

AYKUT KUL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(DOKTORA TEZİ)

**ESRAR KULLANIMININ TESPİTİNDE ENZİMATİK
HİDROLİZ ETKİNLİĞİNİN ULTRA PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ TANDEM KÜTLE
SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

AYKUT KUL

**DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET OLCAY SAĞIRLI**

ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI



BEYAN

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



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, bilgisini ve desteğini esirgemeyerek her konuda her zaman anlayış ve yol gösteren, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum çok değerli sevgili hocam İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet Olcay SAĞIRLI'ya;

Yüksek lisans danışmanım, çok değerli sevgili hocam Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşen Kurt Cücü'ye;

Akademik hayatımda üzerimde büyük emeği olan ve Üsküdar Üniversitesi İleri Toksikoloji ve Analiz Laboratuvarı'nda çalıştığım süre boyunca laboratuvar sorumlum olan çok değerli sevgili hocam Uzm. Ecz. Selma ÖZİLHAN'a;

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Üsküdar Üniversitesi İleri Toksikoloji ve Analiz Laboratuvarı'nda yöneticilerim olan ve aramızdan ayrılan çok değerli sevgili hocalarım Prof. Dr. Salih Tuncel ÖZDEN ve Prof. Dr. Uğur ATİK'e;

Üsküdar Üniversitesi İleri Toksikoloji ve Analiz Laboratuvarı'nda çalışma arkadaşım sevgili Uzm. Mol. Tıp. Murat ÖZDEMİR'e;

Destek ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız sevgili Öğretim Üyelerine ve sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Bugüne kadar bana emeği geçen tüm hocalarıma;

Tez çalışmamda ve hayatımda aldığım tüm kararlarda beni yalnız bırakmayan eşim Büşra KUL, babam Mustafa KUL, annem Fatma KUL, kardeşim Elçin YAŞAR ve üzerimde emeği olan herkese tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-36347

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kenevir Bitkisi	3
2.2. Kenevir Kullanımının Tarihçesi	4
2.3. Endüstriyel esrar	4
2.4. Kenevirin Yasaklı Ürünleri.....	4
2.5. Farmakolojik Etkileri	5
2.6. Terapötik Potansiyeli	5
2.7. Esrarın Farmakokinetiği.....	6
2.7.1. Absorpsiyon	6
2.7.2. Dağılım.....	6
2.7.3. Metabolizma.....	6
2.7.4. Atılım	7
2.7.5. Biyolojik Sıvılarda Esrar Kullanımının Belirlenmesi	7
2.7.6. Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS).....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	10
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler	10
3.3. Çözeltilerinin Hazırlanması	10
3.3.1. THC-COOH Çözeltilisinin Hazırlanması	10
3.3.2. THC-COOH-d3 Çözeltilisinin Hazırlanması	11

3.3.3. THC-COOH Glukuronid Çözeltisinin Hazırlanması.....	11
3.3.4. Amonyum Format Tampon Çözeltisi 1 Hazırlanması	11
3.3.5. Amonyum Format Tampon Çözeltisi 2 Hazırlanması	11
3.3.6. β -d-Glukuronidaz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	11
3.3.7. Mobil Faz A (5,0 mM Amonyum Format Tampon Çözeltisi).....	11
3.3.8. Mobil Faz B (%0,1'lik Formik Asit İçeren Asetonitril)	11
3.3.9. Yıkama Çözelti 1 (Seal Wash).....	12
3.3.10. Yıkama Çözelti 2 (Strong Wash)	12
3.3.11. Yıkama Çözelti 3 (Weak Wash)	12
3.3.12. Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması	12
3.3.13. Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması.....	12
3.3.14. Hidroliz deneyi için THC-COOH Glukuronid Örneklerinin Hazırlanması....	12
3.3.15. Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	12
3.4. Optimum Hidroliz Şartının Belirlenmesi.....	13
3.5. Yöntemin Validasyonu	13
3.5.1. Seçicilik (Selectivity).....	13
3.5.2. Kantitatif Alt Sınırı (LLOQ).....	13
3.5.3. Kalibrasyon Eğrisi Performansı (Calibration Curve Performance)	14
3.5.4. Enjeksiyonlar Arası Taşıma (Carry-over).....	14
3.5.5. Doğruluk (Accuracy)	14
3.5.6. Kesinlik (Precision).....	15
3.5.7. Stabilite (Stability)	15
3.5.8. Seyreltme Bütünlüğü (Dilution Integrity).....	16
3.5.9. Matriks Etkisi (Matrix Effects).....	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. UPLC-MS/MS Analiz Parametreleri	17
4.2. Optimum Hidroliz Şartının Belirlenmesi.....	17
4.3. Yöntemin Validasyonu	24
4.3.1. Seçicilik (Selectivity).....	24
4.3.2. Kantitatif Alt Sınırı (LLOQ).....	27
4.3.3. Kalibrasyon Eğrisi Performansı (Calibration Curve Performance)	27
4.3.4. Enjeksiyonlar Arası Taşıma (Carry-over).....	29
4.3.5. Doğruluk (Accuracy)	30

4.3.6. Kesinlik (Precision).....	30
4.3.7. Stabilit� (Stability)	31
4.3.8. Seyreltme B�t�nl��� (Dilution Integrity).....	32
4.3.9. Matriks Etkisi (Matrix Effects).....	32
5. TARTI�MA	34
KAYNAKLAR	37
ET�K KURUL KARARI	41
�NT�HAL RAPORU �LK SAYFASI.....	42
�ZGE�M��	HATA! YER ��ARET� TANIMLANMAMI��.



TABLolar LİSTESİ

Tablo 4-1: Standartlar için günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3)	28
Tablo 4-2: Kalite Kontrol Örnekleri Gün-içi % Doğruluk Değerleri (n=6)	30
Tablo 4-3: Kalite Kontrol Örnekleri Günler-arası % Doğruluk Değerleri (n=18)	30
Tablo 4-4: Kalite Kontrol Örnekleri Gün-içi % CV Kesinlik Değerleri (n=6).....	31
Tablo 4-5: Kalite Kontrol Örnekleri Günler-arası % CV Kesinlik Değerleri (n=18).....	31
Tablo 4-6: -20 °C’de 4 Haftalık Stabilitate Çalışması Verileri (n=6)	31
Tablo 4-7: 24 Saat Otoörnekleyici Stabilitate Çalışması Verileri (n=6)	32
Tablo 4-8: Dondurma-çözme Stabilitate Çalışması Verileri (n=6)	32
Tablo 4-9: Seyreltme Bütünlüğü Çalışması Verileri (n=6)	32
Tablo 4-10: Matriks Etkisi Çalışması Verileri.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kenevir bitkisi	3
Şekil 2-2: Delta-9-tetrahidrokannabinol'ün Metabolizma Reaksiyonları	7
Şekil 2-3: LC-MS/MS Cihazının temel bileşenleri (Waters Aplikasyon Notu)	8
Şekil 2-4: İyonizasyon kaynaklarının polarite ve molekül ağırlığına göre kullanımı	9
Şekil 4-1: 37 °C'de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı	18
Şekil 4-2: 55 °C'de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı	19
Şekil 4-3: 75 °C'de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı	20
Şekil 4-4: 90 °C'de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı	21
Şekil 4-5: Belirlenen optimum koşullar altında THC-COOH konsantrasyonun hidroliz zamana karşı değışim grafiğı	22
Şekil 4-6: Optimum koşullar altında hidroliz sonrası elde edilen THC-COOH glukuronid kromatogramı	23
Şekil 4-7: Derişimi 4 ng/mL olan THC-COOH glukuronid örneğı kromatogramı	24
Şekil 4-8: THC-COOH için boş örnek kromatogramı	25
Şekil 4-9: THC-COOH-d3 için boş örnek kromatogramı	25
Şekil 4-10: THC-COOH için LLOQ örneğı kromatogramı	26
Şekil 4-11: İç standart örneğı kromatogramı	27
Şekil 4-12: Birinci gün kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 4-13: İkinci gün kalibrasyon eğrisi	29
Şekil 4-14: Üçüncü gün kalibrasyon eğrisi	29

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Δ^9 -THC	: Δ^9 -tetrahidrokanabinol
11-OH-THC	: 11-hidroksi-THC
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
%	: Yüzde
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
APCI	: Atmosforik Basınç Kimyasal İyonizasyon
APPI	: Atmosforik Basınç Foto İyonizasyon
C_{ortalama}	: Ortalama Konsantrasyon
C_{teorik}	: Teorik Konsantrasyon
CV	: Varyasyon Katsayısı
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
IS	: İç Standart
kV	: Kilovolt
L	: Litre
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi
LLOQ	: Kantitatif Alt Sınırı
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
m/z	: Kütle/Yük
MF	: Matriks Faktör
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
nm	: Nanometre

ng	: Nanogram
QC	: Kalite Kontrol
s	: Saniye
SD	: Standart Sapma
THC	: Tetrahidrokannabinol
THC-COOH	: 11-nor-9-karboksi- Δ^9 -THC
ULOQ	: Yüksek Kalibrasyon Üst Sınırı
UPLC-MS/MS:	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi



ÖZET

Kul, A. (2022). Esrar Kullanımının Tespitinde Enzimatik Hidroliz Etkinliğinin Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi Yöntemiyle Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Esrar halen dünyada en yaygın kullanılan yasadışı uyuşturucu maddedir. Biyolojik sıvılarda esrar kullanımını belirlemek için seçici, hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. İdrar, esrar kullanımının tespitinde uzun süre belirlenebildiği için en fazla tercih edilen biyolojik materyaldir. İdrar yapılan bu analizlerde enzimatik hidroliz uygulanmaktadır. Bu çalışmada, esrar kullanımının tespitinde enzimatik hidroliz etkinliğinin ultra performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, enzimatik hidrolizin etkinliğini belirlemek için enzim konsantrasyonu, pH ve sıcaklık parametreleri incelenmiştir. Literatürden farklı olarak 75 °C ve 90 °C sıcaklıklarda enzimatik hidroliz etkinliği deneysel olarak araştırılmıştır. Enzimatik hidroliz optimizasyonundan sonra geliştirilen yöntem, Avrupa İlaç Ajansı Biyoanalitik Yöntem Kılavuzu parametrelerine göre valide edilerek gerçek örneklerin analizi gerçekleştirilmiştir.

Enzimatik hidroliz verimi 75 °C ve 90 °C'de literatüre göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu iki sıcaklık için benzer sonuçlar elde edildiğinden, valide edilen yöntem için 75 °C seçilmiştir. Kalibrasyon eğrisi aralığı, 1-2000 ng/mL arasında doğrusal olarak belirlenmiştir.

Avrupa İlaç Ajansı Biyoanalitik Yöntem Kılavuzu'na göre valide edilen yöntem, gerçek numune analizlerine başarıyla uygulanarak toplam 11-nor-9-karboksi- Δ 9-THC miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen bu yöntemin esrar kullanımının belirlenmesinde hızlı, kolay ve güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Esrar, Enzimatik Hidroliz, UPLC-MS/MS, Validasyon, İdrar

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-36347

ABSTRACT

Kul, A. (2022). Determination of Enzymatic Hydrolysis Efficiency in Detection of Cannabis Use by Ultra Performance Liquid Chromatography by Tandem Mass Spectrometry Method. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Doctoral Thesis. Istanbul.

Marijuana is still the most widely used illegal drug in the world. Selective, rapid and reliable methods are needed to identify cannabis use in biological fluids. Urine is the most preferred biological material because it can be detected for a long time in the detection of cannabis use. In these analyzes of urine, enzymatic hydrolysis is applied. In this study, it was aimed to determine the enzymatic hydrolysis efficiency in the detection of cannabis use by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method.

In this thesis study, enzyme concentration, pH and temperature parameters were investigated to determine the efficiency of enzymatic hydrolysis. Unlike the literature, the enzymatic hydrolysis efficiency was investigated experimentally at temperatures of 75 °C and 90 °C. After the enzymatic hydrolysis optimization, the developed method was validated according to the parameters of the European Medicines Agency Bioanalytical Method Guide and analysis of real samples was performed.

It was determined that the enzymatic hydrolysis efficiency was higher at 75°C and 90°C compared to the literature. Since similar results were obtained for these two temperatures, 75°C was chosen for the validated method. The calibration curve range was linearly determined from 1-2000 ng/mL.

The method, which was validated according to the European Medicines Agency's Bioanalytical Method Guide, was successfully applied to real sample analyzes and total 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC concentrations were determined. The results showed that this developed method can be used quickly, easily and safely in determining cannabis use.

Key Words: Marijuana, Enzymatic Hydrolysis, UPLC-MS/MS, Validation, Urine

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2020-36347

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kenevir bitkisinden elde edilen esrar dünyada halen en yaygın kullanılan yasa dışı uyuşturucu maddedir (1). Esrar kullanımının insan davranışları üzerinde; öfori ve gevşeme duygusu, değişen zaman algısı, konsantrasyon eksikliği, öğrenme bozukluğu, hafıza bozukluğu ve paranoya gibi etkileri vardır (2). Esrar yüzün üzerinde kannabinoid içerir (3). Bu kannabinoidlerden Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC), en yaygın bulunan kannabinoiddir (4). Esrar kullanımından sonra, THC karaciğerde 11-hidroksi-THC (11-OH-THC) ve 11-nor-9-karboksi- Δ^9 -THC (THC-COOH) (11-nor-9-THC- Δ -karboksilik asit)'e metabolize olur ve çoğu glukuronidasyona uğrar. 11-OH-THC ve 11-OH-THC glukuronid vücuttan dışkıyla atılırken, THC-COOH ve THC-COOH glukuronid idrarla atılır (5).

