T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ANKARA ŞEHİR HASTANESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

UYUŞTURUCU MADDE ANALİZİNDE TÜKÜRÜK, İDRAR, KAN ÖRNEKLERİNDE KULLANILAN TARAMA VE DOĞRULAMA YÖNTEMLERİNİN LABORATUVAR VE KLİNİK BAKIŞ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tıpta Uzmanlık Tezi

Asist. Dr. Gamze Avcıoğlu

Ankara, 2019

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ANKARA ŞEHİR HASTANESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

UYUŞTURUCU MADDE ANALİZİNDE TÜKÜRÜK, İDRAR, KAN ÖRNEKLERİNDE KULLANILAN TARAMA VE DOĞRULAMA YÖNTEMLERİNİN LABORATUVAR VE KLİNİK BAKIŞ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tıpta Uzmanlık Tezi

Asist. Dr. Gamze Avcıoğlu

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ

Ankara, 2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması süresince bilgilerini ve tecrübelerini özveri ile aktaran, hiçbir konuda benden yardımını esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım ve kendisini örnek aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktararak desteklerini esirgemeyen ve bizleri çok yönlü olarak yetiştirmeye çabalayan, tıbbi biyokimya uzmanlığının yanı sıra akademik bir vizyon da kazandırmaya çalışan ve mesleğe adım atmaya hazırlandığım dört yıl boyunca kendimi her anlamda çok şanslı hissetmemi sağlayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Özcan EREL, Prof. Dr. Gülsen YILMAZ, Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Ceylan BAL, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Canan TOPÇUOĞLU, Doç. Dr. Sevilay SEZER, Doç. Dr. Turan TURHAN ve Dr. Öğr. Üyesi Salim NEŞELİOĞLU'na;

Biyokimya uzmanlığı adına bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bu meslekte yetişmemi sağlayan, aydınlatıcı fikirleri ve yaklaşımları ile örnek olan değerli uzmanlarımız; Ankara Şehir Hastanesi uzman doktorlarına;

Asistanlık eğitimime başlama sürecimde samimi desteklerini ve anlayışlarını esirgemeyen tecrübelerini aktararak hızlı adapte olmamı sağlayan Uzm. Dr. Merve ERGİN, Uzm. Dr. Murat ALIŞIK ve Uzm. Dr. Ahmet Rıfat BALIK'a;

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, karşılıklı saygı ve anlayış içinde çalıştığım asistan arkadaşlarım; Almila ŞENAT, Emine Feyza YURT, Gamze GÖK, Suadiye SAĞLAM'a;

Beni her zaman destekleyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan annem Emine AVCIOĞLU, babam Abdullah AVCIOĞLU'na ve kardeşim Alper AVCIOĞLU'na sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Gamze AVCIOĞLU

Ankara, 2019

ÖZET

Madde kullanım bozukluğu bireyde ve toplumda oldukça önemli psikolojik, ekonomik ve sosyolojik problemlere yol açmaktadır. Türk Ceza Kanunu'nun 191. maddesinde uyuşturucu/uyarıcı madde kullanmanın yasak olduğu ve tedavi veya Denetimli Serbestlik tedbirine uyulmaması durumunda iki yıldan beş yıla kadar hapis cezası ile cezalandırılmasının söz konusu olacağı hükmü yer almaktadır. Dolayısıyla uyuşturucu/uyarıcı maddelerin doğru ve kesin bir şekilde tespit edilmesi çok önemlidir.

Uyuşturucu/uyarıcı maddelerin taranmasında immün yöntemler, doğrulanmasında kromatografi ve kütle spektrometri yöntemi kullanılmaktadır. Madde kullanım bozukluğu olan ya da Denetimli Serbestlik tedbirine tabi tutulan bireylerin tedavileri AMATEM kliniklerinde yapılmakta olup bireylerin idrar örneklerinde immün yöntem ile uyuşturucu/uyarıcı madde taraması yapılmaktadır. Trafikte ise bireyin uyuşturucu/uyarıcı madde etkisi altında olup olmadığının değerlendirilmesinde tükürükte POCT cihazı ile esrar, eroin, kokain, amfetamin ve benzodiazepinlerin taraması yapılmaktadır. Bu immün yöntemlerden elde edilen pozitif tarama sonuçları gerek görülmesi durumunda Adli Tıp kurumlarında LC-MS/MS yöntemi ile doğrulanmaktadır.

Trafikte uyuşturucu madde taramasında kullanılan POCT yönteminin ve AMATEM kliniğinde kullanılan immün yöntemin güvenilirliği ilk kez bu çalışma ile test edilmiştir. Ülkemizde kullanılan bu iki tarama yönteminin sonuçları ticari kit ve laboratuvarda geliştirilen yöntem kullanılarak LC-MS/MS cihazı ile plazma ve idrar örneklerinde doğrulanmıştır. Çalışmamızda trafik uygulamasında deneme aşamasında olan ve Denetimli Serbestlik kurumlarında da kullanımına ihtiyaç duyulan POCT cihazı açısından anlamlı veriler elde edilmiştir. Kullandığımız POCT cihazının spesifitesi yüksek olarak saptanmış, ancak sensitivitesi eroin, kokain ve amfetamin maddeleri için iyi, MDMA/metamfetamin için yetersiz olarak saptanmış olup benzodiazepinler ve esrar için tükürük testinde pozitif sonuç saptanamadığından sensitivite hesaplanamamıştır.

AMATEM kliniğinde kullanılan immün yöntemin ise amacına uygun olarak yeterli sensitivitede olduğu gözlenmiş olup çapraz reaksiyona bağlı spesifite problemlerinin olabildiği göz önünde bulundurulmalıdır. AMATEM'de kullanılan immün yöntemin cut-off limitinin opiyatlar için 300 ng/mL yerine SAMHSA'nın da önerdiği şekilde 2000 ng/mL olarak kullanılması durumunda yöntemin spesifitesinin %83'ten %95'e yükseldiği

saptanmıştır. Bu nedenle yalancı pozitif sonuçların ve doğrulamaya giden örnek sayısının azaltılması adına opiyatlar için 2000 ng/mL cut-off limitinin kullanılması önerilir.

Çalışmamızda idrar ve kan örneklerinde ticari kit ve laboratuvarda geliştirilen LC-MS/MS doğrulama yöntemleri iki farklı cihazda karşılaştırılmış ve validasyon parametreleri hesaplanmıştır. Çalışmamız ayrıca LC-MS/MS yöntemlerine ait iyonizasyon modu, ekstraksiyon yöntemi, kullanılan standartlar gibi farklılığa neden olabilecek birçok parametre açısından anlamlı veriler içermektedir.

Sonuç olarak uyuşturucu/uyarıcı madde analizinde verilen pozitif ya da negatif sonucun kişinin tutuklanmasına kadar gidecek adli sürecin bir parçası olduğunun akıldan çıkarılmaması önemlidir. Yapılan analizlerin analitik aşamada validasyonu ve verifikasyonu kadar madde özelinde kullanım zamanının ve analizin yapıldığı örnek tipinin sonuca etkisini de iyi bilerek değerlendirmeyi buna göre yapmak elzemdir. Ayrıca kullanım amacına özel POCT cihazlarının geliştirilmesi ve mutlaka geliştirilen her cihazın performans değerlendirmesinin de yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: madde ile ilişkili bozukluklar, yöntem karşılaştırma, hasta başı test cihazı, immün yöntem, LC-MS/MS yöntemi

ABSTRACT

Substance abuse causes significant psychological, economic and sociological problems in the individual and society. Article 191 of the Turkish Penal Code states that the use of drugs/stimulants is prohibited and that if the treatment or probation measure is not followed, it will be punishable by imprisonment from two to five years. Therefore, it is very important that the drugs/stimulants are identified correctly and precisely.

Immunological methods are used for screening drugs/stimulants, chromatography and mass spectrometry are used for verification. The treatment of individuals with substance use disorder or who have been subjected to Probation measure is carried out in AMATEM clinics and the individuals' urine samples are screened by immunoassays. On the other hand, cannabis, heroin, cocaine, amphetamine and benzodiazepines are screened in saliva with the help of POCT device to assess whether the individual is driving under the influence of drugs/stimulants in the saliva. Positive screening results obtained from these immune methods are confirmed by LC-MS/MS method in Forensic Medicine institutions if necessary.

The safety of the POCT method used in traffic drug screening and the immune method used in AMATEM clinic was tested for the first time in this study. The results of these two screening methods used in our country were confirmed by LC-MS/MS device in plasma and urine samples by using commercial kit and laboratory developed method. In our study, significant data were obtained in terms of POCT device which is in trial phase in traffic application and needed to be used in probation institutions. The specificity of our POCT device was found to be high, but the sensitivity was good for heroin, cocaine and amphetamines, insufficient for MDMA/methamphetamine, and because of the positive results in the saliva test for benzodiazepines and cannabis, the sensitivity could not be calculated.

It is observed that the immune method used in AMATEM clinic has sufficient sensitivity in accordance with its purpose and it should be considered that there may be specificity problems due to cross reaction. When the cut-off limit of the immunostaining method used in AMATEM was used as 2000 ng/mL, as suggested by SAMHSA instead of 300 ng/mL for opiates, the specificity of the method increased from 83% to 95%. It is

therefore recommended to use a cut-off limit of 2000 ng/mL for opiates to reduce false positive results and the number of samples leading to validation.

In our study, validation methods of urine and blood samples LC-MS/MS validation parameters developed in the commercial kit and laboratory were compared and calculated. Our study also contains meaningful data in terms of many parameters that may cause differences such as ionization mode, extraction method and standards used in LC-MS/MS methods.

As a result, it is important to keep in mind that the positive or negative result given in the drugs/stimulant analysis is part of the judicial process leading to the arrest of the person. As well as validation and verification of the analyzes performed at the analytical stage, it is essential to evaluate the effect of the usage time and the type of the sample on the result by knowing the results accordingly. In addition, it is necessary to develop specific POCT devices and to evaluate the performance of each device developed.

Key words: substance-related disorders, method comparison, POCT testing, immune method, LC-MS/MS method

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR ..... **iv**

ÖZET ..... **v**

ABSTRACT ..... **vii**

Sayfa No: ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xvi**

Sayfa No: ..... **xvi**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xviii**

Sayfa No: ..... **xviii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

2.1. Madde Kullanımı/Bağımlılığına Genel Bakış 2

2.1.1. Bağımlılık tanımı 2

2.1.2. Madde Bağımlılığı 2

2.1.3. Madde kullanımı ölçütleri 2

2.2. Türkiye'de bağımlılığın yeri 5

2.2.1. Madde kullanımı ile ilgili ölümler 7

2.3. Maddelerin sınıflandırılması 8

2.3.1. Esrar 8

2.3.1.1. Farmakokinetik etkileri 9

2.3.2. Opioidler ve opiyatlar 10

2.3.2.1 Farmakokinetik 11

2.3.3. Kokain 13

2.3.3.1. Farmakokinetik 13

2.3.4. Amfetaminler 14

2.3.4.1. Farmakokinetik etkileri 15

2.3.5. Benzodiazepinler 16

2.3.5.1. Farmakokinetik etkileri 16

2.4. Madde analizinde kullanılan örnek tipleri 18

2.4.1 İdrar ve tükürük örneklerinde madde karıştırma sorunları 22

2.4.2. Maddelerin idrar, kan ve tükürükte tespit zamanı 23

2.5. Maddelerin analiz yöntemleri 25

2.5.1. POCT 25

2.5.1.1. Tükürükte immünokromatografik kart testlerin yapısı ve çalışma prensibi 26

2.5.1.2. Tükürük numunesinin alınması, taşınması ve POCT ile analizi 28
2.5.1.3. Tükürükte esrar, amfetaminler, kokain, opioid ve opiyatlar ve benzodiazepinlerin POCT ile değerlendirilmesi 30
2.5.1.3.1. POCT ile tükürükte esrar analizi 30
2.5.1.3.2. POCT ile tükürükte opiyat analizi 31
2.5.1.3.3. POCT ile tükürükte kokain analizi 31
2.5.1.3.4. POCT ile tükürükte amfetamin analizi 33
2.5.1.3.5 POCT ile tükürükte benzodiazepin analizi 34
2.5.1. İmmün yöntemler 35
2.5.1.1. İmmünoassay tipleri 37
2.5.1.2. Maddelerin immünoassay ile analizi ve yöntemin interferansları 38
2.5.1.2.1. İmmünoassay ile esrar analizi 38
2.5.1.2.2. İmmünoassay ile opiyat analizi 39
2.5.1.2.3. İmmünoassay ile kokain analizi 40
2.5.1.2.4. İmmünoassay ile amfetamin analizi 41
2.5.1.2.5 İmmünoassay ile benzodiazepin analizi 42
2.5.1. Kromatografik ve kütle spektrometrik yöntemler 45
2.5.1.1. Örnek hazırlığı 46
2.5.1.2. İyonizasyon ve tarama modları 48
2.5.1.2. Kütle spektrometrisi ve immün yöntemlerin karşılaştırılması 48
2.6. LC-MS/MS ile esrar, amfetaminler, kokain, opiyat ve benzodiazepinlerin analizleri 50
2.6.1. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda esrar analizi 50
2.6.1.1. Plazmada esrar analizi 50
2.6.1.2. İdrarda esrar analizi 51
2.6.2. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda opiyat analizi 52
2.6.2.1. Plazmada opiyat analizi 52
2.6.2.2. İdrarda opiyat analizi 53
2.6.3. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda kokain analizi 54
2.6.3.1. Plazmada kokain analizi 54
2.6.3.2. İdrarda kokain analizi 54
2.6.4. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda amfetamin analizi 55
2.6.4.1. Plazmada amfetamin analizi 55
2.6.4.2. İdrarda amfetamin analizi 56
2.6.5. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda benzodiazepin analizi 56
2.6.5.1. Plazmada benzodiazepin analizi 56
2.6.5.2. İdrarda benzodiazepin analizi 57

2.7. Yöntem Değerlendirme ve Validasyonu 57
3. MATERYAL VE YÖNTEM 60
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler 60
3.1.1. İmmünokromatografik kart test 60
3.1.2. LC-MS/MS ticari kit 60
3.1.3. LC-MS/MS laboratuvarda geliştirilen metot (LGM) 60
3.2. Kullanılan cihazlar 61
3.3. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri 62
3.4. Yöntemler 63
3.4.1. Tükürükte yapılan ölçümler 63
3.4.2. İdrarda yapılan ölçümler 66
3.4.2.1. İmmünoassay 66
3.4.2.2. LC-MS/MS 67
3.5. Metot validasyonu 76
3.5.1. Kalibrasyon eğrileri 76
3.5.2. Kesinlik (Precision) 76
3.5.3. Gün içi kesinlik 76
3.5.4. Günler arası kesinlik 76
3.5.5. Gerçeklik (Trueness) 77
3.5.6. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ) 77
3.5.7. Doğrusallık (Linearite) 77
3.5.8. Geri Kazanım (Recovery) 77
3.6. İstatistiksel analiz 77
4. BULGULAR 79
4.1. Kromatogramlar 86
4.2. Kalibrasyon eğrileri 89
4.3. Tükürük testinin tanısal yeterlilik analizi bulguları 92
4.4. İdrar immünoassay yönteminin tanısal yeterlilik analizi bulguları 95
4.5. Yöntemlerin karşılaştırılması 98
4.5.1. LC-MS/MS ticari ve LGM 98
4.6. ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max Cihazlarının karşılaştırılması 103
4.7. Metot Validasyonu 115
4.7.1. Kalibrasyon Eğrileri 115
4.7.2. Kesinlik (Precision) 115
4.7.2.1. Gün İçi Kesinlik 116

4.7.2.2. Günler Arası Kesinlik 116
4.7.2.3. Gerçeklik (Trueness) 116
4.7.2.4. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ) 116
4.7.2.5. Doğrusallık (Linearity) 116
4.7.2.6. Geri Kazanım (Recovery) 116
5. TARTIŞMA 119
Opiyat 122
Kokain 123
Amfetamin 123
Esrar 124
Benzodiazepinler 126
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 154
7. KAYNAKLAR 157
8. EKLER 175
EK-1: ETİK KURUL ONAYI 175
ÖZGEÇMİŞ 176

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
APA	Amerikan Psikiyatri Birliği
ICD	Uluslararası Hastalık Sınıflaması
DSM	Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Sınıflandırma El Kitabı
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme
TUBİM	Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
AMATEM	Alkol Madde Bağımlılığı Araştırma, Tedavi ve Eğitim Merkezleri
SCORE	Kanalizasyon Analizi Çekirdek Grubu Avrupa
THCA-A	Δ^9-tetrahidrokannabinolik asit-A
THC	Δ^9-tetrahidrokannabinol
THC-COOH	11-nor-Δ^9-tetrahidrokannabinol-9-karboksilik asit
CBD	Kannabidiol
CBN	Kanabinol
IM	İntramüsküler
IV	İntravenöz
SC	Subkütanöz,
IN	İntranazal
DAM	Eroin
6-MAM	6-monoasetil-morfin
MOR	Morfin
COC	Kokain
BZE	Benzoilekgonin
EME	Ekgonin metil ester
CE	Kokaetilene

AMP	Amfetamin
MA	Metamfetamin
MDA	3,4-metilendioksiamfetamin
MDE	metilendioksi-N-etilamfetamin
MDMA	3,4-metilendioksi-N-metamfetamin
MBDB	N-metil-1-(1,3-benzodiokso-5-il)-2-butanaminefedrin
SAMHSA	Madde Bağımlılığı ve Ruh Sağlığı Hizmetleri İdaresi
POCT	Hasta başı test cihazları
TLC	İnce tabaka kromatografi
LC-MS	Sıvı kromatografi kütle-spektrometresi
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
TOF-MS	Time-of-flight-kütle spektrometresi
FPIA	Floresans polarizasyon immünassay
EMIT	Enzim çoğaltılmış immünoassay tekniği
CEDIA	Klonlanmış enzim donör immünoassay
KIMS	Solüsyondaki mikropartiküllerin kinetik etkileşimi
MS	Kütle spektrometri
PP	Protein presipitasyonu
SSE	Sıvı sıvı ekstraksiyon
SPE	Solid faz ekstraksiyon
ESI	Elektrosprey
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
SIM	Seçilen iyonu izleme
MRM	Çoklu reaksiyon izleme

CSP	Teknikler kiral sabit fazlar
CDR	Kiral türevlendirme reaktifleri
CDS	Mobil fazdaki kiral seçimi
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
SD	Standart sapma
CV	Varyasyon katsayısı
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
GP	Gerçek pozitif
GN	Gerçek negatif
YP	Yalancı pozitif
YN	Yalancı negatif
PPV	Pozitif prediktif değer
NPV	Negatif prediktif değer

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Esrar metabolizması (16) **10**

Şekil 2. Eroin metabolizması **12**

Şekil 3. Kokain metabolizması **14**

Şekil 4. Benzodiazepinlerin metabolizması **15**

Şekil 5. Farklı matrikslerdeki maddelerin retansiyon zamanları (30). **20**

Şekil 6. Şekil A'da kart testin yapısı ve Şekil B'de negatif ve pozitif örneklerin değerlendirilmesi… …….. ..... **28**

Şekil 7. Delta-9 THC seviyelerinin zamana göre değişimi (12). **31**

Şekil 8. BZE seviyelerinin tükürük ve plazmada zaman göre değişimi **32**

Şekil 9. 10 ve 20 mg dozlarda uygulanan amfetamin ve metamfetamin konsantrasyonlarının tükürükte zamana göre değişimi **34**

Şekil 10. Diazepamın tükürükteki konsantrasyonunun zamana göre değişimi (71) **35**

Şekil 11. Çalışmamızda kullanılan ABSCIEX Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS sistemi.. **62**

Şekil 12. ARMAS UTC Uyuşturucu Test kiti cihazı ve kokain pozitif örnek **65**

Şekil 13. Plazma santrifüj sonrasında (a), idrar tüp ile ekstraksiyon aşaması (b), idrar örneği santrifüjden sonra (c) **71**

Şekil 14. Analiz edilen maddelere ait kromatogram **86**

Şekil 15. Amfetamin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram **86**

Şekil 16. Oksazepam için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram **87**

Şekil 17. BZE için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ait kromatogram **87**

Şekil 18. Morfin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram **88**

Şekil 19. THC-COOH için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram **88**

Şekil 20. Amfetamin için için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri **89**

Şekil 21. Oksazepam için için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri **90**

Şekil 22. BZE LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A) ve idrar (B) ait kalibrasyon eğrileri **90**

Şekil 23. Morfin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri **91**

Şekil 24. THC-COOH için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri **91**

Şekil 25. Amfetamin grafikleri (A1,A2 ve A3), metamfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), MDMA grafikleri (C1, C2 ve C3), MDA grafikleri (D1, D2 ve D3), THC-COOH grafikleri (E1, E2 ve E3), morfin grafikleri (F1, F2 ve F3), kodein grafikleri (G1, G2 ve G3) ve oksazepam grafikleri (H1, H2 ve H3) **101**

Şekil 26. İdrarda maddelere ait LC-MS/MS ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarının karşılaştırılmasında (A-L)-1'de korelasyon analizi, (A-L)-2'de Bland-Altman analizi ve (A-L)-3'te Passing-Bablok regresyon analizi yer almaktadır. THC-COOH grafikleri (A1, A2 ve A3), amfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), metamfetamin grafikleri (C1, C2 ve C3), MDA grafikleri (D1, D2 ve D3), pregabalin grafikleri (E1, E2 ve E3), MDMA grafikleri (F1, F2 ve F3), morfin grafikleri (G1, G2 ve G3), hidromorfon grafikleri (H1, H2 ve H3), BZE grafikleri (I1, I2 ve I3), hidrokodon grafikleri (J1, J2 ve J3), kodein grafikleri (K1, K2 ve K3) ve kokain grafikleri (L1, L2 ve L3) olarak gösterilmektedir. **108**

Şekil 27. Plazmada maddelere ait LC-MS/MS ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarının karşılaştırılmasında (A-I)-1'de korelasyon analizi, (A-I)-2'de Bland-Altman analizi ve (A-I)-3'te Passing-Bablok regresyon analizi yer almaktadır. THC-COOH grafikleri (A1, A2 ve A3), amfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), metamfetamin grafikleri (C1, C2 ve C3), morfin grafikleri (D1, D2 ve D3), pregabalin grafikleri (E1, E2 ve E3), MDMA grafikleri (F1, F2 ve F3), BZE grafikleri (G1, G2 ve G3), diazepam grafikleri (H1, H2 ve H3) **113**

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Madde İle İlişkili Bozukluklar ve Bağımlılık Bozuklukları (DSM-V) **3**

Tablo 2. Madde ile İlişkili Bozukluklar ve Bağımlılık Bozuklukları (DSM-V) **4**

Tablo 3. Benzodiazepinlerin yarı ömürleri **17**

Tablo 4. Maddelerin ortalama tükürük:plazma oranları ve pKa değerleri (31). **19**

Tablo 5. Matrikslerin avantajları ve dezavantajları **21**

Tablo 6. Maddelerin kan, plazma veya serumdaki tespit zamanları ve tespit sınırları **24**

Tablo 7. Maddelerin tükürükteki tespit zamanları ve tespit sınırları **24**

Tablo 8. Maddelerin idrardaki tespit zamanları ve tespit sınırları **24**

Tablo 9. Tükürük testi için SAMHSA tarafından önerilen cutoff değerleri **29**

Tablo 10. Maddelerin idrarda tarama ve doğrulama testleri için SAMHSA ve Avrupa tespit limitleri (72). **36**

Tablo 11. Madde analizinde kullanılan immünoassay çeşitleri **37**

Tablo 12. İmmünoassay ile madde analizinde interfere edici uygulamalar (85). **44**

Tablo 13. İmmünokromatografik testinde kullanılan parametreler ve cut-off limitleri **65**

Tablo 14. Maddelerin kalibre edildiği parametreler ve cut-off değerleri **66**

Tablo 15. LC-MS ticari test kiti ile madde analizinde kullanılan cut-off limitleri **68**

Tablo 16. Plazma ve idrar kalibratörlerinin hazırlanmasında kullanılan veriler **70**

Tablo 17. Gradyan faz akış özellikleri **72**

Tablo 18. MS sistemi özellikleri **72**

Tablo 19. Analiz edilen maddeler metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş moleküler iyon (Q1), prekürsör iyon (Q3), DP (kümeleşme önleyici potansiyel), EP (giriş potansiyeli), CE (parçalanma enerjisi), CXP (parçalanma hücresi çıkış potansiyeli) ve retansiyon zamanı (Rt) değerleri **73**

Tablo 20. Gönüllülerin demografik verileri **79**

Tablo 21. Maddelerin son kullanım zamanına ilişkin bulgular **80**

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait veriler **81**

Tablo 23. Tükürükte tanısal duyarlılık testlerinin plazma ile karşılaştırılması **93**

Tablo 24. Tükürük, plazma ve idrarda maddelerin değerlendirilmesi devamı **93**

Tablo 25. İdrar İA internal kalite kontrol bulguları **96**

Tablo 26. İdrar immünoassay yönteminin tanısal duyarlılığının LC-MS/MS yöntemi ile değerlendirilmesi **96**

Tablo 27. İdrar immünoassay ve tükürük testi/plazma ve LC-MS/MS yönteminin değerlendirilmesi **97**

Tablo 28. Maddelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre korelasyon analizi **102**

Tablo 29. Parametrelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre Bland-Altman analizi **102**

Tablo 30. Parametrelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre Passing-Bablok regresyon analizi **103**

Tablo 31. İdrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazları analiz edilen maddelerin korelasyon analizi **108**

Tablo 32. Parametrelerin idrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Bland-Altman analizi **109**

Tablo 33. Parametrelerin idrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Passing-Bablok regresyon analizi **110**

Tablo 34. Plazmada LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazları analiz edilen maddelerin korelasyon analizi **114**

Tablo 35. Plazmada maddelerin LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Bland-Altman analizi **114**

Tablo 36. Parametrelerin plazmada LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Passing-Bablok regresyon analizi……115

Tablo 37. Validasyon çalışması sonuçları **117**

1. GİRİŞ

Ülkemizde çeşitli nedenlerle farklı yöntemler kullanılarak uyuşturucu/uyarıcı madde analizleri gerçekleştirilmekte; tedavi olmak için veya Denetimli Serbestlik kontrolü kapsamında AMATEM kliniklerine başvuran bireylerin idrar örneklerinde tarama amaçlı olarak immün yöntemler, trafikte bireyin madde etkisi altında olup olmadığının değerlendirilmesinde tükürük örneğinde tarama amacıyla POCT cihazı, acil servislerde bilinci yerinde olmayan veya intoksikasyonu olan bireylerde tarama amacıyla kart testler, Adli Tıp kurumlarında ve tarama yöntemlerinin doğrulanmasında ise doğrulama amacıyla LC-MS/MS yöntemi kullanılmaktadır. Belirtilen yöntemlerin, kullanılan örnek türlerinin ve örnek alım zamanlarının madde analizleri üzerine etkisini bilmek, sonuçların doğru yorumlanması için son derece kritiktir.

Bu bağlamda sunduğumuz tezin amaçları;

1. Trafikte uyuşturucu ve/veya uyarıcı madde kullanımının taranması amacıyla kullanılmaya başlanan tükürükte uyuşturucu madde tarama cihazının tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesi,
2. AMATEM kliniklerinde kullanılan ve tarama yöntemi olarak kabul edilen idrar immün yönteminin tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesi,
3. Madde analizinde kullanılan tükürük, idrar ve kan matrikslerinin farklarının değerlendirilmesi,
4. İdrarda madde kullanım bozukluğu tanısının değerlendirilmesinde kullanılan ticari kit ve laboratuvarda geliştirilen LCMS-MS yönteminin karşılaştırılması,
5. Laboratuvarda geliştirilen yöntemin validasyonu ve bu yöntemin kullanıldığı iki farklı cihazın karşılaştırılması,
6. Rutin kullanım bakış açısından "tüm veriler dahil edildiğinde hangi matriks, hangi yöntem, hangi durumda kullanılmalı" sorusunun tartışılması,

olarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Madde Kullanımı/Bağımlılığına Genel Bakış

2.1.1. Bağımlılık tanımı

Bağımlılık; nesneye, kişiye, ya da bir varlığa duyulan önlenemez istek veya bir başka iradenin güdümü altına girme durumu olarak tanımlanabilir ve bireyin mental aktivitesi ile ilişkili patolojik bir davranışı yansıtır. Bağımlılık bireylerin ruhsal ve bedensel sağlığına ya da sosyal yaşamına zarar vermesine karşın, belirli bir takıntılı durumu yinelemeye yönelik engellenemeyen bir istek duymaları ve bunu sürdürmeleri halidir (1).

2.1.2. Madde Bağımlılığı

Madde bağımlılığının temel özelliği, madde kullanımının yol açtığı birçok soruna (tıbbi, ekonomik, sosyal, mesleki) rağmen kişinin kompulsif tarzda madde kullanmasına neden olan bilişsel, fizyolojik, davranışsal belirtilerin varlığıdır (2).

2.1.3. Madde kullanımı ölçütleri

Toplumda önemli bir sorun haline gelen madde kullanımı önleme ve tedavi çalışmaları hızlanmış olup bu bağlamda madde kullanımının tanısında çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Bu konuda en sık kullanılan sistemler olan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) tarafından yayımlanan ICD (Uluslararası Hastalık Sınıflaması) ve DSM (Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Sınıflandırma El Kitabı) sınıflandırmalarıdır. DSM-I (1952)'den itibaren DSM-V'e kadar bağımlılık tanımlaması yapılmış olup güncel olan sınıflama, DSM-V'tir (2013). DSM-V bağımlılıklar dahil birçok ruhsal hastalığın isimleri, semptomları ve teşhis özellikleri hakkındaki altın standart kılavuzdur.

