

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**JWH-073 VE METABOLİTLERİNİN LC-MS/MS İLE KAN VE
İDRARDA TAYİNLERİ**

SERKAN ÖZTÜRK

**DANIŞMAN
PROF.DR. BUKET ALPERTUNGA**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Serkan Öztürk tarafından hazırlanan JWH-073 Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

29 / 06 / 2015

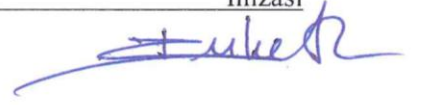
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof.Dr. BUKET ALPERTUNGA

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



2.Prof.Dr. TÜRKAN YURDUN

M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji A.B.D.



3.Doç.Dr. SİBEL ÖZDEN

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



4.

5.

BEYAN

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

Serkan ÖZTÜRK



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA' ya, Adli Tıp Kurumu Başkanı Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK' e, desteğini esirgemeyen eşim, ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29204

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sentetik Kannabinoidler	3
2.2. JWH-073.....	7
2.2.1. Farmakolojik ve Toksikolojik Etkileri.....	7
2.2.2. Farmakolojik ve Toksikolojik Özellikleri.....	7
2.2.3. Yasal Kısıtlamalar ve Kullanım Sıklığı	11
2.2.4. Analiz yöntemleri	14
2.3. LC-MS/MS Yöntemi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler.....	21
3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	21
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	21
3.2.2. Çözeltiler.....	22
3.3. Biyolojik Örnekler.....	23
3.4. Kan ve İdrar Örneklerin Hazırlanması	24
3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Şartları	25
3.5.1. Sıvı Sistem Özellikleri	25
3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri.....	26
3.6. Validasyon Çalışmaları	27
3.6.1. Seçicilik Çalışmaları	28
3.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	28
3.6.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	28
3.6.4. Geri Kazanım	28
3.6.5. Kesinlik.....	29
3.6.6. Kararlılık.....	29
3.7. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Metot Validasyonu	30
4.1.1. Seçicilik	30

4.1.2.	Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	31
4.1.3.	Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı LOQ).....	33
4.1.4.	Geri Kazanım.....	35
4.1.5.	Kesinlik.....	35
4.1.6.	Kararlılık.....	36
5.	TARTIŞMA.....	37
	KAYNAKLAR	41
	ETİK KURUL KARARI	49
	ÖZGEÇMİŞ	50

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Jenerasyon numarası ve dahil edilen sentetik kannabinoidler [17].....	6
Tablo 2-2: JWH-73 ve Metabolitleri ile ilgili yapılan çalışmalar materyal, numune hazırlama yöntemleri, analiz yöntemleri ve tayin sınırları	16
Tablo 3-1: LC-MS/MS sıvı sistemi akış özellikleri.....	25
Tablo 3-2: JWH-073, Metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsor İyon, DP (Kümeleşme Önleyici Potansiyel), EP (Giriş Potansiyeli), CE (Parçalanma Enerjisi), CXP (Parçalanma Çıkış Enerjisi) ve Alıkonma zamanı değerleri.	26
Tablo 4-1: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve belirleme katsayıları.....	32
Tablo 4-2: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD (ng/mL) ve LOQ (ng/mL) değerleri (n=10).....	34
Tablo 4-3: Kanda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).	35
Tablo 4-4: İdrarda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).	35
Tablo 4-5: Kanda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) gün içi kesinlik ve doğrusallık değerleri (n=10).	35
Tablo 4-6: İdrarda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) gün içi kesinlik ve doğrusallık değerleri (n=10).	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Satışı yapılan sentetik kannabinoidlerin farklı isim, ambalaj ve içerikleri	4
Şekil 2-2: JWH-073'ün Kimyasal Yapısı (Naftalen-1-il-(1-bütindol-3-il)metanon)	7
Şekil 4-1: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit, JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl) maddelerinin (A) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) kanda ve (B) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) idrarda MRM kromatogramları	30
Şekil 4-2: Kanda JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B) ve JWH-073 N-(4- hidroksibütıl) (C) maddeleri için kalibrasyon eğrileri.	31
Şekil 4-3: İdrarda JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B) ve JWH-073 N-(4- hidroksibütıl) (C) maddeleri için kalibrasyon eğrileri.	32
Şekil 4-4: Katım yapılmış kan örneğinde JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B), JWH-073 N-(5-hidroksipentil)(C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.1 ng/mL).....	33
Şekil 4-5: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B), JWH-073 N-(5-hidroksipentil)(C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.075 ng/mL). 34	

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

µg/mL	Milyonda Bir Birim
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonlaştırma
CE	Parçalanma Enerjisi
CXP	Parçalanma Çıkış Enerjisi
DC	Doğrusal Akım
DP	Kümeleşme Önleyici Potansiyel
EMCDDA	Avrupa Suistimal edilen madde Ve Suistimal edilen madde Bağımlılığı İzleme Merkezi
EP	Giriş Potansiyeli
ESI	Elektro Sprey İyonizasyon
EWS	Erken Uyarı Sistemi
GC/MS	Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
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
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
THC	Tetrahidrokannabinol
TIC	Total İyon Kromatogramı
UPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
µl	Mikrolitre

ÖZET

Öztürk, S. (2015). JWH-073 ve Metabolitlerinin LC-MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayinleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Esrarın yan etkilerini azaltarak tedavi edici etkisini geliştirmek üzere sentezlenen sentetik kannabinoidlerin suistimali tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Endokannabinoid reseptörlere tetrahidrokannabinol (THC)'e benzer etki gösteren fakat farklı kimyasal yapıdaki bu maddeler, ciddi yan etkilere hatta ölümlere neden olmaktadır. Sentetik kannabinoidlerin bitkisel materyaller üzerine spreyleneşmesiyle hazırlanan karışımlar “doğal” ve “yasal” kandırmacasıyla internet üzerinden kolaylıkla satılmakta ve popülariteleri gün geçtikçe artmaktadır. Maddelerin farmakolojisi, toksik etkileri ve tayiniyle ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit, and JWH-073 N-(4-hidroksibutil) maddelerinin katı faz ekstraksiyonunu takiben LC-MS/MS analizi ile kan ve idrarda tayini ve kantitasyonu amacıyla spesifik ve güvenilir bir metot geliştirilmiştir. Metodun doğrusallık (0.1 – 50 ng/mL), seçicilik, gün içi ve günlerarası doğruluk ve kesinlik (CV < 15%), geri kazanım (% 75-95), teşhis sınırı (LOD) (0.08-0.13 ng/mL), ve tayin alt sınırı (LOQ) (0.11-0.17 ng/mL) parametreleri açısından validasyonu yapılmıştır. Ayrıca matriks etkisi, stabilite ve proses etkisi de incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, JWH-073, JWH-073 metabolitleri, kan, idrar

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:29204.

ABSTRACT

Oztürk, S. Determination of JWH-073 and metabolites in blood and urine with LC-MS/MS. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

Abuse of synthetic cannabinoids which were synthesized for improving the therapeutic effects of cannabis by reducing the adverse effects, has reached dangerous dimensions. These chemicals which have similar effects on endocannabinoid receptors with tetrahydrocannabinol (THC) but different chemical structure, have more serious side effects and even cause death. The mixtures which were prepared by spraying synthetic cannabinoids to herbal materials being sold as "natural" and "legal" with trickery over the internet and its popularity is increasing day by day. The studies about synthetic cannabinoids on pharmacology, toxic effects and, detection are very limited.

A specific and reliable method has been developed for the detection and quantification of JWH-073, JWH-073 N-butanoic acid, and JWH-073 N-(4-hydroxybutyl) in blood and urine using solid-phase extraction followed by LC-MS/MS analysis. The method has been validated in terms of linearity (0.1 – 50 ng/mL), selectivity, intra-assay and inter-assay accuracy and precision (CV < 15%), recovery (% 75-95), limits of detection (LOD) (0.08-0.13 ng/mL), and quantification (LOQ) (0.11- 0.17 ng/mL). Matrix effects, stability, and process efficiency were also assessed.

Key Words: LC-MS/MS, JWH-073, JWH-073 metabolites, blood, urine

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 29204.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kenevir içindeki esrar bileşeni tetrahidrokannabinol (THC) ve diğer bileşenlerinin dini ya da tıbbi amaçlar nedeniyle kullanımı eski Çin'e kadar dayanmaktadır. 1964 yılında Raphael Mechoulam ve ark. kenevir bitkisi içindeki psikoaktif bileşen olan THC'ü bitkiden izole etmiş ve tanımlamışlardır [1]. Aynı yıllarda esrarın sahip olduğu yan etkilere neden olmayan analjezik ve antienflamatuar etkileri olan kannabinoid reseptör agonisti yeni maddelerin bulunması için de çalışmalar yapılmıştır [2]. Sentetik kannabinoidler, esrarın kemoterapideki antiemetik etkisini geliştirmek üzere dizayn edilen çalışmalarda sentezlenmişlerdir. THC analogları olan bu klasik kannabinoidler, THC'nin dibenzofuran yapısının kısmi olarak kırılmasıyla sentezlenmiştir [3]. Maddeler esrara benzer olarak endokannabinoid CB1 ve CB2 reseptörlerinden biri ya da her ikisi üzerinde de etki göstermektedir [4]. Maddeler kimyasal yapı olarak esrara benzemesede olmasına rağmen farmakolojik etkileri esrara benzerdir [5].

Sentetik kannabinoid içeren bitkisel ürünler 2004 yılında ilk olarak “spice” ve “K2” ticari isimleriyle piyasaya sürülmüştür [6]. Satışları genellikle internet üzerinden yapılan bu maddeler “legal high” ya da “herbal incense” olarak pazarlanmışlardır [7]. Üzerlerinde “insan tüketimi için değildir” ibaresi bulunan ve tütsü ya da potpori iddiasıyla pazarlanan maddelerin ambalajları üzerinde içeriğinin yazılması zorunlu değildir, böylece yasal denetimleri kandırmak da mümkün olmaktadır. Maddelerin “bitkisel” ya da “yasal” kelimeleri kullanılarak satışının yapılması kullanan kişilerde “doğal” ve “zararsız” izlenimi yaratmaktadır. Sentetik kannabinoidlerin etanol ya da asetonla çözündürüldükten sonra bitkisel materyal üzerine püskürtüldüğü ve daha sonra kurutularak değişen konsantrasyonlarda ürün elde edildiği düşünülmektedir. Püskürtülen madde konsantrasyonlarının değişken olmasına bağlı olarak yan etki profilleri de değişiklik göstermekte, hatta aynı isimli ürünü alan farklı kişilerde hafif yan etkiden, ölümle sonuçlanan toksisiteye kadar değişiklik göstermektedir. Elde edilmesinin oldukça kolay ve ucuz olması sentetik kannabinoidleri suistimal edilen madde kullanmaya meyilli genç ve ergenler için cazip hale getirmektedir. Merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem başta olmak üzere birçok sistem üzerinde toksik etkileri belirlenen bu maddenin kullanımına bağlı olarak acil servislere başvurular dramatik bir şekilde artmaktadır [7, 8].

Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) verilerine göre kokain, eroin, amfetamin, metamfetamin, Metilendioksimetamfetamin(MDMA) gibi maddelerin yüksek dozda alımından kaynaklanan ölüm olguları 1999 ve 2010 yılları arasında neredeyse sabit kalmış; buna karşılık “tanımlanmamış” maddelerden kaynaklanan ölümler üç katına çıkmıştır. Ölümlerin üç katına çıkmasına bahsi geçen yıllar arasında yasaklı maddeler kapsamında olmayan sentetik kannabinoidler ve banyo tuzlarının neden olduğu düşünülmektedir [9]. Bilinmeyen maddelerin kötüye kullanımı Amerika Birleşik Devletleri’nde acil servislere başvuran hasta sayısını son on yılda %187’den %5846’ya kadar çıkarmıştır [10].

2008 yılı sonlarında THC Pharma (Frankfurt, Almanya) firması “spice” içerisinde bir sentetik kannabinoid olan JWH-018 olduğunu raporlamış ve 2009 yılı başında JWH-018 maddesi yasaklanmıştır. Bu düzenlemenin hemen ardından Mart 2009’da ikinci nesil sentetikler piyasaya sürülmüş ve tespit edilmeye başlanmıştır [11]. Kısa bir sürede pek çok Avrupa ülkesinde bu maddeler yasa kapsamına alınmışlardır. Mart ayında Amerika Birleşik Devletleri FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) JWH-018, JWH-073, JWH-200 ve CP-47,497 ve kannabisikloheksanol’den oluşan beş maddelik yasak listesini yayınlamıştır.

Sentetik kannabinoidlerin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri hakkında bilinenler oldukça azdır [12]. Farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin tanımlanması ve toksik etkilerinin incelenebilmesi, analizleri için uygun metotlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir. Maddelerin kimyasal yapı olarak heterojen bir dağılım göstermeleri ortak analiz yöntemlerinin geliştirilmesini oldukça zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmanın amacı JWH-073 ve metabolitlerinin kanda ve idrarda tayinini sağlayan seçici, güvenilir, maliyeti düşük bir yöntem geliştirilmesi ve uluslararası rehberlere uygun olarak validasyonunun yapılmasıdır. Böylece suistimali yaygın olan bu maddenin yasa tarafından izlenmesi ve bu maddeden kaynaklanan ölümlerin tespiti amaçlanmaktadır. Yapılan çalışma ile ayrıca bu alandaki literatüre katkı sağlamak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Kannabinoidler

Esas olarak kannabinoidler üç grupta toplanabilirler; fitokannabinoidler, endokannabinoidler ve sentetik kannabinoidler. Fitokannabinoidler sadece kenevir bitkisinden kayda değer miktarda izole edilen kannabinol (CBN), kannabidiol (CBD) ve Tetrahidrokannabinol (THC) doğal kannabinoidlerdir. Endokannabinoidler vücutta üretilen hücre içi lipid mesajcılardır, kullanılabilecek miktardan daha fazla üretildiği ve sonraki kullanım için saklanabildiğine inanılır. Kannabinoidlere ait bu üç grubun da etkilerinin hücre membranları ile özel bir etkileşim ile meydana geldikleri bilinmektedir [13]. 1980 yılında kannabinoid reseptörler (CB) tanımlanmış ve keşif sırasına göre (CB1) ve (CB2) olarak numaralandırılmıştır. Bu iki reseptör arasındaki farklılık tahmin edilen aminoasit dizisi farklılıkları, sinyal mekanizması ve doku dağılımından kaynaklanmaktadır [6].

