

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

BİR SENTETİK KANNABİNOİD OLAN RCS-4 BİLEŞİĞİNİN VE
METABOLİTİNİN LC-MS/MS İLE SERUM ÖRNEĞİNDEN TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Nagehan ADIÖREN

İSTANBUL, 2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN

BİR SENTETİK KANNABİNOİD OLAN RCS-4 BİLEŞİĞİNİN VE
METABOLİTİNİN LC-MS/MS İLE SERUM ÖRNEĞİNDEN TAYİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Nagehan ADIÖREN

İSTANBUL, 2024

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimini, yardımlarını esirgemeyen ve bana yol göstererek hep yanımda olan çok değerli danışman hocam **Doç. Dr. Zeynep Türkmen**'e,

Laboratuvarıda tecrübe kazanmama vesile olan, bilgisini ve desteğini asla bizden esirgemeyen çok kıymetli hocam **Doç. Dr. Selda Mercan**'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda her zaman yanımda olan çok kıymetli hocalarım **Arş. Gör. Merve Kuloğlu Genç**, **Biyolog Murat Yayla** ve **Kimyager Tuğba Tekin Bülbül** ve dönem arkadaşım **Mihriban Dilan Kılıç**'a,

Her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini hep hissettiğim arkadaşlarım **Tusel Yatkın** ve **Rabia Ceran Büyükkol**'a,

Her düştüğümde beni kaldıran ve pes etmeme asla izin vermeyen, her zaman desteğiyle bana güç veren ve yanımda olan canım eşim **Çağdaş Adıören**'e,

Ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim, bugünlere gelmeme vesile olan, maddi manevi hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen canım annem **Nigar Erdağı** başta olmak üzere abim **Gökhan Erdağı**, dayılarım **Atila Kaya** ve **Oğuz Kaya**'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Nagehan Adıören

İstanbul, Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SEMBOLLER.....	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Sentetik Kannabinoidler	3
2.2 RCS-4.....	7
2.2.1 Farmakokinetik Özellikleri.....	9
2.2.2 Farmakodinamik Özellikleri.....	14
2.2.3 Toksikolojik Etkileri.....	16
2.2.4 Yasal Düzenlemeler	18
2.2.5 Analiz Yöntemleri	21
2.3 LC/MS/MS Yöntemi.....	22
2.3.1 LC-MS/MS ORBITRAP	26
2.4 Validasyon	28
2.4.1 Seçicilik	28
2.4.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	28
2.4.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)	29
2.4.4 Doğruluk	29

3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1 Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Diğer Gereçler	31
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	32
3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	32
3.2.2 Çözeltiler	32
3.2.3 Ana Stok ve Ara Stok Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.3 Biyolojik Örnekleri	34
3.4 Serum Örneklerinin Hazırlanması	34
3.5 LC-MS/MS ORBITRAP Çalışma Şartları	37
3.6 Validasyon Çalışmaları	37
3.6.1 Seçicilik Çalışmaları	38
3.6.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	38
3.6.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)	39
3.6.4 Doğruluk	39
4. BULGULAR	41
4.1 Metot Validasyonu	41
4.1.1 Seçicilik	41
4.1.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi	43
4.1.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)	45
4.1.4 Doğruluk	45
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	55

KAYNAKÇA	56
ÖZGEÇMİŞ.....	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Renkli Ambalajlardaki Sentetik Kannabinoidler	4
Şekil 2: JWH-018; Sentetik Kannabinoid Bileşiklerinin Genel Yapısı (Değiştirilmiştir)(Andrews vd., 2023).....	5
Şekil 3: AB Erken Uyarı Sistemine İlk Kez Bildirilen Sentetik Kannabinoid Sayısı, 2005– 2022 (New psychoactive substances-the current situation in Europe (European Drug Report 2023))	6
Şekil 4: RCS-4 Maddesinin Kimyasal Yapısı	7
Şekil 5: Yapısal Olarak İlişkili Sentetik Kannabinoidlerin Kimyasal Yapıları(Gandhi vd., 2014).....	11
Şekil 6: RCS-4'ün Olası İn Vitro Metabolizasyonu (Gandhi vd., 2014)	13
Şekil 7: LC-MS/MS Çalışma Prensibi.....	25
Şekil 8: LC-MS/MS ORBITRAP Çalışma Prensibi	27
Şekil 9: İnkübasyon Öncesi	35
Şekil 10: İnkübasyon Sonrası	35
Şekil 11: İnkübasyon Sonrası Metanol Eklenmesi ile Çöken Protein	36
Şekil 12: RCS-4'ün Analit İçermeyen Serum Numunesi Kromatogramı	41
Şekil 13: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Analit İçermeyen Serum Numunesi Kromatogramı	42
Şekil 14: RCS-4'ün Analit İlave Edilmiş Serum Numunesi Kromatogramı.....	42
Şekil 15: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Analit İlave Edilmiş Serum Numunesi Kromatogramı	43
Şekil 16: RCS-4'ün Serum Numunesindeki Kalibrasyon Eğrisi.....	44
Şekil 17: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Serum Numunesindeki Kalibrasyon Eğrisi.....	44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I: Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Marka/Model Bilgileri	31
Tablo II: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde/Çözücüler ve Marka Bilgileri.....	32
Tablo III: LC-MS/MS ORBITRAP 'in Çalışma Şartları.....	37
Tablo IV: Doğrusal Aralık, Denklem ve Korelasyon Katsayısı	44
Tablo V: Hassasiyet Çalışması Sonucu Elde Edilen LOD ve LOQ Değerleri.....	45
Tablo VI: RCS-4'ün Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik Analiz Sonuçları, Ortalamaları, SS'ları ve RSD Değerleri.....	46
Tablo VII: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik Analiz Sonuçları, Ortalamaları, SS'ları ve RSD Değerleri	47
Tablo VIII: RCS-4'ün Geri Kazanımı	48
Tablo IX: RCS-4 N-(5-Karboksipentil)'in Geri Kazanımı	49

KISALTMALAR ve SEMBOLLER

$\mu\text{g/mL}$	Milyonda bir birim
μL	Mikrolitre
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu
cAMP	Siklik adenosin monofostaf
CB1	Kannabinoid 1
CB2	Kannabinoid 2
CBD	Kannabidiol
CSA	Kontrollü Maddeler Yasası
CYP	Sitokrom P450
DEA	Uyuşturucu ile M¼cadele Dairesi
ECS	Endokannabinoid sistem
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
EWS	Erken uyarı sistemi
GC/MS	Gaz kromatografisi/k¼tle spektrometrisi
HepG2	Karsinoma h¼cre hattı
HPLC	Y¼ksek performanslı sıvı kromatografisi
IS	İç standart
L	Litre
LC/HR-MS	Likit kromatografisi-y¼ksek çöz¼n¼rl¼kl¼ k¼tle spektrometrisi
LC/MS/MS	Likit kromatografi/tandem k¼tle spektrometrisi
LC/TOF-MS	Likit kromatografi/uçuř zamanlı k¼tle spektrometrisi
LLE	Sıvı-sıvı ekstraksiyon
LOD	Teşhis sınırı

LOQ	Tayin sınırı
m/z	Kütle/yük
mg	Miligram
mL	Mililitre
MRM	Çoklu reaksiyon görüntüleme
MS	Kütle spektrometrisi
MSS	Merkezi sinir sistemi
ng	Nanogram
ng/mL	Milyarda bir birim
NPS Y	eni nesil psikoaktif maddeler
pg	Pikogram
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
RSD	Bağıl standart sapma
SH-SY5Y	Nöroblastoma hücre hattı
SK	Sentetik kannabinoid
SLE	Katı-Sıvı Ekstraksiyon
ss	Standart sapma
SWGTOX	Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu
TLC	İnce tabaka kromatografisi
THC	Δ^9 -Tetrahidrokannabinol
TUBİM	Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
UGT	UDP-glukuronosiltransferazlar
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi
USS	Ultra saf su

ÖZET

Sentetik kannabinoidler 2004 yılından beri üretimi ve tüketimi artış gösteren; ‘Spice’, ‘K2’, ‘Bonzai’, ‘Jamaika’ gibi isimlerle bilinen psikoaktif maddelerdir. Sentetik kannabinoidlerin asıl üretim amacı endokannabinoid sistemi araştırmak iken esrar ile neredeyse aynı etkileri göstermesi onu uyuşturucu pazarı için güncel ve kazançlı bir kaynak haline getirmektedir.

Sentetik kannabinoidler, kannabinoid reseptörlerine tam agonist etki gösterdiği için esrara kıyasla daha hızlı etki göstermektedir; bu da daha hızlı bağımlılığa ve daha çok hasar görmeye sebep olmaktadır. Bu nedenle sentetik kannabinoid kullanımıyla ilişkilendirilen ani ölüm vakaları artmaktadır.

Genellikle esrarın etkilerini taklit etmesi amacıyla doğal bitkilerin veya bitki karışımlarının üzerine püskürtülerek "bitkisel sigara karışımları" veya "bitkisel tütsü" olarak satılan sentetik kannabinoidler günümüzde ulaşımı çok kolay maddelerdir ve halk sağlığı için ciddi şekilde tehlike oluşturmaktadır. Fakat kimyasal yapısının çok kolay değişebilir olması hem fazlaca madde çeşitliliğine hem de mevcut analizlerle tespit edilebilirliğinin güçleşmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle bu maddelerle ilgili yapılan tanımlama, tespit, validasyon çalışmaları önem arz etmektedir.

Bu çalışma bir sentetik kannabinoid olan RCS-4 ve başlıca metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil) için serumdan enzimatik hidroliz yöntemi ile LC-MS/MS ORBITRAP sistemi kullanılarak tespiti ve yöntemin validasyonu amaçlanarak gerçekleştirilmiştir.

Seçicilik çalışmalarında RCS-4 ve metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil)’in serumda seçiciliği araştırılmış ve kör serum numunelerinde herhangi bir pike rastlanmamıştır. Doğrusal aralık 0-100 ng/mL arasında olup, RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için korelasyon katsayısı 0.990’dan yüksektir. RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için serum

numunesinde tespit limiti (LOD) sırasıyla 5.679 – 6.623 ng/mL; tayin limiti (LOQ) ise sırasıyla 18,930 - 22,076'dır. Doğruluk çalışması için tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmış, kesinlik ve geri kazanım bu sonuçlar üzerinden değerlendirilmiştir. Buna göre %RSD değerleri RCS-4'ün 10, 50 ve 100 ppb konsantrasyonları için sırasıyla 0,09 – 0,07 – 0,1; RCS-4-N(5-Karboksipentil) için 0,15 – 0,11 – 0,1 olarak bulunmuştur. RCS-4 için geri kazanım değerleri %97.54 - %104.21 aralığında olup, RCS-4-N(5-Karboksipentil) için ise %88.87 - %118.93 aralığındadır. Çalışılan validasyon parametrelerinin tümü, toksikolojik analizlerin validasyonuna yönelik uluslararası rehberlerin kabul aralıkları içerisinde. Böylece, metodun RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için serum numunelerinden tespiti ve tayinine yönelik geçerliliği kanıtlanmıştır. Bu yöntem, adli vakaların aydınlatılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *RCS-4, RCS-4 metabolitleri, LC-MS/MS ORBITRAP, Kan, Serum, Sentetik kannabinoidler, Spice, Bonzai*

SUMMARY

Synthetic cannabinoids are psychoactive substances known by names such as 'Spice', 'K2', 'Bonzai', 'Jamaica', whose production and consumption have increased since 2004. While the main purpose of the production of synthetic cannabinoids is to investigate the endocannabinoid system, the fact that they have almost the same effects as cannabis makes them a current and lucrative source for the drug market.

Since synthetic cannabinoids act as full agonists to cannabinoid receptors, they act faster than cannabis, leading to faster addiction and more damage. This is why the number of sudden deaths associated with synthetic cannabinoid use is increasing.

Synthetic cannabinoids, which are often sprayed on natural plants or plant mixtures to mimic the effects of cannabis and sold as “herbal smoking mixtures” or “herbal incense”, are very easy to access today and pose a serious threat to public health. However, the fact that their chemical structure can change very easily causes both a large variety of substances and difficulty in detecting them with existing analyzes. Therefore, identification, detection and validation studies on these substances are important.

This study was carried out to determine RCS-4, a synthetic cannabinoid, and its main metabolite RCS-4-N(5-carboxypentyl) from serum by enzymatic hydrolysis method using LC-MS/MS ORBITRAP system and to validate the method.

In selectivity studies, the selectivity of RCS-4 and its metabolite RCS-4-N(5-carboxypentyl) in serum was investigated and no peak was found in blind serum samples. The linear range was 0-100 ng/mL and the correlation coefficient for RCS-4 and RCS-4-N(5-Carboxypentyl) was higher than 0.990. The limit of detection (LOD) for RCS-4 and RCS-4-N(5-Carboxypentyl) in serum sample is 5.679 - 6.623 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) is 18,930 - 22,076, respectively. For the accuracy study, repeatability and reproducibility

studies were performed and precision and recovery were evaluated based on these results. Accordingly, %RSD values were found to be 0.09 - 0.07 - 0.1 for RCS-4 at concentrations of 10, 50 and 100 ppb and 0.15 - 0.11 - 0.1 for RCS-4-N(5-Carboxypentyl), respectively. The recovery values for RCS-4 were in the range 97.54% - 104.21% and for RCS-4-N(5-Carboxypentyl) in the range 88.87% - 118.93%. All of the validation parameters studied are within the acceptance ranges of the international guidelines for the validation of toxicological analyses. Thus, the validity of the method for the detection and determination of RCS-4 and RCS-4-N(5-Carboxypentyl) in serum samples has been proven. This method will make an important contribution to the clarification of forensic cases.

Key words: *RCS-4, RCS-4 metabolites, LC/MS/MS ORBITRAP, Blood, Serum, Synthetic cannabinoids, Spice, Bonzai*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli toksikoloji, modern analitik kimya ve temel toksikolojinin birleşmesiyle ortaya çıkmış bir bilim dalıdır. Ksenobiyotiklerin insanlar ve hayvanlar üzerindeki zararlı etkilerini araştırmaktadır (Dinis-Oliveira vd., 2010).

Kenevir insanlık tarihinde bilinen, yetiştirilmiş en eski bitkilerden biridir (Maioli vd., 2022). Esrar ve marijuana olarak da bilinen kenevir, en sık kullanılan yasadışı psikoaktif maddedir (Lafaye vd., 2017). Esrar kullanımı uzun ve renkli bir tarihe sahip olmakla birlikte göç, sömürgecilik, din ve hatta ahlaki ortamların da değişmesi gibi çok sayıda gücün koşullu birleşimini yansıtmaktadır. Çin'den Hindistan'a, Orta Doğu'dan Afrika'ya, Latin Amerika'dan Kuzey Amerika'ya kadar çeşitli esrar türleri, bazı dönemlerde kutsal olarak kabul edilmiştir bazı dönemlerde ise ahlaksız olarak kınanmıştır. Farklı tarihsel bağlamlarda bazen kabul edilmiş ve tolere edilmiş olsa da tarih boyunca defalarca şeytanlaştırılmıştır. Her dönemde var olmaya, legal veya illegal kullanılmaya devam etmiştir (Warf, 2014).

Esrardan yaklaşık olarak 100'den fazla kannabinoid izole edilmiştir. Kannabidiol (CBD) ve Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC) izole edilen en önemli iki bileşiktir. CBD ilk olarak 1940'ta esrardan izole edilmiştir ve yapısı 1963'te bildirilmiştir, fakat psikoaktif olmadığı için THC'nin gölgesinde kalmıştır. Ana psikoaktif fitokannabinoid olan THC'nin yapısı, 1964'te İsrail'de Mechoulam ve Gaoni tarafından belirlenmiştir ve maymunlar üzerinde test edilerek psikoaktif olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan test ile deneklerin karakterlerine göre farklı psikolojik etkiler (gülme, panik atak, vb.) oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu keşif 1980'lerde endokannabinoid sistemin (ECS) keşfi için öncü olmuştur (Crocq, 2020).

Sentetik kannabinoidler (SK) en geniş ve en çeşitli yeni psikoaktif madde grubu olarak bilinmektedir (Adamowicz, 2021). SK'ler, endokannabinoid sistemin keşfedildiği ve kanser hastalarının ağrılarını gidermek için yeni tedavilerin araştırıldığı 1970'lerde ortaya çıkmıştır, 2000'li yıllarda ise uyuşturucu pazarında yerini almıştır. Esrarla benzer etkiler oluşturduğu, kolayca ulaşılabilirdiği ve tespit edilmesi daha zor olduğu için özellikle esrar kullanıcıları arasında daha hızlı yayılan SK'lerin, kimyasal yapıları, bileşenleri, farmakolojik özellikleri bakımından esrardan çok daha zararlı olduğu bilinmektedir (Lafaye vd., 2017).

Adli bir olayın aydınlatılmasında hem antemortem hem postmortem için en önemli örneklerden biri kan numunesidir. Madde kullanımının giderek yaygınlaşması nedeniyle bağımlılık yapan bu maddelerin biyolojik örneklerden hızlı ve doğru bir şekilde analiz ve tespit edilmesi, klinik ve adli toksikoloji için büyük önem taşımaktadır (Kaya-Akyüzlü & Kayaaltı, 2015).

Bu tezde araştırılan ve önemli bir SK olan RCS-4 (4-metoksifenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon, N-alkillenmiş 3-(metoksibenzoil)indoller sınıfının rapor edilen ilk üyesidir ve 13.02.2011 tarihinden itibaren 2313 sayılı yasa kapsamına alınmıştır (Banister vd., 2015; Pakiş & Polat, 2016). SK'lar, toksisitelerinin çoğu zaman belirsiz olması ve bağımlılık riski yüksekliği nedeni ile toplum sağlığı için her zaman tehlike arz etmektedir. Bu nedenle biyolojik matrislerde tespit edilebilirliği ve bu yöntemlerin geliştirilmesi her zaman önemli olacaktır. Bu çalışmada, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ORBITRAP cihazı kullanılarak serumda RCS-4 ve metabolitlerinin tayin edilebilmesi için, seçici aynı zamanda hassas ve güvenilir bir analitik metot geliştirilmesi, geliştirilen bu metodun validasyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sentetik Kannabinoidler

Sentetik kannabinoidler (SK), ilk olarak Howlett ve ark. tarafından kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış olup, endokannabinoid sistemin (ECS) araştırılması hedeflenerek tasarlanmış, yapısal olarak kolayca çeşitlendirilebilen yeni nesil psikoaktif maddeler (NPS'ler) grubudur (Roque-Bravo vd., 2022). ECS, birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynayan karmaşık bir sistemdir. Hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerinde, periferik organlarda ve bağışıklık dokularında bilişsel süreçler, davranış kontrolü, hafıza, motor kontrol, ağrı hissi, iştah, iç denge, kardiyovasküler mekanizmalar, gastrointestinal motilite, immünoregülasyon vb. gibi çok sayıda fizyolojik işlevde görev almaktadır. SK'lerin tümü, hangi reseptöre hangi afinite seviyesinde bağlandıklarına bağlı olarak beyin, bağışıklık ve diğer çeşitli işlevleri etkileyen çok çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Howlett vd., 2002; Le Boisselier vd., 2017).