2013 yılında APA tarafından yayınlanan DSM-V' te madde kullanım bozukluğu durumunu ifade ederken terminolojide değişiklik yapılarak DSM-IV' te yer alan "madde kullanım bozukluğu (abuse)" veya "madde bağımlılığı" (dependence) terimleri kaldırılmıştır. Bu iki ayrı tanıma ait tanı ölçütleri birleştirilmiş ve 11 farklı kritere dayanan "madde kullanım bozukluğu" tanımı getirilmiştir (3). Bunun nedeni, "madde kullanım bozukluğu " tanısının güvenilirliğinin düşük olması ve iki tanı arasındaki ayrımın belirsiz

olmasıdır. Bu değişiklikle bağımlılık kavramı sadece madde kullanım bozukluğu ve bağımlılığıyla ilişkili olmayan bir "davranış" problemi olarak kabul edilmiştir (3). Madde ile ilişkili bozukluklar ve bağımlılık bozuklukları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Madde İle İlişkili Bozukluklar ve Bağımlılık Bozuklukları (DSM-V)

Madde kullanım bozukluğu tanı ölçütleri
1. Çoğu kez, istendiğinden daha büyük ölçüde ya da uzun süreli olarak madde alınır.
2. Madde kullanmayı bırakmak ya da denetim altında tutmak için sürekli bir istek ya da sonuç vermeyen çabalar vardır.
3. Madde elde etmek, madde kullanmak ya da yarattığı etkilerden kurtulmak için gerekli etkinliklere çok zaman ayrılır.
4. Madde kullanmaya içinin gitmesi ya da madde kullanmak için çok büyük bir istek duyma ya da kendini zorlanmış hissetme.
5. İşte okulda ya da evdeki konumunun gereği olan başlıca yükümlülüklerini yerine getirememe ile sonuçlanan, yineleyici madde kullanımı.
6. Maddenin etkilerinin neden olduğu ya da alevlendirdiği, sürekli da yineleyici toplumsal da kişilerarası sorunlar olmasına karşın madde kullanımını sürdürme.
7. Madde kullanımından ötürü önemli bir takım toplumsal, işle ilgili etkinliklerin ya da eğlenme-dinlenme etkinliklerinin bırakılması da azaltılması.
8. Yineleyici bir biçimde, tehlikeli olabilecek durumlarda madde kullanma.
9. Büyük bir olasılıkla maddenin neden olduğu ya da alevlendirdiği, sürekli ya da yineleyici bedensel ya da ruhsal bir sorunu olduğu bilgisine karşın madde kullanımı sürdürülür.
10. Aşağıdakilerden biriyle tanımlandığı üzere, dayanıklılık (tolerans) gelişmiş olması:
a. Esrikliği (zehirlenme) ya da istenen etkiyi sağlamak için belirgin olarak artan ölçülerde madde kullanma gereksinimi.
b. Aynı ölçüde madde kullanımının sürdürülmesine karşın belirgin olarak daha az etki sağlanması.
11. Aşağıdakilerden biriyle tanımlandığı üzere, yoksunluk gelişmiş olması:
a. Maddeye özgü yoksunluk sendromu (ilgili maddenin yoksunluğu için A ve B tanı ölçütlerine bakın)
b. Yoksunluk belirtilerinden kurtulmak da kaçınmak için madde (ya da yakından ilişkili bir madde) alınır.

Bu 11 tanı ölçütünden 2 veya daha fazlasının bulunması tanı koymak için yeterlidir. Bu ölçütlerden elde edilen sonuçlara göre bozukluk; hafif şiddetli (2-3 ölçüt), orta şiddetli (4-5 ölçüt) ve ağır (6 ölçüt ve daha fazlası) olarak derecelendirilmektedir (4).

DSM-V'te on tane madde sınıfı tanımlanmıştır; Alkol, kafein, kannabis (kenevir), hallusinojenler (fensiklidin ve diğer hallusinojenler olmak üzere), uçucu maddeler (inhalanlar), opiyatlar, sedatif-hipnotikler, uyarıcılar, tütün ve diğer (ya da tanımlanamayan) (Tablo 2).

Tablo 2. Madde ile İlişkili Bozukluklar ve Bağımlılık Bozuklukları (DSM-V)

I. Madde ile ilişkili bozukluklar ➢ Madde kullanım bozuklukları • Alkolle ilişkili bozukluklar • Kafeinle ilişkili bozukluklar • Kenevirle (kannabis) ilişkili bozukluklar • Varsandıranla (hallusinojenle) ilişkili bozukluklar • Uçucuyla (inhalanla) ilişkili bozukluklar • Opiyatla ilişkili bozukluklar • Dinginleştirici, uyutucu ya da kaygı gidericiyle (sedatif, hipnotik ya da anksiyolitikle) ilişkili bozukluklar • Uyarıcıyla ilişkili bozukluklar • Tütünle ilişkili bozukluklar • Diğer (ya da bilinmeyen) bir maddeyle ilişkili bozukluklar ➢ Maddenin yol açtığı bozukluklar • Madde esrikliği (zehirlenmesi) • Madde yoksunluğu • Maddenin/ilacın yol açtığı ruhsal bozukluklar
II. Madde ile ilişkili olmayan bozukluklar • Kumar oynama bozukluğu

2.2. Türkiye'de bağımlılığın yeri

Madde kullanım bozukluğu bireyde ve toplumda oldukça önemli psikolojik, ekonomik ve sosyolojik problemlere yol açmaktadır. Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) tarafından yayımlanan 2019 yılı Türkiye Ülke Uyuşturucu Raporu ve TUBİM (Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi) 2019 yılı Türkiye Uyuşturucu Raporu'na göre 15-64 yaş arası yetişkinler tarafından kullanılan en yaygın kullanılan yasadışı madde esrar olarak bildirilmiştir. Esrarı, MDMA/ekstazi ve kokain izlemektedir (5). Ülkemizde madde kullanım bozukluğu oranlarının en yüksek olduğu popülasyon 15-34 yaş arasındaki genç erkekler olarak bildirilmiştir. Maddeyi ilk kullanım yaş ortalaması 19 olup incelenen bireylerin %3,1'inin (1338 kişi) hayatında en az bir kere madde kullandığı raporlanmıştır (yaşam boyu prevalans). TUBİM Raporu'na göre hayatında en az bir kere madde kullananların %94'ü erkek, %6'sı ise kadın olarak belirtilmiştir (6). 15-34 yaş arasındaki bireylerin %1,8 inin kannabis, %0,2'sinin MDMA ve %0,1'inin kokain kullandığı belirlenmiştir.

EMCDDA 2019 Türkiye raporuna göre öğrenciler arasında madde kullanım verileri değerlendirildiğinde 14-19 yaş lise öğrencilerinde 2011 yılı tütün, alkol ve uyuşturucu kullanımı ile ilgili olarak tutum ve davranış anketi rapor edilmiştir. 15 yaşındaki öğrencilerin yaklaşık %1'i yaşam boyu herhangi bir ilacı kullanmadığını bildirirken, tüm katılımcılar göz önüne alındığında bu oran %1,5'e yükselmiştir. Cevap verenlerin yaklaşık % 0,3'ü esrar kullandığını bildirmiştir (5). TUBİM verilerine göre hayatında en az bir kere madde kullananların %20'sinin ilkokul mezunu, %18,3'ünün ortaokul mezunu, %29,9'unun ise lise mezunu olduğu ve madde kullanımının en yaygın olduğu grubun lise mezunu grubunun olduğu saptanmıştır.

Bu veriler göz önüne alındığında madde kullanım bozukluğu toplumu derinden etkilemekte ve giderek yaygınlaşmaktadır. Madde kullanım bozukluğu problemine yönelik toplumun tüm kesimlerini içine alan topyekûn bir mücadele gerekmektedir. Bu mücadele kapsamında 2018 yılında Türkiye'nin Ulusal Strateji ve Yasadışı Uyuşturucularla Mücadele Eylemi (2018-23), ülkenin beşinci stratejik uyuşturucu politikası belirlenmiş olup amacı; toplumu her türlü uyarıcı ve uyuşturucu madde kullanımından uzak tutmak" olarak belirtilmiştir (7). Ayrıca Türk Ceza Kanunu'nun 191. maddesinde "Kullanmak için uyuşturucu ve uyarıcı madde satın almak, kabul etmek veya bulundurmak ya da uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanmak" hükmü bulunmaktadır. Uyuşturucu veya uyarıcı madde

satın alan, kabul eden, bulunduranın yanı sıra, uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanan kimselerin de, iki yıldan beş yıla kadar hapis cezası ile cezalandırılması söz konusu olacaktır. Kanun koyucu, uyuşturucu veya uyarıcı madde kullanan kişiyi, aslında tedavi ve terapiye ihtiyaç duyan bir kişi olarak görmüş, kişinin hapis ile cezalandırılması yerine tedaviye ve denetimli serbestlik tedbirine tabi tutulması; uyuşturucu madde kabul eden veya bulunduran kişi hakkında ise kişinin yine hapis ile cezalandırılması yerine sadece denetimli serbestlik tedbirine tabi tutulması gerektiğini kabul ederek kişiye ikinci bir şans vermiştir. Bu bağlamda ülkemizde madde kullanım bozukluğu tanısı olan ayaktan veya yatarak tedavisi planlanan bireylerin tedavisinde Alkol Madde Bağımlılığı Araştırma, Tedavi ve Eğitim Merkezleri (AMATEM) önemli rol oynamaktadır.

2017'de AMATEM'lere başvuran kullanıcıların çoğunluğunun primer olarak opioid kullanım bozukluğu için, çoğunlukla eroin kullanımı, ardından esrar ve uyarıcılar (kokain dışındaki) için tedaviye geldiği belirtilmiştir. Madde kullanım bozukluğu için tedaviye gelen bireylerin çoğunuluğunun erkek olduğu belirlenmiştir.

2014 yılından bu yana, primer olarak amfetamin ve kokain kullanımıyla ilgili bozukluklar nedeniyle yataklı merkezlere tedaviye gelen yeni kullanıcı sayısında artışlar bildirilmiştir. Kannabis ile ilişkili yataklı tedavi merkezlerine başvuruların oranı son on yılda düşerken, son yıllarda, çoğu sentetik kannabinoidler olmak üzere, diğer yasadışı maddelerin kullanımı için tedaviye gelen kullanıcıların oranı artmıştır (5). Özel yataklı tedavi merkezlerinden elde edilen verilere göre eroin, 2017 yılında tedaviye ilk kez başlayan hastaların en sık kullandığı madde olarak tanımlanmıştır. Türkiye'de yüksek riskli uyuşturucu olarak çoğunlukla opioidler kullanılmaktadır. Tüm kullanıcıların yaklaşık beşte birinin eroini enjeksiyon şeklinde uygulandığı belirtilmiştir. Ayrıca 2017 yılında enjekte edilen uyuşturucu kullanımına bağlı yeni teşhis edilmiş 14 HIV enfeksiyonu vakası olduğu belirtilmiştir. 2015 yılında test edilen yaklaşık madde kullanım bozukluğu tedavisi alan 3000 bireyin hiçbiri HIV pozitif olmayıp, tedavi gören 10 kişiden 4'ü HCV antikorları için pozitif olarak sonuçlanmıştır (5).

Uyuşturucuyla mücadele kapsamında İstanbul ve Kanalizasyon Analizi Çekirdek Grubu Avrupa (SCORE) tarafından yürütülen atık sularda uyuşturucu madde analizi araştırmasına dahil olmuştur. Bu kampanyada amfetamin, metamfetamin, MDMA, esrar ve kokain analizi yapılmış olup hafta sonlarında bu bileşiklerin daha yüksek seviyeleri tespit edilmiş ve en fazla kullanılan madde esrar olarak belirlenmiştir (8).

Türkiye yasadışı madde transportu açısından önemli geçiş noktasındadır. Dolayısıyla çok sayıda yasadışı madde ele geçirilmekte olup ele geçirilen ilk 5 yasadışı madde kilogram cinsinden ölçülen miktarlara göre sıralanacak olursa; bitkisel kenevir, esrar reçinesi, eroin, kokain, metamfetamindir (5).

2.2.1. Madde kullanımı ile ilgili ölümler

Yasadışı maddelerin doğrudan kullanımına bağlı zehirlenmeler veya aşırı dozlar nedeniyle oluşan ölümlerin sayısında artış vardır. 2017 yılında, Adalet Bakanlığı'nın özel ölüm sicil kayıtları ile rapor edilen madde kullanım bozukluğu kaynaklı ölümlerin sayısı, 2012'den bu yana görülen büyük artışların ardından dengelenmiştir. Ölen bireylerin büyük çoğunluğu erkek, ortalama ölüm yaşı 32 olup ölen bireylerin çoğunda birden fazla madde tespit edilmiştir. Sentetik kannabinoidler bu vakaların üçte ikisinde mevcut olup vakaların yarısında sadece sentetik kannabinoidler tespit edilmiştir. Opioidlerden özellikle eroin ölümlerin dörtte birinden daha azında tespit edilmiştir. Türkiye'de görülen madde kullanım bozukluğu kaynaklı ölümlerde düzenli olarak yer alan diğer maddeler MDMD/ekstazi, amfetaminler ve kokaindir.

Yetişkinler arasında (15-64 yaş arası) tahmin edilen uyuşturucu kaynaklı ölüm oranı, 2017'de milyon başına 17 ölüm iken; bu sonucun, Avrupa ortalamasının milyon başına 22 ölümünden daha düşük olduğu raporlanmıştır (5). Ülkemizin bugüne kadar aile yapısı ve kararlı mücadele politikasının etkisiyle dünya ve Avrupa’ya göre daha iyi bir noktada olmasına karşılık özellikle gençlerimizin tüm dünyayı esir alan madde kullanımına karşı korunması önem arz etmektedir. Bu bağlamda uyuşturucu madde ie mücadelenin topyekün bir seferberlik şeklinde devam etmesi gerekmektedir.

2.3. Maddelerin sınıflandırılması

DSM V'e göre madde ile ilişkili bozukluklar ve bağımlılık bozuklukları başlığı altında on madde sınıfı bulunmaktadır ancak zorunlu yasal rehberler aşağıdaki madde ve metabolitleri için tarama analizini önermektedir (9). Ülkemizde aşağıdaki maddelerin taramasının yapılması nedeniyle bu araştırmada aşağıda yer alan 5 madde grubunun özelliklerinden bahsedilecektir.

- **Esrar ve metabolitleri**
- **Opiyat ve metabolitleri**
- **Amfetaminler**
- **Kokain metabolitleri**
- **Benzodiazepinler**

2.3.1. Esrar

Cannabis sativa (Hint keneviri, esrar, kannabis) bitkisi tıbbi ve psikoaktif özellikleri nedeniyle 5000 yıldır kullanılmaktadır. EMCDDA 2019 raporlarına göre 15-64 yaşları arasındaki bireylerde en sık kullanılan maddenin esrar olduğu belirtilmiştir. Esrar ve türevlerinin bağımlılık yaptığı bilinmektedir, ancak fiziksel bağımlılık gelişimi ve yoksunluk sendromu tartışmalı bir konudur. Ayrıca, DSM V'te kannabis yoksunluk belirtileri tanımlanmış ve dikkate alınmıştır.

Halk arasında marihuana, Mary Jane, cigara, ot gibi birçok ismi bulunmaktadır. Esrarın oral ve sigara olmak üzere iki kullanım şekli bulunmaktadır. En sık sigara şeklinde kullanılmaktadır. Bitkinin kurutulan yaprakları sigara içine sarılarak içilir veya nargileye benzer şekilde "kova" veya "bong" olarak adlandırılan buharın inhale edilmesi gibi yöntemlerle kullanılır. Bitkinin yaprakları ve köklerindeki THC oranı % 0,5-5 arasında değişir. Dişi bitkiden elde edilen sinsemilla adı verilen formu %7-14 THC içerir. THC'nin bitkiden ayrıştırılmasıyla elde edilen esrar reçinesi ise %15-50 THC içerir (10). Hibrid tohumlardan elde edilen esrar türüne "skunk" adı verilmekte olup esrara göre THC içeriği 10-15 kat fazla ancak kannabidiol içeriği düşüktür (11).

Son yıllarda popülerliği artan sentetik esrarların ise "Spice", "K2" gibi isimleri olup CB1 ve CB2 reseptörlerine yüksek afiniteleri bulunmaktadır. Bu bileşikler esrara benzer olup etkileri oldukça kuvvetlidir.

2.3.1.1. Farmakokinetik etkileri

Esrar inhale edildikten sonra etkisi birkaç dakikada başlayarak 30. dakikada maksimuma ulaşır ve 2-4 saat sonra biter. 3-4 saat içinde plazma konsantrasyonu giderek azalır (10). Esrar sigara şeklinde alındığında sistemik yararlanımının yaklaşık %18, hafif içicilerde yaklaşık %10-14, ağır içicilerde ise yaklaşık %23-27 olduğu bildirilmiştir (12). Esrarın eliminasyonu bireyler arasında önemli ölçüde varyasyon göstermektedir (13). Esrarın etkileri kullanıcının içtiği sigara sayısı, süresi, iki çekiş arasındaki süre, inhale edilen hacim, içme yöntemi, kullanılan yere bağlı olarak kişiden kişiye değişim gösterdiği için sigara olarak alınan esrarın kan konsantrasyonları kantite edilmelidir. Esrar oral olarak alındıktan sonra absorbsiyonun yavaş olması nedeniyle oral alımdan 1-5 saat sonra elde edilen THC piki düşük ve gecikmiş olarak elde edilir (14).

Δ^9-tetrahidrokannabinolik asit-A (THCA-A) kenevir bitkilerindeki THC'nin öncüsüdür. THCA-A dekarboksilasyon ile esrarın temel psikoaktif bileşeni olan Δ^9-tetrahidrokannabinol (THC)'ye dönüştürülür (12). THC vücuda alındıktan sonra CYP 4502C9 ve 2C19 izoenzimleri ile aktif metaboliti olan 11-OH-THC'ye okside olur ve daha sonra inaktif metaboliti olan 11-nor-Δ^9-tetrahidrokannabinol-9-karboksilik asit (THC-COOH)'ye metabolize olmaktadır (15) (Şekil 1).

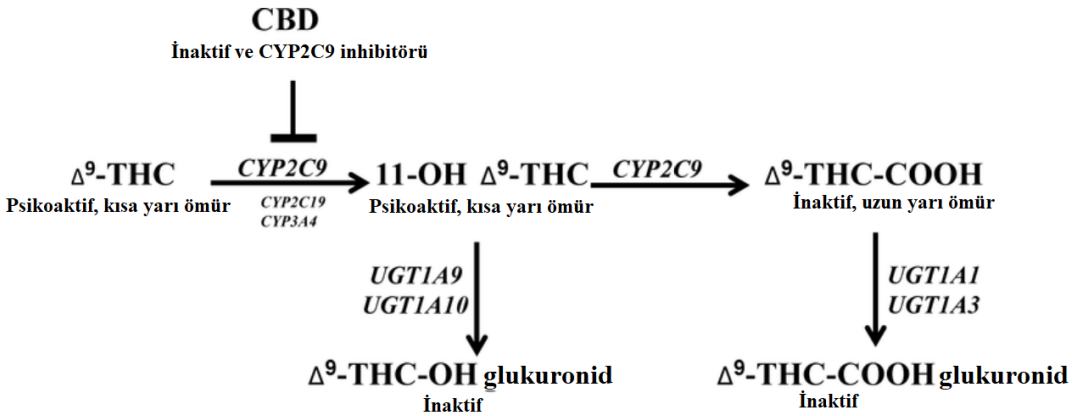
Kannabidiol (CBD), kenevir bitkilerinde THC'den sonra en bol bulunan ancak psikoaktif olmayan bileşiktir. Kanabinol (CBN), kenevir bitkisinin kimyasal yıkım ürünü olup THC'nin %10'u oranında psikoaktiftir (16).

THC plazmada %97-99 oranında proteinlere ve özellikle alfa-1-asit glikoproteine bağlı olup hidrofobik yapıdadır. Adipoz dokuda uzun süre kalması nedeniyle esrar son kullanımdan 45-60 gün sonra bile tespit edilebilmektedir (10, 14).

Sigara içiminin bitiminden sonra THC konsantrasyonları hızla düşerken 11-OH-THC konsantrasyonları kademeli olarak artar ve eşlik eden THC seviyelerinin üzerine çıkar. Sigara ile esrar alımından sonra elde edilen metabolitin konsantrasyonu oral olana göre daha yüksektir (12).

Esrar veya THC dozunun %65'ten fazlası gaita ile %20'si idrarla atılır ve asidik idrar metabolitlerinin %20'si konjüge ve unkonjüge THC-COOH'tur. Primer idrar metaboliti THC-COOH-glukuroniddir, 11-OH-THC ise daha çok gaitada bulunur (12). THC-COOH-

glukuronidin eliminasyon yarı ömrünün yaklaşık olarak 24 saat olduğu bildirilmiştir (10). Esrar sigara olarak kullanıldıktan sonra pik THC-COOH konsantrasyonları 1,4-2,4 saat sonra elde edildiği bildirilmiştir. THC-COOH'un idrarla atılımı hemen başlar ancak esrar kullanımından sonra analiz edilen örneklerde THC-COOH her zaman pozitif değildir. Çeşitli immüno yöntemlerde THC-COOH için tespit zamanı ara sıra esrar kullananlar için 1-3 günü bulmakla birlikte bireyler arası varyasyon gösterir (13).



Şekil 1. Esrar metabolizması (17)

2.3.2. Opioidler ve opiyatlar

Opiyat terimi, *Papaver somniferum*'dan doğal olarak oluşan, morfinin etkilerine benzer özellikler gösteren doğal veya semisentetik alkaloidleri ifade etmektedir. Doğal alkaloidler; morfin, kodein, tebain, papaverin ve noskapin gibi bileşiklerden oluşur. Semisentetik alkaloidler; eroin, buprenorfin, hidrokodon, hidromorfon, oksikodon ve oksimorfon bileşiklerini kapsamaktadır (18).

Opioid terimi, opioid reseptörlere afinitesi olan ve temelde farklı kimyasal yapılara sahip olmalarına rağmen, morfin ile benzer farmakolojik etki gösteren tüm bileşikleri kapsayan geniş bir terimdir (12). Bu grupta fentanil, meperidin, metadon, pentazosin, propoksifen ve tramadol yer alır.

Opioidler tıbbi açıdan sıklıkla oral, intramüsküler (IM), intravenöz (IV), subkütanöz (SC) olarak nadiren ise inhalasyon, intranazal (IN), transdermal ve rektal olarak kullanılmakta olup kötüye kullanımda inhalasyon, enjeksiyon veya IV yollarla kullanımı bulunmaktadır.

Opioidler yaygın olarak klinikte anestezi veya ağrı yönetimi amacıyla kullanılır. Opioid bağımlılığı olan hastalarda opioid replasman tedavisi için buprenorfin ve metadon kullanılmaktadır. Nalokson yarışmalı bir μ-opioid reseptör antagonistidir ve opioid doz aşımında ortaya çıkan hayatı tehdit edici solunum sistemi depresyonunu tersine çevirmek için kullanılır ve ayrıca opioid bağımlılığı için kullanılan bir tedavi olan Suboxone®'un bir bileşenidir (19).

2.3.2.1 Farmakokinetik

Opioidlerin plazma proteinlerine bağlanma oranı %10 ile %96 arasında değişmekte olup karaciğer böbrek beyin gibi organlara yoğunlaşır ve plasenta bariyerini geçer. Opioidler esas olarak karaciğerde aktif veya inaktif metabolitlere faz 1 ve 2 reaksiyonları ile metabolize olurlar. Aktif metabolitler genel olarak ana maddeden daha kuvvetli analjezik etki gösterebilmektedir. Opioidler ve metabolitleri idrarla atılırken glukuronid konjugatlarının sadece küçük bir kısmı gaitayla veya safrayla atılır.

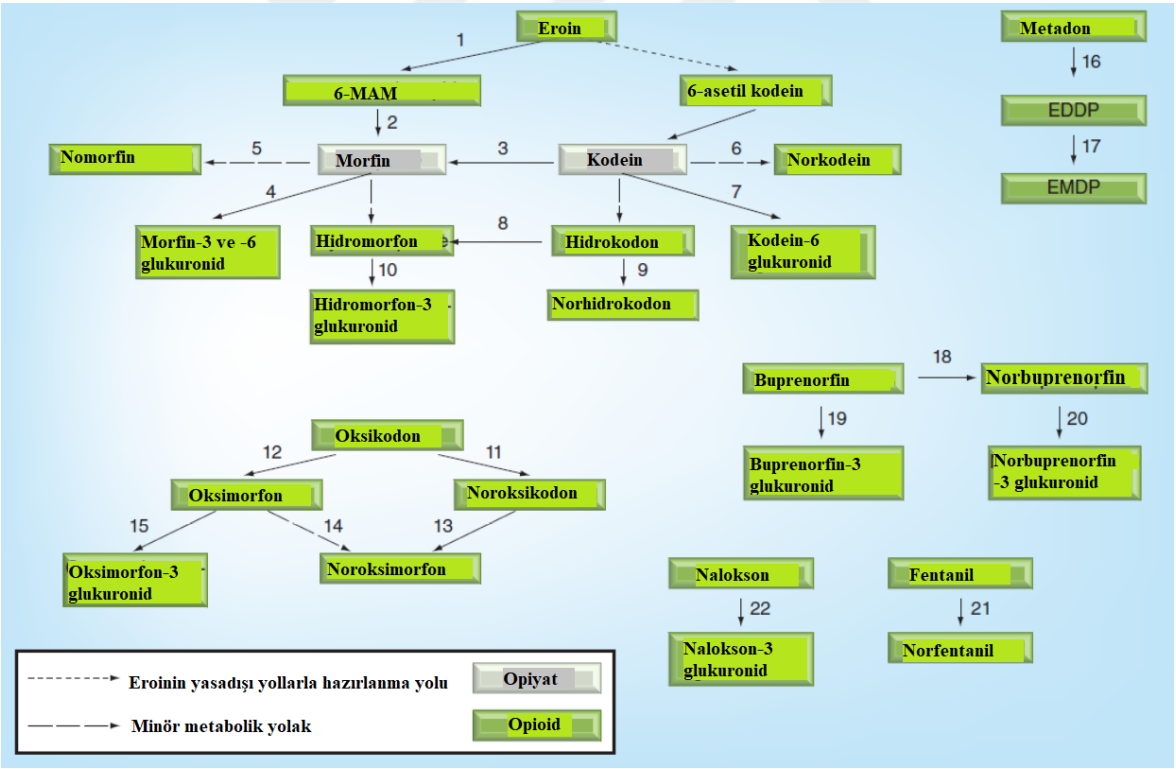
Eroin (diasetilmorfin, DAM), yarı sentetik ve lipofilik morfin türevi olup yüksek derecede bağımlılık özelliklerine sahip güçlü bir narkotik analjeziktir. DAM'ın yarı ömrü kısadır (yaklaşık 2 ila 5 dakika arasında) ve DAM'ler deasetilasyon yoluyla hızlı bir şekilde 6-monoasetil-morfine (6-MAM) ve 6-MAM ise serum-esterazlar ve karaciğer karboksilesterazları tarafından morfine (MOR) hidrolize edilir. MOR karaciğerde glukuronidasyona uğrayarak metabolize olur. MOR, morfin-3-glukuronid (M3G) ve morfin-6-glukuronide (M6G) konjuge edilerek metabolize edilir. M3G ana metabolittir ve farmakolojik bir etkisi yoktur (Şekil 2). Bu konjugatlar hidrofilik bileşiklerdir ve esas olarak idrarla atılırlar (20). M6G, sabit konsantrasyonlarda, M3G konsantrasyonunun yaklaşık % 15'i olarak plazmada bulunmaktadır (21).

DAM ve 6-MAM'ın bozulmasının pH ve sıcaklığa bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bozulmayı önlemek için örneklerin toplanmasında degradasyonu önleyici tedbirlerin alınması gerekir (20).

MOR bazik yapıda ve pKa değeri 8 civarında olduğu için oral alımda gastrointestinal sistemde iyi absorbe olmaz. Dolayısıyla morfinin IV kullanımı daha etkilidir.

6-MAM, eroinin önemli bir metabolitidir ve eroin kötüye kullanımı tespiti için spesifik biyobelirteç olarak kabul edilmiştir. Ancak, 6-MAM yaklaşık 30 dakikalık bir yarı ömre sahiptir ve sadece küçük bir miktarı idrarla atılır. Ayrıca, 6-MAM'in deteksiyon penceresi idrarda 8 saatten azdır (21).

Kodein demetilasyonla morfin ve norkeodeine dönüşerek idrarla atılır. Hidrokodon ise hidromorfon ve norhidrokodona metabolize olur. Metadonun (eroin bağımlılığı ve kronik ağrı tedavisinde kullanılır) başlıca metaboliti 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin (EDDP)'dir. Madde kullanım bozukluğu ve ağrı tedavisinin takibinde metadon ve EDDP analiz edilir.



Şekil 2. Eroin metabolizması

2.3.3. Kokain

Çoğunlukla Güney Amerika'da yetişen *Erythoxylon coca* bitkisinden izole edilen bir alkoloiddir. EMCDDA raporlarına göre kokain kullanımında son 10 yılda artış olup ABD'de ikinci en yaygın kullanılan maddedir (10). Kokain (COC), yüksek derecede bağımlılık yaratan ve potansiyel olarak tehlikeli bir kötüye kullanım ilacıdır (22). Kokainin halk arasında yaygın kullanılan adları kok, koko, jamboo, taş, toz şekerdir. COC, toz halinde (hidroklorür) veya serbest baz (krak COC) olarak kullanılabilir ve kötüye kullanılan en yaygın yasadışı ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir.

2.3.3.1. Farmakokinetik

Kokain intranazal, oral, IV ve sigara şeklinde kullanılmaktadır. Oral kullanımın biyoyararlanımı düşük olduğu için öforik etkisi az olduğu için daha az tercih edilen yol olup sigara ve IN yollar en sık tercih edilen yöntemlerdir (12).

Vücutta, COC hızla ana metabolitlerine benzoilekgonin (BZE) ve ekgonin metil estere (EME)'ye dönüşür. BZE fizyolojik ve alkali pH'ta spontan hidroliz yoluyla veya karaciğer karboksilesterazların aktivitesi ile oluşabilir (23). BZE farmakolojik olarak aktif değildir ancak, BZE'nin yarı ömrü (4-7 saat), COC'nin yarı ömründen (0,5-1,5 saat) önemli ölçüde daha uzun olduğu için, COC kullanımını değerlendiren idrar analizlerinin çoğu BZE'yi tespit etmek üzere tasarlanmıştır. COC, kan ve tükürükte ilk 24 saatte, idrarda BZE olarak 72 saate kadar tespit edilebilmektedir (10).