Kenevir bitkisine ait psikoaktif bileşenler nedeniyle yüzyıllardır suistimal edilen madde olarak kullanılmıştır. Bu bileşenlerden en önemlisi endokannabinoid CB1 reseptörü üzerinde kısmi agonist (hipotermi, analjezi) ekti gösteren THC'dir. Bu psikoaktif maddenin keşfinden sonra maddenin reseptör etkisi, terapötik etkileri ve yan etkileri üzerinde pek çok çalışma yapılırken, aynı zamanda endokannabinoid sistem ve reseptörler üzerinde de çalışmalar yapılmıştır [14]. Bu araştırmalarda kullanılmak üzere dizayn edilen sentetik kannabinoidlerin reseptör afinitelerinin THC ye oranla CB1 üzerinde 4 ile 10 kat kadar daha fazla olduğu görülmüştür [3]. THC, CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinde kısmi agonist etki gösterirken sentetik türevler aynı reseptörler tam agonist etki gösterirler [7].

Sentetik kannabinoidler farklı kimyasal yapıda maddelerden oluşan geniş bir ailedir. Farmakolojik ajanlar olarak üretilmiş olmalarına rağmen tedavi edici özellikleri istenmeyen psikoaktif yan etkilerden ayırmak oldukça zordur [6].

İlk kez 2004 yılında “spice” adı altında sentetik kannabinoid içeren ve bitkisel olduğu iddia edilen bir ürünün internet üzerinden satılmaya başlandığı tespit edilmiş, 2008'den sonra ise “spice” ve benzeri paketlenmiş ürünlerin satışı ile ilgili Almanya ulusal televizyonu ve yerel gazetelerde ilanlar görülmeye başlamış, genellikle de psikotrop madde kullanmak isteyen ergenler ve gençler tarafından tercih edildiği belirlenmiştir [11, 6]. Erişimlerdeki kolaylık ve psioaktif etkileri bu maddelerin popülerliğini oldukça arttırmıştır. Spice Silver, Spice Gold ve Spice Diamond ve birçok

çeşidinin *Pedicularis densiflora* (Hint Savaşçısı), *Leonotis leonurus* (Aslan Kuyruğu), *Cannavalia rosea* (Baybean), *Nymphaea aquatic* (Mavi Lotus), *Vanilleae planifolia* (Vanilya), bal ve benzeri bitkisel ürün ya da bitki içerdiği rapor edilmiştir. Bu bitkilerin de toksikolojik etkileri bilinmemektedir [15]. Kimyasal içeriklerine bağlı olarak *Pedicularis densiflora* (Hint Savaşçısı) ve *Leonotis leonurus* (Aslan Kuyruğu)'un psikotrop etkiye sahip olduğu söylenebilir. Şekil 2-1'de "spice" ve benzeri ticari ürünler ve tütsüye benzetilen içerikleri gösterilmektedir.



Şekil 2-1 Satışı yapılan sentetik kannabinoidlerin farklı isim, ambalaj ve içerikleri

Kullanıcılarda esrar benzeri etkiler gösteren ve bitkisel olduğu iddia edilen “spice” ürünleri içerikleri bakımından incelenmiş, ancak esrara rastlanmamıştır. 2008 yılı Aralık ayında bitkisel karışımların psikoaktif etkilerinin sentetik kannabinoidlerden kaynaklandığı açığa çıkmış ve içlerinde JWH-018, JWH-073, JWH-398, JWH-250, HU-210 ve CP-47,497 ve homologları ile oleamide olduğu rapor edilmiştir. Bu kannabinoid reseptör agonistleri yağda çözünen, polar olmayan, 20-26 karbonlu ve oldukça uçucu yapılardır [6, 16]. 2009 yılında Avusturya, Almanya, Fransa, Lüksemburg, Polonya, Litvanya, İsveç, İngiltere ve Estonya gibi bazı Avrupa ülkeleri bütün bu ürünleri narkotik yasasına dahil ederek satışını engellemiştir [8].

“Spice” içerisinde bulunan klasik kannabinodlerden HU-120 1960’larda Hebrew Üniversitesi’nde Raphael Mechoulam tarafından sentezlenmiştir. Klasik olmayan kannabinoidlerden siklofenol (CP) 1970’lerde Pfizer firması tarafından geliştirilmiştir. HU-210 yapı olarak THC’ye çok benzer olmasına rağmen reseptör afinitesi daha yüksektir. CP-47,497’nin sentezi daha kolaydır. Bu maddeler CB1 reseptörü üzerinde tam bir agonist etki göstermesi nedeniyle esrara oranla daha güçlü etki gösterirler ve popülerlikleri daha yüksektir. Diğer bir klasik olmayan kannabinod olan AM, Alexandros Makriyannis tarafından sentezlenmiştir [8]. Son olarak 1990’lı yıllarda John W. Hoffman ve ekibi JWH isimli bir seri sentetik kannabinoid sentezlemişlerdir.

Maddelerin tek başına yasa kapsamına alınması suistimalinin önüne geçememiştir. Yasa kapsamına alındığı anda aynı isimle satılmaya devam edilen ticari mamüllerin kimyasal içerikleri değiştirilerek “yasal” niteliği korunmuştur. İlk üretilen “spice” ürünleri JWH-018 ve JWH-073 içermektedir. Fakat bu maddeler aminoalkil indoller ve diğer bisiklik klasik olmayan CP-47,497 ve onun C8 homologları gibi yasa kapsamına alındığı için yeni ikinci jenerasyon üretilmeye başlanmıştır. İlk jenerasyon maddeler daha birçok ülkede yasaklanmadan ikinci jenerasyon maddeler tespit edilmeye başlanmıştır. Ocak 2014 itibarıyla yedinci jenerasyon sentetik kannabinoidlerden THJ-018 listeye dahil edilmiştir [17]. Tablo 2-1’de sentetik kannabinoidler ve dahil olduğu jenerasyon numaraları gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Jenerasyon numarası ve dahil edilen sentetik kannabinoidler [17]

Jenerasyon Numarası	Sentetik Kannabinoid
1	JWH-018, JWH-019, JWH-073
2	AM-2201, RCS-4, JWH-122
3	AKB-48, STS-135
4	UR-144, 5-Fluoro-UR-144, XLR-11
5	PB-22, 5-fluoro-PB-22, BB-22
6	AB-PINACA, AB-FUBINACA, ADB-PINACA
7	THJ-018, FUB-PB-22

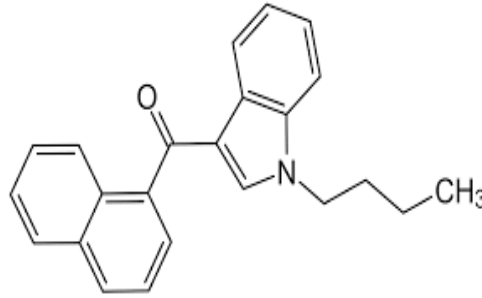
Yeni üretilen ve klasik serilerde (CP, AM, JWH, HU) olmayan sentetik maddelere üretildikleri ülkelere özgü isimler verilmiştir. “AKB-48” ismini Japon pop grubundan almıştır. “STS-135” Amerikan Uzay Üssü programlarından birinin son uçuşudur. “XLR-11” ilk sıvı yakıtlı motordur. Bu da sentetik kannabinoidlerin artık bir çok ülkede ve merdiven altı laboratuvarlarda yasadışı olarak kolaylıkla üretilebildiği kanıtlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sentetik kannabinoidlerin yan etkilerinin oldukça güçlü olduğunu ve yeni bir “suistimal edilen madde” sınıfı olarak kabul edildiğini göstermektedir. Bu amaçla üretilmiş yüzlerce maddeden sadece 20 tanesinden azı biyolojik kitlerle enzim-substrat ilişkisine dayanarak ölçülmektedir ve bu sistemlerin bir çoğunda sadece ana maddelerin tayin edilmesi yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır [3].

“spice” içeriğinde sentetik kannabinoidler dışında bulunan diğer maddeler yağ asitleri ve esterleri (linoleik asit, palmitik asit), amid yağ asitleri (oleamide, palmitol etanolamid), bitkisel kaynaklı maddeler (eugenol, timol, asetil vanilin,..), benzil benzoat gibi koruyucular ve α - tokoferol’dür [16]. Bu maddeleri oldukça yüksek dozlarda karışımlara eklemek suretiyle, sentetik kannabinoidin yan etkilerini maskelemek hedeflenmektedir [6].

Bu ürünlerde ayrıca sıklıkla β 2-adrejenik agonisti klenbuterol’e rastlanmaktadır [18]. Kullanım sonrası titreme, taşikardi ve anksiyete gibi şikayetler ile acil servise başvuran hastaların anlatmış olduğu semptomimetik benzeri etkilerde bu maddenin de etkisinin olabileceği düşünülmektedir [19]. Bunların dışında harmin ve harmolin, nikotin, kafein ve metallere de rastlanmaktadır. Karışımlara eklenen kimyasallar, sentetik kannabinoidin tespitini de zorlaştırmaktadır [15].

2.2. JWH-073

JWH-073, JWH-018 maddesindeki fonksiyonel grubun değiştirilmesiyle sentezlenen sentetik kannabinoid'dir. Suistimal edilen ilk jenerasyon sentetik maddelerdendir. Madde lipofilik yapıda, yirmi üç karbonlu, uçucu ve non-polar özelliktedir. Bu maddenin kimyasal yapısı Şekil 2-2'de verilmiştir.



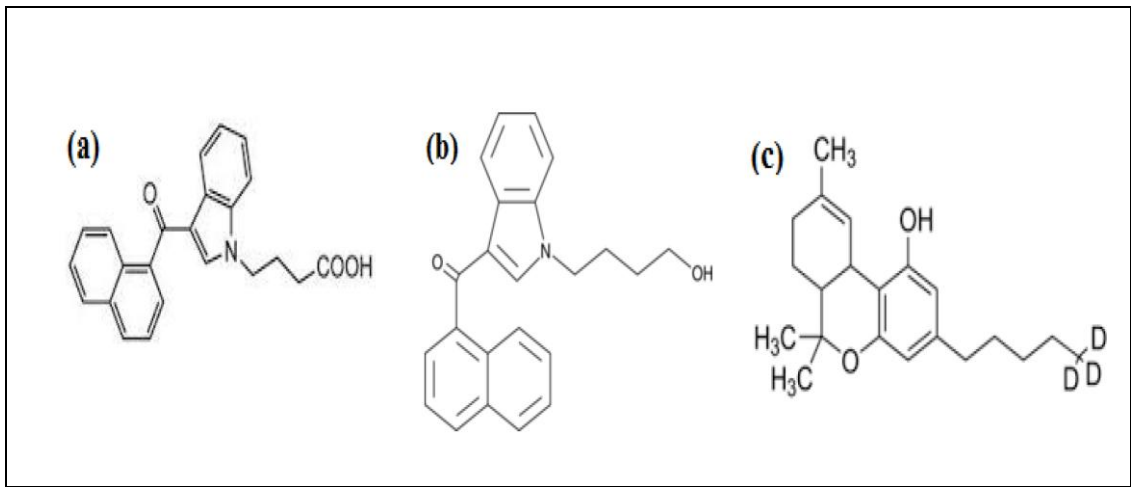
Şekil 2-2: JWH-073'ün Kimyasal Yapısı (Naftalen-1-il-(1-bütülinol-3-il)metanon)

2.2.1. Farmakolojik ve Toksikolojik Etkileri

JWH-073 ile yapılan ilk çalışmalar, maddenin bitkisel içeriklerde [16,18,20-27] ve saçta [28-31], tükürükte [32-35], tam kan, serum ve plazmada [36-41] ve idrarda [42-50] analizleri ile ilgili olmuştur. Karaciğer mikrozomları kullanılarak yapılan çalışmalarda Faz I ve Faz II metabolizması tanımlanmıştır. Ana madde önce CYP450'lerle (merkezi sinir sistemi:CYP2C9, akciğer:CYP1A2 ve karaciğer:CYP2D6) enzimleri ile oksitlenerek hidroksillenmiş ya da poli hidroksillenmiş metabolitlerine, sonrasında UDP glukronozil transferaz enzimleri ile glukuronid konjugatlarına dönüşerek böbreklerden atılır. Konjugasyondan karaciğerde UGT1A1, UGT1A9; karaciğer dışında UGT2B7, UGT1A10; akciğerde UGT1A7 ve beyinde UGT1A3, UGT2B7 enzimleri sorumludur [51,52].

Poklis ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada farelere esrar, JWH-018 ve JWH-073 maddelerinden aynı dozlarda verilmiş ve metabolit düzeyleri takip edilmiştir. Farelere "Magic Gold" verildikten 20 dakika sonra JWH-073 konsantrasyonları kanda 67-244 ng/mL arasında, beyinde ise 412-873 ng/g arasında değişmiştir. Hayvanlarda maruziyet sonrası bulunan JWH-073 ve JWH-018 miktarları THC ye oranla daha düşüktür, bu da yarılanma ömürlerinin THC'den daha kısa olduğunu göstermektedir [39].

Maddenin genellikle alkil grubunda ω -karbonunun oksitlenmesi ya da hidroksillenmesiyle Faz I hidroksil metabolitlerinin oluştuğu ve bu metabolitlerin, biyolojik materyallerde analiz için daha uygun olduğu görülmüştür [4]. Tez çalışmasında, yukarıdaki çalışmalar referans olarak alınarak JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4- hidroksibütil) metabolitleri kullanılmıştır. IS (İç standart) olarak kimyasal yapı bakımından benzer olan delta-9-tetrahydrocannabinol-d3 (THC-d3) kullanılmıştır. Metabolitler ve IS'ın kimyasal formülleri aşağıdaki Şekil 2-3'de gösterilmiştir.



Şekil 2-3: JWH-073 N-bütanoik asit(a), JWH-073 N-(4-hidroksibütil) (b) ve THC-d3 (c) kimyasal yapıları

2.2.2. Farmakolojik ve Toksikolojik Özellikleri

Maddelerin farmakolojik etkilerinin anlaşılabilmesi için yapılan çalışmalarda insan denekler kullanılamaması nedeniyle çalışmalar genellikle fareler üzerinde yapılmıştır. Fareler piroliz edilen maddelere burundan inhalasyon yoluyla maruz bırakılmış ve etkileri incelenmiştir [5]. Kimyasal yapıları farklı olmasına rağmen esrara benzer olarak endokannabinoid sistem üzerindeki CB1 ve CB2 reseptörlerini etkilemektedir.