Birçok ülkede esrar kullanımı yasaklanmıştır (6). Bu nedenle biyolojik sıvılarda esrar kullanımını belirlemek için seçici, hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (7). Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemleri adli analizlerde altın standart olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (8). Asidik ve nötral formlar LC-MS/MS yöntemi ile birlikte analiz edilebildiği için LC-MS/MS yöntemi GC-MS yöntemine tercih edilmektedir (9). Esrar kullanımı biyolojik sıvılarda (4, 5, 10) ve saçta (11) LC-MS/MS ile tespit edilebilmektedir. THC yağ dokusunda birikerek vücutta uzun süre kalmaktadır (12). THC-COOH, kronik esrar kullanıcısının idrar örneğinde 24 gün boyunca belirlenebilmektedir (13). İlaçların tespit süresinin diğer biyolojik sıvılara göre daha uzun olması ve numune hazırlama işleminin daha basit olması sebebiyle idrar analizi diğer biyolojik numunelere göre daha fazla tercih edilmektedir (14). İdrar örneğinde THC-COOH belirlemek için enzimatik (4, 15-20) veya alkali (17, 21-24) hidrolizinden sonra toplam miktar belirlenmektedir. Literatürdeki çalışmalarda farklı enzimatik hidroliz koşulları kullanılmıştır (4, 15-20).

Bu çalışmada, esrar kullanımının tespitinde enzimatik hidroliz etkinliğinin ultra performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Hidroliz optimizasyonu çalışmasında, literatürde bulunan sıcaklık değerlerinden farklı çalışmalar yaparak uzun olan hidroliz süresinde önemli bir azalma hedeflenmiştir. Ayrıca, toplam THC-COOH tayini için hızlı bir analitik

yöntem geliştirilerek valide edilmesi ve bu yöntemin gerçek numunelere uygulanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kenevir Bitkisi

Kenevir bitkisi (*Cannabis sativa* L.) (Şekil 2-1), eski zamanlardan beri esas olarak Orta Asya'da (Hindistan ve Çin) yetiştirilen otsu yıllık bir bitkidir (25). Kenevir bitkisi yüzyıllar boyunca lif, gıda, yağ ve ilaç kaynağı olarak ve ayrıca eğlence ve dini amaçlarla kullanılmıştır (25, 26). Kannabinoidler , terpenoidler , flavonoidler ve alkaloidler gibi bir dizi kimyasal olarak aktif bileşik içerir. En aktif bileşikler, esas olarak dişi çiçeklerin trikom boşluğunda biriken bir terpenofenolik bileşikler sınıfı olan kannabinoidlerdir (27). Şimdiye kadar tanımlanan 100'den fazla kannabinoidden en güçlü olanı, esas olarak psikoaktif etkilerden sorumlu olan trans- Δ^9 -tetrahidrokannabinol'dür (Δ^9 -THC) (28).



Şekil 2-1: Kenevir bitkisi

2.2. Kenevir Kullanımının Tarihçesi

Esrar için ilk olarak MÖ 2700'de Çin imparatoru Shen Nung'un yazısında doğrudan atıf yapılmıştır. Hindistan'da kenevir MÖ 1000'de eğlence ve tıbbi amaçlı kullanılmıştır. Yunan tarihçi Herodot (MÖ 480) Orta Asya'daki İskitlerin keneviri kendilerini mest etmek için kullandığını anlatmıştır. 12. Yüzyıl'da esrar kullanımı İran ve Kuzey Afrika'ya hızla yayılmıştır. Esrarın MÖ 1500'de Avrupa'ya ulaştığı düşünülmektedir ve neredeyse tüm Farmakopelerden çıkarılincaya kadar, tıbbi ve tarımsal olarak kullanılmıştır. Son 50 yılda, sosyal ortamlarda sosyalliği artırmak ve coşkulu ve sarhoş edici etkiler yaratmak için ergenler ve genç yetişkinler tarafından eğlence amaçlı kullanım için giderek daha fazla benimsenmiştir (29-31).

2.3. Endüstriyel Esrar

Kenevir bitkisi tıbbi ve endüstriyel amaçla üretilmektedir. Kenevirin (lifi, sapı ve yağı) tekstil, endüstriyel ürünler, yapı malzemeleri, kağıt, enerji, çevresel ürünler, gıda, yem ve kozmetik gibi bir çok kullanım alanı vardır (32). Kenevir hemen hemen her ülkede giderek daha fazla yetiştirilmektedir. Toplam THC içeriği, endüstriyel tip keneviri tanımlamak için kullanılır. Endüstriyel tip kenevirlerde THC oranının üst sınırı Kanada için % 0,3 ve Avrupa Birliği için % 0,2 olarak bildirilmiştir (33).

2.4. Kenevirin Yasaklı Ürünleri

Kenevir ürünleri, yasa dışı uyuşturucu pazarında açık ara en çok suistimal edilen uyuşturuculardır (34). Kenevir bir çok ülkede yetiştirilebilir ve giderek daha fazla yetiştirilmektedir (35). Dişi kenevir bitkisinde erkek kenevir bitkisine göre beş kat daha fazla psiko-aktif madde olan Δ^9 -THC bulunur. Bundan dolayı yasaklı ürünler için dişi kenevir bitkisi yetiştirilir (36). Kenevir genellikle esrar sigarası şeklinde içilir (37). Aynı zamanda çiğnenerek, gıda maddelerine ve alkollü içkilere karıştırılarak oral yolla da alınır (38,39).

Bitkisel kenevir (marihuana) hemen her ülkede üretimi yapılarak geniş bir alana yayılmıştır. Ülkemizde esrar olarak bilinen bitkisel kenevir bitkisinin kısımları (yaprak, sap ve çiçek) ayrı ayrı ya da birlikte kurutulup toz edilmesi ile elde edilir (33,40).

Glandüler trikomlarda üretilen bitkinin reçineli salgıları toplanarak daha yüksek Δ^9 -THC içeren kenevir reçinesi (haşhiş) elde edilir (33,40).

Esrar veya haşhiş bir organik çözücü yardımıyla özütlenerek sıvı esrar (esrar yağı) çıkarılır. Genel olarak, ister bitkisel kenevirden ister kenevir reçinesinden yapılmış olsun, sıvı kenevir koyu renkli ve macun kıvamındadır (33,40).

2.5. Farmakolojik Etkileri

Esrar kullanımı, davranışsal ve fizyolojik değişikliklere neden olur. Literatürde; öfori, rahatlama duyguları, değişen zaman algısı, konsantrasyon eksikliği, panik reaksiyonları, paranoya, bozulmuş öğrenme ve hafıza gibi davranışsal değişiklikler belirtilmiştir. Konjonktival sufüzyon, ağız ve boğaz kuruluğu, iştah artışı, vazodilatasyon, solunum hızının azalması, kalp hızı ve diyastolik kan basıncıda hızlı değişiklikler sık görülen fizyolojik etkiler arasında yer alır. Esrar, bağışıklık ve endokrin sistemlerini etkiler, akciğer hasarı ve EEG değişikliklerine yol açar (41). Ayrıca, yenidoğan ve çocuk gelişimini olumsuz etkiler (42).

Esrar kullanımından sonra 3-6 saat içinde THC'nin davranışsal ve fizyolojik etkilerinin çoğu temel seviyelere döner, ancak bazı çalışmalarda kullanımdan 24 saat sonrasına kadar spesifik davranışların devam ettiği görülmüştür (2).

2.6. Terapötik Potansiyeli

Kenevir bitkisi binlerce yıldır geleneksel ilaçlarda kullanılmaktadır. Esrar kaynaklı analjezi, esrarın tıbbi olarak kullanılmasının en yaygın nedenidir. Günümüzde sentetik kannabinoid olarak bilinen THC'nin sentetik kimyasal analogları yapıldı. Yapısal olarak THC'nin aktivitesine benzeyen veya bu aktiviteyi taklit eden birkaç yenilikçi ilaç, kronik ağrı, epilepsi ve multipl skleroz gibi durumların tedavisi ve iştah uyarıcıları olarak kullanım için klinik olarak geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Tıbbi esrar hastaları, en az yan etki ile semptomlarda ve yaşam kalitesinde en iyi iyileşmeyi sağlamak için sıklıkla minimum miktarda THC içeren CBD baskın ürünleri kullanır. Multipl skleroz'lu hastalar, spastisite, gevşeme, titreme, ağrı, uyku ve anksiyete gibi farklı endikasyonlar için çeşitli kannabinoid bileşikleri reçetesiz veya yasadışı olarak kullanırlar. Kannabinoidlerin anti-inflamatuar etkisi, inflamatuvar faktörleri azaltarak multipl sklerozda hastalık aktivitesini baskılamaya yardımcı olabilir. Kannabinoidler ayrıca kanserde ağrıyı hafifletmek, iştahı uyarmak ve mide bulantısını gidermek için palyatif bakımda kullanılır (43).

2.7. Esrarın Farmakokinetiği

2.7.1. Absorpsiyon

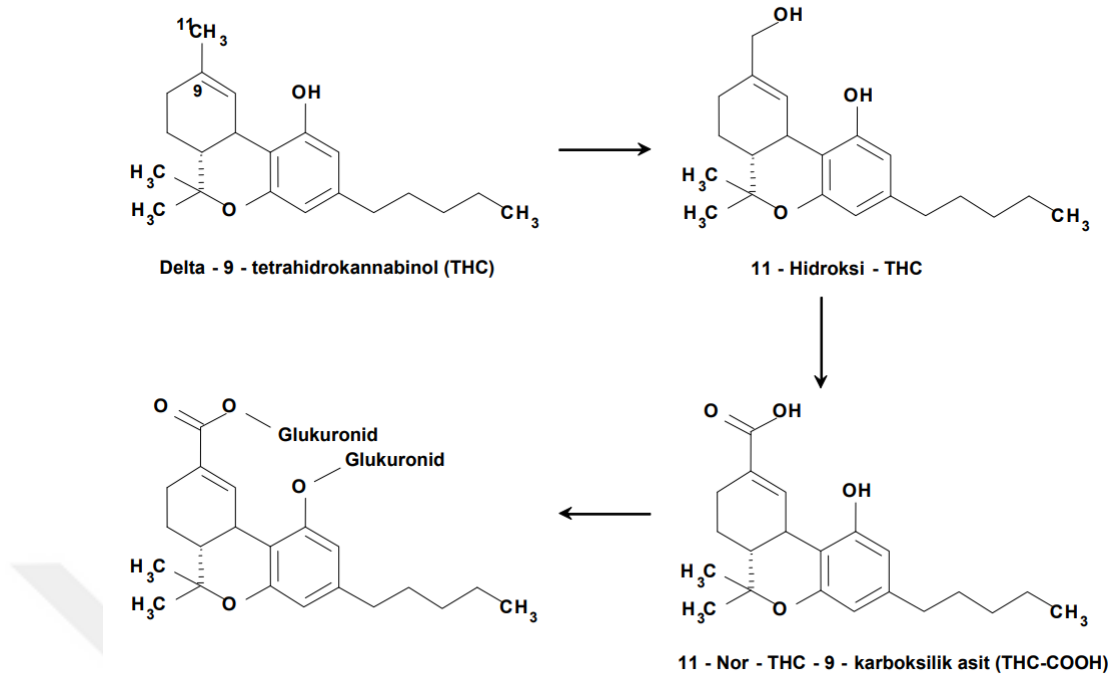
Esrar genellikle sigara gibi içilir. Esrarın merkezi sinir sistemine hemen etkilemesi nedeniyle yoğun zevkli ve güçlü pekiştirici etkiler üretilebilir (44). Sigara gibi içme yolunun ardından biyoyararlanımın kişiler arası değişkenliğe bağlı olarak %10-50 olduğu bildirilmiştir. Nefeslerin sayısı, süresi ve aralığı, tutma süresi ve inhalasyon hacmi, esrara maruz kalma derecesini büyük ölçüde etkiler. THC, esrar dumanının ilk nefeste solunmasından sonraki saniyeler içinde plazmada ölçülebilir. Genellikle 6-10 dakika içinde THC'nin plazma konsantrasyonu maksimuma ulaşır. Esrarın yutularak kullanımında yaygındır. Bu tür kullanım sonrası absorpsiyon sigara gibi kullanıma göre yavaş ve daha düşüktür. Susam yağında ve çikolatalı kurabiyede 15-20 mg esrar alımından yaklaşık 1-6 saat sonra THC'nin plazma konsantrasyonu maksimuma ulaşır. Oral kullanımdan sonra biyoyararlanımın %4-20 olduğu gözlemlenmiştir (2,45,46).