SK'ler, şu anki kötüye kullanımının aksine 40 yıldan fazla süre önce medikal amaçlı üretilmiştir. Daha sonra bazı üreticiler tarafından bu maddeler yasa dışı olarak üretilmeye ve satılmaya başlanmıştır. Yasa dışı olarak üretilenler, genelde aseton, metanol gibi organik bir çözücüde çözülerek bitkisel materyallerin (örn. melisa, nane, kekik) üzerine püskürtülmektedir. Üretiminden sonra hiçbir kalite ya da miktar denetimi yapılmadan, ilgi çekici isimlerle (örn. Spice, K2, Bonzai), süslenmiş ambalajlar içinde ve genellikle internet üzerinden satılmaktadırlar. Çoğunlukla sigara formunda tüketilmelerinin yanı sıra tablet ya da toz şeklinde de tüketilebilmektedirler. Bu bitkisel karışımlar genellikle saf halde satılmamakta ve bu da onları tahmin edilemez şekilde tehlikeli hale getirmektedir. SK'lerin yapısı zaman içinde sürekli değiştirilmiş ve geniş bir pazar haline getirilmiştir. Legal olarak medikal amaçlı üretilmesine rağmen, JWH-018 ve HU-210 gibi maddeler başta olmak üzere birkaç çeşit SK 2004 yılı itibarıyla yasa dışı uyuşturucu pazarında yerini almıştır. Bu maddelerin ilk tespiti 2008 yılında

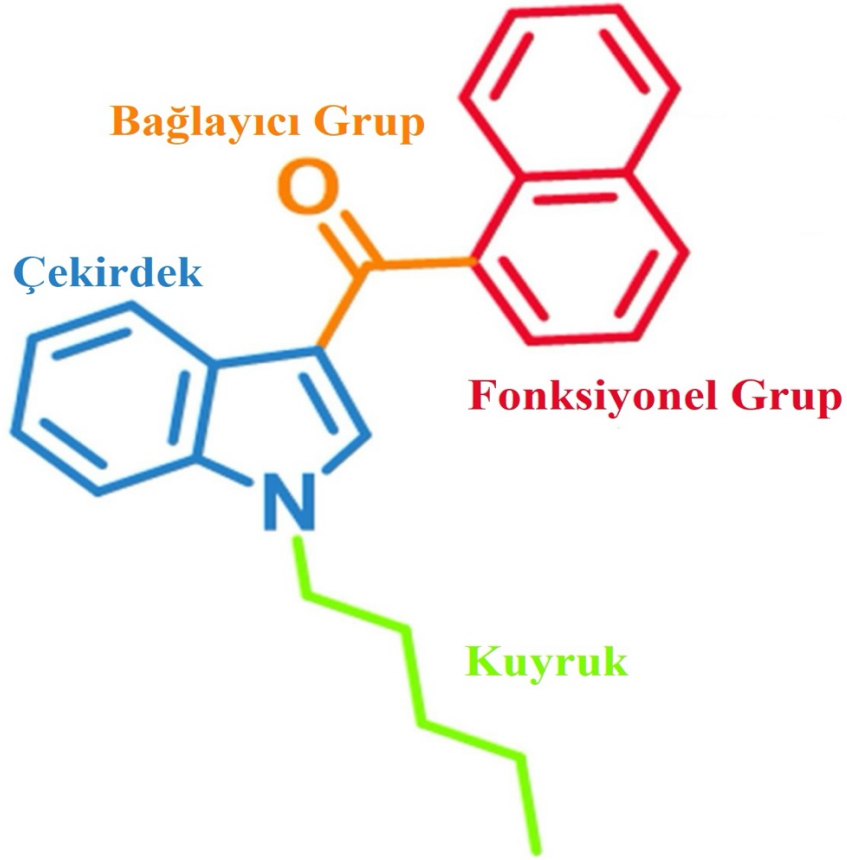
yapılmıştır ve böylece yapılan araştırmaların kötüye kullanıldığı ortaya çıkmıştır (Kemp vd., 2016; Roque-Bravo vd., 2022)



Şekil 1: Renkli Ambalajlardaki Sentetik Kannabinoidler

SK'ler, kannabinoid reseptörleri olan CB1 ve CB2 ile etkileşime girmekte ve esrarın ana psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -THC benzeri kannabimimetik etkiler oluşturmaktadır. Esrardaki ana psikoaktif madde olan Δ^9 -THC'den daha yüksek bağlanma afinitesine sahip oldukları ve esrarın etki edemediği bazı farklı reseptörlerle de etkileştiği için, esrara göre daha yoğun etkiler göstermektedir. Ayrıca CB1 reseptörüne olan afinitesinin, CB2 reseptörüne olan afinitesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Castaneto vd., 2014; Kemp vd., 2016). SK bileşikleri Şekil 2'de görüldüğü gibi, Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı Merkezi (EMCDDA) tarafından 2013 yılından itibaren benimsenen dört ana gruptan oluşmaktadır. Bunlar; çekirdek grupları, kuyruk grupları, bağlayıcı ve fonksiyonel gruplardır. Bu dört ana grubun

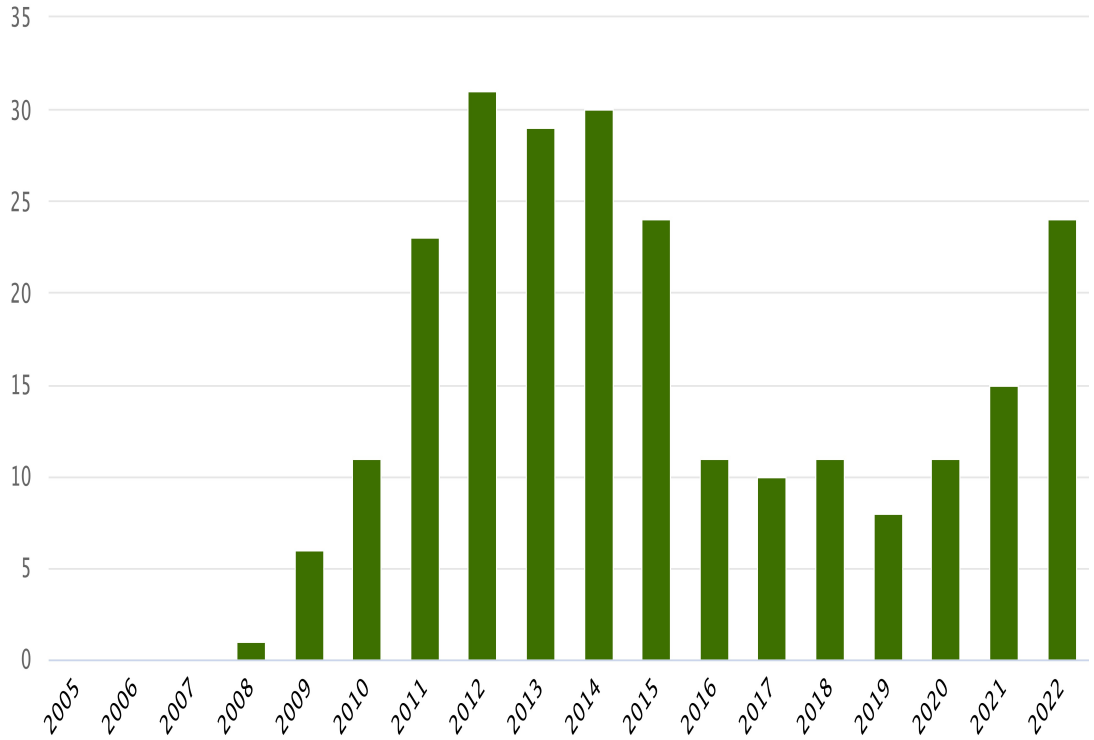
değiştirilebilirliği göz önüne alındığında, SK bileşiklerinin potansiyel kombinasyonlarının sayısı çok fazla olmaktadır (Andrews vd., 2023).



Şekil 2: JWH-018; Sentetik Kannabinoid Bileşiklerinin Genel Yapısı (Değiştirilmiştir)(Andrews vd., 2023)

EMCDDA raporlarına göre, esrar kullanıcıları yanırlıkla SK'lere maruz kalabilmektedirler. 2021 yılında, çoğunluğu Almanya ve İsveç olmak üzere, en az 13 Avrupa ülkesinde, THC veya diğer doğal kannabinoidlerin SK'lerle bir arada bulunduğu bitkisel materyal raporlarında genel bir artış olmuştur. Bu tür katkılı ürünler görünüş olarak ayırt edilemeyeceği için daha yaygın bir şekilde bulunabileceğinin ancak fark edilmemiş olmasının mümkün olduğu düşünülmektedir (EMCDDA, 2023). 2023'te Avrupa Uyuşturucu Raporu sentetik uyuşturucuların giderek artan önemini, yeni maddelerin ortaya çıkışını, uyuşturucu pazarındaki yeni üretim uygulamalarını ve uyuşturucu kullanımıyla ilişkilendirilen zararların

büyük bir kısmının bilerek ya da bilmeyerek birlikte kullanılan uyuşturucular arasındaki etkileşimler neticesinde daha da kötüleştiğini belirtmektedir. Bitkisel materyallerde doğal kannabinoidlerin yanı sıra sentetik kannabinoidlerin de tespit edilmeye devam etmesi benzer endişeleri artırmaktadır (The drug situation in Europe up to 2023-an overview and assessment of emerging threats and new developments (European Drug Report 2023)).



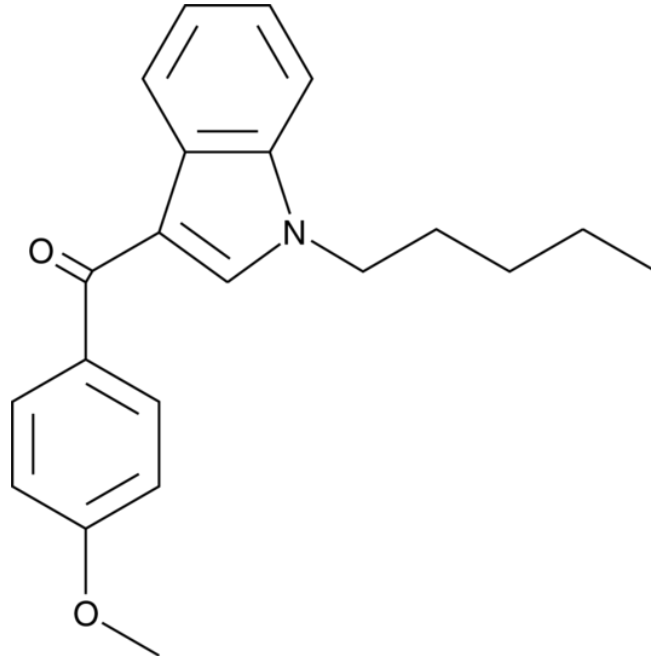
Şekil 3: AB Erken Uyarı Sistemine İlk Kez Bildirilen Sentetik Kannabinoid Sayısı, 2005–2022 (EMCDDA, 2023)

SK'lerin farmakolojik ve toksikolojik etkilerinin altında yatan mekanizmalar henüz yeterli düzeyde keşfedilememiş olup, kullanımları ciddi seviyelerde zehirlenmelere ve ölümlere sebebiyet vermektedir. Yapılarının ufak modifiyeler ile değiştirilebilmesi ve buna bağlı olarak zor tespit edilmeleri ayrıca kullanımlarındaki artış SK'lerin sorun çıkarmaya devam edebileceğini göstermektedir. Bu sebeple küresel şekilde halk sağlığını tehdit etmektedir (Roque-Bravo vd., 2022).

2.2 RCS-4

SK'ler esrarın etkilerini taklit eden ve yeni ortaya çıkan tasarım uyuşturucuların en büyük ve en hızlı büyüyen sınıfı olmakla birlikte, bütün dünyada yakalanan yasadışı materyallerde SK'lere büyük ölçüde rastlanmıştır (Göl & Çok, 2017; Gurdal vd., 2013).

2009 yılından bu yana, SK'ler ile ilgili yürürlükteki yasalar, yasal kısıtlamaları aşmak için yeni bileşiklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. (4-metoksifenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon (RCS-4) bitkisel tütün karışımları içinde satılan güçlü bir kannabinoid reseptör agonistidir (Gandhi vd., 2014). RCS-4, benzoilindol yapısına sahip bileşikler sınıfına girmektedir ve yapısal olarak, JWH-018 ve AM2201 gibi çekirdek indol yapısına sahip diğer sentetik kannabinoid reseptör agonistleriyle ilişkilidir (Expert Committee on Drug Dependence, 2014).



Şekil 4: RCS-4 Maddesinin Kimyasal Yapısı

RCS-4, ilk olarak 2010 yılında piyasaya sürülmüş ve Macaristan tarafından Erken Uyarı Sistemi (EWS) aracılığıyla EMCDDA'ne bildirilmiştir. Bunu takiben, dünya genelindeki ele geçirmelerde sıklıkla tespit edilmeye başlanmıştır (Gandhi vd., 2014). N-alkillenmiş 3-(metoksibenzoil)indoller sınıfının rapor edilen ilk üyesi olan RCS-4 (9, Eric-4, BTM-4, SR-19 ve OBT-199 olarak da internette satılmaktadır), Tokyo Metropolitan Halk Sağlığı Enstitüsü'nden Nakajima ve arkadaşları tarafından Ocak 2011'de tanımlanmış, bunu aynı yıl içinde aynı grup tarafından 2-metoksi regioizomeri (RCS-2, 7) takip etmiştir.

RCS-4, ABD, Belçika, Güney Kore ve Yeni Zelanda'da ele geçirilen ticari ürünlerde saptanmış olup, bu da uluslararası düzeyde geniş çaplı bir kullanıma işaret etmektedir. 2011 yılında Polonya'da ele geçirilen bazı ürünlerde tespit edilen en yaygın üçüncü madde olmuştur. Almanya'da 2011 yılında SK ürünleri ile ilgili yapılan bir araştırmada, bir bitkisel karışımda 157 mg/g konsantrasyonda RCS-4 bulunmuştur. Bununla birlikte, Japonya'daki çeşitli ürünlerde 18 ve 1,7 mg/g bitkisel madde konsantrasyonlarında RCS-4 bulunmuştur. Miktarlardaki farklılık göstermektedir ki, RCS-4 ile ilgili bilgiler yeterli seviyede değildir.

Temmuz 2011'de Yeni Zelanda'da satın alınan ürünlerde RCS-4'ün N-butil homoloğu RCS-4-C4 bulunmuş ve Ekim 2012'de Güney Kore'deki Ulusal Adli Servis araştırmacıları tarafından ele geçirilen ürünlerde regioizomerik RCS-2-C4 tespit edilmiştir. Aynı grup Haziran 2013'e kadar ele geçirdikleri materyallerde RCS-2 ve RCS-3 de bulmuştur (Banister vd., 2015).

Polonya'da 3,5 yıl boyunca (2008-2011) dükkanlarda ve şahıslardan toplanan 2000'den fazla numuneden 420'si SCRA içeriği açısından analiz edilmiş ve 92 numunede RCS-4 tespit edilmiştir. Bu numunelerin 18'inde RCS-4, JWH-081 ile bir arada bulunmuştur.

Diğer ülkelerin yanı sıra, EMCDD'ye bildirildiğine göre, İtalya, Norveç, Türkiye, Birleşik Krallık, Bulgaristan, Hırvatistan, İsveç, Almanya, Çek Cumhuriyeti ve Belarus'ta ele geçirilen bitkisel ürünlerde RCS-4'e rastlanmıştır. İsveç, Danimarka, Yeni Zelanda, Almanya,

Estonya, Macaristan, İrlanda, İtalya, Lüksemburg, Slovenya, Portekiz ve Polonya'da ulusal kontrol altındadır. UR-144 ve AM-2201 ile RCS-4, 2013 yılında Birleşik Krallık'ta ulusal kontrol altına alınmıştır. (Expert Committee on Drug Dependence, 2014).

RCS-4, 2010-2011 yıllarında dünya çapında tüketildikten sonra birçok Avrupa ülkesinde ve ABD'de yasaklanmasının ardından tüketimi azalmıştır.

RCS-4, bir benzoil halkası içeren indol bazlı bir SK olarak bilinmektedir ve adli bilimciler tarafından SK olarak tanımlanmış birkaç N-alkil-3-(metoksibenzoil)indolden ilkinin temsil etmektedir. İnternet üzerinden Eric-4, SR-19, BTM-4 ve OBT-199 gibi çeşitli isimlerle satıldığı bilinen RCS-4, insan tüketimine sunulan çeşitli ürünlerde, bazı analoglarıyla birlikte (RCS-2, RCS-3, RCS-2-C4, RCS-3-C4 ve RCS-4-C4) tespit edilmiştir. Buna rağmen bu kannabinoid sınıfı hakkında görece az şey bilinmektedir (Banister vd., 2015; Ferk vd., 2016).