CB1 reseptörleri merkezi ya da perifer sinir sistemi, kemik, kalp, karaciğer, akciğer, vasküler endotelyum ve üreme sisteminde bulunmaktadır. CB2 reseptörleri başlıca immun sistemde yoğunlaşmıştır, fakat az miktarda da merkezi sinir sisteminde de bulunur [53,54]. Sentetik kannabinoidler çoğunlukla pre-snapitik terminaller üzerine yerleşmiş olan G-protein çiftli CB1 reseptörlerini uyarırlar. CB1 reseptör aktivasyonu

hücrel siklik adenosin monofosfat (cAMP) miktarını düşürür ve kannabimimetik cevap oluşmasını sağlar [55]. Sentetik kannabinoid reseptör agonistleri, voltaj-kapılı iyon kanalları ile etkileşime girerek potasyum, sodyum ve N ve P/Q tip kalsiyum kanallarını inhibe eder ve membran potansiyelini düşürürler [56].

Birçok farklı sentetik kannabinoidin organizma üzerindeki ortak dört ana etkisi; hipotermi, analjezi, katalepsi ve lokomotor baskılamadır. Bu etkilere kannabinoid tetradı adı verilir ve bu etkilerin derecelendirilmesi ile farklı maddelerin reseptörler üzerindeki etkileri karşılaştırılır [7]. THC ile kıyaslandığında bazı sentetik kannabinoidler CB1 reseptörüne 4-5 kat daha fazla bağlanma afinitesine sahiptir [8]. Buna ek olarak JWH-073 metabolitleri, zenginleştirilmiş reseptör-efektör çiftlerine ana ilaçtan daha etkili bir sinyal etkinliği sağlamaktadır [4]. JWH-073 metabolitlerinden birinin nötral bir CB1 reseptör agonisti olduğu belirtilmiştir. Bu maddenin zayıflama üzerinde etkili olduğu düşünülmekte ve konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir [57].

JWH-073, γ -aminobutirik asit iletimini inhibe eden majör vericidir. Merkezi sinir sisteminde esrardan daha güçlü bir inhibitördür [2].

Bu tür maddelerin klinik etkileri yayınlanmış olan olgu çalışmalarının derlenmesiyle belirlenmiştir. Bu etkiler belirlenirken internet üzerinden paylaşımda bulunan bloglar da fazlaca kullanılmıştır. En fazla rapor edilen etkiler merkezi sinir sistemi etkileridir bunlar; anksiyete, öfke patlaması, paranoya, göz temasından kaçınma, ajitasyon, delüzyonlar, psikozlar, kusma ve tepkisizliktir [58, 59]. Klinik etkileri taşikardi, hipertansiyon, konvulsiyon, göz iltihabı, terleme, göğüs kafesinde ağrı ve ağız kuruluğu olarak rapor edilmiştir. Buna ek olarak bazı kaynaklar sentetik madde kullanımının intihara meyli arttırdığını belirtmişlerdir [59, 60]. Buna ek olarak bazı olgu raporlarında, hafif hipokalemi, miyokard infarktüsü, böbrek yetmezliği ve konvulsiyonlar rapor edilmiştir [15, 55-62].

17 yaşında bir erkek, K9 alımı sonrası göğüs ağrısı, taşikardi ve sonrasında bradikardi tanısıyla acil serviste gözlem altına alınmış, şikayetleri “nefes almada zorluk ve göğüs kafesinde baskı” olarak kaydedilmiştir. Terleme ve kusma şikayeti olmayan hasta K9 almadan bir saat önce “Oxyelite” isimli (100 mg kafein ve diğer bileşenler) diyet ilacını aldığını söylemiştir. Alımdan 30 dak. sonra kalp atış hızı 140 ve tansiyon 136/78 mm Hg olarak ölçülmüştür. Hastane müdahalesinden 11 saat sonra kalp atış hızı 48 ve tansiyon 121/59 mm Hg olarak ölçülmüştür, bradikardi mevcuttur [3].

4-6 mg JWH-073 kullanmış bir kullanıcının tanımladığı belirtiler insan beyninin önünde ve gözlerin arkasında basınç, bulanıklık ve hareketlilik (esrarla aynı süreç ve etkiler) şeklindedir. Gün içinde tekrarlayan alımlarda kişi esrarinkine benzer “suistimal edilen maddenun etkisi altında, yorgun ve bulanık” etkiler hissetmiş, maddeyi iyi bir kenevir kadar ilginç bulmuştur [6].

Harris ve ark. 3 ay boyunca “spice” kullanımına bağlı önemli şikayetlerle acil servise başvuran hastaları incelemişler ve altı olgu tespit etmişlerdir. İki hasta geçici felç şikâyetiyle başvurmuş, diğer iki hastada halüsinasyon saptanmış, sadece bir hastada taşikardi gözlemlenmiştir. Acil serviste gözlem süresi ortalama 2-8 saat olmuştur ve hiçbir hasta tekrarlayan felç durumundan bahsetmemiştir. Birçok sentetik kannabinoidin esrardan daha potent oldukları ve psikoaktif dozlarının <1 mg olduğu tahmin edilmektedir [63].

Esrarın düzenli alımının kesilmesinin ardından yoksunluk reaksiyonları görülmezken sentetiklerde bu etkilerin görüldüğü gözlemlenmiştir [64]. Bağımlılık etkisini yaratan asıl etkilerin; antikonvulsan aktivite, kataleptik etki, lokomotor aktivitenin baskılanması, hipotermi, hipotansiyon, kortikosteroidlerin salınımı olduğu düşünülmektedir [7]. Kayda değer ilk geri çekilme sendromu bilgisi 8 ay boyunca her gün düzenli olarak Spice kullanan 20 yaşındaki bir erkek kullanıcıdan gelmiştir. Kişi bu maddeyi başlangıçta rahatlatıcı, yatıştırıcı ve esrar benzeri etkilere sahip olarak tanımlarken sonrasında yoksunluk periyodunda içsel huzursuzluk, yoğun terleme, madde özlemi, gece kâbusları, titreme ve baş ağrısı yaşadığı için tıbbi tedavi talebinde bulunmuştur [65].

Sentetik kannabinoidleri kullananlarda geveleyerek konuşma, uyuşukluk, yüksek kan basıncı, inme, hissizlik, halüsinasyon, asabilik, taşikardi, paranoya ve anksiyeteyi de içeren çeşitli toksik etkiler rapor edilmiştir. Yeni nesil kannabinoidlerin reseptör afiniteleri oldukça yüksek olduğundan, bu maddelerin yan etkilerinin de oldukça ciddiye alınması gerektiği ifade edilmiştir [8]. Bu olguların tedavisi daha çok destekleyici tedavi niteliğindedir, spesifik bir antidot bulunmamaktadır. Ajitasyon, taşikardi, hipertansiyon, anksiyete ve konvülsiyon gibi semptomların tedavisi için diazepam ya da lorazepam gibi benzodiazepinler kullanılır. Ek olarak iç/dış soğutma, yüksek dozda benzodiazepin, agresif hidrasyon, sedasyon ya da entübasyon gerekli olabilir. Ayrıca distonik reaksiyonlar ve kas sertliği için difenhidramin kullanılabilir [15, 59].

Kronik kullanımdan kaynaklanan uzun dönem etkileriyle ilgili hiçbir bilimsel veri bulunmamaktadır. 3 hafta içinde dört kez ve 1.5 yıl boyunca günlük dozlar halinde düzenli olarak sentetik kannabinoid kullanan 10 kişilik sağlıklı bir erkek topluluğunda psikoz geliştiği gözlemlenmiştir. Bu olgu raporunda duyuşal ve görsel halüsinasyonlardan, paranoid kuruntulara, düşünme yetisinde tutukluktan bozulmuş konuşmaya ve uykusuzluktan sersemlik ve özkıyım düşüncesine kadar değışen bir grup psikotik semptom tanımlanmıştır. Bu etkiler esrara benzer olmakla birlikte alınan küçük dozlarda dahi esrardan daha ciddi yan etkilere neden olmaktadır [66].

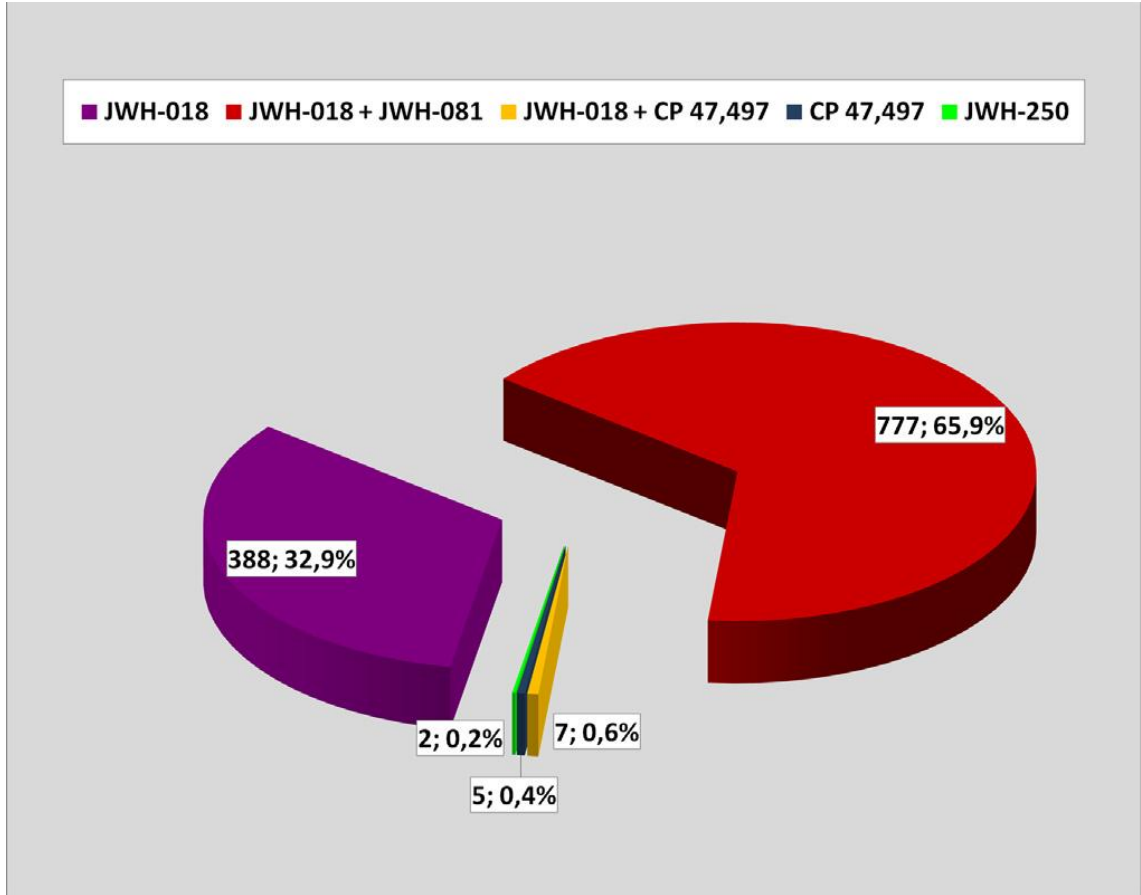
Uzun dönem yoğun esrar kullanımı azalan beyin hacmi ile ilişkilendirilmiştir. Hipokampus ve amigdalanın serebral kısımları sırasıyla %12 ve %7 oranlarında anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu kısımlar hafıza ve şizofreninin pato-psikolojisi ve duyguların işlenmesi ile ilgilidir. Buna benzer olarak uzun dönemli Spice kullanıcıları öfke ve anksiyete nöbetleri yaşamaktadır [8]. Uzun dönemde ve yüksek dozlarda kannabinoid alımının embriyonun gelişimine (implantasyon sorunu, düşük, erken doğum, anormaliler) zarar verdiği görülmüştür [13].

2.2.3. Yasal Kısıtlamalar ve Kullanım Sıklığı

İnternet üzerinden yaş sınırı ve yasal kontrol olmaksızın satılması bu maddelerin suistimali sorununa uluslararası bir boyut kazandırmıştır. Bu tür suistimal edilen maddelerin tanımlanması ve hızlı bir şekilde yasa kapsamını sağlamak üzere hizmet veren EMCDDA (Avrupa Suistimal edilen madde Ve Suistimal edilen madde Bağımlılığı İzleme Merkezi) konsey kararıyla (2005/387/JHA) EWS (Erken Uyarı Sistemi)'yi kurmuştur. Ülkemiz bu sisteme 2006 yılında üye olmuştur ve suistimal edilen maddenin izlenmesi ile ilgili tüm veriler en kısa sürede bu merkeze üye olan tüm ülkelerle paylaşılmaktadır.

2008 yılı sonlarında THC Pharma firmasının bitkisel içerikli olduğu iddia edilen bu ürünlerde sentetik esrarları tespitinin ardından 2009 yılı başlarında ilk olarak Almanya'da bu maddeler yasaklanmıştır. Daha sonra Avrupa Birliği ülkelerinin birçoğunda bu maddeler yasaklanmıştır. Ülkelerin bir kısmı maddelerin kendisini yasaklarken bir kısmı "jenerik yasa" ile birbirine benzeyen tüm maddeleri yasaklamıştır. Ülkemizde bu madde ilk olarak 2010 yılında tespit edilmiştir [67].

Şekil 2-4’de 2010-2012 yılları arasında Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Narkotik Şubesi’ne savcılık ve mahkemeler tarafından gönderilmiş ve incelenmiş bitkisel görünümlü maddelerin dağılım yüzdeleri gösterilmektedir [68].



Şekil 2-4: Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Narkotik Şubesi’ne Ağustos 2010-Mart 2012 tarihleri arasında gönderilen bitki görünümlü suistimal edilen maddelerin dağılımı (Esrar Hariç) [68]

Bunu takiben JWH-073 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 07.01.2011 tarih, 1310 sayılı Bakanlar Kurulu kararı ile kanun tarafından kullanılması, bulundurulması, üretilmesi ve ticaretinin yasak olduğu suistimal edilen madde ve uyarıcı maddeler listesine alınmıştır [69] (Şekil 2-5).

2015 yılında ise Adli Tıp Kurumu ve Sağlık Bakanlığı gibi resmi kuruluşlar tarafından yapılan öneriye istinaden bu maddeler ve bu maddelerden üretilen tüm türevleri isim anılmaksızın yasa kapsamına alınmıştır [70]. Bu yasa Avrupa ve Dünya çapında uygulanan bir tür “jenerik” yasadır

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 Milli 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 Köy İşleri Bakanı	Ö. DİNÇER Çalışma ve Sos. Gv. 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 2-5: 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı resmi gazete [70].