2.7.2. Dağılım

Esrar kullanımından sonra THC dokulara hızla dağılır ve dağılım hacmi 10 L/kg'dır. THC oldukça lipofiliktir ve organlar (kalp, beyin, akciğer ve karaciğer) tarafından hızlıca alınır. THC derişimi karaciğerde metabolize olduğundan derişimi hızla azalır. THC'nin %95-99 kadar bir kısmı plazmada başlıca lipoproteinlere bağlıdır. Uzun süreli esrar kullanımında THC lipofilik özelliklerinden dolayı yağ dokularda birikir. Ayrıca, THC'nin plasentaya hızlı bir şekilde geçtiği görülmüştür (2,45,46).

2.7.3. Metabolizma

Esrarın psikoaktif bileşeni THC karaciğerde sitokrom P450 enzimleriyle dokuzuncu karbon atomundan hidroksilasyona uğrar ve aktif metabolit 11-OH-THC oluşur. 11-OH-THC'nin oksidasyonu ile inaktif bir metabolit olan THC-COOH oluşur. THC-COOH glukuronidasyona uğrayarak 1 veya 2 glukuronid içeren bir molekül oluşturur. THC'nin metabolizma reaksiyonları Şekil 2-2'de gösterilmiştir (2,45,46).



Şekil 2-2: Delta-9-tetrahidrokannabinol'ün Metabolizma Reaksiyonları

2.7.4. Atılım

Esrar kullanımından sonra, THC'nin % 65'ten fazlası 11-OH-THC ve 11-OH-THC glukuronid olarak dışkıyla vücuttan atılırken, yaklaşık % 20'si THC-COOH ve THC-COOH glukuronid olarak idrarla atılır. THC-COOH'ın terminal üriner atılım yarı ömrü 3-4 gündür (2,45,46).

2.7.5. Biyolojik Sıvılarda Esrar Kullanımının Belirlenmesi

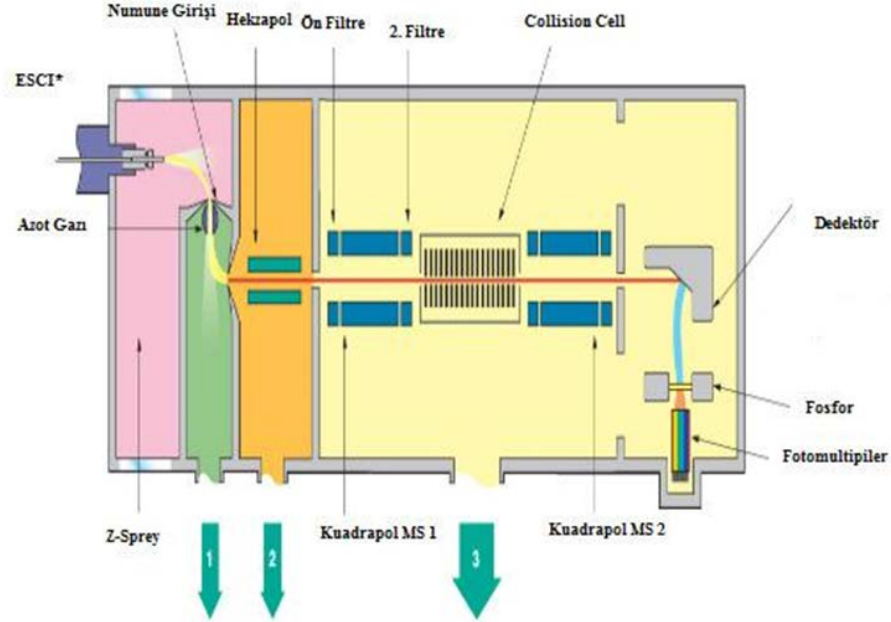
Rutin laboratuvar uygulamalarında immunoassay ve kromatografik birçok yöntem kullanılırken, doğrulama amacıyla kütle spektrometresi ile birlikte kromatografik ölçüm metotlarının kullanılması önerilmekte ve matriks etkilenmesindeki avantaj dolayısıyla altın standart olarak kabul edilmektedir. Asidik ve nötral formlar LC-MS/MS yöntemi ile birlikte analiz edilebildiği için LC-MS/MS yöntemi GC-MS yöntemine tercih edilmektedir (9). Esrar kullanımı biyolojik sıvılarda (4, 5, 10) ve saçta (11) LC-MS/MS ile tespit edilebilmektedir. THC yağ dokusunda birikerek vücutta uzun süre kalmaktadır (12). THC-COOH, kronik esrar kullanıcısının idrar örneğinde 24 gün boyunca belirlenebilmektedir (13). İlaçların tespit süresinin diğer biyolojik sıvılara göre daha uzun olması ve numune hazırlama işleminin daha basit olması sebebiyle idrar analizi diğer biyolojik numunelere göre daha fazla tercih edilmektedir (14). İdrar örneğinde THC-

COOH belirlemek için enzimatik (4, 15-20) veya alkali (17, 21-24) hidrolizinden sonra toplam miktar belirlenmektedir.

2.7.6. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

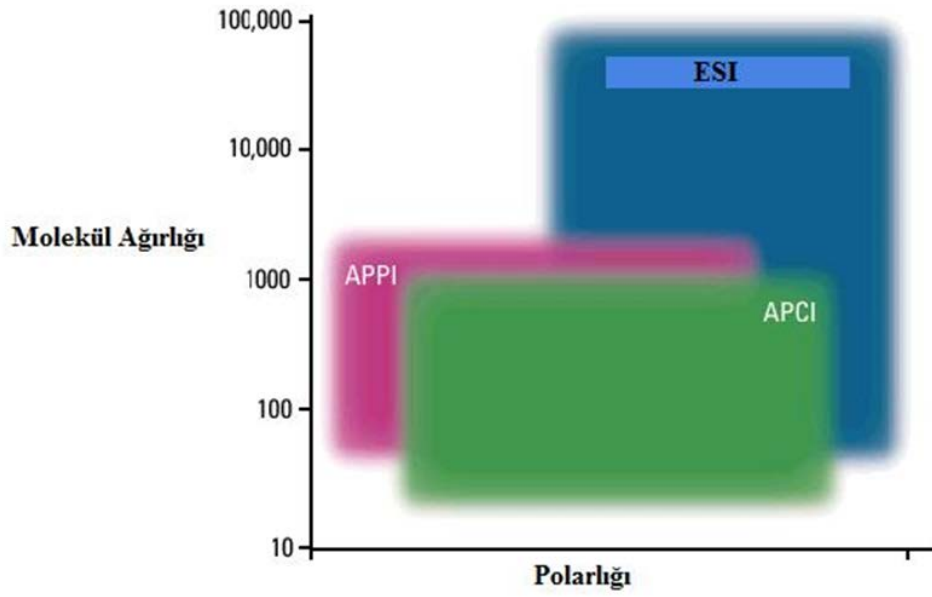
Karmaşık matrikslerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde seçiciliğinin ve hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle LC-MS/MS cihazı tercih edilmektedir (47).

Bu yöntemde kromatografik olarak ayrımı yapılan analit molekülleri gaz fazına geçer ve kütle dedektörü ile analiz edilir (48). LC-MS/MS cihazında kullanılan kütle dedektörünün temel bileşenleri Şekil 2-3'de gösterilmiştir.



Şekil 2-3: LC-MS/MS Cihazının temel bileşenleri (Waters Aplikasyon Notu)

Analizi yapılacak moleküllerin polarlığı ve molekül kütlesine göre LC-MS/MS cihazında; elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınç foto iyonizasyon (APPI) sistemleri kullanılır. İyonizasyon kaynaklarının polarite ve molekül ağırlığına göre kullanımı Şekil 2-4' de gösterilmektedir (49).



Şekil 2-4: İyonizasyon kaynaklarının polarite ve molekül ağırlığına göre kullanımı

Bu çalışmada ESI sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde, kolondan çözücü ile birlikte gelen analit vakumlu ortamda püskürtülür, ısıtılmış kurutucu gaz ve güçlü bir elektrik alan uygulanması sonucu iyonlaşarak kütle dedektörüne gönderilir (50).

LC-MS/MS cihazının yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların oranının az olması, hassas ve güvenilir bir yöntem olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, analiz maliyeti açısından ekonomik olması, çok az miktarda örnek ile çalışılabilmesi ve tek bir analiz ile birçok ilaç etken maddesinin aynı anda taranması gibi birçok avantajı vardır (51,52).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler yüksek analitik saflıkta olup aşağıda belirtilmiştir.

THC-COOH çözeltisi (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya),

THC-COOH-d3 çözeltisi (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya),

THC-COOH glukuronid çözeltisi (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Almanya),

Metanol (Merck, Darmstadt, Almanya),

Asetonitril (Merck, Darmstadt, Almanya),

Formik asit (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

Amonyum format (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD),

β -d-glukuronidaz (palette vulga) enzimi (Fluka – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD),

Ultra saf su.

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Tez çalışmasında yer alan deneylerde Üsküdar Üniversitesi İleri Toksikoloji ve Analiz Laboratuvarı bünyesinde bulunan UPLC-MS/MS (Waters ACQUITY TQD), vorteks (Heidolph), pH metre (Mettler Toledo FG2), terazi (Mettler Toledo AL), etüv (Binder RL10), pipet seti (Eppendorf), -20 °C derin dondurucu (Uğur) cihazları ve İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı bünyesinde bulunan santrifüj (Hettich Rotofix), saf su cihazı (Elga Pure Lab Option-Q), sonikatör (Bandelin) cihazları ile cam malzemeler (balon joje, mezür) (İsolab) kullanılmıştır.

3.3. Çözeltilerinin Hazırlanması

3.3.1. THC-COOH Çözeltisinin Hazırlanması

Metanol içersindeki derişimi 1,00 mg/mL olan çözeltinin 200 μ L'si 10 mL'lik balon joje içine konularak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Son çözelti derişimi 20.000 ng/mL'dir.

3.3.2. THC-COOH-d3 Çözeltisinin Hazırlanması

İç standart (IS) olarak kullanılmak üzere metanol içersindeki derişimi 1,00 mg/mL olan THC-COOH-d3 çözeltisinin 80 µL'si 10 mL'lik balon joje içine konularak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Son çözelti derişimi 8.000 ng/mL'dir.

3.3.3. THC-COOH Glukuronid Çözeltisinin Hazırlanması

Metanol içersindeki derişimi 1,00 mg/mL olan çözeltinin 200 µL'si 10 mL'lik balon joje içine konularak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Son çözelti derişimi 20.000 ng/mL'dir.

3.3.4. Amonyum Format Tampon Çözeltisi 1 Hazırlanması

Amonyum format maddesinden 2,95 gram tam olarak tartılıp, 100,00 mL'lik balon jojede su ile hacmine tamamlanmıştır. Formik asit ile pH'ı 5,00'a ayarlanmıştır.

3.3.5. Amonyum Format Tampon Çözeltisi 2 Hazırlanması

Amonyum format maddesinden 9,33 gram tam olarak tartılıp, 100,00 mL'lik balon jojede su ile hacmine tamamlanmıştır. Formik asit ile pH'ı 6,50'ye ayarlanmıştır.

3.3.6. β-d-Glukuronidaz Çözeltilerinin Hazırlanması

β-d-glukuronidaz çözeltileri derişimleri; 1500, 3000 ve 6500 ünite/100 µL amonyum format tampon çözeltisi 1 ve 1500, 3000 ve 6500 ünite/100 µL amonyum format tampon çözeltisi 2 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.3.7. Mobil Faz A (5,0 mM Amonyum Format Tampon Çözeltisi)

314,00 mg amonyum format maddesi 2 L lik bir behere alınarak 900 mL ultra saf suda tamamen çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Çözeltinin pH değeri manyetik karıştırıcı eşliğinde damla damla derişik formik asit eklenerek tam olarak 3,00'e ayarlanmıştır. Çözelti 1,0 L'lik balon jojeye aktararak, ultra saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.8. Mobil Faz B (%0,1'lik Formik Asit İçeren Asetonitril)

1,0 L'lik balon jojeye 1,0 mL derişik formik asit konularak asetonitril ile hacmine tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.9. Yıkama Çözelti 1 (Seal Wash)

1,0 L'lik balon jojeye 200,0 mL metanol ilave edilerek, ultra saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.10. Yıkama Çözelti 2 (Strong Wash)

1,0 L'lik balon jojeye 950,0 mL asetonitril ilave edilerek, ultra saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.11. Yıkama Çözelti 3 (Weak Wash)

1,0 L'lik balon jojeye 100,0 mL asetonitril ilave edilerek, ultra saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.12. Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için herbir seviyeden 3'er adet olacak şekilde 1, 4, 8, 200, 400, 800, 1200 ve 2000 ng/mL derişime sahip kalibrasyon standartları, THC-COOH çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak idrar içerisinde hazırlanmıştır.

3.3.13. Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması

Herbir seviyeden 18'er adet olacak şekilde 1, 3, 1000 ve 1600 ng/mL derişime sahip kalite kontrol örnekleri, THC-COOH çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 1 mL idrar içerisinde hazırlanmıştır.