2.2.1 Farmakokinetik Özellikleri

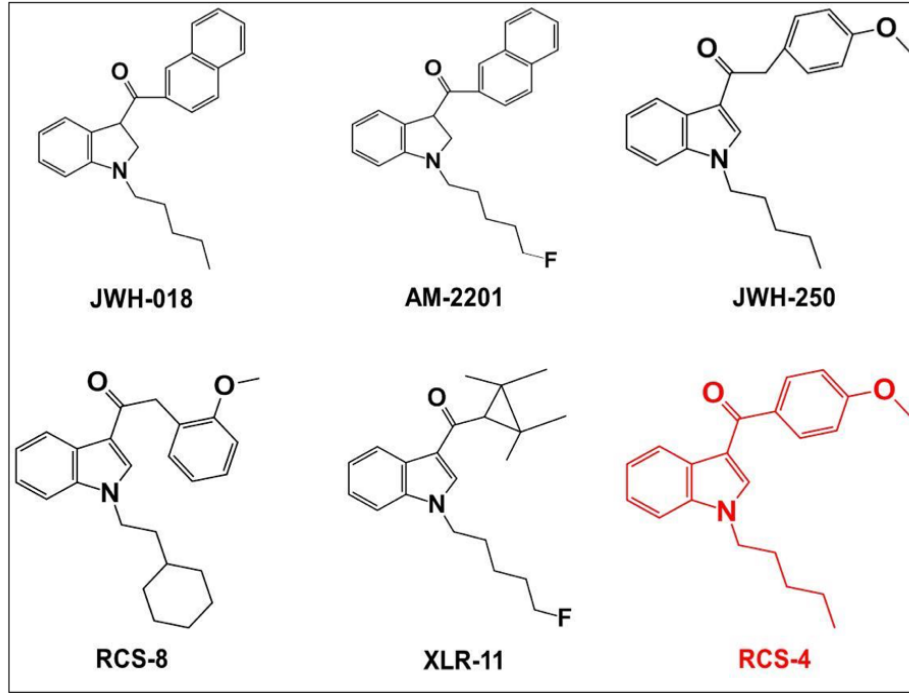
Ksenobiyotiklerin metabolizması, türler arasında korunan ve evrimsel açıdan oldukça eski olan ve çeşitli biyotransformasyon yolları ile gerçekleşir. İlaç metabolizmasının amacı, potansiyel olarak zararlı bileşikler detoksifiye ederek dolaşımdan uzaklaştırmak ve sonrasında vücuttan tümüyle atılmasını sağlamaktır. Karaciğer bu detoksifikasyon mekanizmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Çoğu durumda, ksenobiyotiklerin oksidatif metabolizması ilk olarak hepatik sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir ve bu noktada metabolitler UDP-glukuronosiltransferazlar (UGT'ler) adı verilen bir enzim sınıfı tarafından bir şeker parçası olan glukuronik asit ile konjuge edilmektedir. Bunun sonucunda ortaya çıkan metabolitler daha sonra vücuttan atılabilecek kadar çözünür hale gelmektedir (Tai & Fantegrossi, 2016).

SK'ların metabolik profillerinin belirlenmesi, klinik ve adli laboratuvarların tarama yöntemlerine yeni SK belirteçlerini dahil etmesine olanak tanımaktadır ve SK'ların birçok

metaboliti, ana sentetik kannabinoidlerden daha fazla toksisite göstermektedir. Bu nedenle, sentetik kannabinoidlerin alımını izlemek için çeşitli in vitro ve in vivo sistemler kullanarak SK'ların metabolitlerini tanımlamak oldukça önemli görünmektedir.

Birçok SK'nın in vitro ve in vivo metabolizması, insan ve sıçan karaciğer mikrozomları, insan hepatositleri ve insan bağırsak mikrozomları gibi in vitro modeller ve sentetik kannabinoidlerle tedavi edilen insanlardan ve sıçanlardan alınan idrar ve plazma örnekleri de dahil olmak üzere in vivo modeller kullanılarak, metabolitlerini uyuşturucu kullanımının ilgili göstergeleri olarak kullanmak için incelenmiştir (Kong vd., 2018).

Kimyasal yapıya dayalı olarak, sentetik kannabinoidler daha önce naftoylindoller (JWH-018, John W Huffman tarafından JWH-073, WIN-55, 212-2), naftilmetilindoller (JWH-175), naftoylpirroller (JWH-307), naftilmetilindenler (JWH-176), fenilasetilindoller (RCS-8, JWH-250), sikloheksilfenoller (Pfizer tarafından CP47,497), benzoilindoller (Research Chemical Suppliers tarafından RCS-4, Alexandros Makriyannis tarafından AM-694) ve klasik sentetik kannabinoid (Hebrew Üniversitesi tarafından HU-210) gibi sekiz kimyasal sınıfta sınıflandırılmıştır. Bununla birlikte, birçok yeni bileşik artık adamantilindoller (STS-135, AKB-48), tetrametilsiklopropil (XLR-11, UR-144), indol-3-karboksamid (Org2861, UR-12) veya kinolinil esterler (PB-22, 5F-PB-22) gibi diğer alt yapıları da içermektedir. Temsili bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 5'te gösterilmektedir.



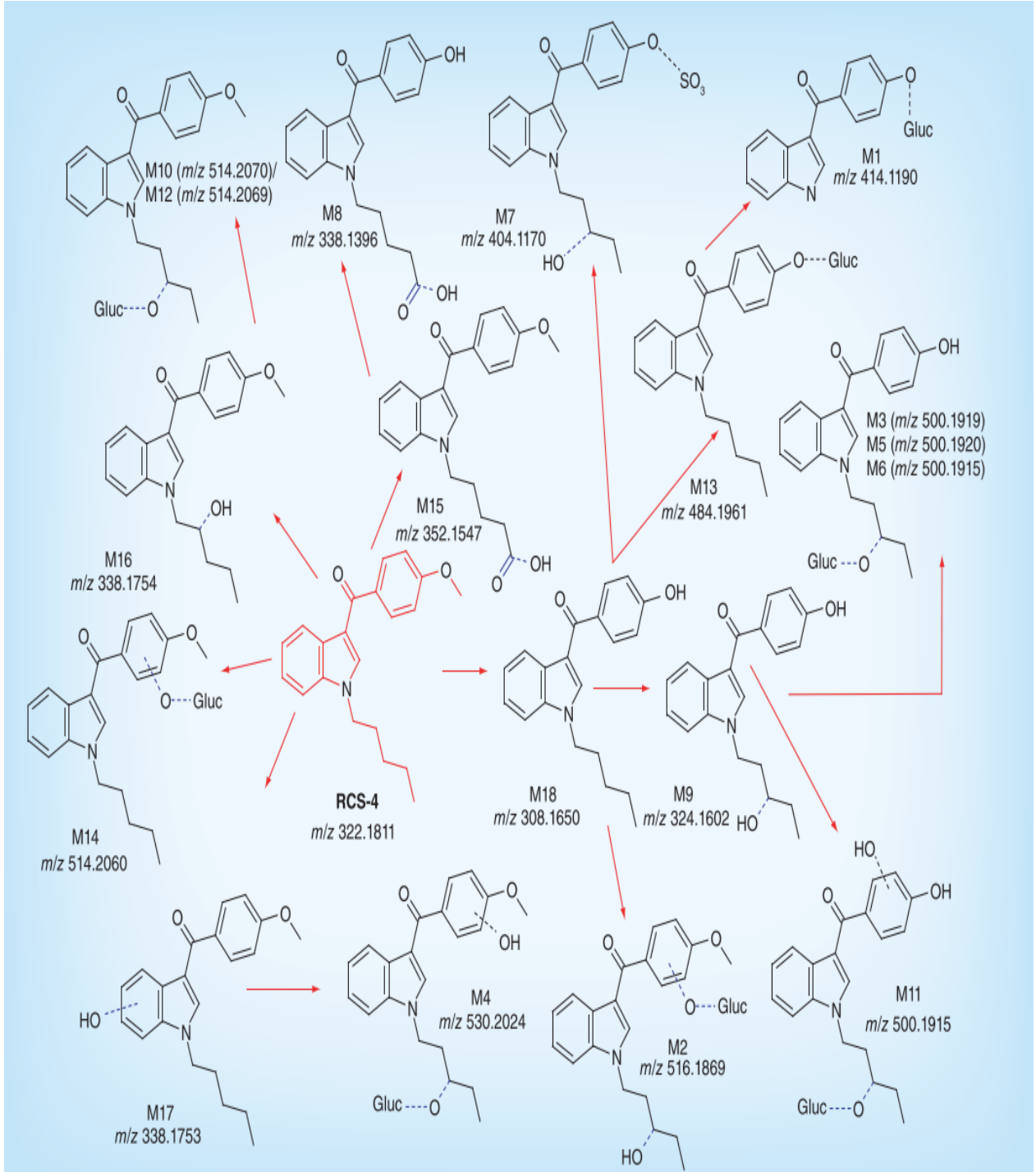
Şekil 5:Yapısal Olarak İlişkili Sentetik Kannabinoidlerin Kimyasal Yapıları(Gandhi vd., 2014)

RCS-4'ün 16 metaboliti, 2012 yılında Kavanagh ve ark. tarafından gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanarak, uyuşturucu zehirlenmesi semptomlarıyla hastanelere başvuran bireylerden alınan idrar örneklerinde tespit edilmiştir ve RCS-4 için metabolik yollar aromatik monohidroksilasyon, N- ve O-dealkilasyon ve N-pentil zincirinin bir ketona oksidasyonu olarak tanımlanmıştır (Kavanagh vd., 2012).

In vitro ve in vivo çalışmalar, esrarın aktif bileşeni olan THC ile karşılaştırıldığında birçok SK için kannabinoid CB1 ve CB2 reseptörlerinde daha güçlü afiniteler olduğunu göstermektedir. Ayrıca, JWH-018 ve JWH-073 metabolitlerinin de insan CB1 ve CB2 reseptörlerinde güçlü bağlanma afinitesi ve gücüne sahip olduğu gösterilmiştir. Sentetik kannabinoidler insanlarda büyük ölçüde metabolize edilmektedir. In vitro çalışmalar, sitokrom P450 (CYP) oksidasyonunun ardından, üridin difosfat glukuronosiltransferaz enzimleri tarafından glukuronidasyonun sentetik kannabinoidlerin metabolize edilmesi için önemli olduğunu göstermiştir. Birçok çalışma, sentetik kannabinoidlerin metabolik profillerinin

aydınlatılmasında insan karaciğer mikrozomlarının faydasını göstermiştir. Alternatif olarak, insan hepatositleri hem Faz I hem de II enzimlerini içerdikleri ve in vivo karaciğer ortamını daha gerçekçi bir şekilde taklit ettikleri için ilaç metabolizmasını incelemek için mikrozomlardan daha uygun olduğu bilinmektedir. Faz I ilaç metabolize edici enzimler tipik olarak aktif, inaktif veya reaktif metabolitlere yol açan oksidasyon, redüksiyon veya hidroliz reaksiyonlarında yer alan sitokrom P450 enzimlerinden oluşmaktadır. Faz II enzimleri genellikle vücuttan kolayca atılabilen polar ilaç konjugatları üretmektedir.

2014 yılında Gandhi ve ark. tarafından RCS-4'ün metabolizasyonunun belirlenmesi amacı ile insan hepatositleriyle bir çalışma yapılmıştır ve bu insan hepatositleri ile hem Faz I hem de Faz II RCS-4 metabolitlerini tanımlayan ilk çalışmadır. Hepatositler karaciğerin parankimal hücreleri olmakla birlikte, ilaç metabolize eden enzimler bakımından zengin olmaları nedeniyle, vücuttaki ksenobiyotiklerin kaderini belirlemede önemli bir rol oynamaktadırlar. Çalışmanın sonucu olarak, on sekiz metabolit TOF-MS kullanılarak tanımlanmıştır (Gandhi vd., 2014).



Şekil 6: RCS-4'ün Olası *İn Vitro* Metabolizasyonu (Gandhi vd., 2014)

Schaefer ve ark. tarafından 2015 yılında farmakokinetik verileri karşılaştırmak amacı ile domuz ve insan serumu, tam kan ve idrarda JWH-210, RCS-4, THC ve ana metabolitlerinin eşzamanlı LC-MS/MS tayini yapılmış ve ana metabolitleri kesin ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır. Domuzlarla kontrollü bir farmakokinetik çalışma yapılması ve elde

edilen sonuçların insan vaka verileriyle karşılaştırılmasının uygun olacağı tespit edilmiştir. Domuzlara RCS-4'ün pulmoner uygulamasını takiben antemortem ve postmortem örneklerin analiz edildiği başka bir çalışmada, yağ dokusunun RCS-4 gibi SK'ların tespit edilmesi için bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, bu tür maddelerin tespiti için ek bir matris sağladığı için adli toksikoloji alanında önem taşımaktadır (Schaefer vd., 2015, 2020).

Schaefer ve ark. tarafından yapılan ikinci bir çalışmada ise, JWH-210, RCS-4 ve THC'nin pulmoner uygulamayı takiben dağılım modelleri domuzlarda araştırılmıştır. JWH-210, RCS-4 ve THC'nin yanı sıra bunların metabolitlerinin konsantrasyonları emilim, metabolizma ve atılımla ilgili dokulardaki en yüksek sonuçlara ulaşılmıştır. Sonuç olarak, akciğer, karaciğer, böbrek ve safra sıvısı/duodenum içeriği, özellikle standart matrislerin mevcut olmadığı durumlarda, postmortem analiz için örnek olarak uygun bulunmuştur. Ayrıca beyin de alternatif numune olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Metabolitler açısından bakıldığında ise RCS-4'ün metabolitlerinden olan HO-RCS-4 en yaygın metabolit olup, RCS-4'ün diğer maddelere kıyasla daha kapsamlı bir şekilde metabolize edildiğini düşündürmektedir (Schaefer vd., 2019).

2.2.2 Farmakodinamik Özellikleri

SK'lerin büyük bir kısmının insanlar üzerindeki farmakodinamik ve farmakokinetik etkileriyle alakalı pek fazla şey bilinmemektedir.

CB1 ve CB2 ECS'de bulunan kannabinoid reseptörleridir ve adenil siklaz aktivitesini baskılamakla görevli G proteinine bağlıdır. ECS, gelişmekte olan sinir sisteminde merkezi bir rol oynarken, olgun sinir sisteminde nöronal etkinliği ve ağ işlevini modüle etmektedir. ECS, endojen kanabinoidleri (endokanabinoidler [eCBs]), kanabinoid reseptörlerini ve eCB'leri taşıyan, sentezleyen ve bozan proteinleri içermektedir. ECS'nin çoğu bileşeninin çok işlevli olduğunu bilmek önem taşımaktadır. Dolayısıyla, ECS'yi ayrı, izole bir sistem olarak

değerlendirmekten ziyade, diğer birçok sinyal yolağını etkileyen ve bunlardan etkilenen bir sistem olarak düşünmek gerekmektedir (Lu & Mackie, 2021).

ECS'nin fizyolojik veya potansiyel patofizyolojik faaliyetleri, özellikle spesifik kannabinoid reseptör ligandlarının (agonistler, kısmi agonistler, antagonistler, ters agonistler) uygulanması veya endokannabinoidlerin biyosentezi ve biyodegradasyonunun farmakokinetik çalışmaları ile oldukça kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. İnsanlardaki ECS mekanizmaları, bağışıklık ve kardiyovasküler sistemlerin işlevleri, gıda alımının kontrolü, doğurganlık, ağrı modülasyonu, hafıza, nöroproteksiyon gibi bir dizi fizyolojik süreçte yer almaktadır (Sulcova*, 2019).

Sentetik kannabinoid agonistleri 1990'larda akademik araştırma merkezlerinde ve ilaç endüstrisinde aday araştırma ilaçları olarak sentezlenmiştir ve ortak olarak kannabinoid CB1 ve/veya CB2 reseptörlerine karşı bir afiniteye sahiptir (Logan vd., 2012). 1990'ların başlarında iki kannabinoid reseptörü tanımlanmış, CB1 ve CB2 olarak adlandırılmıştır. CB1, esas olarak merkezi sinir sisteminde (MSS), CB2 ise ağırlıklı olarak makrofajlar, lenf düğümleri, dalak ve mikrogliya hücreleri gibi immün sistemle ilişkili hücrelerde bulunmaktadır. CB1 reseptörleri esas olarak kavrama, kısa süreli hafıza, hareket ve motor fonksiyonla ilgili MSS bölgelerinde bulunmaktadır. CB1 reseptörünün THC ya da SK reseptör agonistleri tarafından aktivasyonu, diğerlerinin yanı sıra beyindeki birçok inhibitör ve eksitatör sinapta nörotransmitter salınımını düzenlemektedir. Söz konusu bu etkilere CB1 reseptörüne bağlı G-protein aktivasyonu aracılık eder ve nihayetinde cAMP'ye bağlı protein kinazların aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır (Expert Committee on Drug Dependence, 2014). Kannabinoid reseptörleri, G-protein bağlı reseptörlerin geniş bir sınıfında gruplandırılmaktadır ayrıca işlev ve aktivitelerinin düzenlenmesinde yer alan karmaşık mekanizmalara sahip oldukları bilinmektedir (Costain vd., 2018).

Banister ve ark. yaptığı çalışmada, RCS-4'ün tüm regioisomerlerinin ve bunların C4 homologlarının sentezi ayrıca insan CB1 ve CB2 reseptörlerinde bu SC sınıfının yapı-aktivite ilişkilerini sistematik olarak araştırmıştır. Çalışmaya göre tüm bileşikler CB1 ve CB2 reseptörlerinde agonist aktivite göstermiştir ve C4 homologları CB2 reseptörlerini CB1 reseptörlerine tercih etmiştir. Analogların çoğunun (RCS-2, RCS-2-C4, RCS-3, RCS-3-C4 ve RCS-4-C4) CB1 ve CB2 reseptörlerine yönelik aktivitelerine rağmen dünyanın büyük bir kısmında düzenlemeye tabi olmadığından, bu analogların karaborsada ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır (Banister vd., 2015).

Costain ve ark. yaptığı çalışmada, Δ^9 -THC'nin farmakolojik özelliklerini RCS-4, THJ-2201 ve AB-CHMINACA ile karşılaştırmıştır. Sonuçlar, RCS-4 ve THJ-2201'in Δ^9 -THC'ye benzer etkinlik seviyeleri gösterdiğini, AB-CHMINACA'nın ise diğer CB1 agonistleriyle tutarlı olmayan bir etki ürettiğini göstermektedir. , RCS-4 forskolin varlığında kısmi bir agonist olarak hareket etmiştir ancak, forskolin yokluğunda cAMP seviyelerinde de önemli bir artışa neden olmuştur. Çalışmanın sonu RCS-4'ün protean agonist olarak hareket ediyor olabileceğini ayrıca THJ-2210 ve RCS-4'ün Δ^9 -THC'ye benzer farmakolojik özelliklere sahip CB1 agonistleri olduğunu göstermektedir (Costain vd., 2018).

2.2.3 Toksikolojik Etkileri

Biyolojik örneklerde kötüye kullanılan ilaç maddelerinin tespiti ve miktar tayini, acil vakaların tanı ve tedavisinde en önemli ve gerekli bilgilerdir. Çoğu SK kapsamlı bir şekilde metabolize olmaktadır ve bu da onları biyolojik örneklerde tanımlamayı zorlaştırmaktadır. SK'ye erişim kolay olup, kullanıcılarının çoğunluğunu esrar, alkol ve nikotin gibi çok sayıda uyuşturucu madde kullanım öyküsü olan 13 ila 59 yaş aralığındaki erkekler oluşturmaktadır. Çeşitli isimler ve ambalajlar altında satılmakta ve en yaygın uygulama olarak sigara şeklinde içilmektedir (Castaneto vd., 2014; Kong vd., 2018). SK'lar, süre ve kullanım miktarına bağlı

çok çeşitli fizyolojik ve psikiyatrik yan etkiler gösterebilmektedir. Tüketilmelerinin ardından ortaya çıkan geniş semptom yelpazesi, CB1 reseptörlerinin yüksek afiniteli ve yüksek etkili agonistleri olduğundan ve CB1 reseptörlerinin merkezi ve periferik sinir sistemindeki yaygın dağılımı göz önünde tutulduğunda bu semptomların CB1 reseptörlerinin güçlü bir şekilde uyarılmasından kaynaklanması muhtemel ve anlaşılabilir bir durumdur (Hermanns-Clausen vd., 2013).