Maddelerin kullanım sıklığının belirlenmesi amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. 2010 yılında ülke çapında sentetik esrar ve banyo tuzlarına bağlı acil

servisleri arama sayıları 3200 iken bu sayı 2011’de 13000 olarak kaydedilmiştir. Sentetik kannabinoidler toplumda esrardan sonra en çok suistimal edilen ikinci madde durumundadır 9. sınıf lise öğrencisi bir önceki sene de sentetik esrar kullandığını itiraf etmiştir [71-72].

İngiltere ve Galler’de her yıl ev sakinleri arasında yapılan anketlerde 15-24 yaş arası “spice” kullanımının %0.4 ve 25-29 yaş arası kullanımın ise %0.1 arttığı ortaya çıkmıştır [73]. 2013 yılında yayınlanan bir araştırmaya [74] göre 2011 yılında internet üzerinden yapılan bir ankete katılanların %17’si sentetik esrar kullandığını kabul etmiştir. Bu kişilerden %41’i bir önceki sene de kullanmıştır. Sentetik esrar kullanıcılarının %99’u daha önce esrar kullanmıştır. Michigan Üniversitesi’nin liselerde yaptığı bir ankette 12. sınıfların %11.3; 10. sınıfların %8.8 ve 8. Sınıfların %4.4’ü sentetik esrar kullanmaktadır. Bu sayı, bahsi geçen sınıflarda esrar kullananların yaklaşık üçte biri kadardır [74].

14 Ekim 2011- 2 Kasım 2011 ve 26 Mart 2012- 23 Nisan 2014 tarihleri arasında Norveç Halk Sağlığı Enstitüsü’nün yaptığı 7 haftalık bir çalışmada güvenli sürüş uygulaması amacıyla örnekleri alınmış olan 726 olgu incelenmiştir. Bu kan örneklerinden 16 tanesi sentetik kannabinoid bakımından pozitif bulunmuştur. 11 kişi ilaç etkisi altında araç kullanımı şüphesiyle, 4’ü trafik kazasına karıştığı için ve bir tanesi de yasadışı ilaç kullanımı şüphesiyle kan vermiştir. İlaç etkisi altında araç kullanımında sentetik kannabinoid oranı % 2.2’dir. Bu çalışma, maddeyi sadece genç bireylerin kullanmadığını ve büyük çoğunluğun erkek olduğu gerçeğini de ortaya koymuştur [57].

Son olarak ülkemizde Eylül 2012 ve Eylül 2013 arasında savcılık tarafından gönderilen 636 şüpheliye ait 868 örnekten 471 tanesi suistimal edilen maddeler bakımından pozitif bulunmuştur. Bu olguların %50.5’inde JWH-018 ve metabolitleri pozitif bulunmuştur [75]. Bu da ülkemizde sentetik esrar kullanımının ne kadar yaygın olduğunu gözler önüne sermektedir.

Sentetik kannabinoidlerin hızla yenilerinin üretilmesi ve geliştirilmesi analiz metotları oldukça yetersiz kılmaktadır. Bu yüzden kullanım sıklığı artmakta ve erişim kolaylığı nedeniyle kullanıcı yaş ortalaması giderek düşmektedir.

2.2.4. Analiz yöntemleri

Maddelerin tanımlanması için pek çok analiz yöntemi birlikte kullanılmıştır. Öncelikle maddelerin bitkisel ürünlerde tespit edilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda LC-MS, LC-MS/MS, GC/MS, TOF ve NMR sistemleri maddelerin yapısının belirlenmesi ve isimlendirilmesi için kullanılmıştır[16, 18, 20-27].

Maddelerin ve metabolitlerinin belirlenmesi ve biyolojik sıvılarda tespiti için yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda GC/MS ve LC-MS/MS sistemleri kullanılmıştır [28-52]. Bu çalışmaların tamamına yakınında uygun deteksiyon limiti, kolaylığı, türevlendirme gerektirmemesi, analiz maliyetinin düşüklüğü ve analiz süresinin kısalığı gibi avantajları nedeniyle LC-MS/MS tercih edilmiştir.

Tablo 2-2’de JWH-073 maddesi ve metabolitlerinin tayini amacıyla yapılmış çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2-2: JWH-73 ve Metabolitleri ile ilgili yapılan çalışmalar materyal, numune hazırlama yöntemleri, analiz yöntemleri ve tayin sınırları

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
1	JWH-073 JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD 0.1 ng/mL	[27]
2	JWH-073	Saç	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS		[28]
3	JWH-073 JWH-073 N-bütanoik asit	Karaciğer Mikrozomları	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[48]
4	JWH-073 JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[42]
5	JWH-073	Tükürük	Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[34]

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
6	JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD 0.1 ng/mL 0.025 ng/mL	[47]
7	JWH-073 N-bütanoik asit	İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	-	[48]
8	JWH-073	Kan Beyin	Protein Çöktürme	LC-MS/MS	LOQ 1 ng/mL	[39]
9	JWH-073 JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	Plazma İdrar	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	GC/MS	-	[50]
10	JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Protein Çöktürme	LC-MS/MS	-	[45]
11	JWH-073 JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Katı Faz Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD 0.1 ng/mL	[49]

No	Madde	Materyal	Numune Hazırlama Yöntemi	Analiz Yöntemi	Tayin Sınırı	Kaynak
12	JWH-073	Serum	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD 0.05 ng/mL	[38]
13	JWH-073	Saç	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	UHPLC-MS/MS	LOD 0.01 ng/mL	[31]
14	JWH-073 JWH-073 N-bütanoik asit JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	Saç	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	LC-MS/MS	LOD 0.01 ng/mL	[30]
15	JWH-073	Tükürük	Seyreltme	UHPLC-MS/MS	-	[35]
16	JWH-073 JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl)	İdrar	Katı Faz Ekstraksiyonu	HPLC-MS/MS	LOD 0.01 ng/mL	[50]

2.3. LC-MS/MS Yöntemi

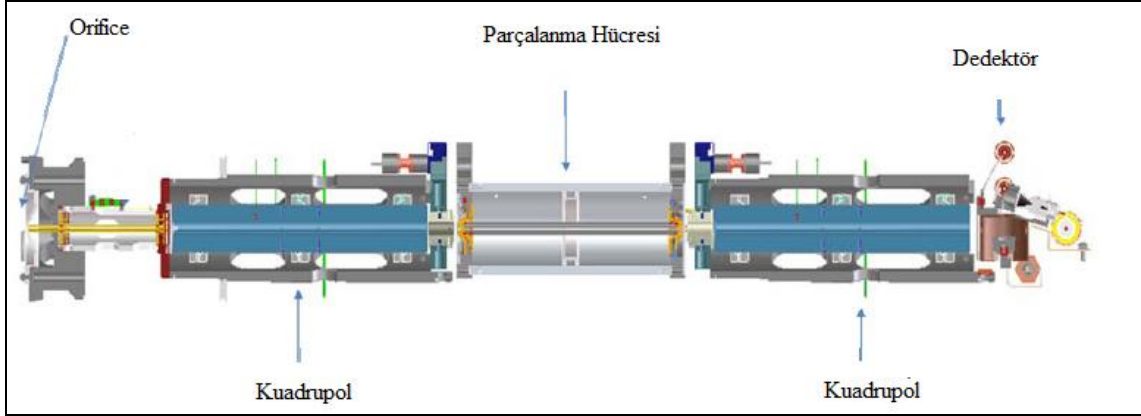
Kütle spektrometresi (MS) tekniğinin seçiciliği yüksek olmasına karşın tek başına analiz edilecek maddeyi aynı matriks içinde bulunan diğer moleküllerden ayırması oldukça güçtür. MS tekniği maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırmak üzere dizayn edilmiş bir sistemdir, ayırmaya yardımcı olan sıvı kromatografisi (LC) sistemi ile kombine edildiğinde (LC-MS), her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/ Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi dizayn edilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sistem hassasiyet, hız ve seçicilik gibi özellikleri nedeniyle son dönemlerde sıklıkla tercih edilmektedir [76].

Bu sistem temelde sıvı kromatografisi, iyon kaynağı, kütle analizörü, detektör ve yazılımdan oluşmaktadır. Sıvı Kromatografi kısmı maddeleri fizikokimyasal özelliklerine göre ayırır ve iyon kaynağına bu sıraya göre gönderir. İyon kaynağı bu maddeleri buharlaşabilen ve analizi istenmeyen diğer maddelerden ayırarak gaz fazına dönüştürür ve analiz edilmesini sağlayan pozitif ve negatif yükleri kazandırır. Kütle analizörü bu yüklü parçacıkları kuadropollerde m/z oranları ve yüklerine göre ayırır. Detektör ayrılmış bu moleküllerin iyon enerjilerini elektriksel sinyallere çevirir. Son olarak yazılım bu sinyalleri alan değerine dönüştürerek okur ve analiz gerçekleştirilmiş olur.

Sıvı kromatografisindeki temel amaç maddelerin yapılarına göre farklı tutunma zamanlarında birbirinden ayrılmasını sağlayarak bu maddeleri farklı zamanlarda iyon kaynağına yollamaktır. Bu amaçla öncelikle analiz edilecek maddeler açısından rezolüsyonu iyi bir analitik kolon seçilir. Maddelerin kolonda hareket etmesini ve farklı zamanlarda kolonda tutunmasını sağlamak üzere mobil fazlar kullanılır. Bu mobil fazların farklı oranlarda kolona gönderilmesiyle ayrılma sağlanmış olur. Mobil fazların farklı oranlarda sisteme gönderilmesini sağlayan sistem bileşenleri ise pompalardır.

İyon kaynakları maddelerin vakum altında solventten uzaklaştırıldığı ve yapısına göre yük kazandırıldığı bölümdür. Maddenin polaritesine göre elektrosprey (ESI) ya da atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kaynakları kullanılmaktadır [76]. Bazı maddeleri bu iki kaynakta da iyonlaşabilmektedir. Bu kısımda maddelerin vakum altında efektif olarak buharlaştırılabilmesi için akış [0.2-2 mL/dk] belirli bir miktar aralığında sınırlandırılmıştır. Düşük akışlarda analit kaybı gözlenirken yüksek akışta maddenin gaz haline geçmesi engellenmektedir.

Kütle analizörleri maddelerin m/z oranlarına göre ayrılmasını sağlamak üzere tasarlanmış manyetik yüzeye sahip iletkenlikleri yüksek ve metal aşınmasına dayanıklı yüzeylerdir. Bu yüzeyler üzerine sırasıyla ya da birlikte RF (Radyo Frekans) ve DC (Doğrusal Akım) voltajları uygulanır. Bu da analizi istenen moleküllerin hızını ve yörüngesini ayarlamaktadır. Şekil 2-6’da temel kütle analizör bileşenleri gösterilmiştir.



Şekil 2-6 Tandem Kütle Spektrometresi Genel Görünümü [76]

Giriş kuadrupolünde (Q1) analizi hedeflenen yüklü ana madde seçilir. Bu madde parçalanma hücresi (Q2) olarak isimlendirilen ikinci kuadrupolde azot gazı altında parçalanır ve fragmentlerine ayrılır. Bu fragmentler üçüncü kuadrupolde (Q3) aynı hıza getirilir ve detektöre yollanırlar.

LC-MS/MS sisteminde metodun geliştirilmesindeki en önemli basamaklar; analizi yapılacak maddenin özelliklerinin tanımlanması, maddelerin cihaz üzerinde optimizasyonu, maddeye özgü fragmentlerin belirlenmesi, maddenin yapısına uygun analitik kolonun belirlenmesi, kolon üzerindeki akış ve sıcaklık parametrelerin belirlenmesinden oluşmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler

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

3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Amonyak	Merck
Amonyum format	Sigma Aldrich
Asetik asit	Merck
Asetonitril	Panreac
Etil Asetat	Panreac
Formik asit	Merck
JWH-073 standardı	Cayman
JWH-073 N-(4-hidroksibütil) standardı	Cayman

JWH-073 N-bütanoik asit standardı	Cayman
Metanol	Panreac
THC-d3(IS)	Lipomed
Ultra saf su	Panreac

3.2.2. Çözeltiler

İç Standart (IS) çözeltileri:

Stok IS (10 µg/mL) çözeltisi: 1mg/mL'lik THC-d3 çözeltisinden 1 mL alınıp metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Ara Stok IS (500 ng/mL) çözeltisi: Stok iç standart çözeltisinden 500 µL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) standart çözeltileri:

Ana stok çözeltisi(100 µg/mL): 5 mg standart JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) 50 mL metanolde çözöldü.

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

Kan ve idrar katım örneklerinin hazırlanması için:

Kan katım örneklerine eklenecek 0.75; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır:

İdrar katım örneklerine eklenecek 1; 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ng/mL konsantrasyonlarındaki çözeltiler hazırlanmıştır:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tüm standart çözeltiler taze olarak hazırlanmış ve kullanılabilecek +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. Çözeltiler örneklerin çalışıldığı gün taze olarak hazırlanmıştır.

