



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



DOKTORA TEZİ

**AMİNOALKİLİNDOL GRUBU İÇEREN SENTETİK
UYUŞTURUCU MADDELERİN TAYİNİNDE
SPEKTROFOTOMETRİK ve KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Hasan DURMUŞ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşem ARDA**

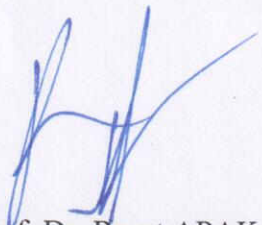
Mayıs, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 3.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Doç. Dr. Ayşem ARDA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Birsen DEMİRATA
ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi


Prof. Dr. Süleyman AKMAN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi


Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 112T792 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma İstanbul Kriminal Polis Laboratuvarı Kimyasal İnceleme Şube Müdürlüğü ve İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı başkanlığı altında yapılmıştır.

Çalışma boyunca tecrübe ve bilgilerinden faydalandığım, bilimsel konularda fikir danıştığım ve çalışmamda yol gösterici olan Sayın Prof. Dr. Reşat APAK’a,

Doktora öğrenimim boyunca bana her konuda destek olan, hem bir öğretmen hem de bir ağabey olarak iyi günde ve kötü günde yanımda duran, bu çalışma dışında da karşılaştığım problemleri çözmemde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Erol ERÇAĞ’a,

Çalışma boyunca vermiş olduğu sonsuz katkı ve destekleri, araştırmamla ilgili yaptığı birçok yardımları dolayısıyla Sayın Doç. Dr. Ayşem ARDA’ya,

Bana güzel bir evlat ve hayat veren, her zorluğa karşı beraber göğüs gerdiğimiz, can yoldaşım ve en iyi arkadaşım, eşim Oya AKÇELİK DURMUŞ’a,

Hayatım boyunca hep yanımda oldukları ve bana destek oldukları için tüm aile fertlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2017

Hasan DURMUŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
3. MALZEME VE YÖNTEM	12
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR	12
3.2. KİMYASAL MADDELER	12
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	12
3.3.1. Van URK reaktifi	12
3.3.2. Kovac's reaktifi	12
3.3.3. Salkowski reaktifi	13
3.3.4. Ehrlich reaktifi	13
3.3.5. 2,4-Dinitrofenilhidrazin	13
3.3.6. Seliwanoff	13
3.3.7. Rothenfusser Testi.....	13
3.3.8. Hidroksilamin hidroklorür	13
3.3.9. Folin	13
3.3.10. James reaktifi	13
3.3.11. Wasicky reaktifi	13
3.3.12. p-DMAB	13
3.3.13. Sentetik kannabinoid referans maddeleri	14
3.3.14. Sentetik kannabinoid yakalama numuneleri	14
3.3.15. İnterferan çözeltileri.....	14
3.4. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM.....	14
3.4.1. Beherde Uygulanan Yöntem ile Yapılan Çalışmalar	15
3.4.1.1. H_2SO_4 Konsantrasyonu ve Hacim Optimizasyonu	15

3.4.1.2. <i>SiO₂ Miktarı Optimizasyonu</i>	15
3.4.1.3. <i>Çözücü Seçimi</i>	15
3.4.1.4. <i>İşlem Sırası</i>	16
3.4.2. Optimizasyon Çalışmaları Sonucunda Tespit Edilen Reaktif Miktarları ve Örnek Hazırlanması.....	17
3.4.3. Deneyin Yapılışı	17
3.4.4. Çalışma grafiğinin hazırlanması	17
3.4.5. Farklı Sentetik Kannabinoidlere Geliştirilen Yöntemin Uygulanması.....	18
3.4.5.1. <i>Hazırlanan Çözeltiler ve Yöntemin Uygulanışı</i>	18
3.4.5.2. <i>5F-PB-22 için çalışma grafiğinin hazırlanması</i>	19
3.4.5.3. <i>XLR-11 için çalışma grafiğinin hazırlanması</i>	19
3.4.5.4. <i>Sertifikalı Standart MAM-2201 Standartı Kullanılarak Metil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Hazırlanması</i>	19
3.4.5.5. <i>JWH-122 standardı için beherde yapılan çalışmalar</i>	19
3.4.5.6. <i>Çalışma Grafiğinin Oluşturulması için Yöntemin uygulanışı ve renk kararlılığının tespiti</i>	20
3.4.5.7. <i>JWH-210 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması</i>	20
3.4.5.8. <i>JWH-018 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması</i>	20
3.4.5.9. <i>JWH-081 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması</i>	20
3.4.5.10. <i>AM-2201 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması</i>	21
3.4.5.11. <i>MAM-2201 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması</i>	21
3.4.5.12. <i>AM-2201 Tayininde Girişim (İnterferan) Etkisinin Etil Alkollü Ortamda İncelenmesi</i>	21
3.4.6. Gerçek Örnek Analizi	21
3.5. HPLC İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	22
3.6. LC-MS/MS İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	22
3.7. GC-MS İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
4. BULGULAR	24
4.1. RENK TESTLERİ	24
4.1.1. 2,4-Dinitrofenilhidrazin testi.....	24
4.1.2. Seliwanoff Testi	25
4.1.3. Rothenfusser Testi.....	25

4.1.4. Hidrazin sülfat Denemesi.....	25
4.1.5. Hidroksilamin hidroklorür (NH ₂ OH.HCl) ile Deneme.....	25
4.1.6. Folin Yöntemi	25
4.1.7. James Reaktifi	26
4.1.8. van URK reaktifi.....	26
4.1.9. Ehrlich reaktifi	26
4.1.10. Wasicky reaktifi	26
4.1.11. p-dimetilaminobenzaldehid ile tayin.....	26
4.2. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM BULGULARI.....	27
4.2.1. AM-2201 Tayininde Metil Alkollü Ortamda Beherde Geliştirilen Yöntemin Uygulanmasıyla Elde Edilen Sonuçlar.....	27
4.2.2. 5F-PB-22 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	29
4.2.3. XLR-11 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	30
4.2.4. MAM-2201 sertifikalı standart maddesine metil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar	31
4.2.5. JWH-122'nin beherde tayininde modifiye edilen yöntemin uygulanarak renk kararlılığının tespit edilmesinde bulunan sonuçlar.....	32
4.2.6. JWH-122 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	32
4.2.7. JWH-210 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	34
4.2.8. JWH-018 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	35
4.2.9. JWH-081 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	36
4.2.10. AM-2201 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar.....	37
4.2.11. MAM-2201 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar	38
4.2.12. Yönteme Girişim Yapıcı Maddelerin Etkileri.....	40
4.2.13. Mikrodalga Ölçme Test Cihazı Kullanılarak Yapılan Spektrofotometrik Çalışmalar.....	40
4.2.13.1. H ₂ SO ₄ hacim optimizasyonu.....	40
4.2.13.2. Sıcaklık Optimizasyonu	41
4.2.13.3. Reaktif Hacim Optimizasyonu	41
4.2.13.4. Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu	41

4.2.13.5. AM-2201 için çalışma grafiğinin oluşturulması	42
4.3. HPLC KALİBRASYON EĞRİLERİ VE PDA TARAMALARI	43
4.4.1. JWH-018'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları.....	44
4.4.2. AM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	45
4.4.3. UR-144'ün HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	46
4.4.4. XLR-11'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	47
4.4.5. PB-22'nin HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	48
4.4.6. 5F-PB-22'nin HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	49
4.4.7. EAM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	50
4.4.8. MAM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	51
4.4.9. NM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	52
4.4.10. AKB-48'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	53
4.4.1. 5F-AKB-48'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları	54
4.5. LC-MS/MS ANALİZLERİ	54
4.6. GC-MS ANALİZLERİ VE KÜTLE SPEKTRUMLARI.....	55
4.7. LC-MS/MS İLE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM KARŞILAŞTIRMASI .	59
4.7.1. AM 2201 için yapılan çalışmalar	60
4.7.2. JWH-081 için yapılan çalışmalar	62
4.8. SAHA NUMUNELERİNİN ANALİZ SONUÇLARI	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Kannabinol.	4
Şekil 2.2: Doğal ve sentetik kannabinoid örnekleri.	5
Şekil 2.3: pDMAB (para-Dimetilaminobenzaldehid).	8
Şekil 2.4: pDMAB ile indol reaksiyonu[41].	9
Şekil 2.5: DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin).	10
Şekil 3.1: Çalışmalarda kullanılan sentetik kannabinoidlerin kimyasal yapıları.	18
Şekil 4.1: 50-200 mg L ⁻¹ konsantrasyon aralığında standart AM-2201 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.	28
Şekil 4.2: Son konsantrasyonu 2,5, 5 10 ve 15 mg L ⁻¹ olan 5F-PB-22 standartlarına yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.	29
Şekil 4.3: Son konsantrasyonu 10, 20, 30, 40 ve 50 mg L ⁻¹ olan XLR-11 standartlarına yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.	30
Şekil 4.4: 6,25, 12,5, 25, 37,5 ve 50 mg L ⁻¹ son konsantrasyonda ki standart MAM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.	31
Şekil 4.5: 3, 6,25, 12,5, 20, 25, 30 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-122 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.	33
Şekil 4.6: 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-210 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.	34
Şekil 4.7: 3, 6,25, 12,5, 15, 20, 25 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-018 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.	35
Şekil 4.8: 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-081 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.	36
Şekil 4.9: 6,25, 12,5, 25, 37,5, 50, 60, 75 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart AM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.	37
Şekil 4.10: 6,25, 12,5, 20, 25, 30, 37,5 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart MAM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.	39
Şekil 4.11: 5, 10, 15, 20 ve 25 mg L ⁻¹ son konsantrasyondaki standart AM-2201 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.	42

Şekil 4.12: HPLC metodu ile incelenen sentetik kannabinoidlerin kromatogramı (her bir madde 100 mg L ⁻¹).	43
Şekil 4.13: JWH-018 PDA spektrumu.....	44
Şekil 4.14: AM-2201 PDA spektrumu.	45
Şekil 4.15: UR-144 PDA spektrumu.	46
Şekil 4.16: XLR-11 PDA spektrumu.....	47
Şekil 4.17: PB-22 PDA spektrumu.....	48
Şekil 4.18: 5F-PB-22 PDA spektrumu.	49
Şekil 4.19: EAM-2201 PDA spektrumu.....	50
Şekil 4.20: MAM-2201 PDA spektrumu.....	51
Şekil 4.21: NM-2201 PDA spektrumu.	52
Şekil 4.22: AKB-48 PDA spektrumu.	53
Şekil 4.23: 5F-AKB-48 PDA spektrumu.....	54
Şekil 4.24: JWH-201, AB-FUBINACA, JWH-073, 5F-AKB-48, MAM-2201, JWH-200 karışımı GC-MS kromatogramı.....	56
Şekil 4.25: JWH-018, JWH-122, JWH-210 ve JWH-081 karışımı GC-MS kromatogramı.....	56
Şekil 4.26: JWH-018 GC-MS spektrumu.....	57
Şekil 4.27: JWH-122 GC-MS spektrumu.....	57
Şekil 4.28: JWH-210 GC-MS spektrumu.....	57
Şekil 4.29: JWH-250 GC-MS spektrumu.....	58
Şekil 4.30: AM-2201 GC-MS spektrumu.....	58
Şekil 4.31: MAM-2201 GC-MS spektrumu.	58
Şekil 4.32: UR-144 GC-MS spektrumu.	59
Şekil 4.33: XLR-11 GC-MS spektrumu.	59
Şekil 4.34: 5F-AKB-48 GC-MS spektrumu.....	59
Şekil 4.35: AM 2201 için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	60
Şekil 4.36: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	61

Şekil 4.37: JWH-081 için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 4.38: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 5.1: İndol molekülü.	69
Şekil 5.2: LSD ve psilosin molekülleri ile aminoalkilindol grubu maddelerin ana yapısı.	70
Şekil 5.3: JWH-018'in SiO ₂ ve H ₂ SO ₄ karışımının katalizörlüğünde pDMAB ile tepkimesi.	71
Şekil 5.4: JWH-015 ve JWH-073 maddelerinin molekül formülleri.....	73
Şekil 5.5: JWH-018 için kütle parçalanmaları.....	74
Şekil 5.6: JWH-018 için kütle spektrumu.....	74
Şekil 5.7: Aminoalkilindazole türevi maddelerinin molekül formülleri.	75

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Kannabinoidler ve sınıflandırmaları.	6
Tablo 3.1: Değişen derişik H ₂ SO ₄ hacimleri ile yöntem uygulandıktan sonra ölçülen absorbens değerleri.	15
Tablo 3.2: LC-MS/MS mobil faz akış verileri.	22
Tablo 3.3: GC-MS cihaz koşulları.	23
Tablo 3.4: GC-MS fırın programı.	23
Tablo 4.1: DNPH analiz yöntemi ile elde edilen absorbenslar.	24
Tablo 4.2: 50, 100, 150 ve 200 mg L ⁻¹ konstantrasyonda ki AM-2201 standartları için 572 nm’de ölçülen absorbenslar.	28
Tablo 4.3: 25, 50, 100 ve 150 mg L ⁻¹ konstantrasyondaki standart 5F-PB-22 çözeltilerine yöntemin uygulandıktan sonra 572 nm’de ölçülen absorbenslar.	29
Tablo 4.4: 100, 200, 300, 400 ve 500 mg L ⁻¹ konstantrasyondaki standart XLR-11 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra 572 nm’de ölçülen absorbenslar.	30
Tablo 4.5: Metil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart MAM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	31
Tablo 4.6: Zamana göre farklı dalgaboylarında 15 mg L ⁻¹ son konstantrasyondaki JWH-122 için yöntemin uygulanışı sonrası elde edilen absorbens değerleri.	32
Tablo 4.7: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-122 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	33
Tablo 4.8: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-210 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	34
Tablo 4.9: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-018 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	35
Tablo 4.10: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-081 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	36
Tablo 4.11: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart AM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	38
Tablo 4.12: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart MAM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbenslar.	39

Tablo 4.13: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntem ile AM-2201 tayinine mannitol ve salisilik asit etkisi.	40
Tablo 4.14: H ₂ SO ₄ hacim optimizasyonu.	40
Tablo 4.15: Sıcaklık optimizasyonu.	41
Tablo 4.16: Reaktif hacmi optimizasyonu.	41
Tablo 4.17: Reaktif konsantrasyonu optimizasyonu.	41
Tablo 4.18: 5-25 mg L ⁻¹ aralığında standart AM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen absorbanslar.	42
Tablo 4.19: JWH-018 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	44
Tablo 4.20: AM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	45
Tablo 4.21: UR-144 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	46
Tablo 4.22: XLR-11 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	47
Tablo 4.23: PB-22 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	48
Tablo 4.24: 5F-PB-22 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	49
Tablo 4.25: EAM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	50
Tablo 4.26: MAM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	51
Tablo 4.27: NM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	52
Tablo 4.28: AKB-48 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	53
Tablo 4.29: 5F-AKB-48 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.	54
Tablo 4.30: MS/MS tarama koşulları.	55
Tablo 4.31: AM 2201 için yapılan kalibrasyon çalışması.	60
Tablo 4.32: Beş farklı 500 mg L ⁻¹ AM 2201 numunesi için elde edilen absorbans değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.	61
Tablo 4.33: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında yapılan kalibrasyon çalışması.	61

Tablo 4.34: Beş farklı 50 µg L ⁻¹ AM 2201 numunesi için elde edilen pik alan değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.....	62
Tablo 4.35: JWH-081 için yapılan kalibrasyon çalışması(λ=634 nm).....	62
Tablo 4.36: Beş farklı 100 mg L ⁻¹ JWH-081 numunesi için elde edilen absorbans değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar(λ=637 nm).....	63
Tablo 4.37: JWH-081 için LC-MS/MS cihazında yapılan kalibrasyon çalışması.	64
Tablo 4.38: Beş farklı 100 µg L ⁻¹ JWH-081 numunesi için elde edilen pik alan değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.....	64
Tablo 4.39: Saha numuneleri miktarsal analiz sonuçları.	66
Tablo 5.1: Sentetik kannabinoidler ve Δ ⁹ -THC için CB ₁ reseptör affiniteleri oranı[68].....	76

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
eV	: Elektron volt
$\bar{X}$	: Ortalama
S	: Standart sapma
S _{örn}	: Örneklenmiş standart sapma
t	: t testi
F	: F testi

Kisaltmalar	Açıklama
CB ₁	: Kannabinoid reseptörü tip 1
CB ₂	: Kannabinoid reseptörü tip 2
DNPH	: Dinitrofenilhidrazin
GC-MS	: Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Tandem kütle spektrometresi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PDA	: Foto-diyod dizisi
pDMAB	: 4-(Dimetilamino)benzaldehyd
SSA	: Silika sülfirik asit
Δ^9 -THC	: (-)-(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol
UNODC	: Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi
UV-GB	: Ultraviyole-görünür bölge

ÖZET

DOKTORA TEZİ

AMİNOALKİLİNDOL GRUBU İÇEREN SENTETİK UYUŞTURUCU MADDELERİN TAYİNİNDE SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Hasan DURMUŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayşem ARDA

Hint keneviri bitkisinin tarih boyunca sanayi değerin yanında keyif verici ve ilaç olarak kullanımı da bulunmaktadır. Keyif verici etkiden içerisinde bulunan Δ^9 -THC maddesi sorumlu olup, insanlar üzerinde halüsinogen etkiye sahiptir. Δ^9 -THC maddesinin hint keneviri bitkisinden izolasyonu, tanımlanması ve laboratuvar ortamında sentezlenmesinin ardından bilim adamları bu maddenin ağrı kesici etki mekanizmasını kopyalamak amacıyla vücutta aynı reseptörler ile etkileşime girebilen maddeler sentezlemeye başlamışlardır. Ancak bu çalışmalar amacı dışına çıkmış, insanlar tarafından suiistimal edilerek ve hint kenevirine ikame olarak kullanılmıştır. Bu tür maddelerin en yaygın olanları aminoalkilindol grubu içeren sentetik kannabinoid türevi maddelerdir. Özellikle kolluk kuvvetlerinin yaptığı çalışmalar sonucu elde edilen şüpheli maddelerin yakalamaya sebep olabilecek makul şüphe oluşturacak ve/veya kaldırarak şekilde en kısa sürede tanımlanması gerebilmektedir. Güvenlik güçlerinin patlayıcı veya uyuşturucu maddeleri tespit etmeleri için çeşitli taşınabilir cihazlar bulunmakla birlikte kolorimetrik yöntemler uygulama kolaylığı, yatırım ve kullanım maliyeti ile en çok tercih edilen yöntemdir. Bu yöntemler göreceli olarak hızlı ve maliyeti düşük testlerdir. Yapılan test ile bir madde grubunun varlığını veya yokluğunu anlamak mümkündür. Bu maddeler için hali hazırda geliştirilmiş bir renk testi ve spektrofotometrik metot bulunmamaktadır. Yapılan çalışma ile aminoalkilindol grubu içeren maddelerin bilinen bir indol reaktifi olan p-DMAB ile SiO_2 ve H_2SO_4 karışımı katalizörlüğünde reaksiyon vermesi ve renkli bir kompleks oluşturması sağlanmıştır. Geliştirilen bu yöntem AM-2201, JWH-018, 5F-PB-22 ve XLR-11 gibi aminoalkilindol türevi maddelere uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aminoalkilindol grubu maddelerin LC-MS/MS, HPLC ve GC-MS cihazları ile analizleri yapılmış, ayrıca İstanbul bölgesinde ele geçirilen sentetik kannabinoid türevi maddelerin HPLC ile nitel analizleri yapılarak, saflık oranları tespit

edilmiştir. Yapılan bu çalışma neticesi ile aminoalkilindol grubu maddeleri içeren sentetik kannabinoidlerin hem toz hem de bitki üzerine emdirilmiş haldeki numunelerine sahada başarıyla uygulanabilecek ayırt edici bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ile spektrofotometrik çalışmalar yapılarak, yöntemin adli kimya laboratuvarlarında nicel analizler için uygulanabilecek bir metot olduğu gösterilmiştir. Yapılan kromatografik analizler ve saha numunelerinde yapılan nicel analizler ile Türkiye’de ele geçirilmiş olan maddelerin içerikleri ile içerdikleri net madde miktarları ortaya konmuştur.

Mayıs 2017, 103 sayfa.

Anahtar kelimeler: Aminoalkilindol, sentetik kannabinoid, renk testi, spektrofotometri, GC-MS, LC-MS/MS, HPLC



SUMMARY

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR DETERMINATION OF SYNTHETIC NARCOTIC SUBSTANCES CONTAINING AMINOALKYLINDOLE GROUP

Hasan DURMUŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ayşem ARDA

Cannabis plant has an industrial value along with recreational and drug use throughout the history. Compound called Δ^9 -THC is the main reason of recreational usage, which has a hallucinogenic effect on human beings. After the isolation, identification and synthesis in laboratory of Δ^9 -THC, scientist started to synthesize compounds interact with same receptors as Δ^9 -THC in order to copy analgesic effects of this compound. Nevertheless people started to use these researches for recreational purposes as a substitution for cannabis. Most known of these substances are synthetic cannabinoids which have aminoalkylindole group. Suspicious substances seized by law enforcements sometimes needs to be identified immediately to justify arrests. There are lots of hand-held and portable devices that can be used by law enforcements, hence colorimetric tests are method of choice in many areas due to their ease of application and costs. These methods relatively fast and costs of the operation are less. It is possible to say absence or presence of some substance group by applying these tests. There is no spectrophotometric method and an effective colorimetric test developed for these type of compounds. In this research a colorimetric method developed for the aminoalkylindole group containing compounds to give SiO_2 and H_2SO_4 mixture catalyzed reaction with a well-known indole reagent, p-DMAB, to form a colored complex. The method applied to some aminoalkylindole derivatives such as AM-2201, JWH-018, 5F-PB-22 and XLR-11 and successful results came out. Also analysis of aminoalkylindole type substances done with LC-MS/MS, HPLC and GC-MS, hence quantitative analysis of seized materials in İstanbul region done by HPLC in order to report purity of the substances. As a result of the research, a novel method was developed for the determination of aminoalkylindole

containing compounds which can be successfully applied both powder and absorbed to plant material samples in field. The method was used in spectrophotometric analysis and proved that can be used in quantitative analysis in forensic laboratories. Chromatographic and quantitative analysis on seized materials showed that types of substances being sold and their purity in Turkey.

May 2017, 103 pages.

Keywords: Aminoalkylindole, synthetic cannabinoids, color test, spectrophotometry, GC-MS, LC-MS/MS, HPLC



1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanoğlu doğa ile etkileşiminde deneme yanılma yöntemini kullanarak birçok keşifler yapmıştır. Bu keşifler yazı bulunmadan önce resim ve şekiller veya söylenceler ile daha sonrada yazı ile nesilden nesile aktarılmıştır. Bu aktarımlar arasında hastalıkların tedavisi veya etkilerinin geçirilmesi/hafifletilmesi amacıyla yapılan arayışlarda yer almıştır ve bu durum halen de sürmektedir. İşte bu keşif macerasının bir bölümünde bilimsel adı cannabis sativa olan ve hint keneviri olarak bildiğimiz bitki ile karşılaştık. Bağımlılık oluşturunca maddeler sınıfından kannabinoidler, kannabinoid reseptörlerini aktive eden çeşitli kimyasal bileşenleri içeren bir sınıftır. Literatürde sentetik kannabinoidlerin gaz ve sıvı kromatografisi ile tayini, saf referans maddelerin analizi ile sınırlıdır ve genelde metod iyileştirme ve üretim safsızlıklarının tespiti gibi konular üzerinde durulmamıştır. Artan madde çeşitliliğine koşut olarak, bu maddelerin karışım halinde bulunması, farklı bitkiler üzerine emdirilmiş şekilde satılması gibi koşullar da göz önüne alınarak metod iyileştirmesi bir ihtiyaçtır. Üretim safsızlıklarının tesbiti, müsadere edilen yasadışı maddelerin kaynaklarıyla irtibatlandırılması ve tanımlanması da adli bilimlerde önemlidir. Ayrıca ön eleme amacıyla bu maddelerin yerinde saptanması ve tayinini amaçlayan spot testler (leke denemeleri) henüz geliştirilmemiştir. Bilinen saha testleriyle söz konusu maddelerin tespiti mümkün olmayıp esas olarak sadece yüksek maliyetli aletli analiz yöntemleri ile tayin edilebilmektedirler. Suistimal edilen bu maddeler nadiren toz halde ele geçirilse de çoğunlukla (psikoaktif etkiye sahip olmayan) bir bitki üzerine emdirilmiş şekilde satılmaktadır. Bu maddeler farklı bitkiler üzerine rahatlıkla emdirildiği gibi toplumda tanınan, zararsız görünümlü bitkiler üzerine (tütün, nane vb.) de uygulanmaktadır. Dolayısıyla bilinen diğer uyuşturucu ve uyarıcı maddeler gibi piyasada ticari olarak satışı yapılan uyuşturucu madde test kitleri yardımıyla ya da uzmanlaşmış laboratuvar personelinin bilgi ve deneyim birikimine bağlı olarak sentetik kannabinoidlerin ayırımının ve tanınmasının yapılması hali hazırda mümkün olmadığından tez kapsamında bu maddelere ilişkin de spot testin geliştirilmesi, spektrofotometrik yöntem geliştirilip kromatografik yöntemle kıyaslanarak valide edilmesi amaçlanmıştır. Spot test reaktiflerinin geliştirilmesinde sentetik kannabinoidlerin ortak yapısal fonksiyonel gruplarının renk reaksiyonları ve ticari bileşimlerde bulunabilen safsızlıkların kolorimetrik analizi hedef alınmıştır.

Bu maddelerin tayinine yönelik kolorimetrik yöntemler literatürde mevcut değildir. Oysa ki bu tür ucuz ve pratik yöntemlerin olay yeri incelemelerinde ve kriminal laboratuvarların ön karar alma süreçlerini hızlandırma anlamında işlevi çoktur. Bu bağlamda geliştirilen renk testinin ileri çalışmalarda kolorimetrik test kitlerine dönüştürülmesi olasıdır.

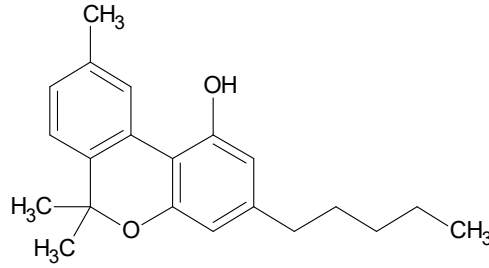


2. GENEL KISIMLAR

Antik çağlardan bu yana bilinen bu bitki bugün dünyanın hemen hemen her bölgesinde iki ana tür olarak (*cannabis sativa* ve *cannabis indica*) yetiştirilmektedir [1]. Orta Asya’da Çinlilerin M.Ö. 6000 yıllarında hint keneviri bitkisini lif ve yağ kaynağı olarak yetiştirdiğine, Hintlilerin ise bu bitkiyi dini ritüellerinde kullandıkları ve kutsal saydıklarına dair deliller mevcuttur[2].

Hint keneviri bitkisi tarih boyunca sanayi değerinin yanında keyif verici ve ilaç olarakta kullanılmıştır. Hint keneviri bitkisinde 60’tan fazlası kannabinoid olan 400’ün üzerinde kimyasal madde bulunmaktadır[3]. Kannabinoid ismi hint keneviri bitkisinin içerdiği alkaloidlere verilen genel bir isimdir. Esrar dünyada en yaygın olarak kullanılan [4] ve bazı kesimlerce zararsız olarak kabul edilen, ancak özellikle gençlerde akıl sağlığını etkilediği düşünülen [5] bir uyuşturucu türüdür. İnsan üzerinde yarattığı halüsinojen etkiden içerisinde bulunan Δ^9 -THC etken maddesi başlıca sorumludur. Bu maddenin CB₁ ve CB₂ reseptörleri ile etkileşimi sonucu sanrı gördürme etkisi ortaya çıkar. CB₁ reseptörü sadece kannabinoidler ile ilgili görünürken, CB₂ reseptörü aynı zamanda ağrı azaltımı ile de ilgilidir [6].