SK'ların hücrel toksisitesini araştırmak için yapılan bir çalışmada, çok kullanılan beş SK in vitro ortamda değerlendirilmiştir. Bir insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y), bir insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı (HepG2) ve bir embriyonik sıçan kalp hücre hattı (H9c2) sırasıyla nöronal, hepatik ve kardiyak toksisiteyi değerlendirmek amaçla kullanılmıştır. Canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, membran geçirgenliği/bütünlüğü değerlendirilmiş ve hücrel protein içeriği ölçülmüştür. Bunun sonucunda araştırılan SK'ların yalnızca test edilen en yüksek konsantrasyonda nörotoksik, kardiyotoksik ve hepatotoksik olduğu belirlenmiştir (Santos-Carvalho vd., 2015).

Sentetik bir kannabinoid olan RCS-4'ün genotoksisitesi incelenmiş, yapılan çalışmalar RCS-4'ün insan sağlığı açısından endişe yaratabilecek genotoksik özelliklere sahip olabileceğini, insan hücrelerinde kromozomal düzeyde DNA kararsızlığına neden olduğunu göstermektedir. Genotoksisite, bir maddenin bir hücre içerisindeki genetik bilgiye zarar vererek potansiyel olarak mutasyonlara veya kansere yol açma yeteneğini ifade etmektedir ve genetik materyalin kararsızlığının insan kanserinin etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Ferk vd., 2016).

RCS-4'ün toksik etkileri hakkında ayrıntılı ve yeterli bilgi mevcut değildir. Genel olarak, SK reseptör agonistleri, bulantı, kusma, ajitasyon, halüsinasyon, panik atak, taşikardi, hipertansiyon ve bazen göğüs ağrısı, miyokloni, akut psikoz ve nöbetlere neden olabilir.

Hastaneye başvuran zehirlenme vakaları olsa da, SK reseptör agonistleri nadiren tanımlanmıştır (Expert Committee on Drug Dependence, 2014).

EMCDDA'nın 2023 raporuna göre SK'ya bağlı ölümler, 2021'de Macaristan'da 16'ya (2020'de 34) ve 2021'de Türkiye'de 46'ya (2020'de 49) geriledi. Yedi ülke, 2021'de başta Avusturya (7 vaka), Macaristan (7 vaka) ve Finlandiya'da (6 vaka) olmak üzere sentetik katinonlarla 26 ölüm bildirdi. 2020 ve 2021 için verilerin mevcut olduğu yerlerde, 2020'de sadece 2 vakanın bildirildiği Avusturya hariç, rakamlar sabitti (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2023).

2.2.4 Yasal Düzenlemeler

SK'lerin kimyasal yapılarının kolayca değiştirilebilir olması ve farklı isimlerle piyasaya sürülmeleri yasal olarak denetlenebilmelerini ve takibini oldukça zor bir hale getirmektedir. Barratt ve ark. göre, dünya genelinde NPS tespit edilme sayısının hızla artması, her yeni maddeyi tek tek değerlendirip yasaklama yaklaşımını sürdürülemez hale getirmiştir (Barratt vd., 2017).

Avrupa ve ABD'de, SC tüketimi ile ilgili sağlık sorunları nedeniyle hükümet kurumları, bu maddelerin satışını ve dağıtımını sınırlamak için yasal adımlar atmıştır (Caviness vd., 2015). 2009 yılının başından itibaren, Avusturya ve Almanya başta olmak üzere, SK'ler yasaklanmış ve kullanımları kontrol altına alınmaya başlanmıştır. Ardından Fransa, Lüksemburg, Polonya, Litvanya, İsveç ve Estonya gibi diğer ülkeler de bu bileşikler yasaklamıştır (Fattore & Fratta, 2011). Henüz sınıflandırılmamış yeni maddelerin mevcudiyetini engellemek adına Avustralya, halihazırda düzenlenmemiş veya muaf kategorilere ait olmayan tüm 'psikoaktif maddeleri' yasaklayan genel veya kapsamlı yasaklama mevzuatını yürürlüğe koyan ilk devlet olmuştur (Alves vd., 2020).

Birleşik Krallık'ta, JWH-018 gibi "first generation/birinci nesil" SC'ler 2009'un sonunda kontrol altına alınmış ve AM-2201 ve UR-144 gibi "second generation/ikinci nesil" ürünleri kontrol altına almak için Şubat 2013'te ek mevzuat çıkarılmıştır (Waugh vd., 2016). Bu ürünlerin satışını durdurmak yerine, üreticiler önceki kontroller altında yasaklanan maddelerin yerine 5F-APICA, 5F-PB-22, PB-22 ve 5F-AKB-48 gibi yeni kannabimimetik maddeler geliştirmişti (Iversen Les & Gibbons Simon, 2014). Şu anda, bu maddeler Birleşik Krallık'ta 1971 tarihli Uyuşturucu Maddeler Yasası kapsamında B Sınıfı uyuşturucular olarak kalıcı olarak kontrol altındadır (Home Office, 2018).

NPS pazarının karmaşık ve dinamik doğası göz önüne alındığında, Portekiz NPS'nin hızla yayılmasını durdurmak için özel mevzuat kabul etmiştir. Madeira Özerk Bölgesi, ülkede NPS'ye karşı özel önlem alan ilk bölge olmuştur. Ekim 2012'ye kadar NPS, 4 ölüme ve yaklaşık 190 hastaneye yatışa neden olmuştur ve bu durum Madeira hükümetini 25 Ekim tarihli 28/2012 M Sayılı Kanun Hükmünde Kararname'yi uygulamaya koyarak bu maddelerin satışını ve dağıtımını yasaklamak için yasal önlemler almaya zorlamıştır. Ertesi yıl, Portekiz'de yeni bir mevzuat (17 Nisan tarihli 54/2013 Sayılı Kanun Hükmünde Kararname) çıkarılmış ve 45'i SC olan 159 NPS'nin üretimi, ihracatı, reklamı, dağıtımı ve satışı yasaklanmıştır (Henriques vd., 2018). Bu önlemler, stokları ele geçirerek ve "akıllı dükkânlar" olarak adlandırılan yerleri kapatarak NPS arzını azaltmaya yardımcı olmuştur.

ABD'de, 2010'dan önce SC'ler ne federal düzeyde ne de herhangi bir eyalet tarafından kontrol edilmemekteydi. Ancak, K2 ürünlerinin neden olduğu belirgin zararlar ve bu ürünlerdeki ana psikoaktif bileşenler olarak tanımlanan CP-47,497, JWH-018, JWH-200, JWH-073 ve kannabikloheksanol ile ilgili ilk analitik çalışmaların ardından, 1 Mart 2011'de Uyuşturucu ile Mücadele Dairesi (DEA), bu beş bileşiği geçici olarak Kontrollü Maddeler Yasası'nın (CSA) I. Çizelgesi'nde yer alan kontrollü maddeler listesine dâhil etmiştir (Drug Enforcement Administration (DEA), 2011).

2012 yılına gelindiğinde, yasaklanan bileşikler, RCS-4, JWH-122, AM-2201, JWH-203 ve JWH-210 gibi yapısal olarak benzer olanlarla değiştirilmiştir. Bu durum, bu ürünlerin üreticilerinin SC düzenlemesinin bir adım önünde kaldığını göstermektedir (Brents & Prather, 2014; Musah vd., 2012). Ancak, Haziran 2012'de Kongre, DEA'nın Mart 2011'de geçici olarak düzenlediği beş SC ve 10 ek SC'yi kalıcı olarak planlamak için mevzuat kabul etmiştir (Brents & Prather, 2014; Sacco, 2014).

Şu anda, CSA'nın I. Çizelgesi'nde yer alan kontrollü maddeler listesi, 43'ü kannabimimetik ajan olan 221 maddeyi içermektedir (United States Drug Enforcement Administration (DEA), 2019). DEA, halkı bu maddelerle ilgili tehlikelerden korumak için NPS'nin ticareti ve kötüye kullanımı sorununu ele almak için tüm mevcut kaynakları kullanmaya devam etmektedir.

NPS sorununa yönelik yasal çabalara rağmen, yasadışı uyuşturucu pazarında yeni SC'ler ortaya çıkmaya devam etmektedir. Ülkeye özgü mevzuattaki farklılıklar ve bu mevzuatın uygulanabilirlik kapasitesi, NPS ticareti için fırsatlar yaratmakta ve etkili kolluk kuvveti müdahaleleri için büyük bir engel teşkil etmektedir (Tetty & Levissianos, 2017).

Mayıs 2010'da Türkiye'de ilk SK ele geçirilmiştir. Türkiye'de üretiminin olmadığı belirlenen bonzainin yasa dışı bir şekilde yurt dışından getirildiği tespit edilmiştir. ABD, Almanya, Portekiz, Çin, Hollanda, KKTC, İngiltere, İspanya ve Macaristan gibi ülkeler ithalat yapılan ülkelerden bazılarıdır. Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi olarak bilinen TUBİM, Erken Uyarı Sistemi (EWS) adı verilen sistem aracılığıyla birkaç SK bildirimini yapmıştır ve 2011'den bugüne madde grubu olarak SK'nın, 2313 sayılı 'Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun' hükümlerine dahil olduğu bilinmektedir. (Artuç vd., 2014).

Türkiye’de, 22.05.2013 tarihli ve 2013/4827 sayılı kararname eki listesinde, SK’ların büyük bir bölümü yer almış ve yasa dışı madde olarak kabul edilmiştir. 13.02.2011 tarihinden bu yana RCS-4, AM-2201, JWH-019, JWH-201, JWH-302, JWH-018, CP-47 gibi etken maddeler 2313 sayılı kanun kapsamına alınmıştır ve bunu takiben 2013 yılında 30 adet, 2014 yılında 52 adet SK ise mayıs ayından itibaren yasaklı maddeler kapsamına dahil edilmiştir. 24 Şubat 2015 tarihinde yapılan kanun değişikliği ile ‘Bonzai’ gibi sentetik uyuşturucu maddeleri de Türk Ceza Kanunu’na dahil edilmiştir. ‘Morfin’ ibaresinden sonra gelmek üzere ‘sentetik kannabinoid ve türevleri’ ibaresi, 5237 Sayılı Türk Ceza Kanunu’nun 188. maddesinin dördüncü fıkrasına eklenmiştir (Pakış & Polat, 2016).

2.2.5 Analiz Yöntemleri

SK'lar, genellikle bilinmeyen ve beklenmedik bileşim ve konsantrasyonlarda üretildikleri ve kullanıcılar tarafından bilinçsiz bir şekilde tüketildikleri için analizleri, klinik ve adli toksikoloji için fazlaca önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra yasa dışı laboratuvarlar, SK’lar ile ilgili yasal analizleri atlatmak için devamlı olarak yeni SK’lar üreterek toksikolojik analizler karmaşık bir hale getirmektedirler (Schaefer vd., 2016; Scheidweiler & Huestis, 2014).

Bitkisel ürünlerdeki SK’ları tanımlamak, miktarlarını tayin etmek, idrar, serum ve tükürük gibi vücut sıvılarında ve ayrıca saç örneklerinde metabolitlerini tespit etmek için kimyası, toksisitesi ve farmakolojisi ile ilgili önemli araştırmalar yapılmaktadır. SK’ların kimyasal olarak ayrıldığı gruplara göre, bu grupların her birinin farklı üyelerinin tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesi farklı analitik teknikler ve analiz yöntemleri gerektirmektedir.

Benzoilindol grubundan olan RCS-4 ve metabolitleri için, öncelikle maddelerin kimyasal yapılarını tespit etmek için, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS), ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HR/MS/MS),

gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) gibi yöntemler tercih edilmektedir. Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyonu-kütle spektrometresi (MALDI/TOF/MS) ise bitkisel karışımların SK'lar açısından direkt ve hızlı bir şekilde taranması için kullanılmaktadır (ElSohly vd., 2014).

SK'ların serumdaki maksimum konsantrasyonlarına sigara tüketiminin ardından 10 dakikadan daha az bir sürede ulaşılabilir (Teske vd., 2010). Bundan dolayı, ilacın serumdan tespiti genellikle zordur. SK metabolitlerinin parçalanması ana madde ve analoglarına benzediği için ana maddeyi ve kandaki metabolitlerini tek başına GC/MS ile belirlemek zor olabilmektedir. Bunun yanı sıra düşük hassasiyet, kandaki SK'ların GC-MS ile tespit edilmesi için bir engeldir (Namera vd., 2015). Yüksek hassasiyeti nedeniyle LC/MS/MS yöntemi, SK'ların ve metabolitlerinin kan ve idrarda ng/mL düzeylerinde izlenebilmesi için kullanılabilmektedir ve genellikle tercih edilen yöntemdir (Castaneto vd., 2014).

2.3 LC/MS/MS Yöntemi

LC-MS/MS sistemi, spektroskopi ve kromatografi sistemlerinin tek bir cihaz altında birleştirilmesi ile oluşturulmuş çoklu bir sistemdir.

LC-MS/MS sisteminin bileşenleri aşağıdaki gibidir:

- HPLC/UPLC pompa sistemi
- Analitik kolon
- İyon kaynağı
- Yazılım
- Dedektör
- Lensler
- Analizör

- MS vakum sistemi

LC-MS/MS, tespitin zor olduğu çok düşük konsantrasyonlarda bile maddenin miktar tayininin yapılabilmesi için imkân sağlamaktadır. Çoklu analit tayininde, kompleks matrislerdeki eser miktarda bulunan analitlerin hassas miktar tayininde ve doğrulanmasında kullanılmaktadır. Bunun yanısıra et, süt, sebze, meyve gibi besin numunelerinde pestisit ve metabolitleri, hormon ve metabolitleri, aflatoksin-mikotoksin analizleri vb. ile kan ya da doku gibi biyolojik numunelerde ilaç ve metabolitlerinin ölçülmesi gibi farklı uygulama alanları da mevcuttur. Ölçüm hassasiyeti mikrolitre (μL) örnek hacimlerinde nanogram (ng), pikogram (pg) düzeyinde bir duyarlılığa sahiptir.

Kütle spektrometrisi (MS) neredeyse yüz yıllık bir geçmişe sahiptir. Temel ilkeleri ilk kez Nobel ödüllü Sir Joseph John ('J. J.') Thomson tarafından 1897 yılında Cambridge Felsefe Derneği'nde verdiği bir konferansta tanımlanmıştır. 1913 yılında iyonize neon gazı akışına manyetik ve elektrik alan uygulayarak iki izotopik bileşene ayıran Thomson, bunu deneysel doğrulama ile takip etmiştir.

Özellikle moleküler ağırlıkları düşük olan hedef maddeler için, immünoassayler ya da geleneksel yüksek performanslı/basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlere kıyasla daha yüksek analitik özgüllük sunmaktadır. GC-MS ile kıyaslandığında ise daha yüksek verime sahip olduğu görülmüştür (Grebe SKG; Singh R, 2011).

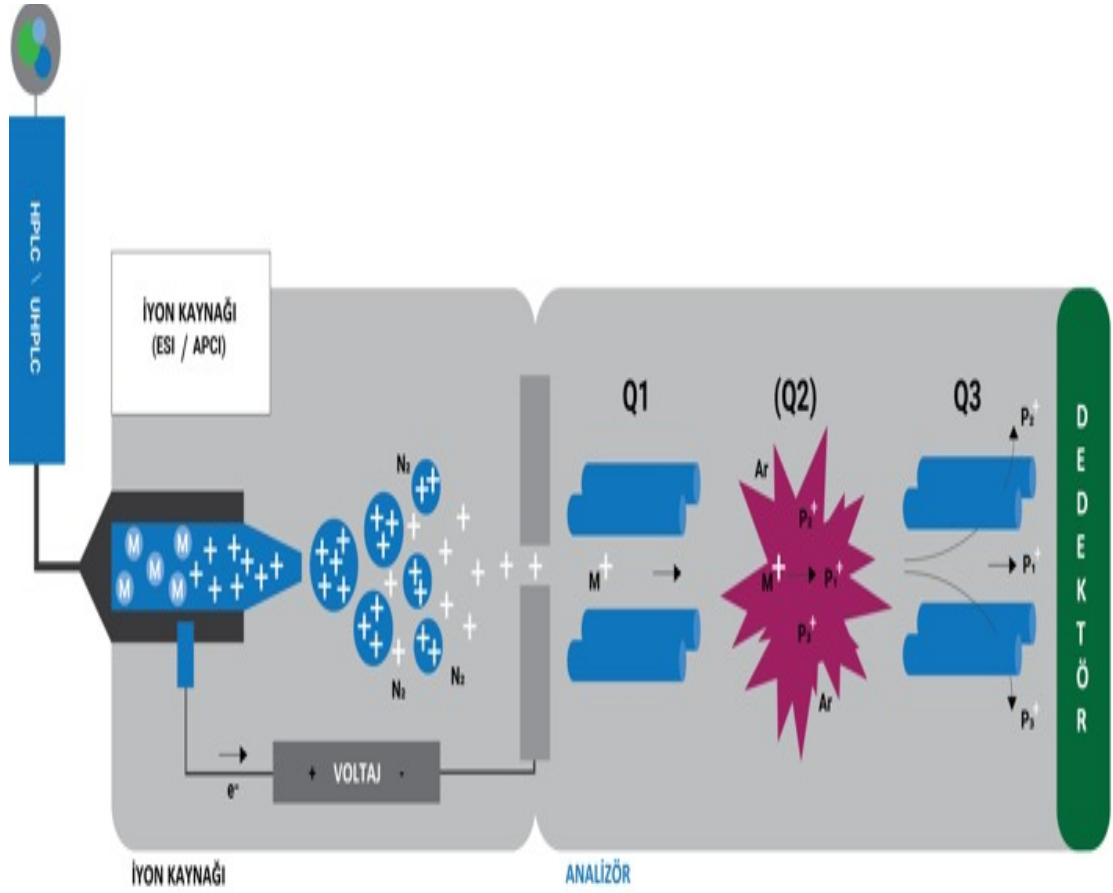
LC-MS/MS tekniğinde UPLC cihazı sayesinde moleküller önce fizikokimyasal yapılarına göre ayrılmakta, daha sonra kütle dedektörü yardımıyla analizi yapılmaktadır. Kütle spektrometreleri molekülleri iyonizasyon yolu ile uyarmakta, böylece onları yüklü ve iyonize moleküllere dönüştürmektedirler. Birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılan moleküller collision (parçalanma) gazı olarak bilinen özel ve yüksek derecede saf olarak bulunan bu gaz ile parçalanmaktadır. Bu işlemten sonra ikinci kuadrupol filtrede ise bu

parçalanmayla oluşan iyonlar ile tespit yapılmakta ve miktar belirlenmektedir. Örnekte bulunan bileşenlerin moleküler ağırlıkları, yapıları ve miktarları ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır. Büyük proteinleri ve küçük bileşiklerini de kapsayan polar iyonik, termal açıdan kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin tayinine yönelik analizler yüksek hassasiyetle ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

LC/MS/MS'in çalışması; MS'e ulaşmadan önce numune bileşenlerini ayıran ve konsantre eden bir sıvı kromatografi cihazı (HPLC) ile başlamaktadır. Kütle spektrometresinde, kuadropoller iyonları doğrudan bir elektrik alanı ile birleştirilmiş, salınan bir radyo frekansı uygulayarak filtrelemekte ve bu da iyonların kütle-yük oranlarına (m/z) göre ayrılmasına yol açmaktadır. Üçlü kuadropol konfigürasyonu içinde, birinci kuadropol izolatları analit moleküler iyonları, ikinci kuadropol parçaları moleküler iyonları seçmekte ve üçüncü kuadropol, bir dedektör aracılığıyla ölçüm için iyon parçalarını seçici olarak izole etmektedir.