Mobil Fazlar:

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

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

Mobil Faz B: 1 M amonyum format çözeltisinden 2 mL ve %99.8 saflıkta formik asitten 2 mL alınarak yüksek saflıkta Asetonitril (ACN) ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

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

3.3. Biyolojik Örnekler

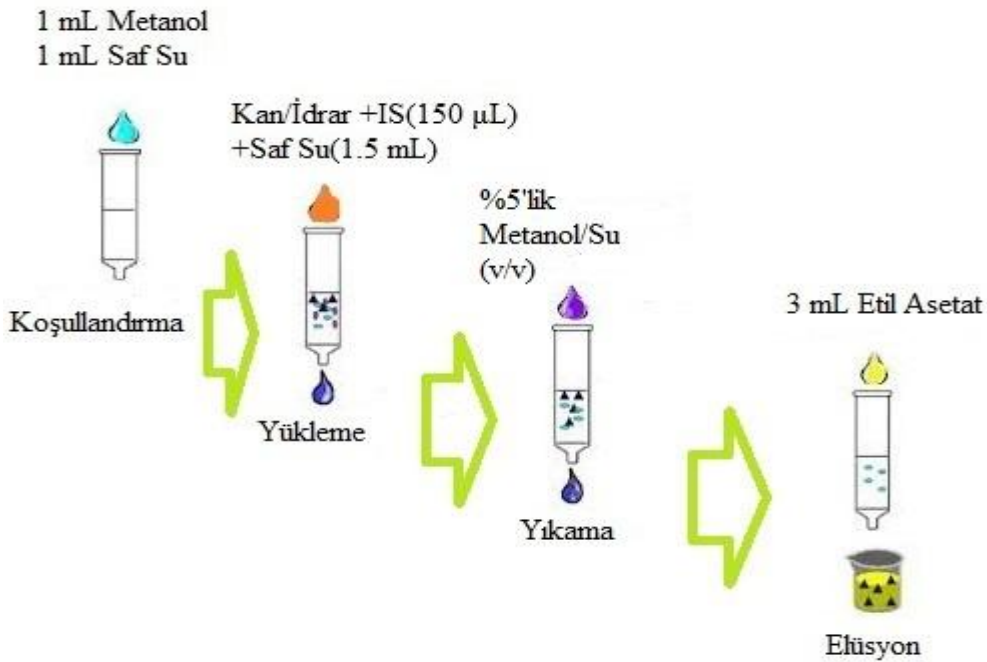
Kızılay Kan Merkezinden bağışlanan sodyum florürlü tüplere alınan tam kan örnekleri analiz gününe dek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. İdrar örnekleri suistimal edilen madde kullanım şüphesi olmayan gönüllülerden alınmış ve analize dek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Kan ve İdrar Örneklerin Hazırlanması

Bu örneklerin ekstraksiyonunda, laboratuvarımızda sentetik kannabinoidlerin analizi için özel olarak geliştirilmiş katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Katım yapılacak kan ve idrar örneklerinden 1.2 mL alınarak üzerine 150 μ L IS (500 ng/mL) ile 150 μ L istenen konsantrasyonda standart çözelti karışımı eklenmiştir. 1.5 mL hacimdeki bu karışım üzerine 1.5 mL saf su eklenerek çalışılacak örnek hacmi 3 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek vorteks yardımı ile 1 dk karıştırıldıktan sonra 10 dk süre ile 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Oasis HLB kartuşu sırasına göre 1 mL metanol ve 1 mL saf su ile koşullandırılmıştır. Örnek kartuştan yaklaşık 2 mL/dk hızla geçirilmiştir. HLB kartuş 1 mL %5'lik metanol/su (v/v) ile yıkandıktan sonra 20 dk süre ile kartuştan azot geçirilerek kurutuldu. Elüsyon 3 mL etil asetatla yapılmıştır. Toplanan bu eluent azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulmuştur. 1mL mobil faz A ile çözülerek 0.22 μ filtreden geçirilmiş ve vialle alınarak analize hazır hale getirilmiştir.

Matriks boşu olarak kullanılacak örneklerden 1.35 mL alınarak üzerine 150 μ L IS (500 ng/mL) eklenmiştir. Hazırlanan 1.5 mL örnek üzerine 1.5 mL distile su eklenerek toplam örnek hacmi 3 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek vorteks yardımı ile 1 dk karıştırıldıktan sonra 10 dk süre ile 4000 rpm'de santrifüj edilmiş ve yukarıda katım örnekleri için açıklanmış yöntem uygulanarak analize hazır hale getirilmiştir. Örneklerin hazırlanması Şekil 3-1'de özetlenmiştir.



Şekil 3-1: Kan/İdrar örneklerinin ekstraksiyon basamakları

3.5. LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları

3.5.1. Sıvı Sistem Özellikleri

Akış hızı	1 mL/dk
Analiz süresi	8 dk
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Mobil Faz A	% 0.2 (Formik Asit + 2 mM Amonyum Format) (Suda) (v/v)
Mobil Faz B	% 0.2 (Formik Asit + 2 mM Amonyum Format) (ACN'de) (v/v)

Tablo 3.1'de UPLC üzerinde uygulanan akış diyagramı gösterilmiştir.

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

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

3.5.2. MS/MS Sistem Özellikleri

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

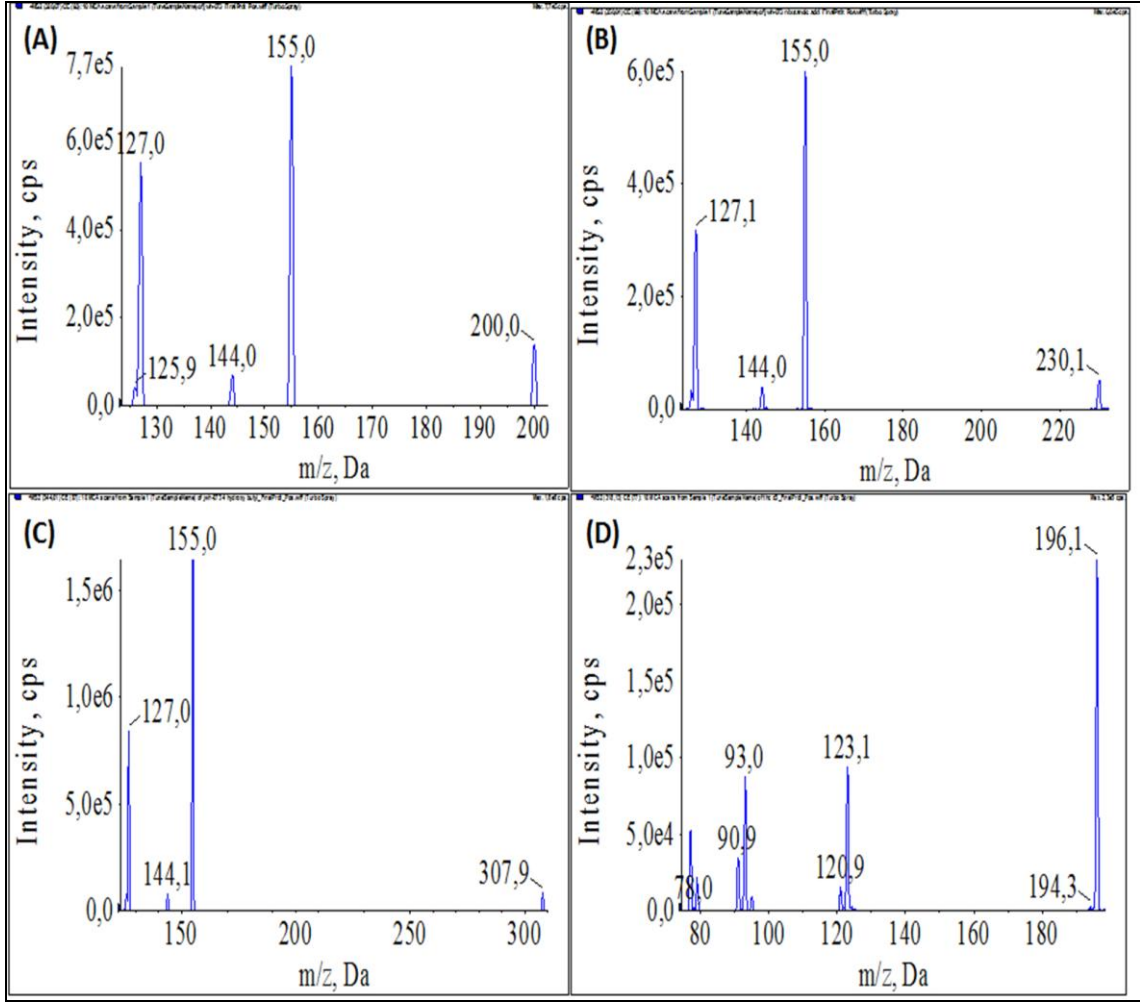
Tablo 3-2' de JWH-073 ve metabolitlerine ait MS/MS metot değerleri verilmiştir.

Tablo 3-2: JWH-073, Metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş Moleküler İyon, Prekürsör İyon, DP (Kümeleşme Önleyici Potansiyel), EP (Giriş Potansiyeli), CE (Parçalanma Enerjisi), CXP (Parçalanma Çıkış Enerjisi) ve Alıkonma zamanı değerleri.

Madde	Transisyon	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	RT (min)
JWH-073	328.2> <u>155.0</u> /127.1/144.0	80	10	29/53/29	10/8/12	4.71
JWH-073 N-bütanoik asit	358.2> <u>155.0</u> /127.0/144.0	80	10	29/57/37	10/8/8	4.20
JWH-073 N- (4-hidroksibütil)	344.2> <u>155.0</u> /127.1/144.1	80	10	27/47/41	8/10/8	4.11
IS (Δ9-THC-d ₃)	318.2> <u>196.1</u> /123.1/93.0	110	10	29/47/31	16/12/4	4.82

**İtalik fragmentler kantitasyon için kullanılmıştır.*

JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit, JWH-073 N-(4-hidroksibütil) ve THC-d₃ standartlarının infüzyonu ile elde edilen parçalanma spektrumları sırasıyla Şekil 3-2'de verilmiştir.



Şekil 3-2: İnfüzyon sırasında moleküler iyonlardan elde edilmiş JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B), JWH-073 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) maddelerine ait infüzyon spektrumları

3.6. Validasyon Çalışmaları

Uygulanan yöntemin validasyonu FDA Biyoanalitik Metot Validasyonu ve diğer uluslararası validasyon rehberlerine uygun olarak yapılmıştır [77-82]. 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 ve idrar örnekleri biyolojik matriksten kaynaklanabilecek olası tüm girişimler için 10'ar ($n \geq 6$) kez örneklenerek LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Spektrumlarda JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) maddeler için belirlenmiş spesifik alıkonma zamanlarında herhangi bir pik olup olmadığı incelenmiştir.

3.6.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Validasyonu yapılan metodun doğru sonuç verdiği aralık belirlenmiştir. Kan ve idrar örneklerine standart çözeltilerden 0.1; 0.25; 0.5; 1; 2.5; 5; 10; 25; 50 ng/mL konsantrasyonlar sağlanacak şekilde ilave edilerek 3.4 de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Her bir konsantrasyon basamağı için birbirinden bağımsız ikişer kan ve idrar örneğinin ekstraksiyonu yapılmıştır. Her bir analit için elde edilen alan ile IS arasında doğrusal bir grafik çizilmiş ve denklem yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Validasyon rehberine göre belirleme katsayısı (r^2) >0,99 olmalıdır.

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

Detektör tarafından tespit edilen en küçük sinyalin matriks tarafından oluşturulan gürültüden (noise) ayırt edilebildiği en düşük miktar o maddenin teşhis sınırıdır. Buna ek olarak analiz edilen madde ile ilgili en düşük doğru madde miktarının hesaplanabildiği konsantrasyon değeri de o maddenin tayin alt sınırıdır.

Teşhis ve tayin alt sınırı değerleri;

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

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

X_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin ortalaması

S_{bl} = Analitsiz ölçümlerinin standart sapması,

formülleri ile hesaplanmıştır.

3.6.4. Geri Kazanım

Geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerlerinin hesaplanmaları Matuszewski ve ark.'na [81] uygun olarak yapılmıştır. Bu kapsamda; Düşük (0.1 ng/mL), Orta (5 ng/mL) ve Yüksek (50 ng/mL) konsantrasyonlarında JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksi bütil) 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-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl) 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 tekrarla yapılmıştır.

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

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

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

Formülleri ile hesaplanmıştır.

3.6.5. Kesinlik

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

3.6.6. Kararlılık

JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl) maddelerinin metanol ve de 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.

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır.

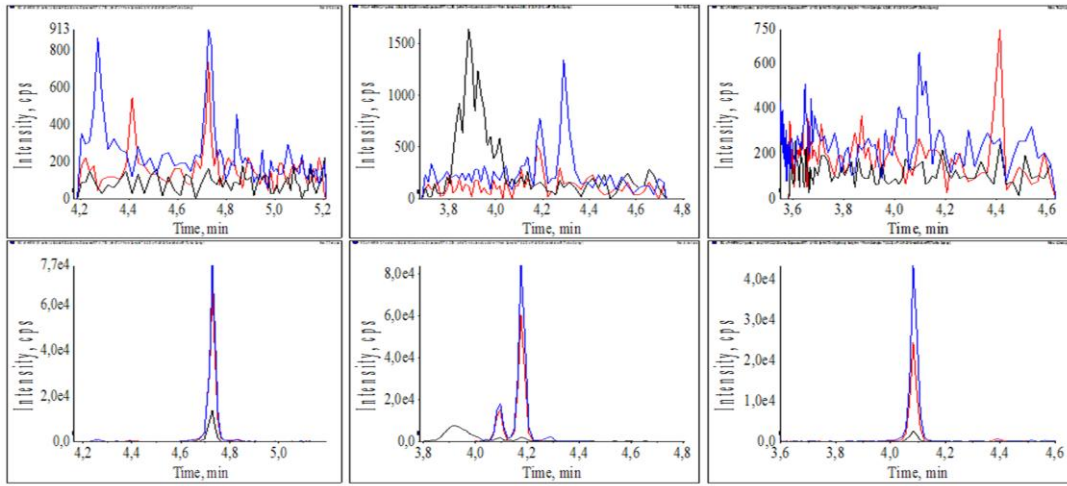
4. BULGULAR

4.1. Metot Validasyonu

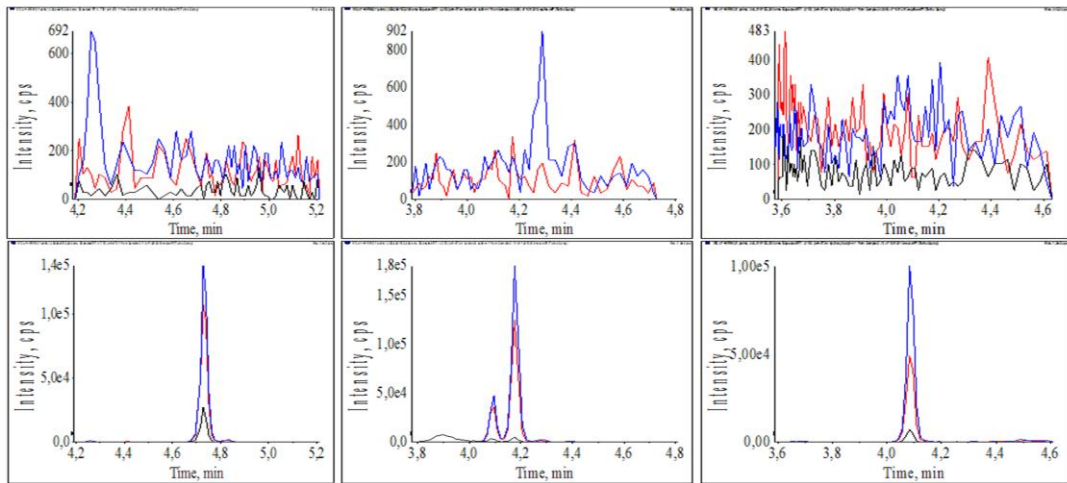
4.1.1. Seçicilik

3.4 ve 3.6.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen kromatogramlarda, maddeler için belirlenen alıkonma zamanlarında boş kan ve idrar örneklerinde hiçbir girişim tespit edilmemiştir. Şekil 4-1'de JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit, JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl) maddelerinin (A) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) kanda ve (B) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) idrarda MRM kromatogramları gösterilmiştir.