200 yılı civarında yazıldığı düşünülen Çin farmakopisinde hint keneviri bitkisinden bahsedilmektedir. 1899 yılında *cannabis sativa* üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde kannabinol izole edilmiştir. 1940 yıllarda ise kannabinol maddesi ve diğer bazı kannabinoidlerin yapısı çözülmüş, ilk kez olarak sentetik yolla elde edilmesi başarılmıştır[7-9]. 1964 yılında Mechoulam ve Gaoni’ni tarafından kenevir bitkisinden izole edilerek Δ^9 -tetrahidrokannabinol ((-)-(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol,) (Δ^9 -THC) olarak tanımlanmıştır [10,11].

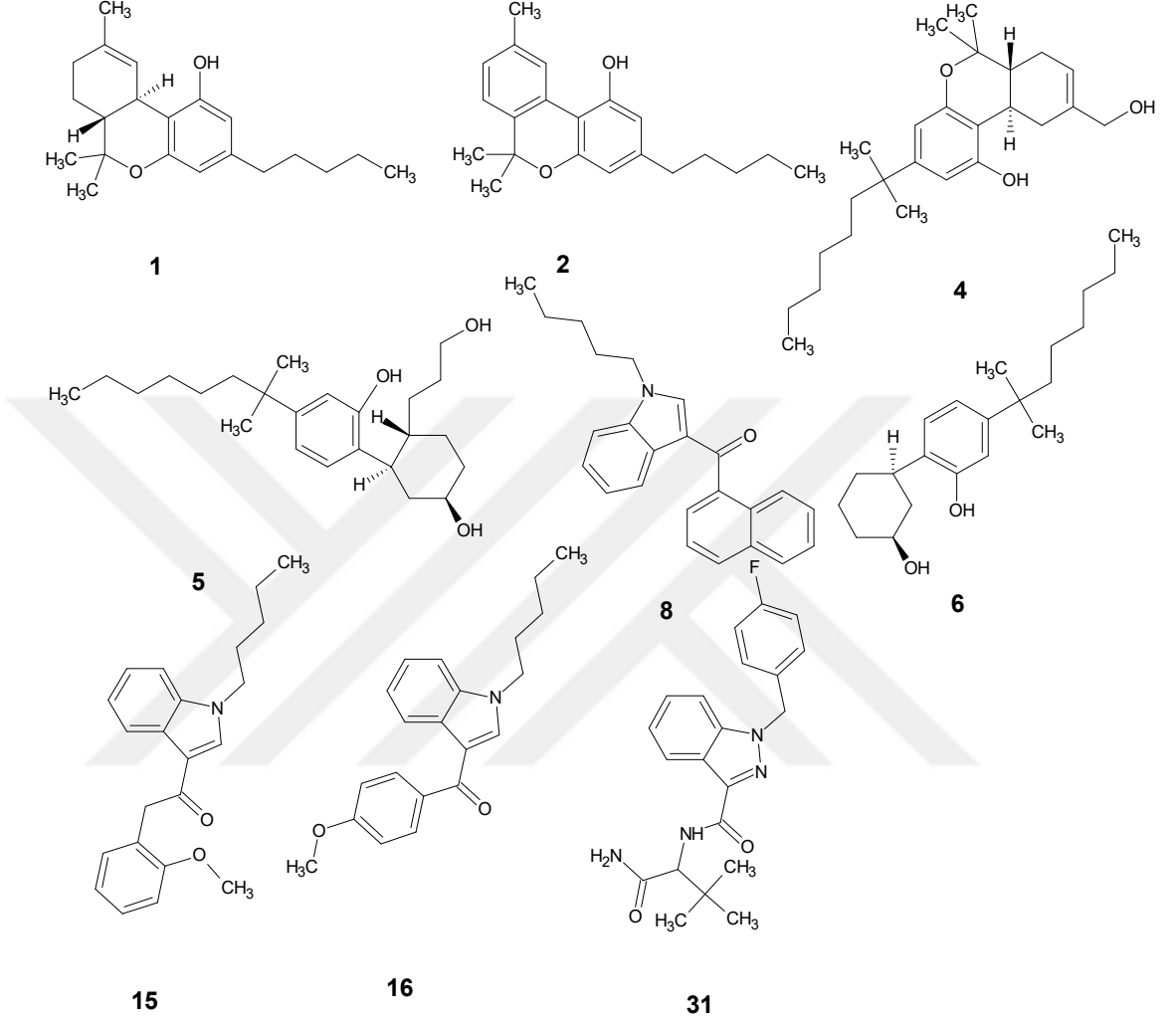


Şekil 2.1: Kannabinol.

Mechoulam ve Gaoni'nin çalışmasının ardından konu ile alakalı birçok araştırma grubu tarafından Δ^9 -THC benzeri maddeler sentezlenmiştir. Pfizer firması tarafından geliştirilen ve bilinen ilk sentetik kannabioid olan CP-55,940 (2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol) ve benzeri maddeler buna örnek verilebilir. Daha sonraları CB₁ ve CB₂ reseptörlerinin işlevleri anlaşılmasıyla bu reseptörler üzerinde etki eden ve yapısal olarak Δ^9 -THC'ye benzerlik göstermeyen maddelerin sentezine yönelilmiştir. Bu çalışmalar sonucu Winthrop çalışma grubu tarafından bazı aminoalkilindol grubu maddelerin in vivo olarak CB₁ reseptörleri üzerinde etkin olduğu tespit edildi. 90'lı yıllarda ABD Clemson Üniversitesinden J.W. Huffman ve diğ. [12-15] tarafından naftoilindol, naftilmetilindol, naftoilpirol, naftilmetilinden ve fenilasetilindol ana yapısına sahip birçok molekül sentezlendi. Bu maddeler kısaca aminoalkilindoller veya JWH maddeleri (sentezleyeninin adına ithafen) olarak bilinmektedir. Δ^9 -THC benzeri etki gösteren ve bitkisel kaynaklı olmayan bu maddeler günümüzde sentetik kannabinoid olarak adlandırılmaktadır.

CB₂ reseptör affinitesi çok yüksek ve CB₁ affinitesi düşük bir madde sentezleyerek steroid olmayan etkin bir ağrı kesici madde sentezlemek için yola çıkılmış[16], ancak daha sonra bu çalışmaların ürünü olan maddelerden CB₁ affinitesi yüksek olan maddelerin suiistimal edilmesi durumu ortaya çıkmıştır. 2000'li yıllara kadar sadece bilimsel araştırma amacıyla sentezlenen sentetik kannabinoidler ilerleyen yıllarda esrar gibi kullanılmaya başlanmıştır. İnternet üzerinde yapılan geriye dönük araştırmalar neticesinde sentetik kannabinoidlerin suiistimalinin 2006 yılına kadar uzandığı, hatta bazı kullanıcı yorumlarına göre kesin olmamakla birlikte, 2004 yılında dahi piyasada yer aldığı saptanmıştır. Tüm dünyada popüler olarak kullanımı bulunan esrar maddesine alternatif olarak piyasaya çıkan, ilk zamanlarında bitkisel karışım olarak pazarlanan sentetik kannabinoidler kısa sürede piyasada yer edinmiştir[17]. Ülkeler arası ticaret ve

iletişimin artması, internet üzerinden sipariş ve kargo şirketleri ile teslimat gibi değişen yasadışı madde ticareti şekli sentetik kannabinoidlerin yaygınlaşmasını kolaylaştırmıştır.



Şekil 2.2: Doğal ve sentetik kannabinoid örnekleri.

Sentetik kannabinoidler Δ^9 -THC benzeri molekül yapısına sahip klasik ve benzemeyen klasik olmayan olarak sınıflandırılabilir. Ancak mevcut madde çeşitliliği ve kimyasal açıdan bakıldığında maddelerin içerdikleri ana yapılaraya dayanarak oluşturulacak bir sınıflama çalışma açısından kolaylık sağlayacaktır.(Tablo 2.1)

Tablo 2.1: Kannabinoidler ve sınıflandırmaları.

No	Kısa Adı	Açık Adı	Grup
1	Δ^9 -THC	(-)-(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol	DK
2	Kannabinol	6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-benzo[c]chromen-1-ol	DK
3	Kannabidiol	2-[(1R,6R)-6-isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol	DK
4	HU 210	(6aR,10aR)-9-(Hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-3-(2-methyloctan-2-yl)-6a,7,10,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol	KK
5	CP 55,940	2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol	KOK, SF
6	CP 47,497	2-[(1R,3S)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol	KOK, SF
7	JWH 007	1-pentyl-2-methyl-3-(1-naphthoyl)indole	KOK, Aİ, Nİ
8	JWH 018	Naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
9	JWH 022	1-naphthalenyl[1-(4-penten-1-yl)-1H-indol-3-yl]-methanone	KOK, Aİ, Nİ
10	JWH 073	naphthalen-1-yl-(1-butylinol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
11	JWH 081	4-methoxynaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
12	JWH 122	(4-methyl-1-naphthyl)-(1-pentylindol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
13	JWH 200	(1-(2-morpholin-4-ylethyl)indol-3-yl)-naphthalen-1-ylmethanone	KOK, Aİ, Nİ
14	JWH 210	4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
15	JWH 250	2-(2-methoxyphenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl)ethanone	KOK, Aİ, Fİ
16	RCS-4	(4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	KOK, Aİ, Bİ
17	RCS-8	2-(2-methoxyphenyl)-1-[1-(2-cyclohexylethyl)indol-3-yl]ethanone	KOK, Aİ, Fİ
18	WIN 48,098	(4-methoxyphenyl)-[2-methyl-1-(2-morpholin-4-ylethyl)indol-3-yl]methanone	KOK, Aİ, Bİ
19	WIN 55,212-2	[(3R)-2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenyl-methanone	KK
20	AM 2201	1-[(5-Fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(naphthalen-1-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
21	MAM 2201	(1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl)(4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone	KOK, Aİ, Nİ
22	EAM 2201	(4-ethyl-1-naphthalenyl)[1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-methanone	KOK, Aİ, Nİ
23	AM 694	1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl) methanone	KOK, Aİ, Fİ
24	AM 1220	(R)-(1-((1-methylpiperidin-2-yl)methyl)-1H-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
25	UR-144	(1-pentylindol-3-yl)-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone	KOK, Aİ
26	CRA 13	naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone	KOK, Aİ, Nİ
27	AKB-48	1-pentyl-N-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-yl-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA
28	5F-AKB-48	N-(adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA
29	AB-PINACA	N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA
30	AB-FUBINACA	N-[(1S)-1-(Aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-(4-fluorophenyl)methyl]-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA
31	ADB-FUBINACA	N-(1-Amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA

Tablo 2.1: (devamı)

32	PB-22	1-Pentyl-1H-indole-3-carboxylic acid 8-quinolinyl ester	KOK, Aİ, İK
33	5F-PB-22	1-(5-fluoropentyl)-8-quinolinyl ester-1H-indole-3-carboxylic acid	KOK, Aİ, İK
34	STS-135	N-(Adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carboxamide	KOK, Aİ, İKA
35	SDB 006	N-benzyl-1-pentyl-1H-indole-3-carboxamide	KOK, Aİ, İKA
36	APİCA	1-pentyl-N-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-yl-1H-indole-3-carboxamide	KOK, Aİ, İKA
37	THJ 018	1-naphthalenyl(1-pentyl-1H-indazol-3-yl)-methanone	KOK, AİZ, NİZ
38	THJ 2201	[1-(5-Fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl](1-naphthyl)methanone	KOK, AİZ, NİZ
39	NM 2201	naphthalen-1-yl 1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carboxylate	KOK, Aİ, İK
40	AB CHMİNACA	N-[(1S)-1-(Aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA
41	MMB CHMİNACA	methyl 2-{[1-(cyclohexylmethyl)-1H-indol-3-yl]formamido}-3,3-dimethylbutanoate	KOK, Aİ, İKA
42	ADB CHMİNACA	N-(1-amino-3,3-dimethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide	KOK, AİZ, İZA

Doğal kannabinoid, DK; sentetik kannabinoid, SK; klasik kannabinoid, KK; klasik olmayan kannabinoid, KOK; siklohegzilfenol, SF; aminoalkilindol, Aİ; aminoalkilindazol, AİZ; naftoilindol, Nİ; naftoilindazol, NİZ; fenilasetilindol, Fİ; benzoilindol, Bİ; indolekarboksamid, İKA; indazolkarboksamid, İZA; indolkarboksilat, İK

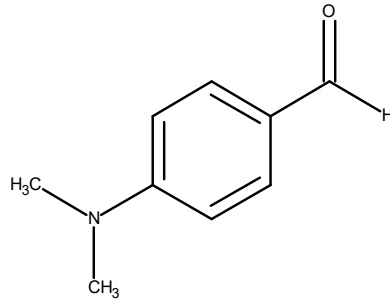
Sentetik kannabinoidlerin kullanımı yaygınlaştıkça ülkeler bu maddeleri yasal kısıtlılık altına alarak ticaretinin önüne geçmeye çalışsa da, her geçen yıl yeni maddeler ortaya çıkmaktadır. Yeni maddeler yoluyla, madde adı yasada yer almadığı için, suçlular hukuki yaptırımdan kullanıcılar ise zorunlu tedaviden kurtulmaktadır.

Bu çalışmanın amacı günümüzde tüm dünyada kötüye kullanımı yaygınlık gösteren sentetik kannabinoidler sınıfından bir grup madde için sahada uygulanabilecek ve bu maddelerin varlığını tespit etmeye yönelik bir kolorimetrik yöntem ile laboratuvarında bu maddelerin tespitine yönelik spektrofotometrik ve kromatografik metotlar geliştirmektir. Hali hazırda birçok ülkede yasaklanmış olan bu maddelerin insanlar üzerinde bağımlılık yarattığı ve yasadışı olarak satışının bulunduğu bilinmektedir[17]. Bilinen saha testleri ile söz konusu maddelerin tespiti mümkün olmamakla birlikte sadece enstrümantal analiz yöntemleri ile tayin edilebilmektedirler[18-27].

Kolorimetrik yöntemler (spot testler) uzun süredir analitik kimya çalışmalarında kullanılan maliyeti düşük ve seçici tepkimelere dayanan yöntemlerdir. Bu yöntemler göreceli olarak hızlı ve maliyeti düşük testlerdir. Yapılan test ile bir madde grubunun

varlığını veya yokluğunu anlamak mümkündür. Ayrıca bu testler genel olarak çok fazla ekipman gerektirmeyen ve laboratuvar dışında uygulanabilecek testlerdir. Tayin sınırları her ne kadar günümüz aletli analiz yöntemleri kadar düşük olmasa da her analizin çok düşük tayin sınırları gerektirmediği göz önüne alındığında halen kullanım açısından avantajlar sağlamaktadır. Özellikle kolluk kuvvetlerinin yaptığı çalışmalar sonucu elde edilen şüpheli maddelerin yakalamaya sebep olabilecek makul şüphe oluşturacak ve/veya kaldıracak şekilde en kısa sürede tanımlanması gerebilmektedir. Güvenlik güçlerinin patlayıcı veya uyuşturucu maddeleri tespit etmeleri için çeşitli taşınabilir cihazlar bulunmakla birlikte kolorimetrik yöntemler uygulama kolaylığı, yatırım ve kullanım maliyeti ile en çok tercih edilen yöntemdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) farmasötik maddeler ve tıbbi bitkiler için Basit Testler kitabında [28], Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Organize Suçla Mücadele Örgütü (UNODC) suiistimal Edilen Maddeler için Hızlı Metotlar [29] kitabında toplamda 600 civarı madde için duyulara (koku, tat, doku vb.) ve fizikokimyasal (renk reaksiyonları, erime noktası, vb.) özelliklere dayalı testlere yer vermiştir. Hali hazırda esrar, eroin, kokain ve amfetamin grubu maddeler için hem laboratuvarda hazırlanabilecek hem de ticari olarak satın alınabilecek test kitleri mevcuttur [29-38]. Ancak sentetik kannabinoidler için sınırlı olarak bulunan bu test kitleri aynı gruba ait maddeler için bile farklı renkler veren [39] genel renk testi olarak adlandırılacak spesifik olmayan testlerdir.

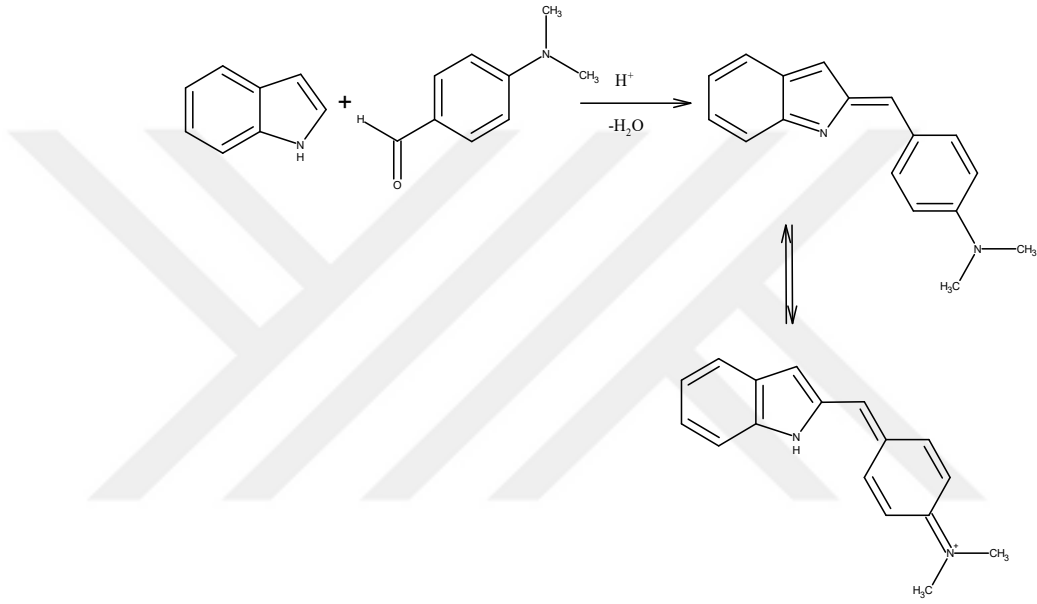
Sentetik kannabinoidlerin bir kısmı aminonaftilindol yapısı içermektedir. p-dimetilaminobenzaldehid (pDMAB) hali hazırda indol grubu içeren maddeler için çok spesifik bir kromajenik maddedir[40].



Şekil 2.3: pDMAB (para-Dimetilaminobenzaldehid).

pDMAB reaktifi ve bu maddenin bazı türevleri mikrobiyoloji alanında incelenen organizmanın triptofandan indol grubunu ayırabilme yetisini test etmek üzere de

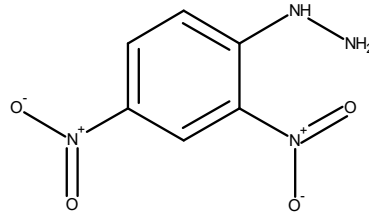
kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisinde renklendirici olarak pDMAB ile hazırlanan van URK reaktifi ile indol gruplarının renklendirilmesi uzun bir süre almakta ve oluşan renkler uzun süreli değildir. Bunun yanında demir (III) klorür ile hazırlanan Salkowski reaktifinde ise renk oluşumu çok hızlıdır. Ancak yine oluşan renkler belirli bir süre sonra tanımsız kahverengi spotlara dönüşmektedir. Bu iki reaktifin karıştırılması sonucu elde edilen reaktif ile 79 indol grubu içeren maddenin İTK (İnce tabaka kromatografisi) plakası üzerinde renklendirilmesi başarıyla sağlanmıştır[40].



Şekil 2.4: pDMAB ile indol reaksiyonu[41].

Yapısal olarak Δ^9 -THC benzeri moleküller bilinen esrar renk testlerine (Duquenois-Levin testi, Fast Blue B tuzu) cevap verebilmektedir. Ancak ayrı bir yapıya sahip sentetik kannabinoidler ile yapılan renklendirme çalışmalarını ve İTK plakası üzerinde yapılan araştırmalardan olumlu bir sonuç elde edilememiştir[42].

Bu maddelerin içerdikleri bir diğer ortak yapı ise karbonil grubudur. Karbonil grubu renklendirme reaktifi olarak 2,4-dinitrofenilhidrazin(DNPH) bilinen bir yöntemdir. Isaacs R.C.A. tarafından yapılan çalışmada DNPH içeren Brady's reaktifi kullanılarak keton karboksil grubu ihtiva eden sentetik kannabinoidler için üç farklı test koşulunda turuncu/kırmızı-turuncu olarak ayırt edici renk elde edildiği belirtilmektedir[43]. Sentetik kannabinoidlerin son kullanıcıya ulaşmış formu bitki üzerine emdirilmiş halde olduğundan, ve bu bitkiler değişkenlik gösterdiğinden[44], bitkilerden gelebilecek karboksil grubu içeren maddeler testi etkileyecektir.



Şekil 2.5: DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin).

UV-GB spektrometri tekniği ilaç ve biyomedikal çalışmalarda sıklıkla kullanılmakla birlikte adli kimyada yaygın olarak kullanılan bir teknik değildir. İşletme ve ilk maliyeti düşük olmasına rağmen, diğer kullanılan tekniklerde elde edilen tanımlama verileri ve birçok maddeyi aynı anda tarama avantajı bulunmaması nedeniyle, tercih edilmemektedir. Nitel analiz kısmında kromatografi kadar güçlü olmasa da nicel analiz için, özellikle analiz şartlarından etkilenen maddelerde, diğer yöntemlere göre üstün yanları bulunmaktadır. Örneğin, UNODC tarafından yayınlanan bazı kitapçıklarda UV-GB spektrometrisine yer verilmiştir [33,45]. Ancak adli laboratuvarlarda yapılan incelemelerde numune içeriğinde aranan hedef maddelerin tanımlamasının yüksek doğrulukta yapılması ve numune hazırlama adımları ile analiz sürelerinin mümkün olduğunca kısa tutulması ihtiyacı nedeniyle bu ihtiyacı karşılayabilen diğer inceleme tekniklerine yöneltmektedir. Kromatografik yöntemler adli kimya laboratuvarlarında kullanılan temel analiz metotlarından. Uyuşturucu maddelerin analizinde ise tanımlama ve ayırma gibi iki ayrı etkinliği bulunan gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Diğer en yaygın olarak kullanılan yöntemler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve çift kütle spektrometrelili sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) olarak sıralanabilir.

Aminonaftilindol grubu ihtiva eden sentetik kannabinoidler ile ilgili GC-MS yöntemi kullanılarak yapılmış çalışmalar bulunmaktadır [18,22]. Bu çalışmalarda genel olarak saha numunelerinin incelenmesi sonucu tespit edilen sentetik kannabinoidler sunulmaktadır. Örneğin Uchiyama ve arkadaşlarının [18] yaptığı çalışmada Japonya’da elde edilen 46 sentetik kannabinoid içerdiğinden şüphelenilen numunenin GC-MS ve LC-MS analizi yapılmış ve içerdikleri kimyasal bileşikler tanımlanmaya çalışılmıştır. Yine bir başka çalışmada Almanya’da karşılaşılan JWH-122 maddesinin tanımlaması GC-MS ve NMR teknikleri kullanılarak yapılmıştır [21]. Genel olarak bakıldığında literatürde yer alan çalışmaların büyük bir çoğunluğu ilk defa karşılaşılan maddelerin tanımlamaları

üzerine yoğunlaşmıştır [18, 20-23, 46-55]. Çünkü bu alanda karşılaşılan en büyük problemlerden birisi ilk defa karşılaşılan maddenin ne olduğunu tespit etmektir. GC-MS cihazı ile elde edilen kütle spektrumlarının var olan veri bankaları ile yapılan karşılaştırması sonucu tanımlama işlemi çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilmekte ve konu ile ilgili olan tüm kütüphaneler 70 eV voltajda parçalanma verilerini içerdiği için her laboratuvarında kullanılabilmektedir. Son zamanlarda ise LC-MS/MS sistemleri adli kimya laboratuvarlarında yaygınlık kazanmıştır. Görece pahalı olan LC-MS/MS cihazı iyonlaştırma teknikleri ve parçalama enerjilerinin değişkenlik göstermesi, kullanılan ayırma metodunun oluşan parçalanma ürünlerini etkilemesi nedeniyle, GC-MS gibi geniş veri bankalarına sahip değildir. Yine de son yıllarda, özellikle sentetik kannabinoidler ve kationonlar gibi yeni psikoaktif maddeler için, bu yönde çalışmalar yapılmaktadır[56-60]. Sentetik kannabinoidler ile ilgili bir diğer sorun ise nitel analizi yapılan maddelerin referans madde eksikliğinden dolayı nicel analizlerinin yapılamamasıdır. Bu konuda yapılan çalışmalar [18, 42, 60-63] sınırlı sayıda olmakla birlikte, hali hazırda ülkemizde elde edilen sentetik kannabinoidlerin miktarsal olarak çalışması bilimsel araştırma olarak yapılmamış olup, doz olarak değişiklik gösterip göstermediği bilinmemektedir. Klinik çalışmaları yapılmamış ve dozaj bilgileri bulunmayan bu tip maddelerin kullanımı sonucu ölüme varan aşırı doz vakaları yaşanmaktadır. Bu amaçla örneklenen bulgular içerisinde bulunan madde türleri ile miktarlarının belirlenmesi önem arz etmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada çözeltilerin hazırlanması aşamasında Shimadzu ATX224 analitik terazi ve Dragonlab MX-S vorteks karıştırıcı kullanılmıştır. Spektrofotometrik çalışmalar için IKA marka C-MAG HS 7 model ısıtıcı, CEM marka mikrodalga sistemi ve Shimadzu marka UV-1800 model UV-Vis spektrometresi kullanılmıştır. Kromatografik analizler için Shimadzu marka LC-20A model yüksek performanslı likit kromatografisi, Shimadzu marka LC-MS/MS 8040 model likit kromatografi-tandem kütle spektrometresi ve Shimadzu marka GC-Ultra QP2010 model gaz kromatografisi kütle spektrometresi cihazları kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Bu çalışmada kullanılan sertifikalı olmayan sentetik kannabinoidler İstanbul Kriminal Polis Laboratuvarında incelemesi yapılmış olan toz halde yakalanmış vaka numuneleridir. Çözelti ve reaktiflerin hazırlanmasında kullanılan 2,4-dinitrofenilhidrazin, hidroklorik asit, sülfirik asit, rezorsinol, difenilamin, metanol, asetik asit, hidrazin sülfat, hidroksilamin, sodyum asetat, bakır klorür, alüminyum klorür, Rochelle tuzu, sodyum karbonat, hidrojen peroksit, 4-dimetilamino benzaldehid (p-DMAB), silisyum oksit, asetonitril, diklorometan ve dimetil sülfoksit, glukoz, salisilik asit, mannitol, üre analitik saflıkta Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kromatografik analizlerde kullanılan asetonitril, metil alkol ve saf su HPLC saflığında Merck firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan sertifikalı standart maddeler Cayman Chemicals firmasından satın alınmıştır.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Van URK reaktifi

1 g p-DMAB 50 mL derişik HCl içerisinde çözüldü ve üzerine 100 mL etil alkol eklendi.

3.3.2. Kovac's reaktifi

1 g p-DMAB 25 mL derişik HCl içerisinde çözüldü ve üzerine 5 mL izoamil alkol eklendi.

3.3.3. *Salkowski reaktifi*

2,03 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500 mL su ve 300 mL derişik sülfirik asit içerisinde çözöldü.

3.3.4. *Ehrlich reaktifi*

1 g p-DMAB 95 mL etanolde çözöldü ve üzerine 20 mL derişik HCl eklendi.

3.3.5. *2,4-Dinitrofenilhidrazin*

$7,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonda ve 1-2 damla derişik HCl eklenip çözeltiye alınıp metanolle tamamlandı.

3.3.6. *Seliwanoff*

500 mg rezorsinol'ün 100 mL'lik çözeltisi % 25' lik (v/v) HCl ile hazırlandı.

3.3.7. *Rothenfusser Testi*

2 g difenilamin 20 mL metanol içerisinde çözöldü ve üzerine 80 mL glasiyal asetik asit ile 100 mL derişik HCl eklendi.

3.3.8. *Hidroksilamin hidroklorür*

1,6 g hidroksilamin hidroklorür 100 mL metanolde çözöldü.

3.3.9. *Folin*

Lowry A: 0,1 N NaOH çözeltisinde çözönmüş % 2' lik Na_2CO_3 ; Lowry B: % 1' lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisinde çözönmüş %0,5' lik Cu_2SO_4 ; Lowry C: 50 mL Lowry A + 1 mL Lowry B şeklinde hazırlandı.