Bir LC/MS/MS sistemi üçlü kuadropol cihazı olarak bilinmesine rağmen, teknik olarak bir tandem kuadropol kütle analizörüdür. Birinci ve üçüncü kuadropol kütle analizörleridir, ikinci kuadropol ise bir çarpışma hücresi olarak işlev görmektedir. Bu yöntem daha fazla yapısal bilgi, gelişmiş seçicilik ve hassasiyet sağlamakta, güçlü ve temiz bir sinyal sağlamaktadır.

Bir numuneden belirli bir kütle arandığında, nispeten temiz bir numune matrisinden belirli bir kütlenin seçilmesini sağladıkları için tek kuadropollu kütle spektrometrelerinden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, aynı kütleye sahip moleküller arasında ayırım yapmak veya karmaşık bir karışımındaki veya bir matristeki analitler arasında ayırım yapmak istendiğinde ise, üçlü kuadropol aletleri gerektirmektedirler.



Şekil 7: LC-MS/MS Çalışma Prensibi

LC-MS/MS çalışma prensibi şu şekildedir;

1. Hazırlandıktan sonra numuneler ayrılır ve bir sıvı kromatografi cihazında (HPLC) konsantre edilir.
2. Kütle spektrometresinin iyon kaynağında moleküller yüklü iyonlar haline gelir. MS'in tespit edeceği numunelerin türüne bağlı olarak farklı iyonizasyon teknikleri geliştirilmiştir. En yaygın olanları:
 - Elektrosprey iyonizasyonu (ESI), aerosol oluşturmak için bir sıvıya yüksek bir voltajın uygulandığı bir elektrosprey yardımı ile iyonlar üretmektedir. "Yumuşak iyonizasyon" tekniği olarak da bilinen ESI, çok az parçalanma yaratır. Bu nedenle, iyonizasyon tekniği olarak ESI'ye sahip olan LC/MS/MS sistemleri, iyonize edildiğinde, bu moleküllerin parçalanabilme yatkınlıklarının üstesinden geldiği için

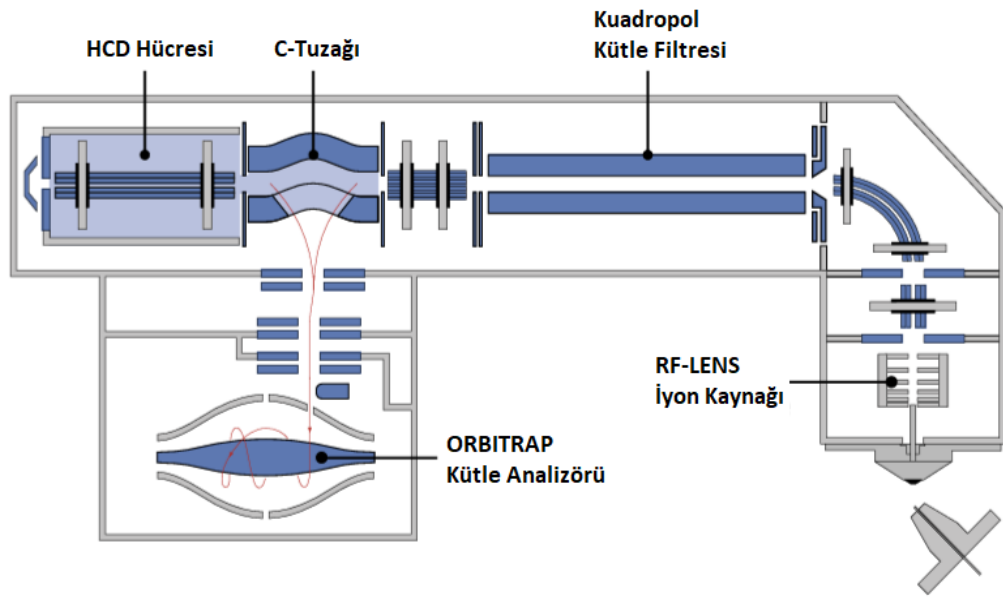
makromoleküllerden iyon üretiminde özellikle faydalıdır. Elektrosprey iyonizasyon yöntemi ilk kez 1984 yılında Masamichi Yamashita ve John Fenn tarafından rapor edilmiş ve 2002 yılında biyolojik makromoleküllerin analiz edilmesi için elektrosprey iyonizasyonun geliştirilmesinden dolayı Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. Elektrosprey'in yumuşak iyonlaştırıcı doğası, nicel çalışmalara uygundur. Hedef moleküller bozulmadan kaldıkça, bu analitin maksimum hassasiyetinin gözlemlenmesine izin veren tek bir iyon seçim için mevcuttur.

- Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI) Kaynak: Bir molekülün polaritesi azaldıkça, elektrospreylerin de onları iyonize etme eğilimi azalır. Bu nedenle APCI geliştirilmiştir. Sıvı bir kılcal damardan pompalanır ve ucunda nebulize edilir. Başlangıçta iyon kaynağında bulunan iyonlaştırıcı gaz ve çözücü molekülleri olan kılcal damarın ucunun yakınında bir korona deşarjı gerçekleşir.
3. Kütle spektrometresinde, kuadrupol filtresi iyonları kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayırmaktadır. Üçlü kuadrupol konfigürasyonu içinde, birinci kuadrupol analit molekülleri izole eder, ikinci kuadrupol parçaları moleküler iyonları seçer ve üçüncü kuadrupol iyonları bir dedektör aracılığıyla ölçüm için seçici olarak izole eder.
 4. İyonlar ve iyon parçaları elektrostatik dedektöre ulaştığında özel yazılımın kütle spektrumuna dönüştüğü bir akım oluşturur.
 5. Kütle spektrumu, örnek içindeki farklı kütle-yük oranlarını (m/z) bolluklarına (spesifik bir iyonun oluşumu, en bol iyonun oluşumuna bölünmesi) karşı çizer.

2.3.1 LC-MS/MS ORBITRAP

LC-MS/MS ORBITRAP Q Exactive Focus MS cihazı, en karmaşık biyoanalitik testler için bile doğru sonuçlar sağlayacak hassasiyete, seçiciliğe ve esnekliğe sahiptir. Kanıtlanmış Q Exactive platformu ve iyon kaynağı sağlamlığı, doğrulanmış ölçümlerin güvenilir bir şekilde

gerçekleştirilebilmesini mümkün kılmaktadır. Yüksek performanslı kantitasyon için tasarlanmış çoklu tarama fonksiyonları, optimum performans sağlamak üzere kolayca özelleştirilebilir ve herhangi bir biyoanalitik tahlilin ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde düzenlenebilmektedir. Q Exactive Focus MS, 70.000 çözünürlük ayarı ve 1 ppm kütle doğruluğu ile üçlü kuadropole denk hassasiyet sağlamakta ve karmaşık matrislerdeki farmasötik bileşiklerin doğru miktar ölçümü için benzeri olmayan bir seçicilik seviyesi sunmaktadır.



Şekil 8: LC-MS/MS ORBITRAP Çalışma Prensibi

Adli toksikolojide yapılan testlerin amacı, hedeflenen bileşiklerin yüksek verimli ve güvenli bir şekilde tanımlanması ve ardından kantitatif doğrulamayla beraber gerçek bilinmeyen bileşikleri tanımlamaktır. Orbitrap tabanlı yüksek çözünürlük kullanılarak elde edilen özgülük, kısa kromatografi ve protein çöktürme veya seyreltme gibi basit ve düşük maliyetli numune hazırlama yöntemleri kullanıldığında da biyolojik matrislerde düşük tespit ve kantitasyon sınırlarına izin vermektedir.

LC-MS/MS'e bakıldığında üç kuadropollü LC-MS/MS yöntemlerini optimize etmekte güç olduğu görülmektedir. Bileşiğe özgü ana iyonu bulmak için tarama modunda bir analiz yaptıktan sonra parçalanma iyon spektrumlarını elde etmek için farklı enerji seviyelerinde bir çok analitik çalışma yapmak gerekmektedir. Saf standartlar kullanılarak uygun parçalanma iyonlarının elde edilmesi ve bu parçalanma ürünleri için uygun parçalanma enerjilerinin tespit edilmesinden sonra gerçek numune ortamında girişimlerin olup olmadığının tespit edilmesi gerekmektedir. Üç kuadropol kullanılması durumunda her bir analit için farklı zaman dilimleri oluşturulmak zorundadır. Metod ve ortam koşullarından dolayı alıkonma zamanında değişiklik olması durumunda aradığımız maddelerin tespit edilememesi sorunuyla karşılaşılabilir.

2.4 Validasyon

Validasyon, yeni bir analitik metodun veya önceden valide edilmiş bir metottaki değişikliğin etkinliğini ve güvenilirliğini ve aynı koşullardaki tekrarlanabilirliğini kanıtlamak için yapılan, birbirine bağlı birçok deney ile gerçekleştirilen çalışmadır. Bir yöntemin valide edilmesinin amacı, çalışılan standart koşullar altında yöntemin amaçlanan kullanım düzeyinde başarılı bir şekilde çalışabileceğine dair nesnel kanıtlar oluşturmak ve yöntemin sınırlamalarını belirlemektir.

2.4.1 Seçicilik

Seçicilik, bir yöntemde hedef analiti, diğer analitleri de içeren bir numuneden veya matrisden ayırt edebilmesidir. Bu parametre, kaynakları farklı olan kör matris örneklerine hedef analitin eklenmesi daha sonra analiz edilmesiyle değerlendirilmekte ve analiz sonucunda hedef analit ya da diğer analitlerin bir girişimi olup olmadığı gözlemlenmektedir.

2.4.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, konsantrasyonunu bildiğimiz analitlerin, analitik sistemdeki ölçüm sonucuna karşılık gelen grafiğin çizilmesi sonucu elde edilmektedir.

Doğrusallık çalışmaları, örnekteki analit miktarının belirlenebilmesi için gerekmede; kalibrasyon eğrisi, iç standart ekleme ve standart ekleme yöntemleri ile gerçekleştirilebilmektedir. İç standartlar, matris içerisinde bulunmayan, hedef analitin kimyasal yapısına yakın olan maddelerden seçilerek, örnek hazırlama basamaklarındaki kayıpları, analizler sırasındaki rastgele ve sistematik hataları düzeltmeye yardımcı olan maddelerdir.

2.4.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

LOD değeri, numunedeki analitin boş matrinden güvenilir bir şekilde ayırt edilebilen ve analitik yöntemle tanımlanabilen en düşük konsantrasyonunun tahmini iken LOQ ise, bir numunedeki analitin, kabul edilebilir yanlılık ve hassasiyetle güvenilir bir şekilde ölçülebilen en düşük konsantrasyonunun tahmini olarak tanımlanmaktadır.

2.4.4 Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntem için elde edilen sonucun referans değere yakınlık derecesi olarak tanımlanmaktadır. Yani, geliştirilen yöntem ile elde edilen ölçüm sonucu, referans değere ne kadar yakın ise, yöntem o kadar doğrudur. Doğruluk, gerçeklik ve kesinlik olmak üzere iki parametre ile değerlendirilmektedir.

2.4.4.1 Kesinlik

Aynı homojen numunenin birden fazla örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığının ölçüsü; sayısal olarak kesinsizlik olarak ifade edilir. Kesinlik parametresi, analit sonuçlarının temel alınan standart değere yakınlığı ile değil, tekrar edilen analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlığı ile ilgilenmektedir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarıyla ortaya koyulmakta ve kesinlik çalışmaları bağımsız analiz sonuçlarının kendi aralarındaki tutarlılığı gösterir. Ölçüm belirsizliğinde rastgele hatanın dağılımını gösterir.

- Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları, aynı ölçüm yöntemi, aynı ölçme cihazı, aynı konum, kısa zaman aralığı içinde ölçümlerin tekrarlanmasıyla yapılmaktadır.

- Tekrar Üretilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmasından sonra farklı zaman, farklı eğri, farklı stok çözeltisi ile iki analistin katılımıyla tekrar üretilebilirlik çalışması yapılmaktadır. Elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlik sonuçlarıyla uygunluk derecesi, tekrar üretilebilirliği ortaya koymaktadır.

2.4.4.2 Gerçeklik

Metodun, yapılan ölçümlerde gerçek değeri verebilme kabiliyetini ortaya koyan çalışmadır. Ölçümlerde baz alınan gerçek değer bilinmelidir ki katım yaptığımız analit miktarına göre elde edilen sonuç karşılaştırılabilir. Bu sebeple yapılan çalışmalarda kullanılan materyallerin sertifikalı referans malzemeler olması gerekmektedir. Gerçeklik hesaplamaları için kesinlik çalışmasından elde edilen veriler kullanılmaktadır. Elde edilen verilerde gerçek değere göre geri alma yani geri kazanı oranları hesaplanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, yasa dışı bir madde grubu olan SK'lerin bilindik üyesi RCS-4 ve onun metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil)'in, serum içerisinde kantitatif analizi için LS-MS/MS sistemi ile yöntem geliştirilmiştir.

3.1 Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Diğer Gereçler

Kullanılan tüm ekipman ve malzemeler marka ve modelleriyle Tablo I'de listelenmiştir.

Tablo I: Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Marka/Model Bilgileri

<i>Ekipman</i>	<i>Model/Marka</i>
Cihaz	Dionex Ultimate RSLC 3000
Dedektör	Q Exactive Focus
Analitik Kolon	Phenyl-Hexyl, 3 µm, 150 x 4.6 mm Toksikolojik Kolon
Santrifüj	Hettich Universal 320R
Ultra Saf Su Cihazı	Elga Purelab Flex
Vorteks	Isolab
Ultrasonik Banyo	Sonorex
Hassas Terazî	Mettler Toledo
Otomatik Pipet	Eppendorf
Buzdolabı	Sharp
Dondurucu (-80)	Hettich
Erlen	Isolab
Vial	Isolab
Balonjoje	Isolab
Falkon tüpler	Isolab
Pipet ucu	Isolab
Spin kolonu	Membran Solutions
pH Metre	Hanna Edge

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Kullanılan tüm kimyasal maddeler, çözücüler ve markaları Tablo II’de listelenmiştir.

Tablo II: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde/Çözücüler ve Marka Bilgileri

<i>Kimyasal Madde/Çözücü</i>	<i>Marka</i>
Metanol	Honeywell
Amonyum Format	Honeywell
Formik Asit	Carlo Erba
Sodyum Asetat	Honeywell
Asetik Asit	Honeywell
Asetonitril	Isolab
RCS-4 Standartı	Cayman
RCS-4 N-(5-karboksipentil) metabolit	Cayman
JWH18-D11	Lipomed

3.2.2 Çözeltiler

Çalışmada kullanılan bütün kalibrasyon çözeltileri ve ara stoklar ana stok çözeltilerinden seyreltilerek hazırlandı ve bu çözeltiler uygun şartlarda muhafaza edildi.

Çözeltilerin tamamı -20 °C’de ve kontaminasyon olmayacak şekilde, balon jodede kapakları parafilmlenerek saklandı. Stok solüsyonlar, belirlenen ölçüm aralığına göre oluşturuldu.

İnkübasyonda enzimin çalışacağı optimum pH seviyesinde tampon çözelti hazırlandı;

Tampon çözelti: 0.1 M (asetik asit + sodyum asetat) pH: 4,8

0,1 M sodyum asetat çözeltisi hazırlamam için, 8.204 gram sodyum asetat 1 litre ultra saf suda çözdürüldü. 0,1 M asetik asit çözeltisi hazırlamak için ise yüzde yüzlük asetik asitten 5.724 ml alınarak ultra saf suda çözdürüldü. Bu iki stok çözelti kullanılarak, sodyum asetat çözeltisinden 56.6 ml, asetik asit çözeltisinden ise 43.4 ml alınarak 100 ml’lik balon joje içerisinde karıştırıldı ve pH:4.8’lik tampon çözelti elde edildi.

Mobil fazlar, analizlerden hemen önce olacak şekilde hazırlandı ve ultrasonik banyoda degaze edilerek kullanıldı.

Mobil Faz A; 1L USS (ultra saf su) içerisinde 126 mg amonyum format + %0,1 formik asit

Mobil Faz B; 1L 1:1 oranında metanol + asetronitril içerisinde 126 mg amonyum format + %0,1 formik asit

3.2.3 Ana Stok ve Ara Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Ana stok RCS-4 çözeltisi: Konsantrasyonu 1000 µg/mL olan sıvı formda referans standart.

Ana stok RCS-4-N(5-Karbosipentil) çözeltisi: 1 mg RCS-4-N(5(Karboksipentil) katı referans standardı tartılıp 10 mL metanol içerisinde balon jodede çözülerek hazırlandı.

Ara stok RCS-4 çözeltisi (10 µg/mL): 1000 µg/mL ana stok çözeltisinden 100 µL alınıp balon joje içerisinde 9900 µL metanol ile 10 mL’ye tamamlandı.