(A)



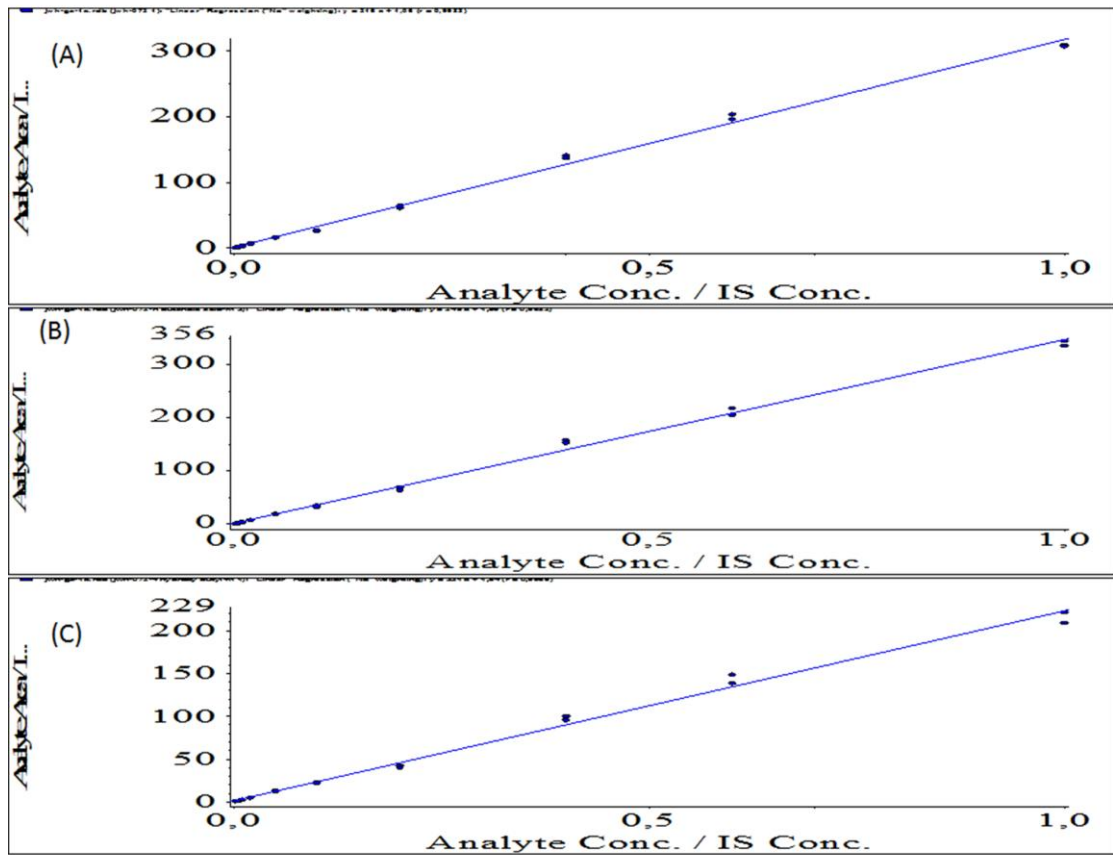
(B)



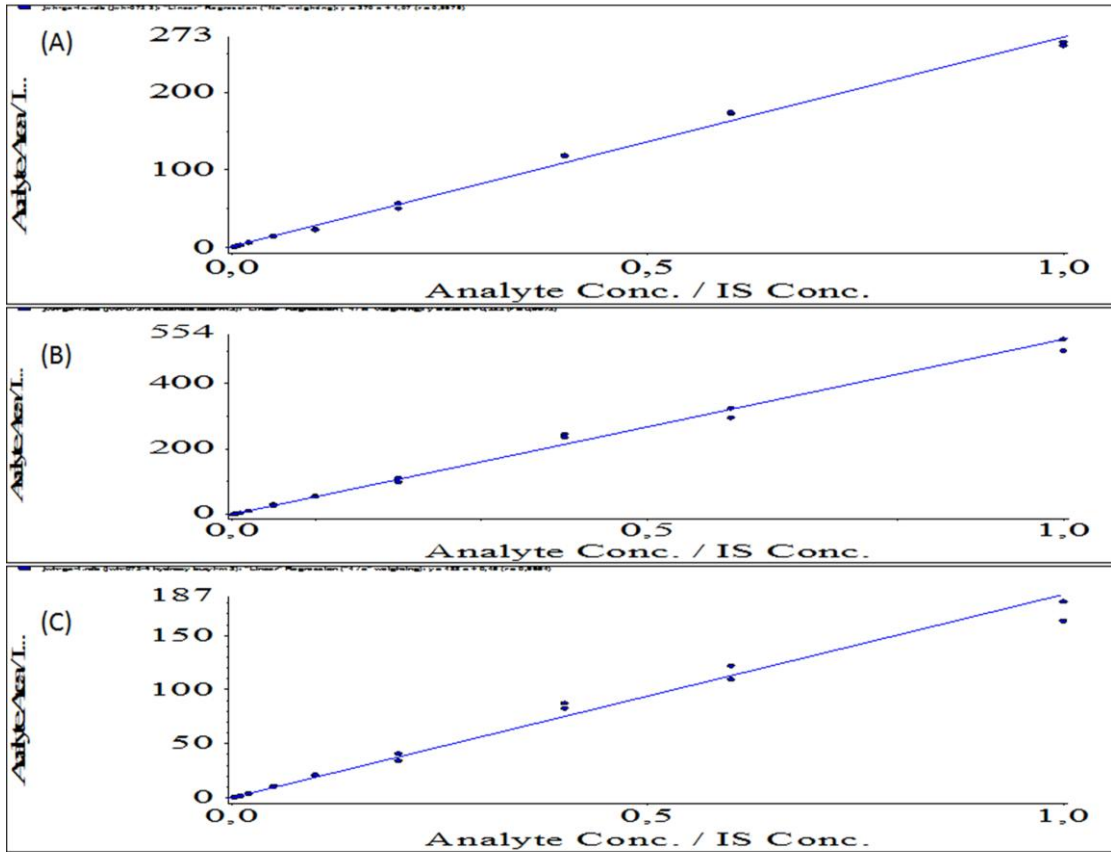
Şekil 4-1: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit, JWH-073 N-(4-hidroksi bütıl) maddelerinin (A) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) kanda ve (B) boş ve katım yapılmış (0.25 ng/mL) idrarda MRM kromatogramları

4.1.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

3.4 ve 3.6.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen örnekler ile metodun doğrusal aralığının hesaplanması için 0. 1; 0.25; 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 ve 50 ng/mL konsantrasyonlar sağlanacak şekilde örneklerle karşılık gelen pik alanı ile IS pik alanı arasında grafik çizildi. Dokuz farklı konsantrasyonda ikişer ölçüm yapıldı. Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te sırasıyla JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) maddeleri için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrileri görülmektedir.



Şekil 4-2: Kanda JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B) ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) (C) maddeleri için kalibrasyon eğrileri.



Şekil 4-3: İdrarda JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B) ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) (C) maddeleri için kalibrasyon eğrileri.

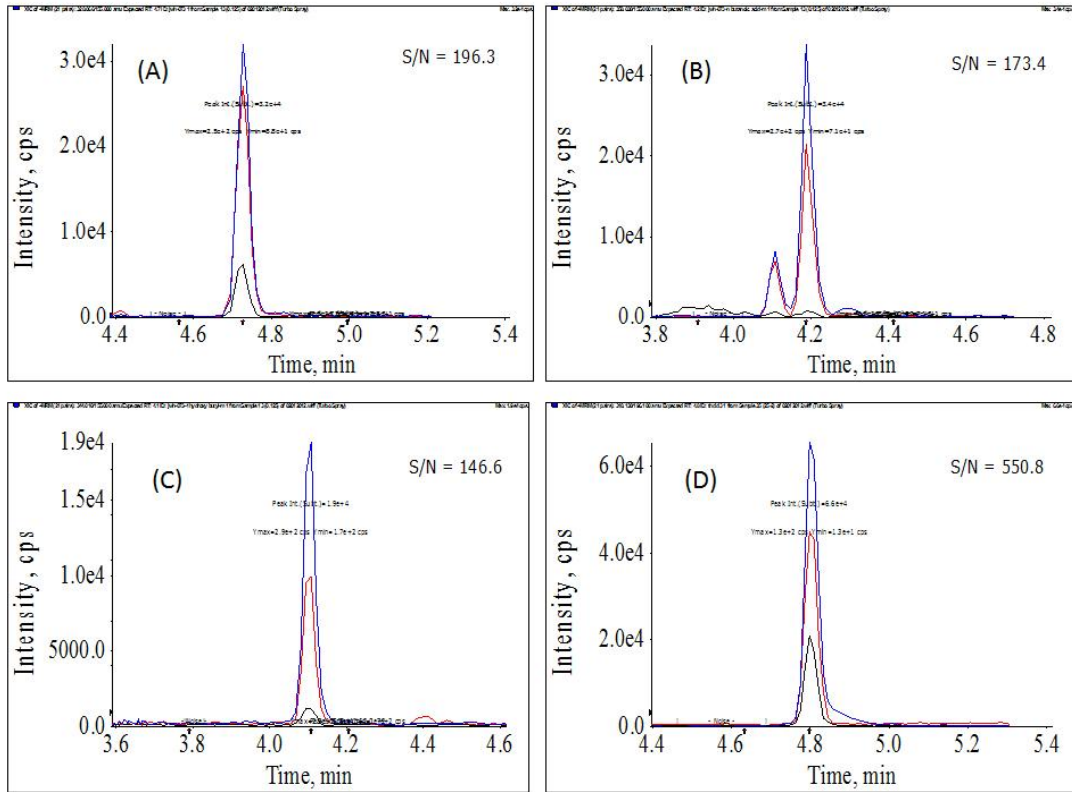
JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, lineer dinamik aralığı ve belirleme katsayıları Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) için kan ve idrarda çizilmiş olan kalibrasyon eğrilerinin denklemi, doğrusal aralığı ve belirleme katsayıları

	Madde	Doğrusal Aralık	Denklem	Korelasyon Katsayısı(r^2)
KAN	JWH-073	0.1-50 ng/mL	$y=316x+1.06$	0.998
	JWH-073 N-bütanoik asit	0.1-50 ng/mL	$y=345x+1.59$	0.998
	JWH-073 N-(4-hidroksibütül)	0.1-50 ng/mL	$y=221x+1.54$	0.997
İDRAR	JWH-073	0.1-50 ng/mL	$y=270x+1.07$	0.998
	JWH-073 N-bütanoik asit	0.1-50 ng/mL	$y=536x+0.38$	0.997
	JWH-073 N-(4-hidroksibütül)	0.1-50 ng/mL	$y=188x+0.15$	0.995

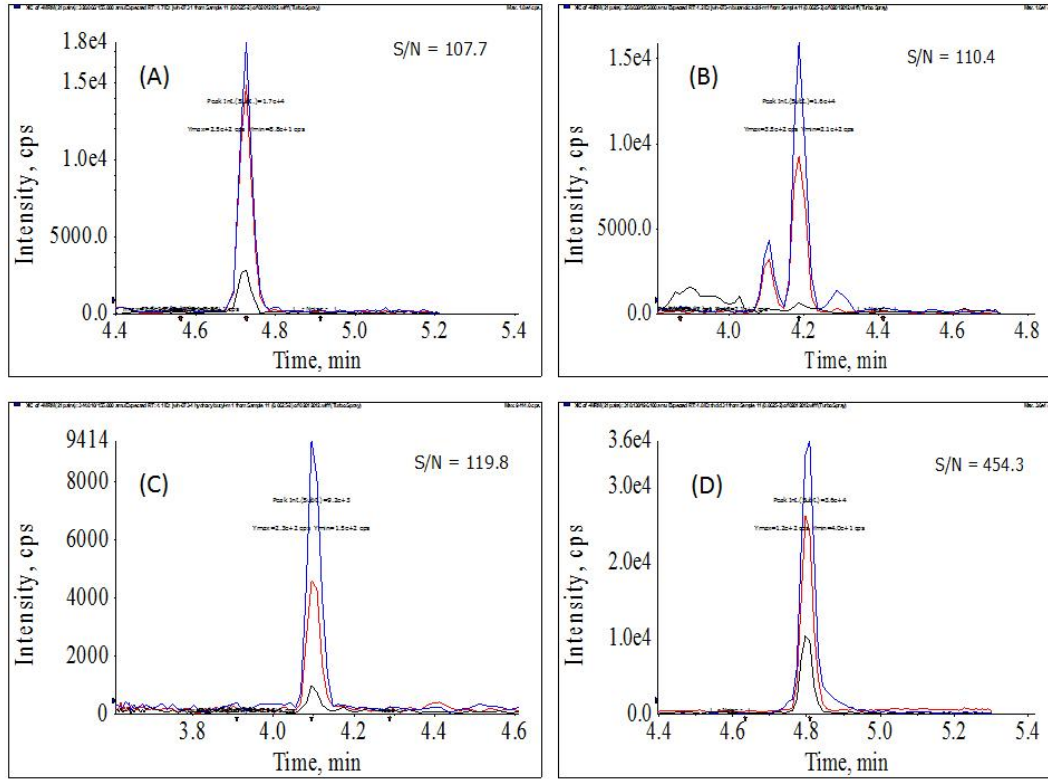
4.1.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı LOQ)

3.4 ve 3.6.3.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen, S/N (Sinyal/Gürültü) oranı en az 3 şartını taşıyan kan (0.1 ng/mL) ve idrar (0.075 ng/mL) örnekleri ile çalışılarak (n=10) JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) için LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Şekil 4-4'de katım yapılmış kanda 0.1ng/mL'de analitlerin S/N değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4-4: Katım yapılmış kan örneğinde JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B), JWH-073 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.1 ng/mL)

Şekil 4-5’de katım yapılmış idrarda 0.075 ng/mL’de analitlerin S/N değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4-5: Katım yapılmış idrar örneğinde JWH-073 (A), JWH-073 N-bütanoik asit (B), JWH-073 N-(5-hidroksipentil) (C) ve THC-d3 (D) için S/N değerleri (0.075 ng/mL)

Tablo 4-2’ de analiz edilen JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD ve LOQ değerleri verilmiştir.