3.3.10. *James reaktifi*

25 mg 2-metoksi-4-dimetilaminobenzaldehid 0,66 mL 0,1 N HCl ile çözöldü.

3.3.11. *Wasicky reaktifi*

2 g pDMAB'in 50 mL %95'lik etil alkol ve 50 mL konsantre HCl içerisinde çözölmesi ile hazırlandı.

3.3.12. *p-DMAB*

5 g p-DMAB 100 mL metil alkolde çözöldü.

3.3.13. *Sentetik kannabinoid referans maddeleri*

Tüm sentetik kannabinoid numuneleri 1000 mg L⁻¹ olacak şekilde metanol veya asetonitrilde stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Daha sonra HPLC kalibrasyon eğrisi için stok çözeltilerden 5, 10, 25, 50 ve 100 mg L⁻¹ olacak şekilde seyreltilmiştir. LC-MS/MS çalışmaları için 0,1 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanmıştır.

3.3.14. *Sentetik kannabinoid yakalama numuneleri*

Tüm sentetik kannabinoid numuneleri HPLC için 100 mg L⁻¹; LC-MS/MS için 0,1 mg L⁻¹ olacak şekilde metanol veya asetonitrilde hazırlanmıştır.

3.3.15. *İnterferan çözeltileri*

Aspirin (Salisilik Asit) 3000 mg L⁻¹ olacak şekilde metanolde, Mannitol 3000 mg L⁻¹ olacak şekilde 0,5 mL su suda çözülüp metanol ile 5 mL' ye tamamlanarak, Glukoz 3000 mg L⁻¹ olacak şekilde metanolde ve üre 3,012 mL suda çözülüp 5 mL'ye metanol ile tamamlanarak hazırlandı.

Karışımlar; salisilik asit, mannitol, glukoz ve üre son konsantrasyonu 1200 mg L⁻¹, AM-2201 konsantrasyonu 600 mg L⁻¹ olacak şekilde hazırlandı.

3.4. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM

Literatürde Silika Sülfirik Asit (SSA)'in, indollerin karbonil bileşikleri ile solventsiz koşullar altında ve mükemmel bir verimle, kendilerine karşılık gelen bis(indonil) alkanlarını verdiği elektrofilik süstitisyon reaksiyonlarında tekrar kullanılabilen, ılımlı ve etkin bir katı asit katalisti olduğu [64] bilgisi yer almaktadır. Bu çalışmadan hareketle silika ve sülfirik asit karışımının sentetik kannabinoidlerin indol grubu reaktifi olan Ehrlich reaktifi ile renk vermesinde katalizör görevi görebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalarda silika sülfirik asit karışımı katalizörlüğünde p-DMAB reaktifi kullanılarak geliştirilebilecek bir yöntem üzerinde çalışılmaya başlanmış ve değişen deney koşullarında (işlem sırası, sıcaklık vb.) yapılan çalışmalar sonucu p-DMAB reaktifinin sentetik kannabinoid çözeltisinin SiO₂ ve derişik H₂SO₄ ile muamele edilmesiyle belli şartlar altında mor renk verdiği gözlenmiştir.

Yöntemin son aşamasında çözelti hacimlerinin 10 mL' ye tamamlanması ile çözeltiler 10 kat seyrelmektedir. Yöntem ilk olarak 100 mg L⁻¹ AM-2201 çözeltisine uygulandığında

spektrofotometrik analiz sonucu çözeltinin 572 nm dalgaboyunda maksimum absorbands verdiği görülmüştür (Son konsantrasyon 10 mg L⁻¹).

İlk önce yapılan çalışmalarda geliştirilen yöntemin beherde nasıl gerçekleştiği tespit edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen safhalarında kapalı bir kapta çalışma yapmak üzere mikrodalga sentez cihazı kullanılarak da analiz yapılmıştır. Tüm bu işlemlerde sıcaklık önemli bir faktör olmakla birlikte sentetik kannobinoidlerin standartları yurt dışından temin edildiğinde bazı maddelerin ısıtma yapmadan deney tüpünde direkt sonuç verdiği tespit edilmiştir.

3.4.1. Beherde Uygulanan Yöntem ile Yapılan Çalışmalar

3.4.1.1. H₂SO₄ Konsantrasyonu ve Hacim Optimizasyonu

Değişen konsantrasyonlarda H₂SO₄ ile yöntem denenmiş ancak sadece derişik H₂SO₄ varlığında yöntemden cevap alınabilmiştir. Derişik H₂SO₄ hacmi ile ilgili optimizasyon çalışması yöntemde kullanılan tüm kimyasal madde miktarlarının sabit tutulup derişik H₂SO₄ miktarının değiştirilmesiyle yapılmış ve absorbands ölçümleri kıyaslanarak uygun derişik H₂SO₄ hacmi belirlenmiştir. 100 mg L⁻¹ AM-2201 çözeltisi hazırlanmış ve değişen derişik H₂SO₄ hacimleriyle yöntem tekrarlanmıştır.

Tablo 3.1: Değişen derişik H₂SO₄ hacimleri ile yöntem uygulandıktan sonra ölçülen absorbands değerleri.

Derişik H₂SO₄ hacmi (mL)	Absorbans
0,5	0,332
1	0,449
1,5	0,448

3.4.1.2. SiO₂ Miktarı Optimizasyonu

Yöntemde kullanılan SiO₂ miktarıyla ilgili olarak ise öncelikle 100 mg SiO₂ ve 50 mg SiO₂ ile çalışılmıştır. Daha sonra SiO₂ miktarı 20 mg' a kadar düşürülmüş ve sonuçların değişmediği gözlenmiştir.

3.4.1.3. Çözücü Seçimi

Metanol, etanol, dimetil sülfoksid (DMSO), diklorometan gibi organik çözücülerde çözünen AM-2201 suda ise eser miktarda çözünmektedir. Yöntem geliştirilirken ortama bir miktar su katılması AM-2201' in çökmeye başlamasına sebep olmuştur. Bu nedenle

yöntemde susuz ortamda çalışılmış, AM-2201 çözücüsü olarak da metanol tercih edilmiştir.

İndol belirlenmesinde kullanılan reaktiflerden Ehrlich reaktifi p-DMAB ile hazırlanan bir reaktiftir. Buradan yola çıkarak bu yöntemin geliştirilmesinde öncelikle p-DMAB Ehrlich reaktifi olarak hazırlanmıştır.

Ehrlich reaktifinin hazırlanmasında 1 g p-DMAB 95 mL etanolde çözünür ve yavaşça 20 mL derişik HCl eklenir. Bu şekilde hazırlanan p-DMAB reaktifi ile yapılan çalışmalarda reaktif eklenmesi sonucu pembe renk gözlenmiştir ancak spektrum düzgün değildir. Daha sonra p-DMAB reaktifi hazırlanırken ortamdan asidin kaldırılması gerektiği ve analit çözücüsü ile aynı çözünün kullanılması ile daha iyi spektrum alınabileceği düşünülerek sadece metanolde çözülerek hazırlanmıştır (0,5 g/10 mL). Yöntem bu şekilde hazırlanan p-DMAB reaktifi ile yapıldığı zaman stabil mor renk ve en yüksek absorbsiyonun gözleendiği 572 nm dalgaboyunda düzgün bir spektrum elde edilmiştir.

3.4.1.4. İşlem Sırası

Reaktiflerin hangi sıra ile katılacağı bu yöntemde önemli bir parametredir. Yöntemin optimizasyonu aşamasında ilk olarak SiO₂, derişik H₂SO₄ ve p-DMAB karışımının üzerine AM-2201 çözeltisi eklenerek sonuç alınabileceği düşünülmüştür. 100 mg SiO₂ üzerine 1 mL H₂SO₄ ve 1 mL p-DMAB eklenerek iyice karıştırılmış ve daha sonra 1 mL 1000 mg L⁻¹ AM-2201 çözeltisi eklenip ısıtıldığında yeşilimsi-sarı renkte bulanık bir çözelti elde edilmiştir. Çözelti süzgeç kağıdında süzildükten sonra spektrofotometrede tarama yapıldığında spektrumun düzgün olmadığı gözlenmiştir.

Daha düzgün bir spektrum elde etmek amacıyla deneme tekrarlanarak ortama ek olarak metanol ilavesi yapılmıştır ve değişen metanol hacimlerinde spektrofotometrede yapılan taramalar sonucunda yine düzgün spektrumlar ede edilememiştir.

Daha sonra 20 mg SiO₂ + 1 mL d. H₂SO₄ + 1 mL AM-2201 çözeltisi sırasıyla eklenmiş, 180 °C'ye ayarlanmış bir ısıtıcıda 5 dakika ısıtılmış ve üzerine p-DMAB reaktifi eklendiğinde çözeltinin şarap kırmızısından mor renge dönüştüğü gözlenmiştir. Çözelti ancak metanol eklenmesiyle kararlı bir mor renge dönüşmektedir. Bu amaçla da beherdeki örnekler metanol ile yıkanarak balon jojede 10 mL' ye tamamlanmaktadır.

Isıtma işlemi sonucu çözelti soğutulduktan sonra p-DMAB eklenmesi de denenmiş ancak sonuç alınamamıştır. Bu nedenle p-DMAB reaktifinin çözeltiye ısıtma işleminden hemen sonra eklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

3.4.2. Optimizasyon Çalışmaları Sonucunda Tespit Edilen Reaktif Miktarları ve Örnek Hazırlanması

Sentetik kannabinoidler için geliştirilen spektrofotometrik yöntemde reaktif olarak p-DMAB (p-dimetilamino benzaldehit) ve katalizör olarak SiO_2 ve derişik H_2SO_4 karışımı kullanılmıştır. Hassas tartılmış 0,5 g p-DMAB metanolde çözülerek balon jodede 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Yöntemin uygulanacağı analitin stok çözeltisi hazırlanırken sentetik kannabinoid çeşitlerinden ilk olarak 1-[(5-Fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(naftalen-1-il)metanon yani özel adıyla AM-2201 seçilmiştir. 1000 mg L⁻¹ AM-2201 stok çözeltisi metanolde hazırlanmıştır. Gerçek örnek analizinde ise AM-2201 emdirilmiş bitki örneği üzerinde çalışılmıştır.

3.4.3. Deneyin Yapılışı

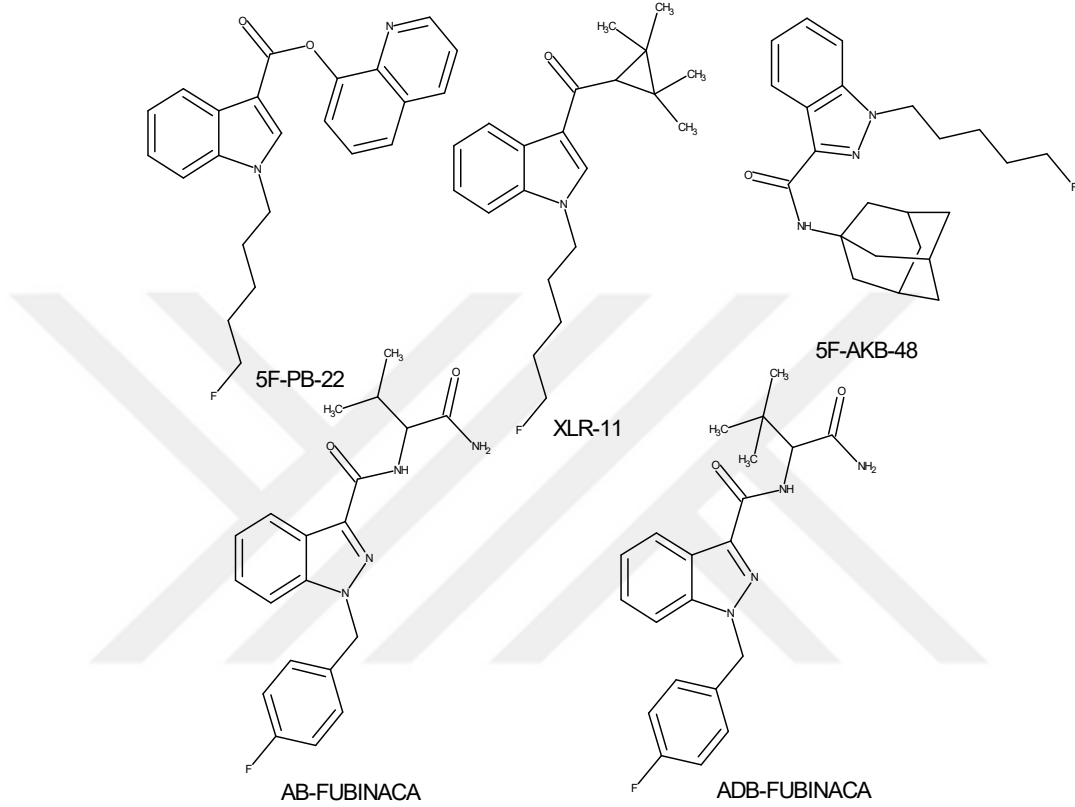
İki behere (reaktif körü ve örnek hazırlamak üzere) 20 mg SiO_2 hassas olarak tartılır. Daha sonra çeker ocak altında iki behere de 1 mL derişik H_2SO_4 eklenir ve karıştırılır. Ardından örnek beherine 1 mL AM-2201 çözeltisi ve reaktif körü beherine de 1 mL metanol eklenerek karıştırıldıktan sonra iki beher de 5 dakika süreyle ısıtılır. 5 dakika sonunda iki behere de 1 mL p-DMAB reaktifi eklenir. Referans çözeltisinin sarı renkte olduğu, örnek çözeltisinin şarap kırmızısından mor renge dönüştüğü görülür. Beherler metanol ile yıkanarak çözeltiler balon jodede 10 mL'ye tamamlanır. Örnek çözeltisinin metanol kattıkça tamamen mor renge dönüştüğü gözlenir. Aynı işlem referans çözeltisine de uygulandığında referans çözeltisinin son renginin açık sarı olduğu görülür. Çözeltiler 0,45 µm filtreden geçirildikten sonra spektrofotometrede numune için maksimum absorbansın gözleendiği 572 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılır.

3.4.4. Çalışma grafiğinin hazırlanması

Kalibrasyon çalışması için 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ olacak şekilde 1000 mg L⁻¹ AM-2201 stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler hazırlanmış ve yöntem her biri için ayrı ayrı uygulanmıştır.

3.4.5. Farklı Sentetik Kannabinoidlere Geliştirilen Yöntemin Uygulanması

Sentetik kannabinoidlerin spektrofotometrik tayini için geliştirilen yöntem aşağıda kimyasal formülleri verilen sentetik kannabinoidlere uygulanmıştır. Kannabinoidlerden sadece 5F-PB-22 ve XLR-11 yönteme cevap vermiştir.



Şekil 3.1: Çalışmalarda kullanılan sentetik kannabinoidlerin kimyasal yapıları.

3.4.5.1. Hazırlanan Çözeltiler ve Yöntemin Uygulanışı

Sentetik kannabinoidlerden 5F-PB-22 ve XLR-11' in 1000 mg L⁻¹ konsantrasyondaki stok çözeltileri metanolde hazırlandı ve yöntem bu stoklardan seyreltilmiş halde 200 mg L⁻¹ konsantrasyondaki sentetik kannabinoid çözeltilerine uygulandı. Yönteme her iki kannabinoidin de cevap verdiği görüldü. Bu bağlamda 5F-PB-22 ve XLR-11 maddelerinin tayininde çalışma grafiği (lineer kalibrasyon) oluşturmak üzere çalışmalar yapıldı. Ancak bu iki sentetik kannabinoidin stok çözeltileri hazırlanmasından bir sonraki gün kullanıldığında bir önceki günkü sonuçlar elde edilemedi. Yapılan araştırmalar sonucunda bu maddelerin metanol varlığında kararsız olduğu ve çözeltilerin çok hızlı bozulduğu görüldü. Bu sebeple maddelerinin tayininde yöntemde kullanılan çözücünün (metanol) yerine başka bir çözücü ya da çözücü karışımında işlem yapılması gerekliliği

ortaya çıktı. 5F-PB-22 ve XLR-11'in 1000 mg L⁻¹'lik stokları asetonitrilde hazırlanarak deneme tekrarlandı ancak bu durumda da reaktifin asetonitril fazlasında çökmesinden kaynaklanan bir sorun meydana geldi. Son olarak stok çözeltiler asetonitril:su (1:1) karışımında hazırlanarak çalışma grafikleri hazırlandı ve tekrarlayan sonuçlar elde edildi.

3.4.5.2. 5F-PB-22 için çalışma grafiğinin hazırlanması

Asetonitril:Su (1:1) karışımında hazırlanmış olan 1000 mg L⁻¹ 5F-PB-22 stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmış 25, 50, 100 ve 150 mg L⁻¹ standart çözeltilerin her birine yöntem ayrı ayrı uygulanmış ve çalışma grafiği hazırlanmıştır.

3.4.5.3. XLR-11 için çalışma grafiğinin hazırlanması

Asetonitril:Su (1:1) karışımında hazırlanmış olan 1000 mg L⁻¹ XLR-11 stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmış 100, 200, 300, 400 ve 500 mg L⁻¹ konsantrasyondaki standart çözeltilerin her birine yöntem ayrı ayrı uygulanmış ve çalışma grafiği hazırlanmıştır.

3.4.5.4. Sertifikalı Standart MAM-2201 Standartı Kullanılarak Metil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Hazırlanması

1000 mg L⁻¹ stok çözelti etanolde hazırlandı. Konsantrasyonları 62,5, 125, 250, 375, 500, 750 mg L⁻¹ olacak şekilde seyreltilerek hazırlanan çözeltilere yöntem şu şekilde uygulandı;

1 mL derişik H₂SO₄ + 1mL örnek karışımı beherde 3 dakika 180 °C'de ısıtılarak üzerine 1 mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB eklenerek metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. Mavi-mor renk elde edildi.

3.4.5.5. JWH-122 standardı için beherde yapılan çalışmalar

Sertifikalı standart madde olarak yurt dışından temini gerçekleştirilen JWH türlerinin çözeltileri metanolde çözünmemeleri sebebiyle etil alkolde hazırlanabilmiştir. Bu aşamadan sonra JWH örneklerinin çalışma grafikleri etil alkollü ortamda hazırlanan çözeltilerle yapılmıştır. Etanolde çözünmüş 125 mg L⁻¹ JWH-122 maddesine AM-2201 için geliştirilen yöntem uygulandığında ısıtma aşamasında 5 dakika içinde yanma meydana geldiği için optimum sonuç almak üzere yöntemin modifikasyonu yoluna gidilmiştir.

3.4.5.6. Çalışma Grafiğinin Oluşturulması için Yöntemin uygulanışı ve renk kararlılığının tespiti

1000 mg L⁻¹ stok çözelti etanolde hazırlandı. Bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 30, 62,5, 125, 200, 250, 300 mg L⁻¹ standart çözeltiler hazırlanmış ve yöntem aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

1 mL derişik H₂SO₄ + 1mL örnek karışımı 3 dakika 180 °C'ye ayarlanmış bir ısıtıcıda ısıtılarak (yanma olayına engel olmak üzere 5 dakika yerine 3 dakika ısıtma yapılmıştır) üzerine 1mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB eklenerek etanol ile 10 ml'ye tamamlandı. Mavi renk elde edildi. Oluşan rengin kararlılığını ortaya koymak üzere 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir ölçüm alacak şekilde spektrofotometrede 577 ve 635 nm'de okumalar yapılmıştır.

3.4.5.7. JWH-210 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması

1000 mg L⁻¹ stok çözelti metanolde hazırlandı. 10, 25, 50, 75, 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilere yöntem şu şekilde uygulandı;

1 mL derişik H₂SO₄ + 1 mL örnek karışımı 3 dakika 180 °C'de ısıtılarak üzerine 1 mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB eklenerek etil alkol ile 10 ml'ye tamamlandı. Mavi renk elde edildi. Çözeltilerin absorbansları spektrofotomterede 635 nm'de okundu.

3.4.5.8. JWH-018 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması

1000 mg L⁻¹ stok çözelti metanolde hazırlandı. 30, 62,5, 125, 150, 200, 250 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilere yöntem şu şekilde uygulandı;

1 mL derişik H₂SO₄ + 1mL örnek karışımı 3 dakika 180 °C'de ısıtılarak üzerine 1 mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB eklenerek etil alkol ile 10 ml'ye tamamlandı. Mavi renk elde edildi. Çözeltilerin absorbansları spektrofotomterede 635 nm'de okundu.

3.4.5.9. JWH-081 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması

1000 mg L⁻¹ stok çözelti etanolde hazırlandı. 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltilere yöntem şu şekilde uygulanmıştır;

1 mL derişik H_2SO_4 + 1 mL örnek karışımı 3 dakika $180\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ısıtılarak üzerine 1 mL 50 mg L^{-1} p-DMAB eklenerek etil alkol ile 10 ml'ye tamamlandı. Mavi renk elde edildi. Çözeltilerin absorbansları sepektrofotometrede okunarak çalışma grafiğı hazırlanmıştır.

3.4.5.10. AM-2201 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması

AM-2201 standart numunesinden 2000 mg L^{-1} stok çözeltisi etanolde hazırlandı. Bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 62,5, 125, 250, 375, 500, 600, 750 mg L^{-1} konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmış ve yöntem uygulanmıştır.

3.4.5.11. MAM-2201 Standardı İçin Etil Alkollü Ortamda Çalışma Grafiğinin Oluşturulması

MAM-2201 standart numunesinden 1000 mg L^{-1} stok çözeltisi etil alkolde hazırlandı. Bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak 62,5, 125, 200, 250, 300, 375 mg L^{-1} konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmış ve yöntem uygulanmıştır.

3.4.5.12. AM-2201 Tayininde Girişim (İnterferan) Etkisinin Etil Alkollü Ortamda İncelenmesi

Sentetik kannobinoidleri kamufle etmek amacıyla kullanılabilecek salisilik asit ve mannitolün yöntem etkileri deneysel olarak araştırılmıştır. Mannitol ve Salisilik asit stok çözeltileri 3000 mg L^{-1} olacak şekilde 1:1 etanol-su ortamında hazırlanmıştır. Mannitolün karışımdaki konsantrasyonu 1500 mg L^{-1} ve AM-2201'in ise 500 mg L^{-1} olacak şekilde 1:1 etanol-su içeren ortamda karışım hazırlanmıştır. Salisilik asidin karışımdaki konsantrasyonu 1200 mg L^{-1} ve AM-2201'in ise 600 mg L^{-1} olacak şekilde 1:1 etanol-su içeren ortamda karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlara ayrı ayrı yöntem uygulanmıştır.

3.4.6. Gerçek Örnek Analizi

İstanbul Emniyet Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarı'ndan temin edilen AM-2201 emdirilmiş bitki 0,3 g olacak şekilde bir beherde tartılmıştır. Üzerine 5 mL metanol eklenerek ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraktan 1 mL alınarak 1:4 oranında metanol ile seyreltilmiştir. Bu örnekten 1 mL alınarak yöntem uygulanmış fakat yöntemin son aşamasında örnek çok derişik olduğundan metanolla 10 mL yerine 50 mL' ye tamamlanmıştır.

3.5. HPLC İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çalışmada Shimadzu marka Prominence LC-20AT model HPLC kullanılmıştır. Cihazda kullanılmak üzere GL Science marka 5 µm partikül boyutlu 4,6 mm iç çapa sahip 150 mm uzunluğunda C8 kolon seçilmiştir. Kolon akışı 1 mL/dak. izokratik akış, kolon fırını 40 °C ve PDA dedektörü tarama aralığı 200-260 nm arası olarak ayarlanmıştır. Numuneler oto örnekleyici ile 10 µL yapılan enjeksiyon sonrası 12 dakika boyunca yürütülmüştür. Mobil faz olarak asetonitril:su (70:30) belirlenmiş ve referans maddelerden sıvı halde olanlardan farklı çözücüye sahip olanlar dışındaki numuneler asetonitril ile hazırlanmıştır. Sentetik kannabinoidler suda çözünmedikleri için seyreltme ve hazırlama aşamalarında mobil faz kullanımı tercih edilmemiştir.

3.6. LC-MS/MS İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çalışmada Shimadzu marka LCMS 8040 modeli kullanılmıştır. Cihazda kullanılmak üzere Restek marka 5 µm partikül boyutlu 2,1 mm iç çapa sahip 50 mm uzunluğunda Allure PFPP kolon seçilmiştir. Kolon akışı değişken gradient olarak ayarlanmış olup akış tablosu Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Kolon fırını 40 °C’ye ayarlanmış ve numuneler oto örnekleyici ile 1 µL yapılan enjeksiyon sonrası 17,5 dakika boyunca yürütülmüştür. Mobil faz olarak metanol (% 0,1 formik asit; v/v) ve su (% 0,1 formik asit; v/v) belirlenmiş ve referans maddelerden sıvı halde olanlardan farklı çözücüye sahip olanlar dışındaki numuneler metanol ile hazırlanmıştır. Sentetik kannabinoidler suda çözünmedikleri için seyreltme ve hazırlama aşamalarında mobil faz kullanımı tercih edilmemiştir.

Tablo 3.2: LC-MS/MS mobil faz akış verileri.

Dakika	Metanol (%)	Su (%)	Akış (mL/dak.)
0-10	90	10	0,5
10-15,5	10	90	1,0
15,5-17,5	90	10	0,5

3.7. GC-MS İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çalışmada Shimadzu marka GC-MS 2010 Plus modeli kullanılmıştır. Cihazda Restek marka 0,25µmx0,25mmx30m RTX 5ms kolon ve taşıyıcı gaz olarak He (1 mL/dak) kullanılmıştır. Analizler için kullanılan metod detayları Tablo 3.3’te, fırın programı Tablo 3.4’te gösterilmiştir. Numuneler oto örnekleyici ile ayrımlı modda (1:50) 1 µL

enjeksiyon yapılmıştır. Referans maddelerden sıvı halde olanlardan farklı çözücüye sahip olanlar dışındaki numuneler metanol ile hazırlanmıştır.

Tablo 3.3: GC-MS cihaz koşulları.

İnlet (°C)	260
İyon Kaynağı (°C)	230
Arayüz (°C)	280
Çarpışma Enerjisi (eV)	70
Tarama aralığı (amu)	35-550

Tablo 3.4: GC-MS fırın programı.

Oran (°C/dak)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dak)
-	55	2
10	100	1
20	300	13

4. BULGULAR

4.1. RENK TESTLERİ

4.1.1. 2,4-Dinitrofenilhidrazin testi

0,5 ml 50 mg L⁻¹ JWH-022 üzerine 1 ml dinitrofenil hidrazin (DNPH) reaktifi eklenmiştir. Çalışmada reaktif körü olarak 0,5 ml metanol üzerine 1 mL DNPH eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan çözeltiler 100 °C’de 5 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Hem referansta hem de örnekte çok açık sarı renk oluşmuştur. Spektrofotometrede absorbans ölçümü maksimum absorbansın gözlemlendiği 419 nm dalgaboyunda yapılmıştır.

Tablo 4.1: DNPH analiz yöntemi ile elde edilen absorbanslar.

Örnek konsantrasyonu (mg L ⁻¹)		A ₄₁₉ (15 dakika sonunda)	A ₄₁₉ (30 dakika sonunda)
25	1.örnek	0,634	0,681
	2.örnek	0,625	0,675
50	1.örnek	0,650	0,688
	2.örnek	0,644	0,691

Tablo 4.1 verilerine göre DNPH analiz yöntemi kullanılarak kantitatif tayin yapma imkanının olmadığına karar verilmiştir.

DNPH kullanılarak yapılan bir diğer denemede ise 1 mL stok JWH-022 çözeltisi üzerine 0,2 mL 0,01 M H₂SO₄ ile 2 mL DNPH eklenmiş ve 95 °C’de 10 dakika bekletilmiştir. Bu deneme sonucunda herhangi bir renk değişimi gözlemlenememiştir.

DNPH’in kullanıldığı bir başka denemede sentetik kannabinoid türü olan JWH-015 için deneme yapılmıştır. 0,1 mL 1000 mg L⁻¹ JWH-015 üzerine 0,25 mL DNPH ve 0,1 mL kloroform eklenmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbansı 444 nm’de (maksimum absorpsiyon dalgaboyu) ölçülmüş ve A₄₄₄=0,749 değeri elde edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin nicel analiz uygulamak için uygun olmadığına karar verilmiştir.