Ara stok RCS-4-N(5-Karboksipentil) çözeltisi (10 µg/mL): 1000 µg/mL ana stok çözeltisinden 100 µL alınıp balon joje içerisinde 9900 µL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

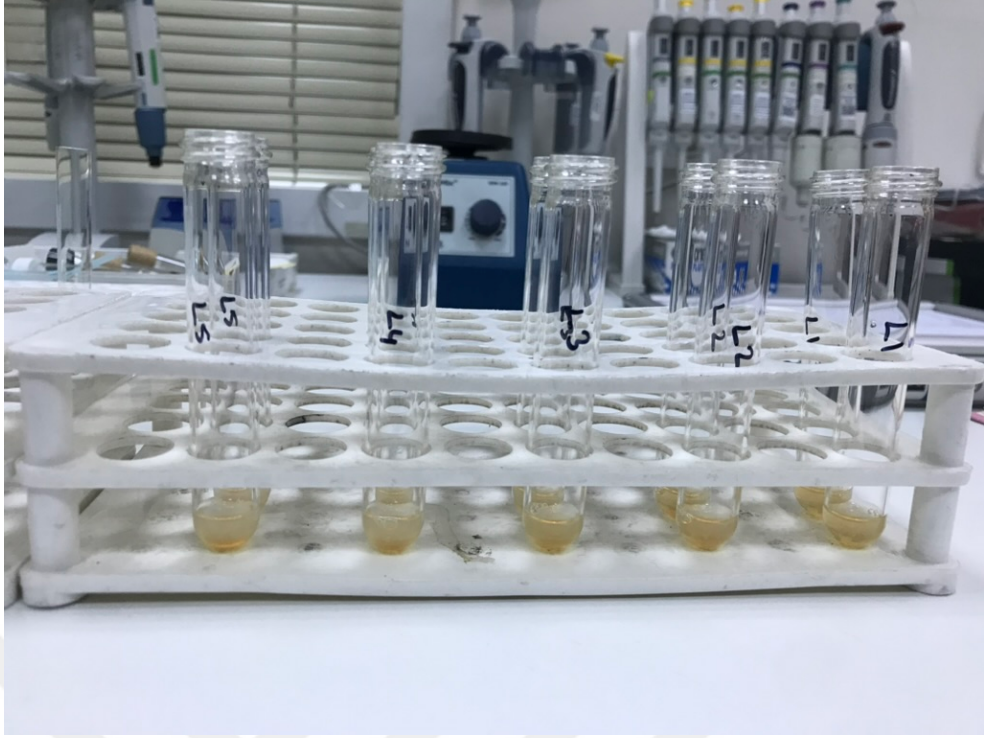
Ara stok standart mix çözeltisi (250 ng/mL): 10 µg/mL ara stok çözeltilerinin her birinden 250 µL alınıp balon joje içerisinde 9500 µL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.3 Biyolojik Örnekleri

Kan örnekleri madde kullanımı şüphesi olmayan gönüllülerden, sarı kapaklı jelli tüplere alındı ve analizin yapılacağı güne kadar +4'te güvenli bir şekilde saklandı.

3.4 Serum Örneklerinin Hazırlanması

Örnekler, enzimatik hidroliz yöntemine uygun olarak hazırlanmıştır. Serum örneklerinden 250 µL alınarak üzerine 500 µL tampon çözelti, 20 µL β-glukuronidaz enzimi ve 500 ppb'lik internal standarttan (JWH18-D11) 50 µL eklendi (Şekil 9). Hazırlanan çözelti 2 dakika vortekslenip 58 °C'de 2 saat inkübe edildi (Şekil 10).

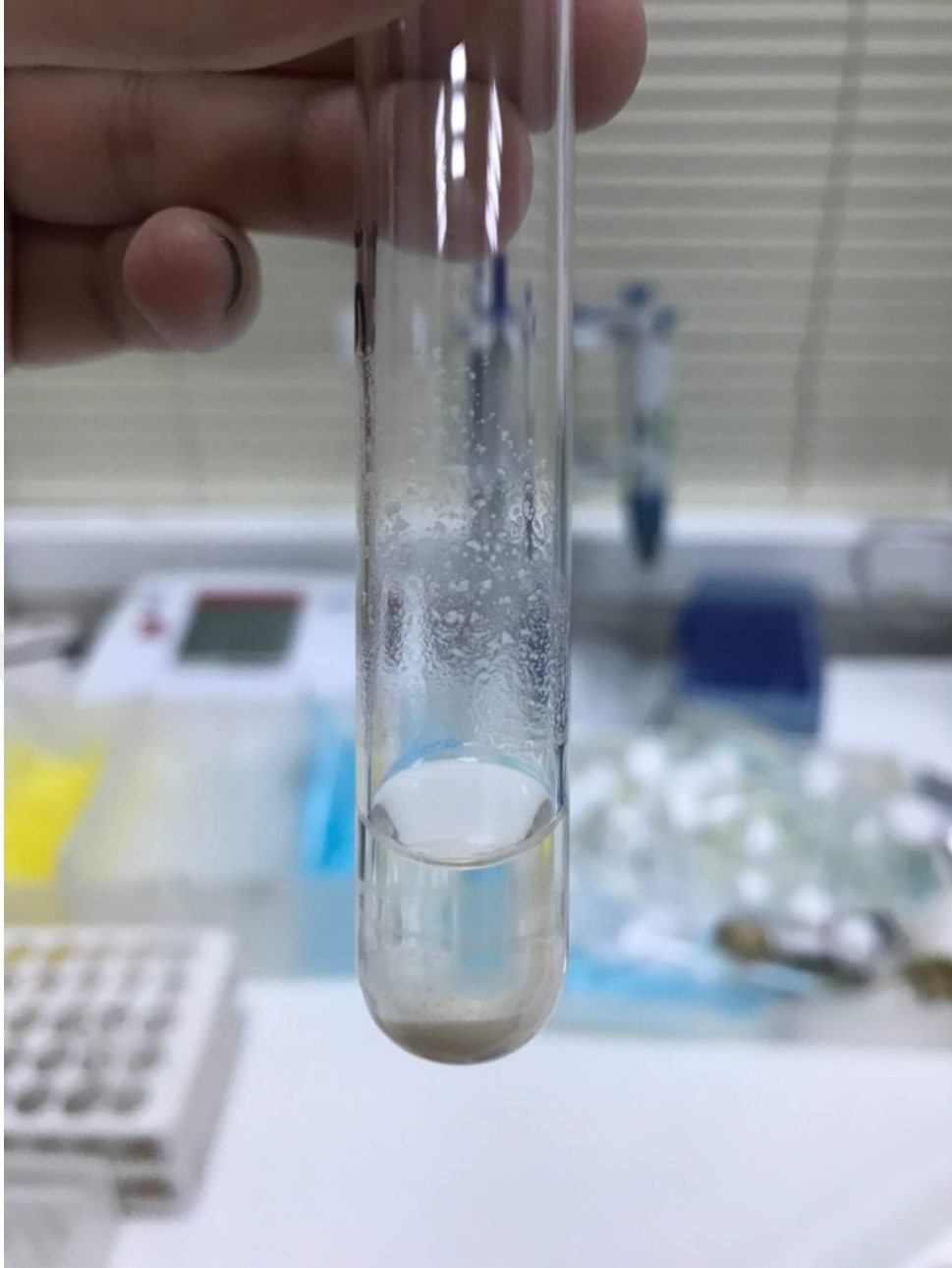


Şekil 9: İnkübasyon Öncesi



Şekil 10: İnkübasyon Sonrası

İnkübasyondan sonra metanol ile 3 mL'ye tamamlanan çözeltide protein çöktürme işlemi metanol ile sağlanmış oldu (Şekil 11).



Şekil 11: İnkübasyon Sonrası Metanol Eklenmesi ile Çöken Protein

Tekrar vortekslenen çözelti 3500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan berrak çözeltiden 750 μ L alınarak 3 katman 0.22 μ m porlu filtrasyon tüpüne aktarıldı. 10.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi, bu işlem kolonda kirlilik kalmaması adına tekrarlandı. 500 μ L alınarak viallere koyuldu ve LC-MS/MS ORBITRAP cihazında yürütüldü.

3.5 LC-MS/MS ORBITRAP Çalışma Şartları

LC-MS/MS ORBITRAP sisteminin çalışma şartları Tablo III'te belirtildiği gibidir.

Tablo III: LC-MS/MS ORBITRAP 'in Çalışma Şartları

İyon kaynağı	Pozitif Mod, ESI
Dedektör voltajı	1,98 kV
Numune sıcaklığı	4.0 [°C] - 45.0 [°C] / Nominal 8.0 [°C]
Arayüz sıcaklığı	300 °C
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Maksimum sıcaklık	50 °C
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Analiz süresi	15 dk
Akış hızı	0.500 [mL/dk]
Mobil faz A	1 L USS içerisinde %0,1 formik asit+ 126 mg amonyum format
Mobil faz B	1 L 1:1 oranında metanol + asetonitril içerisinde %0,1'lik formik asit+ 126 mg amonyum format

3.6 Validasyon Çalışmaları

RCS-4 ve metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil)'in serum örneklerinden tayini amaçlı yapılan bu çalışmanın validasyonu, SWGTOX'un (Toksikoloji Bilimsel Çalışma Grubu) validasyon rehberine uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Yapılan validasyon çalışması kapsamında kalibrasyon eğrisi, doğrusallık, seçicilik, tayin sınırı (LOQ), teşhis sınırı (LOD), geri kazanım ve kesinlik çalışmaları validasyon parametreleri olarak seçildi.

3.6.1 Seçicilik Çalışmaları

Matriks kaynaklı oluşabilecek girişimleri gözlemleyebilmek adına seçicilik çalışması yapıldı. İçerisinde analit bulunmadığı bilinen kör serum örneği 10 kez çalışıldı. RCS-4 ve metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil) için matriks ya da çözücünden kaynaklanan girişim varlığı incelendi.

3.6.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Çalışılan yöntemin kantitatif olarak verdiği sonuçların doğru olduğu konsantrasyon aralığının belirlenebilmesi için doğrusal aralık oluşturuldu.

Doğrusallık çalışmasında IS ya da analit içermediği bilinen boş serum örneklerine 250 ppb'lık RCS-4 ve RCS-4-N(5-karboksipentil) içeren standart çözeltiden 3.4 bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanan örneklerle belirlenen ölçüm seviyelerine göre spike yapıldı ve ilk seviye kör olacak şekilde beş seviye belirlendi.

Seviye1: 0 µL (sadece IS)

Seviye 2: 10 µL

Seviye 3: 25 µL

Seviye 4: 50 µL

Seviye 5: 100 µL olacak şekilde ekleme yapıldı. Yapılan eklemeye göre 3 µL'ye tamamlanacak şekilde metanol eklenip devamı 3.4 bölümünde gibi çalışılmış ve cihaza verildi.

Tüm seviyeler 3'er tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlara göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

3.6.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

Algılama sınırı dediğimiz yani tespit edilebilen en düşük değer olarak bilinen LOD, matriks içinde aradığımız analitin en düşük seviyesinin güvenli ve doğru bir şekilde tespit edilmesidir.

Analiz edilen örneğin kesin ve doğru bir şekilde tespit edilebilen en düşük miktarı olan LOQ ise, kalibrasyon eğrisinin en alt noktası olarak tanımlanabilir.

Çeşitli şekillerde hesaplanabilen LOD ve LOQ değerleri için hassasiyet çalışmaları yapıldı. En düşük kalibratörde 6 tekrarlı birer enjeksiyonlu çalışma sonuçlarının standart sapmaları aşağıdaki formülasyonda belirtildiği gibi, standart sapmanın 3 katı ve 10 katı olacak şekilde hesaplandı.

- $LOD = 3 \times ss$
- $LOQ = 10 \times ss$

ss: standart sapma

3.6.4 Doğruluk

Doğruluk çalışması, kesinlik ve geri kazanım çalışmaları ile yapıldı.

3.6.4.1 Kesinlik

Kesinlik parametresi oluşturmak için günler arası tekrar üretilebilirlik, gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Düşük, orta ve yüksek olarak üç farklı konsantrasyon (10 µL, 50 µL, 100 µL) her birinden 5'er kere çalışıldı.

3.6.4.2 Geri Kazanım

Kesinlik çalışması altında yapılan sonuçlarla değerlendirildi ve elde edilen sonuçların tamamına göre geri kazanım değeri hesaplandı. Geri kazanım değerlerinin % 80-120 aralığında olması hedeflendi.

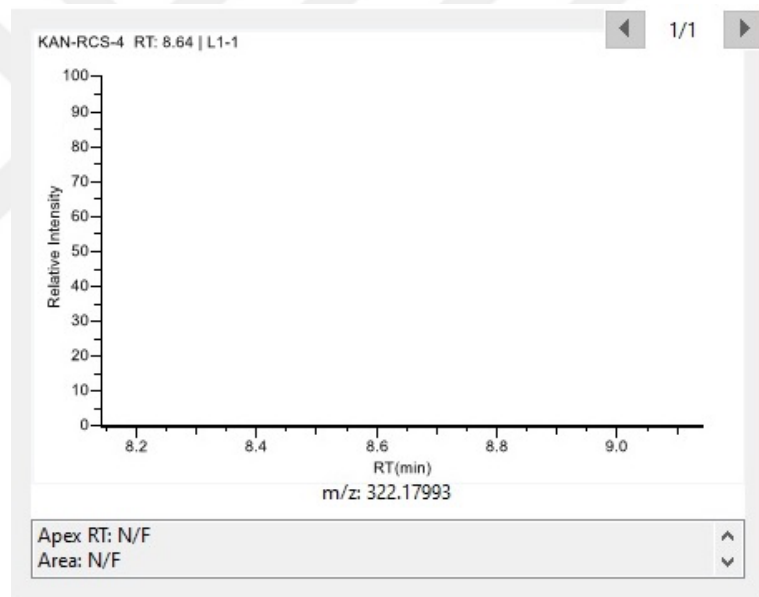


4. BULGULAR

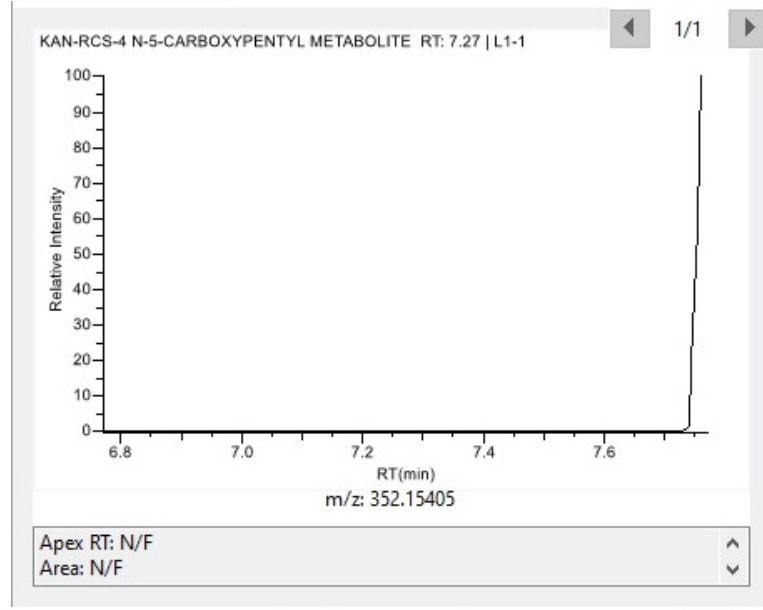
4.1 Metot Validasyonu

4.1.1 Seçicilik

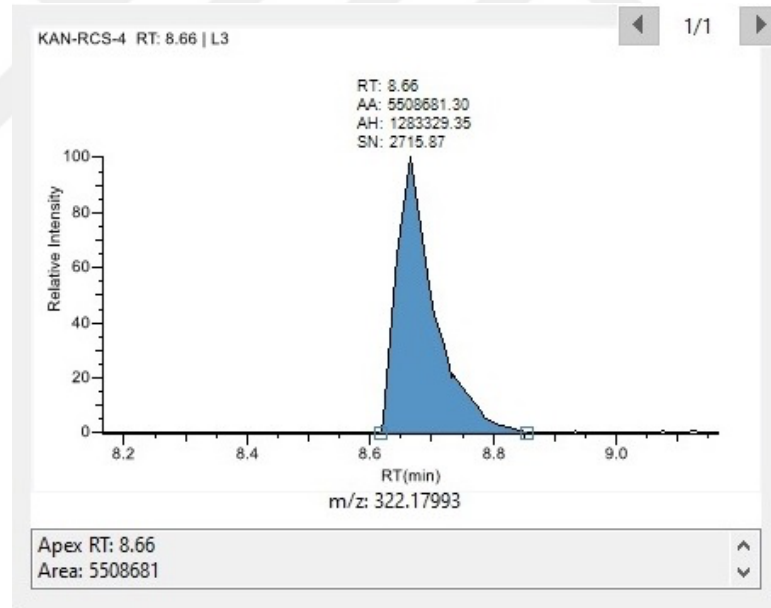
Seçicilik için yapılan çalışma sonuçlarına göre, RCS-4 ve RCS-4-N(5-karboksipentil) için RT değerinde girişim tespit edilmemiştir. Analit bulunmayan serum numunesine ait RCS-4 ve RCS-4-N(5-karboksipentil)'in kromatogramları sırasıyla Şekil 12 ve Şekil 13'te; içine 25 µL konsantrasyonda RCS-4 ve RCS-4-N(5-karboksipentil) spike edilen serum numunesinin kromatogramları ise Şekil 14 ve Şekil 15'te gösterilmektedir.