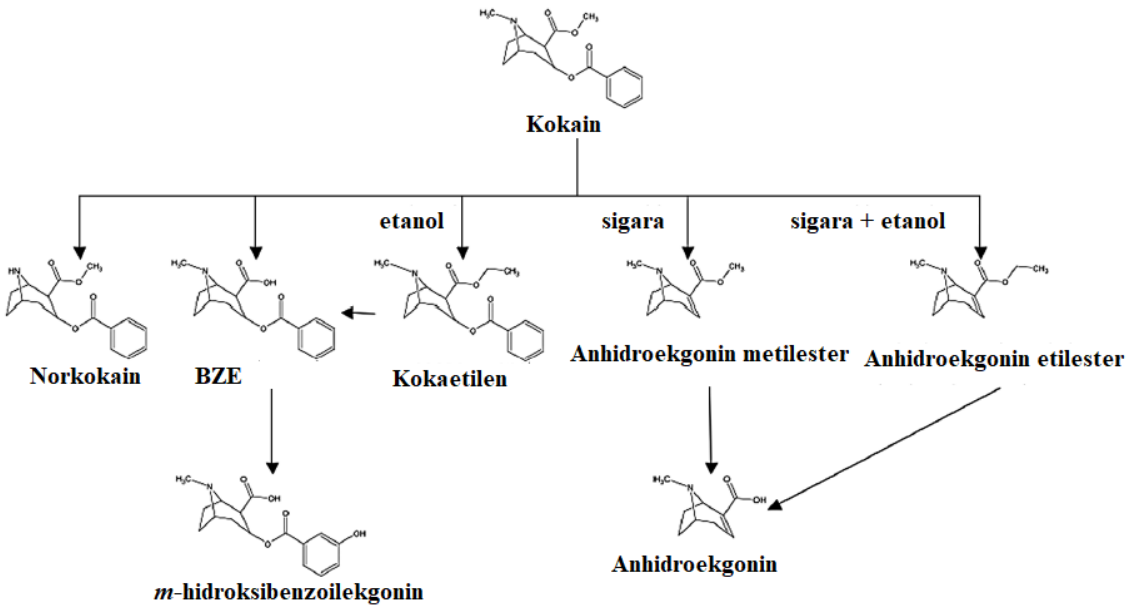
COC'nin N-demetilasyonu, norkokain (NC) adı verilen ve hepatotoksik bileşiklere metabolize olabilen bir metabolit oluşturur. Kolinesteraz eksikliği olan hastalarda ve aynı anda COC ve etanol tüketenlerde NC konsantrasyonları daha yüksektir (24).

Eş zamanlı COC ve alkol kullanımı sık görülmektedir. Eşlik eden alkol kullanımıyla birlikte karaciğer metilesteraz, COC'nin kokaetilene (CE), (daha az etkili) transesterifikasyonunu katalize eder. CE için eliminasyon yarı ömrü, COC için olandan oldukça uzun olan 2,5-6 saattir. CE'nin eliminasyon yarı ömrünün uzun olması, CE'nin toksisitesine artmasına neden olabilir (25).

Kokainin hidroklorür (HCI) tuzu formu, IN kullanılabilir, eritilebilir veya enjekte edilebilir. Krak COC, ısıtılabilen ve buharları inhale edilebilen bir taş kristali içinde gelir;

“krak, taş” terimi, ısıtıldığında duyulan çatırtı sesini ifade eder. Krak formu, kokainin serbest baz şeklidir (25).

Krak COC kullanımı, COC içildiğinde meydana gelen termal bozulmaya özgü metabolitlerin varlığı ile spesifik olarak belirlenebilir. Krak formu sigara şeklinde uygulanır ve kullanıcıda anhidroekgonin metil ester (AEME, metil ekgonidin) bulunur. Aynı anda etanol ve krak kullananlarda anhidroekgonin etil ester (AEEE, etil ekgonidin), tanımlanmıştır (26).



Şekil 3. Kokain metabolizması

2.3.4. Amfetaminler

Amfetaminler başlıca feniletilamin, amfetamin, metamfetamin, 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA), metilendioksi-N-etilamfetamin (MDE), 3,4-metilendioksi-N-metamfetamin (MDMA), N-metil-1-(1,3-benzodiokso-5-il)-2-butanamin (MBDB), efedrin ve psödoefedrindir.

Metamfetamin (MA) ve amfetamin (AMP), merkezi sinir sisteminin (MSS) güçlü bir uyarıcısıdır ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve narkolepsi gibi diğer MSS rahatsızlıkları için etkili bir tedavi olarak kullanılmaktadır (27). Güçlü uyarıcı etkisi

sadece terapötik etkinlik sağlamakla kalmaz, aynı zamanda AMP ve MA'nın kötüye kullanımına neden olmaktadır. Amfetamainler, iştah kesici etkileri nedeniyle zayıflama amaçlı da kullanılmaktadır. MA'nın "buz" veya "kristalin met" gibi isimleri kullanılmaktadır. AMP ve MA'nın oral, IN, IV ve sigara şeklinde kullanımı bulunmaktadır. IN kullanılırken MA tabletleri ezilerek camda ısıtılır ve dumanı inhale edilir. MDMA ise ekstazi olarak isimlendirilmekte ve tablet, toz veya kristal formlarında oral, IN, IV olarak tüketilmektedir (10). MDMA hem uyarıcı hem de halüsinojen özellik göstermektedir.

AMP ve MA tek bir kiral merkeze sahip farmakolojik farklı özellikte iki optik olarak aktif S - (+) - (veya D-) ve R - (-) - (veya L-) enantiyomerlere sahiptir. Kötüye kullanımı olan ve kuvvetli MSS'de stimülan özellik gösteren enantiyomeri "D" olup "L"enantiyomerinin kardiyovasküler ve periferik etkileri daha baskındır. (27, 28). D-MA DEHB tedavisi için program II kontrollü maddeler listesinde bulunan bir ilaçtır. L-enantiyomeri ise kontrollü maddeler listesinde bulunmayıp OTC nazal dekonjestan Vicks ®VapoInhaler ™'in aktif bileşenidir (27).

2.3.4.1. Farmakokinetik etkileri

AMP veya MA'nın oral alımı sonrasında etkisinin başlama süresi yavaş iken, IV veya sigara şeklinde kullanıldığında ise etkinin başlama süresi hızlıdır. Oral MA uygulamasından sonra maksimum konsantrasyonlara 2,6-3,6 saatleri arasında ulaşılır ve ortalama eliminasyon yarı ömrü 10,1 saat olarak belirtilmiştir.

AMP alındıktan sonra 12 saatte pik yapar ve üriner atılımı idrar pH'sından oldukça etkilenir. Sitokrom P2D6 enzimi metamfetaminin metabolize edilmesinde rol oynamaktadır (12). MA'nın aktif metaboliti amfetamin, inaktif metabolitleri ise OH-amfetamin ve norefedrindir.

MA oral olarak alındığında %30-54'ü MA olarak, %10-23'ü AMP olarak değişmeden idrarla atılır ve idrarda 7 güne kadar tespit edilebilmektedir. MA IV alındığında ise % 45'i metamfetamin ve %7'si AMP olarak idrarla atılır.

MDMA oral alındığında etkisi 30-60 dakika içinde başlar ve 2 saat içinde maksimum seviyeye ulaşır. MDMA'nın yarı ömrü ise yaklaşık 7 saat olup MDMA kullanımından 36 saat sonra MDMA'nın %3-8'i idrar ile atılır (10). MDMA, 3,4-metilendioksiamfetamin (MDA)'ya çoğunlukla N-demetilasyonla kanda metabolize olur ve MDMA'nın

stereoselektif metabolizması olması nedeniyle MDA kanda birikir ve MDA 3-hidroksi-4-metoksi (HMA) ve 3,4-dihidroksi türevlerine (HHA) türevlerine ileri metabolize olur.

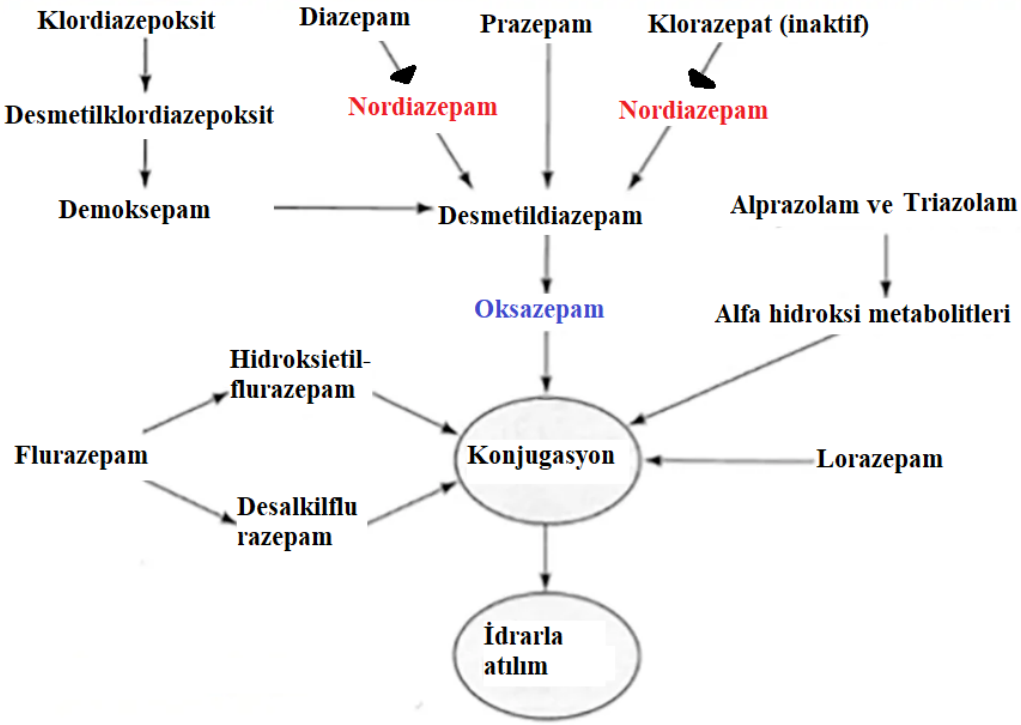
2.3.5. Benzodiazepinler

Benzodiazepinler, uykusuzluk, depresyon, anksiyete ve epilepsiyi tedavi etmek için sakinleştiriciler, hipnotikler, anestezikler, antikonvülsanlar veya kas gevşeticileri olarak dünyada en sık reçete edilen ilaçlardır (29). Benzodiazepinlerin barbitüratlardan daha güvenli ve daha etkili olduğu kabul edilir, ancak kronik kullanımda psişik ve fizyolojik bağımlılık oluşturabilir.

Benzodiazepinlerin alkol gibi diğer merkezi sinir sistemi depresanları ile birlikte alımı, ölüme yol açabilecek ciddi solunum depresyonuna neden olabilmektedir. Benzodiazepinlerin kötüye kullanımı intiharla ilişkili toksisite, madde etkisinde araç kullanımı ve ilaçla kolaylaştırılmış cinsel istismar ile ilişkilendirilmiştir. Oral, IV ve IM kullanım yolları bulunmaktadır.

2.3.5.1. Farmakokinetik etkileri

Benzodiazepinlerin eliminasyon yarı ömürleri bireyler arası varyasyon göstermektedir. Uzun etkili benzodiazepinler (diazepam, klorazepat, klordiazepoksit) karaciğerde N-dealkilasyonla nordiazepama dönüşür (Şekil 4). Nordiazepamın ortalama yarılanma ömrü 50-90 saattir (30). Orta etkili benzodiazepinler direkt konjuge edilerek inaktive edilir. Kısa etkili benzodiazpinler (midazolam, triazolam) oldukça lipofilik olup karaciğerde hızlı bir şekilde α-hidroksi metabolitlerine dönüştürülür (Tablo 3.).



Şekil 4. Benzodiazepinlerin metabolizması

Tablo 3. Benzodiazepinlerin yarı ömürleri

İlaç	**Yarı ömür (saat)**
Kısa etkililer	
Midazolam	1-4
Flurazepam	1-3
Temazepam	3-13
Triazolam	1,8-3,9
Orta etkililer	
Flunitrazepam	9-25
Uzun etkililer	
Diazepam	21-37
Alprazolam	6-27
Klonazepam	19-60
Klordiazepoksit	6-27
Lorazepam	9-16
Oksazepam	4-11

2.4. Madde analizinde kullanılan örnek tipleri

Madde analizi için kullanılan örnekler arasında idrar, kan, tükürük, mekonyum, saç, ter ve tırnak bulunmaktadır.

İdrar en yaygın kullanılan örnek tipidir, çünkü maddeler idrarda yüksek konsantrasyonda bulunur ve analizi kolaydır. İdrarda maddelerin daha çok metabolitleri bulunur. Ancak, idrardaki madde konsantrasyonları ile maddenin bozunma derecesi ve ilacın klinik etkileri arasındaki korelasyon iyi değildir.

Kan örneği yaygın kullanılır, ancak genellikle idrar örneği uygun olmadığında kullanılan bir örnek tipidir. Kanda büyük oranda kötüye kullanılan maddenin ana bileşiği bulunmaktadır. Kan, madde konsantrasyonlarını, maddenin bozunmasını ve klinik korelasyonunu değerlendirmek için en iyi örnektir.

Tükürük örneği 30 dakika ile 24 saatlik süredeki yakın geçmişte madde maruziyetini yansıtır ve maddenin eliminasyonu tükürük üretimine ve pH'ya bağlıdır. Tükürükte maddenin metabolitlerinden ziyade ana madde bulunmaktadır. Ancak, ana maddeler tükürükte ölçüldüğünde, pasif maruziyet soruları ortaya çıkabilir. Pasif maruziyet konusundaki tartışmayı en aza indirmek için tükürükte madde metabolitlerinin ölçümü tercih edilir.

Tükürük ve kan karşılaştırılacak olursa; madde konsantrasyonlarının tükürük ve kan arasındaki korelasyonu, tükürük pH'sı ve hacmi, ilaç tipi ve protein bağlanması gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Tükürük pH'sı genellikle asittir (pH 6-7). Asidik koşullar altında, asidik maddeler çözünür ve kana geçer (31). Bu nedenle, genel olarak tükürükteki asidik maddelerin konsantrasyonu, bazik maddelere kıyasla daha düşüktür. Maddelerin tükürük:plazma oranı Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Maddelerin ortalama tükürük:plazma oranları ve pKa değerleri (32).

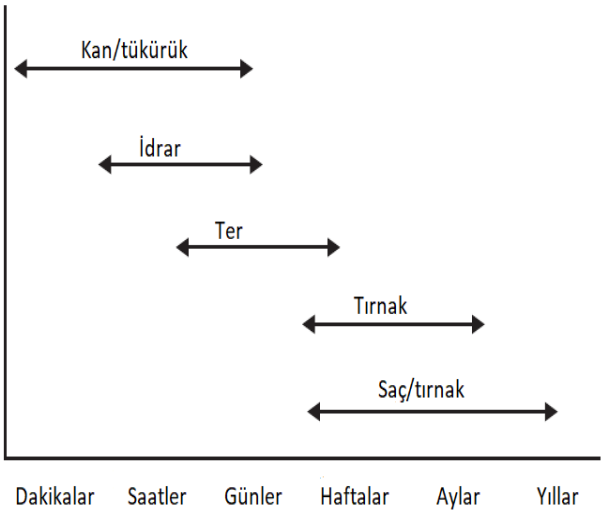
Madde (Tip)	**Ortalama tükürük/plazma oranı**	**pKa (33)**
Kokain (bazik)	3	8,6
Morfin (bazik)	0,8–154 (34, 35) IV: 0–1,8 (36)	8,0-9,0
Kodein (bazik)	3,7 (37) 4,0 (35, 38) 7,5–43,7 (33)	8,2
Delta-9-THC (nötr)	1,2 (31)	10,6
Buprenorfin	1 (31)	-
Metadon (bazik)	1,6 (31)	-
Diazepam (asidik)	0,01-0,08 (31)	3,4
Amfetamin (bazik) Metamfetamin (bazik) MDMA (bazik) MDA	15,3 (2,6–210) (39) 0,1–52,3 (40) 0,8–22,4 (40) 0,7–24,3 (40)	9,9 9,7 9,4

Saç örneği madde kullanımının haftalar ile yıllar arasında değişen uzun bir zaman aralığında değerlendirilmesi durumunda faydalıdır. Ancak, madde ve metabolitlerinin saçta tespit edilebilme zamanının 4-10 gün sonra başlaması nedeniyle her zaman makul bir örnek tipi değildir.

Tırnak örneği madde kullanımının birkaç ay arasında değişen zaman aralığında değerlendirilmesi durumunda faydalı olup saç örneği uygun olmadığında kullanılan örnek tipidir. Kısa saçlı erkeklerin veya postmortem örneklerin analizinde avantajlıdır. Ayrıca su, ısı veya güneş ışığı nedeniyle madde bozunma riski saç örneğine göre daha azdır.

Ter örneği 1-2 haftada bir kez toplanması nedeniyle idrar örneğinin haftada birden fazla toplanması durumlarında idrara göre daha avantajlı olabilir. Ancak egzersiz, sıcaklık,

hidrasyon, ilaçlar ve diyet gibi diğer birçok faktör ter pH'sını etkileyebilir. Farklı matrikslerdeki maddelerin retansiyon zamanları Şekil 5'te gösterilmektedir (31).



Şekil 5: Farklı matrikslerdeki maddelerin retansiyon zamanları (31).

Madde Bağımlılığı ve Ruh Sağlığı Hizmetleri İdaresi (SAMHSA) Federal İşyeri Uyuşturucu Test Programları için alternatif örnekler kullanma olasılığını araştırmaktadır. 2004 yılında SAMHSA, işyerinde madde analiz programlarına tükürük, saç ve ter örneklerinin eklenmesini önermiştir. Ancak, kamu kurumları ve federal kurumların yorumları ve endişeleri nedeniyle, 2008 yılında, bu alternatif örnekleri Federal İşyeri Uyuşturucu Test Programlarına dahil etmek için yeterli bilgi olmadığı sonucuna varılmıştır (41). Buna rağmen, SAMHSA, donör idrar örneği veremiyorsa, tükürük örneğinin alternatif bir örnek olarak kullanılmasına izin veren kılavuzları son zamanlarda uygulamaya ve alternatif örnek testindeki gelişmeleri izlemeye başlamıştır (42).

Madde kullanım bozukluğun tanısında kullanılan örneklerin avantajları ve dezavantajları Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Matrikslerin avantajları ve dezavantajları

Örnek	Avantajları	Dezavantajları
İdrar	• En çok çalışılan ve kabul gören numune türü • Laboratuvar yöntemleri iyi standardize edilmiştir • Daha az pahalı • POCT cihazları mevcut	• Özel toplama tesisi gerekli • Numuneye madde katılması potansiyeli yüksek • Denetimli toplama gerekli • Madde tespit penceresi kısa olması: 1-3 gün • Madde konsantrasyonu ve doz ilişkisi yok • Madde konsantrasyonu hidrasyon durumuna bağlı
Kan	• Pozitif test, yakın zamanda madde kullanımını gösterir • Madde konsantrasyonu, bozunma ile daha iyi korele • Örnek doğrudan gözetim altında toplanır • Numuneye madde katılması olasılığı düşük	• Örnek toplanması için eğitimli personel ihtiyacı • Flebotomi ile ilişkili riskler • POCT cihazları mevcut değil • Madde tespit penceresi kısa olması:1 gün
Tükürük	• Pozitif test, yakın zamanda madde kullanımını gösterir • Sonuçlar davranış/performansla ilgili olabilir • Basit, invaziv olmayan örnek toplama • Numuneye madde katılması potansiyeli çok düşük • POCT cihazları mevcut	• Madde tespit penceresi kısa: 1 gün • Pasif maruziyet nedeniyle kontaminasyon • Kurulmuş analitik metotları az ve pahalı olması • Kuru ağız sendromunda örnek alımı zor • Örnek toplamada varyasyon yüksek
Saç	• Haftalardan aylara kadar uzun tespit penceresi • Örnek toplamak kolay ve noninvaziv • Numuneye madde katılması olasılığı çok düşük • Örnekler yıllarca kararlı • Mumyalanmış örneklerden numune elde edilebilir. • Aynı kaynaktan tekrar örnek almak mümkün	• Yakın zaman madde kullanımlarını göstermez • Analizinin zor olup ciddi numune hazırlık sürecinin gerekmesi • Saç renginin oluşturduğu farklılık • Kurulmuş analitik metotları az ve pahalı • Eksternal kontaminasyon ihtimali
Ter	• Birkaç gün ile birkaç haftaya kadar kümülatif ilaç maruziyetini gösterir • Kolay ve noninvaziv örnek toplama	• Ter üretiminde bireylerarası varyasyonu yüksek • Pahalı ve kurulmuş analitik yöntemler az • POCT cihazları mevcut değil

2.4.1. Maddelerin kandan tükürüğe transferi

Maddeler ve metabolitleri, kılcal damarlardan, tükürük kanallarına, lipit membranları üzerinden pasif difüzyon yoluyla taşınır. Maddeler tükürüğe; ultrafiltrasyon ve sekresyon, oral alım, sigara ve intranazal uygulama yoluyla da geçebilir. Maddelerin sadece serbest ve noniyonize formu plazmadan tükürüğe geçebilmektedir. Tükürükteki madde konsantrasyonları ile plazmadaki madde konsantrasyonlarının paralel olduğu bilinse de aslında plazma ve tükürükteki madde konsantrasyonları arasındaki ilişki oldukça komplekstir (43). Plazma pH'sı, tükürük pH'sı, ilaç iyonlaşması, protein bağlama ve tükürük hacmi gibi birçok faktör tükürükteki madde konsantrasyonlarını etkiler. Stimüle edilmemiş tükürük biraz asidik bir pH'a sahip iken tükürük uyarılarak toplandığında, tükürük pH'sı, bikarbonat seviyelerindeki artış nedeniyle hafif baziktir (pH=7,5-8,0) (42, 44). pH'daki değişiklikler, iyonlaşma ve bağlayıcı etkiler yoluyla tükürükteki madde konsantrasyonunu önemli ölçüde değiştirebilmektedir (31, 45).

2.4.1 İdrar ve tükürük örneklerinde madde karıştırma sorunları

Madde kullanan bireyler analizleri yanıltmak amacıyla çeşitli yöntemler kullanmaktadırlar. Özellikle idrar numunelerine madde karıştırma oldukça yaygındır. Bireyler genellikle aşırı sıvı alma yöntemini kullanır. Bunun dışında kafein ve hidroklorotiyazid gibi flushing/detoksifiye edici ajan kullanarak, internet sitelerinden sentetik idrar satın alarak, internetten in vitro saflık bozucu madde (çeşitli ev kimyasalları (çamaşır suyu, sabun), visine göz damlası, sirke, limon suyu, sofra tuzu, potasyum nitrit, piridinyum kloromat, glutaraldehit ve peroksit) alarak idrar sonucunu yanıltmaya çalışırlar (46, 47). Sirke ve limon suyu idrarı asidik yapması nedeniyle numunenin pH'sından, sofra tuzu idrarın dansitesinin artışından saptanabilirken visine göz damlası idrar için numune bütünlük testleri ile saptanamaz.

Numune toplanmasının doğrudan gözlenmesi nedeniyle, tükürük numunelerine madde karıştırılması zor olsa da artmaya başlamıştır (48). Tükürük numunesi alınmadan önce madde kullanıcısı içecek, yiyecek tüketerek veya ağız yıkama solüsyonları kullanarak örnek analizini yanıltmaya çalışmaktadır.

İdrar örneği için numune bütünlük testleri ile idrar saflığının bozulup bozulmadığı değerlendirilir. İdrar kreatinini 20-200 mg/dL, idrar sıcaklığı 32-38 ^{o}C (alındıktan 4 dakika içinde), dansitesi 1,003-1,035, pH 3-11 ve nitrit negatif olmalıdır (49). Kreatinin değeri 4,52-

20 mg/dL ve dansite 1,001-1,003 ise “numune seyreltilmiştir” veya kreatinin değeri <4,52 mg/dL ve dansite <1,001 “numune idrar değildir” olarak raporlanmaktadır.

Tükürük örneğine madde karıştırılması problemlerinin tespiti için SAMHSA, insan albümini veya IgG testinin kullanılmasını önerir. Numune içinde insan albümini veya IgG'nin bulunmaması, numuneye madde karıştırıldığını göstermektedir. IgG için cutoff 0,5 mg/L ve albümin için cut-off limiti 0,6 mg/dL’dir (41).

2.4.2. Maddelerin idrar, kan ve tükürükte tespit zamanı

Maddelerin analizinden öncesi cevaplanması gereken en önemli sorulardan biri de maddenin veya metabolitlerinin alındıktan sonra ne kadar süre ile tespit edilebileceğidir. Maddenin tespit edilme süresinin birçok faktöre bağlı olması ve bu konuyla ilgili az sayıda çalışma yapılması nedeniyle bu sorunun cevabını vermek güç olabilmektedir. Dahası maddelerin sağlıklı gönüllülere verilmesinin gerekmesi nedeniyle bu konuyla ilgili yapılacak çalışmaların onaydan geçmesinde zorluklarla karşılaşılabilmektedir. Dolayısıyla, birçok çalışmada uygulanan dozlar, madde kullanıcılarının kullandığı dozlardan nispeten düşüktür.

Kötüye kullanılan maddelerin tespit süresi; alınan madde dozu, maddenin uygulama yolu ve maddenin hazırlığı, maddenin akut ve kronik kullanımı, kullanılan matriks, kullanılan analitik tekniğin tespit sınırı, aranan metabolitin veya molekülün yapısı, idrar veya tükürük pH'sı ve konsantrasyonu ve bireyler arası varyasyon olmak üzere birçok faktörden etkilenir (50). Maddelerin vücut sıvılarında deteksiyon zamanları Tablo 6, Tablo 7 ve Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 6. Maddelerin kan, plazma veya serumdaki tespit zamanları ve tespit sınırları

Analit	**Tespit sınırı (ng/mL)**	**Tespit zamanı (saat)**
Amfetamin	4	46
Metamfetamin	3	48
MDMA	20	24
THC	10	5
THC-COOH	10	36
Kokain	10	12
BZE	10	48
Morfin	1	20

Tablo 7. Maddelerin tükürükteki tespit zamanları ve tespit sınırları

Analit	**Tespit sınırı (ng/mL)**	**Tespit zamanı (saat)**
Amfetamin	10	20-50
Metamfetamin	2,5	24
MDMA	126	24
THC	0,5	34
Kokain	1	5-12
BZE	1	12-24
6-MAM	1	0,5-8

Tablo 8. Maddelerin idrardaki tespit zamanları ve tespit sınırları

Analit	**Tespit sınırı (ng/mL)**	**Tespit zamanı (saat)**	**Maksimum Tespit zamanı (gün)**
Amfetamin	2,5	46	9
Metamfetamin	2,5	48	6
MDMA	20	24	-
THC-COOH	15	87	95
BZE	1000	48-72	22
Morfin		11-54	11
Oksazepam	50	24-72	30-40

2.5. Maddelerin analiz yöntemleri

Madde analizinde tarama ve doğrulama yöntemleri kullanılmaktadır. Tarama amaçlı olarak hasta başı test cihazları (POCT) ve immün yöntemler, doğrulama amaçlı olarak kromatografik-kütle spektrometrik yöntemler, ince tabaka kromatografi (TLC), sıvı kromatografi kütle-spektrometresi (LC-MS), gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS), time-of-flight-kütle spektrometresi (TOF-MS) kullanılmaktadır. Bu bölümde POCT, immün ve kromatografik-kütle spektrometrik yöntemlerin prensibi ile araştırılacak beş madde sınıfının analizi değerlendirilecektir.

2.5.1. POCT

Madde analizinde kullanılan POCT cihazı immünokromatografi prensibine dayalı çalışmaktadır. İmmünokromatografik testler; immünokromatografik kart test, immünokromatografik test, kromatografik kart test, dip test, dipstik test, dipkart test, strip test, yanal akış testi şeklinde isimlendirilmektedir. İmmünokromatografik kart testlerin başlıca avantajları; sensitivite ve spesifitelerinin yüksek olması, üretiminin kolay olması, maliyetlerinin düşük olması, testler analiz edilirken cihaza gerek duyulmaması, sahada gerçekleştirilebilmesi, testin raf ömrünün uzun olması, analiz metodunun kolay uygulanabilmesi ve özel eğitim gerektirmemesi, test sonucunun gözle değerlendirilebilir olması, uzman kişilere gerek duyulmaksızın herkes tarafından uygulanabilecek kadar kolay olması, sonuçların güvenilirliğinin yüksek olmasıdır (51). Dezavantajları ise tam kantitatif metot olmaması, kullanıcılar arasında sonuçların sübjektif olarak değerlendirilmesi, çok küçük hacimlerin analizde yetersiz kalması, şerit başına tek bir analitin ölçülebilmesi ve sadece sıvı numuneler için kullanılabilmesidir.

POCT testleri idrar ve tükürük örneklerinde kullanılabilmektedir. Ancak çalışmamızda tükürük POCT cihazı kullanıldığı ve değerlendirildiği için konunun devamı tükürük POCT olarak tartışılacaktır.

2.5.1.1. Tükürükte immünokromatografik kart testlerin yapısı ve çalışma prensibi

Genellikle şerit yapısında üretilen immünokromatografik kart testlerin eni 4-6 mm, boyu 6-7 cm, kalınlığı ise 1-2 mm olup bu testler kapiller akım prensibine göre çalışır. İmmünokromatografik kart testler;

- Plastik destek ve kaset kapak
- Örneğin damlatıldığı ve selüloz yapılı "örnek pedi"
- Sünger absorban ped
- Renkli molekül ve antikorların bulunduğu, reaksiyonların gerçekleştiği fiber glass yapılı "konjugat pedi"
- Kapiller akımın gerçekleştiği ve sonucun izlendiği nitroselüloz membran
- Test çizgisi (T) ve kontrol çizgisi (K) bileşenlerini içermekte olup immünokromatografik kart test yapısı Şekil 6'da gösterilmektedir.

İmmünokromatografik kart testlerin üstü plastik kaset kapak ile kapalıdır. Örneklerin alındığı sünger olan örnek pedi, örnek uygulama noktası ve T ve K'nin değerlendirildiği pencere gözle görülebilmekte olup diğer kısımlar kapalıdır. Örnek uygulama pedi ağıza yerleştirilerek veya tükürük örneği örnek uygulama noktasına damlatılarak test çalışmaktadır. Absorban ped tükürüğün toplanması ve ivedilikle örnek pedine tükürüğün taşınması için tasarlanmıştır. Damlatılan veya örnek ped ile etkileşime giren örnek öncelikle örnek pedinde birikir.