3.3.14. Hidroliz deneyi için THC-COOH Glukuronid Örneklerinin Hazırlanması

Hidroliz optimizasyonunda kullanılacak olan 1800 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid örnekleri, THC-COOH glukuronid çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 1 mL idrar içerisinde hazırlanmıştır.

3.3.15. Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması

Birer mL kalibrasyon standardı, kalite kontrol örnekleri ve hasta örnekleri polipropilen tüplere alınmıştır. Üzerine sırasıyla 50 µL IS çözeltisi, 100 µL çeşitli derişimlerde hazırlanan β-d-glukuronidaz çözeltisi ve 100 µL metanol ilave edilmiştir. Tüm örnekler hidroliz için çeşitli şartlarda etüvde bekletilmiştir. Daha sonra 1 dakika girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 4000 rpm de santrifüj edilmiştir. 5 µL örnek sisteme enjekte edilmiştir.

3.4. Optimum Hidroliz Şartının Belirlenmesi

Üsküdar Üniversitesi İleri Toksikoloji ve Analiz Laboratuvarı'nda esrar kullanımını belirlemek için yapılan test sonuçları (n=5986) incelenmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullanacağımız THC-COOH-glukuronid konsantrasyonu 1800 ng/mL olarak belirlenmiştir.

THC-COOH glukuronid'i THC-COOH'e dönüştürürken sıcaklık (37, 55, 75 ve 90 °C), tampon pH'ı (5,0 ve 6,5), enzim konsantrasyonu (1500, 3000 ve 6500 ünite/100 µL) ve hidroliz süresi (15, 30, 45, 60 ve 75 dakika) parametreleri değerlendirildi. Ayrıca, tüm hidroliz deneylerinin sonunda THC-COOH glukuronid kalitatif olarak izlenmiştir.

3.5. Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen biyoanalitik yöntemin doğrulanması için validasyon gereklidir. Yöntemin validasyonu, biyolojik matrikste bulunan analitin tespiti için oluşturulan yöntemin güvenilirliğini göstermek amacı ile yapılır. Tam doğrulama için çalışma örneklerinin bulunduğu matriks ile aynı matriks kullanılır. Boş biyolojik matriksin içersine referans standart ilavesi ile yöntem geliştirilir ve doğrulanır (53).

Avrupa İlaç Ajansı (EMA) biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzuna göre yöntemin güvenilirliğini göstermek için; seçicilik, kantitatif alt sınırı, kalibrasyon eğrisi performansı, enjeksiyonlar arası taşıma, doğruluk, kesinlik, stabilite, seyreltme bütünlüğü ve stabilite parametreleri değerlendirilir (53).

3.5.1. Seçicilik (Selectivity)

Biyoanalitik yöntem doğrulanırken seçicilik parametresi için kullanılan matriks en az 6 farklı kaynaktan elde edilmesi gerekir. Kullanılan matriksler analizi yapılacak analiti içermemelidir. Seçilen matriksler, analit için kantitatif alt sınırının sahip olduğu alanın % 20' si ve daha az girişime sahip olmalıdır. Ayrıca kullanılan IS alanının % 5' i ve daha az girişime sahip olmalıdır (53).

3.5.2. Kantitatif Alt Sınırı (LLOQ)

Biyoanalitik çalışmalarda kantitatif alt sınır, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle çalışmanın amacına uygun şekilde seçilir (53).

3.5.3. Kalibrasyon Eğrisi Performansı (Calibration Curve Performance)

Kalibrasyon eğrisi performansı değerlendirilmeden önce çalışmanın amacına uygun aralık seçilmelidir. Bu aralığın en alt noktası LLOQ olarak belirlenir ve seçilen en üst noktası en yüksek kalibrasyon üst sınırı (ULOQ) olarak adlandırılır (53).

Kalibrasyon eğrisi performansı matriks içinde hazırlanmış minimum altı nokta, analitleri içermeyen matriks (blank) örneği ve yalnızca iç standart içeren matriks (zero) örneği kullanılarak en az üç farklı günde değerlendirilmelidir. Biyolojik matriks içinde hazırlanan standart örneklerinin taze hazırlanması önerilir (53).

Kalibrasyon eğrisi performansı değerlendirilirken eğim ve kesim noktası doğrusallıkla uyumlu olmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin hesaplanan konsantrasyonları ortalama yüzde doğrulukla sunulmalıdır (53).

Kalibrasyon eğrisi standartlarının kabul edilebilir ortalama yüzde doğruluk değerleri LLOQ için $\pm \%20$ ve diğer standartlar için $\pm \%15$ olmalıdır. Seçilen noktaların %75'i bu kurallara uyacak şekilde minimum altı standart kriterini sağlamalıdır. Bu kriterlere uymayan standart red edilir ve yeniden regresyon analizi yapılır (53).

3.5.4. Enjeksiyonlar Arası Taşıma (Carry-over)

Çalışma boyunca enjeksiyonlar arası taşıma minimuma indirilmelidir. Enjeksiyonlar arası taşıma değerlendirilirken, ULOQ standart örneğinden sonra blank örneği enjeksiyonu yapılır. Blank örneğinde ki kabul edilebilir maksimum taşıma standart örneği için LLOQ örneğini alanının % 20'si kadar ve iç standart örneği için alanının %5'i kadar olmalıdır (53).

3.5.5. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, ölçülen değerlerin gerçek değere yakınlığıdır. Biyoanalitik yöntemin doğruluğu yüzde olarak verilir. Doğruluk çalışması için kalite kontrol örnekleri kullanılır. Yöntemin doğruluğu belirlenirken en az dört seviye kalite kontrol örneği seçilmelidir. Bu örnekler sırasıyla LLOQ örneği, düşük QC (LLOQ örneğinin üç katı konsantrasyona sahip) örneği, orta QC (kalibrasyon eğrisinin orta noktasındaki konsantrasyona sahip) örneği ve yüksek QC (ULOQ örneğinin en az % 75'i konsantrasyona sahip) örneği olarak belirlenir (53).

Doğruluk, gün-içi doğruluk ve günler-arası doğruluk olarak değerlendirilir (53).

3.5.5.1. Gün-içi Doğruluk (Within-run Accuracy)

Gün-içi doğruluk çalışması için her bir kalite kontrol örneği seviyesinden en az beş örnek hazırlanarak enjeksiyon yapılmalıdır. Kabul edilebilir ortalama yüzde doğruluk değerleri LLOQ örneği için $\pm \% 20$ ve diğer kalite kontrol örnekleri için $\pm \% 15$ olmalıdır (53).

3.5.5.2. Günler-arası Doğruluk (Between-run Accuracy)

Günler-arası doğruluk çalışmasında, gün-içi doğruluk çalışmasının en az iki farklı günde yapılmasından sonra tüm analiz sonuçlarının gerçek değere yakınlığına bakılır. Kabul edilebilir ortalama yüzde doğruluk değerleri LLOQ örneği için $\pm \% 20$ ve diğer kalite kontrol örnekleri için $\pm \% 15$ olmalıdır (53).

3.5.6. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, tekrarlanan analizlerin birbirine yakınlığıdır. Kesinlik sonuçları % varyasyon katsayısı (% CV) hesaplanılarak verilmelidir. Bu katsayı tekrarlanan analizlerin standart sapmasının yüz ile çarpılmış halinin ortalama değere oranı ile hesaplanır (53).

Kesinlik, gün-içi kesinlik ve günler-arası kesinlik olarak değerlendirilir (53).

3.5.6.1. Gün-içi Kesinlik (Within-run Precision)

Gün-içi kesinlik çalışması için gün-içi doğruluk çalışmasındaki değerler kullanılır. Kabul edilebilir yüzde CV değerleri LLOQ örneği için $\% 20$ ve diğer kalite kontrol örnekleri için $\% 15$ olmalıdır (53).

3.5.6.2. Günler-arası Kesinlik (Between-run Precision)

Günler-arası kesinlik çalışması için günler-arası doğruluk çalışmasındaki değerler kullanılır. Kabul edilebilir yüzde CV değerleri LLOQ örneği için $\% 20$ ve diğer kalite kontrol örnekleri için $\% 15$ olmalıdır (53).

3.5.7. Stabilité (Stability)

Analizlerde kullanılacak olan stok çözeltileri ve matriks içersinde hazırlanmış örneklerin çalışma boyunca bulunduğu ortamlardaki stabiliteleri takip edilmelidir. Stabilitenin analiz sonuçlarına etkisi kabul edilebilir limitler içersinde olmalıdır. Stabilité

çalışması, taze hazırlanmış stok çözeltileri ve örnekler ile belirli koşullarda bekletilmiş stok çözeltileri ve örneklerin analizi ile yapılır. Bu analizlerin aralarındaki kabul edilebilir ortalama yüzde doğruluk değerleri $\pm \% 15$ olmalıdır. Matriks içersindeki analitlerin stabilitesi belirlenirken düşük ve yüksek kalite kontrol örneği kullanılır (53).

3.5.8. Seyreltme Bütünlüğü (Dilution Integrity)

Seyreltme Bütünlüğü çalışmasında, ULOQ örneğinden fazla konsantrasyona sahip örneklerin seyreltilerek kalibrasyon aralığına girmesi sağlanır. Bu örneklerin en az 5 kez analizi yapılmalıdır. Bu analizlerin sonucunda kabul edilebilir ortalama yüzde doğruluk değerleri $\pm \% 15$ olmalıdır (53).

3.5.9. Matriks Etkisi (Matrix Effects)

Matriks etkisi çalışması kütle spektrometrik yöntemler için gereklidir. Matriks etkisi çalışmasında en az altı farklı kaynaktan elde edilen matriks kullanılmalıdır. Matriks etkisi hesaplanırken düşük QC, yüksek QC ve IS konsantrasyonlarına sahip matriks içerisinde ve çözücü içerisinde numuneler hazırlanır. İç standartın matriks faktör (MF)'ü normalize edilerek hesaplanır. Matriks faktör aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\text{Normalize MF} = \frac{\text{matriks içersindeki QC pik alanı}}{\text{çözücü içersindeki QC pik alanı}} \times \frac{\text{çözücü içersindeki IS pik alanı}}{\text{matriks içersindeki IS pik alanı}}$$

Normalize edilmiş IS ve normalize MF için kabul edilebilir yüzde CV değerleri $\% 15$ olmalıdır (53).

4. BULGULAR

4.1. UPLC-MS/MS Analiz Parametreleri

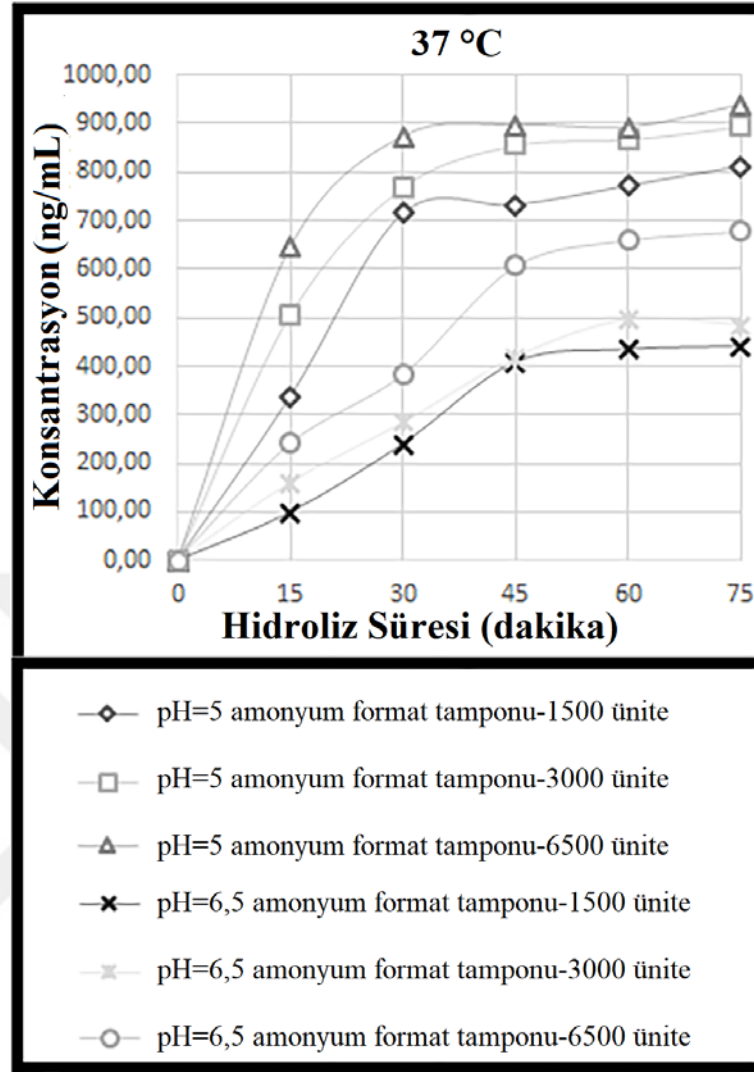
Kromatografik ayırma için Acquity UPLC HSS C18 (1,8 μ m, 2,1 x 150 mm) kolonu ile Waters Acquity UPLC Sistemi kullanılmıştır. Otoörnekleyici 10 °C'de tutulurken kolon sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmıştır. Mobil faz A, 5,0 mM amonyum format tamponundan (pH=3,00) oluşurken, mobil faz B, %0,1 formik asitli asetonitrilden oluşturulmuştur. Akış hızı, gradiyent koşullar altında 0,4 mL/dk olarak belirlenmiştir. Gradyent akışı, %4 B'den %70 B'ye (0-0,5 dakika) lineer olarak arttırılmıştır, ardından %99 B'ye arttırılmıştır (0,6 dakika) ve %99 B'de (0,6-1,10 dakika) sabit tutulmuştur. %99 B'den %4 B şartlarına geri döndürülmüştür (1,20 dakika) ve %4 B'de (1,20–5 dakika) sabit tutulmuştur. Kromatografik ayırma 5 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin dedeksiyonu, elektrosprey iyonizasyon kaynağına sahip Waters Xevo TQD tandem kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometre parametreleri; kapiler voltaj (1.5 kV), desolvasyon gaz akışı (1000 L/h), desolvasyon gaz sıcaklığı (500 °C) ve kaynak sıcaklığı (150 °C) optimize edilmiştir. Kantitatif analiz için, çoklu reaksiyon izleme (MRM) geçişleri, THC-COOH için m/z 343,1→299,1 ve THC-COOH-d3 için m/z 348,2→196,2 seçilmiştir. Nitel analiz için, MRM geçişleri, THC-COOH için m/z 343,1→245,1; THC-COOH glukuronid için m/z 519,2→343,1 ve THC-COOH-d3 için m/z 348,2→119,1 seçilmiştir. Analitlerin tespiti, THC-COOH için negatif elektrosprey iyonizasyonu modu ve THC-COOH-d3 ve THC-COOH glukuronid için pozitif elektrosprey iyonizasyonu modu kullanılarak yapılmıştır.

4.2. Optimum Hidroliz Şartının Belirlenmesi

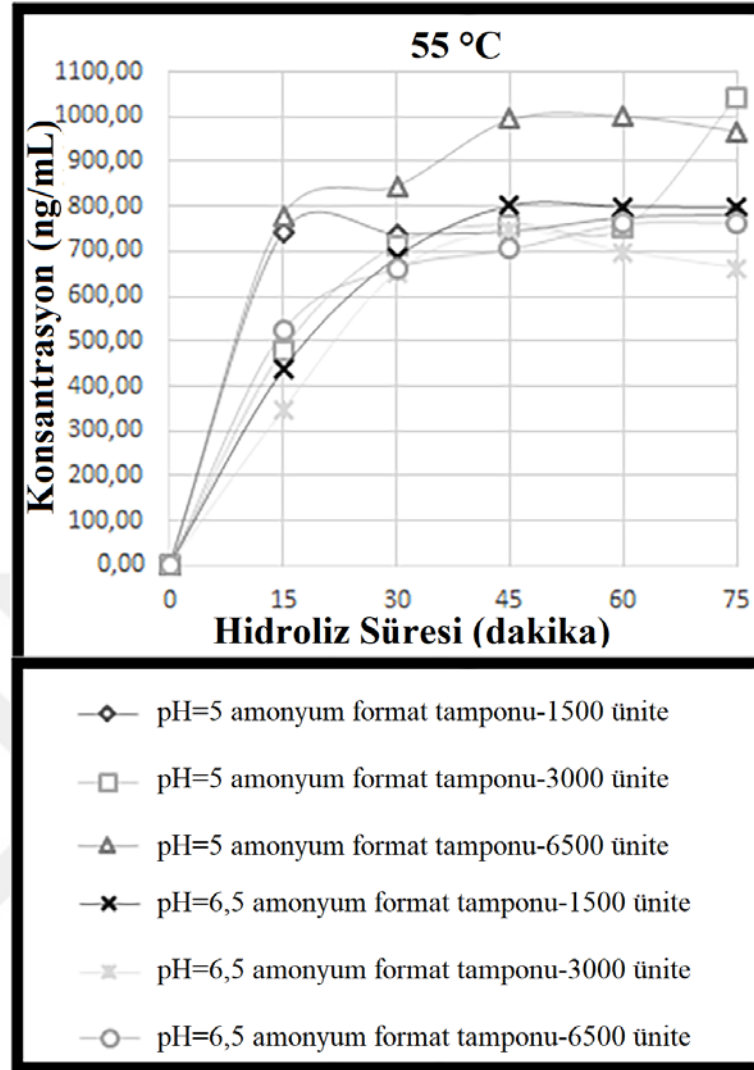
Deneylerde kullanılacak olan THC-COOH glukuronid'in derişimi 1800 ng/mL olduğundan teorik olarak oluşabilecek olan maksimum THC-COOH miktarı 1190,8 ($\pm$ % 15) olarak hesaplanmıştır.

Sıcaklık 37 °C'de sabit tutulup çeşitli tampon pH'ı ve enzim konsantrasyonu parametreleri kullanılarak, 1800 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid'in THC-COOH'e dönüşümü sırasında oluşan THC-COOH konsantrasyonunun zamana karşı grafiği Şekil 4-1'de verilmiştir.



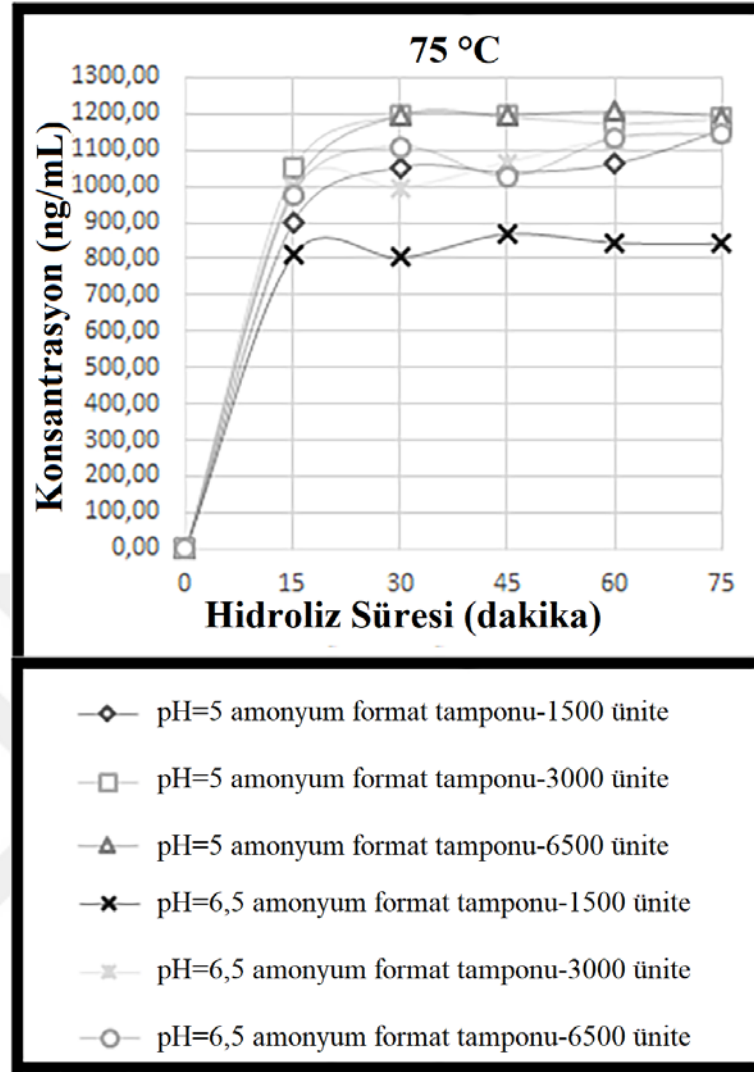
Şekil 4-1: 37 °C’de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı

Sıcaklık 55 °C’de sabit tutulup çeşitli tampon pH’ı ve enzim konsantrasyonu parametreleri kullanılarak, 1800 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid’in THC-COOH’e dönüşümü sırasında oluşan THC-COOH konsantrasyonunun zamana karşı grafiğı Şekil 4-2’de verilmiştir.



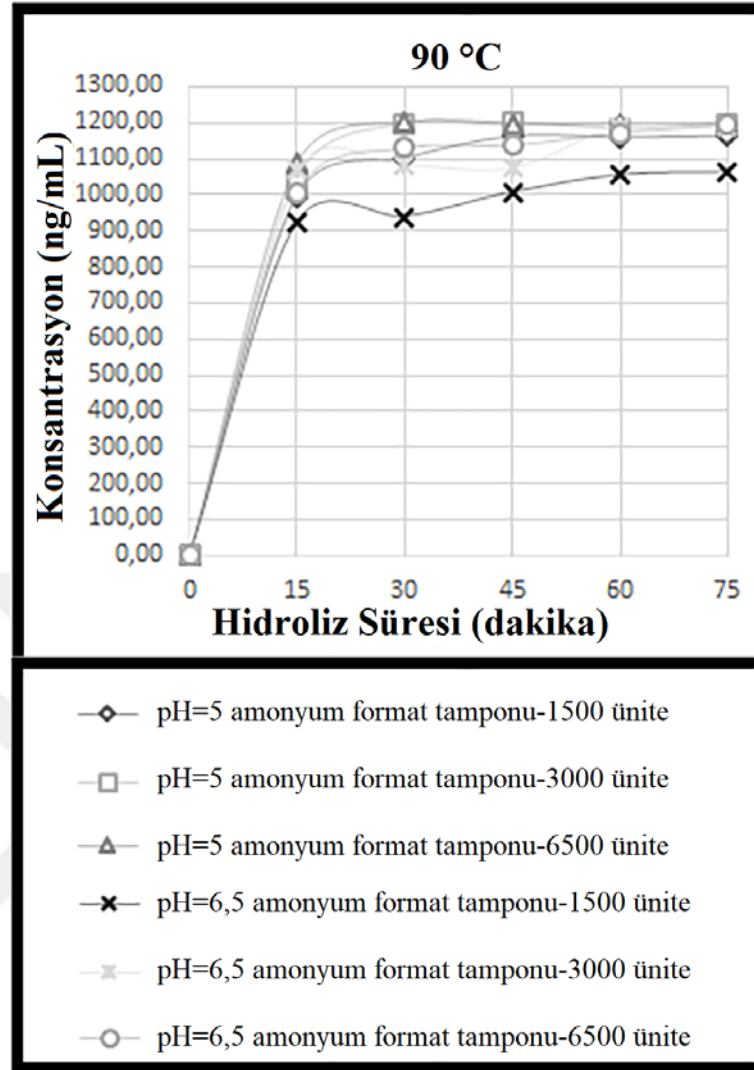
Şekil 4-2: 55 °C’de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı

Sıcaklık 75 °C’de sabit tutulup çeşitli tampon pH’ı ve enzim konsantrasyonu parametreleri kullanılarak, 1800 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid’in THC-COOH’e dönüşümü sırasında oluşan THC-COOH konsantrasyonunun zamana karşı grafiğı Şekil 4-3’de verilmiştir.



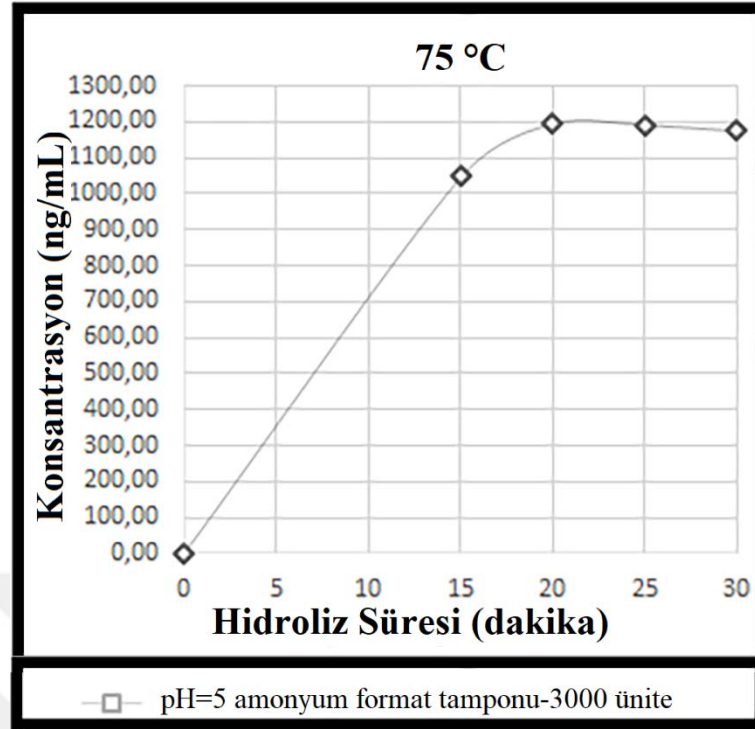
Şekil 4-3: 75 °C’de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı

Sıcaklık 90 °C’de sabit tutulup çeşitli tampon pH’ı ve enzim konsantrasyonu parametreleri kullanılarak, 1800 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid’in THC-COOH’e dönüşümü sırasında oluşan THC-COOH konsantrasyonunun zamana karşı grafiğı Şekil 4-4’de verilmiştir.



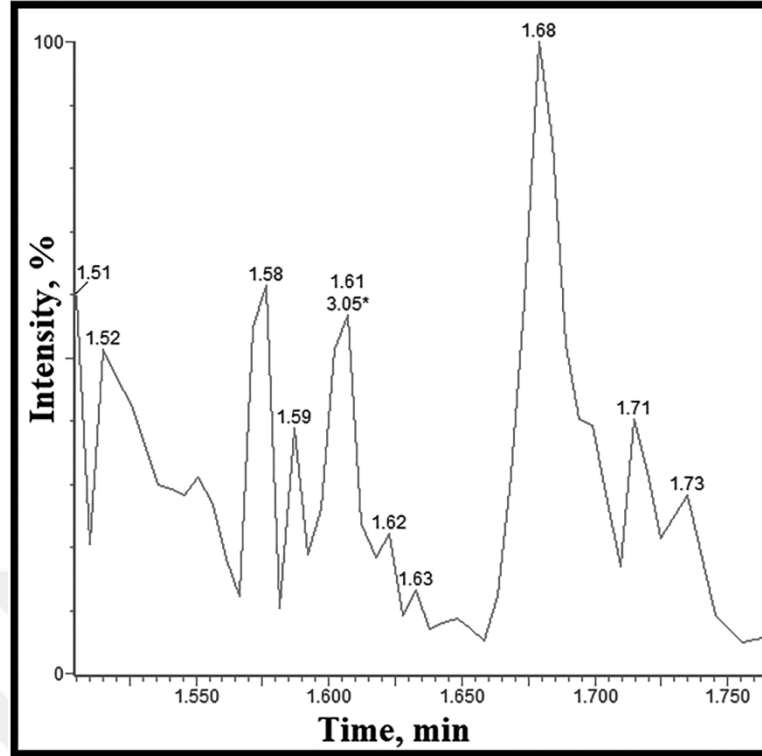
Şekil 4-4: 90 °C’de farklı pH ve enzim derişimlerinde THC-COOH konsantrasyon hidroliz zamanı grafiğı

Elde edilen sonuçlara göre 75 °C ve 90 °C’de en yüksek elde edilebilecek teorik konsantrasyona ulaşıldı. Bu şartlardan 75 °C’de 3000 ünite enzim/100 µL pH 5,00 amonyum format tamponu seçilerek optimum süreyi belirlemek için yapılan çalışmada elde edilen THC-COOH konsantrasyonunun zamana karşı grafiğı Şekil 4-5’de verilmiştir.



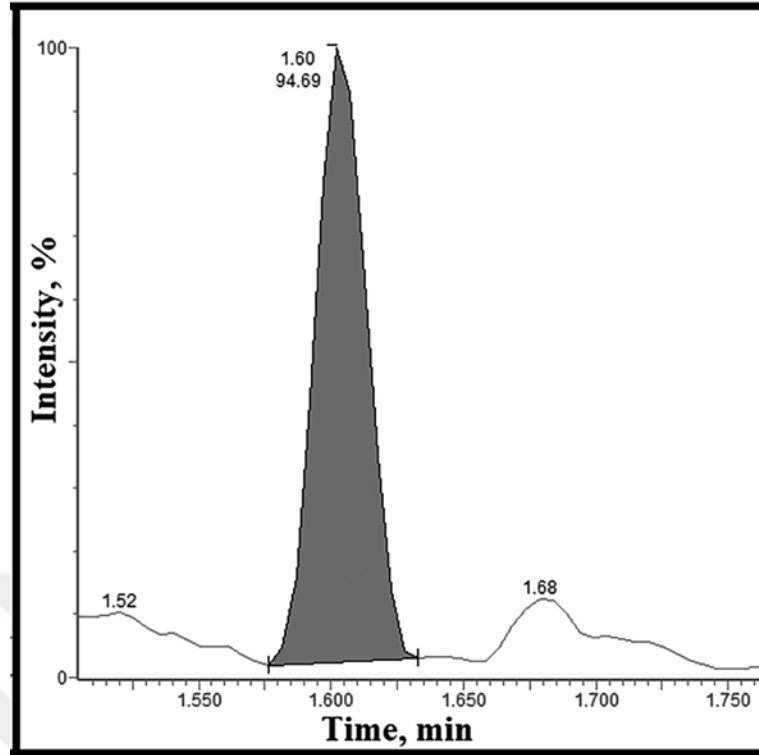
Şekil 4-5: Belirlenen optimum koşullar altında THC-COOH konsantrasyonunun hidroliz zamana karşı değişim grafiği

Optimum koşullar altında, 20 dakika içerisinde THC-COOH glukuronid tamamen THC-COOH'ye dönüştürülmüş ve THC-COOH glukuronid piki gözlemlenmemiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Optimum koşullar altında hidroliz sonrası elde edilen THC-COOH glukuronid kromatogramı

Ayrıca karşılaştırma yapmak için mevcut şartlarda elde edilen 4 ng/mL derişime sahip THC-COOH glukuronid örneği için elde edilen pik Şekil 4-7' de verilmiştir.

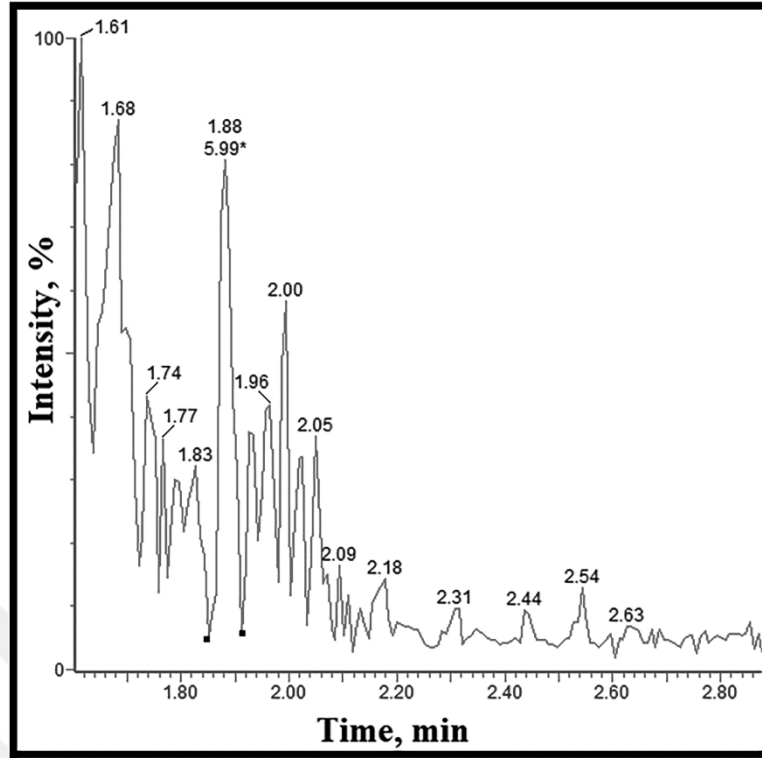


Şekil 4-7: Derişimi 4 ng/mL olan THC-COOH glukuronid örneği kromatogramı

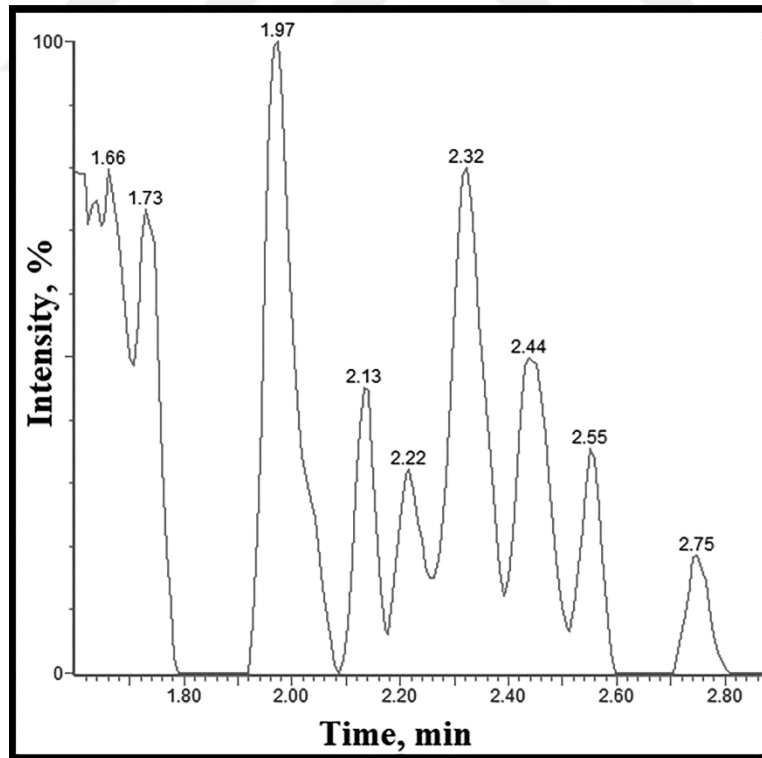
4.3. Yöntemin Validasyonu

4.3.1. Seçicilik (Selectivity)

Analitleri içermeyen idrar örneğinden kaynaklı analizi etkileyecek olan herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Boş örneklere ait kromatogramlar, THC-COOH için Şekil 4-8’de ve THC-COOH-d3 için Şekil 4-9’da verilmiştir.

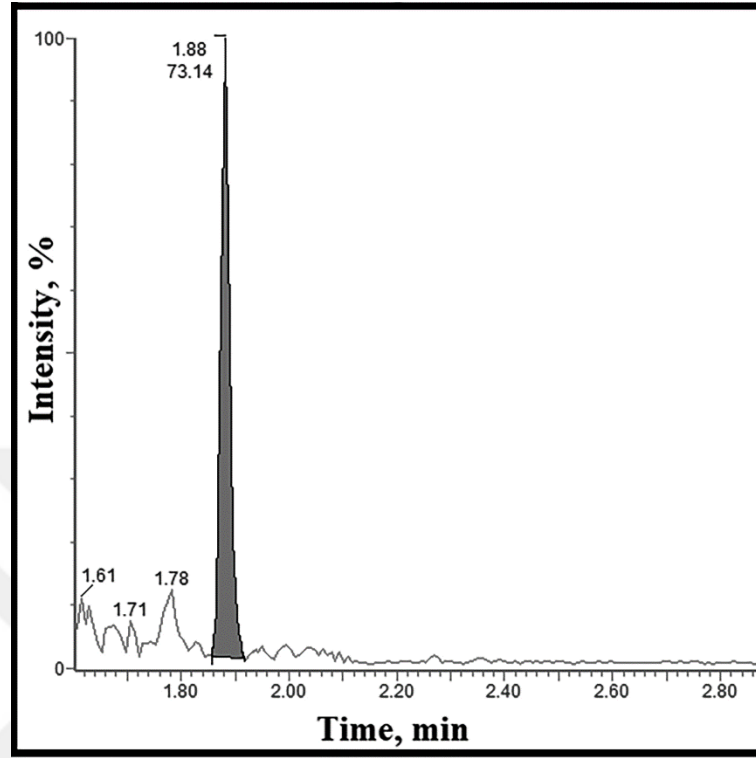


Şekil 4-8: THC-COOH için boş örnek kromatogramı

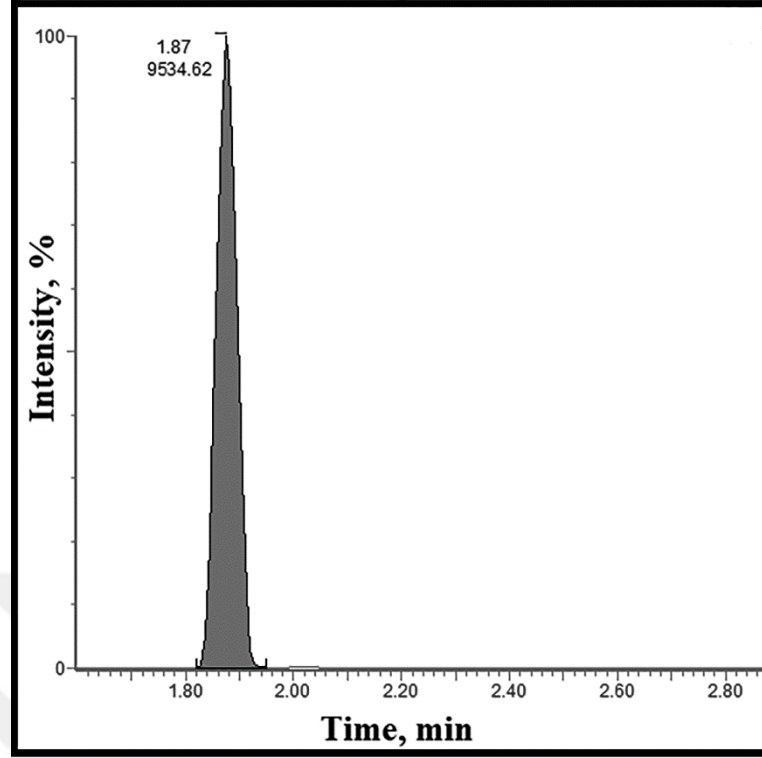


Şekil 4-9: THC-COOH-d3 için boş örnek kromatogramı

Alıkonma zamanı THC-COOH için 1,88 dakika (Şekil 4-10) ve THC-COOH-d3 için 1,87 dakikadır (Şekil 4-11).