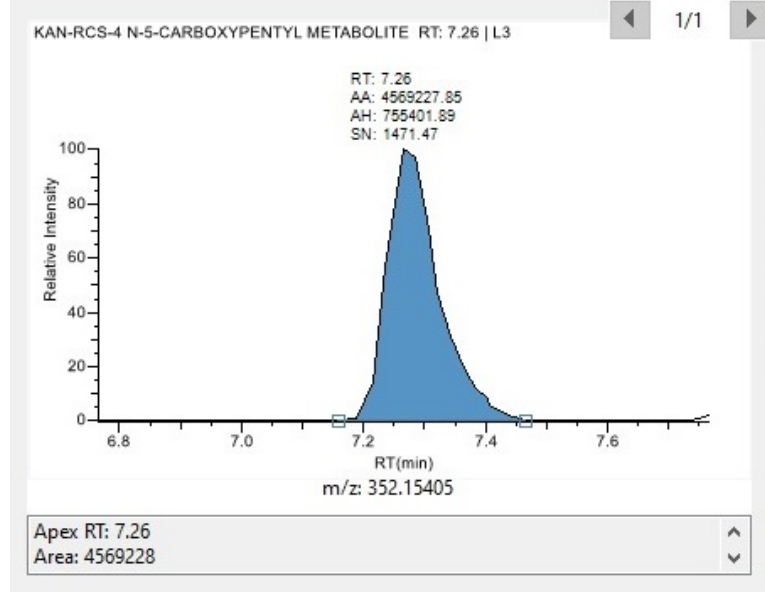
Şekil 12: RCS-4'ün Analit İçermeyen Serum Numunesi Kromatogramı



Şekil 13: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Analit İçermeyen Serum Numunesi Kromatogramı



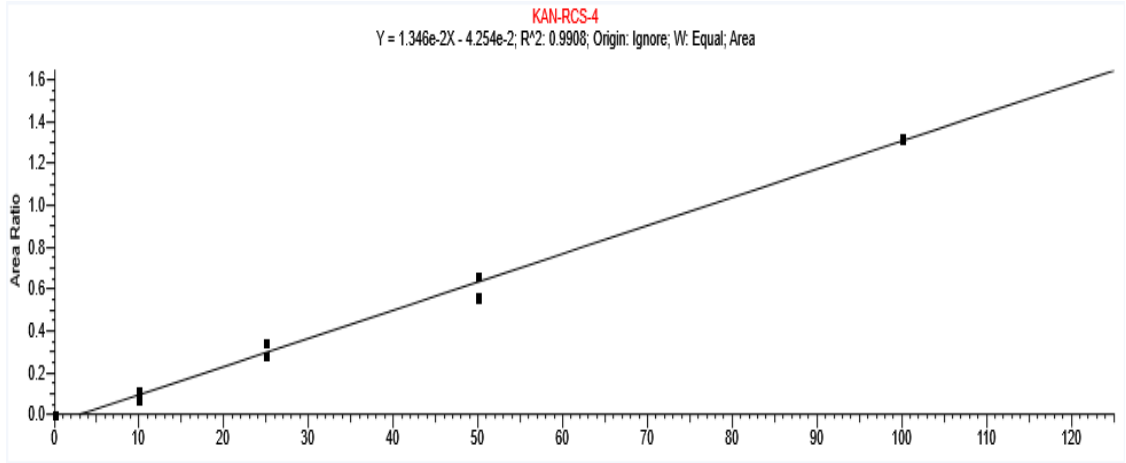
Şekil 14: RCS-4'ün Analit İlave Edilmiş Serum Numunesi Kromatogramı



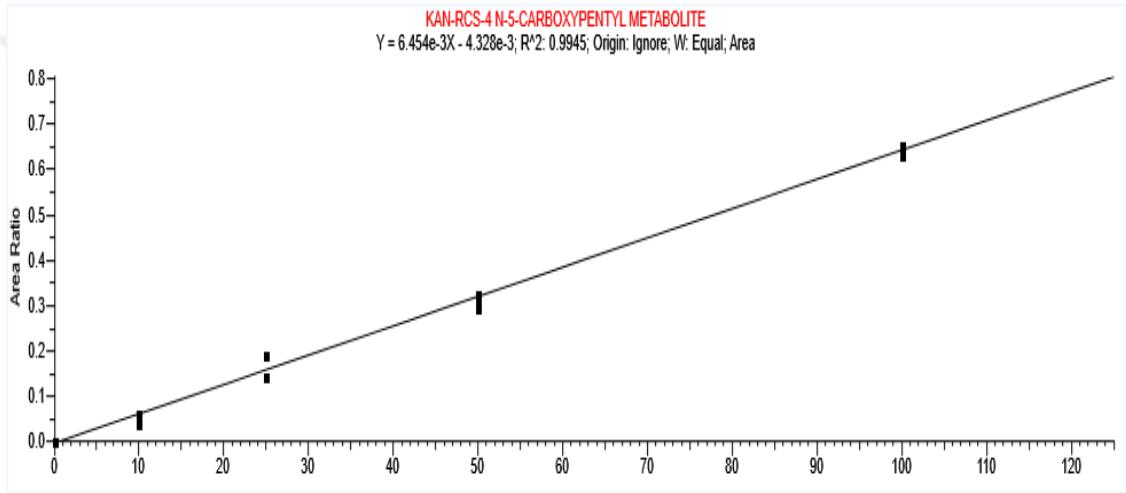
Şekil 15: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Analit İlave Edilmiş Serum Numunesi Kromatogramı

4.1.2 Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Sırasıyla 0; 10; 25; 50 ve 100 ng/mL spike edilen referans materyallerin analizinden elde edilen kalibrasyon eğrileri RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için Şekil 16 ve Şekil 17’de gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrilerine ait doğru denklemleri ve R^2 değerleri LC-MS/MS ORBITRAP sisteminin yazılımı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen doğrusal aralık, denklem ve korelasyon katsayısı Tablo IV’te verilmiştir. Kullanılan validasyon rehberine göre, (R^2) > 0,99, çalışılan doğrusal aralık için uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 16: RCS-4'ün Serum Numunesindeki Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 17: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Serum Numunesindeki Kalibrasyon Eğrisi

Tablo IV: Doğrusal Aralık, Denklem ve Korelasyon Katsayısı

	Madde	Doğrusallık Aralığı	Denklem	Korelasyon Katsayısı (R ²)
SERUM	RCS-4	0 - 100 ng/mL	$y = 1.346e-2X - 4.234e-2$	0.9908
	RCS-4 N-5-CARBOXYPENTYL	0 - 100 ng/mL	$y = 6.454e-3X - 4.328e-3$	0.9945

4.1.3 Tespit Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

Hassasiyet çalışması için en düşük kalibratör olan 10 ng/mL konsantrasyonda spike edilmiş serum numunelerinin ORT, SS, LOD ve LOQ değerleri Tablo V'te verilmiştir.

Tablo V: Hassasiyet Çalışması Sonucu Elde Edilen LOD ve LOQ Değerleri

	RCS-4	RCS-4 N-(5-Karboksipentil) Metabolit
1	10,565	10,333
2	13,181	12,077
3	9,897	7,827
4	8,943	7,928
5	13,745	13,347
6	10,625	9,836
ORT	11,16	10,22
SS	1,89	2,21
LOD	5,679	6,623
LOQ	18,930	22,076

4.1.4 Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kesinlik ve geri kazanım olmak üzere iki alt parametre ile çalışılmıştır. Hesaplamalar için ise tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik sonuçları kullanılmıştır.

4.1.4.1 Kesinlik

Düşük, orta ve yüksek seviyedeki konsantrasyonlarla (10, 50, 100 ng/mL) yapılan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları sonuçları sırasıyla RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için Tablo VI ve Tablo VII’de gösterilmiştir. İki farklı günde iki çalışma gerçekleştirilmiş olup, bahsi geçen her konsantrasyon için 5’er tekrar yapılmıştır. İki analit için de serum numunesinden elde edilen verilerin ortalamaları, SS ve RSD değerleri Microsoft Excel kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo VI: RCS-4’ün Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik Analiz Sonuçları, Ortalamaları, SS’leri ve RSD Değerleri

RCS-4			
	10 ppb	50 ppb	100 ppb
1. Gün	8,318	54,026	100,569
1. Gün	8,719	48,901	110,258
1. Gün	9,901	45,160	124,274
1. Gün	10,657	56,423	88,113
1. Gün	11,176	53,010	118,084
2. Gün	9,830	49,211	96,342
2. Gün	9,536	53,186	98,573
2. Gün	9,669	47,556	96,915
2. Gün	9,407	53,430	104,201
2. Gün	10,843	52,846	104,683
ORT	9,81	51,37	104,20
SS	0,90	3,48	10,81
RSD	0,09	0,07	0,10

Tablo VII: RCS-4-N(5-Karboksipentil)'in Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik Analiz Sonuçları, Ortalamaları, SS'ları ve RSD Değerleri

RCS-4 N-(5-Karboksipentil) Metabolit			
	10 ppb	50 ppb	100 ppb
1. Gün	6,735	62,483	123,580
1. Gün	6,790	52,677	122,277
1. Gün	8,422	50,671	134,035
1. Gün	8,499	66,200	91,501
1. Gün	9,940	51,804	111,711
2. Gün	9,451	51,253	125,464
2. Gün	11,069	48,617	112,302
2. Gün	9,245	48,409	113,458
2. Gün	9,679	52,645	116,624
2. Gün	9,039	50,620	126,831
ORT	8,89	53,54	117,78
SS	1,35	5,94	11,72
RSD	0,15	0,11	0,10

4.1.4.2 Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmasında tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik sonuçları kullanılmıştır. RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karbosipentil) için 10, 50, 100 ppb konsantrasyonlarında yapılmış 10'ar çalışmanın ortalamaları Tablo VIII ve Tablo IX'da verilmiştir.

Tüm analizlerin yüzde değerleri hesaplanmış olup ortalamaları, ss'ları verilmiştir. RCS-4 için yapılan analizlerdeki geri kazanım ortalama 101,67 iken; RCS-4-N(5-Karboksipentil) için ortalama 104.57'dir. Geri kazanım oranları yüzdece %80-120 arasında olduğundan anlamlı bulunmuştur.

Tablo VIII: RCS-4'ün Geri Kazanımı

RCS-4			
	Bias belirsizlik hesabı		
	10,00	50,00	100,00
1. Gün - N	83,18	108,052	100,569
1. Gün - N	87,19	97,802	110,258
1. Gün - N	99,01	90,32	124,274
1. Gün - N	106,57	112,846	88,113
1. Gün - N	111,76	106,02	118,084
2. Gün - N	98,3	98,422	96,342
2. Gün - N	95,36	106,372	98,573
2. Gün - N	96,69	95,112	96,915
2. Gün - N	94,07	106,86	104,201
2. Gün - N	108,43	105,692	104,683
ort			
ss			
rsd			
% rsd			

Tablo IX: RCS-4 N-(5-Karboksipentil)'in Geri Kazanımı

RCS-4 N-(5-Karboksipentil) Metabolit			
	Bias belirsizlik hesabı		
	10,00	50,00	100,00
1. Gün - N	67,35	124,966	123,58
1. Gün - N	67,9	105,354	122,277
1. Gün - N	84,22	101,342	134,035
1. Gün - N	84,99	132,4	91,501
1. Gün - N	99,4	103,608	111,711
2. Gün - N	94,51	102,506	125,464
2. Gün - N	110,69	97,234	112,302
2. Gün - N	92,45	96,818	113,458
2. Gün - N	96,79	105,29	116,624
2. Gün - N	90,39	101,24	126,831
ort			104,57
ss			17,03
rsd			0,16
% rsd			16,29

5. TARTIŞMA

Uyuşturucu madde kullanımı ve bağımlılık kişinin beden sağlığına zarar vermesinin yanı sıra ruh sağlığını da ciddi şekilde etkilemektedir. Bunların dışında ekonomik, kültürel, toksikolojik, sosyal, en önemlisi adli sorunlara da yol açtığı için ve yeni nesil uyuşturucu maddelerin tespit edilmeleri diğer yasa dışı maddelere göre daha zor olduğu için halk sağlığını her açıdan önemli derecede tehdit etmektedir.

SK'ler, hem madde çeşitliliği hem de kullanım yaygınlığı bakımından NPS'lerin büyük ve önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Asıl üretim amacı yeni ilaçlar geliştirmek ve ECS'yi araştırmak olan SK'ler kannabinoid reseptörlerine agonisttir. Bilimsel araştırmalar yapmak için üretilen ilk SK'dan 40 yıl kadar sonra, esrarın temel bileşeni THC'yi taklit etmeleri sebebiyle, SK'lerin yasa dışı olarak üretimi ve satışı ortaya çıkmıştır (Sedefov R. vd., 2009).

Genellikle, uygun bir çözücü içinde çözdürülüp bitkilerin üzerine spreylenecek ve daha sonra kurutularak paketlenen ve bitkisel tütsü olarak tanımlanan SK'ler, renkli, dikkat çekici paketler ve 'K2', 'Spice', 'Bonzai' gibi isimlerle piyasaya sürülerek yasa dışı satışı gerçekleştirilmektedir. Ürünün üzerinde insan tüketimine yönelik olmadığını belirten ifadeler olsa da paketlenme ve pazarlanma yöntemleri bunun tam tersini göstermektedir. Klasik uyuşturucu testlerinde tespit edilememeleri ise SK'leri uyuşturucu kullanımında daha ilgi çekici bir kaçış yolu haline getirmektedir (Schlatter, 2014).

SK'ler, Türkiye'de ilk defa 2010 yılında yakalanmış, 2011 yılında yapılan yasal düzenleme ile piyasada mevcut 14 SK için kimyasal isimleri verilerek yasaklanma kararı verilmiştir. Yapıları kolaylıkla değişen SK'lerin, her yıl yeni çeşitleri piyasaya sürüldüğü için ilerleyen yıllarda da yasal düzenlemeler, eklenen yeni maddelerle devam etmek durumunda kalmıştır. Bu düzenleme şekli 2015 yılında değişmiştir. Yeni düzenlemede artık madde isimleri belirtilmeden asıl kimyasal yapılar ve bu yapılara eklenebilme ihtimali olan, olası fonksiyonel

gruplar belirlenmiş ve jenerik sınıflandırılma olarak adlandırılmıştır. Yasal süreçler için hızlandırıcı olarak uygulanan jenerik yasa ile çekirdek yapıları ve radikal grupları belirtilen yeni SK'ler için, tespit edilebilmeleri için vakit kaybetmeden Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına dahil edilmiştir (Narkotik Suçlarla Mücadele Daire Başkanlığı, 2019).

SK'lerin toksikolojik ve farmakolojik etkileri ve özellikleri ile ilgili bilgiler kısıtlı olsa da, insan hücrelerinde bulunduğu bilinen kannabinoid reseptörlerine yani CB1 veya CB2'ye bağlanmayı sağlayan yapısal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. CB1 reseptörleri, beyindeki en bol G-protein bağlı reseptörler (GPCR'ler) arasındadır ve GABA ve glutamat nörotransmisyonunun modülasyonunda önemli bir yer almaktadır. CB2 reseptörleri ise daha çok bağışıklık hücreleri üzerinde eksprese edilmekte ve apoptozu, proliferasyonun inhibisyonunu ve sitokin, kemokin üretiminin baskılanmasını indükleyerek immünosüpresyona aracılık ettiği düşünülmektedir (Fantegrossi vd., 2014; Schlatter, 2014).

SK'lerin hazırlanmaları ve paketlenmeleri sırasında steril ortamlarda çalışılmaması, güvenilir olmayan rastgele yöntemlerin kullanılması gibi durumlar, hazırlanan karışımın homojen olmamasına ve aynı seride bulunan ürünlerin dahi farklı paketlerinde konsantrasyon farklılıklarına sebep olmaktadır. Bitkinin kendisinden oluşabilecek kontaminasyon da göz ardı edilmekte, dolayısıyla yaratacağı etki ve zararın belirsiz olması, üretilen maddeyi daha da tehlikeli bir hale getirmektedir (Franz vd., 2016).

Maddeler potent yapıda olduğu için düşük miktarlarda bile yüksek seviyede psikotrop etki oluşturmakta ve vücutta hızlı metabolize edilmektedir, yarılanma ömürleri oldukça kısadır. Dolayısı ile biyolojik örneklerde tespitleri zorlaşmaktadır. Maddelerin bu özelliklerinden dolayı maddenin kendisinin tespitinin önemli olduğu gibi metabolitlerinin de tespit edilmesi büyük ölçüde önem taşımaktadır. (Castaneto vd., 2014).

RCS-4, ilk olarak 2010 yılında Macaristan'da tespit edilmiş bunu takiben 2010-2011 yıllarında dünya genelinde tüketilmiş ve ele geçirilen maddeler arasında sıklıkla RCS-4'e rastlanmıştır (Banister vd., 2015).

RCS-4 ve metabolitlerinin biyolojik matrislerde tespit çalışmaları oldukça sınırlıdır. Yapılan literatür araştırmalarında sentetik kannabinoidlerin farmakolojik ve toksik etkileri ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Maddelerin farmakolojik ve psikoaktif etkilerine ilişkin bilgiler genellikle gözlemlere ve kullanıcıların ifadelerine dayanmaktadır. Etki süreleri, metabolitleri, metabolitlerinin aktiviteleri, birikme özellikleri, etkileşimleri, uzun dönem kullanımlarına bağlı olarak ortaya çıkabilecek zararların ortaya çıkarılması ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bu maddeleri kullanmakta olan kişilerin tespiti, bağımlılığının izlenebilmesi, suça karışma riskinin değerlendirilmesi, işlenmiş suçlarda uyuşturucu madde kullanımlarının belirlenebilmesi, farmakokinetik özelliklerinin ve buna bağlı olarak olası risk faktörlerinin belirlenebilmesi için dedeksiyon limiti düşük, hızlı ve seçici metotların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Yapılan literatür taramasında RCS-4 için yapılan analitik çalışmalar belirlenmiştir. Saç, idrar, serum, kan gibi matrisler kullanılırken; cihaz olarak genellikle GC-MS, LC-MS/MS, LC/ESI-MS/MS kullanılmıştır. RCS-4 ile ilgili ölümlü vakaya rastlanmamıştır.

Hutter ve arkadaşları, insan saçında RCS-4 ve başka 21 SK tespiti ve miktar tayini için LC-MS/MS ile yöntem geliştirmiş ve sonuçların belirlenen aralıklara uygun olduğunu bulmuştur. $RSD \leq \%12$ 'nin altındayken geri kazanımları ise $\leq 6,9$ olarak belirlenmiştir. LOD değeri 0,5 pg/mg olarak hesaplanmış, matris etkisi ise %45 olarak bulunmuştur.

Kavanagh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan idrar numunelerinde RCS-4'ün on altı üriner metaboliti tanımlanmıştır. RCS-4 için metabolik yollar aromatik monohidroksilasyon, N- ve O-dealkilasyon ve N-pentil zincirinin bir ketona oksidasyonudur.

Ana ilaç saptanmamıştır. O-demetillenmiş metabolitlerin RCS-4 alımının tanımlanması için en yararlı metabolik belirteçler olduğu bulunmuştur. Çalışma GC-MS ile yapılmıştır.

Kneisel & Auwärter, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile LC/ESI-MS/MS ile serumdan RCS-4 de dahil olmak üzere 30 SK tespiti için yöntem valide etmişlerdir. Tüm analitler için korelasyon katsayıları (R^2) > 0,993 ($n = 6$) ile tatmin edici doğrusallık sağlamıştır. LOD değeri 0,03 ng/mL iken, LOQ ise 0,1 ila 2,0 ng/mL arasında bulunmuştur.