4.1.2. Seliwanoff Testi

1 mL 100 mg L⁻¹ JWH-022 örneğine 2 mL Seliwanoff reaktifi eklenmiş ve 100 °C'de 1 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. Test stok JWH-022 örneğine de uygulandığında 100 °C'de 10 dakika sonunda çok açık pembe renk gözlenmiştir.

4.1.3. Rothenfusser Testi

2 mL 100 mg L⁻¹ JWH-022 örneğine 2 mL Rothenfusser reaktifi eklenmiş ve 100 °C'de 10 dakika bekletme uygulanmıştır. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir.

4.1.4. Hidrazin sülfat Denemesi

1 mL 100 mg L⁻¹ JWH-022 örneğine 0,01 M 0,2 mL H₂SO₄ ve 2 mL hidrazin sülfat eklenerek 95 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. Bunun üzerine çözeltiye 1-2 damla 1 M H₂SO₄ eklenmiş ve bekleme süresi 24 saate çıkartılmış ancak yine renk değişimi görülememiştir.

4.1.5. Hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH.HCl) ile Deneme

0,1 mL 1000 mg L⁻¹ JWH-250 örneğine 0,25 mL NH₂OH.HCl ve 0,25 mL CH₃COOH/CH₃COONa tamponu (pH 4,5) eklenmiş; 70 °C'de 15 dakika bekletilmiş ancak renk gözlenememiştir. Çözelti soğutulmadan üzerine 0,2 mL CuCl₂ çözeltisi eklenmiş ve tekrar 70 °C'de 15 dakika bekletilmiştir. Bu aşamada renk değişimi olmamış ancak örneğin bulanıklaştığı görülmüştür.

4.1.6. Folin Yöntemi

0,1 mL 1000 mg L⁻¹ JWH-015 çözeltisi üzerine 0,9 mL metanol eklenmiş ve karışıma 2,5 mL Lowry C reaktifi katılarak 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra çözelti içerisine 1:3 seyreltilmiş 0,25 mL folin çözeltisi eklenerek 30 dakika daha beklenmiştir. Deney sonunda açık yeşil renk gözlenmiş ancak referans ile çok az renk tonu farkı olmuştur ve spektrofotometrede görünür alanda absorban gözlenmemiştir.

Yöntem, % 34' lük 1000 mg L⁻¹ AM-2201'in asetonitril ve metanoldeki çözeltilerine de uygulanmıştır. Ancak Lowry C katıldığı anda, reaktifin sulu çözelti olması ve AM-2201'in suda çözünmeyiş nedeniyle, çökme gözlenmiştir.

4.1.7. James Reaktifi

1 mL stok AM-2201 örneğine 0,1 mL James reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. Çözelti üzerine 0,2 mL H₂SO₄ eklenerek 5 dakika daha beklenmiş ancak değişim görülmemiştir. Test H₂SO₄ reaktiften önce eklenerek tekrarlanmış ancak sonuç değişmemiştir. Her iki deneme de H₂SO₄ yerine kromik asit kullanılarak tekrarlanmış ve yine aynı sonuçlar elde edilmiştir.

4.1.8. van URK reaktifi

1 mL stok AM-2201 örneğine 0,5 mL van URK reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. van URK reaktifi 1:3 oranında Salkowski reaktifi ile karıştırılarak test tekrarlanmış ancak sonuç değişmemiştir.

4.1.9. Ehrlich reaktifi

1 mL stok AM-2201 örneğine 0,5 mL Ehrlich reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. Örnekten alınan 0,1 mL çözelti İTK plakasına ekilmiş ve Ehrlich reaktifi eklenmeden önce 15 dakika 254 nm UV ışığı altında bekletilmiştir. İTK plakası üzerinde anlamlı renk değişimi gözlenmemiştir. UV altında bekletme yerine plaka 30 saniye boyunca asetik anhidrit buharına maruz bırakılmış ve reaktif spreyleneceği ancak sonuç değişmemiştir.

4.1.10. Wasicky reaktifi

1 mL stok AM-2201 örneğine 0,5 mL Wasicky reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Deneme sonucunda renk değişimi görülmemiştir. Çözelti üzerine devamında 1 mL Salkowski reaktifi eklenmiş ancak renk değişimi olmamıştır. Yine 1 mL stok AM -2201 çözeltisi üzerine 0,5 mL H₂O₂ eklenmiş, oda sıcaklığında 5 dakika beklendikten sonra 0,5 mL Wasicky reaktifi ile 5 dakika daha beklenmiştir. Renk değişimi gözlemlenmemesi üzerine karışıma 1 mL Salkowski reaktifi eklenmiş ancak renk değişimi olmamıştır.

4.1.11. p-dimetilaminobenzaldehid ile tayin

p-dimetilaminobenzaldehid maddesi ile hazırlanmış olan diğer reaktifler ile sonuç elde edilememiştir ancak genel olarak indol grubunu içeren maddeler için renklendirme

reaktifi olarak bu madde kullanıldığından hedef moleküller ile tepkime verebilmesi için katalizör kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Bu sebeple silika sülfirik asit karışımı katalizörlüğünde indol grubunun p-DMAB ile tepkime vermesi denenmiştir.

1 mL stok AM-2201 örneğine 100 mg SiO_2 ve 0,1 mL H_2SO_4 eklenmiş, çözelti 180°C de 2 dakika bekletildikten sonra üzerine 0,1 mL p-dimetilaminobenzaldehid çözeltisi eklenmiştir. Test sonucunda çözelti şarap kırmızısı renk almıştır.

Diğer sentetik kannabinoidler ile yapılan denemeler sonucunda indol grubuna 1 numaralı pozisyondan bağlı olan fonksiyonel grubun veya karboksil yapısının devamında yeralan farklı fonksiyonel grupların bir değişiklik yapmadığı anlaşılmıştır. Ancak bir diğer sentetik kannabinoid grubu olan indazol ana yapısına sahip maddeler bu teste cevap vermemektedir.

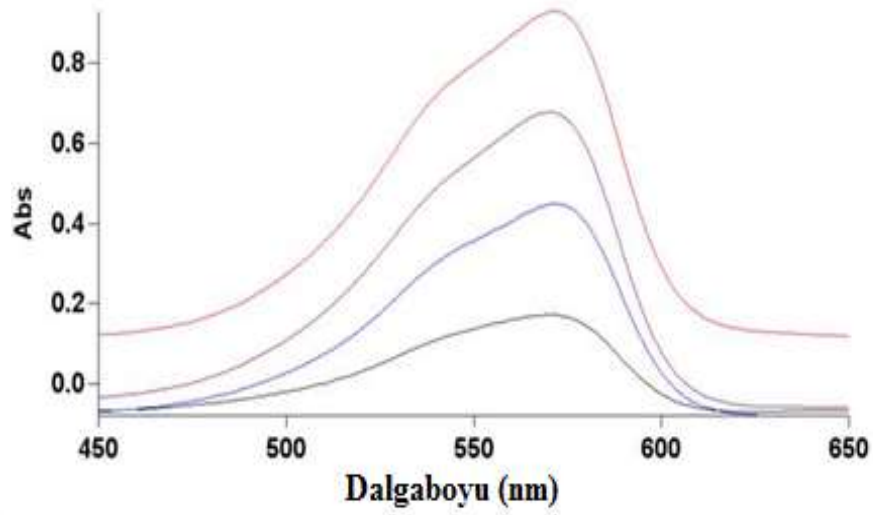
4.2. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM BULGULARI

Silika ve sülfirik asit karışımı katalizörlüğünde p-DMAB reaktifi kullanılarak geliştirilen yöntem üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, değişen deney koşullarında (işlem sırası, sıcaklık vb.) yapılan çalışmalar sonucu p-DMAB reaktifinin sentetik kannabinoid çözeltisinin SiO_2 ve derişik H_2SO_4 ile muamele edilmesiyle belli şartlar altında mor renk verdiği gözlenmiştir. Yöntem ile ilgili ayrıntılar ve kantitatif tayin sonuçları aşağıda sunulmuştur.

Yöntemin son aşamasında çözelti hacimlerinin 10 mL' ye tamamlanması ile çözeltiler 10 kat seyrelmektedir. Yöntem ilk olarak 100 mg L^{-1} AM-2201 çözeltisine uygulandığında spektrofotometrik analiz sonucu çözeltinin 572 nm dalgaboyunda maksimum absorbans verdiği görülmüştür (Son konsantrasyon 10 mg L^{-1}).

4.2.1. AM-2201 Tayininde Metil Alkollü Ortamda Beherde Geliştirilen Yöntemin Uygulanmasıyla Elde Edilen Sonuçlar

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak amacıyla 50, 100, 150 ve 200 mg L^{-1} AM-2201 standart çözeltileriyle çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1: 50-200 mg L⁻¹ konsantrasyon aralığında standart AM-2201 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.2: 50, 100, 150 ve 200 mg L⁻¹ konsantrasyonda ki AM-2201 standartları için 572 nm’de ölçülen absorbanslar.

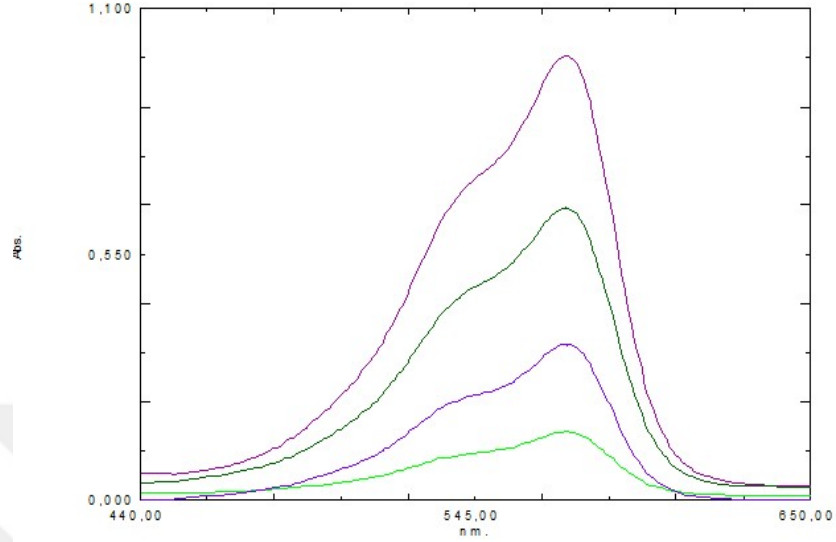
Son Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Absorbans (N=3)
5	0,172
10	0,449
15	0,678
20	0,931

Kalibrasyon doğru denklemi:

$$A_{572} = 5,01 \times 10^{-2} C - 6,90 \times 10^{-2} \quad (r=0,9993) \quad (C = \text{AM-2201 son konsantrasyonu (mg L}^{-1}\text{)})$$

AM-2201’nin molar absorplama katsayısı $\varepsilon = 1,62 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD= 1,25 mg L⁻¹ ve LOQ = 4,17 mg L⁻¹’dir.

4.2.2. 5F-PB-22 tayininde etil alkolü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.2: Son konsantrasyonu 2,5, 5 10 ve 15 mg L⁻¹ olan 5F-PB-22 standartlarına yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.3: 25, 50, 100 ve 150 mg L⁻¹ konsantrasyondaki standart 5F-PB-22 çözeltilerine yöntemin uygulandıktan sonra 572 nm’de ölçülen absorpsiyonlar.

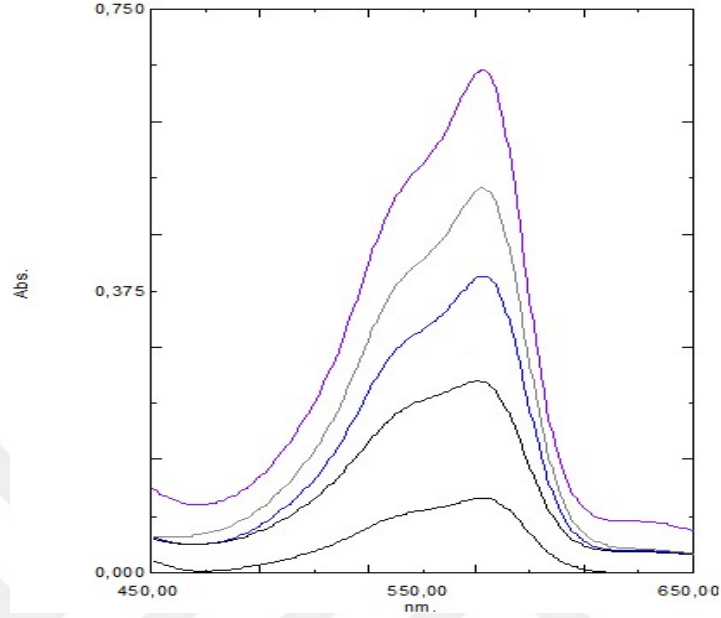
Son Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Absorbans (N=3)
2,5	0,152
5	0,347
10	0,654
15	0,995

Tablo 4.3’te görülen veriler kullanılarak elde edilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{572} = 6,65 \times 10^{-2} C - 3,10 \times 10^{-3} \quad (r=0,9993) \quad (C = 5F-PB-22 \text{ son konsantrasyonu (mg L}^{-1}\text{)})$$

5F-PB-22’nin molar absorplama katsayısı $\epsilon = 2,46 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD= 0,45 mg L⁻¹ ve LOQ = 1,5 mg L⁻¹’dir.

4.2.3. XLR-11 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.3: Son konsantrasyonu 10, 20, 30, 40 ve 50 mg L⁻¹ olan XLR-11 standartlarına yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.4: 100, 200, 300, 400 ve 500 mg L⁻¹ konsantrasyondaki standart XLR-11 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra 572 nm’de ölçülen absorbanslar.

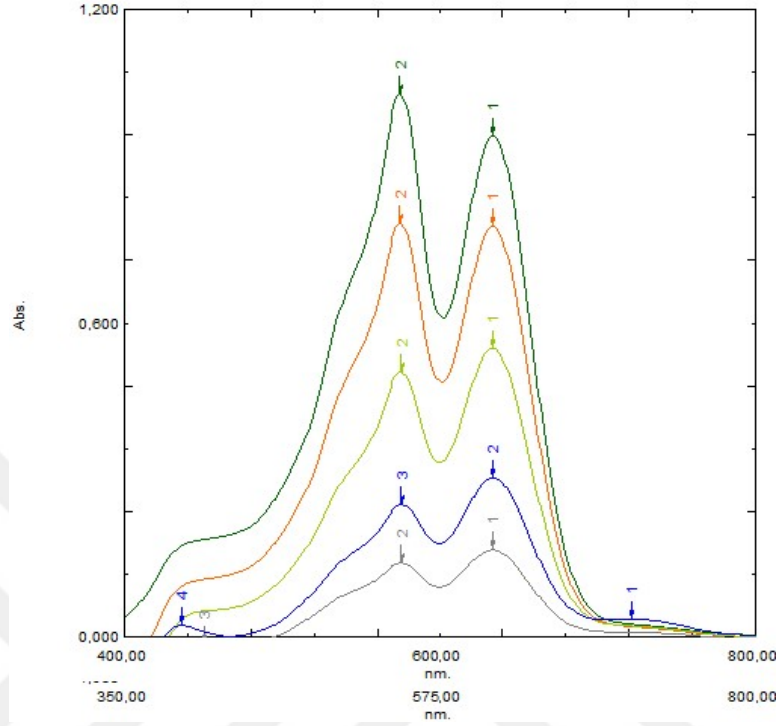
Son Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Absorbans (N=3)
10	0,099
20	0,254
30	0,395
40	0,511
50	0,669

Tablo 4.4’te görülen veriler kullanılarak elde edilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{572} = 1,40 \times 10^{-2} C - 3,35 \times 10^{-2} \quad (r=0,9988) \quad (C = \text{XLR-11 son konsantrasyonu (mg L}^{-1}\text{)})$$

XLR-11’in molar absorplama katsayısı $\varepsilon = 4,4 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 2,66 mg L⁻¹
LOQ = 8,85 mg L⁻¹’dir.

4.2.4. MAM-2201 sertifikalı standart maddesine metil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar



Şekil 4.4: 6,25, 12,5, 25, 37,5 ve 50 mg L⁻¹ son konsantrasyonda ki standart MAM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanması sonucu elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.5: Metil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart MAM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₆ (N=3)	Ortalama absorbans A ₆₃₄ (N=3)
6,25	0,143	0,166
12,5	0,267	0,314
25	0,496	0,538
37,5	0,799	0,742
50	1,026	0,956

576 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle yöntem uygulandıktan sonraki MAM-2201 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{576} = 2,05 \times 10^{-2} C + 9,3 \times 10^{-3} \quad r = 0,9989 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

MAM-2201'in molar absorplama katsayısı $\varepsilon=7,66 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD=0,95 mg L⁻¹ LOQ = 3,17 mg L⁻¹'dir.

634 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle yöntem uygulandıktan sonraki MAM-2201 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{634} = 1,78 \times 10^{-2} C + 7,73 \times 10^{-2} \quad r = 0,9986 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

MAM-2201'in molar absorplama katsayısı $\varepsilon= 7,13 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD= 1,78 mgL⁻¹ LOQ = 5,93 mg L⁻¹'dir.

4.2.5. JWH-122'nin beherde tayininde modifiye edilen yöntemin uygulanarak renk kararlılığının tespit edilmesinde bulunan sonuçlar

Tablo 4.6: Zamana göre farklı dalgaboylarında 15 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki JWH-122 için yöntemin uygulanışı sonrası elde edilen absorbans değerleri.

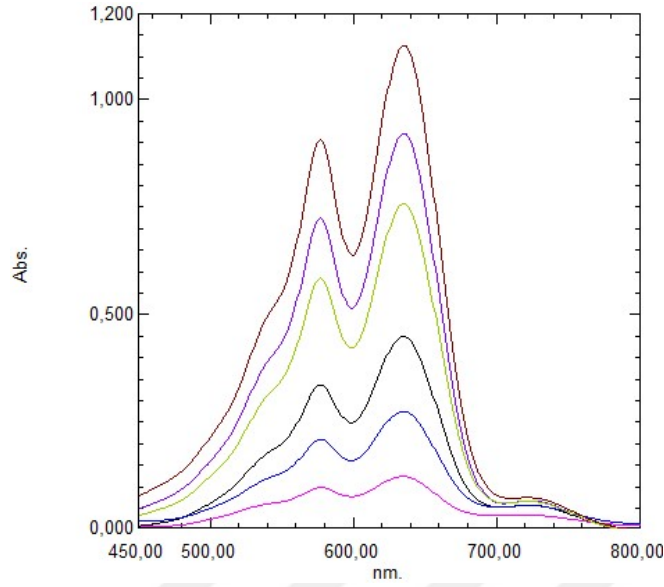
t(dk)	A₁	λ₁ (nm)	A₂	λ₂ (nm)
0	0,472	631	0,503	572
5	0,469	632	0,494	571
10	0,470	631	0,495	573
20	0,471	632	0,496	574
30	0,440	633	0,461	572

4.2.6. JWH-122 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar

Yöntem uygulandıktan sonra 577 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-122 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{577} = 2,82 \times 10^{-2} C + 1,31 \times 10^{-2} \quad r = 0,9992 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

JWH-122'nin molar absorplama katsayısı $\varepsilon=1,03 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,64 mg L⁻¹ LOQ = 2,14 mg L⁻¹'dir.



Şekil 4.5: 3, 6,25, 12,5, 20, 25, 30 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-122 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.7: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-122 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

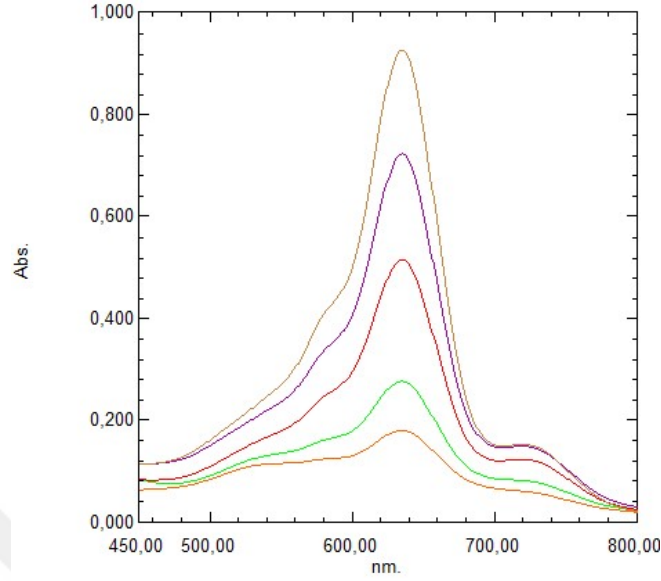
Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₇ (N=3)	Ortalama absorbans A ₆₃₅ (N=3)
3	0,095	0,122
6,25	0,206	0,271
12,5	0,35	0,467
20	0,578	0,752
25	0,711	0,907
30	0,870	1,091

Yöntem uygulandıktan sonra 635 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-122 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{635} = 3,54 \times 10^{-2} C + 3,14 \times 10^{-2} \quad r = 0,9994 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

JWH-122'nin molar absorplama katsayısı $\varepsilon = 1,33 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,53 mg L⁻¹ LOQ = 1,77 mg L⁻¹'dir.

4.2.7. JWH-210 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.6: 1, 2,5, 5, 7,5, 10 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-210 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.8: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-210 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

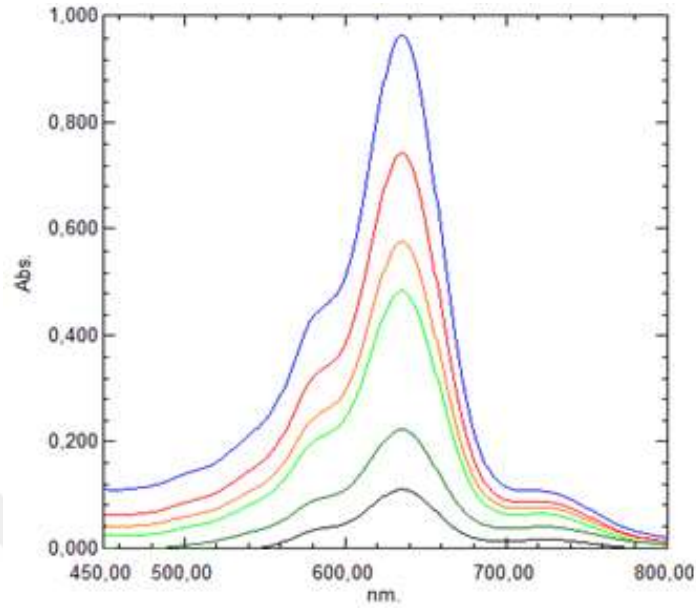
Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₆₃₅ (N=3)
1	0,171
2,5	0,282
5	0,512
7,5	0,739
10	0,939

Yöntem uygulandıktan sonra 635 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-210 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{635} = 8,68 \times 10^{-2} C + 7,74 \times 10^{-2} \quad r = 0,9995 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

JWH-210'un molar absorplama katsayısı $\epsilon = 3,79 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,14 mg L⁻¹ LOQ = 0,47 mg L⁻¹'dir.

4.2.8. JWH-018 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.7: 3, 6,25, 12,5, 15, 20, 25 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-018 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.9: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-018 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

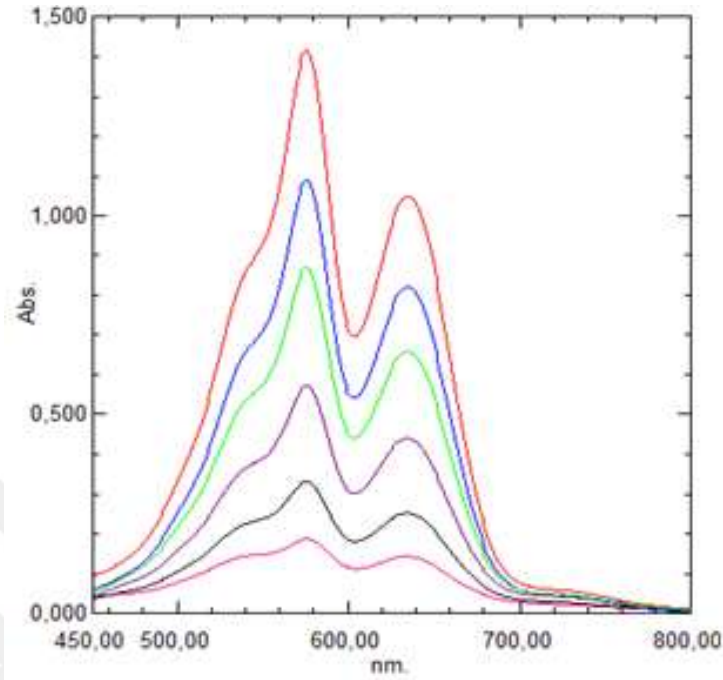
Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₆₃₅ (N=3)
3	0,106
6,25	0,231
12,5	0,486
15	0,572
20	0,748
25	0,968

Yöntem uygulandıktan sonra 635 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-018 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{635} = 3,81 \times 10^{-2} C - 3,7 \times 10^{-3} \quad r = 0,9993 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

JWH-018'in molar absorplama katsayısı $\epsilon = 1,3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,68 mg L⁻¹ LOQ = 2,27 mg L⁻¹'dir.

4.2.9. JWH-081 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.8: 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart JWH-081 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.10: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart JWH-081 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₅ (N=3)	Ortalama absorbans A ₆₃₅ (N=3)
2,5	0,187	0,139
5	0,349	0,258
10	0,633	0,460
15	0,892	0,686
20	1,143	0,906
25	1,431	1,075

Yöntem uygulandıktan sonra 575 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-081 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{575} = 5,44 \times 10^{-2} C + 6,96 \times 10^{-2} \quad r = 0,9995 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

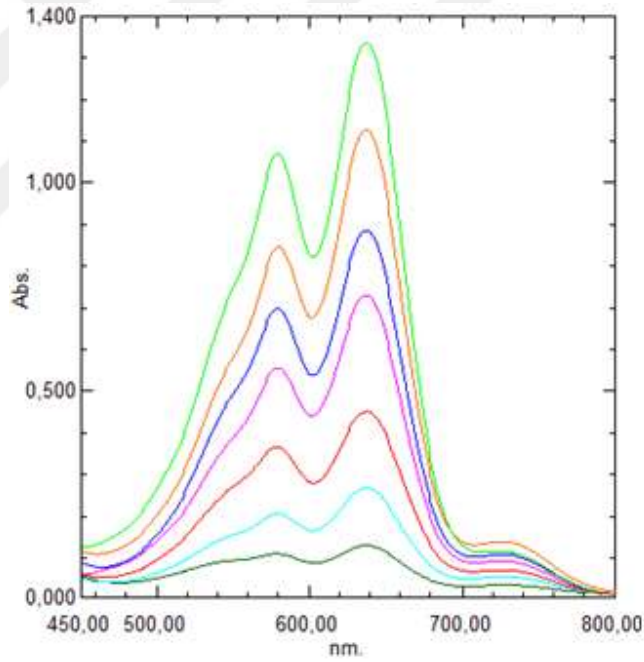
JWH-081'in molar absorplama katsayısı $\varepsilon=2,21 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,72 mg L⁻¹ LOQ = 2,4 mg L⁻¹'dir.

Yöntem uygulandıktan sonra 635 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle JWH-081 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{635} = 4,21 \times 10^{-2} C + 4,36 \times 10^{-2} \quad r = 0,9991 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

JWH-081'in molar absorplama katsayısı $\varepsilon=1,71 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 0,62 mg L⁻¹ LOQ = 2,07 mg L⁻¹'dir.

4.2.10. AM-2201 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar



Şekil 4.9: 6,25, 12,5, 25, 37,5, 50, 60, 75 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart AM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.11: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart AM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₉ (N=3)
6,25	0,12
12,5	0,217
25	0,363
37,5	0,527
50	0,679
60	0,826
75	1,021

Yöntem uygulandıktan sonra 579 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle AM-2201 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{579} = 1,30 \times 10^{-2} C + 4,25 \times 10^{-2} \quad r = 0,9997 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

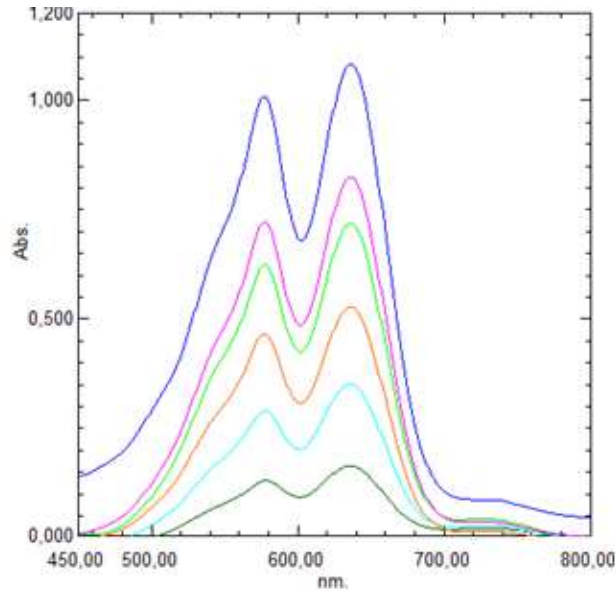
AM-2201'in molar absorplama katsayısı $\epsilon = 4,95 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 1,56 mg L⁻¹ LOQ = 5,2 mg L⁻¹'dir.

4.2.11. MAM-2201 tayininde etil alkollü ortamda çalışma grafiğinin oluşturulması için yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar

Yöntem uygulandıktan sonra 578 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle MAM-2201 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{575} = 2,49 \times 10^{-2} C - 3,30 \times 10^{-2} \quad r = 0,9991 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

MAM-2201'in molar absorplama katsayısı $\epsilon = 8,6 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 1,47 mg L⁻¹ LOQ = 4,9 mg L⁻¹'dir.



Şekil 4.10: 6,25, 12,5, 20, 25, 30, 37,5 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart MAM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.12: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntemin standart MAM-2201 çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen absorbanslar.

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₈ (N=3)	Ortalama absorbans A ₆₃₆ (N=3)
6,25	0,120	0,154
12,5	0,294	0,367
20	0,461	0,555
25	0,577	0,705
30	0,731	0,833
37,5	0,899	1,034

Yöntem uygulandıktan sonra 635 nm dalga boyunda elde edilen ortalama absorbans değerleriyle MAM-2201 son konsantrasyonları arasında çizilen çalışma grafiğinin denklemi:

$$A_{635} = 2,78 \times 10^{-2} C - 0,07 \times 10^{-2} \quad r = 0,9990 \quad C: \text{mg L}^{-1} \text{ cinsinden son konsantrasyon}$$

MAM-2201'in molar absorplama katsayısı $\epsilon = 1,04 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, LOD = 1,15 mgL⁻¹ LOQ = 3,83 mg L⁻¹'dir.

4.2.12. Yönteme Girişim Yapıcı Maddelerin Etkileri

Kısım 3.4.5.12’de tanımlandığı gibi AM-2201 tayininde mannitol ve salisilik asit etkisi incelendiğinde Tablo 4.13’te verilen geri kazanımlar elde edilmiştir.

Tablo 4.13: Etil alkollü ortamda beherde geliştirilen yöntem ile AM-2201 tayinine mannitol ve salisilik asit etkisi.

Madde Karışımı (bileşenlerin son konsantrasyonları, mg L ⁻¹)	Kütle Oranı	% Geri Kazanım
50 mg L ⁻¹ AM-2201+ 150 mg L ⁻¹ Mannitol	1:3	98
60 mg L ⁻¹ AM-2201+ 120 mg L ⁻¹ Salisilik Asit	1:2	114

4.2.13. Mikrodalga Ölçme Test Cihazı Kullanılarak Yapılan Spektrofotometrik Çalışmalar

4.2.13.1. H₂SO₄ hacim optimizasyonu

1000 mg L⁻¹ AM-2201 ile H₂SO₄ optimizasyonu yapıldı.

20 mg SiO₂ + V mL d. H₂SO₄ + 0,25 mL AM-2201 + 0,25 mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB

Sıcaklık: 130 °C ve süre: 2 dakika

Son hacim balon jode MeOH ile 10 mL’ye tamamlandı.

Uygun derişik H₂SO₄ hacmi 0,4 mL olarak belirlendi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: H₂SO₄ hacim optimizasyonu.

V (mL) d. H ₂ SO ₄	Absorbans	$\lambda_{\max}$ (nm)
0,1	0,258	571
0,2	0,846	570
0,3	0,801	572
0,4	0,949	571
0,5	0,760	572

4.2.13.2. Sıcaklık Optimizasyonu

Tablo 4.15: Sıcaklık optimizasyonu.

T (°C)	Absorbans	$\lambda_{\max}$ (nm)
130	0,836	572
140	0,794	571
150	0,624	561

4.2.13.3. Reaktif Hacim Optimizasyonu

20 mg SiO₂ + 0.4 mL d. H₂SO₄ + 0,25 mL 1000 mg L⁻¹ AM-2201 + V mL 50 mg L⁻¹ p-DMAB Sıcaklık: 130 °C ve süre: 2 dakika

Son hacim balon jodede MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı.

Uygun p-DMAB hacmi 0,25 mL olarak belirlendi.

Tablo 4.16: Reaktif hacmi optimizasyonu.

V mL p-DMAB	Absorbans	$\lambda_{\max}$ (nm)
0,1	1,030	573
0,25	1,104	572
0,3	0,884	572
0,4	0,838	570
0,5	0,453	572

Daha önceki çalışmalarda p-DMAB hacmi 0,25 mL olarak alınmıştı ve 573 nm' de 0,838; 572 nm' de 1,104 ve 571 nm' de 0,949 absorbans sonuçları elde edilmişti. Bu nedenle uygun p-DMAB hacmi 0,25 mL olarak belirlenmiştir.

4.2.13.4. Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu

Tablo 4.17: Reaktif konsantrasyonu optimizasyonu.

p-DMAB konsantrasyonu (mg L ⁻¹)	Absorbans	$\lambda_{\max}$ (nm)
5	0,505	571
10	1,043	573
20	0,913	573
30	0,798	573
40	0,823	573

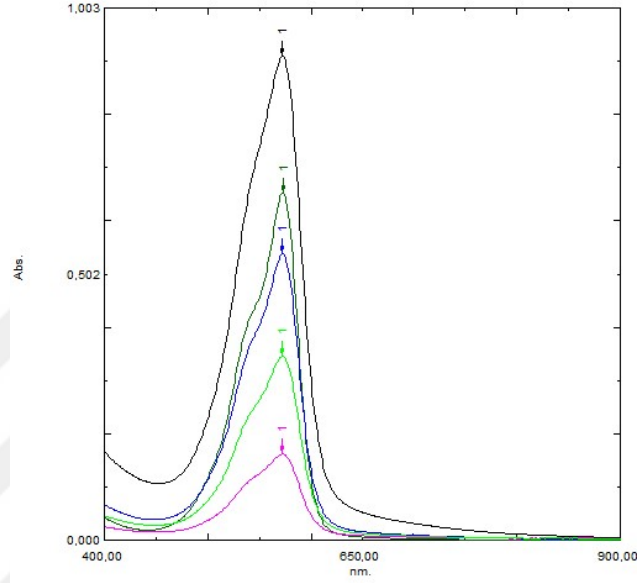
20 mg SiO₂ + 0,4 mL d. H₂SO₄ + 0,25 mL 1000 mg L⁻¹ AM-2201 + 0,25 mL C mg L⁻¹ p-DMAB

Sıcaklık: 130 °C ve süre: 2 dakika

Son hacim balon jojede MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı.

Uygun p-DMAB konsantrasyonu 10 mg L⁻¹ olarak belirlendi.

4.2.13.5. AM-2201 için çalışma grafiğinin oluşturulması



Şekil 4.11: 5, 10, 15, 20 ve 25 mg L⁻¹ son konsantrasyondaki standart AM-2201 çözeltilerine yöntem uygulandıktan sonra elde edilen spektrumlar.

Tablo 4.18: 5-25 mg L⁻¹ aralığında standart AM-2201 çözeltilerine yöntemin uygulanması ile elde edilen absorbanslar.

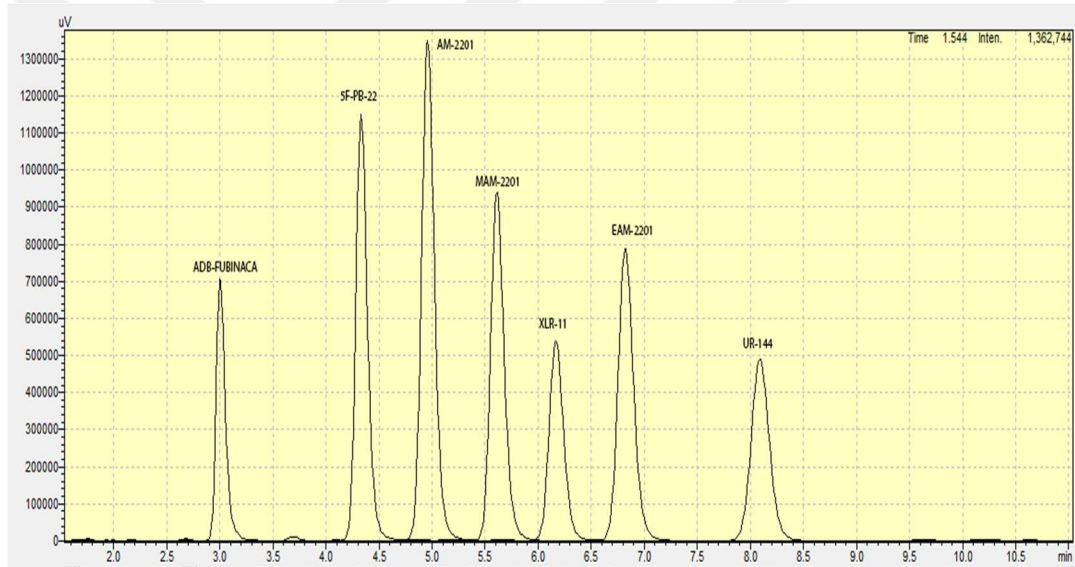
Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama absorbans A ₅₇₃ (N=3)
5	0,140
10	0,345
15	0,542
20	0,682
25	0,956

Belirlenen koşullarda AM-2201 çalışma grafiği oluşturmak üzere farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerin, 573 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değerleri Tablo 4.18'de görülmektedir.

5-25 mg L⁻¹ aralığında AM-2201 örneklerine yöntem uygulandığında elde edilen çalışma grafiği: $A_{573} = 3,94 \times 10^{-2} C - 5,74 \times 10^{-2}$ $r = 0,9957$ (C: mg L⁻¹ cisinden AM-2201 son konsantrasyonu)

4.3. HPLC KALİBRASYON EĞRİLERİ VE PDA TARAMALARI

HPLC analizlerinde kullanılan izokratik akış ilgili maddelerin ayırımında C8 kolon ile başarılı olmuş ve analiz süresini kısa tutmaya olanak sağlamıştır. Her ne kadar saha numuneleri için su ile daha iyi çözünen bileşenlerin kolondan temizlenmesi amacıyla değişken akış uygulanabilirse de uygulama kolaylığı açısından tercih edilmemiştir. Zira numune hazırlanma adımlarında sulu karışımlar kullanılmamış ve suda çözünürlüğü fazla olan maddeler örnek çözeltisi içerisine alınmamıştır.



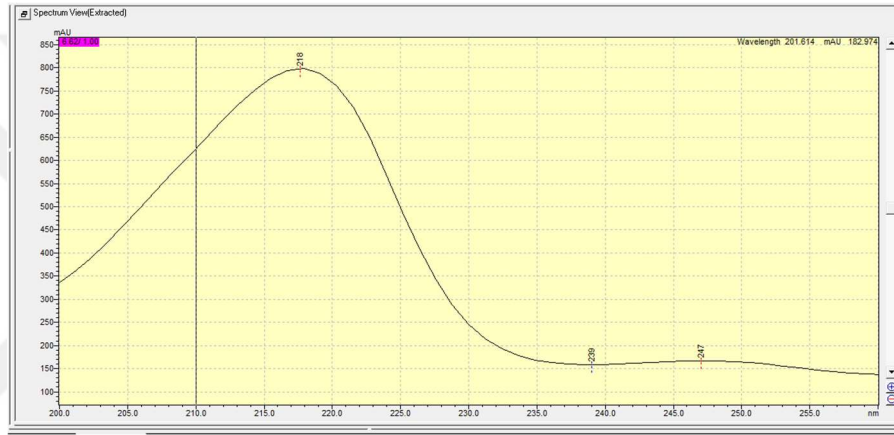
Şekil 4.12: HPLC metodu ile incelenen sentetik kannabinoidlerin kromatogramı (her bir madde 100 mg L⁻¹).

İncelemesi yapılan ve çalışma grafiği oluşturulan maddeler aşağıda sıralanmış olup kalibrasyon grafikleri ve PDA dedektörü ile elde edilen spektrumları izleyen şekillerde gösterilmiştir.

4.4.1. JWH-018'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.19: JWH-018 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
4	377397	3791,014	1,005
8	742858	3143,486	0,423
16	1476148	2831,542	0,192
40	3666042	17412,73	0,475
80	7266964	14003,63	0,193



Şekil 4.13: JWH-018 PDA spektrumu.

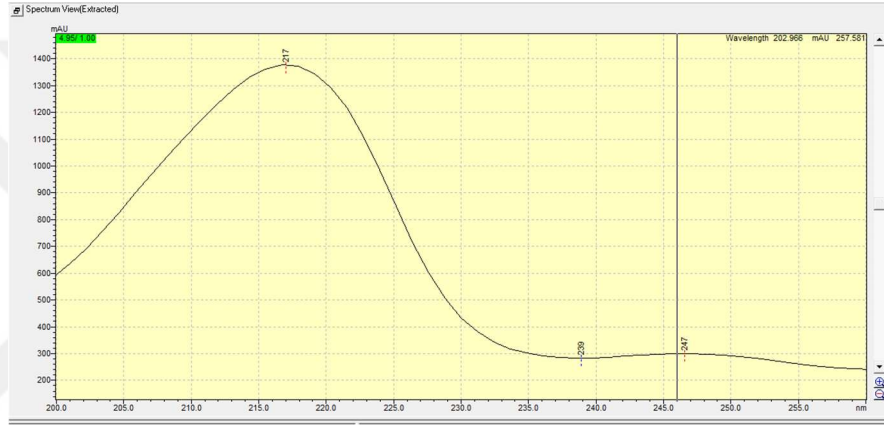
4, 8, 16, 40 ve 80 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart JWH-018 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 216 nm'de en yüksek absorban görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $9,07 \times 10^4 \times C + 2,22 \times 10^4$ $r=1,00$ 'dir (C= mg L⁻¹ cinsinden JWH-018 konsantrasyonu).

4.4.2. AM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.20: AM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
12,5	254105	896,3452	0,352
25	652575	597,5489	0,092
50	1270758	1237,661	0,097
100	2544354	2914,552	0,115



Şekil 4.14: AM-2201 PDA spektrumu.

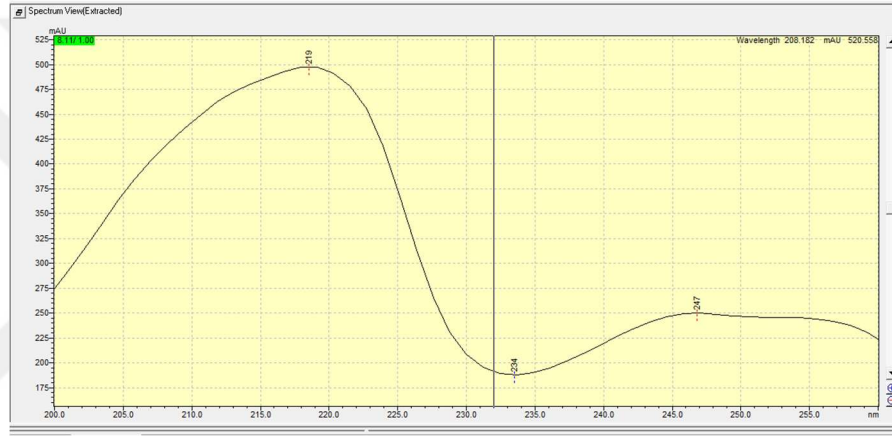
12,5, 25, 50 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart AM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 217 nm'de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $2,59 \times 10^4 \times C - 3,13 \times 10^4$ şeklinde $r = 0,9995$ 'tir. (C= mg L⁻¹ cinsinden AM-2201 konsantrasyonu).

4.4.3. UR-144'ün HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.21: UR-144 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
5	123092	327,623	0,266
10	246590	150,121	0,061
25	617099	146,417	0,024
50	1238697	555,267	0,045
100	2446220	862,353	0,035



Şekil 4.15: UR-144 PDA spektrumu.

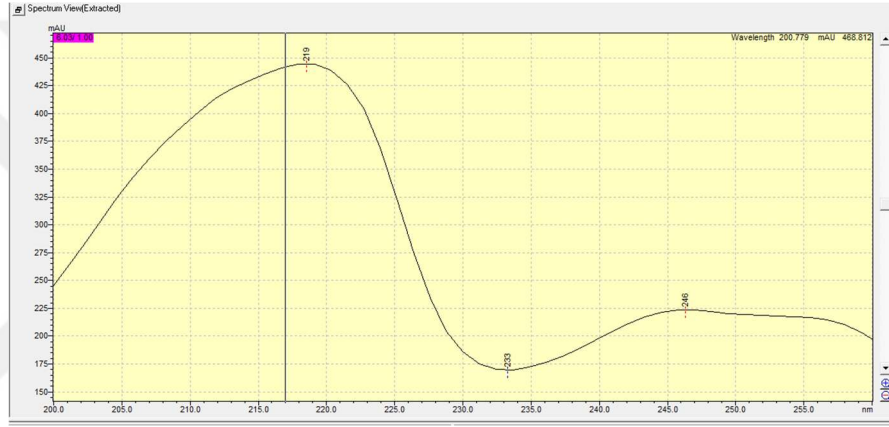
5, 10, 25, 50 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart UR-144 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 219 nm’de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik Alanı = $2,45 \times 10^4 \times C + 4,56 \times 10^3$ $r = 1,00$ ’dir. (C= mg L⁻¹ cinsinden UR-144 konsantrasyonu).

4.4.4. XLR-11'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.22: XLR-11 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.c

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
5	210157	94,503	0,045
10	543277	204,780	0,038
20	1022740	282,835	0,028
40	2070075	3251,694	0,157
100	5216810	4960,205	0,095



Şekil 4.16: XLR-11 PDA spektrumu.

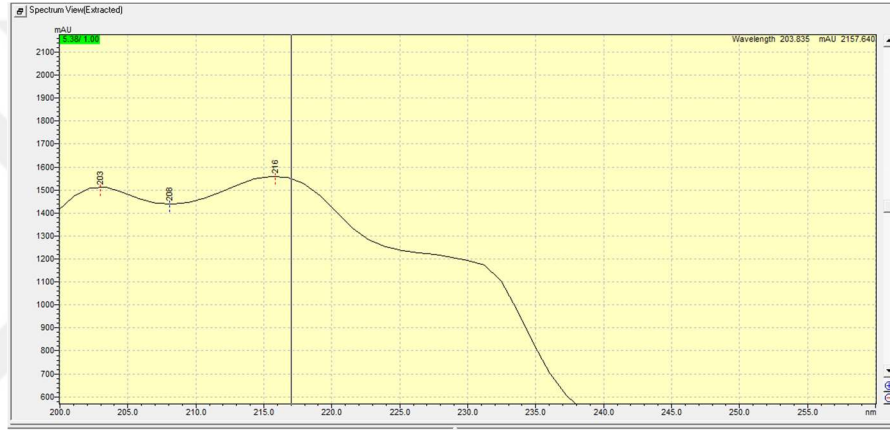
5, 10, 20, 40 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart XLR-11 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 219 nm’de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $5,24 \times 10^4 \times C - 2,03 \times 10^4$ $r = 0,9999$ ’dur. (C= mg L⁻¹ cinsinden XLR-11 konsantrasyonu).

4.4.5. PB-22'nin HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.23: PB-22 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
5	756035	639,99	0,085
10	1360388	1462,151	0,108
20	3075448	719,266	0,023
50	7628721	3154,574	0,041
100	13927693	2582,896	0,019



Şekil 4.17: PB-22 PDA spektrumu.

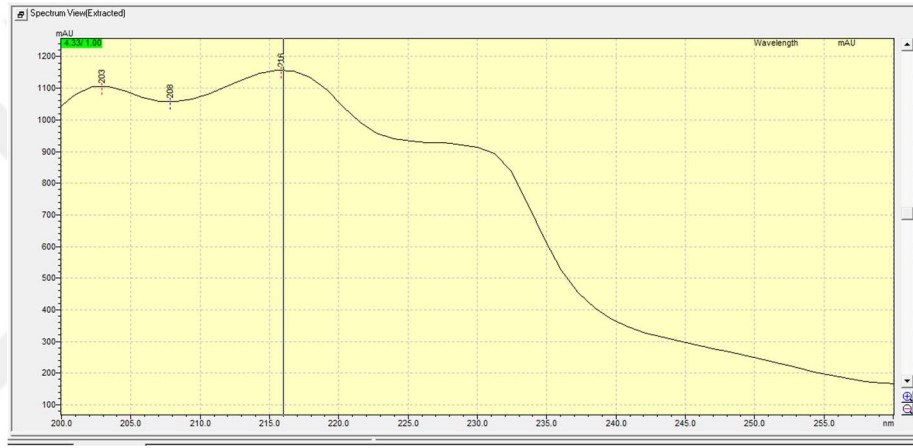
5, 10, 20, 50 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart PB-22 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 216 nm’de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $1,40 \times 10^5 \times C + 1,80 \times 10^5$ şeklinde olup $r = 0,9986$ ’dır. (C= mg L⁻¹ cinsinden PB-22 konsantrasyonu).

4.4.6. 5F-PB-22'nin HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.24: 5F-PB-22 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
5	475960	263,619	0,055
10	909511	1583,751	0,174
20	1809729	2137,513	0,118
50	4567852	2085,290	0,046
100	9010537	14560,06	0,162



Şekil 4.18: 5F-PB-22 PDA spektrumu.

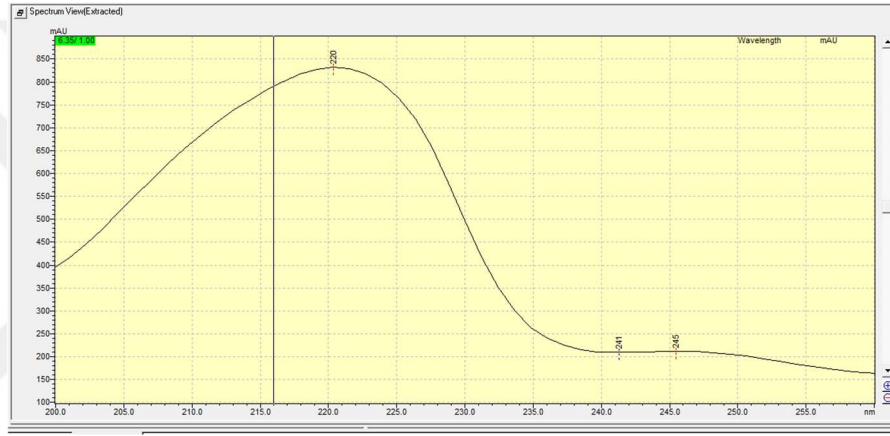
5, 10, 20, 50 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart 5F-PB-22 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 216 nm'de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $9,01 \times 10^4 \times C + 2,30 \times 10^4$ $r = 1,00$ 'dir. (C= mg L⁻¹ cinsinden 5F-PB-22 konsantrasyonu).

4.4.7. EAM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.25: EAM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
4,9	411321	38699,55	9,4
9,8	823477	36191,81	4,4
19,6	2010737	45613,02	2,27
49	4223182	422303,6	9,99
98	8554269	731110,7	8,54



Şekil 4.19: EAM-2201 PDA spektrumu.

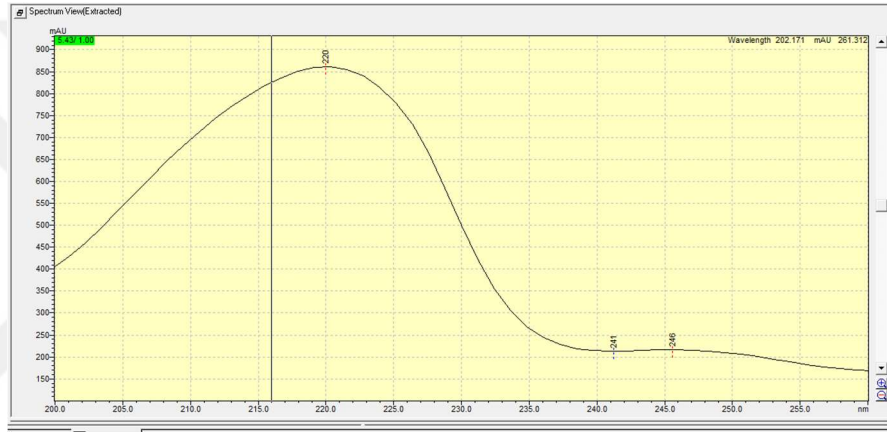
4,9, 9,8, 19,6, 49 ve 98 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart EAM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 220 nm'de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $8,66 \times 10^4 \times C + 6,60 \times 10^4$ $r = 0,999$ 'dur. (C= mg L⁻¹ cinsinden EAM-2201 konsantrasyonu).

4.4.8. MAM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.26: MAM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağlı Standart Sapma
4,9	424560	28933,56	6,81
9,8	848589	54503,99	6,42
19,6	1739920	38242,46	2,20
49	4375561	264649,1	6,05
98	8193091	674974,2	8,24



Şekil 4.20: MAM-2201 PDA spektrumu.

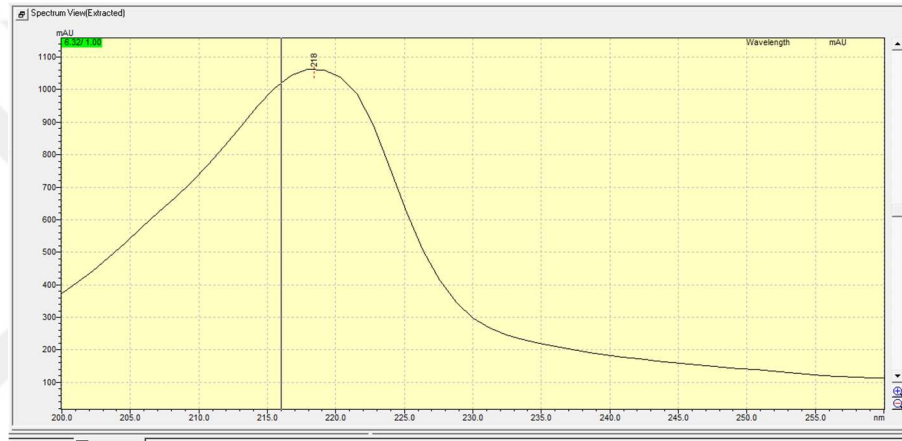
4,9, 9,8, 19,6, 49 ve 98 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart MAM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 220 nm'de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $8,37 \times 10^4 \times C + 8,11 \times 10^4$ $r = 0,9994$ 'tür. (C= mg L⁻¹ cinsinden MAM-2201 konsantrasyonu).

4.4.9. NM-2201'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.27: NM-2201 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
4,5	508613	23461,30	4,61
9,0	1030867	49195,65	4,77
18	2038687	130154,5	6,38
45	4975614	392071,6	7,87
90	9613306	873189,6	9,08



Şekil 4.21: NM-2201 PDA spektrumu.

4,5, 9, 18, 45 ve 90 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart NM-2201 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 218 nm’de en yüksek absorbands görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $1,06 \times 10^5 \times C + 9,18 \times 10^4$ $r = 0,9998$ ’dir. (C= mg L⁻¹ cinsinden NM-2201 konsantrasyonu).

4.4.10. AKB-48'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.28: AKB-48 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağlı Standart Sapma
5	356650	1032,378	0,289
10	701741	925,339	0,131
25	1719886	5198,365	0,302
50	3441292	2844,282	0,083
100	6851435	1852,025	0,027



Şekil 4.22: AKB-48 PDA spektrumu.

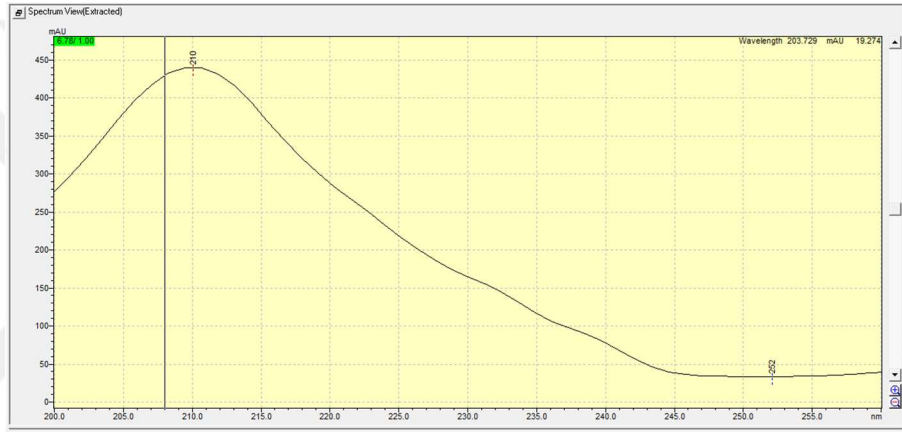
5, 10, 25, 50 ve 100 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart AKB-48 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 210 nm'de en yüksek absorban gözlemlenmiş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $6,84 \times 10^4 \times C + 1,59 \times 10^4$ $r = 1,00$ 'dir. (C= mg L⁻¹ cinsinden AKB-48 konsantrasyonu).

4.4.1. 5F-AKB-48'in HPLC yöntemi ile tayin sonuçları

Tablo 4.29: 5F-AKB-48 için HPLC yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Pik Alanı (N=3)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
4,75	230355	6457,725	2,80
9,5	602279	57519,28	9,55
19	936182	62084,08	6,63
47,5	2204171	99194,24	4,50
95	4711124	61770,32	1,31



Şekil 4.23: 5F-AKB-48 PDA spektrumu.

4,75, 9,5, 19, 47,5 ve 95 mg L⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan standart 5F-AKB-48 çözeltilerine yöntem uygulanmış ve çalışma grafiği oluşturulmuştur. PDA spektrumunda 210 nm'de en yüksek absorbans görülmüş olup kalibrasyon eğrisi bu dalga boyunda alınan kromatograma göre pik altında kalan alan kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğru denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Pik alanı = $4,87 \times 10^4 \times C + 2,51 \times 10^4$ $r = 0,9986$ 'dır. (C= mg L⁻¹ cinsinden 5F-AKB-48 konsantrasyonu).

4.5. LC-MS/MS ANALİZLERİ

LC-MS/MS analizlerinde kullanılan değişken akış programı ile incelenen maddelerin kolondan öncelikli olarak çıkması ve daha sonra suda çözünürlüğü fazla olan maddelerin kolondan temizlenmesi hedeflenmiştir. Akış programının bir diğer amacı ise her ne kadar ayırım daha çok ana iyon ve referans iyon kütlelerine bağlı olsa da aşağıda Tablo 4.24'te

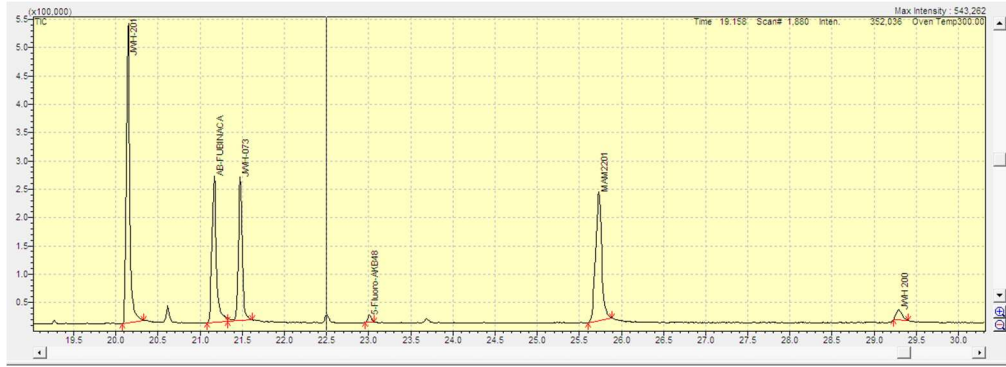
verilen MS/MS detektörünün analizi yapılan maddeler için tarama koşullarından da görülebileceği gibi bazı maddeler için bu iki iyon seçimi yakın olmaktadır. Bu durumda seçilecek olan farklı ana iyon/referans iyon değerleri hassasiyet problemi doğuracağı için kromatografik ayırım daha iyi bir çözüm yolu olarak benimsenmiştir.

Tablo 4.30: MS/MS tarama koşulları.

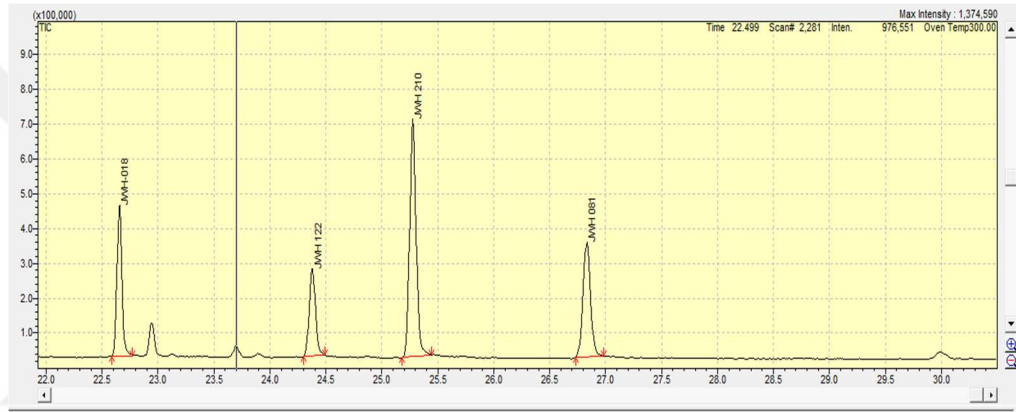
	Adı	m/z(1)	m/z(2)	Alıkonma (dak)	Ref.(1) m/z(1)	Ref.(1) m/z(2)	Hedef Çarpışma Enerjisi(eV)	Ref.(1) Çarpışma Enerjisi(eV)
1	JWH 018	342,2	155,2	7,615	342,2	127,3	-27	-38
2	JWH 015	328,2	127,2	6,956	328,2	155,2	-47	-25
3	JWH 022	340,2	127,2	7,475	340,2	155,2	-44	-24
4	JWH 073	328,2	127,2	6,96	328,2	155,3	-39	-22
5	JWH 200	385,4	155,2	6,816	385,4	114,3	-22	-26
6	JWH 203	340,9	125,2	7,425	340,9	188,3	-27	-19
7	JWH 250	336,4	121,2	7,149	336,4	91,2	-19	-43
8	AM 2201	360,2	232,2	7,125	360,2	155,2	-24	-24
9	RCS-4	322,2	135,2	7,051	322,2	77,2	-21	-53

4.6. GC-MS ANALİZLERİ VE KÜTLE SPEKTRUMLARI

Adli bilim laboratuvarların en yaygın kullanılan sistem olarak GC-MS sağladığı ayırma gücü, çalışma kararlılığı ve mevcut kütle spektrumu kütüphaneleri açısından çok zengin olması nedeniyle tercih edilmektedir. 70 eV elektron bombardımanına göre düzenlenmiş olan veri tabanları maddelerin tanımlanması ve yakın alıkonma zamanına sahip olsalar dahi birbirlerinden ayır edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca çalışmada kullanılan diğer ayırma yöntemlerine nazaran tanımlama yapmak için çoğu zaman referans maddeye ihtiyaç duyulmamaktadır.

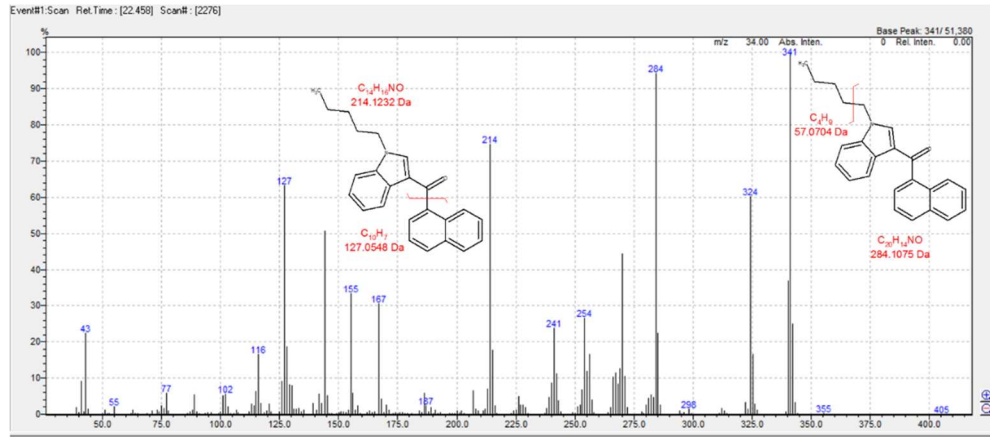


Şekil 4.24: JWH-201, AB-FUBINACA, JWH-073, 5F-AKB-48, MAM-2201, JWH-200 karışımı GC-MS kromatogramı.

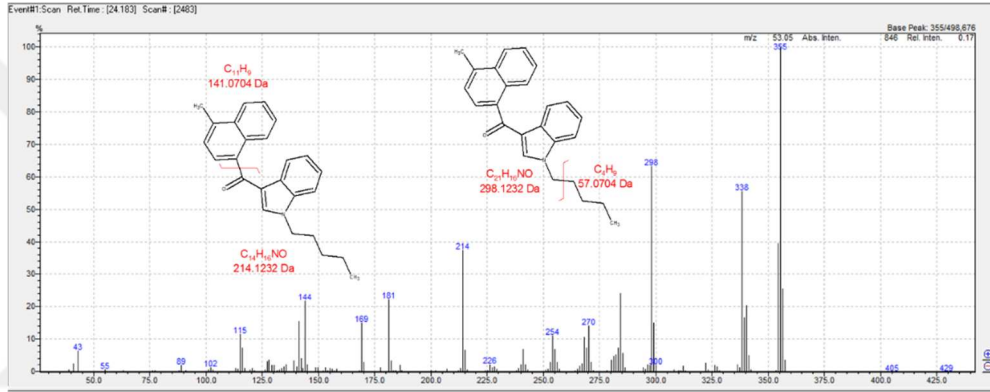


Şekil 4.25: JWH-018, JWH-122, JWH-210 ve JWH-081 karışımı GC-MS kromatogramı.

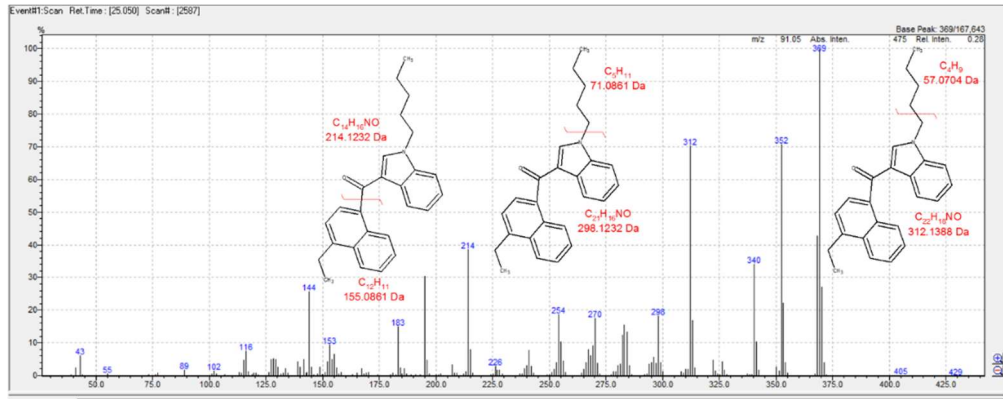
GC-MS cihazı için kullanılan sıcaklık programı saha numuneleri de dikkate alınarak genel bir tarama yapacak kapasitede ayarlanmıştır. Cihaz parametrelerinde ki sıcaklık değerleri ise genel olarak ısıya karşı kararlı bir yapıya sahip sentetik kannabinoidlerin analizlerinde problem yaratmamıştır. Bu konuda tek istisna PB-22 maddesinin inlet sıcaklığının 250 °C üzerinde ve ayrıca numune hazırlama aşamasında metil alkol veya etil alkol ile çözülmesi halinde ısıl bozunmaya uğramasıdır[65]. Ancak PB-22 kromatogramlarında ortaya çıkan bu bozunma ürünleri dikkate alınarak nitel analizler için yöntemde herhangi bir değişikliğe gidilmemiştir. Aşağıda incelemesi yapılan sentetik kannabinoidler ve bunların ana parçalanma yolları gösterilmiştir.



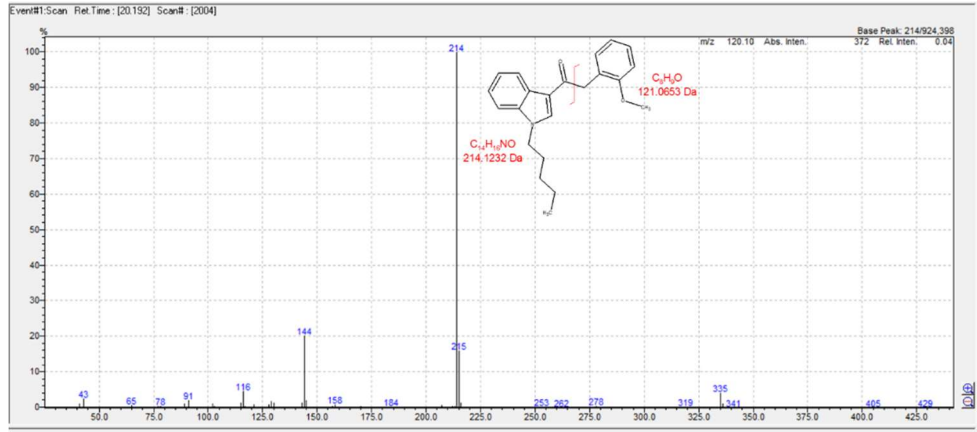
Şekil 4.26: JWH-018 GC-MS spektrumu.



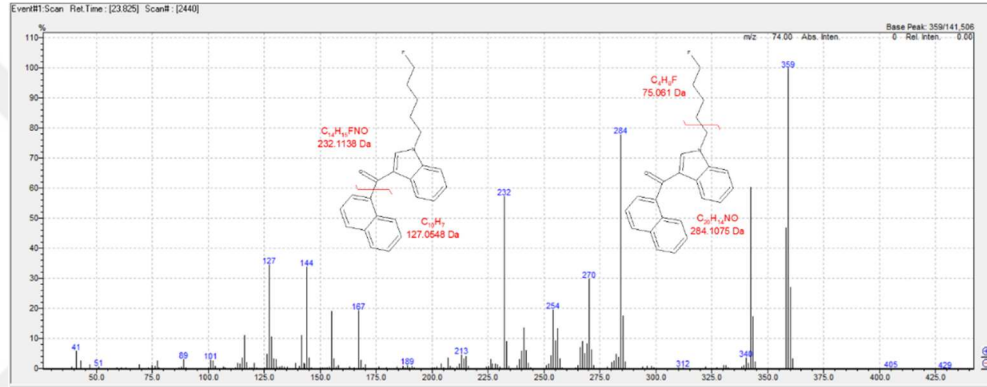
Şekil 4.27: JWH-122 GC-MS spektrumu.



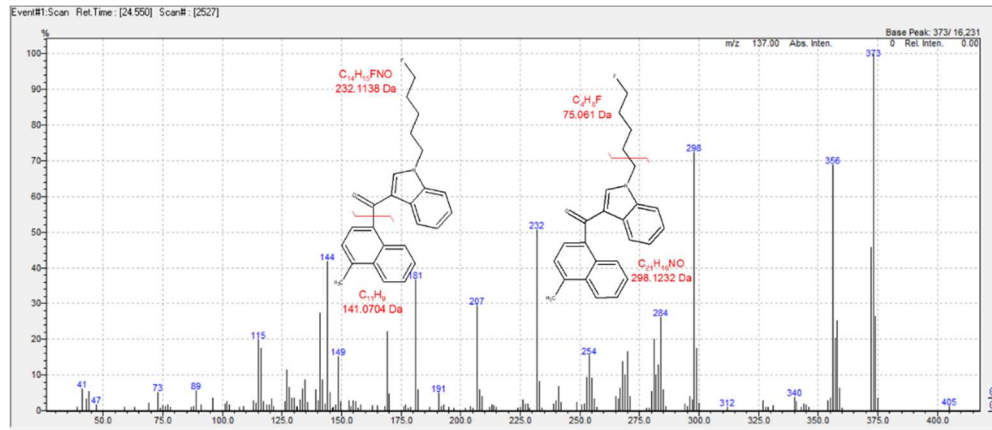
Şekil 4.28: JWH-210 GC-MS spektrumu.



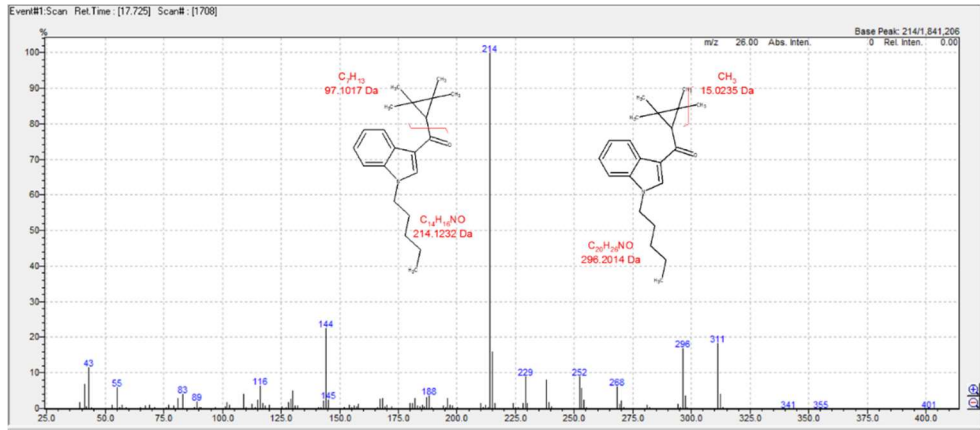
Şekil 4.29: JWH-250 GC-MS spektrumu.



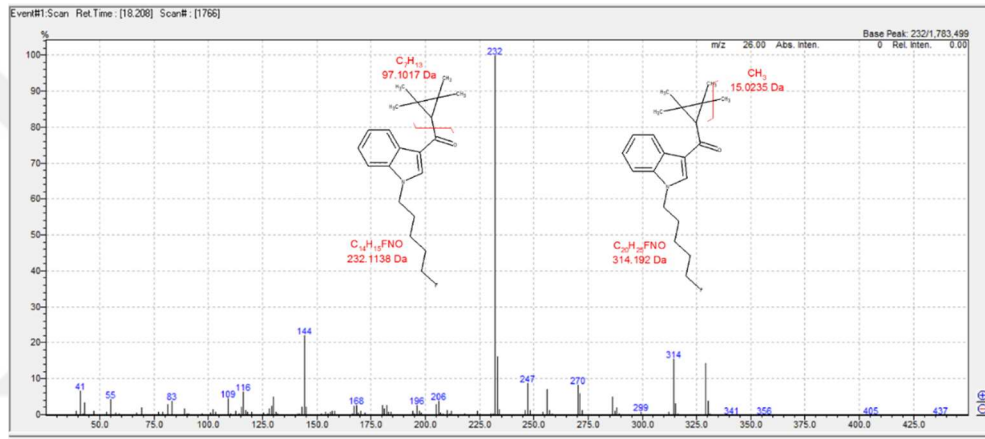
Şekil 4.30: AM-2201 GC-MS spektrumu.



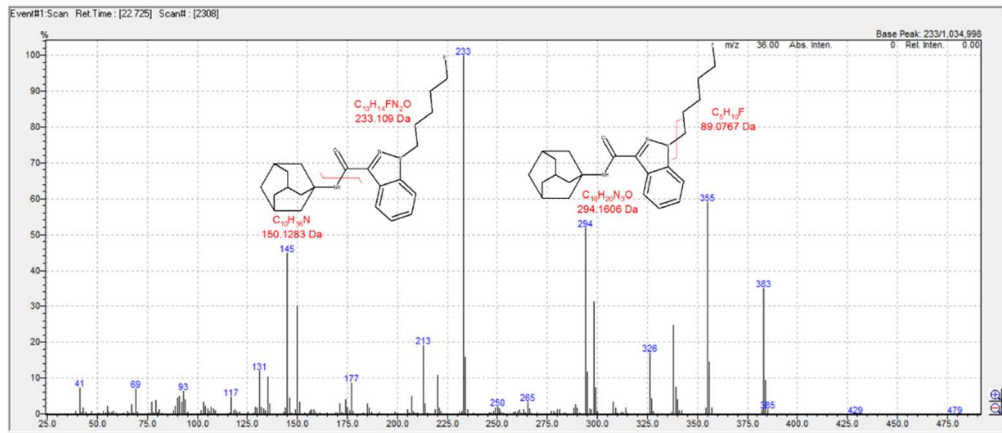
Şekil 4.31: MAM-2201 GC-MS spektrumu.



Şekil 4.32: UR-144 GC-MS spektrumu.



Şekil 4.33: XLR-11 GC-MS spektrumu.



Şekil 4.34: 5F-AKB-48 GC-MS spektrumu.

4.7. LC-MS/MS İLE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM KARŞILAŞTIRMASI

LC-MS/MS ve spektrofotometrik yöntem ile edilen veriler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını göstermek amacıyla, aynı gün içerisinde AM-2201 ve JWH-081 sentetik

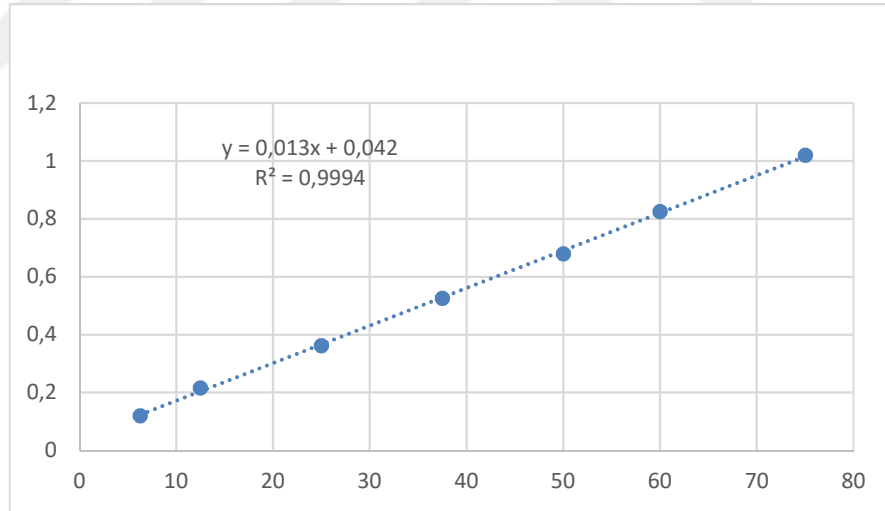
kannabinoidleri için her iki metod kullanılarak kalibrasyon çalışması ve numune analizi yapılmıştır. Her iki madde içinde spektrofotometrik yöntemin etanollü hali uygulanmıştır.

4.7.1. AM 2201 için yapılan çalışmalar

Öncelikle etanollü yöntemin uygulanmasıyla elde edilen çalışmanın verileri alınarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tablo 4.31: AM 2201 için yapılan kalibrasyon çalışması.

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Absorbans (N=3)	$\lambda_{\max}$ (nm)
6,25	0,120	577
12,5	0,216	577
25	0,362	578
37,5	0,526	578
50	0,679	578
60	0,825	578
75	1,020	578



Şekil 4.35: AM 2201 için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

AM2201 için elde edilen eğrinin denklemi; $A = 0,013 C_{\text{son}} + 0,042$ şeklindedir. Bu eğriye ait $r = 0,9997$ olarak hesaplanmıştır.

Beş farklı 500 mg L⁻¹ AM-2201 (EtOH) ile LC-MS/MS ile aynı gün etanollü yöntem uygulanarak beherde çalışılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konulmuştur.

Tablo 4.32: Beş farklı 500 mg L⁻¹ AM 2201 numunesi için elde edilen absorbans değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.

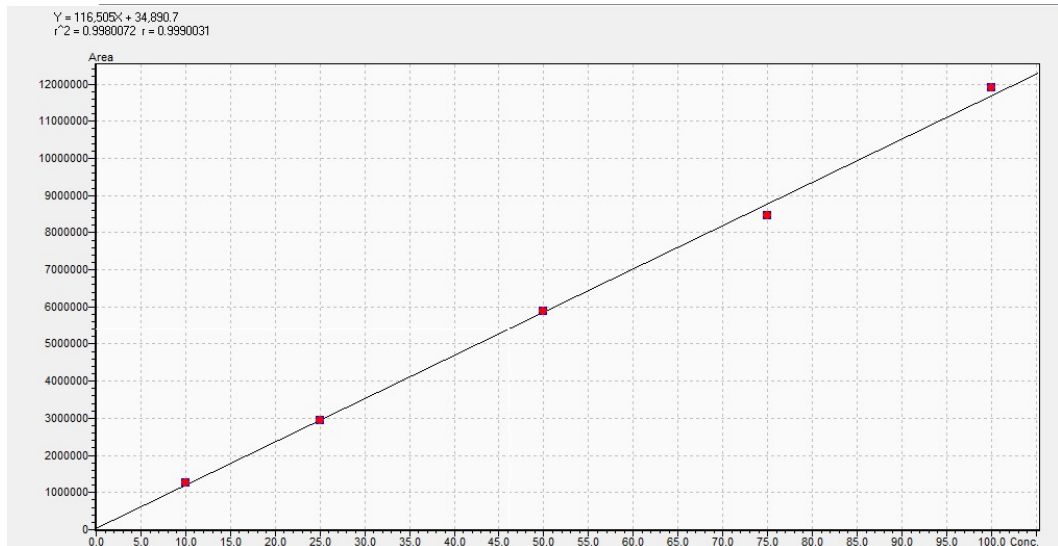
50 mg L ⁻¹ AM-2201 (Son C)	Absorbans	$\lambda_{\max}$ (nm)	Hesaplanan kons. değeri (mg L ⁻¹)
1	0,647	579	46,54
2	0,636	580	45,69
3	0,692	580	50,00
4	0,628	579	45,08
5	0,640	580	46,00

Yapılan çalışma sonucu elde edilen sonuçların ortalaması ($\bar{X}_1$) 46,66; standart sapması ise(S_1) 1,73'tür.

Paralel çalışma olarak, aynı stok çözeltiden aynı gün LC-MS/MS cihazında yapılan analizlerin sonuçları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.33: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında yapılan kalibrasyon çalışması.

AM2201 konsantrasyonu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ortalama Pik Alanı (N=3)
10	1263575
25	2954917
50	5889147
75	8463373
100	11894657



Şekil 4.36: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

AM2201 için elde edilen eğrinin denklemi; $A = 1,17 \times 10^5 C_{\text{son}} - 3,49 \times 10^4$ şeklindedir. Bu eğriye ait $r = 0,9990$ olarak hesaplanmıştır.

Beş farklı 50 µg L⁻¹ AM-2201 ile UV-GB ile aynı gün yapılan analizler sonucu elde edilen alan değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konulmuştur.

Tablo 4.34: Beş farklı 50 µg L⁻¹ AM 2201 numunesi için elde edilen pik alan değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.

AM 2201 konsantrasyonu (50 µg L ⁻¹)	Pik Alanı	Denkleme göre hesaplanan konsantrasyon
1	5561357	47,44
2	5692988	48,57
3	5949398	50,77
4	6033648	51,49
5	5408605	46,12

Yapılan çalışma sonucu elde edilen sonuçların için $\bar{X}_2 = 48,88$; $S_2 = 2,00$ 'dir.

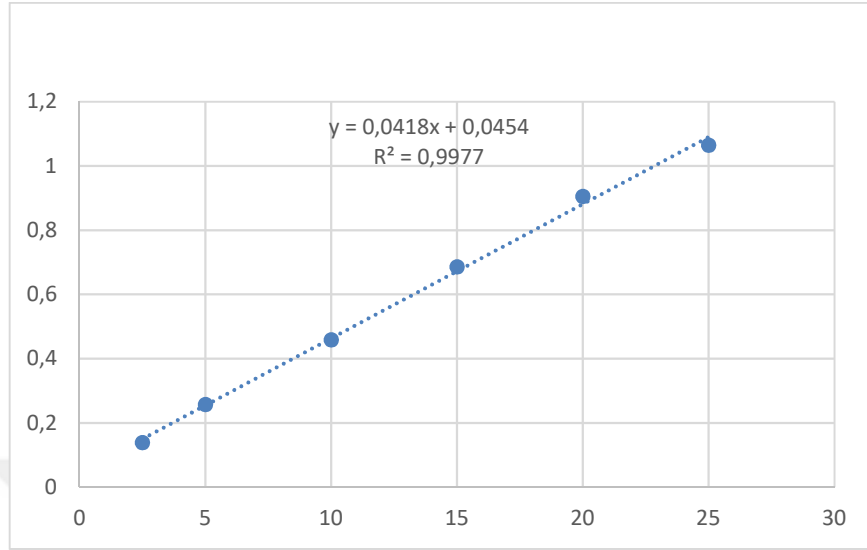
Her iki metodun standart sapmaları çok farklı olmadığı için verilerin örneklenmiş standart sapmaları ($S_{örn}$) hesaplanabilir. Buna göre AM 2201 maddesi için yapılan analizlere göre $S_{örn} = 1,87$ olarak hesaplandı. İstatistiki olarak metotların aralarında anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak için t-test ve çift kuyruklu F-test uygulanmıştır. Buna göre yapılan hesaplama sonucu $t_{AM2201} = 1,872$ ve $F_{AM2201} = 0,748$ olarak bulunmuştur. 8 serbestlik derecesine sahip %95 güven aralığında t-test tablosunda bakıldığında $t_{teorik} = 2,306$ 'dır ve deney sonucu elde edilen t_{AM2201} değeri t_{teorik} değerinden küçük olduğu için metotlar arasında anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir. Yine çift kuyruklu F test tablosundan $F_{4,4}$ için %95 güven aralığında teorik değer 6,39'dur. F_{AM2201} değeri $F_{4,4}$ değerinden küçük olduğu için iki metod arasında anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir.

4.7.2. JWH-081 için yapılan çalışmalar

Öncelikle etanolü yöntemin uygulanmasıyla elde edilen çalışmanın verileri alınarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tablo 4.35: JWH-081 için yapılan kalibrasyon çalışması($\lambda=634$ nm).

Son konsantrasyon (mg L ⁻¹)	Ortalama Absorbans (N=3)
2,5	0,139
5	0,257
10	0,459
15	0,686
20	0,905
25	1,065



Şekil 4.37: JWH-081 için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

JWH-081 için elde edilen eğrinin denklemi; $A = 0,0418 C_{\text{son}} + 0,0454$ şeklindedir. Bu eğriye ait $r = 0,9988$ olarak hesaplanmıştır.

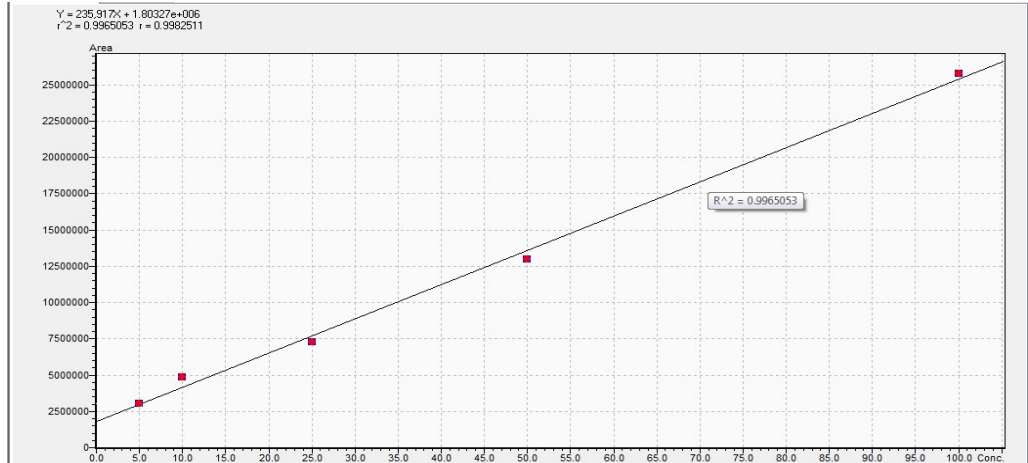
Beş farklı 100 mg L^{-1} JWH-081 (EtOH) ile LC-MS/MS ile aynı gün etanollü yöntem uygulanarak beherde çalışılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konulmuştur.

Tablo 4.36: Beş farklı 100 mg L^{-1} JWH-081 numunesi için elde edilen absorbans değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar ($\lambda=637 \text{ nm}$).

10 mg L ⁻¹ JWH-081 (Son C)	Absorbans	Hesaplanan kons. değeri (mg L ⁻¹)
1	0,377	7,93
2	0,493	10,70
3	0,424	9,05
4	0,480	10,39
5	0,465	10,03

Yapılan çalışma sonucu elde edilen sonuçların ortalaması ($\bar{X}_1$) 9,62; standart sapması ise (S_1) 1,01'dir.

Paralel çalışma olarak, aynı stok çözeltiden aynı gün LC-MS/MS cihazında yapılan analizlerin sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.38: AM 2201 için LC-MS/MS cihazında oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.37: JWH-081 için LC-MS/MS cihazında yapılan kalibrasyon çalışması.

JWH-081 Konsantrasyonu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ortalama Pik Alanı (N=3)
5	3044515
10	4825632
25	7284340
50	12967493
100	25754570

JWH-081 için elde edilen eğrinin denklemi; $A = 2,36 \times 10^5 C_{\text{son}} + 1,8 \times 10^6$ şeklindedir. Bu eğriye $r = 0,9982$ olarak hesaplanmıştır.

Beş farklı $100 \mu\text{g L}^{-1}$ JWH-081 ile UV-GB ile aynı gün yapılan analizler sonucu elde edilen alan değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konulmuştur.

Tablo 4.38: Beş farklı $100 \mu\text{g L}^{-1}$ JWH-081 numunesi için elde edilen pik alan değerleri ve hesaplanan konsantrasyonlar.

JWH-081 Konsantrasyonu ($100 \mu\text{g L}^{-1}$)	Pik Alanı	Grafiğe göre hesaplanan konsantrasyon($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	16898277	63,98
2	25482237	100,37
3	25054287	111,27
4	25629014	100,99
5	25010626	99,00

Yapılan çalışma sonucu elde edilen sonuçların için $\bar{X}_2 = 95,1$; $S_2 = 16,17$ 'dir.

Her iki metodun standart sapmaları çok farklı olmadığı için verilerin örneklenmiş standart sapmaları ($S_{\text{örn}}$) hesaplanabilir. Buna göre JWH-081 maddesi için yapılan analizlere göre $S_{\text{örn}} = 1,146$ olarak hesaplandı. İstatistiki olarak metodların aralarında anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak için t-test ve çift kuyruklu F-test uygulanmıştır. Buna göre yapılan hesaplama sonucu $t_{\text{JWH081}} = 0,632$ ve $F_{\text{JWH081}} = 0,39$ olarak bulunmuştur. 8 serbestlik derecesine sahip %95 güven aralığında t-test tablosunda bakıldığında $t_{\text{teorik}} = 2,306$ 'dır ve deney sonucu elde edilen t_{JWH081} değeri t_{teorik} değerinden küçük olduğu için metodlar arasında anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir. Yine çift kuyruklu F test tablosundan $F_{4,4}$ için %95 güven aralığında teorik değer 6,39'dur. F_{JWH081} değeri $F_{4,4}$ değerinden küçük olduğu için iki metod arasında anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir.

4.8. SAHA NUMUNELERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Bu çalışmada İstanbul Kriminal Polis Laboratuvarı sorumluluk alanı içerisinde kolluk kuvvetleri tarafından yakalanan maddelerin nitel ve nicel analizleri yapılmıştır. Numune toplama aralığı 2013-2015 yılları arasındadır. Çalışma konusu indol grubu içeren sentetik kannabinoidlerin yanı sıra numune toplama aralığında karşılaşılan ve hali hazırda dolaşımda olan indazole grubu içeren sentetik kannabinoidlerinde nicel analizleri yapılmıştır. Söz konusu incelemelere ait veriler Tablo 4.25'te gösterilmektedir. Yakalama numunelerinden özellikle kullanıcılara ulaşan bitki üzerine emdirilmiş numuneler seçilmiştir. Son kullanıcılara toz halde ulaşan sentetik kannabinoid vakası çok az olmakla birlikte, toz halde yakalamalar çoğunlukla yüklü miktarlarda (>1000 g) olmaktadır. Numune toplama aralığında sadece bir vakada sıvı halde elde edilen sentetik kannabinoid örneği bulunmaktadır.

Tablo 4.39: Saha numuneleri miktarsal analiz sonuçları.

No	Numune Türü	İçerdiği Aktif Madde (mg/g)		
1	BİTKİ	PB-22 (100)		
2	BİTKİ	XLR-11 (210)		
3	BİTKİ	AM 2201 (290)		
4	SIVI	AM 2201 (100)	JWH 022 (*)	
5	BİTKİ	XLR 11 (210)		
6	BİTKİ	5F-PB-22 (120)		
7	BİTKİ	AM 2201(70)		
8	BİTKİ	AM 2201 (230)		
9	BİTKİ	AM 2201 (230)		
10	BİTKİ	AB-FUBINACA (140)		
11	BİTKİ	XLR-11 (20)		
12	BİTKİ	XLR-11 (110)	MAM 2201 (130)	
13	BİTKİ	XLR-11 (190)		
14	BİTKİ	AM 2201 (170)	AB-FUBINACA (20)	
15	BİTKİ	5F-PB-22 (30)	ADB-FUBINACA (50)	
16	BİTKİ	AB-PINACA (200)		
17	BİTKİ	AB-PINACA (190)		
18	BİTKİ	ADB-FUBINACA (70)		
19	BİTKİ	XLR-11 (190)		
20	BİTKİ	XLR-11 (20)		
21	BİTKİ	5F-PB-22 (80)		
22	BİTKİ	5F-PB-22 (120)		
23	BİTKİ	5F-PB-22 (120)		
24	BİTKİ	AM 2201 (100)	XLR-11(10)	AB-PINACA(10)
25	BİTKİ	XLR-11 (220)		
26	BİTKİ	ADB-FUBINACA (40)		
27	BİTKİ	ADB-FUBINACA (20)		
28	BİTKİ	EAM 2201 (260)	JWH 210 (*)	JWH 122(*)
29	BİTKİ	PB-22 (110)		
30	BİTKİ	AM 2201 (140)	JWH 022(*)	
31	BİTKİ	AM 2201 (130)	JWH 022(*)	
32	BİTKİ	MAM 2201 (20)		
33	BİTKİ	MAM 2201 (60)		
34	BİTKİ	MAM 2201 (10)		
35	BİTKİ	MAM 2201 (40)		
36	BİTKİ	MAM 2201 (30)		
37	BİTKİ	MAM 2201 (20)		
38	BİTKİ	MAM 2201 (10)		
39	BİTKİ	AM 2201 (80)	XLR-11 (220)	
40	BİTKİ	ADB-FUBINACA (30)		
41	BİTKİ	ADB-FUBINACA (20)		

Tablo 4.39: (devamı).

42	BİTKİ	ADB-FUBINACA (10)		
43	BİTKİ	ADB-FUBINACA (80)		
44	BİTKİ	ADB-FUBINACA (10)		
45	BİTKİ	ADB-FUBINACA (40)		
46	BİTKİ	AB-CHMINACA (40)		
47	BİTKİ	ADB-FUBINACA (10)	AB-CHMINACA (20)	ADB-CHMINACA(10)
48	BİTKİ	ADB-FUBINACA(20)	AB-CHMINACA(20)	ADB-CHMINACA(20)
49	BİTKİ	ADB-FUBINACA(10)	AB-CHMINACA(20)	ADB-CHMINACA(10)
50	BİTKİ	AB-CHMINACA(30)		
51	BİTKİ	AB-FUBINACA(30)	AB-CHMINACA(140)	
52	BİTKİ	5F-AB-PINACA(10)	ADB-CHMINACA(30)	AB-CHMINACA(10)
53	BİTKİ	ADB-CHMINACA(70)	AB-CHMINACA(10)	5F-AKB48(10)
54	BİTKİ	XLR-11(10)	AB-CHMINACA(20)	AB-FUBINACA(80)
55	BİTKİ	ADB-CHMINACA (70)		
56	BİTKİ	XLR-11(230)		
57	BİTKİ	AB-CHMINACA(10)		
58	BİTKİ	AM 2201(240)	ADB-FUBINACA(20)	
59	BİTKİ	ADB-FUBINACA(20)		
60	BİTKİ	ADB-FUBINACA(10)		
61	BİTKİ	XLR-11(120)		
62	BİTKİ	ADB-FUBINACA(10)		
63	BİTKİ	XLR-11(50)	AB-CHMINACA(10)	5F-AKB48(60)
64	BİTKİ	ADB-CHMINACA(30)		
65	BİTKİ	ADB-CHMINACA(30)		
66	BİTKİ	ADB-CHMINACA(60)		
67	TOZ	AM 2201(540)	JWH 018(430)	
68	TOZ	UR-144(870)		
69	BİTKİ	NM-2201(10)		

(*Numune içeriğinde bulunan aktif maddenin referans maddesi temin edilemediğinden nicel analizi yapılamamıştır.)

Çalışmada kullanılan bitki üzerine emdirilmiş sentetik kannabinoid numunelerinden alınan 1 g madde havanda toz hale getirilmiş ve bu tozdan alınan 10 mg örnek 10 mL asetonitrilde çözülüp daha sonra madde saf kabul edilerek yine asetonitril ile 100 mg L⁻¹ yoğunlukta olacak şekilde seyreltilmiştir. Toz yakalama örnekleri ise homojenize edilip aynı işleme tabi tutulmuştur. Çalışma numunelerinde yer alan sıvı örnekten ise 1 mL hacminde numune alınarak asetonitril ile 100 mL'ye tamamlanmış ardından bu çözeltiden alınan 1 mL yine asetonitril ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu numunenin de sonucu mg/g cinsinden hesaplanmıştır.

Yapılan çalışma neticesinde analiz edilen numunelerin genel olarak 200 mg/g yukarısında aktif madde ihtiva etmediği, ancak indol grubu taşıyan sentetik kannabinoidlerin nicel analiz sonuçlarının indazole grubu içerenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Maddelerin miktarsal olarak farklı oranlarda olması, aynı etken maddeler için yasadışı olarak hazırlanmaları ve belirli bir prosedürü takip etmemelerinden kaynaklanmakla birlikte, maddeler arasında ki farklılık sentetik kannabinoidlerden bazılarının Δ^9 -THC den daha yüksek etkiye sahip olması ve doğal esrardan farklı olarak daha ciddi yan etkilere sahip olması [66] nedeniyle açıklanabilir.

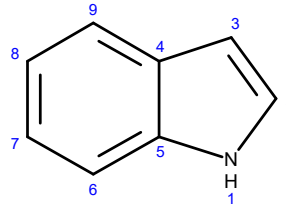


5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorimetrik yöntemler uyuşturucu maddeler ve ilaçların saha testlerinde yaygınlıkla kullanılan tayin yöntemleridir [28-30]. Saha testleri ekipman ihtiyacı fazla olmayan, temel eğitim ile uygulanabilecek ve hızlı var/yok testleridir. Yakalanan şüpheli maddeler üzerinde yapılan bu testler sonucu soruşturmanın gideceği yön ve süresi değişkenlik gösterebilir. Bu sebeple güvenilir ve mümkün olduğunca maddeye özgü bir testin kullanılması önemlidir.

Aminoalkilindol grubu içeren sentetik kannabinoidler, yeni nesil uyuşturucular içerisinde geniş bir yer tutmaktadır. Bu maddelerin için sahada uygulanabilecek özgünlüğü yüksek bir renk testi bulunmamaktadır. p-DMAB reaktifinin $\text{SiO}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$ karışımı katalizörlüğünde kullanımı sonucu elde edilen belirgin renk değişimi, 5 mg L^{-1} son konsantrasyona sahip maddeler için görülmüştür. Saha numuneleri ile yapılan denemelerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan nicel analizler sonucu ortaya çıkan saflık verileri göz önüne alındığında en fazla 0,5 g madde miktarının saha numuneleri için yeterli olacağı söylenebilir.

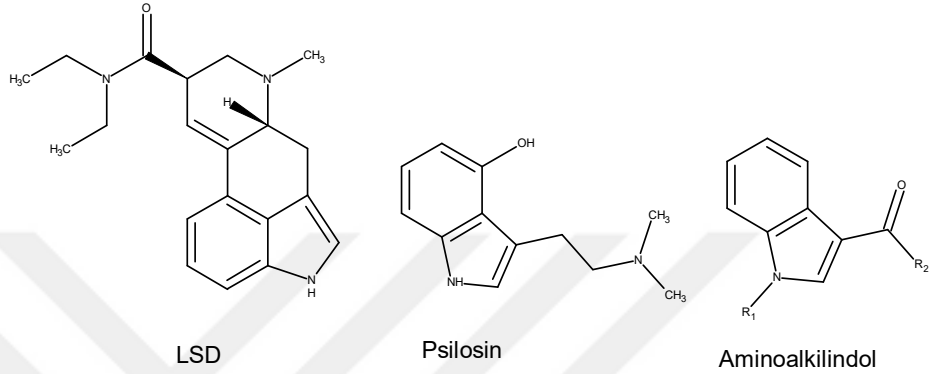
İndoller elektronca zengin heteroaromatik ikili halkalar olarak sınıflandırılabilir. İndol molekülü reaktif bir pirol gibi hareket etmesine rağmen elektrofilik değişim tepkimelerini pirolerin aksine hemen hemen her reaktif için 3 numaralı pozisyondan gerçekleştirir. Eğer 3 numaralı pozisyon doluysa 2 numaralı pozisyondan tepkime verir. İndol tepkimeleri genel olarak, benzen halkasının aromatikliğini bozmadığı için, yapının pirol halkası üzerinden gerçekleşmektedir.[67].



Şekil 5.1: İndol molekülü.

p-DMAB ile hazırlanan asidik ortamdaki reaktiflerin indol grubuna sahip maddeler ile reaksiyonunda bu elektron zengin özelliği reaksiyonların kolayca gerçekleşmesini sağlamaktadır. Örneğin liserjik asit dietilamid (LSD) ve psilosin maddelerinde bulunan

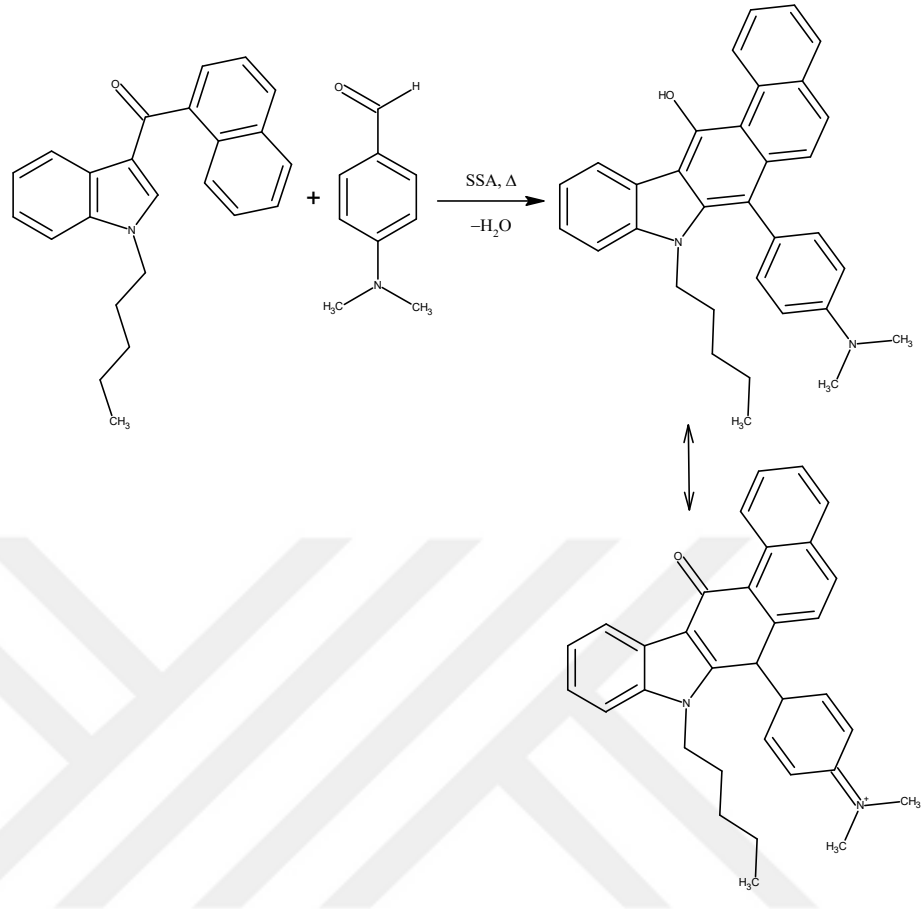
elektron verici alkil grupları ve elektronca zengin indol grubu asidik ortamda hazırlanan Ehrlich reaktifi ile tepkime vererek renkli bir ürün vermektedir [43]. Ancak çalışmada ilgilenilen aminoalkilindol grubu maddelerde bir adet elektron verici alkil grubu bulunmasına rağmen yapıda bulunan güçlü elektron çekici karbonil grubu nedeniyle p-DMAB ile tepkime gerçekleşmemektedir.



Şekil 5.2: LSD ve psilosin molekülleri ile aminoalkilindol grubu maddelerin ana yapısı.

Organik kimyada katı asit katalizörleri, kolay ve tekrar kullanılabilme, çözücüsüz tepkime gerçekleştirme ve çevreye daha az zararlı olması nedeniyle tercih edilmektedir. SSA çözücüsüz ortamlarda indollerin karbonil bileşikleri ile verdikleri bis(indoil)alkanları oluşturan elektrofilik değişim tepkimelerinde kullanılan yumuşak, etkili ve tekrar kullanılabilen bir katalizördür [64].

SiO₂ ile birlikte H₂SO₄ kullanılarak, aminoalkilindol grubu içeren maddelerin p-DMAB ile elektrofilik değişim tepkimesini gerçekleştirmek amacıyla 180 °C'ye ayarlanmış bir ısıtıcıda yapılan denemeler sonucu renkli bileşik elde edilmiştir. Ortamda bulunan H₂SO₄, reaksiyonun asidik koşullarda oluşmasını sağlamasının yanında su çekici özelliği ile de tepkime sonucu açığa çıkan suyu ortamdan uzaklaştırmıştır.



Şekil 5.3: JWH-018'in SiO₂ ve H₂SO₄ karışımının katalizörlüğünde pDMAB ile tepkimesi.

Sentetik kannabinoidlerden JWH-018, JWH-081, JWH-122, JWH-210, AM-2201, MAM-2201, XLR-11 ve 5F-PB-22 ile geliştirilen yöntem ile çalışmalar yapılmıştır. Sıcaklık bu yöntemde önemli bir faktördür. Ehrlich reaktifi indollerle oda sıcaklığında tepkime vermekte ise de, aminoalkilindol grubu maddeler ile tepkime verebilmesi için bir katalizör gerekmektedir. SiO₂ ile birlikte H₂SO₄ karışımının da katalizör görevi görebilmesi ve tepkimenin gerçekleşmesi için, SSA katalizörünün kullanımının [68] yanında ısı gerekmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen absorbans değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıkları (r değerleri) kabul edilir seviyededir. Ayrıca çalışma aralığı olarak seçilen 5 – 100 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda doğrusallıktan sapma gözlenmemiştir.

Geliştirilen yöntemin mikrodalga sentez cihazında uygulanmasında sıcaklık değerinin 130 °C ye düştüğü, optimizasyon çalışmalarında 0,4 mL H₂SO₄'ün yeterli olacağı görülmüştür. Silika miktarının uygulanan yöntem üzerindeki etkilerinin incelendiği

çalışmada 20-100 mg arasında değişen silika miktarının absorbands değeri üzerinde bir değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi tepkimenin susuz ortamda gerçekleşmesi ve organik çözücünün ısıtma işlemi sırasında tamamen ortamdan uzaklaşarak reaksiyonun katı ortamda gerçekleşmesi olabilir.

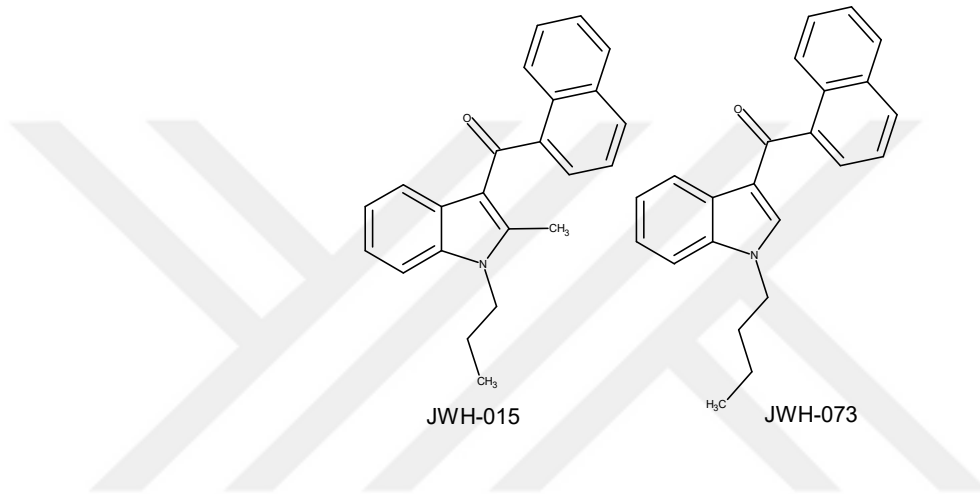
Yöntem uygulaması sırasında kullanılan maddelerden bazılarının metil alkol içerisinde bozunduğu stok çözeltiden ertesi gün yapılan ölçümlerde gözlemlenmiştir. 5F-PB-22 ve XLR-11 maddeleri için gerçekleşen bu durumda asetronitril çözücü olarak kullanılmış, ancak bu seferde reaktifin çökmesi nedeniyle bu iki madde için çözücü 1:1 oranında asetronitril:su olarak seçilmiştir. Sertifikalı referans maddelerden çözelti halinde ambalajların çözücüleri yöntemin uygulanması sırasında kullanılmıştır.

Isıtma adımı JWH-018, JWH-081 ve JWH-122 maddeleri için uygulanırken karışımda yanma olayı meydana geldiği görülmüş ve bu nedenle ısıtma süresi 3 dakikaya düşürülmüştür. Sürenin düşürülmesi ile yanma olayının önüne geçilebilmiş ve bu üç madde için yöntem 5 dakika yerine 3 dakika ısıtılarak uygulanmıştır.

HPLC yöntemi için seçilen asetronitril:su izokratik akışı kolonda çalışmaya konu maddelerin ayırımında herhangi bir soruna yol açmamıştır. Mobil fazda metanol yerine asetronitril kullanımı, kolonda basıncın artmasının önüne geçmiştir. Ayrıca numune hazırlama aşamalarında asetronitril kullanımı, bitki üzerine emdirilmiş saha numunelerinin ekstraksiyonunda bitki parçalarından gelebilecek istenmeyen kirliliklerin numune çözeltisi içerisine geçmesini engellemiştir. HPLC analizlerinde kullanılan izokratik akış referans maddelerin analiz sertifikalarında yer alan saflık tayin metodundaki su oranı arttırılarak, kullanılan kolon ve cihaz basınç değerlerine göre modifiye edilmiş halidir.

LC-MS/MS analizlerinde karşılaşılan ana problem tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yeni nesil uyuşturucu maddelerin referans maddelerinin temin edilmesidir. MS/MS çalışması için maddelerin tanımlanması ve cihaz şartlarının optimize edilmesi gereklidir. Gerekli olan referans maddeler, bu tip uyuşturucuların piyasaya çıkmasından sonra üretildiği, temin süreçlerinde yaşanan bürokratik aşamalar gibi sebeplerle geç elde edilebilmektedir.

LC-MS/MS analizleri sırasında karşılaşılan diğer bir zorluk ise sentetik kannabinoidlerin benzer yapılara sahip olması nedeniyle iyonlaştırma ve parçalama adımlarında yakın veya aynı m/z oranları vermesidir. Örneğin JWH-015 (Formül Ağırlığı: 327,43) ve JWH-073 (Formül Ağırlığı: 327,43) maddeleri için: m/z (1) 328,2, m/z (2) 127,2, Ref (1) 328,2 değerleri aynıdır. Sadece Ref (2) değeri JWH-015 için 155,2 JWH -073 için 155,3'tür. Bu durumda analizler sırasında maddelerin alıkonma zamanları ile referans iyonlarının elde edilip edilemediği ve ana iyonlara olan oranlarına azami dikkat gösterilmelidir.

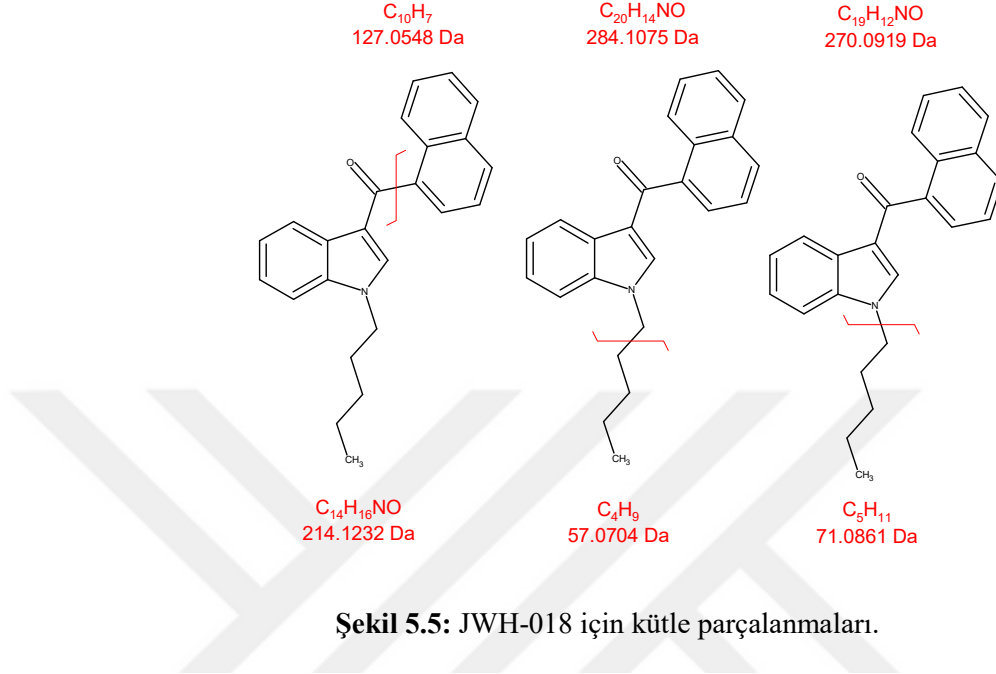


Şekil 5.4: JWH-015 ve JWH-073 maddelerinin molekül formülleri.

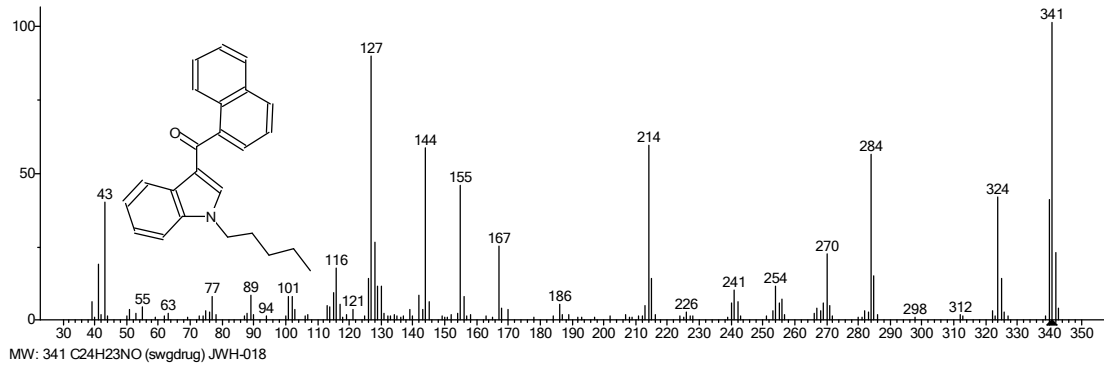
Adli kimya laboratuvarlarında en fazla kullanılan cihazlardan birisi olan GC-MS ile yapılan analizlerde, çalışma konusu aminoalkilindol grubu içeren sentetik kannabinoid maddelerinin tanımlanması elde edilen kütle spektrumlarının cihaz veri bankaları ile yapılan karşılaştırılması ile yapılmıştır. MS/MS siteminde olduğu gibi maddelerin molekül yapılarının birbirlerine benzemesi nedeniyle parçalanma ürünleri de benzeşmektedir. Ancak LC-MS/MS sisteminde kullanılan iyonlaştırma tekniğine göre daha sert bir iyonlaştırma yöntemi olan elektron bombardımanı, incelenen moleküllerde daha fazla parçalanmaya sebep olduğundan ayırım kuvveti daha fazladır. Bu tekniğin bir dezavantajı ise analiz edilen molekülün, moleküler iyonunu tespit etmek, dolayısıyla formül ağırlığını tahmin etmek çoğu kez mümkün olmamaktadır.

GC-MS spektrumlarından elde edilen veriler ve parçalanma iyonları incelendiğinde en fazla bağ kopmasının, yapı içerisindeki karboksilin aminoalkil ile kurduğu bağ yerine diğer fonksiyonel gruplarla yaptığı bağdan gerçekleştiği görülmektedir. Bir diğer sık

rastlanan parçalanma ise indol üzerindeki azota bağlı olan alkil gruplarında meydana gelenlerdir.



Şekil 5.5: JWH-018 için kütle parçalanmaları.

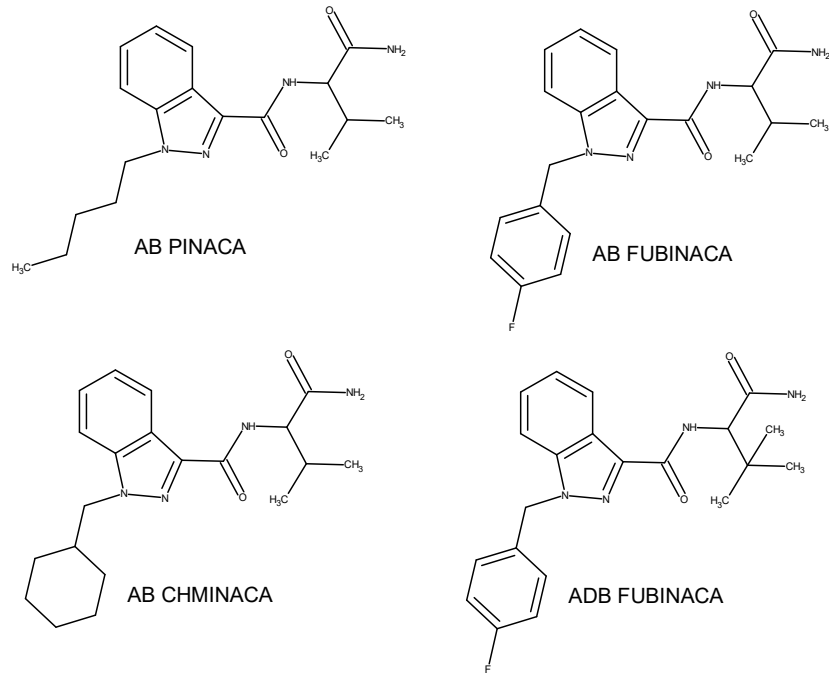


Şekil 5.6: JWH-018 için kütle spektrumu.

İstanbul Kriminal Polis Laboratuvarı sorumluluk sahası içerisinde yakalanan sentetik kannabinoid içeren maddelerin nicel analizleri yapılmıştır. Söz konusu numuneler 2013-2015 yılları arasında yapılan yakalamalardan seçilmiştir. Ele geçirilen madde miktarları vaka bazında değişiklik gösterdiği ve yapılan çalışmaların adli olarak yasaklı madde içerip içermediği öncelikli olduğu için, madde miktarı az olan vakalar örneklenmemiştir. Numune çeşidi olarak özellikle son kullanıcıya ulaşan hali olduğu için bitki üzerine emdirilmiş “bonzai” olarak tabir edilen maddeler tercih edilmiştir. Bu sayede piyasada dolaşımda bulunan maddelerin içerdikleri madde miktarları konusunda bir fikir edinmek amaçlanmıştır. Ayrıca nicel analizi yapılacak olan maddelerin referans maddeleri

bulunması gerektiğinden, her madde için bu işlem yapılamamıştır. Nicel analizler için HPLC yöntemi tercih edilmiştir. LC-MS/MS sistemi her ne kadar tanımlama avantajı sunsa da, yapılan ön çalışmalarda saha numunelerinde ki madde miktarlarının fazla olmasından dolayı numune hazırlık aşamasında seyreltme adımı gerektirdiği görülmüş, madde konsantrasyonu yüksek numunelerin analizleri sonrasında sistemde kirlilik kaldığı ve ardından yapılan çalışmaları etkilediği tespit edilmiştir. GC-MS sistemi ise tekrarlanabilirlik probleminde dolayı tercih edilmemiştir. Yukarıda belirtilen sebepler nedeniyle nicel analiz çalışmalarında HPLC yöntemi, çalışma aralığı LC-MS/MS sistemine göre daha yüksek konsantrasyonda olduğu, tekrarlanabilirlik değerleri GC-MS sistemine göre daha iyi olduğu için, nicel analizlerde kullanılmıştır.

Numune toplama aralığında yasal mevzuatın değişmesi ve çalışmaya konu olan aminoalkilindol grubu maddelerin bazılarının yasal kısıtlılık altına alınması sonucu piyasada aminoalkilindazole yapısına sahip maddeler tespit edilmeye başlanmıştır. Miktersal analiz çalışmasının amacı piyasada karşılaşılan sentetik kannabinoid maddelerinin son kullanıcıya hangi saflıkta ulaştığını görmek olduğu için bu maddeler çalışma dışı bırakılmamıştır.



Şekil 5.7: Aminoalkilindazole türevi maddelerinin molekül formülleri.

Nicel analiz sonuçları değerlendirildiğinde, sentetik kannabinoid içeren bitki karışımlarında her numunede farklı bir saflık oranı ile karşılaşılmıştır. Bu maddelerin etkinlikleri CB₁ reseptörüne bağlanma affinitesinin Δ^9 -THC affinitesine oranlanması ile bulunmaktadır. Klinik olarak insan deneyleri gerçekleştirilmediğinden söz konusu değerler insan üzerindeki etki hakkında bir fikir vermektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde in vitro olarak sentetik kannabinoidlerin etkinlikleri Tablo 5.1’de verilmiştir. 1 den büyük oran Δ^9 -THC’ye göre daha yüksek CB₁ bağlanma affinitesini göstermektedir.

Tablo 5.1: Sentetik kannabinoidler ve Δ^9 -THC için CB₁ reseptör affiniteleri oranı[68].

Madde Adı	Δ^9 -THC/Sentetik Kannabinoid (CB ₁ Ki)
AB-FUBINACA	45,6
ADB-FUBINACA	103
AM-2201	40
JWH-018	4,6
JWH-081	34,2
JWH-122	58,6
UR-144	1,4
XLR-11	1,7

Belirtilen oranlara göre sentetik kannabinoidler esrara göre daha etkili maddelerdir. Türkiye’de ele geçirilen esrar maddelerinde ki Δ^9 -THC oranı ise 2013 verilerine göre; bitkiler için en düşük %0,07 ve en yüksek %13,08 ile toz esrar için en düşük %0,05 ve en yüksek %23,08 şeklindedir [69]. ADB-FUBINACA içeren bir ‘bonzai’ örneğinde 20 mg/g oranında madde bulunduğu ve bunun en yüksek oranda Δ^9 -THC içeren toz esrar ile mukayese edildiğinde dahi 100 kata yakın daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sebeple sentetik kannabinoidlerin esrar yerine kullanılması, hem klinik testlerin yapılmamış olması hem de etkinlikteki bu yüksek oranlara rağmen saflık miktarlarının çok değişkenlik göstermesi nedeniyle çok tehlikelidir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma neticesi ile aminoalkilindol grubu maddeleri içeren sentetik kannabinoidlerin hem toz hem de bitki üzerine emdirilmiş haldeki numunelerine sahada başarıyla uygulanabilecek bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ile spektrofotometrik çalışmalar yapılarak, yöntemin adli kimya laboratuvarlarında nicel analizler için uygulanabilecek bir metot olduğu gösterilmiştir. Yapılan kromatografik

analizler ve saha numunelerinde yapılan nicel analizler ile Türkiye’de ele geçirilmiş olan maddelerin içerikleri ile içerdikleri net madde miktarları ortaya konmuştur.



KAYNAKLAR

- [1]. Kalant, H, Medicinal use of cannabis: history and current status, 2001, *Pain Research and Management*, 6(2), 80-91.
- [2]. Dickson, S. ve Poulsen H., 2009, *Cannabis*, Encyclopedia of Forensic Science, Jamieson, A. ve Moenssens, A., Wiley, West Sussex, UK, ISBN: 978-0-470-01826-2, 431-437
- [3]. Atakan, Z., 2012, Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals, *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2012-2(6), 241-254
- [4]. UNODC, 2011, Synthetic cannabinoids in herbal products
- [5]. Hall, W. ve Degenhardt, L., 2008, Cannabis use and the risk of developing a psychotic disorder, *World Psychiatry*, 2008-7(2), 68–71
- [6]. Zhang Q., Ma P., Cole R.B., Wang G., 2006, Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1345–1355.
- [7]. Adams, R., Hunt, M., Clark, J. H., 1940, Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of minnesota wild hemp I, *Journal of American Chemical Society*, 62, 196–200
- [8]. Adams, R., 1942, Marihuana: harvey lecture, *Bulletin of New York Academy of Medicine*, 18, 705–730
- [9]. Adams, R. ve Baker, B. R., 1940, Structure of cannabidiol VII - A method of synthesis of a tetrahydrocannabinol which possesses marihuana activity, *Journal of American Chemical Society*, 62, 2405–2408
- [10]. Mechoulam, R. ve Shvo, Y., 1963, Hashish—I : the structure of cannabidiol, *Tetrahedron*, 19, 2073-2078

- [11]. Gaoni, Y. ve Mechoulam, R., 1964, Isolation structure + partial synthesis of active constituent of hashish, *Journal of American Chemical Society*, 86, 1646-1647
- [12]. Huffman, J.W., Dai, D., Martin, B.R., Compton, D.R., 1994, Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1994 (4), 563-566
- [13]. Lainton, J.A.H., Huffman, J.W., Martin, B.R., Compton, D.R., 1995, 1-Alkyl-3-(1-naphthoyl) pyrroles: A new class of cannabinoid, *Tetrahedron letters*, 36(9), 1401-1404
- [14]. Wiley, J.L., Compton, D.R., Dai, D., Lainton, J.A.H., Phillips, M., Huffman, J.W., Martin, B.R., 1998, Structure-activity relationships of indole-and pyrrole-derived cannabinoids, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285, 3, 995-1004
- [15]. Huffman, J.W., 1999, Cannabimimetic indoles, pyrroles and indenenes, *Current medicinal chemistry*, 6, 705-720
- [16]. Bell, M. R., D'Ambra, T. E., Kumar, V., Eissenstat, M. A., Herrmann, J. L., Wetzel, J. R., Rosi, D., Philion, R. E., Daum, S. J., Hlasta, D. J., Kullnig, R. K., Ackerman, J. H., Haubrich, D. R., Luttinger, D. A., Baizman, E. R., Miller, M. S., Ward, S. J., 1991, Antinociceptive (Aminoalkyl)indoles, *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 1099-1110.
- [17]. Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L., Beuerle T., 2009, Spice: A never ending story?, *Forensic Science International*, 191, 58-63
- [18]. Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., 2010, Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products, *Forensic Science International*, 198, 31-38
- [19]. Jankovics P., Váradi A., Tölgyesi L., Lohner S., Németh-Palotás J., Balla J., 2012, Detection and identification of the new potential synthetic cannabinoids 1-pentyl-

- 3-(2-iodobenzoyl)indole and 1-pentyl-3-(1-adamantoyl)indole in seized bulk powders in Hungary, *Forensic Science International*, 214 (1-3), 27-32
- [20]. Penn H.J., Langman L. J., Unold D., Shields J., Nichols J. H., 2011, Detection of synthetic cannabinoids in herbal incense products, *Clinical Biochemistry*, 44, 1163-1165
- [21]. Ernst L., Schiebel H. M., Theuring C., Lindigkeit R., Beuerle T., 2011, Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in “Spice-like” herbal incenses, *Forensic Science International*, 208, e31-e35
- [22]. F. Westphal F., Sönnichsen F. D., Thiemt S., 2011, Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole in a herbal mixture, *Forensic Science International*, 215 (1-3), 8-13
- [23]. Dowling, G., Regan, L., 2011, A method for CP 47, 497 a synthetic non-traditional cannabinoid in human urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 879, 253-259
- [24]. Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Moskaleva N., Dzhurko J., Ershov M., Nosyrev A., Vedenin A., Izotov B, Zabirowa I., Rozhanets V., 2011, Chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures, *Journal of Chromatography B*, 879, 1126-1136
- [25]. Tim Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G., 2010, Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine, *Forensic Science International*, 200, 141-147
- [26]. Andrej Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V., 2011, Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures, *Journal of Chromatography B*, 879, 2519-2526
- [27]. Teske J., Weller JP., Fieguth A., Rothämel T., 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*, 878, 2659-2663

- [28]. World Health Organization, 1998, *Basic Tests for Drugs: Pharmaceutical substances, medicinal plant materials and dosage forms*, Office of Publications- WHO, UK, ISBN 92-4-154513-5
- [29]. UNODC, 2001, Rapid On-Site Screening Of Drugs Of Abuse-A summary of commercially available products and their applications: guidance for the selection of suitable products, Part I Biological specimens
- [30]. National Institute of Justice, 2000, Color Test Reagents/Kits for Preliminary Identification of Drugs of Abuse, NIJ Standard–0604.01
- [31]. UNODC, 2012, Recommended methods for the Identification and Analysis of Barbiturates and Benzodiazepines under International Control
- [32]. UNODC, 2012, Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials
- [33]. UNODC, 2010, Recommended methods for the identification and analysis of methaqualone/mecloqualone
- [34]. Nagy, G., Szöllősi, I. ve Szendrei, K., 2005, Colour Tests for Precursor Chemicals of Amphetamine-Type Substances; The Use of Colour Tests for Distinguishing between Ephedrine-Derivatives, *Scientific And Technical Notes*, UNODC
- [35]. Leitner, A., Lechner, H. ve Kainz, P., 2007, Colour Tests for Precursor Chemicals of Amphetamine-Type Substances Systematic study of colour tests for safrole and safrole-rich essential oils, *Scientific And Technical Notes*, UNODC
- [36]. UNODC, 1998, Recommended methods for testing opium, morphine and heroin
- [37]. UNODC, 2006, Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine and their ring-substituted analogues in seized materials,

- [38]. UNODC, 2009, Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products
- [39]. Morris, J., 2013, *Color tests and analytical difficulties with emerging drugs of abuse*, <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/oles/Color-Tests-and-Analytical-Difficulties-with-Emerging-Drugs-Morris.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 16 Şubat 2015]
- [40]. Ehmann A., 1977, The van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives, *Journal of Chromatography*, 132, 267-276
- [41]. Jin, Q., Shan, L., Yue, J. ve Wang, X., 2008, Spectrophotometric determination of total serotonin derivatives in the safflower seeds with Ehrlich's reagent and the underlying color reaction mechanism, *Food Chemistry*, 108, 779-783
- [42]. Logan B.K., Reinhold L.E., Xu A., Diamond F.X., Identification of Synthetic Cannabinoids in Herbal Incense Blends in the United States, *Journal of Forensic Sciences*, 2012, 1-13
- [43]. Isaacs R.C.A., A structure-reactivity relationship driven approach to the identification of a color test protocol for the presumptive indication of synthetic cannabimimetic drugs of abuse, *Forensic Science International*, 242, 135-141
- [44]. Sedefov, R., Gallegos, A., King, L., Lopez, D., Auwärter, V., Hughes, B. ve Griffiths, P., 2009, *Understanding the 'Spice' phenomenon*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, ISBN 978-92-9168-411-3
- [45]. UNODC, 2013, Recommended Methods for the Identification and Analysis of Piperazines in Seized Materials
- [46]. Moosmann, B., Kneisel, S., Girreser, U., Brecht, V., Westphal, F., Auwarter, V., 2012, Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3yl]-(4-methylnaphthalen-1-

- yl)methanone using GC–MS, NMR analysis and a flash chromatography system, *Forensic Science International*, 220, e17–e22
- [47]. Uchiyama, N., Matsuda, S., Kawamura, M., Shimokawa, Y., Kikura-Hanajiri, R., Aritake, K., Urade, Y., Goda, Y., 2014, Characterization of four new designer drugs, 5-chloro-NNEI, NNEI indazole analog, a-PHPP and a-POP, with 11 newly distributed designer drugs in illegal products, *Forensic Science International*, 243, 1–13
- [48]. Shevyrin, V., Melkozerov, V., Nevero, A., Eltsov, O., Baranovsky, A., Shafran, Y., 2014, Synthetic cannabinoids as designer drugs: New representatives of indol-3-carboxylates series and indazole-3-carboxylates as novel group of cannabinoids. Identification and analytical data, *Forensic Science International*, 244, 263–275
- [49]. Uchiyama, N., Shimokawa, Y., Kikura-Hanajiri, R., Demizu, Y., Goda, Y., Hakamatsuka, T., 2015, A synthetic cannabinoid FDU-NNEI, two 2H-indazole isomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and NNEI indazole analog (MN-18), a phenethylamine derivative N-OH-EDMA, and a cathinone derivative dimethoxy-a-PHP, newly identified in illegal products, *Forensic Toxicology*, 33, 244–259
- [50]. Shevyrin, V., Melkozerov, V., Nevero, A., Eltsov, O., Morzherin, Y., Shafran, Y., 2014, 3-Naphthoylindazoles and 2-naphthoylbenzoimidazoles as novel chemical groups of synthetic cannabinoids: Chemical structure elucidation, analytical characteristics and identification of the first representatives in smoke mixtures, *Forensic Science International*, 242, 72–80
- [51]. Shevyrin, V., Melkozerov, V., Nevero, A., Eltsov, O., Shafran, Y., 2013, Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid, *Forensic Science International*, 232, 1–10
- [52]. Uchiyama, N., Shimokawa, Y., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Hakamatsuka, T., 2014, Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl)benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five

- cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products, *Forensic Toxicology*, 32, 266–281
- [53]. Uchiyama, N., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., 2013, URB-754: A new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products, *Forensic Science International*, 227, 21–32
- [54]. Uchiyama, N., Shimokawa, Y., Matsuda, S., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., 2014, Two new synthetic cannabinoids, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA) and (4-methylpiperazin-1-yl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (MEPIRAPIM), and three phenethylamine derivatives, 25H-NBOMe 3,4,5-trimethoxybenzyl analog, 25B-NBOMe, and 2C-N-NBOMe, identified in illegal products, *Forensic Toxicology*, 32, 105–115
- [55]. Uchiyama, N., Asakawa, K., Kikura-Hanajiri, R., Tsutsumi, T., Hakamatsuka, T., 2015, A new pyrazole-carboxamide type synthetic cannabinoid AB-CHFUPYCA [N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide] identified in illegal products, *Forensic Toxicology*, 33, 367–373
- [56]. Dresen, S., Kneisel, S., Weinmann, W., Zimmermann, R. ve Auwartera, V., 2011, Development and validation of a liquid chromatography–tandemmass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type andmethanandamide in serum and its application to forensic samples, *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 163–171
- [57]. Dresen, S., Gergov, M., Politi, L., Halter, C. ve Weinmann, W., 2009, ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 2521–2526
- [58]. Dresen, S., Kempf, J. ve Weinmann, W., 2006, Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification, *Forensic Science International*, 161, 86–91

- [59]. Lopez-Avila, V., 2013, Identification of Designer Drugs using Gas Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry and A Soft-Ionization Source, *Journal of Forensic Science & Criminology*, 1(3), 1-11
- [60]. Kneisel, S. ve 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, 825–835
- [61]. Nakajima, J., Takahashi, M., Seto, T., Kanai, C., Suzuki, J., Yoshida, M. ve Hamano, T., 2011, Identification and quantitation of two benzoylindoles AM-694 and (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone, and three cannabimimetic naphthoylindoles JWH-210, JWH-122, and JWH-019 as adulterants in illegal products obtained via the Internet, *Forensic Toxicology*, 29, 95–110
- [62]. Hasegawa, K., Wurita, A., Minakata, K., Gonmori, K., Yamagishi, I., Nozawa, H., Watanabe, K. ve Suzuki, O., 2015, Identification and quantitation of 5-fluoro-ADB, one of the most dangerous synthetic cannabinoids, in the stomach contents and solid tissues of a human cadaver and in some herbal products, *Forensic Toxicology*, 33 (1), 112–121,
- [63]. Nakajima, J., Takahashi, M., Nonaka, R., Seto, T., Suzuki, J., Yoshida, M., Kanai, C. ve Hamano, T., 2011, Identification and quantitation of a benzoylindole (2-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone and a naphthoylindole 1-(5-fluoropentyl-1H-indol-3-yl)-(naphthalene-1-yl)methanone (AM-2201) found in illegal products obtained via the Internet and their cannabimimetic effects evaluated by in vitro [³⁵S]GTPγS binding assays, *Forensic Toxicology*, 29, 132–141
- [64]. Pore D.M., Desai U.V., Thopate T.S., Wadgaonkar P.P., 2006, A mild, expedient, solventless synthesis of bis(indolyl)alkanes using silica sulfuric acid as a reusable catalyst, *Arkivoc*, 12, 75-80
- [65]. Tsujikawa K., Yamamuro T., Kuwayama K., Kanamori T., Iwata Y.T., Inoue H., Thermal degradation of a new synthetic cannabinoid QUPIC during analysis by gas chromatography–mass spectrometry, 2017, *Forensic Toxicology*, 35(1), 95-103

- [66]. Gurney S. M. R., Scott K. S., Kacinko S. L., Presley B. C., Logan B. K., 2014, Pharmacology, Toxicology, and Adverse Effects of Synthetic Cannabinoid Drugs, *Forensic Science Review*, 26-1, 53-78
- [67]. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. ve Wothers, P., 2001, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Floransa-İtalya, ISBN 0-19-850346-6
- [68]. Castaneto, M.S., Gorelick, D.A., Desrosiers, N.A., Hartman, R.L., Pirard, S. ve Huestis, M.A., 2014, Synthetic Cannabinoids: Epidemiology, Pharmacodynamics, and Clinical Implications, *Drug and Alcohol Dependence*, 1, 12–41
- [69]. Durmuş, H., 2014, *Uyuşturucu maddelerin saflığı/Etki gücü*, Türkiye Uyuşturucu Raporu 2014, Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM), 10.4.2, Korza Yayıncılık, Ankara, ISBN:978-605-149-685-6, 136-138

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hasan DURMUŞ
Doğum Yeri	Çal/DENİZLİ
Doğum Tarihi	03.07.1982
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0 505 543 01 96
E-Posta Adresi	hdurmus1@gmail.com
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2005

Yüksek Lisans	
Üniversite	Dokuz Eylül Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya
Programı	Kimya
Mezuniyet Tarihi	2008

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya Programı
Mezuniyet Tarihi	2017

Makale ve Bildiriler	
[1]. Erçağ, E., Durmuş, H., Arda, A.Ü. ve Apak, R., Nitro-Aromatik Sınıfı Enerjetik Maddelerin İyon Mobilite Spektrometri (IMS) ile Tayin Edilmesi", 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Erzurum, TÜRKİYE, 21-25 Haziran 2010, (Bildiri Özetleri Kitapçığı s.145) (poster bildirisi birincilik ödülü)	