Örnek pedi bazı sürfaktanları ve tampon sistemi içermektedir. Örnek, bu pedin sıvı tutma kapasitesinden fazla damlatıldığından sıvı bu pede temas eden konjugasyon pedine doğru ilerler. Konjugasyon pedinin üzeri antikor konjugatları ile kaplıdır ve konjugasyon pedine gelen sıvı örnek konjugatları ile reaksiyona girerek konjugatların salınmasına neden olur. Etkileşime giren konjugatlar sürüklenerek konjugasyon pedine temas eden nitroselüloz membrana doğru ilerler.

Nitroselüloz membran test-çizgisinde genelde sığır serum albümini ve kontrol-çizgisi de antikorlarla ile kaplıdır (51, 52). Nitroselüloz membrana gelen sıvı, içindeki molekülleri

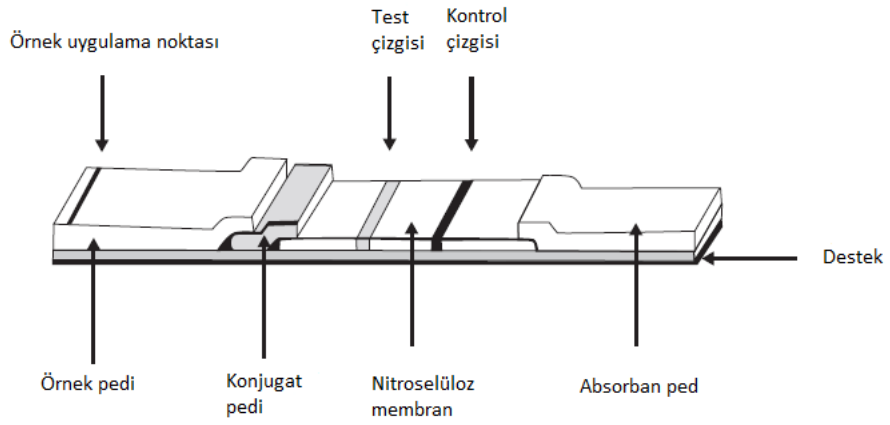
de sürükleyerek membran üzerinde kapiller akım kuvvetine göre membranın sonuna doğru ilerler. Bu sırada test çizgisi ve kontrol çizgisinde ilgili reaksiyonlar gerçekleşir ve buna göre test sonucunu belirten renkli çizgiler oluşur.

Absorban ped kart testin son noktasına yerleştirilmiş olup kapiler akışın sürdürülmesini sağlamaktadır. Sıvı daha da ilerleyerek membranın sonuna temas eden atık pedinde birikir, bu alanın da üzeri kapalıdır. Tüm bu olaylar yaklaşık olarak birkaç dakika içinde gerçekleşir ve sonuç yaklaşık 10 dakika içinde okunabilir. Numune test sonucunu belirten çizgiler saatler boyunca değişmeden kalır.

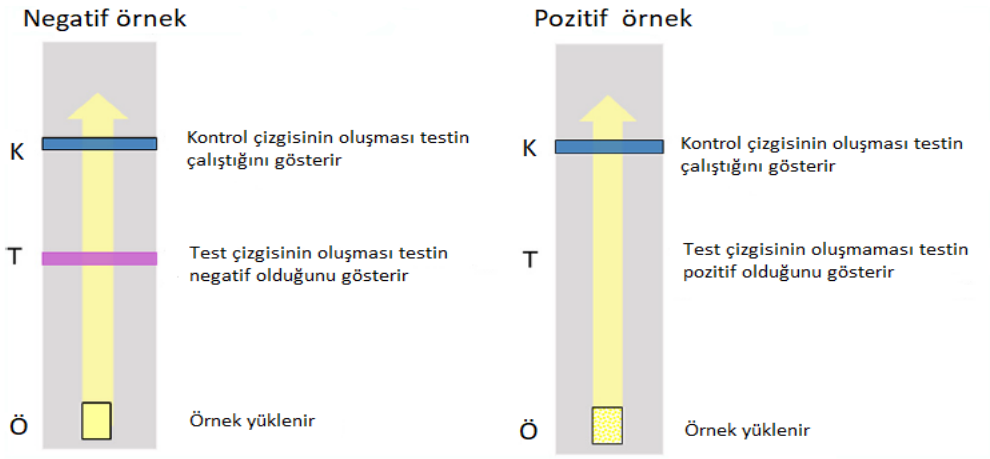
Pedler ve nitroselüloz membranın bütünlüğünü korumak için en alta bir plastik destek yerleştirilir ve tüm diğer parçalar bu plastiğin üzerine sabitlenmiş haldedir.

Kart testlerin, test çizgisi alanında nitroselüloz zemine sabitlenen moleküllere göre, sandviç model ve yarışmalı model olmak üzere 2 farklı çalışma prensibi bulunmaktadır. Sandviç modelde, gözlem penceresinde çift çizgi görülürse sonuç pozitif; tek çizgi görülürse sonuç negatif olarak değerlendirilir. Yarışmalı modelde ise gözlem penceresinde tek çizgi görülürse sonuç pozitif; çift çizgi görülürse sonuç negatif olarak değerlendirilir. Çalışmamızda tükürükte madde analizinde kullanılan immünokromatografik kart test modeli yarışmalı modeldir.

A



B



Şekil 6. Şekil A'da kart testin yapısı ve Şekil B'de negatif ve pozitif örneklerin değerlendirilmesi gösterilmektedir.

2.5.1.2. Tükürük numunesinin alınması, taşınması ve POCT ile analizi

Tükürük örneğinin toplanması için çeşitli ticari cihazlar mevcuttur. Bu cihazların çoğu, bir naylon çubuğa yapıştırılmış bir emici köpük veya ped içerir. Numune toplanmadan önce, donörden, 10-30 dakika boyunca herhangi bir şey içmekten, yemekten veya ağzına herhangi bir şey koymaktan kaçınması istenir. Donörden absorban pedi veya köpüğü dilinin altına veya diş etleri ile yanaklarının arasına 2-5 dakika tutması istenir. Bazı patolojik veya tıbbi nedenlerden dolayı, bazı donörler tükürük örneği veremeyebilir. Örneğin antikolinerjik ilaçlar kullanan kişiler yeterli miktarda tükürük salgılanmayabilir.

Numune toplanmasından sonra, absorban köpük veya ped doğrudan yerinde analiz için kullanılabilir veya bir analiz laboratuvarına gönderilmek üzere dilüentler/koruyucular içerebilir. Salicule, OralLab, RapiScan, Drugwipe, Cozart, Statsure ve SalivaScreen dahil olmak üzere çeşitli ticari cihazlar tükürük toplanması için kullanılmaktadır. Numuneleri bir laboratuvara gönderirken, numunenin taşınması için önlemler alınmalıdır. Yasal örnekler için, gözetim zinciri çok önemlidir. Numuneler 4 °C'de veya oda sıcaklığında taşınabilir (45).

POCT cihazları, hassasiyet ve özgüllük bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir ve belirli ihtiyaca göre özel değerlendirilmelidir. SAMHSA'nın belirlediği tükürükteki maddelere ait tespit limitleri Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9. Tükürük testi için SAMHSA tarafından önerilen cutoff değerleri

Analit	**Başlangıç tarama tespit limiti (ng/mL)**	**Doğrulama tespit limiti (ng/mL)**
THC metabolitleri		
THC ve THC-COOH	4	-
THC	-	2
Kokain		
Kokain metabolitleri	20	
Kokain ya da kokain metaboliti (benzoilekgonin)		8
Opiyatlar / opioidler		
Opiat metabolitleri	40	-
Morfin	-	40
Kodein	-	40
6-MAM	4	4
Fensiklidin (PCP)	10	10
Amfetamin		
Amfetaminler (hedef analit: metamfetamin)	50	-
Amfetamin	-	50
Metamfetamin (numune ayrıca amfetamin içermelidir)	-	50
3,4-Metilendioksimetamfetamin (MDMA)	50	50
3,4-Metilendioksiampfetamin (MDA)	-	50
3,4-Metilendioksietilamfetamin (MDEA)	-	50
Benzodiazepinler	-	-

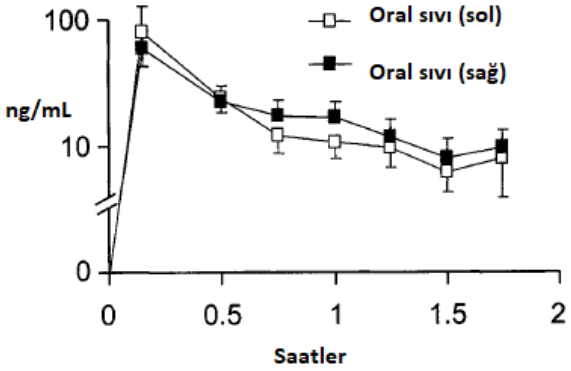
2.5.1.3. Tükürükte esrar, amfetaminler, kokain, opioid ve opiyatlar ve benzodiazepinlerin POCT ile değerlendirilmesi

2.5.1.3.1. POCT ile tükürükte esrar analizi

Tükürükte, ana madde olan THC'nin konsantrasyonu daha yüksektir. Tükürükte THC daha yüksek konsantrasyonda bulunmasına rağmen, madde analizi vakalarında THC'nin pasif maruziyeti argümanını en aza indirmesi nedeniyle tükürükte THC-COOH analiz edilmektedir. Hollanda'da yapılan çalışmada kafede 3 saat boyunca esrar sigarası içilmesi durumunda orada bulunan ancak esrar kullanmayan kişilerin tükürüklerinde pasif kontaminasyon rapor edilmiştir. Tükürük örneklerinde THC varken THC-COOH bulunmamıştır (12).

Plazmadan tükürüğe geçiş çok az olduğu için tükürükteki THC daha çok sigara veya THC preparatının yutulması sonucu gözlenmektedir. THC konsantrasyonları tükürükte çok düşük olduğundan, tespiti için hassas yöntemler gerekir.

Yapılan bir çalışmada teorik olarak tükürük:plazma oranı THC için 0,09–0,13, 11-OH-THC için 0,06–0,09 olarak bildirilmiştir (53). Ancak bu oran esrar sigarası içildikten hemen sonra 10 olarak belirlenmiştir (54). Tükürükteki kanabinoidler genellikle esrar veya esrar ürünlerinin sigara olarak içilmesi veya yutulması sırasında ağızda kalan artık malzemelerden kaynaklanmakta olup sigara olarak içilmesinden sonra konsantrasyonları ilk 2-4 saatte hızla düşmektedir. Buna karşılık içimden birkaç saat sonra idrar veya terde kannabis detekte edilemez. Kannabioidlerin idrarda pozitif olması için ortalama duraklama zamanı (lag time) GC-MS ile 4 saat ve EIA ile 6 saat olarak raporlanmıştır (55). Dolayısıyla tükürükte kannabioid ölçümünün avantajı yakın zamanda kullanımı göstermesidir. Ayrıca THC-COOH ve THC-COOH-glukuronidin tükürükte detekte edilmesiyle pasif esrar içiciliği dışlanabilmektedir (56).



Şekil 7. Delta-9 THC seviyelerinin zamana göre değişimi (13).

2.5.1.3.2. POCT ile tükürükte opiyat analizi

Tükürükte analiz edilen başlıca opiyatlar morfin, kodein, 6-MAM, fensiklidin ve metadondur. DAM'ın hızlı bir şekilde 6-MAM'a ve daha sonra morfine metabolize olması, eroin veya morfin kullanımı arasında ayrım yapılmasını zorlaştırır. Opioid ve opiyatların tükürük, kan ve idrarda tespit zamanları Tablo 6, Tablo 7 ve Tablo 8'de verilmiştir. Tükürük:plazma oranı kodein, metadon, morfin ve tramadol dahil olmak üzere çoğu opioid için yüksektir (57) (Tablo 4).

6-MAM tükürük:plazma oranı 6 civarındadır (54, 58). DAM sigara olarak içildikten 24 saat sonraya kadar ve enjeksiyon olarak uygulandıktan 60 dakika sonraya kadar tükürükte bulunur. Eğer burundan toz şeklinde çekilirse veya sigara olarak içilirse oral kavitede depolandığı için birkaç saat kadar tükürükte yüksek konsantrasyonlarda saptanabilir (54).

MOR tükürükte morfin sülfat olarak uygulandıktan sonra gözlenir. Morfin sülfat IM uygulandıktan yarım saat sonra tükürükteki seviyeleri pik yapar ve 24 saat sonra tükürükte tespit edilemez. Ayrıca DAM kullanılmasından sonra da tükürükte morfin tespit edilebilir (59, 60).

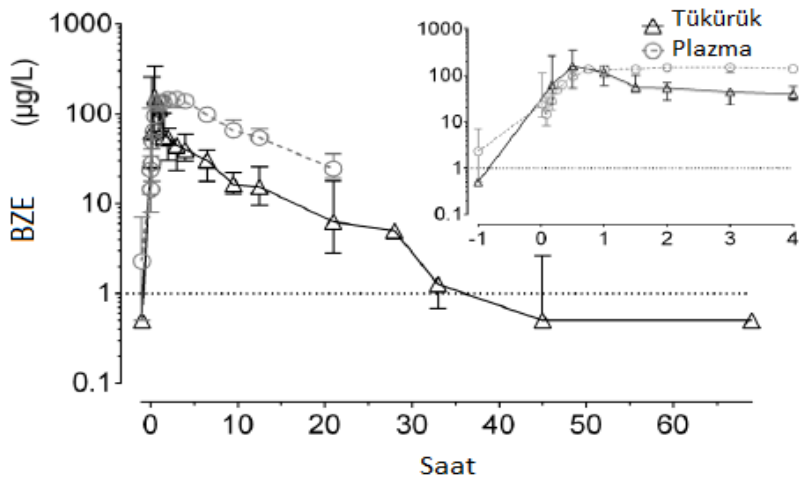
2.5.1.3.3. POCT ile tükürükte kokain analizi

Kokainin zayıf bazik özellikte olması ve tükürükte iyon tuzağı etkisi nedeniyle tükürükteki kokain konsantrasyonunun kana göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (61). COC ve metabolitleri olan anhidroekgonin, BZE ve EME, sigara içildikten ve IV veya IN uygulamadan sonra tükürük içinde tespit edilebilir. Stimüle edilmeyen tükürükte kokainin

tükürük:plazma oranı 5'ten büyük olabilir (62). Stimüle edilen tükürükte kokainin tükürük:plazma 0,5-3 arasında değişmektedir (63).

Tükürükte kokainin 12 saate kadar ve BZE'nin 24 saate kadar tespit edilebildiği raporlanmıştır (64) (Şekil 8). Tükürükte COC, BZE ve EME'in yarı ömürleri sırasıyla 7,9, 9,2 ve 10 saattir. Ancak Jufer ve ark. 10 µg/L tespit limiti için COC, BZE ve EME'nin tükürükte tespit edilme zamanılarını sırasıyla 15, 45 ve 35 saat olarak; 1 µg/L cut-off değeri için 85, 93 ve 93 saat olarak rapor etmiştir (65).

Kokain IV uygulandıktan sonra kokainin tükürükteki yarı ömrü 34,7 ve plazmadaki yarı ömrü 34,9 dakika olarak raporlanmıştır. Kokain sigara olarak kullanıldığında ve IV uygulandığında tükürükteki tespit zamanları sırasıyla 3,17 ve 3,92 saattir (66). Kronik kokain kullanımında kokainin lipofilik olmasından dolayı kokain metabolitlerinin tükürükteki terminal eliminasyon yarı ömrü 16 gün olarak saptanmıştır. Cone ve ark. ise IV, IN ve sigara şeklinde COC kullanımını kıyasladığında sigara ve intranasal uygulamalarda tükürük kontaminasyonu nedeniyle kokainin tükürük:plazma oranının arttığını ve kokain uygulamasından sonra 2 saat içerisinde kokainin tükürükten elimine edildiğini rapor etmişlerdir (67).



Şekil 8. BZE seviyelerinin tükürük ve plazmada zaman göre değişimi (66).

2.5.1.3.4. POCT ile tükürükte amfetamin analizi

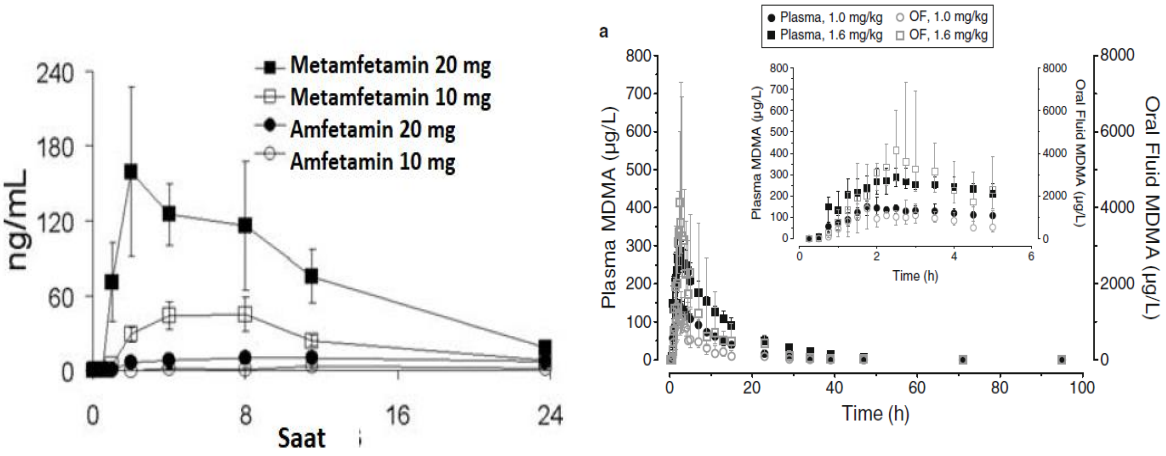
AMP, MA, MDA, MDMA ve MDEA, tek bir dozdan sonra 24 saat boyunca tükürükte tespit edilebilmektedir. Ancak, tükürükte amfetamin metabolitlerinden ziyade amfetamin ana ilacı bulunur.

Amfetaminler, MDMA ve MDA lipofilik, pKa'sı yüksek olan zayıf bazik bileşikler olup plazma proteinlerine bağlanma oranları düşüktür. Genelde tükürükteki konsantrasyonları kandakinden yüksektir çünkü tükürük pH'sı plazmadan düşük olup tükürükte iyon tuzağına uğrarlar (40, 68).

Amfetamin rasemik karışım olarak uygulandığında tükürükte D ve L izomerleri bulunur. Doz alımından 50 saate kadar tükürükte metamfetaminin pozitif bulunduğu raporlanmıştır (69). MDMA'nın 24-48 saate ve MDA'nın 12-47 saate kadar tükürükte saptandığı raporlanmıştır (Şekil 9) (40). Amfetamin sigara ve IV olarak alındıktan sonra metamfetaminin tükürük ve plazma konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Amfetaminler tükürükte yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu için tükürük miktarı azalsa bile hızlı ekstraksiyon metotları ve otomatize metotlarla kolayca tespit edilebilirler (56).

MDMA kullanıldıktan 0,25-1 saat sonra tükürükte saptanmaya başlar ve 1,3-5 saat sonra pik yapar. Plazmada MDMA'nın saptanma zamanı tükürükte saptanma zamanına benzer. MDMA ve MDA'nın tükürükteki maksimum konsantrasyonunun plazmadan oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. MDA seviyeleri MDMA seviyelerinin yaklaşık % 4-5'i kadar olup pik seviyeleri MDMA kullanımından 1,5-4 saat sonra elde edildiği belirtilmiştir (33).

A B

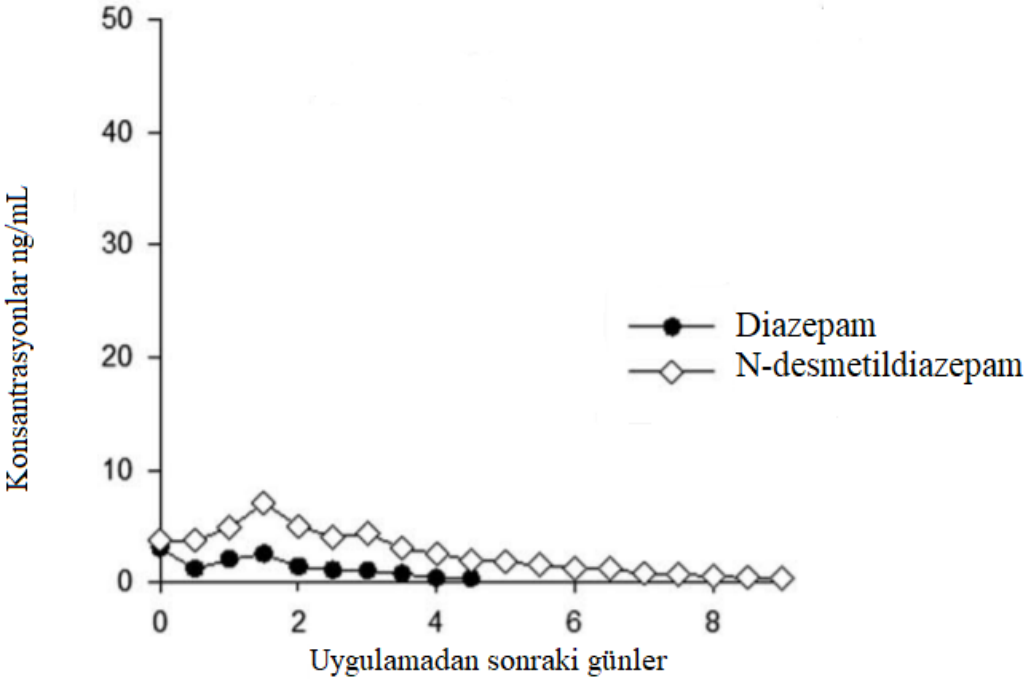


Şekil 9. 10 ve 20 mg dozlarda uygulanan amfetamin ve metamfetamin konsantrasyonlarının tükürükte zamana göre değişimi (A) (70), 1 ve 1,6 mg dozlarda uygulanan MDMA konsntrasyonlarının tükürük ve plazmada zamana göre değişimi (B) (40).

2.5.1.3.5 POCT ile tükürükte benzodiazepin analizi

Benzodiazepinlerin etki gücü farklı olan çok sayıda ilaçtan oluşması, konsantrasyonlarının ve stabilitelerinin düşük olması ve yüksek oranda lipofilik olmaları gibi nedenlerden dolayı tükürükte analizleri zordur. Benzodiazpinlerin asit pKa değerleri ve plazmadaki proteinlere bağlanma oranlarının yüksek olması nedeniyle tükürük:plazma oranı düşüktür (0,01–0,08) (Tablo 4). Dolayısıyla tükürükte benzodiazepin tespit edilebilmesi için sensitif metotlar kullanılmalıdır.

Benzodiazepinlerin tükürükteki konsantrasyonlarının, plazmadaki bağlanmamış ilacın konsantrasyonlarına eşit olduğu bulunmuştur. Klordiazepoksitin tükürük:plazma oranı 0,03±0,01 olarak rapor edilmiştir. Diazepam ve metabolitleri tükürükte 2-5 µg/L konsantrasyonlarda bulunur (Şekil 10) ve tükürük:plazma oranı 0,01-0,08'dir (Tablo 4). Diazepam, ilaç olarak kullanılmasından sonra veya tetrazepamın metabolize edilmesinden sonra oluşmaktadır. Ancak yapılan bir çalışmada tetrazepamın 50 mg doz uygulanmasından sonra 0,25-10 saate kadar tükürükte benzodiazepin pozitif bulunmuş iken diazepam veya nordiazepam metabolitleri tükürükte negatif olup idrarda pozitif olarak bulunmuştur (71).



Şekil 10. Tükürükteki diazepam ve N-desmetildiazepam konsantrasyonlarının zamana göre değişimi (72).

2.5.1. İmmün yöntemler

Madde kullanımın immünoassay ile analizinde en yaygın kullanılan örnek idrar olup serum, plazma, tükürük ve mekonyum dahil diğer vücut sıvıları da kullanılmaktadır. İmmün yöntemler, metodun kullanım kolaylığı, basitliği, maliyetinin düşük ve hızının yüksek olması nedeniyle madde analizleri için kullanılan en yaygın tarama yöntemidir. İmmünoassay analizler ile kalitatif veya yarı kantitatif sonuçlar elde edilir. Laboratuvar bilgi sistemlerine bağlı otomatik immunoassay sistemleri laboratuvar otomasyonu için oldukça elverişlidir.

İmmün yöntemlerin dezavantajları ise; sensitivite ve spesifitelerinin zayıf, sonuçların genelde kalitatif olması, bazı immün yöntemlerin ilaç sınıfına spesifik olması ve çapraz reaksiyon nedeniyle yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuç elde edilebilmesidir (73).

Bazı immünoassaylerin spesifitesi zayıf olup hedef analite yapısal olarak benzeyen başka ilaç veya ilaç sınıfı ile çapraz reaksiyon vererek yalancı pozitif sonuçlara neden olur. İnterferansa neden olabilecek mekanizmalar; (1) yapısal olarak benzer ilaç veya metabolitin antikora bağlanması, (2) ilacın enzim reaksiyonunu interfere etmesi, (3) ilacın hatalı

absorbans okunmasına neden olması, (4) ilacın endojen madde sekresyonuna neden olması ve bu endojen maddenin, ilk üç maddelerdeki gibi etkileşime neden olmasıdır.

İmmün yöntemlerde yalancı negatif test sonuçları da oldukça yaygındır. Nedenleri; (1)madde, yöntemin tespit limitinin altında olabilir, (2)immünoassay tarama ile spesifik ilaç tespit edilemeyebilir ve üreticinin çapraz reaksiyon için beyan ettiği ile test performansı uyumsuz olabilir ve bu farklılık lot-lot farklılığı, farklı popülasyon, tüm bileşik veya metabolitlerin çapraz reaksiyon için test edilmemesinden kaynaklanabilir, (3) ilaç çok kontrollü bir şekilde alınmış ve metabolize olmamış olabilir. Bu nedenlerden ötürü immün yöntemler sadece tarama amaçlı kullanılır (31).

Maddelerin idrarda tarama ve doğrulama testleri için SAMHSA ve Avrupa tespit limitleri Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10. Maddelerin idrarda tarama ve doğrulama testleri için SAMHSA ve Avrupa tespit limitleri (41).

Madde tipi	**SAMHSA tespit limiti (ng/mL)**		**Avrupa tespit limiti (ng/mL)**	
	Tarama	Doğrulama	Tarama	Doğrulama
Esrar (THC-COOH)	50	15	50	15
Kokain (BZE)	150	100	300	150
Amfetaminler	500		300	
Amfetamin		250		200
Metamfetamin	500	250		200
MDMA		250		200
MDEA		250		200
MDA		250		200
Opiyat metabolitleri				
Morfin		2000		
6-MAM	2000	10	300	200
Kodein		2000		
Benzodiazepinler			200	200

2.5.1.1. İmmünoassay tipleri

Madde analizinde kullanılan immün yöntemler genelde küçük moleküler boyutta maddelerin analiz edilmesi nedeniyle, yarışmalı homojen formatı kullanırlar. Floresans polarizasyon immünassay (FPIA), EMIT (enzim çoğaltılmış immünoassay tekniği), CEDIA (klonlanmış enzim donör immünoassay), KIMS (solüsyondaki mikropartiküllerin kinetik etkileşimi) olmak üzere birçok homojen immünoassay teknolojisi bulunmaktadır (74). Heterojen immünoassay teknolojilerine örnek olarak kemilüminesans, ELISA ve mikropartikül ile zenginleştirilmiş immün yöntemler (MEIA) bulunmaktadır. Madde analizinde yaygın kullanılan immünoassayler Tablo 11'de gösterilmektedir.

Tablo 11. Madde analizinde kullanılan immünoassay çeşitleri

Yarışmalı	**FPIA** (Abbott TDx)	**Floresan polarizasyonu**, ancak bu tasarım durduruldu
	EMIT (Siemens): • ADVIA Chemistry, Dimension veya Viva (Siemens), • Multigent (Abbott) veya • SYNCHRON (Beckman-Coulter)	**Kolorimetri** (enzim modülasyonu) Bütün bu immünoassayler, NAD'ın NADH'ye dönüşmesi ile sinyali 340 nm'de ölçer (ancak SYNCHRON, partikül ile geliştirilmiş türbidimetrik inhibisyon immünoassay metodu kullanır).
	CEDIA (Microgenics)	**Kolorimetri** (enzim modülasyonu); sisteme bağlı görünür dalga boylarında, genellikle beta-galaktozidaz enzimi (fragmanlar) kullanılır.
	KIMS immünoassay • Cobas (Roche) veya DRI (Microgenics)	**Türbidimetri**, lateks mikropartikül destekli; sisteme ve teste bağlı dalga boylarında ölçülür (örneğin, Kannabinoidler için KIMS ile 659 nm'de).
	Çeşitli üreticilerin **EIA** kitleri (örneğin, OraSure)	**EIA**, mikroplakada batch test.

2.5.1.2. Maddelerin immünoassay ile analizi ve yöntemin interferansları

İmmün yöntemlerin başlıca kıstlılığı antikor spesifikliğidir. Hedef analite benzer yapıda çok sayıda endojen metabolit olduğu gibi hedef analitten farklı yapıda olup analit gibi tespit edilen ve "çapraz reaktan" adı verilen moleküller de bulunmaktadır. Çapraz reaktanlar örnekte bulunduklarında yalancı pozitif sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır (75). Maddeler ve interfere eden durumlar aşağıda değerlendirilmiştir.

2.5.1.2.1. İmmünoassay ile esrar analizi

Esrar analizinde kullanılan immün yöntemler THC-COOH tespit etmek için tasarlanmıştır. İdrarda THC-COOH 87 saate kadar, kronik kullanımda 95 güne kadar tespit edilebilmektedir (Tablo 8). İdrar, esrar ve metabolitlerini yüksek konsantrasyonlarda; protein ve lipid gibi interfere edici maddeleri ise düşük konsantrasyonda içerdiği için çoğunlukla örnek hazırlığı yapılmadan analiz edilir. Genel olarak THC-COOH düzeylerini tespit etmede kullanılan immün yöntemlerinsensitivite ve spesifiteleri iyidir.

Pasif kannabis maruziyeti immün yöntemle tespit edilemez. Çünkü pasif maruziyette metabolit düzeyleri immün yöntemin cut-off limitinden oldukça düşüktür. Ayrıca marihuana yağının kullanılması ile THC'nin immün analizi pozitif sonuçlanmaz, çünkü marihuana tohumu yıkandıktan sonra yağ özü çıkarılır ve tohum gövdesinde marihuana kalmaz.

İmmün yöntemlerde çapraz reaksiyonun belirlenmesi önemlidir. Özellikle birçok immün yöntemde THC-COOH'a karşı antikorlar oluşturulmuştur ve özgüllüğün arttırılması sayesinde idrar analizi için etkili bir yöntem haline getirilmiştir. Esrar metabolitleri idrarda çoğunlukla glukuronid olarak atılır ancak yöntemin sensitivitesi sayesinde serbest ve glukuronid metabolitleri arasında oluşan çapraz reaksiyon analizi interfere etmez.

Antiviral ajan olan efavirenz esrar analizinde kullanılan immün yöntemler ile çapraz reaksiyon verir. Ayrıca niflumik asit nadiren de olsa yalancı pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Cotton ve ark., Vitros esrar immün yöntemini ticari bebek yıkama ve sabun türlerinin interfere ettiğini rapor etmişlerdir (yenidoğanda yalancı pozitif sonuçlar) (76).

Son yıllarda oldukça popüler olan sentetik kannabinoidler olan JWH-018, JWH-250, HU-210 ve CP-47.497'nın tespiti oldukça önemlidir. JWH-018 (2008 yılında üretilmiş) CB1 kannabinoid reseptör agonisti olup sentetik kannabinoidlerin ilk bileşiğidir (77). HU-210 ise marihuanaya benzer sentetik bir agonisttir (78). Bu bileşikler idrarda marihuana immün

yöntemleri ile belirlenemez. Ayrıca, sentetik kannabinoidlerin yapısal çeşitliliğinin fazla olması, içerdiği maddelerin değişimlerin hızlı olması, yeni bileşiklerin sürekli ortaya çıkması nedeniyle immün yöntemlerle tespiti zordur (79, 80). İdrarda bu bileşenlerin tespit edilmesinde LC-MS/MS veya GC-MS kullanılmalıdır.

2.5.1.2.2. İmmünoassay ile opiyat analizi

Opiyat veya opioid kullanımından 2-3 gün sonra idrarda immün analiz ile opiyatlar pozitif bulunur (Tablo 8). Birçok immün yöntemde opiyat ve opioid analizi için kalibrasyon yapılırken morfin kullanılır ancak morfin nonspesifiktir. Bu durumda morfin benzeri opioidler ve bazı metabolitlerle çapraz reaksiyon gözlenebilir. Özellikle kodein kullananlarda, hidromorfon analizinde pozitif immünoassay sonucu elde edilebilir. Çapraz reaksiyon analitin konsantrasyonu ve reaktif antikor spesifitesi ile değişebilmektedir. Opiyatların immün analizinde yalancı pozitif interferanslar önemlidir. Kodein, hidrokodon, florokinolon antibiyotikler, rifampisin, nalokson gibi ilaçların kullanımı ve haşhaş tüketimi opiyat immunoassay taraması ile yalancı pozitif test sonuçlarına neden olabilmektedir.

Yaygın interferanslardan olan haşhaş tüketimine bağlı yalancı pozitif sonuçları önlemek adına SAMHSA kuralları opiyat immünoassay tarama testleri için cut-off olarak 2000 ng/mL düzeyinin kullanılmasını önermektedir. İşyeri idrarda opiyat taranması için orijinal cut-off 300 ng/mL iken, Kasım 1998'de, haşhaş tohumu içeren ürünler tükettikten sonra yalancı pozitif opiyat sonucunu elimine etmek için cut-off 2000 ng/mL'ye çıkarılmıştır (1).

Haşhaş tohumu içeren gıdaların tüketilmesi immünoassay taraması sırasında pozitif opiyat test sonucuna neden olabilir. Bu nedenle pozitif sonuçların GC-MS veya uygun bir doğrulama yöntemi kullanılarak morfin ve kodein açısından doğrulanması sağlanır.

İdrarda morfin konsantrasyonunun 2000 ng/mL'yi aşması durumunda eroin kullanımı ile haşhaş kullanımına bağlı morfin yüksekliğinin ayırt edilmesi amacıyla immünoassay ile 6-MAM (cut-off 10 ng/mL) analizi yapılır (81). Çünkü 6-MAM haşhaş tohumu içeren besin tüketimi sonucunda tespit edilemez. Genel olarak, haşhaş tohumu içeren besin tüketildikten sonra morfin konsantrasyonları kodein konsantrasyonlarından daha yüksektir. Morfin-3-glukuronid hem eroin hem de haşhaş kullanımı sonrasında idrarda tespit edildiğinden faydalı bir belirteç değildir (82).

Opiyat taramasında yalancı negatif sonuçlara neden olan interferanslar da önemli olup 2 kategoriye ayrılır. Birincisi; idrar opiyat (morfin ve kodein) tarama testinin opioidleri (fentanil, oksikodon, metadon vb.) kapsamamasıdır. Bu durumlarda bahsedilen opioidler için spesifik immünoassay gerekir. İkincisi; opiyat immünoassayler morfine spesifik antikor kullanılması nedeniyle oksikodon, oksimorfon, metadon, propoksifen, fentanil gibi opioidler düşük çapraz reaksiyon nedeniyle tespit edilemeyebilir.

2.5.1.2.3. İmmünoassay ile kokain analizi

İdrarda kokainin immunassay taramasında BZE analiz edilir. BZE idrarda 48-72 saat arasında tespit edilebilmektedir (Tablo 8). Analizde ön işlem çok az gerekir veya hiç gerekmez (12).

Kokain immün yöntemlerinde yalancı negatif sonuçlar önemlidir. Oral yolla yüksek dozda kokain kullanımında BZE'nin idrarda yüksek dozlara ulaşması için yeterli zaman geçmediğinden yüksek dozda kokain idrarda immünoassay ile tespit edilemeyebilir. Kokaine bağlı yüksek doz ölümünün gerçekleştiği konsantrasyonda dahi hastanın test sonucu negatif olarak saptanabilir (83).

Levamizol ilacının (antihelmintik, immünomodülatör) COC analizinde madde bütünlüğünü bozucu olarak kullanıldığı bildirilmiştir (84). Levamizol kokain immün yöntemleriyle tespit edilemez ancak GC-MS veya LC-MS yöntemleriyle tespit edilebilir.

Kokain immün yöntemlerinde yalancı pozitif sonuçlar koka çayı tüketiminden kaynaklanır. Latin Amerika'dan gelen farklı çay türleri (yerba mate gibi), koka bitkisinden elde edilir ve kokain kötüye kullanımıyla karıştırılabilecek miktarda eser miktarda koka içerir (84). Koka çayı içildikten sonra immün yöntemler (tarama) ve GC-MS yöntemi (doğrulama) ile yapılan her iki analizde de kokain sonuçları pozitif tespit edilebilir.

2.5.1.2.4. İmmünoassay ile amfetamin analizi

İmmün yöntemler, amfetaminlerin tespiti için birincil tarama metotlarıdır ve bu analizlerin çoğunda, antikorların, bir primer amin olarak amfetaminin amino grubuna ve ikincil bir amin olarak metamfetamine yönelik olduğu belirtilmektedir. Farklı ticari immün immün yöntemler, amfetamin ve metamfetamine karşı monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanır. Ayrıca hem MDMA hem de MDA'nın amfetamin immün yöntemleri ile önemli çapraz reaktivite gösterdiği belirlenmiş olup MDMA için ayrı bir immünoassay de bulunmaktadır. Birçok immün yöntemde kalibratör olarak D-metamfetamin kullanılır.

Amfetamin immün yöntemleri diğer maddelere göre daha fazla interfere olmakta ve bu nedenle daha fazla yalancı pozitif sonuçlar elde edilmektedir. Amfetaminler yapısal olarak basit moleküllerdir ancak spesifik antikor geliştirilmesi güçtür. Yaygın olarak kullanılan sempatomimetiklerin amfetaminlere yapısal olarak benzemesi nedeniyle immün yöntemlerde çapraz reaksiyona neden olduğu belirtilmiştir [6].

Amfetaminlerin immünoassay ile analizinde diğer sempatomimetik aminlerin amfetaminlere yapısal benzerliği nedeniyle çapraz reaktivite gözlenmesi amfetamin sonuçlarının yorumlanmasında önemli sorunlardan biridir. Özellikler over the counter (OTC) soğuk algınlığı ilaçları, efedrin veya psödoefedrin gibi sempatomimetik aminleri içerir ve bu tür ilaçların kullanımı, amfetamin immünoassay taramasında yalancı pozitif test sonuçlarına neden olan ilaçların çoğunluğunu oluşturur (5).

Vicks inhaler de intereferansa neden ilaçlardan birisidir. Vicks inhaler aktif bileşen olarak L-metamfetamin içermektedir ve bu ürünün kapsamlı kullanımı immünoassay taraması için yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir (6).

Besin takviyeleri veya zayıflama preparatları da amfetamin ile etkileşebilecek bileşikler içerebilmektedir. FDA Nisan 2004'te kilo kaybı ürünleri dahil efedra alkaloitlerini içeren tüm ürünleri yasaklamıştır. Amfetaminlerle çapraz reaksiyon gösteren diğer bileşiklerden biri fenproporekstir. Fenproporeks içeren besin takviyeleri (Brezilya diyet takviyeleri Emagrece Sim ve Herbathin) amfetamine metabolize olur. Bu besin takviyelerini kullanan bireylerin idrarında D-amfetamin pozitif olarak saptanabilir. 1,3-dimetilamilamin olarak da bilinen DMAA, diyet takviyelerinde kullanılan ve yalancı pozitif amfetamin

sonucuna neden olan sentetik bir nöral uyarıcıdır. DMAA amfetamine benzeyen ve norepinefrin salgılayan bir alifatik amindir; bununla birlikte, DMAA'nın amfetamin ile benzer şekilde çalışıp çalışmadığı hala bilinmemektedir. Negatif idrara (madde içermeyen) DMAA eklendiğinde, hem Roche Amphetamines KIMS testi hem de Siemens Syva EMIT II Plus Amphetamines testi 7500 ve 3125 ng / mL'de pozitif sonuç vermiştir.

Genel olarak amfetamin tarama programları ile elde edilen pozitif amfetamin sonuçları kiral olmayan GC-MS yöntemi ile doğrulanmaktadır. Eğer talep edilirse kiral yöntemle D ve L amfetamin/metamfetamin sonuçları doğrulanmaktadır. Kiral olmayan türevleri ve kolonları kullanan MS prosedürleri, amfetamin ve metamfetaminin D veya L izomerlerini ayırt etmediğinden, pozitif bir sonucun D-izomerinin varlığından kaynaklandığını belirlemek için izomer rezolüsyonunu gerçekleştirmek gerekir. Çünkü GC-MS ile rutin doğrulama izomer bileşimini belirlememektedir. İzomer rezolüsyonu kiral, optik olarak aktif kolon veya kiral türevlendirici ajanlar ile sağlanır. İzomer rezolüsyonu sonucu, D-izomer (total konsantrasyon tespit limitinin üzerindeki) %20'den fazla ise tespit edilen madde kötüye kullanılmış olarak yorumlanır (15).

2.5.1.2.5 İmmünoassay ile benzodiazepin analizi

Benzodiazepinler klinik ve toksikolojik analizlerde en sık karşılaşılan maddelerden biri olduğu için çeşitli matrikslerde benzodiazepin analizi önem kazanmıştır. Ancak çok sayıda benzodiazepin türevi olması (klinik kullanımda 50 den fazla ticari benzodiazepin türü bulunmaktadır) ve birçok benzodiazepinin çoklu formlara metabolize olması nedeniyle analizinde güçlükler yaşanmaktadır. Dolayısıyla taramada kullanılan immnoassayler hem kötüye kullanım dozlarında hem de düşük terapötik dozlarda yüksek sensitivite ve spesifitede, hızlı kalitatif (yarı kantitatif) özelliklere sahip olmalıdır. Benzodiazepinlerin ve metabolitlerinin kan, tükürük, saç gibi diğer biyolojik örneklere göre idrarda yüksek konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle idrar, benzodiazepin analizinde tercih edilen matrikslerden biridir (29).

Benzodiazepin analizinde yalancı negatif sonuçlar 2 nedenle görülür; (1) antikor, lorezepam gibi bazı ilaçlarla zayıf çapraz reaksiyon verir, (2) ilaç benzodiazepin için belirlenen 200 ng/mL tespit düzeyinden daha düşük konsantrasyonlarda olabilir. Klonazepam (panik tedavisi) ve flunitrazepam (cinsel istismar amaçlı kullanılır) ilaçları

düşük çapraz reaksiyon nedeniyle benzodiazepin immün yöntemleriyle tespit edilemeyebilir.

İdrar örnekleri yüksek konsantrasyonlarda fenoprofen, flurbiprofen, indometasin, ketoprofen ve ayrıca tolmetin içerdiğinde FPIA yöntemi ile benzodiazepin analizi yapıldığında yalancı pozitif test sonuçları olma potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca oksaprozin (nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç) benzodiazepin analizinde kullanılan immün yöntemleri interfere ederek yalancı pozitif sonuçlara neden olmaktadır.

Darragh ve ark., benzodiazepin için KIMS (%47 sensitivite), CEDIA (%55 sensitivite) ve yüksek duyarlı CEDIA (%78 sensitivite) immün yöntemlerinin, kronik ağrı tedavisi gören hastaların idrarındaki benzodiazepinlerin tespiti için yeterince sensitif olmadığını belirtmişlerdir (85).

İmmün yöntemler genel olarak çok sayıda benzodiazepini tespit edebilirken, bazı immün yöntemlerin en yaygın kullanılan benzodiazepin sınıfını tespit ettiği rapor edilmiştir. Ancak, LC-MS ve LC-MS/MS metotları ile benzodiazepin ailesinin birçok üyesi tespit edilebildiği için özellikle LC-MS/MS metodunun tarama ve doğrulama metodu olması önerilmektedir. İmmünoassay ile madde analizlerinde en sık ölçülen analitler ve interferanlar Tablo 12'de gösterilmektedir.

Tablo 12. İmmünoassay ile madde analizinde interfere edici uygulamalar (86).

Madde	Hedef analit	İnterfere edici uygulamalar
Amfetaminler	Amfetamin, Metamfetamin* ve yasadışı analogları: MDEA, MDA, MDMA	Amfetaminler Amfetamin, Metamfetamin ve yasadışı analogları: MDEA, MDA, MDMA, Efedrin, psödoefedrin, Vicks solunması (Grip tedavisi) Fentermin, fenfluramin (Obezite tedavisi), Fenilpropanolamin (Dekonjestan tedavi), l-Amfetamin, l-metametamin, Selegilin (Parkinson tedavisi) Bupropion, Trazodon, Desipramin (Depresyon tedavisi) Dekstroamfetamin (Dikkat eksikliği tedavisi) Klorpromazin (Psikoz tedavisi) Amantadin, Prokainamit, xletin (Aritmi tedavisi) Propranolol, Labetalol (Beta bloker tedavisi) Metformin (Diabet tedavisi) Ofloksasin (Bakteriyel enfeksiyon tedavisi) Amantadin (Viral enfeksiyon tedavisi) Klorokin (Sıtma tedavisi) Prometazin (Antihistaminik tedavi) Ranitidin (Ülser tedavisi) triflorometil fenilpiperazin (halisünojen)
Benzodiazepinler	Alprazolam, triazolam, diazepam, lorazepam, klordiazepoksid, Oksazepam, nordiazepam (primer metabolitler)	Okzaprozosin (NSAI tedavisi), Sertralin (Depresyon tedavisi), Klorpromazin, okzaprozin (Antipsikotik tedavi), Fenitoin (Antikonvülzan tedavi)
Kannabinoidler	THC-COOH	İbuprofen, Naproksen (NSAI tedavisi), Niflumik Asit (siklooksijenaz inhibitörü tedavisi), Visine göz damlası (benzalkonyum klorür ve borat tampon), Dranabinol (Tıbbi esrar tedavisi), Efavirenz (Viral enfeksiyon tedavisi), Pantoprazol (Ülser tedavisi), Prometazin (Antihistaminik tedavi), Kenevir Tohumu (Beslenme)
Kokain	BZE	Amoksisilin (Bakteriyel enfeksiyon tedavisi), Koka bitkisi yaprakları (Beslenme), Tonik Su (Beslenme)
Opiyatlar	Morfin, eroin, diasetilmorfin, oksikodon, 6-MAM	Kodein, dihidrokodein (grip tedavisi) (asetilkodein eroin ile kontamine olarak alınabilir, kodeine metabolize olur), Hidrokodon, hidromorfon, oksikodon (narkotik analjezik tedavisi), Tramadol (Ağrı tedavisi), Difenhidramin (Kusma tedavisi), Haşhaş tohumu, Kreatinin (Beslenme) Nalokson (Opioid zehirlenmesi), Dekstrometorfan (Öksürük şurup bileşeni), Amisulpirid, Ketiapin (Psikoz tedavisi) Kinolon antibiyotikleri (Ofloksasin, Levofloksasin), Rifampisin (Bakteriyel enfeksiyon tedavisi), Kinin (Sıtma tedavisi), Sulpirid (Nöroleptik), Verapamil (kalsiyum kanal blokörü)

2.5.1. Kromatografik ve kütle spektrometrik yöntemler

Madde analizinde kromatografik yöntemler tarama ve doğrulama amaçlı kullanılmaktadır. Sistemdeki sabit bir faz ile bileşiklerin farklı fiziksel etkileşimlerine dayanan, kompleks karışımların ayrılmasını sağlayan tekniğe kromatografi adı verilmektedir. Kromatografi tekniğinde temel bileşenler; örneği taşıyan hareketli faz (mobil faz) (gaz veya sıvı), hareketli fazın aktığı sabit faz (durgun faz) (katı veya sıvı), sabit fazı tutan kolon ve ayrılan bileşiklerdir (elüat) (87).

Kromatografik yöntemlerin en önemli avantajı sensitivite ve spesifitelerinin yüksek olması nedeniyle madde kullanımının değerlendirilmesinde güvenilir sonuçlar vermesidir.

Kütle spektrometri (MS) analiz örneğinin buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilmesi işlemleri için geliştirilmiş bir cihazdır. Örneklerin MS sistemine yüklenmeden önce GC ve LC gibi ayrım teknikleri kullanılarak ayrılması gerekmektedir. LC ve GC yöntemlerine MS sisteminin eklenmesiyle yöntemin sensitivitesi ve spesifitesi artar.

GC uçucu veya uçucu hale gelebilen bileşiklerin ayrılmasında kullanılır (87). Uçuculuk GC'de kritik derecede önemlidir, çünkü ilgilenilen bileşikler sadece bileşiğin kendisini parçalamayan sıcaklıklarda yeterince uçucu hale getirilebildiklerinde ayrılabilirler (88, 89). GC-MS madde analizinde altın standart metottur.

LC, çözünmüş moleküllerin hareketli sıvı faz ile durgun faz arasında dağılması ilkesine dayanır (90). LC-MS madde analizinde altın standart olmasa da GC-MS'e göre çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. LC-MS'in avantajları; ayrımının hızlı olması, uçucu olmayan bileşiklerin ayrılması, türevlendirmeye ihtiyaç bulunmaması, kromatografik analiz süresinin kısa olması, daha az emek harcanan bir işlem olup veriminin daha yüksek olması ve GC-MS'e göre ucuz olması, GC-MS'e göre düşük sıcaklıkların kullanılmasıdır. Dolayısıyla maddelerin bütünlüğünün korunması LC-MS'te GC-MS'e göre daha iyidir. GC-MS'te türevlendirme aşamaları nedeniyle daha fazla örnek hacmi gerekmekte ve zaman almaktadır. LC-MS'te örnek hacminin daha az olması büyük bir avantajdır. LC-MS/MS sisteminde metodun geliştirilmesindeki en önemli basamaklar; analizi yapılacak maddenin özelliklerinin tanımlanması, maddelerin cihaz üzerinde optimizasyonu, maddeye özgü fragmanlarının, maddenin yapısına uygun analitik kolonun, kolon üzerindeki akış ve sıcaklık parametrelerinin belirlenmesinden oluşmaktadır.

MS sistemleri olukça çeşitli olup adli ve klinik madde taramalarında en yaygın kullanılan MS sistemi kuadrupol MS'tir. Kuadrupol MS'te iki set halinde çapraz olarak düzenlenmiş çubuklarda (kuadrupol çubukları) bulunan elektriksel alan sadece seçilmiş m/z değerine sahip iyonları analizörden geçirip detektöre ulaşmasına izin verir. Giriş kuadrupolünde (Q1) analizi hedeflenen yüklü ana madde seçilir. Bu madde parçalanma hücresi (Q2) olarak isimlendirilen ikinci kuadrupolde azot gazı altında parçalanır ve fragmanlarına ayrılır. Bu fragmanlar üçüncü kuadrupolde (Q3) aynı hıza getirilir ve detektöre yollanırlar.

MS ile analizden önce örneklerin hazırlığı aşaması oldukça önemlidir. Madde kullanım bozukluğunda analiz edilen örnek tipleri çoğu zaman direkt olarak MS sistemine yüklenemediği için analiz öncesinde örneklerin saflaştırılması veya şartlanması gerekmektedir (91, 92). Örnek şartlandırma aşaması ile sensitivite ve spesifite arttırılırken interferanslar ve kontaminantlar (atıklar) azaltılmaktadır. Örnekler bu aşamalar sağlanmadan MS sistemine yüklenirse kontaminantlar MS sisteminde depolanarak analiz süresinde beklenmeyen aksamaya neden olur.

2.5.1.1. Örnek hazırlığı

Örnek hazırlama aşamasında kullanılan çok sayıda metot bulunmakta olup başlıca kullanılan metotlar; dilüsyon ve yükleme, protein presipitasyonu (PP), sıvı sıvı ekstraksiyon (SSE) ve solid faz ekstraksiyon (SPE)'dur.

Örnek hazırlığının en basit şekli dilüsyon metodu (dilute and shoot), aranan madde örnek içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunuyorsa ve MS ile kolayca tespit edilebiliyorsa kullanılabilir. (93, 94). Dilüsyon metodu en sık idrar örneklerinin hazırlığında kullanılmaktadır (95). Bu metodun avantajları; rutinde kullanım ve metot geliştirme kolaylığı, otomatize etme olanağı ile örnek hazırlama işleminin hızlı ve düşük maliyetli olmasıdır (95). Dezavantajları ise; dilüsyon ile her ne kadar çözünen maddelerin konsantrasyonu azalsa da tamamen uzaklaştırılamamasıdır. Dolayısıyla dilüe edilerek hazırlanmış çok sayıda örneğin MS sistemine yüklenmesi durumunda sistemde daha sık temizliğe ve parça değişimine gereksinim duyulur ve analiz süresinde beklenmeyen aksama gibi durumlarla karşılaşılabilir.

PP metodu ise genellikle kan bazlı matrikslerde (serum, plazma ve tam kan) kullanılan metottur. Örneklere presipite edici solventler ve reaktifler eklendikten sonra çözünmüş

proteinler çöker (95, 96). Sonrasında karışım santrifüj edilerek katı faz ve süpernatant kısım ayrılır. Bu metot ile matriksin protein bileşimi fiziksel olarak örnekten ayrılır ve efektif olarak tek bir aşamada dilüe edilir. Avantajları ve dezavantajları basit dilüsyon metodu ile aynıdır. Ancak kan bazlı matriksler proteinlerin presipitasyonundan sonra bile idrara oranla çok sayıda interfere edici bileşik içerir (97). Dolayısıyla PP temelli metotlar ile hazırlanan örneklerin MS sistemine yüklenmesi durumunda sistemin temizlenme ve parça değişimi gereksinimi basit dilüsyon metoduna göre daha çok artacaktır.

SSE çözünür yapıdaki hedef analitin birbiriyle karışmayan iki sıvı arasında dağılması esasına dayanır. Organik solvent (sıvı fazla karışmayan) hedef analiti çözer ve proteinler, istenmeyen tuzlar ve daha polar molekül bileşenlerini efektif olarak uzaklaştırarak sıvı fazda kalmasını sağlar. Organik solvente ekstraksiyon işlemi gerçekleştikten sonra iki sıvı faz birbirinden ayrılır. Sıvı faz atılır ve organik faz ileri hazırlık için kullanılır. Bazı MS sistemleri orijinal organik solventin MS sistemine direkt yüklenmesine olanak tanırken, diğerleri karışım kuruyana kadar uçurma işlemine tabi tutulur ve sonrasında kuru kısım sıvı bazlı solvent ile yeniden çözülerek MS sistemine yüklenir (98). SSE metodunun avantajları; basit dilüsyon ve PP metotlarına göre örnek temizliği açısından başarılı olmasıdır (98, 99). SSE'nin dezavantajları; birden fazla işlem basamağı, fazla sarf malzeme gereksinimi, zaman alıcı ve otomasyonunun güç olması nedeniyle örnek hazırlama aşamasında son derece yüksek maliyet gerektirmesidir.

SPE metodu hedef analite spesifik kimyasal afinitesi olan pek çok ince parçacıktan oluşan solid faz ya da solid komponent (kolon) içerir. Kullanılan metoda, organik veya sıvı solventlere bağlı olarak hedef analiti içeren sıvı kısım solid fazın üst kısmından eklenir ve filtre edilir. (100, 101). Eğer solid fazda tutunan sıvı kısım hedef maddeyi içeriyorsa ikinci bir işlem ile solid fazdan elüe edilerek hedef analitin kimyasal olarak ayrılmasını ve saflaştırılmasını sağlar. Hedef analiti elüe etmede kullanılan solvente bağlı olarak MS sistemine örneğin yüklenmesinden önce solventin uçurularak kurutulması ve yeniden çözülmesi gerekebilir (98). SPE'nin avantajları; diğer hazırlama teknikleriyle kıyaslandığında örnek saflığının en iyi elde edildiği teknik olması, büyük örnek hacimleri ile günlük olarak çalışılmasına imkan tanıması, enstrüman kirlenmesinin minimum olması ile analiz süresinde beklenmeyen aksamanın minimuma indirilmesidir (98, 102). SPE'nin dezavantajı ise tek kullanımlık kolon kullanılmasından ötürü örnek başına düşen maliyetin en yüksek olduğu örnek hazırlama tekniği olmasıdır.

SPE tekniği çevrimiçi ve çevrimdışı olmak üzere 2 gruba ayrılır. Çevrimdışı teknik önceden bahsettiğimiz formdur. Çevrimiçi SPE'de ise farklı olarak yüksek akış hızlarına sahip, büyük parçacıklarla dolu (50-60 µM) kısa, dar kolonların kullanılır. Yüksek akış hızlı kolonlar sayesinde hareketli faz ile durağan faz arasında kütle transferinin arttığı türbülanslı bir akış oluşur. Bunun sonucunda küçük moleküllü analitlerin matriksten ayrılması kolaylaşır (103).

Çevrimiçi SPE'nin temel avantajları, örnek manipülasyonunun (kullanıcı hataları nedeniyle analitin azalması), hacminin ve kullanılan organik solventin minimum olması ve solvent buharlaştırma ve yeniden çözme işlemlerine gereksinim olmamasıdır (21). Ayrıca, çevrimiçi SPE kullanımı ile örnek temizliğinin iyi olması sayesinde matriks etkisinin kabul edilebilir limitlerde olması sağlanmıştır (23). Çevrimdışı SPE'ye göre çevrimiçi SPE'nin en büyük avantajı, cihaz tüm şartlandırma ve yıkama adımlarını gerçekleştirmek için programlandığından uygulama süresindeki azalmadır. Çevrimiçi SPE'nin dezavantajı, ilk ekipman alımı maliyetinin yüksek olabilmesidir (19).

2.5.1.2. İyonizasyon ve tarama modları

Analiz edilen tüm bileşenlerin nötral molekül yapısından iyonize hale geçmesi gerekmektedir ve bu süreç iyonizasyon olarak adlandırılır. Bu geçiş işlemi MS cihazının iyon kaynağı olarak adlandırılan bileşeninde meydana gelmektedir. Maddenin polaritesine göre elektrosprey (ESI) ya da atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kaynakları kullanılmaktadır. Tarama modları olarak SIM (seçilen iyonu izleme) ve MRM (çoklu reaksiyon izleme) kullanılmaktadır.

2.5.1.2. Kütle spektrometrisi ve immün yöntemlerin karşılaştırılması

Madde kullanım bozukluğu tanısının doğrulanmasında altın standart olan MS sistemlerinin deteksiyon limitleri düşük olup sensitivite ve spesifitelerinin yüksek olması nedeniyle immün yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Dolayısıyla MS-MS sistemleri immünassay sonuçları varsayımsal olarak pozitif olan örneklerin doğrulanmasında kullanılmaktadır. İmmün yöntemler sadece tarama amaçlı olarak tasarlanmıştır. Çünkü immün yöntemler tipik olarak yüksek sensitivite ve düşük spesifiteye sahip olmaları nedeniyle birçok laboratuvarda madde taramalarında negatif örnekleri ekarte etmede kullanılmaktadır.

İmmün yöntemlerin sadece tarama amaçlı kullanılmalarının belirli nedenleri bulunmaktadır. İlk olarak, immünassaylerde hedef analit için geliştirilen antikorlar genelde sadece bu analitin tek bir metabolitine veya kendisine karşı geliştirilir. Örneğin opiyat immünassay taraması genelde morfini tespit eder. Oysaki kodein, 6-MAM, hidrokodon, hidromorfon gibi bileşikler de benzer yapıya sahip olup opiyat immünassay taramasında tespit edilebilir (86).

İkinci olarak; kullanılan antikorlar yüksek sensitivite ancak düşük spesifiteye sahiptir. Hedef maddeler antikorlara karşı belirli bir afiniteye sahip olup pozitif taramaya yetecek kadar yüksek bir sinyal vermek için gerekli olan madde konsantrasyonu değişkenlik gösterir. Örnekte birçok madde bulunduğunda aranılan madde tek başına tespit limitin altında kalmasına rağmen çoklu maddelerin additif kombinasyonu ile sinyal üretilerek taramada pozitif sonuçlanabilmekte ya da hedef madde dışındaki bileşikler, pozitif bir sonuç verecek şekilde antikorlarla etkileşime girebilmektedir. Bu durumda örnekte hedef madde olmadığı için MS metodu ile yapılan analizde örnek negatif olarak değerlendirilirken, immünassay taraması ile örnek yalancı pozitif olarak sonuçlandırılabilir. Dolayısıyla bu durum MS temelli sistemlerin doğrulamada kullanılmasının en önemli nedenlerinden biridir. Bazı durumlarda da hedef madde yapısal olarak çok farklı olup antikora olan afinitesi çok düşük olmakta ve spesifik madde grubuna dahil olmasına rağmen biyolojik konsantrasyonlarda taramalarda negatif olarak sonuçlanabilmektedir. Bu durumda efektif bir tarama için hedef maddeye spesifik bir immünassay dizayn edilmelidir.

MS-temelli doğrulama metotları, genellikle madde doğrulama testinin bir parçası olarak spesifik madde metabolitlerini tanımlamak için tasarlanmıştır. Bu metabolit tanımlamaları özellikle hastanın reçetedeki ilaçları ile hastanın sonuçlarındaki uyumunun değerlendirilmesinde önemlidir.

MS temelli sistemler idrar sonuçlarının doğrulanmasında oldukça önemlidir. Madde analizinde neden MS doğrulaması gerektiğine dair örnek verilecek olursa; ağrı yönetimi programlarında hastanın reçete edilen ilacı almadığı tespit edildiğinde hastanın ilacını alıp sattığı veya ilaçlarını üçüncü bir kişiye vermek ya da ilaçları reçete edilenden daha yüksek bir dozda almak için stokladığı değerlendirilebilir. Hasta bu durumu gizlemek için bazı ilaçların yokluğunu maskelemeye çalışabilir. İdrarını topladıktan sonra idrar toplama kabına reçete edilen ilacı ekleyebilir. Hastanın numunesi immünoassayde analiz edilirse immünassayler ana madde ile metabolit ayrımı yapamadığı için yeteri kadar ana madde

eklenirse immünassay taramasında pozitif olarak sonuçlanabilmektedir. Ancak bu örneğin MS analizi yapıldığında ana madde tespit edilirken metabolitler tespit edilmediği için hastanın ekleme yaptığı anlaşılabilmektedir.

Her ne kadar MS temelli sistemler altın standart olarak değerlendirilseler de bu metodolojinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. MS temelli sistemler için sonuç verme süresi (Turn-around time) immünassaylere göre oldukça uzundur. Belirli ilaçların analizi için bu ilaçların maliyet nedeniyle toplu şekilde analiz edilmesi gerekir. Bir MS grubu hazırlandıktan kısa bir süre sonra gelen bir numunenin bir sonraki grupta analiz edilene kadar belirli saat veya gün beklemesi gerekebilir. Bir numune grubu içinde bile, MS temelli analiz örnek hazırlık aşamaları nedeniyle genellikle immonoassay yöntemlerinden daha uzun sürer.

Ayrıca MS temelli metotların rutin analizinde son derece eğitimli personele gereksinim duyulmaktadır. Bu personeller, MS analizinin örnek hazırlama, cihaza yükleme, veri inceleme ve raporlama olmak üzere tüm aşamalarından sorumludur. Pek çok personel aynı zamanda problemli cihazların sorunlarının giderilmesi ve cihaz arızalarının giderilmesi konularında eğitimlidir. MS temelli analizlerde önceden eğitim almış kalifiye personeller yetersiz tedarik edilmekte ve yeni personel bulunması ve işe alınması daha zor olma eğilimindedir.

2.6. LC-MS/MS ile esrar, amfetaminler, kokain, opiyat ve benzodiazepinlerin analizleri

Madde kötüye kullanımının kromatografik analizinde en yaygın kullanılan matrikslerin idrar ve plazma olması nedeniyle esrar, opiyatlar, amfetaminler, kokain ve benzodiazepinlerin bu matrikslerdeki analizleri değerlendirilecektir.

2.6.1. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda esrar analizi

2.6.1.1. Plazmada esrar analizi

Plazmada esrarın ana metaboliti olan THC-COOH 36 saate kadar tespit edilebilmektedir. Kannabinoidler adipoz dokuda depolanarak uzun bir süre boyunca adipoz dokudan salındıkları için kronik olarak günlük kannabis sigarası kullananların plazmalarında uzun süreli yoksunluk dönemlerinde bile tespit edilebilir. Bergamaschi ve ark., kronik günlük kannabis sigarası kullanıcılarının uzun süreli yoksunluk dönemlerinde plazmalarında

33 gün boyunca THC-COOH, 30 gün boyunca THC ve 3 gün boyunca 11-OH-THC tespit etmişlerdir (104).

Desrosiers ve ark. tarafından yapılan kontrollü çalışmada esrar içiminin ardından sıklıkla veya ara sıra esrar sigarası içen kişilerden alınan kanda veya plazmada (500 µl) eşzamanlı THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN, THC-glukuronid ve THCCOO-glukuronid analizi SPE-LC-MS/MS yöntemi ile yapılmıştır. THC, 11-OH-THC, THCCOOH ve THCCOO-glukuronidin, bazal konsantrasyonlar düzeltildikten sonra, ara sıra sigara içenlere kıyasla, sık sigara içenlerde anlamlı olarak daha yüksek olduğu raporlanmıştır. CBD, CBN ve THC-glukuronidin, esrarın yakın zaman kullanımını gösteren belirteçler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (104).

2.6.1.2. İdrarda esrar analizi

İdrarda esrar başlıca THC-COOH olarak bulunur ve kullanılan LC-MS/MS yönteminin tespit limitine göre değişmekle birlikte esrarın yakın zamanda kullanımında 4 güne kadar, esrarın kronik kullanımında 95 güne kadar tespit edilebilmektedir.

LC–MS/MS yöntemi, THC-COOH ve THC-COOH'un glukuronid metabolitlerinin direkt olarak belirlenmesi, zaman alıcı numune hidrolizine ve türevlendirme aşamalarına gerek duyulmaması açısından GC-MS yöntemine göre avantajlıdır.

Esrar analizinde SPE aşaması sonrası LC-MS/MS analizi oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Montesano ve ark., idrarın (90 µl) E. Coli kaynaklı β-glukuronidaz ile enzimatik hidrolizi (2 saat boyunca) sonrasında µ-SPE-LC-MS/MS yöntemini kullanarak THC-COOH, THC, THC-OH, CBD ve CBN'yi tespit etmiştir. µ-SPE ile ekstraksiyon ile tatmin edici geri kazanım değerleri ve ihmal edilebilir bir matriks etkisi ile elde edilmiştir. Yöntemin avantajları analiz için gereken enzim ihtiyacını ve gereken zamanı azaltılmasıdır. Toplam analiz süresi 5,8 dakikadır. Analizde asetonitril kullanımından kaçınılmıştır. Çünkü sinyalde önemli derecede supresyona neden olduğu önceki çalışmalarda raporlanmıştır (105).

Sempio ve ark., idrarda THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN, kannabigerol (CBG), tetrahidrokannabivarin (THCV) ve 11-nor-9-karboksi-THCV (THCVCOOH) analizinde tandem alkali/*E. coli* β-glukuronidaz hidrolizi içeren LC-MS/MS kullanmıştır. Yöntemin hidroliz ön işlemi süresi 16 saat olup oldukça uzundur (106).

Bir başka yaklaşım olan örneklerin dilüe edilerek LC-MS/MS sistemine direkt enjeksiyon metodu yaygın kullanılan bir yaklaşım olsa da bu yöntemde tuzlar, üre, amino asitler, proteinler (örneğin, albümin ve immünoglobülinler) ve hücreler (örneğin beyaz ve kırmızı kan hücreleri, bakteri ve mantar hücreleri) gibi idrar matriks bileşenleri ortadan kaldırılamadığı için bu bileşenler kromatografik sistemi ve iyon kaynağını kirletebilir veya tıkayabilir. Bunun sonucunda iyon kaynağı ve MS sinyalini baskılanabilir veya artırılabilir (107).

2.6.2. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda opiyat analizi

2.6.2.1. Plazmada opiyat analizi

Plazmada opioid analizinde LC-MS ve GC-MS yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. GC-MS metodu plazmada eroin, 6-MAM ve morfin opioid analizi için elverişlidir. Ancak uçucu olmayan morfin glukuronid metabolitlerinin GC-MS ile analizi glukuronid gruplarının dekonjugasyonu olmadan gerçekleştirilemez. GC-MS ile analizdeki türevlendirme aşaması eroinin hidrolizini indüklemesi nedeniyle dezavantajlıdır (108).

Plazmada opioid analizinde ekstraksiyon aşamasında SSE, SPE, PP yöntemleri kullanılmaktadır. Opioidler SSE ile ekstrakte edilirken pH 8-10 arasındaki çözeltilerden ziyade düşük polaritedeki organik çözeltide optimum olarak ekstrakte edilmektedir. SPE ile ekstraksiyon yapılırken hidrofobik ve katyon değiştirici kopolimerik yapıdaki materyalden yapılmış emici kullanılmaktadır. Opioid analizinde SPE metodu daha yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ön işlem aşamasında ise numune β-glukuronidaz veya sülfataz enzimleri ile hidroklorik asitle birkaç saat ısıtılarak inkübe edilir.

Rook ve ark., yaptığı çalışmada eroin, metadon ve bu iki maddenin metabolitleri ve eşzamanlı kokain, asetil kodein ve metabolitleri tespitinde SPE-LC-MS/MS metodu kullanmıştır. Rook ve ark., yaptığı çalışmada kan örneklemesi için plazma esteraz aktivitesini inhibe etmek ve böylece eroin miktarını dengelemek amacıyla sodyum florür içeren tüpler kullanmıştır. Plazma örnekleri buzlu suda saklanmış, SPE'den önce eroinin stabilitesinin korunması amacıyla çözüldükten hemen sonra asidifiye edilmiştir. Eroinin plazmada düşük sıcaklıklar (0-4 ^{o}C) ve pH değerlerinde (3,5-5,2) stabil olduğu gözlenmiştir. Ayrıca analitlerin asidik şartlarda protonlanmasının SPE performansı için oldukça önemli

olduğu belirtilmiştir. Polar mobil fazdan apolar mobil faza geçilerek analiz süresi 15 dakikaya düşürülmüştür (109).

2.6.2.2. İdrarda opiyat analizi

LC-MS/MS, sabit faz ve mobil fazların seçimine dayanan polar ve apolar bileşiklerin ölçümünde esneklik sağlamaktadır. Dolayısıyla idrardaki opioid metabolitlerinin kantitasyonunda LC-MS/MS yöntemi etkilidir, çünkü opiyatlar yaygın olarak polar bileşikler olarak atılmaktadır (19).

Opiyat analizinde ters faz kromatografisi (RPC) ve HILIC kullanılmaktadır. RPC yöntemi yaygın kullanılmasına rağmen HILIC yöntemi pek yaygın kullanılmamaktadır. RPC yönteminde morfin gibi polar bileşikler daha geç elüe edilirken HILIC yönteminde daha çabuk elüe edilir. HILIC yöntemi analiz süresinin uzun olması nedeniyle dezavantajlıdır. Literatürde, iyonizasyon yöntemi olarak APCI yerine ESI tercih edilmiştir (19).

French ve ark.nın yaptığı çalışmada idrarda opiyatlar ve metabolitleri SPE–LC-MS/MS ve SPE-GC-MS ile kaşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. 20 örnek için 4 saat olan örnek hazırlama süresi LC-MS/MS metodu ile 80 dakikaya indirilmiştir. 1 ml idrar kullanılarak (LOQ'lar, 0.31-2.5 ng/ml) hem ana madde hem de glukuronid metabolitlerinin dahil olduğu toplam çalışma süresi 17 dakika olarak belirtilmiştir (110). Jager ve ark., aynı numune hacminde çevrimiçi SPE prosedürü ile 14 dakikalık analitik çalışma süresi ile morfin, kodein ve glukuronid metabolitlerinin analizini gerçekleştirmişlerdir (25 ng/ml'lik bir LOQ) (23).

Coles ve ark., idrarda sadece ana maddenin (özellikle kodein, morfin, hidrokodon, hidromorfon, oksikodon ve 6-asetilmorfin) ölçüldüğü ve cutoff değerinin 5 ng/ml olduğu LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Coles ve ark cutoff değerinin 5 ng/ml'ye kadar inmesi durumunda metabolitlerinin ölçümüne gerek kalmadan opioid analizinin yapılabileceğini belirtseler de yalancı negatiflerin rapor edilmediğinden emin olmak için glukuronid bileşiklerinin tespit edilmesi gerektiği belirtilmiştir (110).

2.6.3. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda kokain analizi

2.6.3.1. Plazmada kokain analizi

COC ve metabolitlerinin plazmada kantitasyonu için çok sayıda yöntem bulunmakta olup LC-MS/MS yöntemleri GC-MS'e göre daha çok tercih edilmektedir. Kokain ve metabolitlerinin çoğu alkali koşullarda ve yüksek ısılarda hidrolize dayanıklı değildir. Ayrıca plazma ve karaciğer esterazları ile in vitro hidroliz gerçekleşebilmektedir. Stabilite problemi dışında kokain ve kokaetilen pH 8-9'da n-butil klorid ile kolayca ekstrakte olabilir (12).

Popa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada COC ve BZE SSE ve SPE-LC-MS/MS ile analiz edilmiştir (LOQ:20 ng/mL). COC ve BZE hidrofilik ve bazik yapıda olup özellikle BZE'nin polartesi daha fazladır. Dolayısıyla SSE ile yapılan ekstraksiyonun yeterince efektif olmadığı belirtilmiştir (111).

Napoletano ve ark.nın çalışmasında mikro SPE-LC-MS/MS yöntemi ile plazma ve idrarda COC, BZE, ekstraksiyonunda basit dilüsyon yöntemi kullanılsa da matriks etkisi minimize edilmiştir (maksimum %9). Ayrıca dilüsyon nedeniyle sensitivitenin azalması beklense de referans alınan SAMHSA cut-off limitlerinin çalışmada kullanılan cutoff limitlerinin çok üstünde olması nedeniyle problem oluşturmamıştır (plazma ve idrar için tüm analitlerin LOQ değeri:0,06-6,6 ng/mL arasında değişmektedir)(112).

2.6.3.2. İdrarda kokain analizi

Kokainin uygulama yoluna bakılmaksızın alınan dozun %64-69'unun 3 gün içinde idrarda detekte edilebildiği belirtilmiştir. Kronik COC kullanımında yüksek miktarda COC idrara değişmeden çıkabilir. COC kullanımından 2-4 gün sonra 0,3 mg/L tespit limiti kullanıldığında idrarda BZE saptandığı ancak idrar pH'sı, doz, kreatinin klirensi ve kulanım sıklığı sonuçları etkilediği bildirilmiştir (113).

Literatürde oral sıvı, idrar ve plazmadaki COC, BZE ve ana piroliz ürünleri olan anhidroekgonin metil ester (AEME) ve anhidroekgonin'i (AEC) gaz kromatografisi ile analiz eden birçok yöntem vardır. Kokain GC-MS ile analiz edildiğinde enjektör kısmının sıcaklığının >210 ^{o}C'yi aşması nedeniyle kokainin degrade olduğu rapor edilmiş olup bu

durum LC-MS/MS sisteminde gözlenmemektedir. Kullanılan yöntemlerin çoğunluğu SPE metoduna dayalıdır.

Robandt ve ark. tarafından BZE ve enzimatik metabolitlerinin *m*-OH BZE, *p*-OH BZE ve nor-BZE analizlerinde insan idrarında yeni geliştirilen otomatik SPE-LC-MS/MS yöntemi valide edilmiş ve GC–MS BZE yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Bu yöntem GC-MS yöntemi ile kıyaslandığında yöntemin analiz ve örnek hazırlama süresi süresinin kısa olması ve sensitivitesinin yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır (114).

Fiorentin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oral sıvı, idrar ve plazmada COC, BZE, CE ve AEME'nin analizinde tek aşamalı, HILIC kolonunun kullanıldığı ve ekstraksiyon aşaması içermeyen LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Ancak SPE yönteminde gereken örnek hacmi ve analiz süresinin artması nedeniyle tek aşamalı HILIC LC-MS yöntemine göre dezavantajlı olduğu vurgulanmıştır (115).

2.6.4. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda amfetamin analizi

2.6.4.1. Plazmada amfetamin analizi

Amfetaminlerin analizinde GC-MS altın standarttır ancak, birçok avantajı nedeniyle LC-MS doğrulama metodu olarak daha fazla tercih edilmektedir. Plazmada amfetaminler 24-48 saate kadar tespit edilmekte olup taramada pozitif çıkan amfetamin analizinin doğrulanması oldukça önemlidir. Bazı reçeteli ilaçların vücutta amfetamin ve/veya metamfetamine metabolize olması nedeniyle pozitif bir amfetamin sonucu her zaman yasadışı amfetamin kullanımını göstermemektedir. Dolayısıyla amfetamin bağımlılığının ve yalancı pozitif sonuçların ayırt edilmesi için amfetaminlerin analizden önce enantiyomerik olarak ayrılması gerekmektedir.

Amfetaminlerin enantiyomerik ayrımında kullanılan teknikler kiral sabit fazlar (CSP), kiral türevlendirme reaktifleri (CDR) ve mobil fazdaki kiral seçimidir (CDS). Kiral sabit fazlar LC-MS veya GC-MS teknikleriyle kullanılabilmektedir. LC-MS metodu ile kiral sabit fazlardaki AMP enantiyomerleri kiral kolonlar kullanılarak ya da UV veya floresans detektör ile kiral türevlendirme sonrasında ters faz kolonlar ile ayrılmaktadır (27). Literatürde amfetaminlerin enantiyomerik ayrımını değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak ülkemizde amfetaminlerin enantiyomerik ayrımı yapılmamaktadır.

2.6.4.2. İdrarda amfetamin analizi

AMP ve MA idrarda yaklaşık olarak 24 saat boyunca tespit edilebilirken kronik kullanıcılarda bu süre 2-4 güne uzayabilmektedir. Ancak, idrarın pH'sı maddenin eliminasyon süresini değiştirmektedir. Asidik idrarın maddenin atılım hızını arttırması nedeniyle kullanıcıların sirke veya vişne suyu içtikleri bildirilmiştir (47).

Hädener ve ark., idrarda D ve L-AMP'nin ayrılması ve miktar tayini için kiral durgun fazın kullanıldığı basit ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde kolon değiştirici HPLC sistemi ile akiral ters faz trapping kolon ve MS-MS ile kombine kiral analitik kolon kullanılarak çevrimiçi (online) numune saflaştırma tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde aynı analitik kolon içinde yer alan birkaç örneğin eşzamanlı analizi sağlanmaktadır (28). Enantiyoselektif AMP analizi için yaygın olarak kullanılan çevrimdışı SPE ve LLE prosedürleri ile karşılaştırıldığında online örnek saflaştırmanın, zaman ve maliyet etkin olması ve numune kontaminasyonuna, kullanıcı hatasına ve yeniden üretilebilirlik gibi problemlere daha az eğilimli olması gibi avantajları bulunmaktadır.

2.6.5. LC-MS/MS ile plazma ve idrarda benzodiazepin analizi

2.6.5.1. Plazmada benzodiazepin analizi

Benzodiazepinler metabolize edilirken polaritelerinin ve suda çözünürlüklerinin arttırılması için glukuronid ile konjuge edilmektedir. Benzodiazepin analizinde glukuronid bağlarının hidrolizinde asit hidroliz veya *abalone, Patella vulgata* ve *Helix pomatia* gibi bazı glukuronidaz yöntemleriyle enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. GC-MS ile benzodiazepinlerin glukuronid bağının ayrılması için zaman alıcı numune hazırlığı gerekmesi ve enjeksiyon prosedüründe bazı benzodiazepinlerin tam veya kısmi termal bozunumu nedeniyle LC-MS/MS avantajlıdır.

Kang ve ark., çok sayıda benzodiazepinin LC-MS/MS ile analizinde üç protein çökeltme plakasını ve 4 farklı *β*-glukuronidaz enzimini hidroliz verimleri açısından kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Rekombinant IMCSzyme *β*-glukuronidaz enzimi, *abalone, Patella vulgata ve Helix pomatia β*-glukuronidazdan daha yüksek hidroliz etkinliği göstermiştir (LOQ:5 ng/ml) (116).

Fernandez ve arkadaşları tarafından insan plazmasında alprazolam, bromazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam ve tetrazepam eşzamanlı tayini için basit ve hızlı bir SPE- HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir. SPE yöntemi ile elde edilen sonuçların SSE yöntemi ile elde edilenden daha iyi olduğu belirlenmiştir (117).

2.6.5.2. İdrarda benzodiazepin analizi

Benzodiazepin doğrulanmasında GC-MS ve LC-MS/MS yöntemleri kullanılır. GC-MS yönteminde konjuge metabolitlerin hidrolizi esnasında benzofenon yapısı oluşur ve alprazolam gibi spesifik benzodiazepinlerin tespit edilememesi nedeniyle GC-MS yöntemi dezavantajlıdır.

LC-MS/MS yönteminin benzodiazepin analizinde GC-MS yöntemine göre çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Ancak LC-MS/MS yönteminde bazı ilaçların aynı bileşiklere metabolize olmaları nedeniyle tespiti zordur. Ayrıca LC-MS/MS yönteminde matriks etkisi problemi bulunmakta olup döteryumlanmış internal standart kullanımıyla bu problemin önüne geçilebilmektedir.

Perez ve ark., idrarda alfa-hidroksialprazolam, oksazepam, lorazepam, nordiazepam ve temazepamın analizinde β-glukuronidaz hidroliz aşamasını içeren SPE-LC-MS/MS ve SPE-GC-MS yöntemlerini geliştirmiş ve karşılaştırmıştır. LC-MS/MS yönteminin hızlı olması örnek hazırlığı aşamasının daha kısa olması gibi avantajlarının yanında döteryumlanmış internal standart kulanılmasına rağmen nordiazepam bileşiğinin flurazepam metabolit 2-hidroksietilflurazepam tarafından baskılanmasından dolayı nordiazepam konsantrasyonunda %39 artış olmuştur. Ancak LC-MS/MS bu dezavantajına ağmen diğer analitler için GC-MS'e göre üstündür (118).

Benzodiazepinler iyonizasyon modu açısından idrarda hem ESI hem de APCI kullanılarak analiz edilmektedir. APCI yöntemi matriks etkisine daha az duyarlı ancak yöntemin sensitivitesi daha düşüktür. Sinyal/gürültü açısından ESI'ye göre APCI daha avantajlıdır.

2.7. Yöntem Değerlendirme ve Validasyonu

Klinik ve araştırma laboratuvarlarında, teknolojik imkanlara göre zamanla farklı ölçüm yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemlerin rutin kullanıma dahil edilmeden önce dikkatlice değerlendirilmesi gerekir.

Değerlendirme aşamasında 5 temel nokta önemlidir (1):

- ❖ Tüm işlemlerde klinik perspektifin uygulanması
- ❖ Analitik hedeflerin belirlenmesi
- ❖ Gerekli verilerin toplanarak, doğru deneylerin tasarlanıp yapılması
- ❖ Uygun istatistikler kullanılarak hataların doğru hesaplanması
- ❖ Yöntem konusunda tarafsız kararların verilmesi

Bunlarla birlikte maliyet, örnek miktarı ve tipi, sonuç verme süresi, personel becerisi, reaktif saklama şartları ve stabilitesi, atık yönetimi ve teknik destek gibi pratik gereklilikler de gözden geçirildikten sonra analitik performans değerlendirilir. Bu noktada metot validasyonu kavramı ortaya çıkmaktadır.

Uluslararası Standartlar Teşkilatına (ISO: International Organization for Standardization) göre validasyon; tasarlanmış belirli bir kullanım veya uygulamanın; gereksinimleri tam olarak karşıladığının, nesnel kanıtlar doğrultusunda onaylanmasıdır (119). Metot validasyonu ise yöntemin beklendiği şekilde çalıştığını ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya sürecidir.

Klinik laboratuvarlarda metot validasyonu için kullanılan analitik performans parametreleri kesinlik (tekrarlanabilirlik), gerçeklik, doğruluk, analitik ölçüm aralığı, geri kazanım, duyarlılık, özgüllük, saptama sınırı, interferans etkisi gibi parametreleri kapsamaktadır.

Gerçeklik ölçülen değerin asıl değer ile farkını tanımlar ve kantitatif ifadesi biastır. Gerçeklik; referans materyal analizi, geri kazanım, interferans veya metot karşılaştırma işlemleriyle değerlendirilir. Kesinlik, aynı metotla aynı örnekte yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını tanımlar ve kantitatif ifadesi standart sapma (SD) veya varyasyon katsayısıdır (CV).

Bu parametreler açısından yöntemin değerlendirilmesi için bazı kılavuzlar kullanılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan kılavuzlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından hazırlanmış olan dokümanlardır. Buradaki validasyon çalışmasında da, genel olarak bu kılavuzlardaki çalışma tasarımları izlenmiştir.

- ❖ CLSI EP10-A3 Kantitatif klinik laboratuvar ölçüm prosedürlerinin ön değerlendirmesi (120).
- ❖ Doğruluk: CLSI EP15-A2 Gerçeklik ve kesinlik performansının kullanıcı onayı (121).
- ❖ Kesinlik: CLSI EP05-A2 Kantitatif ölçüm metotlarının kesinlik performansının değerlendirilmesi (122).
- ❖ Doğrusallık: CLSI EP06-A Kantitatif ölçüm prosedürlerinin doğrusallığının değerlendirilmesi (154).
- ❖ Metot karşılaştırma: CLSI EP09-A2 Hasta örneklerini kullanarak metot karşılaştırma ve bias hesaplama (123).
- ❖ Tespit limiti (Limit of Detection; LOD) ve Tayin Limiti (Limit of Quantitation; LOQ): CLSI EP17-A Tespit limiti ve tayin limitinin belirlenmesi için protokoller (124).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler

3.1.1. İmmünokromatografik kart test

- Tükürükte uyuşturucu madde test kiti (Amfetamin, Benzodiazepin, Kokain, MDMA/Metamfetamin, Opiyat, Kannabis) (UTC Armas Elektronik)
- Tükürük toplama için swap

3.1.2. LC-MS/MS ticari kit

Kimyasal maddeler

Ticari kit; Eureka Lab Divison İdrarda LC-MS ile madde kötüye kullanımı konfirmasyon kiti, Chiaravalle, İtalya)

Sarf malzemeler

- Vidalı cam tüp
- Eppendorf
- Vial, vial kapağı
- Pipet ucu
- İdrar tüpü
- Reaktif şişesi

3.1.3. LC-MS/MS laboratuvarda geliştirilen metot (LGM)

Kimyasal maddeler

- Metanol (Sigma Aldrich)
- Asetonitril (Sigma Aldrich)
- Reaktif 1
- Reaktif 2
- Sentetik kannabinoidler standardı (1 ppm)
- Amfetamin standardı (10 ppm)

- Benzodiazepin standardı (10 ppm)
- Opiyat standardı (10 ppm)
- Kannabinoid standardı (5 ppm)
- Kokain standardı (10 ppm)
- Diğer standartlar (Pregabalin, Gabapentin, Ketamin katinon, 4-metil katinon, Psödoefedrin, Efedrin, Piperazin, Klorfenilpiperazin, Fensiklidin, Alfa-PVP, Liserjid) 0,2-10 ppm)
- İnternal standart karışımı (amfetamin D11, metamfetamin D5, katinon D5, pregabalin D4, efedrin D3, gabapentin D4, MDA D5, MDEA D5, fensiklidin D5, EDDP D3, hidromorfon D3, oksazepam D5, morfin D6, BZE D3, hidrokodon D3, oksimorfon D3, kodein D6, kokain D3, metadon D3, delta 9 THC D3, oksikodon D3, liserjid D3, 6-MAM D3, fentanil D5, heroin D3, buprenorfin D4, THC-COOH D9).

Sarf malzemeler

- Lityum heparinli tüp
- Vidalı cam tüp
- Eppendorf
- Vial, vial kapağı
- Pipet ucu
- İdrar tüpü
- Reaktif şişesi

3.2. Kullanılan cihazlar

- Santrifüj (Nüve/NF 800-R,Thermo Scientific Mikro CL 21R, Hettich Rotina 380 R)
- -80 ^{0}C derin dondurucu (Sanyo/MDF-U5386S)
- Vortex (Scilogex MX-S)
- Otomatik pipet (Socorex (İsviçre), Nichipet (Japonya)
- Distile su cihazı (Elga/Purelab Optionq-DV25)
- Isı bloğu (Techne Dri-Block DB-2D)
- Uyuşturucu test kiti cihazı (UTC Armas Elektronik)
- Otomatik analizör (Roche-Cobas 6000)

- Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) Sistem (ABSCIEX Triple Quad™ 3500 Instrument) (Şekil 11)
- Kolon (Restek Allure PFPP, 5µ, 50 mm x 2.1 mm ve Thermo Scientific Hypersil gold 100 mm x 2,1mm x 3 µm
- Yazılım (Analyst 1.6.2. ve Multi Quant 3.0.2)
- Hassas Terazi (Schimadzu ATX 224)
- Buzdolabı (Finlux)
- Su banyosu (Grant SUB Aqua Dual Plus)
- Ultra saf su cihazı (Thermo Scientific Barnstead Easy pure II)
- Etüv (Nüve EN 120)



Şekil 11. Çalışmamızda kullanılan ABSCIEX Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS sistemi

3.3. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri

Bu çalışma Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireyler Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi AMATEM Kliniği'ne başvuran kişiler arasından seçilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm bireyler idrar numunelerini madde analizi için vermiştir. İdrar bütünlük testi uygun görülen bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllülere çalışmayı anlatan bilgilendirilmiş gönüllü onam formu verilip okutulmuş ve imzalı onayları alınmıştır.

Gönüllülere “Uyuşturucu Madde Analizinde Tükürük, İdrar, Kan Örneklerinde Kullanılan Tarama ve Doğrulama Yöntemlerinin Laboratuvar ve Klinik Bakış Açısından Değerlendirilmesi” anketi uygulanmıştır. Gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri; (1) 18-65 yaş aralığında olmak, (2) DSM-5 kriterlerine göre madde kullanım bozukluğu tanısı almış olmak, (3) Okur-yazar olmak; dışlanma kriterleri ise yasaklı madde dışında tek başına sigara veya alkol kullanım bozukluğu tanısı almış olmak, örnek toplama kriterlerine uymamak (idrar numunesinin bütünlüğünün bozulması, tükürük testinden önce bir şey yiyip içmek, tükürük vizkozitesi fazla olan, yetersiz tükürük örneği). Gönüllülerden onam alınıp anketleri doldurulduktan sonra “Tükürükte uyuşturucu madde test kiti” ile gönüllülere tükürük testi uygulanmıştır. Tükürük testi tamamlanan her bir gönüllüden 1 adet lityum heparinli tüpe kan alınmıştır. Alınan kanlar AMATEM Biyokimya Laboratuvarı’nda 1500 g’de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ayrılan plazmalar farklı çalışma prosedürleri için (LC-MS/MS ticari ve laboratuvarda geliştirilen metotlar için) porsiyonlanarak 2 ayrı ependorf tüpe doldurulmuştur. Gönüllülerin idrar örnekleri 2 porsiyona ayrılarak porsiyonlanmış plazma örnekleri ile birlikte -80 ^{o}C derin dondurucuda çalışmanın yapılacağı güne kadar muhafaza edilmiştir.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Tükürükte yapılan ölçümler

Trafik kontrollerinde tükürükte uyuşturucu madde analizi yapmak üzere İçişleri Bakanlığı tarafından alımı yapılan ARMAS UTC Uyuşturucu Test Cihazı ile kannabinoid, opiyat, amfetamin, metamfetamin, MDMA, kokain, benzodiazepinlerin ölçümü sağlanmıştır. Bu çalışmada uyuşturucu madde test cihazında kötüye kullanılan maddelerin cut-off limitleri trafikte dikkat ve biliş eksikliğine yol açan maddelerin varlığının belirlenmesi amacıyla seçilmiş olup bu yöntemin tanısal duyarlılık testleri test yönteminin cut-off limitlerine göre değerlendirilmiştir.

Uyuşturucu Test Cihazının ölçüm prensibi lateral akışa dayanan yarışmalı immünokromatografik testtir. Bu yöntemde gözlem penceresinde kontrol çizgilerinde çizgi görülmek şartıyla, madde çizgi oluşum bölgelerinde çizgi görülürse sonuç negatif; çizgi görülmezse sonuç pozitif olarak değerlendirilir.

İmmünokromatografik kart testin örnek uygulama pedi çalışmaya dahil edilen gönüllülerin ağzına yerleştirilerek madde analizi gerçekleştirilmiştir. Yeterli miktarda tükürük örnek pedini doldurduktan sonra reaksiyon başlamış ve renk oluşumu takip edilmiştir. Kontrol pedinde renkli çizgi oluşumu tamamlandıktan sonra test kiti gönüllünün ağzından çıkarılmıştır. 8 dakika boyunca reaksiyonun tamamlanması beklenmiş ve ölçüm alınmıştır. Sonuçlar görsel olarak da değerlendirilebilmekte veya analiz için tükürük test cihazına yerleştirilerek elde edilebilmekte olup bu çalışmada cihaza yerleştirilerek sonuç alınmıştır.

Tükürükleri viskoz olan, yetersiz tükürük salgısı olan ve bu nedenle kontrol pedinde çizgi oluşumu tamamlanmayan, fazla ve viskoz tükürük nedeniyle örnek pedinin tükürük hacmini aşan, test kitinin yarısında parametrelerin çalışılmasına yetecek kadar tükürük olan ancak diğer kısmına yetmeyen örnekler çalışmadan dışlanmıştır. Tükürükleri viskoz olan bazı gönüllülerin tükürük örnekleri swap yardımı ile alınmıştır. Swap ile örnek alınırken gönüllüden swabı ağzında yeterli tükürük elde edildiğini gösteren indikatör renk değiştirene kadar dolaştırması istenmiştir. Yeterli miktarda tükürük toplanması sonrasında tükürük örnekleri test kitinin örnek uygulama noktasına damlatılarak reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Ayrıca hastaların analizden 30 dakika önce bir şey yiyip içmediği sorgulanmış uygun olmayan hastalar reddedilmiştir. İmmünokromatografik kart testte madde analizi için kontrol materyalinde kullanılan madde metaboliti ve testin cut-off limitleri Tablo'da gösterilmektedir.

Tablo 13. İmmünokromatografik testinde kullanılan parametreler ve cut-off limitleri

Kötüye kullanılan madde	**Kontrol materyalinde kullanılan madde metaboliti**	**Cut-off limiti (ng/mL)**
AMP	D-amfetamin	50
MDMA/MA	D-metamfetamin	50
Opiyatlar	Morfin	40
COC	BZE	30
THC	Δ^9-tetrahidrokannabinol (THC)	25
Benzodiazepinler	Oksazepam	20



Şekil 12. ARMAS UTC Uyuşturucu Test kiti cihazı ve kokain pozitif örnek

Tükürük test kitinin doğrulanması plazmada LC-MS/MS analizi sağlanmış olup değerlendirmede tükürük POCT testinin cut-off limitleri temel alınmıştır. Her madde grubu için doğrulamada LC-MS/MS yönteminde o madde grubuna ait ana madde ve metabolitlerin seviyeleri kullanılmıştır.

Tükürük test kitinin tanısal duyarlılık testleri değerlendirilmiştir. Gerçek pozitif (GP), gerçek negatif (GN), yalancı pozitif (YP), yalancı negatif (YN), sensitivite, sepesifite, doğruluk, prevalans, pozitif prediktif değer (PPV) ve negatif prediktif değerler (NPV) belirlenmiştir.

3.4.2. İdrarda yapılan ölçümler

3.4.2.1. İmmünoassay

İmmünoassay analizi AMATEM Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Roche-Cobas 6000 cihazının analizlerden önce iç kalite kontrol çalışması yapılmış ve kontroller uygun bulunduktan sonra analizler başlamıştır. Madde kullanımı bozukluğu olan hastalar idrar numunelerini verdikten sonra numunelerde AMATEM hekimleri tarafından istenen parametreler analiz edilmiştir.

Roche cihazının çalışma prensibi KIMS yöntemine dayanır. İdrarda madde bulunmaması durumunda, çözünebilir ilaç konjugatları antikora bağlı mikropartiküllere bağlanarak partikül agregatlarının oluşumuna neden olur. Madde bulunmadığında agregasyon reaksiyonu devam ettikçe absorbans da artar. İdrarda kötüye kullanılan madde bulunması durumunda, bu ilaç mikropartiküle bağlı antikor için ilaç türevi konjugatla yarışır. Maddeye bağlı antikor artık partikül agregasyonunu artıramaz ve sonraki partikül örgüsü oluşumu engellenir. Maddenin varlığı, numunedeki ilacın konsantrasyonuyla orantılı olarak yükselen absorbansı azaltır. Maddenin içeriği, maddenin bilinen bir eşik konsantrasyonu için elde edilen değerine göre belirlenir. Maddelerin kalibre edildiği parametreler ve cut-off limitleri Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14. Maddelerin kalibre edildiği parametreler ve cut-off değerleri

Analit	Kalibre edildiği parametre	cut-off değeri (ng/mL)
Kannabinoidler	THC-COOH	50
Opiyatlar	Morfin	300
Kokain	BZE	300
Amfetaminler	D-metamfetamin	1000
Benzodiazepinler	Nordiazepam	200

3.4.2.2. LC-MS/MS

LC-MS/MS metoduyla idrar ve plazmada madde analizleri; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında, ABSCIEX Triple Quad™ 3500 Instrument sistemi ve EqC laboratuvarında Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max sistemi elektrosprey iyonizasyonu (ESI) pozitif ve negatif iyon modu ve multiple reaksiyon izleme (MRM) seçici iyon izlemesi (SIM) kullanılarak yapılmıştır. Numuneler -80 ^{0}C derin dondurucudan çıkarılmış oda sıcaklığına gelmesi sağlandıktan sonra analizden önce vortekslenmiştir. Plazma ve idrar örnek hazırlama aşamasında sıvı SSE metodu uygulanmıştır. Numuneler Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında analiz edildikten sonra İzmir EqC laboratuvarına -20 ^{0}C koşullarında transfer edilerek bu laboratuvardaki TSQ Quantum Access Max sistemi ile de analiz edilmiştir. İdrar için ticari ve LGM yöntemleri ve idrar ve plazma için ABI SCIEX ve TSQ Quantum Access Max cihazları karşılaştırılmıştır.

a. LC-MS/MS Ticari kit (Eureka Lab Divison, Chiaravalle, İtalya)

İdrarda madde analizinde kullanılan LC-MS kiti ile morfin, normorfin, dihidrokodein, kodein, 6-MAM, MDA, MDMA, metadon, EDDP, AMP, MA, norbuprenorfin, buprenorfin, MBDB, THC-COOH, psödoefedrin, norpsödoefedrin, klonazepam, diazepam, lorazepam, buprenorfin, oksazepam, bromazepam, nalokson, naltrekson, flurazepam, midazolam, nordiazepam, triazolam, ketamin, oksikodon, norkodein, normorfin, delta 9-THC, klobazam) analizi yapılmıştır. LC-MS ticari test kiti ile madde analizinde kullanılan cut-off limitleri Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. LC-MS ticari test kiti ile madde analizinde kullanılan cut-off limitleri

Parametre	**Tarama cut-off**	**Doğrulama tespit limit (ng/mL)**
Kannabinoidler	50	15
Opiyatlar	300	
Morfin		100
Kodein		100
6-MAM		10
Kokain	300	
Kokain		100
BZE		100
Amfetaminler	500	
Amfetamin		200
Metamfetamin		200
3,4-MDMA	500	
MDMA		200
MDA		200
MDEA		200
MBDB		200

- ***Kalibratör, Kontrol ve Örneklerin Hazırlanması***

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda kalibratör, kontrol ve örnekler hazırlanmıştır. 5 mL ultra saf su kullanılarak tüm kalibratörler (THC hariç 10 mL ile çözüldü) çözüldü. Kontroller 5-10 mL ultra saf su kullanılarak çözüldü.

Tüm kalibratör, kontrol ve serum örnekleri LC-MS/MS analizi öncesinde SSE ön işleminden geçirildi. THC-COOH, opiyatlar, buprenorfin ve norbuprenorfin haricindeki parametrelerin analizinde; internal standart solüsyonu 1 (Reaktif E) ultra saf su ile 1:10 dilüe edildikten sonra kullanılmıştır. Opiyatlar, buprenorfin ve norbuprenorfin analizinde ilk aşamada enzim çözülerek hazır hale getirilmesi için Reaktif B (hidroliz enzimi) ve Reaktif C (hidroliz için tampon çözeltisi) karıştırılmıştır. İnternal standart solüsyonu 2 (Reaktif F)

su ile 1:10 dilüe edildikten sonra kullanılmıştır. THC-COOH analizinde İnternal standart solüsyonu 3 (Reaktif G) su ile 1:10 dilüe edildikten sonra kullanılmıştır. Örneklerden (kalibratör, kontrol veya hasta idrarı) 500 µL, 50 µL Reaktif A (THC için hidroliz çözeltisi), 100 µL Reaktif B (Opiyat için hidroliz enzimi) ve 50 µL atropin internal standart eklendikten sonra 1 saat boyunca 60 ^{0}C'lik su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Örneklerden 100 µL alınıp 100 µL reaktif D eklendi. Bu karışım vorteklenip viallere doldurulup LC-MS/MS sistemine yüklendi.

b. LC-MS/MS LGM

- ***İnternal Standart (IS) çözeltileri***

Stok sentetik kannabinoid IS (1 µg/mL) çözeltisi: 1µg/mL'lik THC-d3 çözeltisinden 5 µL alınıp metanol ile 5 mL'ye tamamlanmıştır.

Ara stok sentetik kannabinoid IS (5 ng/mL) çözeltisi: Stok internal standart çözeltisinden 5 µL alınıp negatif idrar ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

Stok amfetamin IS çözeltisi 5 µg/mL, stok benzodiazepin IS 5 µg/mL çözeltisi, stok opiyat IS çözeltisi 5 µg/mL, stok kannabinoid IS çözeltisi 5 µg/mL, stok kokain IS çözeltisi 5 µg/mL, diğer IS çözeltileri (Liserjid 1 µg/mL, diğerleri fensiklidin, kotinin, nikotin, pregabalin, katinon, efedrin 5 µg/mL) sentetik kannabinoid ile aynı prosedürde hazırlanmıştır.

Ara stok amfetamin IS çözeltisi 25 µg/mL, ara stok benzodiazepin IS 5 µg/mL çözeltisi, ara stok opiyat IS çözeltisi 25 µg/mL, ara stok kannabinoid IS çözeltisi 25 µg/mL, ara stok kokain IS çözeltisi 25 µg/mL, diğer IS çözeltileri (Liserjid, fensiklidin, kotinin, pregabalin, katinon, efedrin; 5-25 µg/mL) sentetik kannabinoid ile aynı prosedürde hazırlanmıştır.

Tablo 16. Plazma ve idrar kalibratörlerinin hazırlanmasında kullanılan veriler

Miks	Sk Miks (µl) 1000 ng/mL		Amp Miks (µl) 10 ng/mL		Bzd Miks (µl) 10 ng/mL		Opi Miks (µl) 10 ng/mL		Cbd Miks (µl) 5 ng/mL		Coc Miks (µl) 10 ng/mL		Diger Miks (µl) 0,2-2-10 ng/mL		Is Miks (µl)	Idrar-Plazma (µl)
1	15	30 ppb	25	500 ppb	25	500 ppb	10	200 ppb	10	100 ppb	25	500 ppb	50	1000-200-20 ppb	35	305
2	10	20 ppb	12,5	250 ppb	12,5	250 ppb	7,5	150 ppb	7,5	75 ppb	12,5	250 ppb	25	500-100-10 ppb	35	377,5
3	5	10 ppb	5	100 ppb	5	100 ppb	5	100 ppb	5	50 ppb	5	100 ppb	12,5	250-50-5 ppb	35	422,5
4	2,5	5 ppb	2,5	50 ppb	2,5	5 0 ppb	2,5	50 ppb	2,5	25 ppb	2,5	50 ppb	5	100-20-2 ppb	35	445
5	1,25	2,5 ppb	1,25	25 ppb	1,25	25 ppb	1,25	25 ppb	1,25	12,5 ppb	1,25	25 ppb	2,5	50-10 1 ppb	35	455,25

- ***Örneklerin hazırlanması***

Plazma için; İnternal standart eklenmiş (35 µl) 400 µl plazma üzerine 500 µl reaktif 1 (tuz çözeltisi) eklendi proteinler çöktürüldükten sonra 10 sn vortekslendi. Sonra 400 µl organik faza (metanole) alındı. Numuneler 20 sn vortekslendikten sonra 14000 rpm'de 25 °C'de 10 dakika santifüjlendi ve üst faz cihaza verildi.

İdrar için; IS eklenmiş (35 µl) 500 µl idrar üzerine hidroliz amacıyla 30 µl NaOH eklendi. 65 ^{0}C'de 45 dakika inkübe edildikten sonra nötralize etmek amacıyla 30 µl reaktif 2 eklendi ve numune drug extraction tube (EqC marka) alındı. 5 dk boyunca çalkalanıp 4600 rpm de 5 dk santrifüjlenip üst faz cihaza verildi.

a **b** **c**



Şekil 13. Plazma santrifüj sonrasında (a), idrar tüp ile ekstraksiyon aşaması (b), idrar örneği santrifüjden sonra (c) gösterilmektedir.

- ***LC-MS/MS LGM için Mobil Fazlar***

Mobil faz A: ultra saf su % 0,1 formik asit, mobil faz B: asetonitril % 0,1 formik asitten oluşmaktadır.

- ***LC-MS/MS Sistemi Çalışma Koşulları (LGM) (ABI SCIEX)***

LC-MS/MS LGM yöntemi ABIS-SCIEX cihazında uygulanan çalışma koşulları Tablo 17, 18 ve 19'da verilmiştir.

Tablo 17. Gradyan faz akış özellikleri

Zaman (dk)	Akış (mL/dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	B eğrisi
0	0,35	97	3	5
1	0,35	97	3	5
2	0,35	70	30	5
5	0,35	70	30	5
6	0,35	5	95	5
13	0,35	5	95	5
13,1	0,35	97	3	5

Tablo 18. MS sistemi özellikleri

Hedef iyon tarama zamanı	75 sn
Parçalama gazı (Collision gas)	9
İyon kaynağı	ESI
İyon Kaynağı Gaz I (GS1)	16
İyon Kaynağı Gaz II (GS2)	0
İyon Kaynağı Sıcaklığı (TEM)	0 °C
İyon Sprey Voltajı (IS)	4500 Volt
Perdeleme Gazı	Azot
Perdeleme Gazı (CUR)	10
Siklus zamanı (cycle time)	1400 saniye
Tarama Modu	Seçilmiş iyon izleme (SIM)
SIM + tarama zamanı	0,8
SIM – tarama zamanı	0,6
Analiz süresi	15 dakika

Tablo 19. Analiz edilen maddeler metabolitleri ve IS için infüzyon sonrası belirlenmiş moleküler iyon (Q1), prekürsör iyon (Q3), DP (kümeleşme önleyici potansiyel), EP (giriş potansiyeli), CE (parçalanma enerjisi), CXP (parçalanma hücresi çıkış potansiyeli) ve retansiyon zamanı (Rt) değerleri

Q1	Q3	Rt (dakika)	Analit ve IS'ler	DP	EP	CP	CXP
136	91	3,84	Amfetamin	41	10	20	6
	119					13	8
147	130,4	3,79	Amfetamin D11	41	10	20	8
	91					20	4
149,9	119	3,9	Metamfetamin	46	10	13	8
	117					20	6
150	132	3,55	Katinon	41	10	20	6
	107					20	6
155	121,4	3,89	Metamfetamin D5	46	10	20	8
	137					25	6
160	124	3,78	Pregabalin	41	10	20	6
	142					20	6
164	146	3,75	Pregabalin D4	41	10	20	6
	107					20	8
166	135	3,41	4 OH-N-Metil Amfetamin	46	10	20	8
	148,1					20	4
166,1	133	3,66	Psödoefedrin	40	10	20	4
	151,5					25	4
	163,1					20	10
179,9	135	3,84	MDA	61	10	20	12
	168,2					20	10
193,9	163	3,89	MDMA	81	10	20	6
	134,9					20	6
197	118	4,58	1.4 Klorofenilpiperazin	41	10	35	6
	154					35	6
208,1	135	3,98	MDEA	146	10	20	10
	163					20	8
213	163	3,95	MDEA D5	146	10	25	8
	91					35	6
232	161	4,29	A-PVP	41	10	35	6
	84					25	6

Tablo 19. devamı

Q1	Q3	Rt (dakika)	Analit ve IS'ler	DP	EP	CP	CXP
234	91,1	4,26	Metilfenidat	106	10	61	8
	125					35	8
238,05	220	4,03	Ketamin	1	10	20	6
	117					35	6
244	159	5,01	Fensiklidin	41	10	20	6
	164					25	6
278,143	234	6,02	EDDP	106	10	35	12
	186					50	14
281,2	234	6	EDDP D3	106	10	50	12
	154					35	10
284,9	193	7,87	Diazepam	76	10	35	14
	153					50	12
285,9	165	0,95	Morfin	96	10	50	12
	153					50	12
286	185	0,95	Hidromorfon	96	10	35	12
	268,8					20	8
287	241	7,66	Oksazepam	46	10	35	16
	185					50	12
290	198	7,85	Diazepam	76	10	40	10
	168,1					20	12
290,1	105,1	4,09	BZE	71	10	35	8
	246					30	8
292,01	181	0,95	Morfin D6	96	10	50	12
	171					35	12
300	128	3,53	Hidrokodon	86	10	59	12
	199					35	12
300,1	164,9	3,54	Kodein	86	10	50	12
	153					50	8
302	198	0,95	Oksimorfon	96	10	46	12
	227					26	12
303	199	3,68	Hidrokodon D3	86	10	40	12
	182,1					20	14
304,1	105	4,29	Kokain	61	10	50	6
	287					40	12
306	165	3,53	kodein D6	86	10	50	12
	185,4					35	14

Tablo 19. devamı

Q1	Q3	Rt (dakika)	Analit ve IS'ler	DP	EP	CP	CXP
309	274	7,63	Alprazolam	91	10	35	8
	281					35	8
310,2	265,2	7,52	Metadon	61	10	20	8
	105					35	6
312	249	4,1	Tebain	96	10	35	12
	281					35	12
313,2	268	7,49	Metadon D3	61	10	25	8
	267,9					35	18
313,9	238,9	7,59	Flunitrazepam	76	10	50	18
	193					20	8
334	165	3,68	6-MAM D3	106	10	50	8
	201					20	6
336	218	8,13	Cumyl Butinaca	41	10	20	6
	121					35	6
336,01	200	8,08	JWH-250	41	10	35	6
	188					35	12
337	105	5,27	Fentanil	96	10	50	12
	188					35	12
351	206	7,82	Fenazepam	91	10	50	8
	287					35	8
356	169	8,22	JWH-122	41	10	35	6
	214					35	6
357	312	8,03	Ab Chminaca	66	10	23	18
	340,1					15	20
359	214	8,09	Pb-22	41	10	20	6
	155					50	6
360,2	232,2	8,01	AM-2201	41	10	35	6
	135,2					35	6
370	328	4,12	Eroin	96	10	35	12
	165					50	12
373	271	4,1	Eroin D3	96	10	40	12
	114					35	6
385	155	7,54	JWH-200	41	10	35	6
	144					50	6
	315,2					20	15

Tablo 19. devamı

Q1	Q3	Rt (dakika)	Analit ve IS'ler	DP	EP	CP	CXP
388,2	288	5,85	Flurazepam	60	10	35	15
	396,2					53	16
468,1	165,1	5,63	Buprenorfin	136	10	125	10
	400					53	16

3.5. Metot validasyonu

3.5.1. Kalibrasyon eğrileri

İdrar ve plazma kalibratör setleri kullanılarak 5 seviyeli kalibrasyon eğrileri hazırlandı (Tablo 15).

3.5.2. Kesinlik (Precision)

Gün içi ve günler arası kesinlik değerlendirmesi için düşük ve yüksek seviyeli kontrol (Chiron, Lgc GmbH, Cerillian) materyalleri kullanıldı.

3.5.3. Gün içi kesinlik

Düşük seviye kontrol materyali ön hazırlık işlemlerinden geçirildikten sonra art arda 20 kez analiz edildi. Aynı işlem yüksek seviye kontrol materyali için de yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (CV) değerleri hesaplandı (Tablo 37).

3.5.4. Günler arası kesinlik

Kullanılacak kalibratör ve kontrol materyalleri 20 ayrı mikrotüpe porsiyonlandı ve +4 ^{0}C buzdolabında muhafaza edildi ve 5 gün boyunca düşük ve yüksek seviyeli kontrol günde 1 kez olmak üzere 3 kez tekrar edilerek çalışıldı. Her bir parametrenin varyasyon katsayısı (CV) değerleri hesaplandı (Tablo 37).

3.5.5. Gerçeklik (Trueness)

Analitik gerçeklik, ölçülen değerin gerçek değere, kabul edilmiş bir standarda veya beklenen bir değere uygunluğunu ifade eder. Ölçülen değerin gerçek değerden farkı ise bias ile ifade edilir. Herbir parametrenin ölçümüne ait bias, göreceli hata (relative error) formülüyle hesaplandı (Tablo 37).

%Bias = 100×(Ölçülen değer-Gerçek değer)/Gerçek değer

3.5.6. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Sinyal/Gürültü oranının (S/N) en az 3:1 olduğu konsantrasyon LOD (Limit of Detection) olarak hesaplandı. Bias ve CV değerlerinin %20 ve daha altında olduğu ve S/N oranının en az 10:1 olduğu konsantrasyon ise LOQ (Limit of Quantitation) olarak hesaplandı (Tablo 37).

3.5.7. Doğrusallık (Linearite)

Herbir parametre için kalibrasyon eğrisi hazırlandıktan sonra, r^2 değerleri hesaplandı. Doğrusallık çalışmasının sonuçları Tablo 37'de verilmiştir.

3.5.8. Geri Kazanım (Recovery)

Kör kalibratöre; kalibratör (1. seviye ve 5. seviye) ve IS eklenerek elde edilen örnekler ile asetonitrile kalibratör miks ve IS eklenerek hazırlanan örnekler 2'şer tekrarlı analiz edildi ve geri kazanım (Recovery: R) oranları belirlendi. Bu işlem %R formülüyle yapıldı. Geri kazanım tüm maddeler için %92-105 olarak hesaplandı.

%R = 100×(Ölçülen madde konsantrasyonu)/(Eklenen madde konsantrasyonu)

3.6. İstatistiksel analiz

İdrarda ticari ve LGM yöntemleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesinde Pearson's korelasyon analizi kullanıldı. Pearson's korelasyon analizi ve diğer istatistiksel hesaplamalarda IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) kullanıldı. Hesaplamalarda Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) kullanıldı. Eğilim çizgilerinin hesaplanmasında Passing ve Bablok yöntemi, örneklerin dağılımı ve ölçüm hataları ile ilgili özel bir varsayım olmaksızın doğrusal bir regresyon prosedürü

kullanılmıştır. Yöntemler arasındaki uyumun değerlendirilmesinde Bland-Altman ve Passing-Bablok regresyon analizi kullanıldı. Bland-Altman analizinde % fark ((yöntem A-yöntem B)/ortalama) x 100, alt limit (%95 güven aralığı) ve üst limit (%95 güven aralığı) sonuçları değerlendirildi. Parametrelerin Passing-Bablok analizlerinin değerlendirilmesinde eğimin güven aralığının 1 değerini içermesi, kesim noktasının (intercept) güven aralığının 0 değerini içermesi durumunda anlamlı olarak belirlendi. Bland-Altman ve Passing-Bablok regresyon analizi için MedCalc (version 15,8, MedCalc Software, Ostend, Belgium) kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 104 gönüllü katılmış olup, 1 kişi gönüllüden kan alınamaması, 2 kişi tükürüğü viskoz olduğu için tükürük test kitinin çalışmaması ve 1 kişi tükürük test kitinde kontrol bandının oluşmaması nedeniyle çalışmadan çıkarılmış olup toplamda 100 gönüllünün analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Gönüllülere uygulanan ankete verilen yanıtlar, demografik veriler ve maddelerin son kullanım zamanlarına ilişkin bulgular Tablo 20, Tablo 21 ve Tablo 22'de gösterilmektedir.

GP, taramada ve doğrulamada pozitif olan örnekler, GN, taramada ve doğrulamada negatif olan örnekler, YP, taramada pozitif ve doğrulamada negatif olan örnekler, YN, taramada negatif ve doğrulamada pozitif olan örnekler olarak değerlendirilmiştir. Sensitivite= 100 x (GP/GP + GN); spesifite = 100 × (GN/GN + YP); doğruluk = 100 x (GP + GN)/(GP + GN + YP + YN); prevalans= 100 X (GP + YN)/ total örnek sayısı); PPV=100 x (GP/GP + YP); NPV= 100 x (GN/GN + YN) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda hiçbir hastada plazma ve idrarda sentetik kannabinoidler, katinon, A-PVP, 1,4-klorofenilpiperazin, metil fenidat ve LSD için pozitif sonuç elde edilmemiştir. Lyrica ilacının etken maddesi olan pregabalin LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazmada 23 kişide pozitif olup idrarda da pozitif elde edilmiştir. Ancak idrarda toplamda 46 hastada pozitif sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda kokain ve metabolitleri LC-MS/MS ticari yöntem ile analiz edilmemiş olup sadece LGM ile analiz edilmiştir.