Şekil 4-10: THC-COOH için LLOQ örneği kromatogramı



Şekil 4-11: İç standart örneği kromatogramı

4.3.2. Kantitatif Alt Sınırı (LLOQ)

THC-COOH için LLOQ değeri EMA kılavuzuna göre 1 ng/mL olarak belirlenmiştir. LLOQ örneğinin kromatogramı Şekil 4-10'da verilmiştir.

4.3.3. Kalibrasyon Eğrisi Performansı (Calibration Curve Performance)

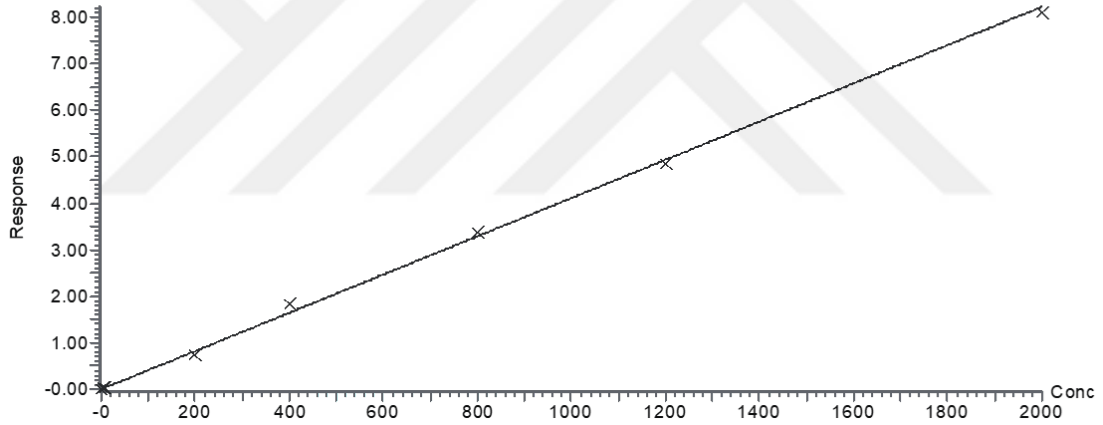
Kalibrasyon eğrisi performansı üç farklı günde değerlendirilerek 1-2000 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Korelasyon katsayıları her üç gün içinde >0.99 olarak bulunmuştur. Standartlar için günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Standartlar için günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=3)

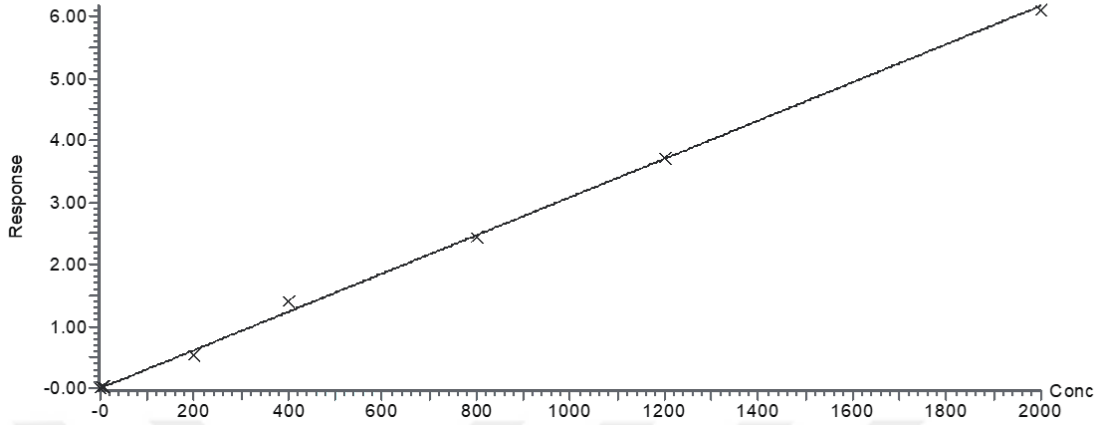
Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk	SD	% CV
1,00	0,90	90,33	0,07	8,01
4,00	4,06	101,42	0,26	6,42
8,00	7,36	91,96	0,09	1,23
200,00	181,13	90,56	4,85	2,68
400,00	415,86	103,96	61,97	8,90
800,00	801,15	100,14	16,79	2,10
1200,00	1201,74	100,15	20,20	1,68
2000,00	2000,81	100,04	47,57	2,38

Üç günün kalibrasyon eğrileri Şekil 4-12, Şekil 4-13 ve Şekil 4-14’de verilmiştir.

Compound name: THC
Correlation coefficient: $r = 0.999110$, $r^2 = 0.998220$
Calibration curve: $0.00411401 * x + -0.000701143$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

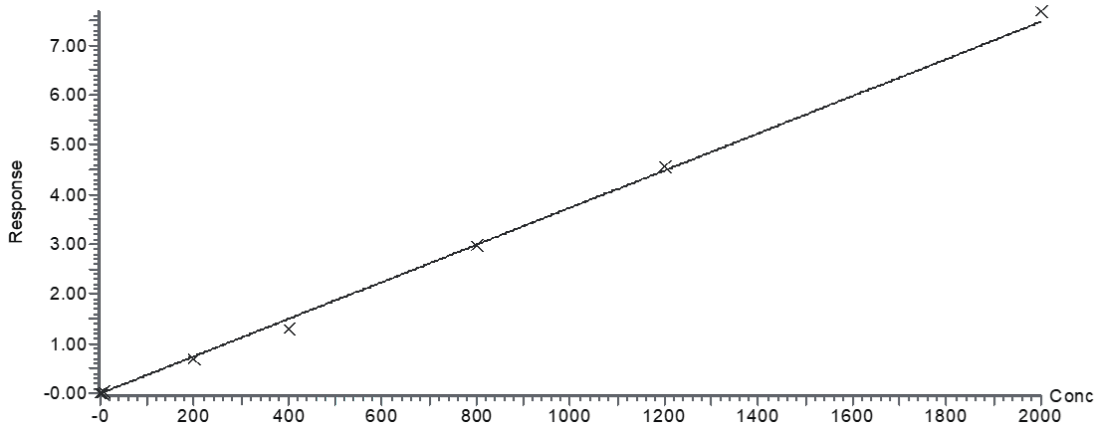
**Şekil 4-12: Birinci gün kalibrasyon eğrisi**

Compound name: THC
 Correlation coefficient: $r = 0.998751$, $r^2 = 0.997504$
 Calibration curve: $0.00308561 * x + -0.000357284$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Şekil 4-13: İkinci gün kalibrasyon eğrisi

Compound name: THC
 Correlation coefficient: $r = 0.998795$, $r^2 = 0.997591$
 Calibration curve: $0.00373581 * x + -0.00133971$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Şekil 4-14: Üçüncü gün kalibrasyon eğrisi

4.3.4. Enjeksiyonlar Arası Taşıma (Carry-over)

Enjeksiyonlar arası taşıma çalışması için ULOQ'dan sonra enjekte edilen blank örneği, THC-COOH ve IS için ihmal edilebilir sinyaller göstermiştir.

4.3.5. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk çalışması sonuçları Excel’de değerlendirilerek aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Ortalama Doğruluk (\%)} = (C_{\text{ortalama}} \times 100) / C_{\text{teorik}}$$

Gün-içi ve Günler-arası doğruluk çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-2 ve Tablo 4-3).

Tablo 4-2: Kalite Kontrol Örnekleri Gün-içi % Doğruluk Değerleri (n=6)

GÜN	Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk
Gün-1	1,00	1,00	99,67
	3,00	2,74	91,28
	1000,00	1070,20	107,02
	1600,00	1715,79	107,24
Gün-2	1,00	1,03	102,50
	3,00	2,87	95,78
	1000,00	1021,98	102,20
	1600,00	1657,26	103,58
Gün-3	1,00	1,08	108,00
	3,00	2,70	89,94
	1000,00	1003,80	100,38
	1600,00	1549,94	96,87

Tablo 4-3: Kalite Kontrol Örnekleri Günler-arası % Doğruluk Değerleri (n=18)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk
1,00	1,03	103,39
3,00	2,77	92,33
1000,00	1031,99	103,20
1600,00	1641,00	102,56

4.3.6. Kesinlik (Precision)

Kesinlik çalışması sonuçları Excel’de değerlendirilerek aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{CV (\%)} = (\text{SD} \times 100) / C_{\text{ortalama}}$$

Gün-içi ve Günler-arası kesinlik çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-4 ve Tablo 4-5).

Tablo 4-4: Kalite Kontrol Örnekleri Gün-İçi % CV Kesinlik Değerleri (n=6)

GÜN	Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	SD	% CV
Gün-1	1,00	1,00	0,09	8,83
	3,00	2,74	0,10	3,68
	1000,00	1070,20	33,14	3,10
	1600,00	1715,79	49,18	2,87
Gün-2	1,00	1,03	0,12	12,18
	3,00	2,87	0,17	5,85
	1000,00	1021,98	32,96	3,22
	1600,00	1657,26	76,55	4,62
Gün-3	1,00	1,08	0,08	7,43
	3,00	2,70	0,14	5,29
	1000,00	1003,80	70,01	6,97
	1600,00	1549,94	47,97	3,10

Tablo 4-5: Kalite Kontrol Örnekleri Günler-arası % CV Kesinlik Değerleri (n=18)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	SD	% CV
1,00	1,03	0,10	9,68
3,00	2,77	0,15	5,50
1000,00	1031,99	53,99	5,23
1600,00	1641,00	90,03	5,49

4.3.7. Stabilité (Stability)

Stok stabilitesi için, THC-COOH (20 µg/mL) ve IS (8 µg/mL) stok çözeltileri taze hazırlanarak ve 4 hafta -20 °C’de saklandıktan sonra analiz edilmiştir (enjeksiyon hacmi 1 µL). THC-COOH ve IS stok çözeltilerinin stabilitesi, sırasıyla %104,3 ve %102,2 doğrulukla EMA limitlerinin içinde bulunmuştur.

İdrar matriksi içersinde bulunan kalite kontrol örnekleri taze hazırlanarak ve 4 hafta -20 °C’de saklandıktan sonra analiz edilmiştir. -20 °C’de 4 haftalık stabilite çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: -20 °C’de 4 Haftalık Stabilité Çalışması Verileri (n=6)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk	SD	% CV
3,00	2,93	97,67	0,27	9,09
1600,00	1594,79	99,67	62,61	3,93

İdrar matriksi içersine bulunan kalite kontrol örnekleri taze hazırlanarak ve 24 saat otoörnekleyicide bekletildikten sonra analiz edilmiştir. 24 saat otoörnekleyici stabilite çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: 24 Saat Otoörnekleyici Stabilite Çalışması Verileri (n=6)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk	SD	% CV
3,00	3,02	100,50	0,27	8,86
1600,00	1678,35	104,90	129,59	7,72

İdrar matriksi içersine bulunan kalite kontrol örnekleri taze hazırlanarak ve 3 kez dondurulup çözöldükten sonra analiz edilmiştir. Dondurma-çözme stabilite çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: Dondurma-çözme Stabilite Çalışması Verileri (n=6)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk	SD	% CV
3,00	2,66	88,61	0,08	8,86
1600,00	1648,19	103,01	112,04	6,80

4.3.8. Seyreltme Bütünlüğü (Dilution Integrity)

Seyreltme bütünlüğü çalışması için ULOQ örneğinin 2 katı konsantrasyona (4000 ng/mL) sahip örnek hazırlanmıştır. Bu örnek kalibrasyon aralığına girmesi için idrar ile 4 kat seyreltilerek çalışılmıştır. Seyreltme bütünlüğü çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: Seyreltme Bütünlüğü Çalışması Verileri (n=6)

Konsantrasyon (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama % Doğruluk	SD	% CV
1000,00	1010,18	101,02	45,14	4,47

4.3.9. Matriks Etkisi (Matrix Effects)

Matriks etkisi çalışmasında düşük ve yüksek QC örnekleri hem matriks içersinde hem de metanol içersinde hazırlanarak normalize matriks faktörleri hesaplanmıştır. Matriks etkisi çalışmasında bulunan değerler EMA kabul limitleri içinde bulunmuştur (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: Matriks Etkisi Çalışması Verileri

ÖRNEK	Matriks İçindeki Alan	Solvent İçindeki Alan	Matriks Faktör	Normalize Matriks Faktör	Ortalama	SD	% CV
QC21	206,62	594,60	2,88	2,35	2,20	0,10	4,50
QC22	212,44	582,50	2,74	2,24			
QC23	217,34	578,93	2,66	2,18			
QC24	211,37	546,03	2,58	2,11			
QC25	220,23	562,30	2,55	2,09			
QC26	205,70	568,45	2,76	2,26			
QC41	52260,36	168921,90	3,23	2,64	2,59	0,11	4,32
QC42	54495,30	168882,30	3,10	2,53			
QC43	48248,43	165248,30	3,42	2,80			
QC44	52157,91	163076,20	3,13	2,55			
QC45	52905,92	160940,90	3,04	2,49			
QC46	51882,36	162094,10	3,12	2,55			
IS1	22295,47	31131,71	1,40	Ortalama IS Matriks Faktör 1,22			
IS2	27693,75	32827,60	1,19				
IS3	26757,36	32722,97	1,22				
IS4	25626,65	30504,70	1,19				
IS5	26909,93	31254,93	1,16				
IS6	25871,53	30731,53	1,19				

5. TARTIŞMA

Literatürde farklı enzimatik hidroliz koşulları ile idrarda toplam THC-COOH tayini ile ilgili LC-MS/MS çalışmaları mevcuttur (4, 15-20).

Felli ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 5,00 ve kullanılan enzim miktarını mL idrarda 5000 ünite olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 20 saat boyunca 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında idrar seyreltme yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 26 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılarak yapılmıştır (4).

Weinmann ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,00 ve kullanılan enzim miktarını mL idrarda 7000 ünite olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 5 saat boyunca 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile azot altında uçurma yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 37,3 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılarak yapılmıştır (15).

Grauwiler ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,00 olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 3 saat boyunca 50 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile azot altında uçurma yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 25 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon modu kullanılarak yapılmıştır (16).

Montesano ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,80 ve kullanılan enzim miktarını mL idrarda 8333 ünite olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 2 saat boyunca 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında katı faz ekstraksiyonu ile azot altında uçurma yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 5,8 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti negatif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılarak yapılmıştır (17).

Lee ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,70 olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 1 saat boyunca 55 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında idrar seyreltme yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılarak yapılmıştır (18).

Aizpurua-Olaizola ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,80 ve kullanılan enzim miktarını mL idrarda 10000 ünite olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 16 saat boyunca 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında katı faz ekstraksiyonu ile azot altında uçurma yöntemi kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 15,5 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif elektrosprey iyonizasyonu modu kullanılarak yapılmıştır (19).

Sempio ve ark. yaptığı çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisinin pH değerini 6,80 ve kullanılan enzim miktarını mL idrarda 2000 ünite olarak seçmiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz işlemi, 16 saat boyunca 37 °C'ye ayarlanmış etüvde bekletilerek yapılmıştır. Yöntemin numune hazırlama aşamasında 96 oyuklu bir plaka kullanılmıştır. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 14,6 dakika olarak belirlenmiştir. THC-COOH'ın tespiti pozitif elektrosprey iyonizasyonu modu kullanılarak yapılmıştır (20).

Bu çalışmada, enzimin bulunduğu tampon çözeltisi için iki farklı pH değerinde (5,00 ve 6,50) çalışılmıştır. Enzimatik hidroliz veriminin pH=5,00 tampon çözeltisinde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kullanılan enzim miktarı mL idrarda 1500, 3000 ve 6500 ünite olarak çalışılmıştır. Optimizasyon sonucuna göre 3000 ve 6500 ünite hidroliz için yeterli bulunmuştur. Enzimatik hidroliz çalışması 37, 55, 75 ve 90 °C'ye ayarlanmış etüvde 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika bekletilerek yapılmıştır. Literatürden farklı olarak 75 °C ve 90 °C sıcaklıkta yapılan hidroliz çalışmalarının hidroliz süresini kısalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, tüm hidroliz deneylerinin sonunda THC-COOH glukuronid kalitatif olarak izlenmiştir. 75 °C ve 90 °C'de benzer sonuçlar elde edildiğinden, valide edilen yöntem için 75 °C seçilmiştir. İdrar içerisinde bulunan 1800 ng/mL THC-COOH glukuronid maddesi 20 dakikalık hidrolizden sonra tamamen THC-COOH maddesine dönüştürülmüştür. Gradient ayırma kullanılan yöntemin toplam ayırma süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir. Elektrosprey iyonizasyon yöntemlerinin genellikle atmosferik

basınçlı kimyasal iyonizasyon yöntemlerinden daha hassas olması, idrarda ölçülen THC-COOH'ın polaritesi ve negatif iyon modunda daha fazla sinyal elde edilmesi nedeniyle negatif elektrosprey iyonizasyon modu kullanılmıştır.

Geliştirilen yöntem, literatürde bulunan tüm çalışmalara göre kısa analiz süresi ve enzimatik hidroliz süresine sahiptir (4, 15-20). Yöntemin çoğu çalışmaya göre basit bir numune hazırlama prosedürü vardır (15-17, 19, 20).

Bu çalışmada, THC-COOH glukuronid maddesinin THC-COOH maddesine dönüşümünde kullanılan enzimatik hidroliz etkinliği detaylı olarak sunulmuştur. Yöntem, EMA biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzuna göre doğrulanmıştır. Daha sonra valide edilen yöntem ile gerçek numune analizleri başarıyla gerçekleştirilerek toplam THC-COOH miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen bu yöntemin esrar kullanımının belirlenmesinde hızlı, kolay ve güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2017*. (ISBN: 978-92-1-148291-1 eISBN: 978-92-1-060623-3 United Nations publication Sales No E17XI6)
2. Huestis MA. Cannabis (Marijuana)-Effects on Human Behavior and Performance. *Forensic Sci Rev* 2002; 14: 15-60.
3. Soulemann AM, Gaafar AEDM, Abdel-Salam OM, ElShebiney SA, Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol content of cannabis seizures in Egypt Asian. *Pac J Trop Med* 2017; 10: 311-4.
4. Felli M, Martello S, Chiarotti M. LC–MS–MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. *Forensic Sci Int* 2011; 204: 67-73.
5. Huestis MA. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids Δ 9-tetrahydrocannabinol cannabidiol and cannabinol. İçinde Pertwee R, editör. *Cannabinoids*. Berlin Heidelberg: Springer; 2005. pp. 657-90.
6. Stevens A. Is policy ‘liberalization’ associated with higher odds of adolescent cannabis use? A re-analysis of data from 38 countries. *Int J Drug Policy* 2019; 66: 94-9.
7. Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, ve ark. Potency trends of Δ 9-THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J Forensic Sci* 2010; 55: 1209-17.
8. Di Rago M, Saar E, Rodda LN, Turfus S, Kotsos A, Gerostamoulos D, ve ark. Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC–MS/MS. *Forensic Sci Int* 2014; 243: 35-43.
9. Patel B, Wene D, Fan ZT. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 146: 15-23.
10. Laloup M, Fernandez MDMR, Wood M, De Boeck G, Henquet C, Maes V, ve ark. Quantitative analysis of Δ 9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1082: 15-24.
11. Roth N, Moosmann B, Auwärter V. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A) THC CBN and CBD in hair. *J Mass Spectrom* 2013; 48: 227-33.
12. Mercolini L, Mandrioli R, Protti M, Conti M, Serpelloni G, Raggi MA. Monitoring of chronic Cannabis abuse: An LC–MS/MS method for hair analysis *J Pharm Biomed Anal* 2013; 76: 119-25.
13. Lowe RH, Abraham TT, Darwin WD, Herning R, Cadet JL, Huestis MA. Extended urinary Δ 9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug Alcohol Depend* 2009; 105: 24-32.
14. Verstraete AG. (2004) Detection times of drugs of abuse in blood urine and oral fluid. *Ther Drug Monit* 26: 200-5.
15. Weinmann W, Vogt S, Goerke R, Müller C, Bromberger A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 381-7.
16. Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J. Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *J Chromatogr B* 2007; 850: 515-22.

17. Montesano C, Sergi M, Odoardi S, Simeoni MC, Compagnone D, Curini R. A μ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 91: 169-75.
18. Lee KM, Kim HJ, Son J, Park, JH, Kwon OS, Lee J. Simple quantitation of formoterol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in doping control. *J Chromatogr B* 2014; 967: 8-12.
19. Aizpurua-Olaizola O, Zarandona I, Ortiz L, Navarro P, Etxebarria N, Usobiaga A. Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis. *Drug Test Anal* 2017; 9: 626-33.
20. Sempio C, Scheidweiler KB, Barnes AJ, Huestis MA. Optimization of recombinant β -glucuronidase hydrolysis and quantification of eight urinary cannabinoids and metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2018; 10: 518-29
21. Breindahl T, Andreassen K. Determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1999; 732: 155-64.
22. Weinmann W, Goerner M, Vogt S, Goerke R, Pollak S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Sci Int* 2001; 121: 103-7.
23. Stephanson N, Josefsson M, Kronstrand R, Beck O. Accurate identification and quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine drug testing: Evaluation of a direct high efficiency liquid chromatographic-mass spectrometric method. *J Chromatogr B* 2008; 871: 101-8.
24. Muller LD, Opdal MS. Developing a rapid semi-automated sample preparation with alkaline hydrolysis in a 96-well plate for quantification of 11-nor-Delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine samples by UHPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 161: 296-304.
25. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, ve ark. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol* 2018; 227: 300-15.
26. Piluzza G; Delogu G, Cabras A, Marceddu S, Bullitta S. Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genet Resour Crop Evol* 2013; 60: 2331-42.
27. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci* 2016; 7: 19.
28. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, ve ark. Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2015; 313: 2456-73.
29. Mascolo N. Medical uses and toxicological profile of cannabis. *Pharm Pharmacol Commun* 2000; 6: 231-4.
30. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry* 2006; 28: 153-7.
31. Hall W, Degenhardt L. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet* 2009; 374: 1383-91.
32. Yılmaz G, Yazıcı L. Dünya’da Yükselen Değer; Endüstriyel Kenevir (*Cannabis sativa* L). *Bozok Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 2022; 1: 54-61.

33. United Nations Office on Drugs and Crime Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products New York 2009 (ISBN: 978-92-1-148242-3 United Nations publication Sales No E09XI15)
34. Taschwer M, Schmid MG. Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ^9 -THC in herbal cannabis seized in Austria–Impact of different storage temperatures on stability. *Forensic Sci Int* 2015; 254: 167-71.
35. Hakkarainen P, Frank VA, Barratt MJ, Dahl HV, Decorte T, Karjalainen K ve ark. Growing medicine: Small-scale cannabis cultivation for medical purposes in six different countries. *Int J Drug Policy* 2015; 26: 250-6.
36. Small E. Evolution and classification of Cannabis sativa (marijuana hemp) in relation to human utilization. *Bot Rev* 2015; 81: 289-94.
37. Cho CM, Hirsch R, Johnstone S. General and oral health implications of cannabis use. *Aust Dent J* 2005; 50: 70-4.
38. Ramírez A, Viveros JM. 2021 Brewing with Cannabis sativa vs Humulus lupulus: A review. *J Inst Brew* 127: 201-209.
39. Barrus DG, Capogrossi KL, Cates SC, Gourdet CK, Peiper NC, Novak SP, Wiley JL. Tasty THC: promises and challenges of cannabis edibles. *Methods Rep RTI Press*. 2016; 35: 1611.
40. Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, ve ark. Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J Forensic Sci* 2010; 55: 1209-17.
41. Sharma P, Murthy P, Bharath MS. Chemistry metabolism and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry* 2012; 7: 149.
42. Grant KS, Petroff R, Isoherranen N, Stella N, Burbacher TM. Cannabis use during pregnancy: pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacol Ther* 2018; 182: 133-51.
43. Breijyeh Z, Jubeh B, Bufo SA, Karaman R, Scrano L. Cannabis: A toxin-producing plant with potential therapeutic uses. *Toxins* 2021; 13: 117
44. Tellioğlu T, Tellioğlu Z. Tıbbi esrar psikiyatrik bozuklukların tedavisinde kullanılabilir mi?. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2012; 22: 98-109.
45. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 42: 327-60.
46. Chayasirisobhon S. 2020; Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *Perm J* 2003; 25: 1-3.
47. Hernandez-Avila CA, Burleson JA, Poling J, Tennen H, Rounsaville BJ, Kranzler HR. Personality and substance use disorders as predictors of criminality. *Compr Psychiatry* 2000; 4: 276-83.
48. Suelter CH, Watson JT. Practical Aspect of Gas Chromatography Mass Spectrometry England: John Wiley&Sons; 1990 pp: 2-42.
49. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton R. Fundamentals of Analytical Toxicology England: John Wiley&Sons; 2007 p: 249-79.
50. Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. Principles of Instrumental Analysis Molecular Mass Spectrometry Philadelphia: Saunders College Publishing; 1998 p: 498-534.
51. Bartlett K, Eaton SJ2, Pourfarzam M. New developments in neonatal screening. *Arch Dis Childh* 1997; 7: 151-154.
52. Sweetman L. Newborn screening by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1996; 42: 345-6.

53. European Medicines Agency (EMA)/Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on Bioanalytical Method Validation EMA/CHMP London United Kingdom 2011.



ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ESRAR KULLANIMININ TESPİTİNDE ENZİMATİK HİDROLİZ
ETKİNLİĞİNİN ULTRA PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 13	% 4	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	Submitted to Üsküdar Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 3
3	academic.oup.com İnternet Kaynağı	% 1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	d78ea76a-1faa-490b-96df- 3833ce6eddb7.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1