Tablo 4-2: JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütül) maddeleri için kan ve idrarda elde edilen LOD (ng/mL) ve LOQ (ng/mL) değerleri (n=10)

Madde	KAN		İDRAR	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
JWH-073	0.13	0.17	0.09	0.13
JWH-073 N-bütanoik asit	0.12	0.17	0.09	0.13
JWH-073 N-(4-hidroksi bütül)	0.12	0.16	0.08	0.11

4.1.4. Geri Kazanım

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

Tablo 4-3: Kanda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).

Madde	Geri Kazanım			Matriks Etkisi			Proses Etkinliği		
JWH-073	75	79	85	106	95	92	79	75	78
JWH-073 N-(4-hidroksibütil)	86	88	91	95	92	97	81	81	88
JWH-073 N-bütanoik asit	77	83	86	101	94	96	78	78	83

Tablo 4-4: İdrarda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) geri kazanım, matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri (n=6).

Madde	Geri Kazanım			Matriks Etkisi			Proses Etkinliği		
JWH-073	82	88	95	93	99	100	76	86	94
JWH-073 N-(4-hidroksibütil)	87	92	94	110	94	99	95	86	92
JWH-073 N-bütanoik asit	84	90	94	104	95	96	87	86	90

4.1.5. Kesinlik

3.4 ve 3.6.5.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak kan ve idrar için hesaplanan kesinlik parametresi ve doğruluk değerleri Tablo 4-5' de ve Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-5: Kanda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) gün içi kesinlik ve doğrusalılık değerleri (n=10).

Madde	Kesinlik (CV, %)						Doğruluk (Bias, %)					
	Gün içi			Günler arası			Gün içi			Günler arası		
JWH-073	8.0	4.7	3.3	7.9	4.2	2.2	5.3	3.1	2.0	3.1	2.5	1.8
JWH-073 N-bütanoik asit	8.6	3.0	2.8	7.7	3.2	3.1	3.1	2.9	2.5	3.7	2.4	1.9
JWH-073 N-(4-hidroksibütil)	6.1	4.4	2.7	6.1	7.8	4.1	3.9	2.5	1.5	2.2	2.2	1.6

Tablo 4-6: İdrarda (0.1, 5 ve 50 ng/mL konsantrasyonlarında) gün içi kesinlik ve doğrusalılık değerleri (n=10).

Madde	Kesinlik (CV, %)						Doğruluk (Bias, %)					
	Gün içi			Günler arası			Gün içi			Günlerarası		
JWH-073	5.6	4.9	4.8	6.6	5.3	4.0	4.6	3.2	2.5	3.0	3.4	2.1
JWH-073 N-bütanoik asit	7.3	4.9	3.0	6.5	4.3	8.7	4.5	4.0	3.0	3.2	3.5	2.7
JWH-073 N-(4-hidroksibütil)	5.8	3.0	3.8	5.6	4.3	6.1	2.0	2.0	2.1	1.3	1.8	1.9

4.1.6. Kararlılık

3.4 ve 3.6.6.'de anlatıldığı şekilde yapılan kararlılık çalışmalarında metanolde, kan ve idrar örneklerinde -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

Esrar ve benzeri maddeler psikoaktif etkileri nedeniyle yüzyıllardır suistimal edilmektedir. Madde suistimalinin önlenmesi amacıyla alınan tedbirlere ve yasal düzenlemelere karşın psikoaktif maddelere sürekli yenileri eklenmektedir. Mevcut psikoaktif maddelerin etkilediği reseptörler üzerinde benzer etkiyi sağlayan bu yeni tasarım maddelerinin piyasaya arz süreci yasa koyucuların yasaklama sürecinden daha hızlı olmaktadır.

Yeni nesil psikoaktif maddelerin önemli bir grubunu sentetik kannabinoidler oluşturmaktadır. Sentetik kannabinoidler ilk kez 1996 yılında ortaya çıkmıştır. Bu tarihten itibaren “spice” ‘’ Bonzai’’ ve “K2” gibi değişik isimler altında satışları devam etmektedir. İçeriğinde tespit edilen madde yasa kapsamına alındığında yerini yeni bir madde almaktadır.

Sentetik kannabinoidler üretim tarihlerine ve yapılarına göre jenerasyonlar halinde sınıflandırılmışlardır. 2009 yılında JWH 018, JWH 073, JWH 250, CP 47,497 maddeleri tespit edilmiş ve ilk jenerasyon olarak kabul edilmişlerdir. 2014 Ocak ayında piyasada yer bulan THJ-018 ise yedinci jenerasyondur. 2009 ve 2014 yılları arasında yüzlerce madde sentezlenmiş ve dünya çapında pazarlanmıştır.

Sentetik kannabinoidlerin sentezlenmesi klasik suistimal edilen maddelere nazaran oldukça kolaydır. Bu yüzden sentezleri merdivenaltı olarak tabir edilen laboratuvarlarda gerçekleştirilmekte, sonrasında aseton veya metanol gibi organik çözücülerde çözündürülerek tütsü benzeri bitkisel ürünler üzerine spreylenecektir. Spreyleme işlemi sırasında etken maddenin bitkisel ürün üzerinde homojen bir şekilde dağılımı mümkün olmadığından sentetik kannabinoid taşıyan ürünler arasında etken madde miktarı açısından büyük farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Etken madde konsantrasyonuna ve kişisel duyarlılığa bağlı olarak da görülen advers etkiler ve şiddetleri değişebilmektedir. Bunun yanı sıra psikoaktif etkiyi arttırmak ya da yan etkileri maskelemek 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.

Yapılan literatür araştırmalarında sentetik kannabinoidlerin toksik etkileri ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Maddelerin farmakolojik ve psikoaktif etkilerine ilişkin bilgiler genellikle gözlemlere ve kullanıcıların ifadelerine dayanmaktadır. Bu

maddelerin giderek artan popülariteleri ve yaygın kullanımları bitkisel ürünlerde ve biyolojik örneklerde analiz edilmelerini zorunlu kılmaktadır. Yarılanma sürelerinin oldukça kısa olmaları nedeniyle biyolojik örneklerde analiz edilebilmeleri için metabolitlerinin bilinmesi gerekmektedir. Klasik suistimal edilen maddelerin aksine sentetik kannabinoidlerin immunoassay yöntemlerle tespit edilmesi mümkün değildir. Sentezlenen ve pazarlanan yüzlerce maddeden çok küçük bir kısmı immunoassay yöntemi ile tespit edilmektedir. Ancak yöntemin spesifik olmaması çok fazla yanlış pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Bu nedenle dedeksiyon limiti düşük, hızlı ve seçici metotların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Sentetik kannabinoidlerden JWH-073 2008 sonunda ilk olarak Almanya’da tespit edilmiş ve 2009 başından itibaren pek çok ülkede yasaklı maddeler listesine dahil edilmiştir. JWH-073 Türkiye’de ilk kez 2010 yılında tespit edilmiştir [67]. 2011 yılı Şubat ayında diğer sentetik maddelerle birlikte yasa kapsamına alınmıştır. JWH-073 ile ilgili ilk araştırmalar maddenin bitkisel içeriklerde tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda LC ve GC sistemleri tercih edilmiş [16, 18, 20-52], yöntemlere yardımcı olmak amacıyla TOF-MS ve NMR sistemleri kullanılmıştır [20, 43].

JWH-073 kullanımının ve etkisi altında suçta karışma ihtimalinin incelenmesi amacıyla maddenin biyolojik örneklerde aranabilmesi için analitik metotlar geliştirilmiştir. *In vitro* [51,52] ve *in vivo* [42-50] çalışmalarda JWH-073 kullanımında en sık saptanan metabolitlerin JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil) olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda LC ve GC sistemleri kullanılmıştır.

JWH-073’ün kan ve idrarda tayini ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Tespit limiti, seçicilik, hız ve maliyet gibi parametreler de göz önüne alınarak genelde LC sistemler tercih edilmiştir [28-52].

Bu çalışmada JWH-073 ve metabolitleri JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütil)’ in kan ve idrarda tayinleri için katı-faz ekstraksiyonu ve LC-MS/MS yönteminin kullanıldığı tespit sınırı düşük, seçici, hızlı ve ekonomik bir metot geliştirilmiştir.

Çalışmada ilk olarak seçicilik parametresi araştırılmıştır. Boş kan ve idrar örneklerinde ilgili maddelerin belirlenmiş alıkonma zamanlarındaki olası girişimler incelenmiş ve herhangi bir girişim saptanmamıştır.

Literatürde JWH-073’in sıvı-sıvı ekstraksiyonu ya da katı faz ekstraksiyonuyla serumda ve kanda LC-MS/MS ile yapılan analizlerinde bulunan LOD değerleri 0.005

ng/mL, LOQ değerleri ise 0.008 ng/mL ile 1 ng/mL arasında değişmektedir [38, 39]. Çalışmamızda tam kanda JWH-073 için tespit edilmiş olan LOD değeri (0.13 ng/mL) ve LOQ değeri (0.17 ng/mL) yapılmış olan diğer çalışmalarla uyumludur.

Poklis ve ark.'ları JWH-073'e maruz bıraktıkları farelerin kan düzeylerini LC-MS/MS ile izlenmişler ve maddenin yarılanma ömrünün esrardan daha kısa olduğunu saptamışlar, buna ek olarak 20 saat sonra yapılan ölçümlerde beyin dokusunda JWH-073'e rastlamamışlardır [39]. Maddenin kısa sürede metabolize olması biyolojik örneklerde tespit edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden analizlerde hedef, maddenin Faz I ve Faz II metabolitlerinin tespit edilmesidir. Geliştirdiğimiz yöntem ile JWH-073 maddesinin kanda ve idrarda JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütıl) metabolitleri ile birlikte daha güvenilir ve kesin olarak tayini yapılabilmektedir.

Literatürde rastlanan çalışmalarda JWH-073 ile ana metabolitleri olan JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütıl)'in idrarda LC-MS/MS ile yapılmış olan analizlerinde metabolitler için bulunan LOD değerleri 0.025 ng/mL ile 0.1 ng/mL arasında, LOQ değerleri ise 0.1 ile 2.5 ng/mL arasındadır [47, 49, 50]. Çalışmamızda JWH-073 ve metabolitleri için tespit edilmiş olan LOD değerleri (0.08-0.09 ng/mL) ve LOQ değerleri (0.11-0.13 ng/mL) arasında değişmekte olup literatür sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda JWH-073, JWH-073 N-bütanoik asit ve JWH-073 N-(4-hidroksibütıl) maddelerine ait kanda ve idrarda 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 0.1-50 ng/mL'dir.

Kan ve idrar için ortalama geri kazanım değerleri %75-95 aralığında değişmektedir. Bu maddeler için ayrıca matrik etkisi ve proses etkinliği değerleri de ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında CV değerleri %10'dan küçük bulunmuştur. Kan, idrar 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 uluslararası kabul kriterleri ile uyumludur [77-82].

Adli Tıp Kurumu Kimya İhtisas Dairesi'nde Ağustos 2012-Şubat 2015 tarihleri arasında validasyonu yapılan bu metod ile 1856 adli olgu ile yapılan çalışmada pozitif olguların %5'inde JWH-073 metabolitlerinden en az bir tanesi tespit edilmiştir.

Bu çalışma, JWH-073 ve metabolitlerinin tam kanda ve idrarda birlikte analiz edildiği ilk çalışmadır. Belirsizlik değerleri düşük, doğrusal aralığı geniş, geri kazanım değerleri yüksek ve analiz süresi oldukça kısadır. Geliştirilen ve validasyonu yapılan bu yöntemin JWH-073 ve ana metabolitlerinin kan ve idrar örneklerinin izlenmesinde ve madde kaynaklı ölümlerin tespitinde faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca kan ve idrar örneklerinde metabolitlerin de tayin ediliyor olması yöntemin önemli bir avantajıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Castaneto M S, Gorelick D A, Desrosiers N A, Hartman R L, Pirard S, Huestis M A. Synthetic cannabinoids : Epidemiology , pharmacodynamics , and clinical implications, *Drug Alcohol Depend* 2014; 144:12–41. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005.
- [2] Lindsay L, White M L. Herbal Marijuana Alternatives and Bath Salts—“Barely Legal” Toxic Highs. *Clin. Pediatr. Emerg. Med.* 2012;13:283–291. doi:10.1016/j.cpem.2012.09.001.
- [3] Young A C, Schwarz E, Medina G, Obafemi A, Feng S, Kane C ve ark. Case Report: Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *Am. J. Emerg. Med* 2012 ; 30:1320.e5–1320.e7. doi:10.1016/j.ajem.2011.05.013.
- [4] Znaleziona 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. *Anal. Chim. Acta* 2015; (In press). doi:10.1016/j.aca.2014.12.055.
- [5] Wiebelhaus J M, Poklis J L, Poklis A, Vann R E , Lichtman A H, Wise L E, Inhalation exposure to smoke from synthetic “ marijuana ” produces potent cannabimimetic effects in mice. *Drug Alcohol Depend* 2012; 126 :316–323. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.05.034.
- [6] Vardakou I, Pistos C, Spiliopoulou C. Spice drugs as a new trend: Mode of action, identification and legislation, *Toxicol. Lett.* 2010; 197:157–162. doi:10.1016/j.toxlet.2010.06.002.
- [7] Fantegrossi W E, Moran J H, Radomska-Pandya A, Prather P L. Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to $\Delta(9)$ -THC: mechanism underlying greater toxicity?. *Life Sci.* 2014; 97: 45–54. doi:10.1016/j.lfs.2013.09.017.
- [8] Seely K A, Lapoint J, Moran J H , Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 2012; 39: 234–243. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.04.017.
- [9] Mycyk MB. Emerging drugs of abuse: what was new yesterday is new today. *J Med Toxicol* 2012;8:1-2.
- [10] Nacca N, Vatti D, Sullivan R, Sud P, Su M, Marraffa J. The synthetic cannabinoid withdrawal syndrome. *J Addict Med* 2013;7:296–8.

- [11] Lindigkeit R, Boehme A, Eiserloh I, Luebbecke M, Wiggermann M, Ernst L ve ark. Spice: A never ending story? *Forensic Sci. Int.* 2009; 191:58–63. doi:10.1016/j.forsciint.2009.06.008.
- [12] Lapoint J, James LP, Moran CL, Nelson LS, Hoffman RS, Moran JH. Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clin Toxicol* 2011;49:760–764.
- [13] Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs. *PPAR Research*. 2007 doi:10.1155/2007/23513
- [14] Mazzarino M, de la Torre X, Botrè F. A liquid chromatography-mass spectrometry method based on class characteristic fragmentation pathways to detect the class of indole-derivative synthetic cannabinoids in biological samples., *Anal. Chim. Acta*. 2014; 837: 70–82. doi:10.1016/j.aca.2014.06.003.
- [15] Rosenbaum CD, Carreiro SP, Babu KM. Here today, gone tomorrow and back again? A Review of herbal marijuana alternatives (k2, spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, Salvia divinorum, methoxetamine, and piperazines. *J Med Toxicol* 2012; 8:15-32.
- [16] Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J, Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci. Int.* 2010; 198:31–38, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.01.004.
- [17] Drug Enforcement Administration, Special Testing and Research Laboratory Emerging Trends Program. [web page on internet]; Erişim 21.02.2015 <http://www.nist.gov/oles/upload/00-Day-1-Drug-Workshop-Handouts-scan-combined.pdf>.
- [18] Dresen S, Ferreirós N, Pütz M, Westphal F, Zimmermann R, Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds, *J. Mass Spectrom* 2010; 45:1186–1194. doi:10.1002/jms.1811.
- [19] Simmons JR, Skinner CG, Williams J, Kang CS, Schwartz MD, Wills BK. Intoxication from smoking “spice”. *Ann Emerg Med* 2011;57:187–188.
- [20] Gottardo R, Chiarini A, Dal Prà I, Seri C, Rimondo C, Serpelloni G ve ark. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS, *J. Mass Spectrom* 2012; 47:141–146, doi:http://dx.doi.org/10.1002/jms.2036.
- [21] Choi H, Heo S, Choe S, Yang W, Park Y, Kim E, Chung H, Lee J. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC–MS. *Anal. Bioanal. Chem* 2013; 405: 3937–3944, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6560-z>.

- [22] Penn HJ, Langman LJ, Unold D, Shields J, Nichols JH, Detection of synthetic cannabinoids in herbal incense products. *Clin. Biochem* 2011; 44:1163–1165, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.06.078.
- [23] Zuba D, Byrska B, Maciow M, Comparison of herbal highs composition, *Anal. Bioanal. Chem* 2011; 400:119–126, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4743-7.
- [24] Hudson S, Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Test. Anal* 2011;3:466–478, doi:http://dx.doi.org/10.1002/dta.268.
- [25] Logan BK, Reinhold LE, Xu A, Diamond FX. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States, *J. Forensic Sci.* 2012; 57:1168–1180, doi:http://dx.doi.org/10.1111/j. 1556-4029.2012.02207.x.
- [26] Uchiyama N, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y. Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products, *Forensic Toxicol* 2011; 29: 25–37, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11419-010-0100-3.
- [27] Grigoryev A, Savchuk S, Melnik A, Moskaleva N, Dzhurko J, Ershov M, et al. Chromatography– mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci* 2011; 879:1126–1136, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.034.
- [28] Hutter M, Kneisel S, Auwärter V, Neukamm MA. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2012; 90:395–401, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.002.
- [29] Salomone A, Gerace E, D’Urso F, Di Corcia D, Vincenti M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples, *J. Mass Spectrom* 2012; 47: 604–610, doi:http://dx.doi.org/10.1002/jms.2988.
- [30] Kim J, In S, Park Y, Park M, Kim E, Lee S. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation, *Anal. Bioanal. Chem* 2013; 405: 9769–9778, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7423-y.
- [31] Strano-Rossi S, Odoardi S, Fisichella M, Anzillotti L, Gottardo R, Tagliaro F. Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2014;1372C:145–156. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.106.
- [32] Coulter C, Garnier M, Moore C. Synthetic cannabinoids in oral fluid. *J. Anal. Toxicol.* 2011; 35: 424–430, doi:http://dx.doi.org/10.1093/anatox/35.7.424.

- [33] Kneisel S, Speck M, Moosmann B, Corneillie T, Butlin N, Auwärter V. LC/ ESI–MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Anal. Bioanal. Chem* 2013; 405:4691–4706, doi:http://dx.doi.org/ 10.1007/s00216-013-6887-0.
- [34] De Castro A, Piñeiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M. 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.
- [35] Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Romolo FS, Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid. *J. Chromatogr. A* 2012; 1258:37–42. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.098.
- [36] Dresen S, Kneisel S, Weinmann W, Zimmermann R, Auwärter V. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *J. Mass Spectrom* 2011; 46:163–171, doi:http://dx.doi.org/ 10.1002/jms.1877.
- [37] Kneisel S, Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid–liquid extraction. *J. Mass Spectrom* 2012;47: 825–835, doi: http://dx.doi.org/10.1002/jms.3020.
- [38] Dziadosz M, Weller JP, Klintschar M, Teske J. 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.2013.04.017.
- [39] Poklis JL, Amira D, Wise LE, Wiebelhaus JM, Haggerty BJ, Poklis A, Detection and disposition of JWH-018 and JWH-073 in mice after exposure to “ Magic Gold” smoke. *Forensic Sci. Int.* 2012;220:91–96. doi:10.1016/j.forsciint.2012.02.003.
- [40] Kacinko SL, Xu A, Homan JW, McMullin MM, Warrington DM, Logan BK. Development and Validation of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Identification and Quantification of JWH-018, JWH-073, JWH-019, and JWH-250 in Human Whole Blood. *J Anal Toxicol* 2011; 35:386–93.
- [41] Shanks KG, Dahn T, Terrell AR. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC–MS–MS in postmortem whole blood casework. *J Anal Toxicol* 2012;36:145–152.

- [42] Moran CL, Le VH, Chimalakonda KC, Smedley AL, Lackey FD, Owen SN ve ark. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Anal. Chem.* 2011; 83:4228–36. doi:10.1021/ac2005636.
- [43] Sundström M, Pelander A, Angerer V, Hutter M, Kneisel S, Ojanperä I. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high- resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Anal. Bioanal. Chem* 2013; 405: 8463–8474, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00216- 013-7272-8.
- [44] Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in herbal mixtures using LC–MS/MS techniques. *J. Mass Spectrom* 2012; 47:54–65, doi:http://dx.doi. org/10.1002/jms.2026.
- [45] De Jager AD, Warner JV, Henman M, Ferguson W, Hall A. LC–MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – an Australian perspective. *J. Chromatogr. B* 2012; 897:22–31. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.002.
- [46] Logan BK, Kacinko SL, McMullin MM, Xu A, Middleberg RA. Technical Bulletin: Identification of primary JWH-018 and JWH-073 metabolites in human urine. *NMS Lab* 2011.
- [47] Jang M, Yang W, Choi H, Chang H, Lee S, Kim E ve ark. Monitoring of urinary metabolites of JWH-018 and JWH-073 in legal cases. *Forensic Sci. Int* 2013; 231:13–9. doi:10.1016/j.forsciint.2013.03.053.
- [48] Yanes EG, Lovett DP, High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 909 (2012) 42–50. doi:10.1016/j.jchromb.2012.10.013.
- [49] Scheidweiler KB, Huestis MA. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 2014;1327:105–17. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.067.
- [50] Simões SS, Silva I, Ajenjo AC, Dias MJ. Validation and application of an UPLC-MS/MS method for the quantification of synthetic cannabinoids in urine samples and analysis of seized materials from the Portuguese market. *Forensic Sci. Int.* 2014; 243:117–25. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.022.
- [51] Chimalakonda KC, Bratton SM, Le VH, Yiew KH, Dineva A, Moran CL ve ark. Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* 2011; 39:1967–1976. doi:10.1124/dmd.111.040709.cannabinoid-based.

- [52] Gambaro V, Arnoldi S, Bellucci S, Casagni E, Dell'Acqua L, Fumagalli L ve ark. Characterization of in vitro metabolites of JWH-018, JWH-073 and their 4-methyl derivatives, markers of the abuse of these synthetic cannabinoids. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 2014; 957:68–76. doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.001.
- [53] Ashton CH, Moore PB. Regulation of synthetic cannabinoids. *Lancet* 2009; 374:1595.
- [54] Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005;310:329–32.
- [55] Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;6:635–64.
- [56] Castaneto MS, Gorelick DA, Desrosiers NA, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA, Synthetic cannabinoids: Epidemiology , pharmacodynamics , and clinical implications. *Drug Alcohol Depend* 2014; 144:12–41. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005.
- [57] Brents LK, Gallus-Zawada A, Radomska-Pandya A, Vasiljevik T, Prisinzano TE, Fantegrossi WE ve ark. Monohydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-073 retain intermediate to high cannabinoid 1 receptor (CB1R) affinity and exhibit neutral antagonist to partial agonist activity. *Biochem. Pharmacol* 2012; 83:952–61. doi:10.1016/j.bcp.2012.01.004.
- [58] Schneir AB, Baumbacher T. Convulsions associated with the use of a synthetic cannabinoid product. *J Med Toxicol* 2012; 8:62-4.
- [59] Cohen J, Morrison S, Greenberg J ve ark. Clinical presentation of intoxication due to synthetic cannabinoids. *Pediatrics* 2012;129:e1064-7.
- [60] Vearrier D, Osterhoudt KC. A teenager with agitation: higher than she should have climbed. *Pediatr Emerg Care* 2010;26: 462-5.
- [61] Nicholson PJ, Quinn MJ, Dodd JD. Headshop headache: acute mephedrone 'meow' myocarditis. *Heart* 2010;96: 2051-2.
- [62] Mir A, Obafemi A, Young A, et al. Myocardial infarction associated with use of the synthetic cannabinoid K2. *Pediatrics* 2011;128:e1-6.
- [63] Harris CR, Brown A. Selected Topics : Toxicology, *J. Emerg. Med* 2013;44:360–366. doi:10.1016/j.jemermed.2012.07.061.
- [64] Nacca N, Vatti D, Sullivan R, Sud P, Su M, Marraffa J. The synthetic cannabinoid withdrawal syndrome. *J Addict Med* 2013;7:296–8.

- [65] Zimmermann US, Winkelmann PR, Pilhatsch M, A Nees J, Spanagel R, K Schulz. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of “spice gold”. *Dtsch. Arztebl. Int* 2009; 106:464–467. doi:10.3238/arztebl.2009.0464.
- [66] Hurst D, Loeffler G, McLay R. Psychosis associated with synthetic cannabinoid agonists: a case series. *Am J Psychiatry* 2011;168:1119.
- [67] Türkiye Cumhuriyeti İçişleri Bakanlığı Polis Narkotik Bölümü, Ulusal Rapor (2010 verileri) [web page on internet] Erişim: 20.02.2015 http://www.kom.gov.tr/Tr/Dosyalar/file/TUBIM_RAPOR/TURKISH%20DRUG%20REPORT%202011.pdf; 2011.
- [68] Gurdal F, Asirdizer M., Aker RG, Korkut S, Gocer Y, Kucukibrahimoglu EE ve ark. Review of detection frequency and type of synthetic cannabinoids in herbal compounds analyzed by Istanbul Narcotic Department of the Council of Forensic Medicine, Turkey. *J. Forensic Leg. Med* 2013; 20:667–72. doi:10.1016/j.jflm.2013.03.041.
- [69] Resmi Gazete.13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazete[web page on internet]. Erişim:13.10.2012,<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/02/20110213.htm>.
- [70] 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>
- [71] Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR, et al. 2010 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 28th Annual Report. *Clin Toxicol* 2011;49:933-40.
- [72] Marshall R, Kearney-Ramos T, Brents LK, Hyatt WS, Tai S, Prather PL ve ark. In vivo effects of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 and phytocannabinoid Δ^9 -THC in mice: inhalation versus intraperitoneal injection., *Pharmacol. Biochem. Behav* 2014;124:40–7. doi:10.1016/j.pbb.2014.05.010.
- [73] Smith, K., Flatley, J., 2011. Drug Misuse Declared: Findings from the 2010/11 British Crime Survey. Home Office Statistical Bulletin, Home Office.
- [74] Tuv SS, Krabseth H, Karinen R, Olsen KM, Øiestad EL, Vindenes V. Prevalence of synthetic cannabinoids in blood samples from Norwegian drivers suspected of impaired driving during a seven weeks period., *Accid. Anal. Prev* 2014; 62:26–31. doi:10.1016/j.aap.2013.09.009.
- [75] Erol Öztürk Y, Yeter O, B. Alpertunga, Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC–MS/MS: Monitoring in forensic cases, *Forensic Sci. Int* 2015;248:88–93. doi:10.1016/j.forsciint.2014.12.029.
- [76] LGC: National Measurment System[web page on internet] Erişim:20.02.2015 http://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf.

- [77] FDA Bioanalytical Method Validation Guide 2011. [web page on internet] Erişim: 20.02.2015 website:<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>.
- [78] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review, *Accredit. Qual. Assur.* 7 (2002) 441–449. doi:10.1007/s00769-002-0516-5.
- [79] Eurachem The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics [web page on internet] Erişim:20.02.2015 http://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCMQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2Fuploads%2Fmedia%2FEurochem_1998_fitness_for_purpose-valid_02.pdf&ei=zHp8VK2EMzsaOPgcAN&usg=AFQjCNHsmMVdA0aDE62e98sFK2qehZfxag.
- [80] SWGTOX – Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology SWGTOX Doc 003. [web page on internet] Erişim: 20.02.2015 <http://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf>.
- [81] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC - MS / MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [82] European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, *Off. J. Eur. Commun.* 2002; 221:8–36.

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 1328

Tarih : 17.08.2012

Konu : Prof. Dr. Buket ALPERTUNGA hk,

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

İlgi : İ.Ü. Eczacılık Fakültesinin 11.07.2012 tarihli 117 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığın üstlendiğiniz ve Serkan ÖZTÜRK'ün yürüteceği 2012/1279-1155 dosya numaralı "JWH-073 ve Metabolitlerinin LC/MS/MS ile Kan ve İdrarda Tayini" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 10.08.2012 tarihli 13 sayılı sayılı toplantısında uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim

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

Ekl: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serkan	Soyadı	Öztürk
Doğ.Yeri	Yedigöze	Doğ.Tar.	17.06.1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	29021510886
Email	sekociyanni@hotmail.com	Tel	+90 (535) 2894822

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Osmangazi Üniversitesi	2004
Lise	Bakırköy Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzman	Adli Tıp Kurumu	2007-
2.	Kimya Mühendisi	Silkcoat	2006-2007
3.	Kimya Mühendisi	Pharmavision	2004-2006

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

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Sinema,Bilgisayar Oyunları,Yemek Pişirmek ve Okumak