Scheidweiler ve Huestis, SK'lar için hidroliz ve SLE yöntemi ile LC-MS/MS kullanarak idrar için bir başka yöntem valide etmiştir. Çalışmaya göre RCS-4 için LOD;0,1 µg/l LOQ; 0,1 µg/l, doğrusal aralık 0,1-50 µg/l olarak ve R^2 değeri 0.995-0.997 arasında bulunmuştur. RCS-4-N(5-Karboksipentil) için ise LOD değeri 0,2 µg/l LOQ değeri 0,2 µg/l, doğrusal aralık 0,2-50 µg/l, R^2 değeri ise RCS-4 gibi 0.995-0.997 arasında bulunmuştur. RCS-4 için matris etkisi %0,7-%9,7 aralığında iken; RCS-4-N(5-Karboksipentil) için ise %18,4-%40,0 arasında bulunmuştur.

Ammann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise LLE yöntemi kullanılarak LC-MS/MS ile kandan RCS-4 tayini yapılmıştır. Doğrusallığı 0.5-100 ng/mL arasında iken LOQ değeri 0.5 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada RCS-4 ve metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil)'in serumdan enzimatik hidroliz yöntemi ile tespiti ve LC-MS/MS ORBITRAP sistemiyle analizi için validasyon parametreleri belirlenmiş ve buna göre çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan seçicilik çalışmalarında RCS-4 ve metaboliti olan RCS-4-N(5-karboksipentil)'in serumda seçiciliği araştırılmış ve kör serum numunelerinde herhangi bir pike rastlanmamıştır.

Hassasiyet çalışması çerçevesinde LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Çalışmaya göre, RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için serum numunesinde tespit limiti (LOD) sırasıyla 5.679 – 6.623 ng/mL; tayin limiti (LOQ) ise sırasıyla 18,930 - 22,076'dır.

Çalışmada doğrusal aralık 0-100 ng/mL arasında olup, RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için korelasyon katsayısı 0.990'dan yüksektir. RCS-4 için korelasyon katsayısı 0.9908 iken RCS-4-N(5-Karboksipentil) için korelasyon katsayısı 0.9945 olarak belirlenmiştir.

Doğruluk çalışmaları kesinlik ve geri kazanım olarak iki alt parametre ile yapıldı.

Tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik %RSD değerleri RCS-4'ün 10, 50 ve 100 ppb konsantrasyonları için sırasıyla 0,09 – 0,07 – 0,1; RCS-4-N(5-Karboksipentil) için 0,15 – 0,11 – 0,1'dir.

RCS-4 için geri kazanım değerleri %97.54 - %104.21 aralığında olup, RCS-4-N(5-Karboksipentil) için ise %88.87 - %118.93 aralığındadır.

Bu çalışma ile RCS-4 ve metaboliti RCS-4-N(5-Karboksipentil) için çalışılan validasyon parametrelerinin tümü, toksikolojik analizlerin validasyonuna yönelik uluslararası rehberlerin kabul aralıkları içerisinde olup, serum numunelerinden tespiti ve tayinine yönelik geçerliliği kanıtlanmıştır. Parametrelere uygun sonuçlar ve kısa analiz süresi göz önüne alındığında RCS-4 ve RCS-4-N(5-Karboksipentil) için düşük değerlerinin tespiti ve izlenmesi açısından önemli ve yararlı olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler ile, kötüye kullanılan, bağımlılık yapıcı bir sentetik uyuşturucu olan RCS-4 ile ve onun metaboliti RCS-4-N(5-karboksipentil) için serum örneklerinin enzimatik hidroliz yöntemi ile hazırlanarak ve LC-MS/MS ORBITRAP sistemi kullanılarak kantitatif analizinin yapılması için uygun yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan validasyon çalışmasının kapsamında doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, doğruluk, kesinlik, seçicilik, geri kazanım, hassasiyet, LOD ve LOQ çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermiştir. RCS-4 ve RCS-4-N(5-karboksipentil) ilgili yapılan bu çalışmanın, diğer metabolitlerin de içinde olduğu daha yüksek hassasiyet, daha düşük tayin limitlerinde çalışmalar yapılabilmesi için referans olarak kullanılabilmesi ayrıca kısa analiz süresi ve tutarlı sonuçları ile olguların aydınlatılmasında adli bilimler ve acil toksikoloji için faydalı bir çalışma olması ve katkı sağlaması amaçlanmıştır.

KAYNAKÇA

1. Adamowicz, P. (2021). Blood concentrations of synthetic cannabinoids. *Clinical Toxicology*, 59(3), 246-251. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1787429>
2. Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. (2020). The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. İçinde *Critical Reviews in Toxicology* (C. 50, Sayı 5, ss. 359-382). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762539>
3. Ammann, J., McLaren, J. M., Gerostamoulos, D., & Beyer, J. (2012). Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 - synthetic cannabinoids. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(6), 372-380. <https://doi.org/10.1093/jat/bks048>
4. Andrews, R., Jorge, R., Christie, R., & Gallegos, A. (2023). From JWH-018 to OXIZIDS: Structural evolution of synthetic cannabinoids in the European Union from 2008 to present day. İçinde *Drug Testing and Analysis* (C. 15, Sayı 4, ss. 378-387). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/dta.3422>
5. Artuç, S., Doğan, K. H., & Demirci, Ş. (2014). Uyuşturucu maddelerde yeni trend sentetik kannabinoidler. *Adli Tıp Bülteni*, 19(3), 198-205.
6. Banister, S. D., Stuart, J., Conroy, T., Longworth, M., Manohar, M., Beinat, C., Wilkinson, S. M., Kevin, R. C., Hibbs, D. E., Glass, M., Connor, M., McGregor, I. S., & Kassiou, M. (2015). Structure–activity relationships of synthetic cannabinoid designer drug RCS-4 and its regioisomers and C4 homologues. *Forensic Toxicology*, 33(2), 355-366. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0282-9>
7. Barratt, M. J., Seear, K., & Lancaster, K. (2017). A critical examination of the definition of ‘psychoactive effect’ in Australian drug legislation. *International Journal of Drug Policy*, 40, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.10.002>
8. Brents, L. K., & Prather, P. L. (2014). The K2/Spice Phenomenon: Emergence, identification, legislation and metabolic characterization of synthetic cannabinoids in herbal incense products. İçinde *Drug Metabolism Reviews* (C. 46, Sayı 1, ss. 72-85). <https://doi.org/10.3109/03602532.2013.839700>
9. Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., & Huestis, M. A. (2014). Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. İçinde *Drug and Alcohol*

- Dependence* (C. 144, ss. 12-41). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005>
10. Caviness, C. M., Tzilos, G., Anderson, B. J., & Stein, M. D. (2015). Synthetic cannabinoids: Use and predictors in a community sample of young adults. *Substance Abuse*, 36(3), 368-373. <https://doi.org/10.1080/08897077.2014.959151>
11. Costain, W. J., Rasquinha, I., Comas, T., Hewitt, M., Aylsworth, A., Rouleau, Y., Marleau, V., Soo, E. C., & Tauskela, J. S. (2018). Analysis of the pharmacological properties of JWH-122 isomers and THJ-2201, RCS-4 and AB-CHMINACA in HEK293T cells and hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*, 823, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.01.043>
12. Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223-228.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/MCROCQ>
13. Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. İçinde *Toxicology Mechanisms and Methods* (C. 20, Sayı 7, ss. 363-414). <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>
14. EMCDDA (2023), European Drug Report 2023: Trends and Developments, https://www.emcdda.europa.eu/publications/european-drug-report/2023/drug-situation-in-europe-up-to-2023_en .(Son Erişim Tarihi: 05.05.2024)
15. EMCDDA. (2023). New Psychoactive Substances–The Current Situation in Europe. European Drug Report 2023. (Son Erişim Tarihi: 05.05.2024)
16. ElSohly, M. A., Gul, W., Wanas, A. S., & Radwan, M. M. (2014). Synthetic cannabinoids: Analysis and metabolites. İçinde *Life Sciences* (C. 97, Sayı 1, ss. 78-90). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.212>
17. Expert Committee on Drug Dependence. (2014). *RCS-4 Critical-Review Report*. (Son Erişim Tarihi: 06.06.2024)
18. Fantegrossi, W. E., Moran, J. H., Radomska-Pandya, A., & Prather, P. L. (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: Mechanism underlying greater toxicity? İçinde *Life Sciences* (C. 97, Sayı 1, ss. 45-54). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.017>
19. Fattore, L., & Fratta, W. (2011). Beyond THC: The new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, SEPTEMBER. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00060>

20. Ferk, F., Gminski, R., Al-Serori, H., Mišik, M., Nersesyan, A., Koller, V. J., Angerer, V., Auwärter, V., Tang, T., Arif, A. T., & Knasmüller, S. (2016). Genotoxic properties of XLR-11, a widely consumed synthetic cannabinoid, and of the benzoyl indole RCS-4. *Archives of Toxicology*, 90(12), 3111-3123. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1664-4>
21. Franz, F., Angerer, V., Hermanns-Clausen, M., Auwärter, V., & Moosmann, B. (2016). Metabolites of synthetic cannabinoids in hair—proof of consumption or false friends for interpretation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(13), 3445-3452. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9422-2>
22. Gandhi, A. S., Zhu, M., Pang, S., Wohlfarth, A., Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2014). Metabolite profiling of RCS-4, a novel synthetic cannabinoid designer drug, using human hepatocyte metabolism and TOF-MS. *Bioanalysis*, 6(11), 1471. <https://doi.org/10.4155/BIO.14.13>
23. Göl, E., & Çok, İ. (2017). Assessment of types of synthetic cannabinoids in narcotic cases assessed by the Council of Forensic Medicine between 2011–2015, Ankara, Turkey. *Forensic Science International*, 280, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.017>
24. Grebe SKG; Singh R. (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here, *Clin. Biochem Rev.*, 32.
25. Gurdal, F., Asirdizer, M., Aker, R. G., Korkut, S., Gocer, Y., Kucukibrahimoglu, E. E., & Ince, C. H. (2013). Review of detection frequency and type of synthetic cannabinoids in herbal compounds analyzed by Istanbul Narcotic Department of the Council of Forensic Medicine, Turkey. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 667-672. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.03.041>
26. Henriques, S., Silva, J. P., Hsu, K., & Paula, J. (2018). Overview on new psychoactive substances in Portugal. İçinde *CIES e-Working Paper N.º* (C. 217).
27. Hermanns-Clausen, M., Kneisel, S., Hutter, M., Szabo, B., & Auwärter, V. (2013). Acute intoxication by synthetic cannabinoids - Four case reports. *Drug Testing and Analysis*, 5(9-10), 790-794. <https://doi.org/10.1002/dta.1483>
28. Home Office. (2018). *Review of the Psychoactive Substances Act 2016*.
29. Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors*.

30. Hutter, M., Kneisel, S., Auwärter, V., & Neukamm, M. A. (2012). Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 903, 95-101.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.002>
31. Iversen Les, & Gibbons Simon. (2014). Third Generation Synthetic Cannabinoids. *Advisory Council on the Misuse of Drugs*.
32. Kavanagh, P., Grigoryev, A., Melnik, A., & Simonov, A. (2012). The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(5), 303-311.
<https://doi.org/10.1093/jat/bks032>
33. Kaya-Akyüz, D., & Kayaaltı, Z. (2015). Blood, hair, urine and breath samples for the analysis of drugs of abuse. İçinde *Marmara Pharmaceutical Journal* (C. 19, Sayı 3, ss. 232-237). Marmara University.
<https://doi.org/10.12991/mpj.20151900817>
34. Kemp, A. M., Clark, M. S., Dobbs, T., Galli, R., Sherman, J., & Cox, R. (2016). Top 10 Facts You Need to Know about Synthetic Cannabinoids: Not so Nice Spice. İçinde *American Journal of Medicine* (C. 129, Sayı 3, ss. 240-244.e1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.10.008>
35. Kneisel, S., & Auwärter, V. (2012). Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(7), 825-835. <https://doi.org/10.1002/jms.3020>
36. Kong, T. Y., Kim, J. H., Kim, D. K., & Lee, H. S. (2018). Synthetic cannabinoids are substrates and inhibitors of multiple drug-metabolizing enzymes. İçinde *Archives of Pharmacal Research* (C. 41, Sayı 7, ss. 691-710). Pharmaceutical Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1055-x>
37. Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., & Benyamina, A. (2017). Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(3), 309-316.
<https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.3/glafaye>
38. Le Boisselier, R., Alexandre, J., Lelong-Boulouard, V., & Debruyne, D. (2017). Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 101(2), 220-229. <https://doi.org/10.1002/cpt.563>

39. Logan, B. K., Reinhold, L. E., Xu, A., & Diamond, F. X. (2012). Identification of Synthetic Cannabinoids in Herbal Incense Blends in the United States. *Journal of Forensic Sciences*, 57(5), 1168-1180. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02207.x>
40. Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. İçinde *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* (C. 6, Sayı 6, ss. 607-615). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
41. Maioli, C., Mattoteia, D., Amin, H. I. M., Minassi, A., & Caprioglio, D. (2022). Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest “Minor” Cannabinoid. İçinde *Plants* (C. 11, Sayı 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11212896>
42. Musah, R. A., Domin, M. A., Walling, M. A., & Shepard, J. R. E. (2012). Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal samples via direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(9), 1109-1114. <https://doi.org/10.1002/rcm.6205>
43. Namera, A., Kawamura, M., Nakamoto, A., Saito, T., & Nagao, M. (2015). Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicology*, 33(2), 175-194. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0270-0>
44. Narkotik Suçlarla Mücadele Daire Başkanlığı. (2019). 2019 Türkiye Uyuşturucu Raporu, <https://www.narkotik.pol.tr/kurumlar/narkotik.pol.tr/TUB%C4%B0M/Usal%20Yay%C4%B1nlar/2019-TURKIYE-UYUSTURUCU-RAPORU.pdf>, (Son Erişim tarihi: 04.05.2024)
45. Pakış, I., & Polat, O. (2016). Sentetik kannabinoidler. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (1), 6-13.
46. Roque-Bravo, R., Silva, R. S., Malheiro, R. F., Carmo, H., Carvalho, F., Dias Da Silva, D., & Silva, J. P. (2022). Annual Review of Pharmacology and Toxicology Synthetic Cannabinoids: A Pharmacological and Toxicological Overview. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2023, 63, 187-209. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-031122>
47. Sacco, L. N. (2014). *Synthetic Drugs: Overview and Issues for Congress*. www.crs.gov
48. Santos-Carvalho, A., Santos, N., Cavadas, C., Carvalho, F., & Ferreira, S. (2015). Toxicity of synthetic cannabinoids in neuronal, hepatic and cardiac in vitro

- models. *Toxicology Letters*, 238(2), S288.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2015.08.829>
49. Schaefer, N., Kettner, M., Laschke, M. W., Schlote, J., Peters, B., Bregel, D., Menger, M. D., Maurer, H. H., Ewald, A. H., & Schmidt, P. H. (2015). Simultaneous LC-MS/MS determination of JWH-210, RCS-4, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, and their main metabolites in pig and human serum, whole blood, and urine for comparing pharmacokinetic data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(13). <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8605-6>
 50. Schaefer, N., Kröll, A. K., Körbel, C., Laschke, M. W., Menger, M. D., Maurer, H. H., Meyer, M. R., & Schmidt, P. H. (2019). Distribution of the (synthetic) cannabinoids JWH-210, RCS-4, as well as Δ^9 -tetrahydrocannabinol following pulmonary administration to pigs. *Archives of Toxicology*, 93(8), 2211-2218. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02493-8>
 51. Schaefer, N., Nordmeier, F., Kröll, A. K., Körbel, C., Laschke, M. W., Menger, M. D., Maurer, H. H., Meyer, M. R., & Schmidt, P. H. (2020). Is adipose tissue suitable for detection of (synthetic) cannabinoids? A comparative study analyzing antemortem and postmortem specimens following pulmonary administration of JWH-210, RCS-4, as well as Δ^9 -tetrahydrocannabinol to pigs. *Archives of Toxicology*, 94(10), 3421-3431. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02843-x>
 52. Schaefer, N., Wojtyniak, J. G., Kettner, M., Schlote, J., Laschke, M. W., Ewald, A. H., Lehr, T., Menger, M. D., Maurer, H. H., & Schmidt, P. H. (2016). Pharmacokinetics of (synthetic) cannabinoids in pigs and their relevance for clinical and forensic toxicology. *Toxicology Letters*, 253, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.021>
 53. Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2014). 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. *Journal of Chromatography A*, 1327, 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.067>
 54. Schlatter, J. (2014). Synthetic cannabinoids: Synthesis and biological activities. *Içinde Studies in Natural Products Chemistry* (C. 43, ss. 291-311). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00009-6>

55. Sedefov, R., Gallegos, A., King, L., Lopez, D., Auwärter, V., Hughes, B., & Griffiths, P. J. T. P. (2009). Understanding the 'Spice' phenomenon. Thematic papers, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
56. Sulcova*, A. (2019). Pharmacodynamics of cannabinoids. *Archives of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 011-018.
<https://doi.org/10.29328/journal.apps.1001013>
57. Tai, S., & Fantegrossi, W. E. (2016). Pharmacological and toxicological effects of synthetic cannabinoids and their metabolites. İçinde *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (C. 32, ss. 249-262). Springer Verlag.
https://doi.org/10.1007/7854_2016_60
58. Teske, J., Weller, J. P., Fieguth, A., Rothämel, T., Schulz, Y., & Tröger, H. D. (2010). Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(27), 2659-2663. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.016>
59. Tettey, J. N., & Levissianos, S. (2017). The global emergence of NPS: An analysis of a new drug trend. İçinde *Novel Psychoactive Substances: Policy, Economics and Drug Regulation* (ss. 1-12). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-60600-2_1
60. Warf, B. (2014). High Points: An Historical Geography of Cannabis. *Geographical Review*, 104(4), 414-438. <https://doi.org/10.1111/j.1931-0846.2014.12038.x>
61. Waugh, J., Najafi, J., Hawkins, L., Hill, S. L., Eddleston, M., Vale, J. A., Thompson, J. P., & Thomas, S. H. L. (2016). Epidemiology and clinical features of toxicity following recreational use of synthetic cannabinoid receptor agonists: a report from the United Kingdom National Poisons Information Service. *Clinical Toxicology*, 54(6), 512-518. <https://doi.org/10.3109/15563650.2016.1171329>

(Görsel kaynaklar için internet adresleri)

1. <https://www.nydailynews.com/2016/07/12/synthetic-marijuana-like-k2-is-potent-cheap-to-make-and-the-effects-can-be-terrifying/>
(Son Erişim Tarihi :05.05.2024)
2. <https://www.caymanchem.com/product/10645/rcs-4>
(Son Erişim Tarihi :08.05.2024)
3. <https://blog.perkinelmer.com/posts/mass-spectrometry-explained-how-lc-ms-ms-works/>
(Son Erişim Tarihi : 21.05.2024)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Nagehan ADIÖREN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul /

E-posta :

Eğitim Bilgileri

2021-2024 İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli
Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)

2013-2020 İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü