre değişkenlik göstermektedir (Gregori vd. 2012). 1961 yılında "Uyuşturucu Maddelere Dair Birleşmiş Milletler Tek Sözleşmesi - Single Convention on Narcotic Drugs" ve 1971 yılında "Birleşmiş Milletler Psicotrop Maddeler Sözleşmesi - Convention on Psychotropic Substances" sözleşmeleri hazırlanmış fakat ne "Spice" ve benzeri maddelerdeki sözde bitkisel içerikler, ne de bu maddelerdeki SK’ler bu uluslararası uyuşturucu kontrol sözleşmeleri ile kontrol altına alınmıştır. Son dönemlerde sağlıkla ilgili potansiyel kaygılara cevap olarak Avusturya, Almanya, Fransa, Lüksemburg,

Polonya, Litvanya, İsveç ve Estonya “Spice” ve ilgili maddelerin yasaklanması ya da kontrolü için yasal önlemler almışlardır (Anonim 2013). Amerika Birleşik Devletleri Uyuşturucu ile Mücadele Dairesi (DEA), 2010 yılında SK’lerin “Schedule I” olarak belirlenmesinin aciliyetini bildirmesine rağmen, bugüne kadar sadece bazı eyaletler kanabimimetikleri kontrol altına almıştır. Bu nedenle, burada maddelerin içeriğinde çok fazla değişiklik görülmemektedir (Gronewold ve Skopp 2011). Türkiye’de, Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) koordinasyonunda çalışan Erken Uyarı Sistemi (EWS) bazı SK’lerin bildirimini yapmış ve 2011’den bu yana "Uyuşturucu Maddelerin Denetlenmesi Hakkında Kanun"a tâbi hale gelmişlerdir (Anonim 2011a).

JWH-122 ve bir grup sentetik kannabinoidler 07.01.2011 tarih, 1310 sayılı Bakanlar Kurulu kararı ile üretilmesi, ticaretinin yasaklanması, bulundurulması ve kullanılması yasak olan suistimal edilen madde ve uyarıcı maddeler listesine alınarak, 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazetede yayınlanmıştır (Anonim 2012). İlgili karar Şekil 2.3’de görülmektedir. Adli Tıp Kurumu ve Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan bir öneriye istinaden yeni nesil sentetik kannabinoid maddelerin ve bu maddelerden üretilen tüm türevlerinin isim anılmaksızın 2015 yılında yasa kapsamına alınması sağlanmıştır (Anonim 2015b).

BAKANLAR KURULU KARARI

Karar Sayısı : 2011/1310

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

Abdullah GÜL
CUMHURBAŞKANI

Recep Tayyip ERDOĞAN
Başbakan

C. ÇİÇEK
Devlet Bak. ve Başb. Yrd.

B. ARINÇ
Devlet Bak. ve Başb. Yrd.

A. BABACAN
Devlet Bak. ve Başb. Yrd.

M. AYDIN
Devlet Bakanı

H. YAZICI
Devlet Bakanı

F. N. ÖZAK
Devlet Bakanı

M. Z. ÇAĞLAYAN
Devlet Bakanı

F. ÇELİK
Devlet Bakanı

E. BAĞIŞ
Devlet Bakanı

S. A. KAVAF
Devlet Bakanı

C. YILMAZ
Devlet Bakanı

S. ERGİN
Adalet Bakanı

M. V. GÖNÜL
Millî Savunma Bakanı

B. ATALAY
İçişleri Bakanı

A. DAVUTOĞLU
Dışişleri Bakanı

M. ŞİMŞEK
Maliye Bakanı

N. ÇUBUKÇU
Millî Eğitim Bakanı

M. DEMİR
Bayındırlık ve İskân Bakanı

R. AKDAĞ
Sağlık Bakanı

B. YILDIRIM
Ulaştırma Bakanı

M. M. EKER
Tarım ve Köyşleri Bakanı

Ö. DİNÇER
Çalışma ve Sos. Güv. Bakanı

N. ERGÜN
Sanayi ve Ticaret Bakanı

T. YILDIZ
Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanı

E. GÜNAY
Kültür ve Turizm Bakanı

V. EROĞLU
Çevre ve Orman Bakanı

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

LİSTE

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

Şekil 0.3. 27845 sayılı ve 13.02.2011 tarihli resmi gazete (Anonim 2015b).

2.5. Analiz yöntemleri

Yeni sentetik maddelerin hızlı bir şekilde ortaya çıkışı bu maddelerin tümünü kapsayan genel bir analiz metodunun oluşmasını zorlaştırmaktadır. Sentetik kannabinoid taşıyıcısı olarak kullanılan bitkisel materyallerin yumuşak ve hafif olmaları bitkinin homojen hale gelmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle analize bitkisel ürünün homojenizasyonu ile başlanır. Sentetik kannabinoidleri tanımlamada ve biyoanalitik yöntemlerini geliştirmede karşılaşılan başlıca zorluklardan bir diğeri de referans materyal eksikliğidir. Saf referans materyalin sınırlı olmasından dolayı bu maddelerin tanımlanması ve kantitatif analizinin yapılması oldukça güçtür. Metabolik standartların eksikliği klinik ve adli laboratuvarlarda standardize edilmiş yöntemlerin gelişmesini engellemiştir. Bitki ürünlerindeki psikoaktif madde içeriğinin düşük olması ve gizlenen katkıların varlığı (yağ asitlerinin amitleri veya gliserin gibi) yüzünden hızlı bir sonuç almak zorlaşmaktadır. Tanımlamada kütle spektrometresi ile eşleşmiş gaz kromatografisi veya sıvı kromatografisi gibi kompleks teknikler tercih edilmektedir (Anonim 2011b).

SK ile ilgili ilk çalışmalar ambalaj ile satılan SK'lerin bitkisel içeriğinin tespiti yönündedir. Bu çalışmalarda GC/MS, NMR, LC-MS, LC-MS/MS ve TOF sistemleri maddelerin yapısı, miktarı ve isimlendirilmesi için kullanılmıştır.

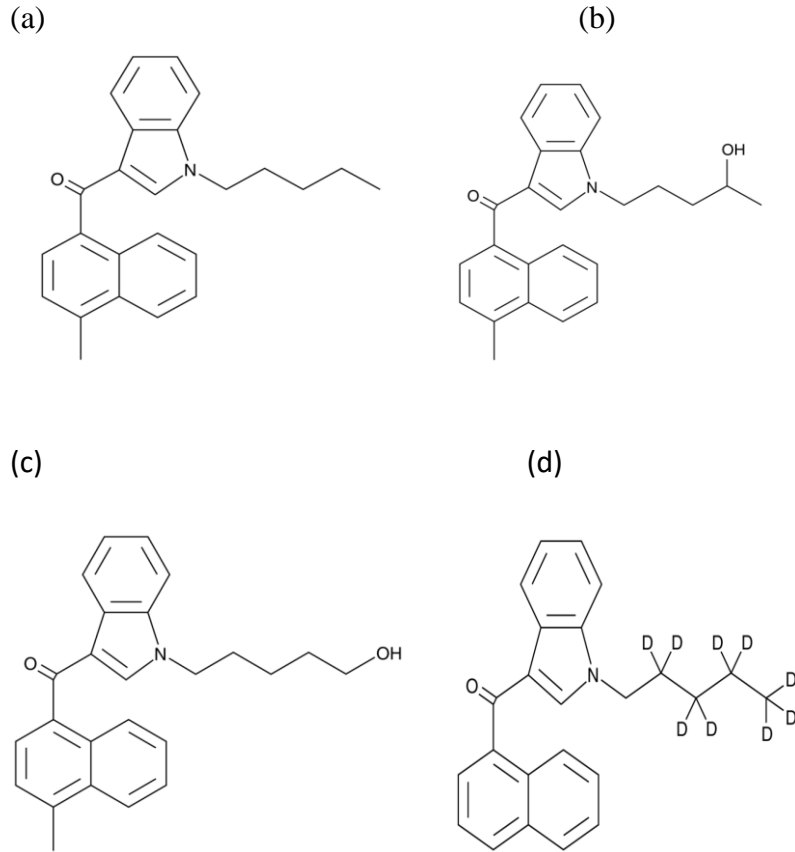
JWH-122 ve benzeri diğer ürünlerin bitkisel karışımlar içerisinde tayinlerinden sonra metabolizmaları ve metabolitlerinin tayini ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Son olarak maddelerin ve metabolitlerinin biyolojik örneklerde izlenmesi ve raporlanması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Kanda yarılanma ömürlerinin kısa olması ve konsantrasyonların "ng/mL" seviyesinde olması nedeniyle maddelerin ve metabolitlerinin izlenmeleri ancak LC-MS/MS ile mümkün olmaktadır. Tablo 2-1'de JWH-122 maddesi tayini için yapılan çalışmalarda materyal, numune hazırlama yöntemi ve analiz yöntemi özetlenmiştir.

Tablo 2.1 JWH-122 ile ilgili yapılan çalışmalar tabloda (materyal, numune hazırlama yöntemleri, analiz yöntemleri ve kaynakları) olarak gösterilmiştir.

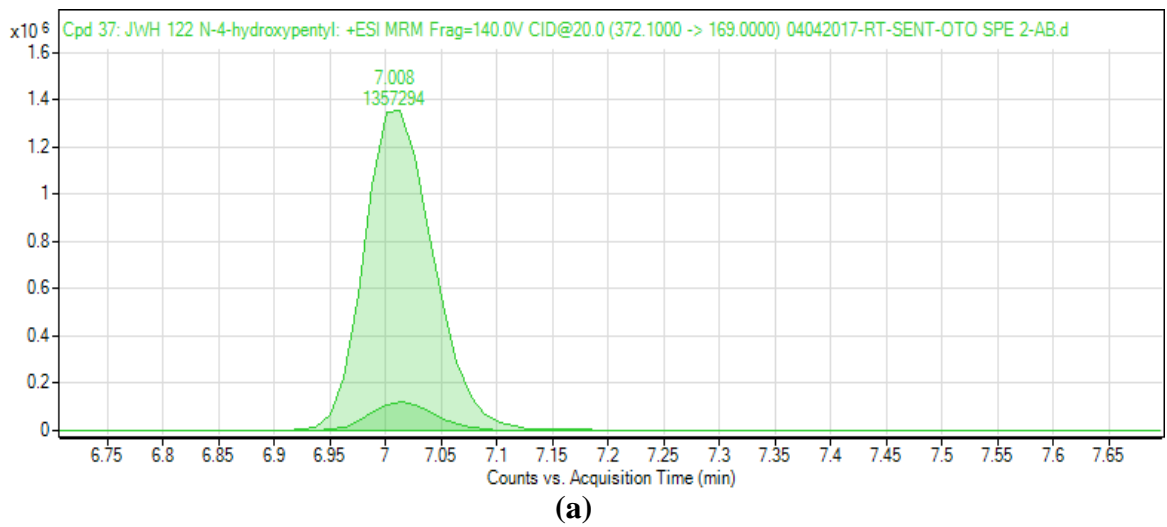
No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Kaynak
1	JWH-122	Serum	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LS-MS/MS	Dziadosz 2013
2	JWH-122	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	Yanes ve Lovett 2012
3	JWH-122	Saç	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	Hutter 2012
4	JWH-122	Tükürük	Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	De Castro 2013

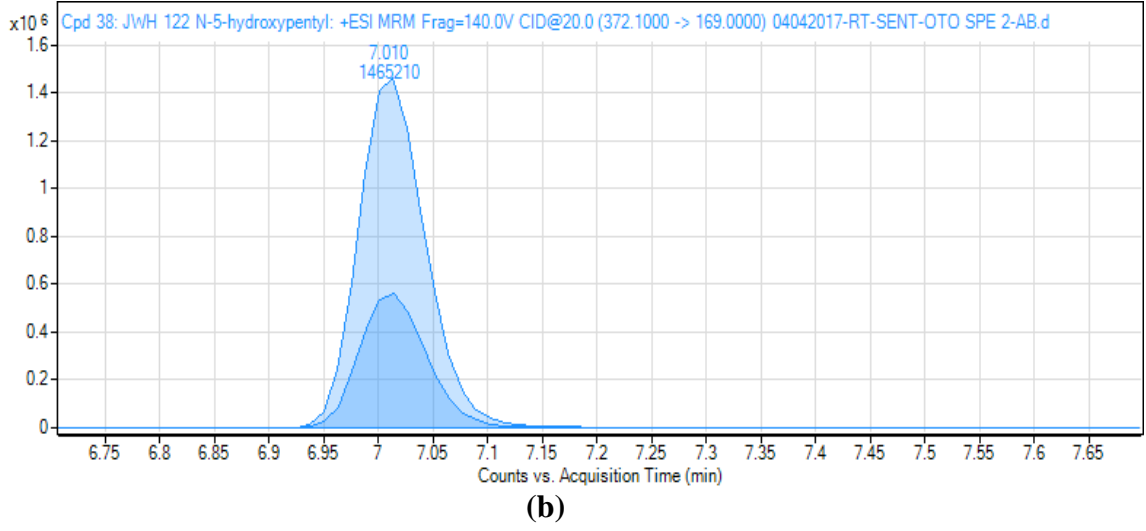
2.6. JWH-122

JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil), JWH-122 N-(5-hidroksipentil) ve JWH-018-D9 maddelerinin kimyasal yapıları Şekil 2.4’de görülmektedir. JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve JWH-122 N-(5-hidroksipentil)’ nin kimyasal yapılarına bakıldığında yalnızca -OH’in bağlanmış olduğu pozisyonda C karbon numaralarının göre adlandırıldıkları görülmektedir. Şekil 2.5’de JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve JWH-122 N-(5-hidroksipentil)’ in LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste çakıştığı görülmektedir.



Şekil 0.4 (a) JWH-122 (Naftalen-1-il-(1-bütülinol-3-il)metanon)
 (b) JWH-122 N-(4-Hidroksipentil)
 (c) JWH -122 N-(5-Hidroksipentil)
 (d) JWH 018-D9 kimyasal yapıları





Şekil 0.5 (a) JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve (b) JWH-122 N-(5-hidroksipentil)' in kromatogramları

2.7. LC-MS/MS Yöntemi

LC-MS/MS çalışmalarında kütle spektrometresi (MS) yüksek seçiciliğine rağmen analiz edilecek maddeyi aynı matrikste moleküllerine ayırmada tek başına yeterli değildir. Maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre moleküllerine ayıran bir sistemdir. Bu sistemde ayırmaya yardımcı olmak üzere (LC) sistemi ile dizayn edilmiştir. Her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi dizayn edilmiştir. Sistemin tercih edilmesindeki en önemli özellikler seçicilik, hassasiyet ve hızdır. Bu özellikleri sayesinde kullanım alanı giderek genişlemektedir (Anonim 2015d).

LC-MS/MS sistemlerin ana bileşenleri:

1. HPLC-UPLC pompa sistemi
2. Degazör
3. Otoörnekleyici
4. Ayırmayı sağlayan bir analitik kolon
5. İyon kaynağı
6. Vakum sistemi
7. Odaklanma lensleri
8. Analizör
9. Dedektör
10. Yazılım olarak tanımlanmaktadır.

Sıvı kromatografi sistemi iyon kaynağından maddeleri fizikokimyasal özelliklerine göre gönderir. Buharlaşabilen ve analizi istenmeyen maddeler iyon kaynağından bir gaz yardımı ile uzaklaştırılırken analiz edilecek maddelerin pozitif ve negatif yükler kazandırılarak sisteme girmeleri sağlanır. Bu yüklü parçacıklar kuadrapollerde m/z ve pozitif/negatif olarak ayrılır. Detektör sayesinde bu moleküllerin iyon enerjileri elektriksel sinyallere dönüştürülerek yazıcıya gönderilir. Yazılım sayesinde bu sinyaller alan değerlerine dönüştürülerek okunur.

Pompa: Pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar. Mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir. Bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir.

Degazör: Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar. Kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır. Tekrarlanabilir "Rt" elde etmemizi sağlar. Sistemde Degasser yok ise mobil fazın ultrasonik banyoda (20)dk kalması gerekir.

Otoörnekleyici: Yıkama ünitesi, iğne, şırınga ve enjektörün bulunduğu ünedir.

Kolon Fırını: Kolon Fırını sıcaklığı sabit tutarak alıkonma sürelerinin (Rt) lerin etkilenmemesini sağlar. Hava dolaşımı sağlayan sistemde olası kaçaklar için sızıntı sensörü mevcuttur. Kolon fırınında blok ısıtıcı da bulunmaktadır.

Kolon: Genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika ya da polimer bazlı dolgulu kolonlar kullanılmaktadır. Mobil Faz (Hareketli Faz) kolona doğru pompalanır.

İyon kaynağı: Kolondan gelen akıştaki buharlaşabilen maddeleri uzaklaştırıp istenen analitleri sistemde tutar.

Vakum pompaları: Ortamda gerekli vakumu ($<10^{-5}$, 10^{-7} torr'a kadar) üretirler. Sistemde iki adet vakum pompası bulunmaktadır. Sistemde iki adet turbo moleküler pompa bulunmaktadır. Vakum iki kademede sağlanmaktadır. İlk pompa (roughing) 10^{-4} torr vakum sağlamaktadır. İkinci pompa (turbo molecular) ise 10^{-5} ile 10^{-7} torr vakuma kadar inebilmektedir. Pompalardan birisi iyon kaynağını atmosfer basıncında tutarken ikinci pompa sadece analizör kısmının vakum değerini sabit tutmak için çalışmaktadır.



Şekil 0.6 Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MSMS

MS/MS analizörü: LC-MS/MS'ler iki tarama kuadropolü (Q1 ve Q3) ve bir adet parçalanma hücresinden (Q2) oluşmaktadır. Hedef iyon ilk kuadropol tarafından seçilerek parçalanmasını indüklemek için inert gaz dolu ikinci hücreye gönderilir. Parçalanmış iyonlar ayırmak ve dedekte edilmek üzere üçüncü kuadropole yollanırlar.

Dedektör: Kütle spektrometresi kuadropollerden gönderilen RF sinyallerinin analizöre sürüklenmesi sayesinde analizin her saniyesinde geçen kütle-iyon oranlarını tespit etmektedir. Bu veriler belirli süreler boyunca yapılan taramalarla birleştirilerek ana kütle ve parçalanma ürünlerinin belirlenmesini sağlar.

Yazılım: Yazılım sistemi kütle dedektöründen gönderilen analog sinyalin dijital sinyale dönüştürülerek veri oluşturulmasını ve işlenmesini sağlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Enstrümantal Analiz ve Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1 Aletler ve Diğer Gereçler

Çalışma süresince kullanılan cihaz ve gereçler aşağıda listelenmiştir.

LC-MS/MS Sistem	Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole Jetstream LC/MS
Sıvı Kromatografi(LC) Sistem	Agilent Infinity 1290 LC
Kolon	Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 150mm, 2.7µ
Azot Jeneratörü Peak	Peak Scientific
Buzdolabı	Samsung
Derin Dondurucu	Samsung
Hassas Terazı	Mettler Toledo
Mikro Pipetler	Eppendorf
Santrifüj	Hettich Rotina 380R
Ultrasonik Banyo	İntersonic
Vorteks	VWR
0.22 µm 13 mm PTFE filtre	Agela Technologies
Cam ve plastik deney tüpleri	

3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve elde edildikleri firmalar aşağıda görülmektedir.

Amonyum format	Sigma Aldrich
HCL	Panreac
Etil Asetat	Panreac
Formik asit	Merck
JWH-122 standardı	Cayman
JWH-122 N-(4-hidroksipentil) standardı	Cayman
Metanol	Panreac
Ultra saf su	Panreac
JWH 018-D9(IS)	Cayman

3.3. Çözeltiler

3.3.1. İç Standart (IS) çözeltileri:

Stok IS (10 µg/mL) çözeltisi: 1mg/mL'lik JWH 018-D9 çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ara Stok IS (500 ng/mL) çözeltisi: Stok iç standart çözeltisinden 500 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.3.3.2. Standart Çözeltiler (JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil))

3.3.2. Standart Çözeltiler (JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil)):

Ana stok çözeltisi(100 µg/mL): 1 mg standart JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) 10 mL metanolde çözülerek hazırlanmıştır.

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

3.3.3. Kalibrasyon çözeltileri:

Kalibrasyon noktalarımız 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/ml, 25 ng/mL, 50 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon noktalarımıza karşılık gelecek çözeltiler numuneye eklenmeleri sırasında seyreltme işlemine maruz kalacaklarından hedeflenen kalibrasyon noktası konsantrasyonunun 10 kat fazlası olacak şekilde hazırlanırlar. Bu şekilde hedeflenen noktalar için 500, 250 ve 100 ng/mL'lik çözeltiler ara stok çözeltiden gerekli mikratların alınıp metanol ile 2 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 50 ve 10 ng/mL'lik çözeltiler 100 ng/mL'lik çözeltiden alınan gerekli kısımların 2 mL'ye seyreltilmesi ile hazırlandı. 5, 1 ve 0.5 ng/mL'lik çözeltiler ise 10 ng/mL'lik çözeltiden alınan gerekli kısımların 2 mL'ye seyreltilmesi ile hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiler internal standart ile beraber kana eklenerek ölçüm alınır. Standart çözeltiler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Ekstraksiyonda kullanılan çözeltiler:

Sulu 0,5 M sodyumkarbonat (v/v) çözeltisi: Sodyumkarbonat katısından 5,3 gr alınarak saf suda çözüldü. Final hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çalışma öncesi çözeltiler taze olarak hazırlandı ve 1M HCl ile pH 9.3' e ayarlandı.

Sulu 1 M' lık HCl (v/v) çözeltisi: %36' lık HCl çözeltisinden 21,4 ml alınarak hazim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

3.3.5. Mobil Fazlar:

Mobil Faz A:

1 M Amonyum format çözeltisi: %99,7 saflıkta amonyum formattan 385 mg tartılarak su ile 100 mL'ye tamamlanır.

1 M amonyum format çözeltisinden 2 mL, %99,8 saflıkta formik asitten 2,5 mL ve yüksek saflıkta metanolden 125 ml alınarak LC-MS analizine uygun saflıkta saf su ile 2500 mL'ye tamamlanır.

Mobil Faz B: Yüksek saflıkta metanolden oluşur.

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

3.4. Kan Örneklerin Hazırlanması

Tam kan örnekleri sodyum florürlü tüplere alınarak çalışma gününe dek +4 °C’de muhafaza edilmiştir. JWH122 ve JWH 122-N-4-Hidroksipentil için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Tam kan örneğinden 0,8 mL alınır ve üzerine 100 µL IS (500 ng/mL) ile 100 µL istenen konsantrasyonda standart çözelti karışımı eklenerek ekstraksiyon işlemine başlanır. Üzerine 0,5 mL, 0,5 M sodyumkarbonat (pH: 9.3) tampon çözeltisi eklenir ve 2 dk vorteks işlemi yapılır. Bu işlemden sonra üzerine (99:1) Heksan-Etilasetat karışımı eklenir ve 20 dk, 3500 rpm’de santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra üst faz alınır ve azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulur. 1 mL mobil faz A ile çözülerek 0,22 µ filtreden geçirilmiş ve vialere alınarak analize hazır hale getirilmiştir.

3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları

3.5.1. Sıvı Sistem Özellikleri

Akış hızı	0,6 mL/dk
Analiz süresi	11,1 dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Otomatik örnekleyicinin tepsi sıcaklığı	8 °C

UPLC üzerinde uygulanan akış diyagramının parametreleri Tablo 3.1’de görülmektedir.

Tablo 3.1 LC-MS/MS sıvı sistemi akış özellikleri.

Zaman Tablosu	Zaman (dk)	Akış (mL/dk)	Mobil Faz A(%)	Mobil Faz B(%)
1	0	0,6	90	10
2	0,3	0,6	90	10
3	3	0,6	15	80
4	7	0,6	5	95
5	11	0,6	5	95
6	11,10	0,6	90	10

3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri

Kuru Gaz Sıcaklığı	300 ° C
Kuru Gaz Voltajı	10 L / dak
Perdeleme Gaz Sıcaklığı	300 ° C
Perdeleme Gaz Akışı	11 L / dak
Nebülizatör basıncı	45 psi
Kapiler Voltaj	3500 V
Nozzle (Ağız kısmı) Voltaj	0 V Poz., 2000 V Neg.

Tablo 3.2 JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) ve JWH 018-D9 infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsör İyon, CE (Parçalanma Enerjisi), Fragmentor Voltaj (Parçalanma Voltajı) ve Alıkonma zamanı değerleri

Kimyasal İsim	Moleküler kütle (g/mol)	Prekürsör iyon (m/z)	Fragment	CE (Volt)	Fragmentor Voltaj	Alıkonma zamanı (dk)
JWH-122	355,1	356,1	<u>169,1</u>	24	160	9,8
			141	42	160	9,8
JWH-122 N-(4-Hidroksi pentil)	371,5	372,1	<u>169</u>	20	140	7,5
			141	52	140	7,5
JWH-018 D9	350,5	351,3	<u>155</u>	25	130	9,2
			127,1	45	130	9,2

*Altı çizgili fragmentler kantitasyon için kullanılmıştır.

3.6. Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmaları FDA(Gıda ve İlaç Uygulamaları) Biyoanalitik Metot Validasyonuna uygun olarak yapılmıştır. (53-55) Seçicilik, Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), Geri kazanım, kesinlik ve kararlılık parametreleri validasyon rehberlerine uygun olarak çalışılmıştır.

3.6.1. Seçicilik Çalışmaları

Kan örnekleri 10'ar ($n \geq 6$) kez örneklenerek matriksten gelebilecek girişimler analiz edilmiştir. Spektrumlarda JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) alıkonma zamanlarında herhangi bir pik olup olmadığı incelenmiştir.

3.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Kan örneklerine son konsantrasyonlar 0.05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 ng/mL olacak şekilde standart çözeltilerden hazırlanarak kan örneklerinin hazırlanması başlığı altında anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Her bir konsantrasyon için birbirinden bağımsız üçer kan ekstraksiyonu yapılmıştır. Her bir analit için elde edilen alan ile IS arasında doğrusal bir grafik çizilmiş ve denklem yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır.

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

Dedektör tarafından bir analite ait sinyalin geri plandaki analize engel olabilen etkenlerden (noise) ayırt edilebildiği en düşük miktar o maddenin teşhis sınırıdır (LOD). Analiz edilen madde ile ilgili güvenilir kantitatif sonucun elde edilebildiği en düşük konsantrasyon değeri de o maddenin tayin alt sınırıdır (LOQ). Teşhis ve tayin alt sınırı değerleri aşağıda görülen 1 ve 2 nolu formüller ile hesaplanmıştır.

$$LOD = X_{bl} + 3 S_{bl} \quad (1)$$

$$LOQ = X_{bl} + 10 S_{bl} \quad (2)$$

X_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin standart sapması,

3.6.4. Geri Kazanım

B.K. Matuszewski, M.L (2003) hesaplanmaları uygun olarak geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği ölçümleri yapılmıştır. Bu kapsamda; Düşük (0.1 ng/mL), Orta (5 ng/mL) ve Yüksek (50 ng/mL) konsantrasyonlarında JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) standart çözeltileri ile yapılan ölçümler (A), boş kan ve idrar örneklerinin ekstraksiyonu sonrası eluata 0.1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) standartlarının eklenmesiyle oluşan çözeltilerde yapılan ölçümler (B) ve son olarak ekstraksiyon işlemi başında son konsantrasyonlar 0,1 ng/mL, 5 ng/mL ve 50 ng/mL olacak şekilde katım yapılarak hazırlanan kan ve idrar örnekleriyle yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası eluatta yapılan ölçümler (C) değerlendirildi. Bu çalışmalar kan ve idrar örneklerinde 6

bağımsız tekrarlar yapılmıştır. Hesaplamalarda aşağıda görülen 3, 4 ve 5 nolu formüller kullanılmıştır.

$$\text{Matriks Etkisi (\%)} = B/A \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = C/B \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Proses Etkinliği (\%)} = C/A \times 100 \quad (5)$$

3.6.5. Kesinlik

Kesinlik parametresi çalışmaları gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (yeniden üretilebilirlik) olarak düşük, orta ve yüksek üç farklı konsantrasyonda (0,1 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL) katım yapılmış örnekler ile ve her konsantrasyonda on tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

3.6.6. Kararlılık

JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddelerinin metanol ve biyolojik matrisler içindeki kararlılığı oda sıcaklığı, +4° C ve -20 °C sıcaklıklarında 20 gün boyunca izlenmiştir. Ölçüm günü stok çözeltilerden taze örnek hazırlanarak alan değerlerindeki değişim ölçülmüştür.

3.6.7. İstatistiksel Analiz

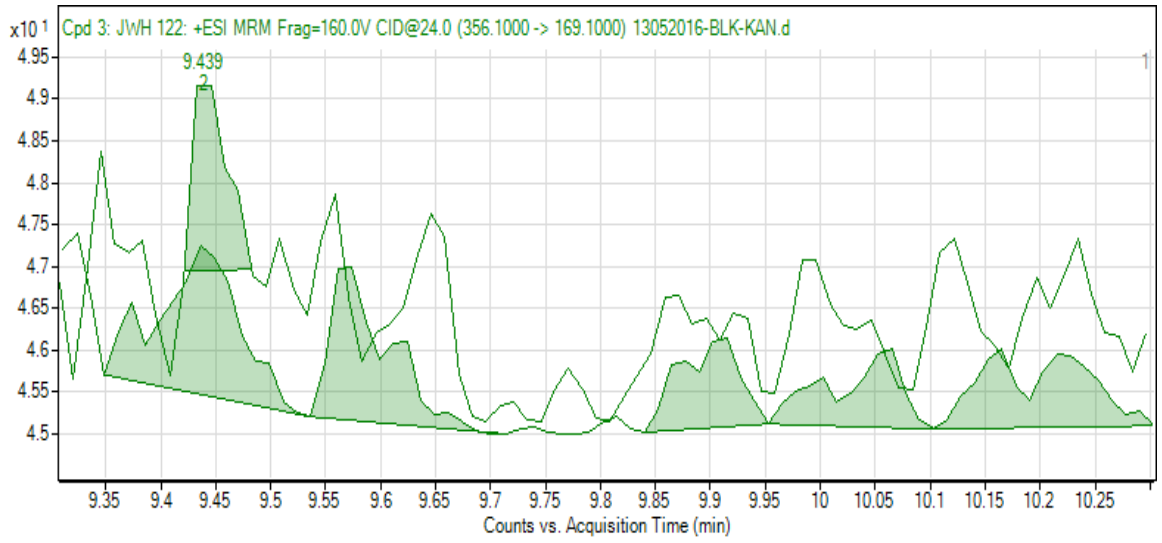
Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

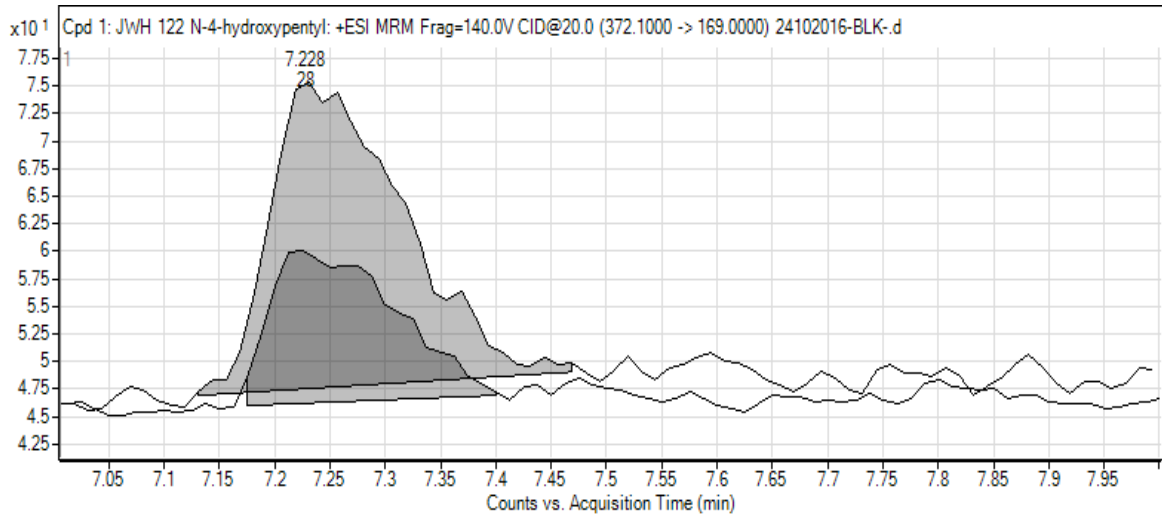
4.1. Metot Validasyonu

4.1.1. Seçicilik

JWH-122, JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için belirlenen alıkonma zamanlarında boş kan örneklerinde hiçbir girişim tespit edilmemiştir. Şekil 4.1 ve 4.2’de JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddelerinin boş kanda ve 0,5 ng/mL katım yapılmış kandan elde edilen kromatogramları sırası ile görülmektedir.



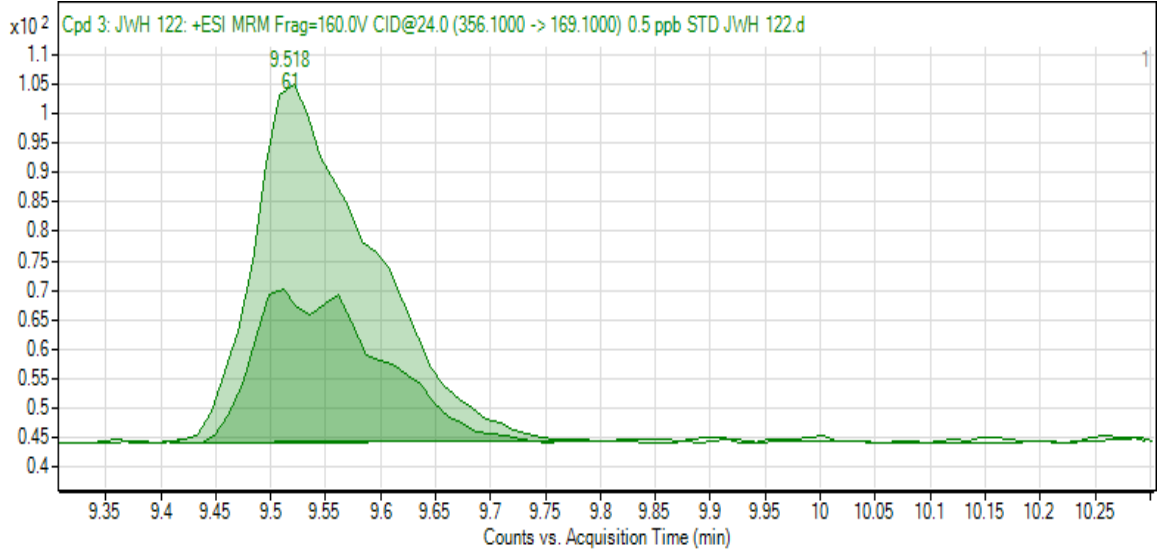
(a)



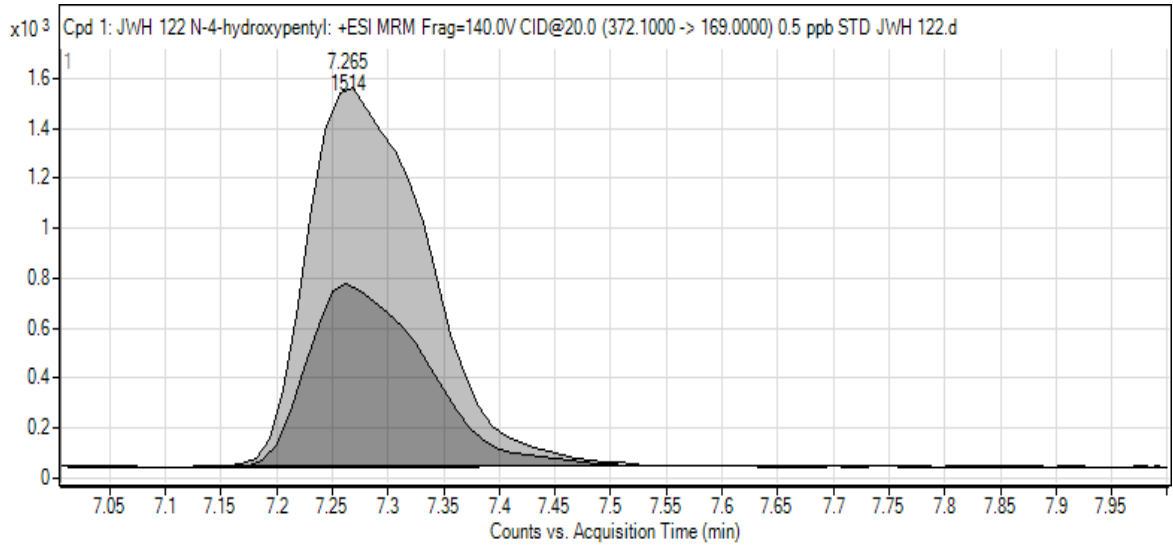
(b)

Şekil 0.1 (a) JWH-122 (Boş Kanda)

(b) JWH 122 N-4-hidroksipentil (Boş Kanda)



(a)



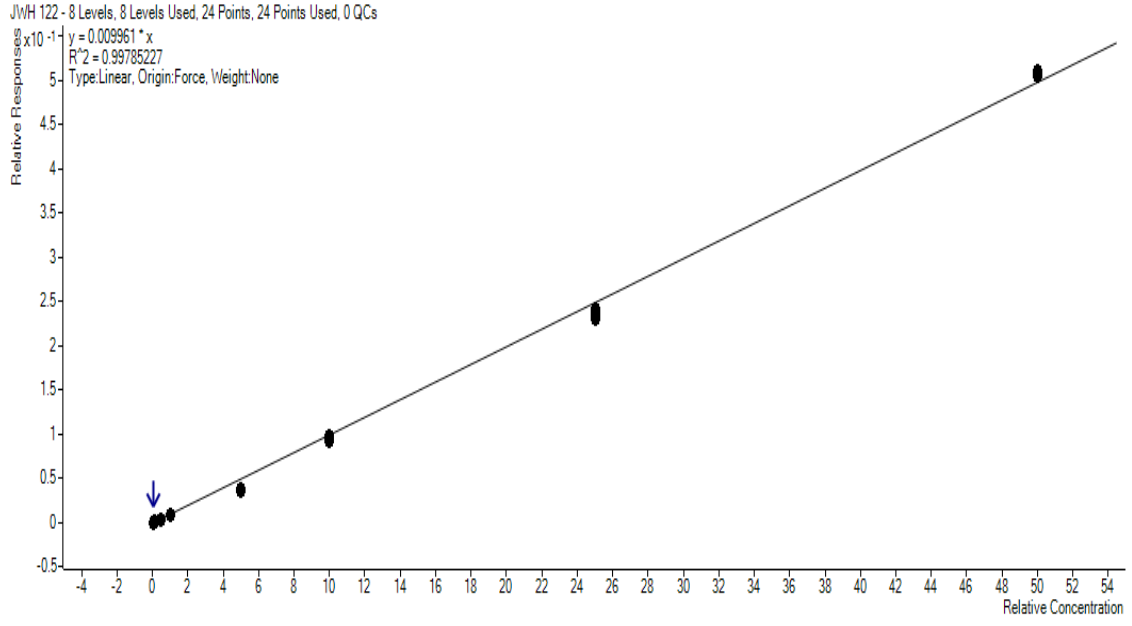
(b)

Şekil 0.2 (a) JWH-122 (0.5ng/mL)

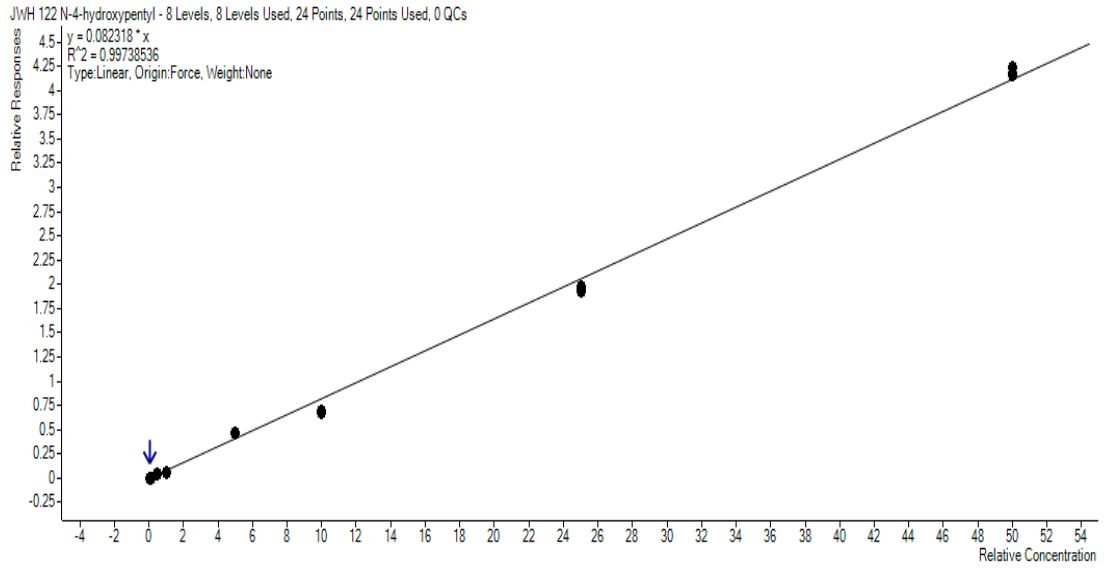
(b) JWH 122 N-(4-hidroksipentil) (0.5ng/mL)

4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Metodun doğrusal aralığının hesaplanması için 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; ve 50 ng/mL konsantrasyonlar elde edilen örneklere karşılık gelen pik alanı ile IS pik alanı arasında grafik çizildi. Sekiz farklı konsantrasyonda üçer ölçüm yapıldı. Şekil 4.2 ve 4.3'te sırasıyla JWH-122 ve JWH 122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için çizilmiş olan kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



(a)



(b)

Şekil 0.3 Kanda (a) JWH-122, (b) JWH 122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kalibrasyon eğrileri

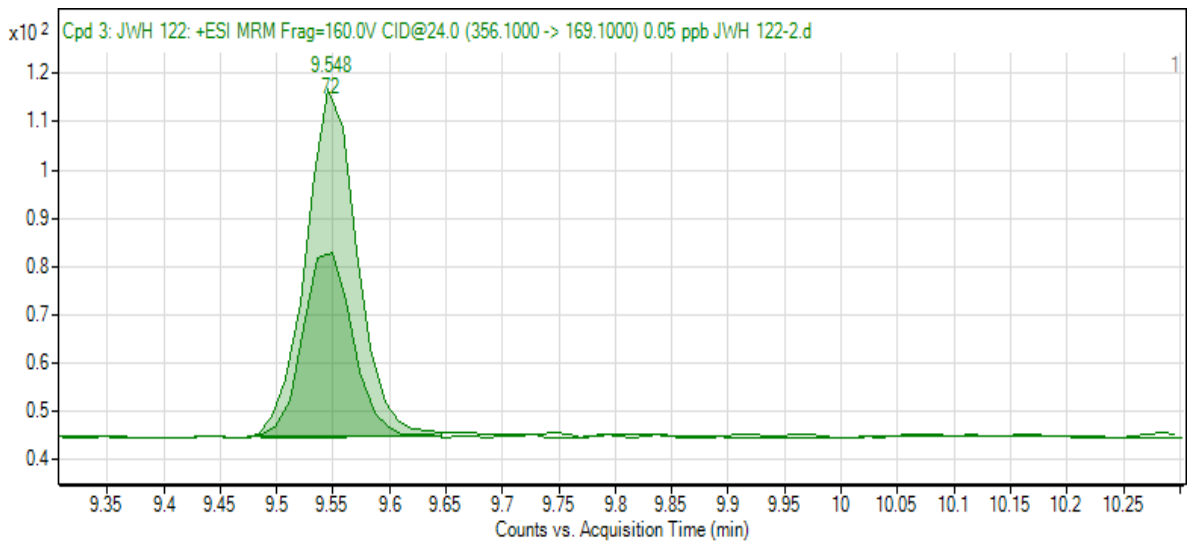
JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) için kanda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, lineer dinamik aralığı ve belirleme katsayıları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 0.1 JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) için kanda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve belirleme katsayıları

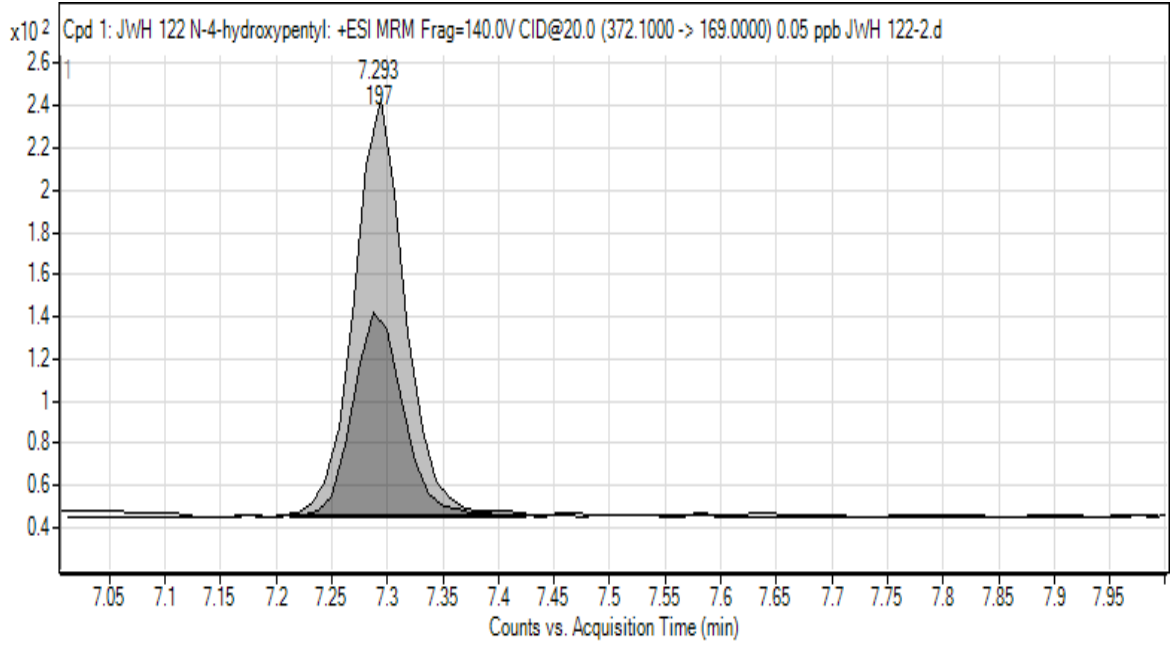
	Madde	Doğrusal Aralık	Denklem	Korelasyon Katsayısı (R ²)
KAN	JWH-122	00,5-50 ng/mL	y=0,010x+0,0060	0,995
	JWH-122 4-Hidroksi	00,5-50 ng/mL	y=0,082x+0,0236	0,996

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

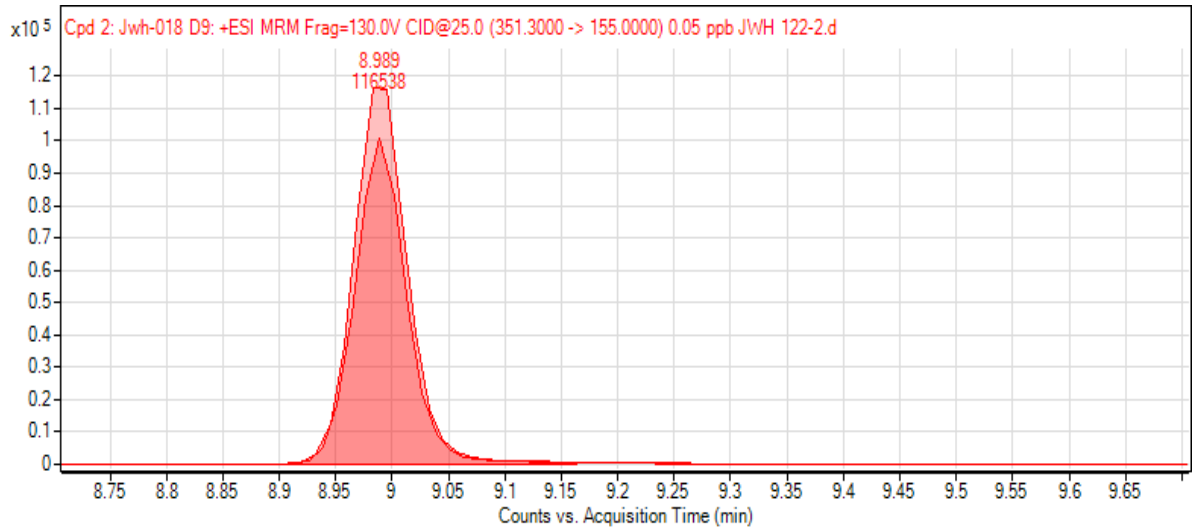
LOD ve LOQ değerleri S/N (Sinyal/Gürültü) oranının en az 3 olduğu (0,05 ng/mL), (n=10) JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) için belirlenmiştir. Şekil 4.4’de katım yapılmış kanda 0.05 ng/mL’de analitlerin S/N değerleri gösterilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 0.4 Katım yapılmış kan örneğinde (a) JWH-122, (b) JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) ve (c) JWH 018-D9 için S/N değerleri (0.05 ng/mL)

Tablo 4.2’de analiz edilen JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) maddeleri için kanda elde edilen LOD ve LOQ değerleri verilmiştir.

Tablo 0.2 JWH-122 ve JWH-122 N-(4-Hidroksipentil) maddeleri için kanda elde edilen LOD (ng/mL) ve LOQ (ng/mL) değerleri (n=10)

Madde	LOD	LOQ
JWH-122	0,041	0,058
JWH-122 N-(4-hidroksipentil)	0,061	0,076

4.1.4. Geri Kazanım

Doğrusal aralık içinde bulunan düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri sırasıyla Tablo 0.3’de verilmiştir.

Tablo 0.3 Kanda (0,1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6)

	Konsantrasyon (ng/mL)	JWH-122	JWH-12 N-(4-Hidroksipentil)
Geri Kazanım (%)	0,1	75,4	73,5
	5	75,9	75,2
	50	71,1	71,7
Matriks Etkisi (%)	0,1	84,7	93,5
	5	89,6	89,1
	50	89,1	84,5
Proses Etkinliği (%)	0,1	67,7	68,5
	5	68,1	67,1
	50	63,2	60,6

4.1.5. Kesinlik

Kesinlik parametresi gün içi tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 4.4'de, günler arası tekrarlanabilirlik değerleri ise Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 0.4 JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kanda gün içi tekrarlanabilirlik değerleri (n=10)

Madde	KAN(RSD)		
	0.05ng/mL	5ng/mL	50ng/mL
JWH-122	4,6	4,1	3,8
JWH-122 N-(4-hidroksipentil)	4,2	4,1	3,6

Tablo 0.5 JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil) maddeleri için kanda günler arası tekrarlanabilirlik değerleri (n=10)

Madde	KAN(RSD)		
	0.05ng/mL	5ng/mL	50ng/mL
JWH-122	4,2	3,8	3,5
JWH-122 N-(4-hidroksipentil)	4,0	3,9	3,2

4.1.6. Kararlılık

Kararlılık çalışmalarında metanolde, -20 °C , +4° C ve oda sıcaklığı'nda bekletilmiş standartların 1, 2, 3, 5 ve 20. günlerde ölçümleri yapılmış ve aynı gün taze hazırlanmış taze çözeltilerin alanları ile karşılaştırılmıştır. Örneklerde izlenen aralıkta alan değerlerinde anlamlı bir alan değişikliği (≥ 10) izlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Madde suistimali büyük bir sosyal problem olarak ülkemizde ve dünyada toplumu doğrudan ya da dolaylı olarak olumsuz etkilemektedir. Esrar ve benzer maddeler psikoaktif etkileri nedeniyle yüzyıllardır suistimal edilmektedir. Bu maddelerin suistimalinin engellenmesi amacıyla her ne kadar yasal düzenleme ve tedbirler alınsada psikoaktif maddelerin sürekli yenilerinin piyasaya çıkmasından dolayı madde suistimali devam etmektedir. Yeni nesil psikotik maddelerin benzer etkiyi gösteren yeni bir maddenin piyasaya sürülmesi bu maddelerin yasa kapsamına alınmasından daha hızlı olmasından dolayı sayıları oldukça hızlı artmaktadır.

Sentetik kannadinoidlerin içeriğinin tespiti ile yasa kapsamına alınan bir madde için yasadan kaçmak için hemen yeni bir sentetik kannabinoid madde piyasaya sürülmekte ve bu maddelerin kimyasal yapıları sürekli değişerek artmaktadır.

Sentetik kannabinoidlerin ve metabolitlerinin etki süreleri, metabolitlerinin aktiviteleri, etkileşimleri, birikimleri ve uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak ortaya çıkabilecek zararların araştırması devam etmektedir. Birçok sentetik kannabinoid maddenin referans standartları bulunamazken sürekli olarak yeni analoglar piyasaya sürülmektedir. Bu maddeleri kullanan kişilerin tespiti, bağımlılığının izlenebilmesi, suça karışma riskinin değerlendirilmesi, işlenmiş suçlarda uyuşturucu madde kullanımlarının belirlenebilmesi, farmakokinetik özelliklerinin ve buna bağlı olarak olası risk faktörlerinin belirlenebilmesi için hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu konuda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

Sentetik kannabinoidlerin sentezlenmesi merdivenaltı olarak tabir edilen laboratuvarlarda gerçekleşmektedir. Aseton veya metanol gibi organik çözücülerde çözündürülerek tütsü benzeri bitkisel ürünler üzerine spreylenebilir. Spreyleme işleminde etken maddenin bitkisel ürünün üzerinde homojen bir şekilde dağılımı mümkün olmayacağından, sentetik kannabinoid içeren ürünlerin arasında etken madde miktarı açısından büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Etken madde konsantrasyonuna ve kişisel duyarlılığa bağlı olarak da görülen etkiler ve şiddetleri değişebilmektedir. Bunun yanı sıra psikoaktif etkiyi arttırmak ya da yan etkileri maskeleyerek amacıyla ürünlere püskürtülen diğer ilaç etken maddeleri, bitki parçalarının içeriklerindeki doğal

maddeler veya pestisit kalıntıları ile ağır metal kirlilikleri toksiste açısından diğer önemli risk faktörleridir.

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil)'in kanda seçiciliği araştırılmış, kör örneklerde maddelerin alıkonma zamanlarında herhangi bir pik izlenmemiştir.

Çalışmamızda JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil)'in maddelerine ait oluşturulmuş kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları (R^2) değerleri 0.995-0.998 arasında değişmekte olup ideal korelasyon katsayısı değeri olan 1'e oldukça yakındır. Doğrusal aralık değeri tüm analitler için 0,05-50 ng/mL'dir.

Bu çalışma, JWH-122 ve JWH-122 N-(4-hidroksipentil)'in tam kanda sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu ile birlikte analiz edildiği ilk çalışmadır. Belirsizlik değerleri düşük, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım değerleri yüksek ve analiz süresi oldukça kısadır.

Kan için ortalama geri kazanım değerleri % 70-80 aralığında değişmektedir. Bu maddeler için ayrıca matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri de ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri % 10'dan küçük bulunmuştur. Kan ve metanolde yapılan kararlılık çalışmalarında katım yapılmış örneklerde ve standartların taze hazırlanan örneklerle yapılan alan karşılaştırmasında % 10'dan büyük bir değişim gözlenmemiştir. Tüm validasyon sonuçları literatür ve uluslar arası kabul kriterleri ile uyumludur (Anonim 2015 ve Anonim 2002).

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2002). European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, *Off. J. Eur. Commun.* 2002; 221:8–36.
- Anonim (2015a). AAPCC Issues Statement on the Synthetic Drug Abuse Prevention Act. American Association of Poison Control Centre, 2012. <http://www.aapcc.org/press/2/>. Erişim tarihi:10.02.2015.
- Anonim (2011a). UNODC, Synthetic cannabinoids in herbal products. United Nations Office on Drugs and Crime, 2011. http://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf. Last accessed February 19, 2013.
- Anonim (2013).EMCDDA, Understanding the ‘Spice’ phenomenon. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon, 2009. http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_80086_EN_Spice%20Thematic%20paper%20%E2%80%94%20final%20version.pdf. Last accessed February 19, 2013.
- Anonim (2012a). 2011 National report (2010 data) to the EMCDDA. “TURKEY” New Development, Trends and in-depth information on selected issues. Reitox National Focal Point, 2012. http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_191577_EN_Turkey_2011.pdf. Last accessed February 18, 2013.
- Anonim (2012b). Resmi Gazete.13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazete[web page oninternet].Erişim:13.10.2012,<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/02/20110213.htm>.
- Anonim (2015b). Resmi Gazete.06.02.2015 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazete[web page on internet].Erişim:20.02.2015,<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/02/20150206.htm>
- Anonim (2011b). UNODC. Synthetic cannabinoids in herbal products. United Nations Office on Drugs and Crime 2011.
- Anonim (2015c). FDA Bioanalytical Method Validation Guide 2011. [web page on internet]
Erişim: 20.02.2015 website:[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidances/UCM368107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance%20Compliance%20Regulatory%20Information/Guidances/UCM368107.pdf).
- Anonim (2015d). LGC: National Measurement System[web page on internet] Erişim:20.02.2015 http://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf.

- Ashton JC, Wright JL, McPartland JM, Tyndall JDA (2008). Cannabinoid CB1 and CB2 receptor ligand specificity and the development of CB2-selective agonists. *Curr Med Chem* 15:1428-1443.
- Aung MM, Griffin G, Huffman JW, Wu M-J, Keel C, Yang B, Showalter VM, Abood ME, Martin BR (2000). Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB1 and CB2 receptor binding. *Drug Alcohol Depend* 60:133-140.
- Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Mueller M, Puetz M, Ferreiros N (2009). ‘Spice’ and other herbal blends: Harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J Mass Spectrom* 44:832-837.
- Castaneto MS, Gorelick D, Desrosiers N, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA (2014). Synthetic cannabinoids: Epidemiology, Pharmacodynamics, and Clinical Implications. *Drug & Alcohol Dependence* 144:12-41.
- De Castro A, Piñeiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M (2013). Quantification of selected synthetic cannabinoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2013;1295 :99–106. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.035.
- Dziadosz M, Weller JP, Klintschar M, Teske J (2013). Scheduled multiple reaction monitoring algorithm as a way to analyse new designer drugs combined with synthetic cannabinoids in human serum with liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2013;929:84–89, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.04.017.
- Fantegrossi W E, Moran J H, Radomska-Pandya A, Prather P L (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to $\Delta(9)$ -THC: mechanism underlying greater toxicity?. *Life Sci.* 97: 45–54. doi:10.1016/j.lfs.2013.09.017.
- Fattore L, Fratta W (2011). Beyond THC: The new generation of cannabinoid designer drugs. *Front Behav Neurosci* 5:60-6.
- Gluodenis TJ (2011). Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends. *Forensic Magazine* 4: 31–5.
- Gregori A, Damiano F, Bonavia M, Mileo V, Varani F, Monfreda M (2012). Identification of two cannabimimetic compounds WIN48098 and AM679 in illegal products. *Science and Justice*.
- Gronewold A, Skopp G (2011). A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Sci Int* 210:711.
- Gunderson EW, Haughey HM, Ait-Daoud N, Joshi AS, Hart CL (2012).”Spice” and “K2” herbal highs: a case series and systematic review of the clinical effects and biopsychosocial implications of synthetic cannabinoid use in humans. *Am J Addict.* 21:320-6.

- Hájos N, Freund TF (2002). Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chem Phys Lipids* 121:73-82.
- Hutter M , Kneisel S, Auwärter V, Neukamm MA (2012). Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2012; 90:395–101, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.07.002.
- Huffman JW, Szklennik PV, Almond A, Bushell K, Selley DE, He H, Cassidy MP, Wiley JL, Martin BR (2005). 1-Pentyl-3phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorg Med Chem Lett* 15:4110-4113.
- Huffman JW, Mabon R, Wu MJ, Lu J, Hart R, Hurst DP, Reggio PH, Wiley JL, Martin BR (2003). 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: New cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB(1) cannabinoid receptor. *Bioorg Med Chem* 11:539-549.
- Huffman JW, Padgett LW (2005). Recent developments in the medicinal chemistry of cannabimimetic indoles, pyrroles and indenes. *Curr Med Chem* 2005; 12:1395-1411.
- Huffman JW, Mabon R, Wu MJ, Lu J, Hart R, Hurst DP, Reggio PH, Wiley JL, Martin BR (2003). 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: new cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB(1) cannabinoid receptor. *Bioorg Med Chem.*20;11:539-49.
- Huffman JW, Padgett LW (2005). Recent developments in the medicinal chemistry of cannabimimetic indoles, pyrroles and indenes. *Curr Med Chem.* 12:1395-411.
- Johnson LA, Johnson RL, Alfonzo C (2011). Spice: A legal marijuana equivalent. *Mil Med* 176(6):718-20.
- Lindsay L, White M L (2012). Herbal Marijuana Alternatives and Bath Salts—“Barely Legal” Toxic Highs. *Clin. Pediatr. Emerg. Med.* 13:283–291. doi:10.1016/j.cpem.09.001.
- Matuszewski B.K., M.L (2003). Constanzer, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC - MS / MS, *Anal. Chem.* 75 3019–3030.
- Merola G, Aturkib Z, D’Oraziob G, Gottardoc R, Macchiaa T, Tagliaroc F, Fanalib S (2012). Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 71:45-53.
- Patton AL, Chimalakonda KC, Moran CL, et al (2013). K2 toxicity: fatal case of psychiatric complications following AM2201 exposure. *J Forensic Sci* 58: 1676–80.
- Penn HJ, Langman LJ, Unold D, Shields J, Nichols JH (2011). Detection of synthetic cannabinoids in herbal incense products. *Clin Biochem* 44(13): 1163-5.

- Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6:635-664.
- Saito T, Namera A, Miura N, et al (2013). A fatal case of MAM-2201 poisoning. *Forensic Toxicol* 31: 333–7.
- Seely K A, Lapoint J, Moran J H , Fattore L (2012). Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 39: 234–243. doi:10.1016/j.pnpbp.04.017.
- Seely KA, Prather PL, James LP, Moran JH (2011). Marijuana-based drugs: Innovative therapeutics or designer drugs of abuse? *Molecular Interventions* 11(1):36-51.
- Shanks KG, Behonick GS (2016). Death after use of Synthetic Cannabinoid 5F-AMB. *Forensic Science International* 262:21-4.
- Olea-Herrero N, Vara D, Malagarie-Cazenave S, Díaz-Laviada I (2009). Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-methanandamide and JWH-015: Involvement of CB2. *Br J Cancer* 101:940-950.
- Tomiyaama K, Funada M (2011). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in “Spice” products: the role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicology Lett.* 10:207:12-7.
- Uzday (2006)T. Bağımlılık Yapan Maddeler ve Özellikleri. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi* 16-33.
- Vardakou I, Pistos C, Spiliopoulou C (2010). Spice drugs as a new trend: Mode of action, identification and legislation, *Toxicol. Lett.* 197:157–162. doi:10.1016/j.toxlet.06.002.
- Vural N (2002). İlaç Suistimali ve Bağımlılığı Toksikoloji. Yayın no:73. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; p.317–41.
- Yanes EG, Lovett DP (2012). High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 909 (2012) 42–50. doi:10.1016/j.jchromb.10.013.
- Young A C, Schwarz E, Medina G, Obafemi A, Feng S, Kane C ve ark (2012). Case Report: Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *Am. J. Emerg. Med* 30:1320.e5–1320.e7. doi:10.1016/j.ajem.05.013.
- Zawilska JB, Andrzejczak D (2015). Next Generation of Novel psychoactive Substances on Horizon- A Complex Problem to Face. *Drug&Alcohol Depend*, 157:1-17.

- Znaleziiona J, Ginterová P, Petr J, Ondra P, Válka I, Ševčík J ve ark (2015). Determination and identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques – a review. *Anal. Chim. Acta* (In press). doi:10.1016/j.aca.12.055.
- Wiebelhaus J M, Poklis J L, Poklis A, Vann R E , Lichtman A H, Wise L E (2012). Inhalation exposure to smoke from synthetic “ marijuana ” produces potent cannabimimetic effects in mice. *Drug Alcohol Depend* 126 :316–323. doi:10.1016/j.drugalcdep.05.034.
- Wintermeyer A, Möller I, Thevis M, et al (2010). In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Anal Bioanal Chem* 398:2141-2153.
- Weaver MF, Hopper JA, Gunderson EW (2015). Designer Drugs 2015:Assessment and Management. *Addiction Science&Clinical Practice*,10(8):1-9.
- Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, Ganju RK (2009). Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 8:3117-3129.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İstanbul Küçükçekmece'de tamamladı. Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 1999 yılında kazandı. 2001 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne yatay geçiş yaptı. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2004 yılında askerlik hizmetini tamamladı. 2005 yılında Adalet Bakanlığı'nda memur olarak göreve başladı. 2012 yılında Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumuna Kimyager olarak atandı. 2012 yılından bu yana da aynı görevde çalışmaktadır.