Tablo 20. Gönüllülerin demografik verileri

	Yaş				
	n	**Minimum**	**Maksimum**	**Ortalama**	**SD**
Erkek	92	18	60	29,40	8,439
Kadın	8	20	27	24,12	2,232

Tablo 21. Maddelerin son kullanım zamanına ilişkin bulgular

Analit adı	**<6 saat**	**6-12 saat önce**	**24 saat önce**	**48 saat önce**	**>72 saat önce**	**Total**
Esrar	1	9	1	9	12	32
Eroin	15	14	1	2	10	42
Kokain	0	1	1	1	2	5
Metamfetamin	0	1	0	3	2	6
MDMA	0	1	1	0	2	4
Lyrica	0	3	0	0	1	4
Eroin ve Lyrica	1	0	0	0	0	1
Skunk	1	1	0	0	0	2
Lyrica ve Rivotril	0	1	0	0	0	1

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait verilerin devamı

SIRA	YAŞ	CİNSİYET	EĞİTİM DURUMU	SİGARA KULLANIMI	ALKOL KULLANIMI	İLK KULLANILAN MADDE	MADDE KULLANMAYA BAŞLAMA YAŞI	EN SIK KULLANILAN MADDE	EN SIK KULLANILAN MADDEYİ KULLANMA ZAMANI	EN SIK KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE ZAMAN KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM SIKLIĞI	MADDENİN EN SON KULLANILAN MİKTARI
1	25	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	BONZAİ		EROİN		BURUNDAN TOZÇEKMEK	DİĞER MDMA	DİĞER ORAL TABLET	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
2	25	KADIN	ORTAOKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	EROİN	22	EROİN		FOLYO	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	
3	19	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR (THC)		KULLANMIYOR		KULLANMIYOR	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	KULLANMIYOR	
4	28	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	EVET	BİLİNMİYOR		EROİN		BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	
5	29	ERKEK	ORTAOKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	20	EROİN		DUMANINI ÇEKME	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	24 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
6	25	ERKEK	ORTAOKUL MEZUNU	EVET	EVET	EROİN	21	EROİN		FOLYO	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	
7	26	KADIN	ORTAOKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	EROİN	14	EROİN		ENJEKSİYON	EROİN	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
8	29	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	EROİN		EROİN		FOLYO	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
9	23	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR		ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
10	37	ERKEK	İNŞAAT MÜHENDİSİ	EVET	HAYIR	EROİN	33	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
11	24	ERKEK	LİSE MEZUNU	HAYIR	EVET	ESRAR	15	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	1 GRAM
12	31	ERKEK	ÜNİVERSİTE OKUYOR	EVET	EVET	ESRAR,LYRİCA ,ECTASY	21	ESRAR VE LYRICA		DUMANINI ÇEKME	LYRICA	İLAÇ GİBİ	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	6 TABLET
13	22	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	13	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	3,5-4 GRAM
14	31	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	EROİN	23	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	BİR KEREDE 1 GRAM
15	18	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	12	EROİN VE BONZAİ	EROİN 2 YILDIR	FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1.5-2 GRAM
16	27	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	11	EROİN	2009 DAN BERİ	FOLYO	EROİN	FOLYO	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	GÜNDE EN AZ 5 GRAM
17	25	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	METAMFETAMİN	24	METAMFETAMİN	1 YILDIR	DİĞER (ERİTEREK)	METAMFETAMİN	DİĞER ERİTEREK	48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİR KEZ	AZ MİKTARDA
18	28	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	BALLY, ESRAR	18	EROİN VE LYRICA	?	ENJEKSİYON, BURUNDAN TOZ VE FOLYO	EROİN VE LYRICA	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	2-3 GRAM
19	43	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	27	ESRAR	16 YILDIR	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 ADET
20	30	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	15	ESRAR	15 YILDIR	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	3-4 TANE

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait verilerin devamı

SIRA	YAŞ	CİNSİYET	EĞİTİM DURUMU	SİGARA KULLANIMI	ALKOL KULLANIMI	İLK KULLANILAN MADDE	MADDE KULLANMAYA BAŞLAMA YAŞI	EN SIK KULLANILAN MADDE	EN SIK KULLANILAN MADDEYİ KULLANMA ZAMANI	EN SIK KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE ZAMAN KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM SIKLIĞI	MADDENİN EN SON KULLANILAN MİKTARI
21	55	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	25	ESRAR	30 YILDIR	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	4-5 TANE
22	35	ERKEK	OKUMAMIŞ	EVET	HAYIR	ESRAR	12	EROİN	5 YILDIR	FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	BULDUKÇA	5 GRAM
23	41	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	40	ESRAR	8 AYDIR??	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 VEYA 2 SİGARA
24	22	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	20	ESRAR	1.5 YILDIR	KOVADAN ÇEKME	ESRAR		48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	
25	27	ERKEK	LİSE TERK	EVET	HAYIR	ESRAR	15	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	GÜNDE 1 GRAM
26	24	ERKEK	LİSE TERK	EVET	HAYIR	ESRAR	18	EROİN		ENJEKSİYON	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	4-5 GRAM
27	33	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	5-7 GRAM
28	26	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	15	EROİN		ENJEKSİYON	EROİN	FOLYO		GÜNDE BİRDEN FAZLA	
29	22	ERKEK	AÇIK LİSE OKUYOR	EVET	EVET	ESRAR	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	GÜNDE 1 GRAM
30	28	ERKEK	AÇIKÖĞR ETİM	EVET	EVET	ESRAR		ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
31	26	ERKEK	İSTATİSTİKTEN YÜKSEK LİSANS YAPIYOR	EVET	EVET	ESRAR	12	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	2 GRAM
32	20	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	14	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	GÜNDE 10 GRAM
33	24	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	EROİN	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	3 GRAM
34	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	AYDA BİR KEZ	15-20 NOKTA
35	35	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	25	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	2 SİGARA
36	23	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	12	ESRAR	11 YILDIR	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
37	52	ERKEK	İLKOLKULU MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	14	ESRAR	28 YILDIR	DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	2-3 SİGARA
38	36	ERKEK	İLKOLKULU MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	1.5 GRAM
39	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	10 GRAM
40	30	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN	2-3 YILDIR	FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1 PAKET

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait verilerin devamı

SIRA	YAŞ	CİNSİYET	EĞİTİM DURUMU	SİGARA KULLANIMI	ALKOL KULLANIMI	İLK KULLANILAN MADDE	MADDE KULLANMAYA BAŞLAMA YAŞI	EN SIK KULLANILAN MADDE	EN SIK KULLANILAN MADDEYİ KULLANMA ZAMANI	EN SIK KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE ZAMAN KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM SIKLIĞI	MADDENİN EN SON KULLANILAN MİKTARI
41	23	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	15	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 GRAM
42	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN		FOLYO	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
43	49	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	19	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 SİGARA
44	23	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	16	KOKAİN		TAŞ	LYRICA		6-12 SAAT ÖNCE		
45	24	ERKEK	AÇIK ÖĞRETİM	EVET	EVET	ESRAR		EROİN		FOLYO	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 SİGARA
46	25	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	19	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 GRAM SİGARA
47	30	ERKEK	LİSE MEZUNU	HAYIR	EVET	ESRAR	15	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1-2 GRAM
48	21	ERKEK	ORTA OKUL TERK	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN		FOLYO	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
49	27	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	11	EROİN		FOLYO	DİĞER MDMA	DİĞER ORAL TABLET	24 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	5 GRAM
50	30	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	BIRAKTIM	ESRAR	15	EROİN		BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	GÜNDE 6-7 GRAM
51	26	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	22	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
52	27	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	15	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	1 SİGARA
53	41	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	18	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1 FİŞEK
54	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	EROİN	25	EROİN		FOLYO	METAMFETAMİN	DİĞER ORAL TABLET	48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİR KEZ	?
55	24	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	BALLY	12	EROİN		FOLYO	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	6G
56	22	ERKEK	AÇIK LİSE OKUYOR	EVET	EVET	ESRAR	18	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	AYDA BİR KEZ	<1 G
57	26	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	EROİN	24	EROİN		FOLYO	LYRICA	DİĞER ORAL TABLET	6-12 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	1 TABLET
58	45	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	EROİN	15	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	2 SİGARA
59	26	ERKEK	ÜNİVERSİTE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	20	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	1 SİGARA
60	32	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	29				KOKAİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	24 SAAT ÖNCE	AYDA BİR KEZ	AZ

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait verilerin devamı

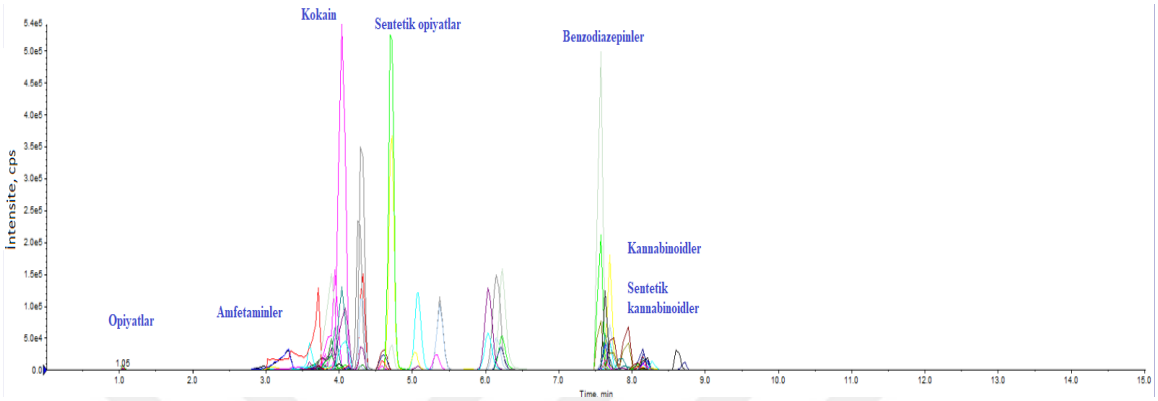
SIRA	YAŞ	CİNSİYET	EĞİTİM DURUMU	SİGARA KULLANIMI	ALKOL KULLANIMI	İLK KULLANILAN MADDE	MADDE KULLANMAYA BAŞLAMA YAŞI	EN SIK KULLANILAN MADDE	EN SIK KULLANILAN MADDEYİ KULLANMA ZAMANI	EN SIK KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE ZAMAN KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM SIKLIĞI	MADDENİN EN SON KULLANILAN MİKTARI
61	40	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	20	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1-2 SİGARA
62	60	ERKEK	LİSE TERK	EVET	HAYIR	ROHIPNOL, INSIDO, ATIVAN	24	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	SKUNK	DUMANINI ÇEKME	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	
63	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	17	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	KOKAİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	>72 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	1 G
64	41	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	TAŞ (MET)	38	METAMFETAMİN		CAMDA ISITARAK	METAMFETAMİN	CAMDA ISITARAK	>72 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	
65	26	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR BALLY	12	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE		
66	20	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	14	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	3 SİGARA
67	49	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	16	ESRAR		BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	EROİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
68	42	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	36	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	
69	35	ERKEK	ÜNİVERSİTE MEZUNU	HAYIR	HAYIR	ESRAR	24	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
70	23	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	13	EROİN		FOLYO	DİĞER MDMA	DİĞER ORAL TABLET	>72 SAAT ÖNCE	AYDA BİRDEN FAZLA	2 ŞEKER
71	24	KADIN	ÜNİVERSİTE OKUYOR	EVET	EVET	ESRAR	12	EROİN VE METAMFETAMİN		ENJEKSİYON	EROİN	ENJEKSİYON	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	EROİN 1 G, METAMFETAMİN 1 G
72	22	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	HAYIR	HAYIR	ESRAR	20	METAMFETAMİN		CAMDA ISITARAK	METAMFETAMİN	CAMDA ISITARAK	48 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	1 G
73	19	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	16								
74	27	KADIN	ÖN LİSANS	EVET	EVET	EROİN	24	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	24 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	1.5 GRAM
75	22	KADIN	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	14	EROİN		FOLYO	METAMFETAMİN	PLASTİK ŞİŞEDEN AĞIZDAN TOZ ŞEKLİNDE ÇEKEREK		GÜNDE BİR KEZ	5 GRAM EROİN
76	32	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	18	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	KOKAİN	BİDONDAN	>72 SAAT ÖNCE	AYDA BİR KEZ	1 GRAMDAN AZ
77	20	KADIN	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	2 GRAM
78	26	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	17				DİĞER MDMA	DİĞER ORAL TABLET	>72 SAAT ÖNCE	BULDUKÇA	
79	29	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ECSTASY	26	LYRICA VE RIVOTRIL		İLAÇ GİBİ	LYRICA VE RIVOTRIL	DİĞER ORAL TABLET	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
80	35	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	15	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	5-6 GRAM

Tablo 22. Gönüllülere uygulanan ankete ait verilerin devamı

SIRA	YAŞ	CİNSİYET	EĞİTİM DURUMU	SİGARA KULLANIMI	ALKOL KULLANIMI	İLK KULLANILAN MADDE	MADDE KULLANMAYA BAŞLAMA YAŞI	EN SIK KULLANILAN MADDE	EN SIK KULLANILAN MADDEYİ KULLANMA ZAMANI	EN SIK KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM ŞEKLİ	EN SON NE ZAMAN KULLANDI	EN SON KULLANILAN MADDENİN KULLANIM SIKLIĞI	MADDENİN EN SON KULLANILAN MİKTARI
81	30	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	14	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
82	35	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	20	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1,5-2 GRAM EROİN
83	30	ERKEK	LİSE TERK	EVET	EVET	ESRAR	18	EROİN		FOLYO	KOKAİN	DİĞER ERİTEREK	6-12 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	0,5 GRAMDAN AZ
84	23	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	21	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	
85	35	ERKEK	OKUMAMIŞ	EVET	HAYIR	ESRAR	14	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	BULDUKÇA	
86	26	ERKEK	ÜNİVERSİTE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	13	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	ESRAR	DUMANINI ÇEKME	>72 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	1 SİGARA
87	23	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	13	METAMFETAMİN		CAMDA ISITARAK	METAMFETAMİN	CAMDA ISITARAK	6-12 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	7-8 DUMAN
88	31	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	23	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	<6 SAAT	GÜNDE BİR KEZ	3 GRAM EROİN
89	25	KADIN	ÜNİVERSİTE OKUYOR	EVET	HAYIR	ESRAR	17	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	SÖYLEMEDİ
90	29	ERKEK	MESLEK YÜKSEK OKULU MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	16	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
91	19	ERKEK	AÇIK LİSE OKUYOR	EVET	HAYIR	EROİN	17	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİR KEZ	
92	26	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	EVET	ESRAR	22	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1 GRAM/ GÜN
93	19	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	HAYIR	HAYIR	ESRAR	17	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	LYRICA	İLAÇ GİBİ	>72 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİR KEZ	
94	36	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	24	SKANK		DUMANINI ÇEKME	SKUNK	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1 GRAM
95	46	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	EROİN	15	ESRAR KOKAİN		DUMANINI ÇEKME VE BURUNDAN TOZ ÇEKME	KOKAİN	BURUNDAN TOZ ÇEKMEK	48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	<0,2 G KOKAİN
96	21	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	14	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	KULLANMIYOR	
97	19	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	HAYIR	HAYIR	ESRAR	17	ESRAR		DUMANINI ÇEKME	LYRICA	İLAÇ GİBİ	>72 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİR KEZ	4 GÜN ÖNCE 10 G ESRAR, 3-4 GÜN ÖNCE 26-28 TABLET LYRICA
98	36	ERKEK	İLKOLKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	24	SKANK		DUMANINI ÇEKME	SKUNK	DUMANINI ÇEKME	6-12 SAAT ÖNCE	GÜNDE BİRDEN FAZLA	1 GRAM
99	46	ERKEK	LİSE MEZUNU	EVET	HAYIR	EROİN	15	ESRAR KOKAİN		DUMANINI ÇEKME VE BURUNDAN TOZ ÇEKME	KOKAİN	BURUNDAN TOZÇEKMEK	48 SAAT ÖNCE	HAFTADA BİRDEN FAZLA	<0,2 G KOKAİN
100	21	ERKEK	ORTA OKUL MEZUNU	EVET	HAYIR	ESRAR	14	EROİN		FOLYO	EROİN	FOLYO	>72 SAAT ÖNCE	KULLANMIYOR	SÖYLEMEDİ

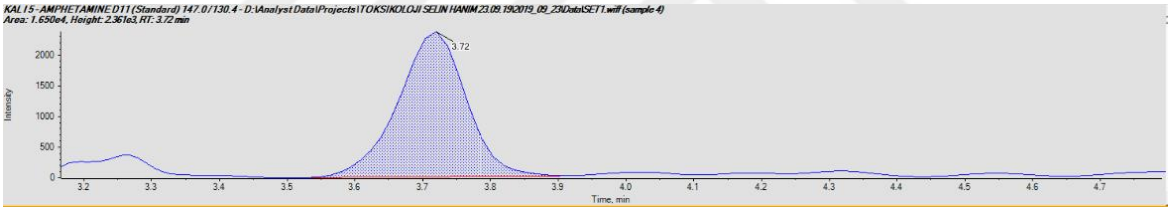
4.1. Kromatogramlar

LC-MS/MS yöntemi plazma ve idrarda madde analizinde elde edilen kromatogramlar Şekil 14-19'da gösterilmiştir.

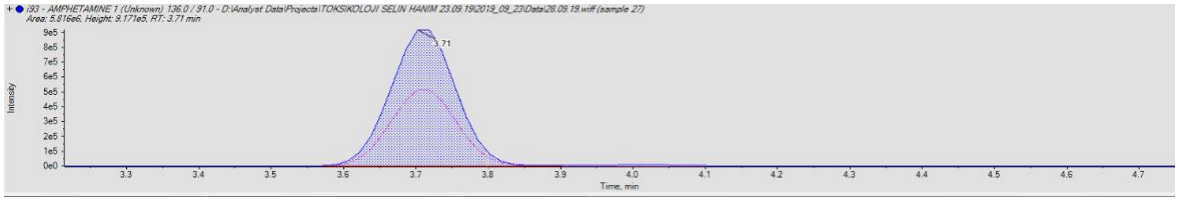


Şekil 14. Analiz edilen maddelere ait kromatogram

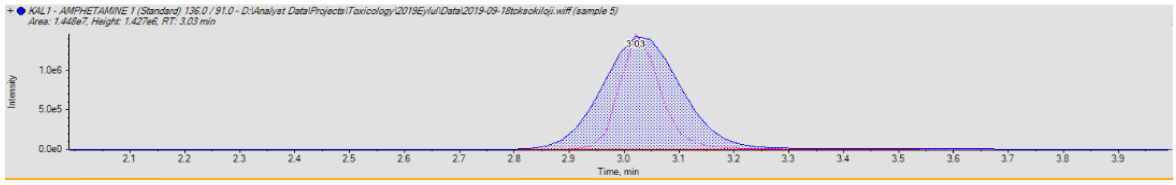
A



B

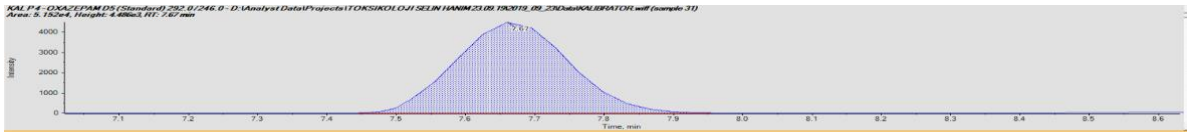


C

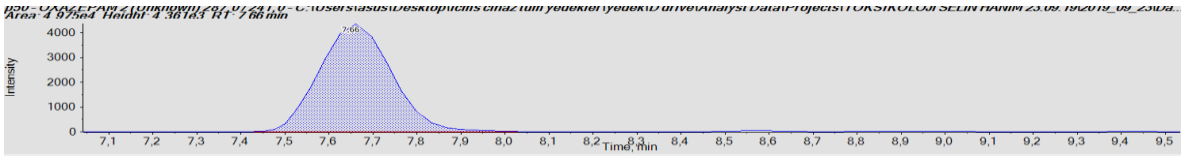


Şekil 15. Amfetamin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram

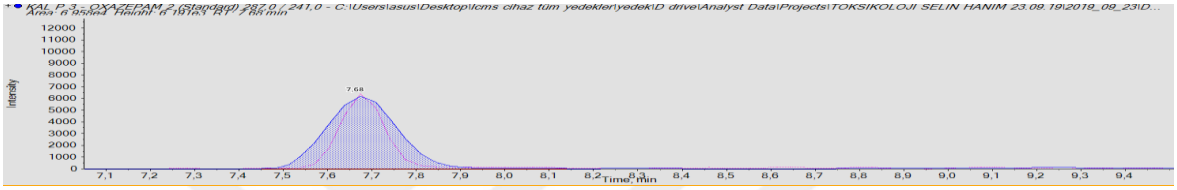
A



B

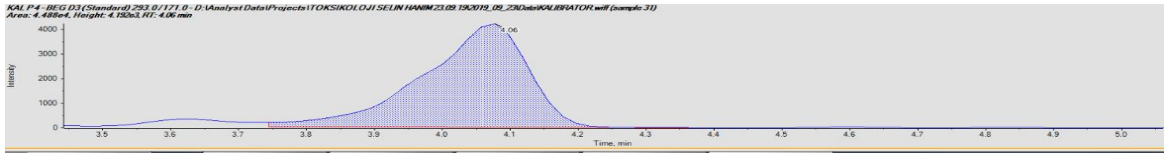


C

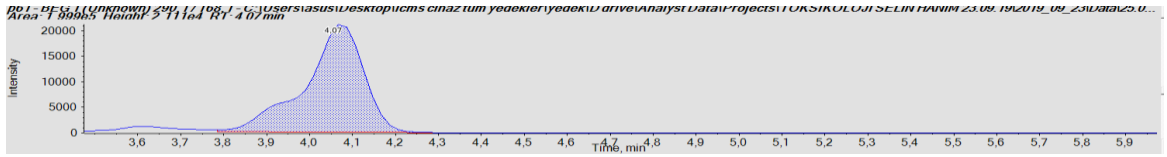


Şekil 16. Oksazepam için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram

A

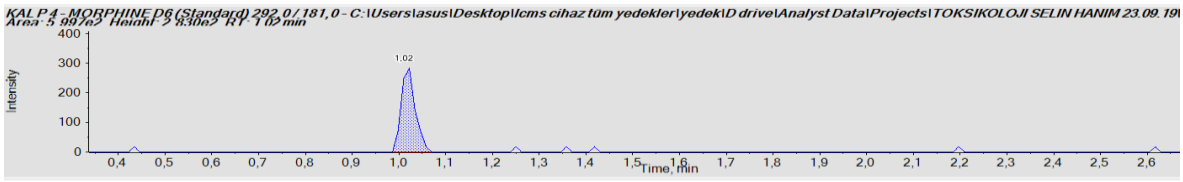


B

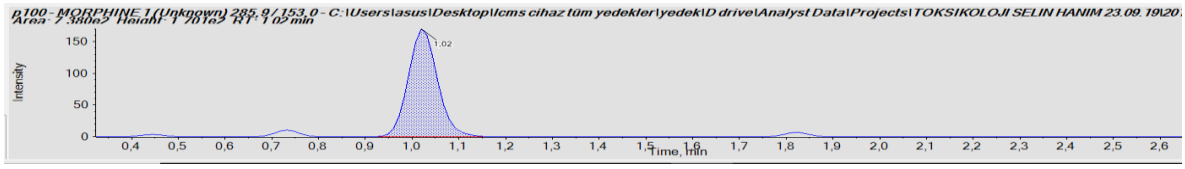


Şekil 17. BZE için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ait kromatogram

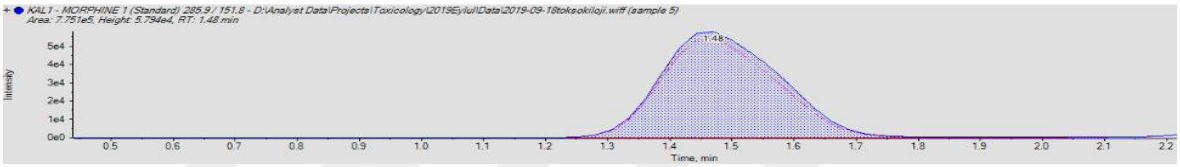
A



B

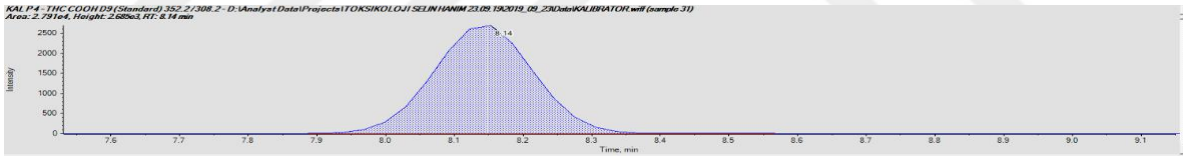


C

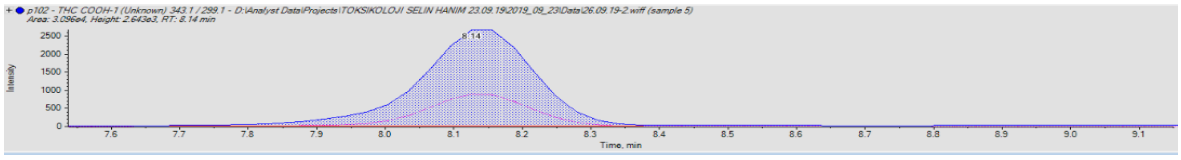


Şekil 18. Morfin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram

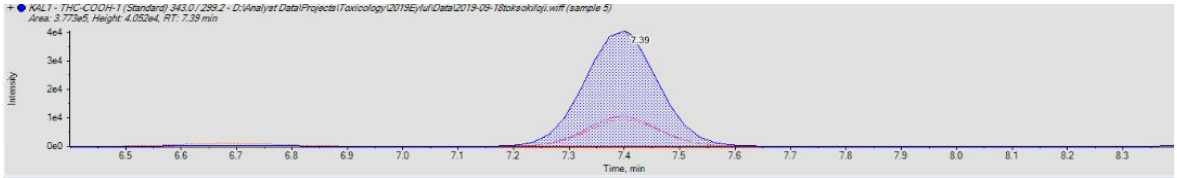
A



B



C

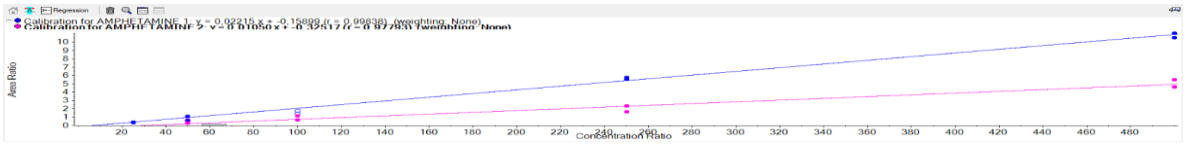


Şekil 19. THC-COOH için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma IS (A) ve hasta örneği (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrar IS'ye (C) ait kromatogram

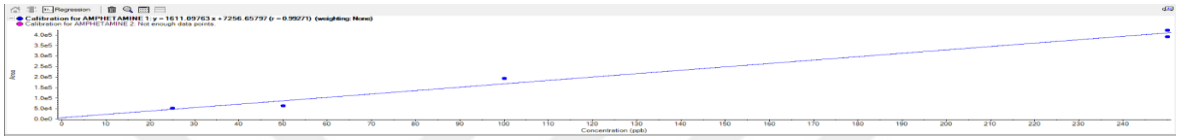
4.2. Kalibrasyon eğrileri

Maddelerin idrar ve plazmada LC-MS/MS LGM yöntemi ile analizinde kullanılan kalibrasyon eğrileri Şekil 20-24'te gösterilmektedir.

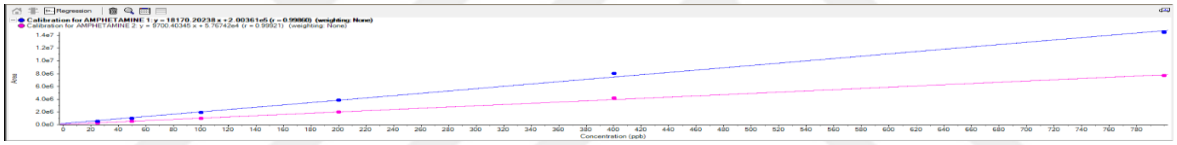
A



B

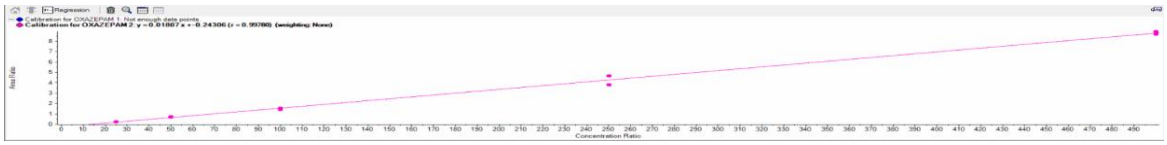


C

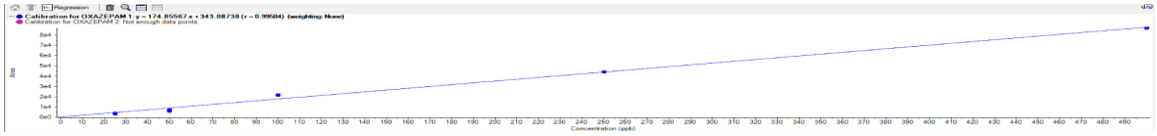


Şekil 20. Amfetamin için için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri

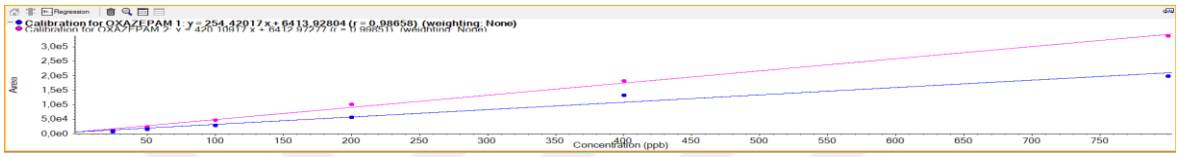
A



B

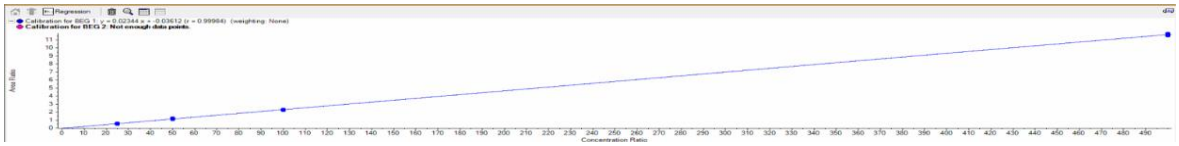


C

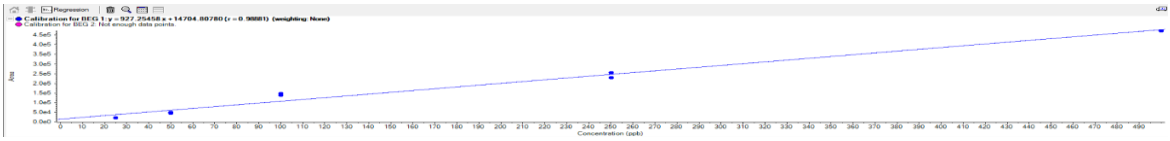


Şekil 21. Oksazepam için için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri

A

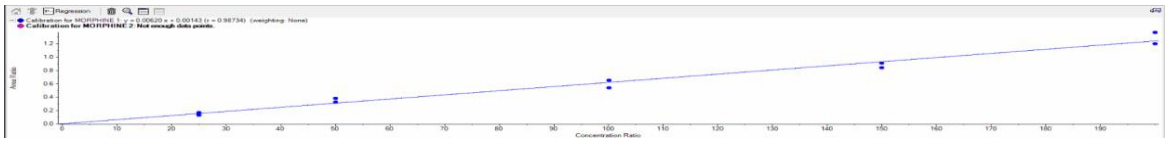


B

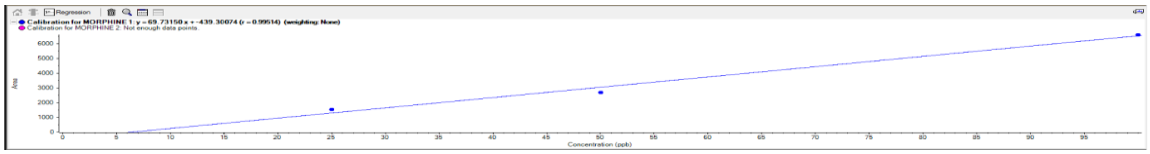


Şekil 22. BZE LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A) ve idrar (B) ait kalibrasyon eğrileri

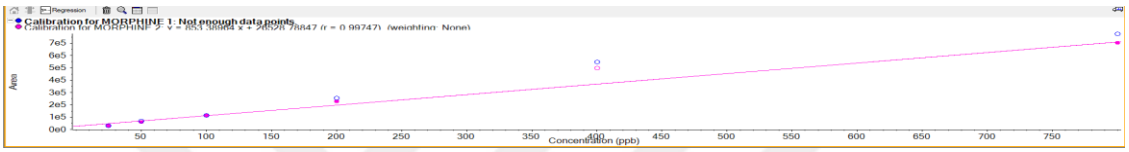
A



B

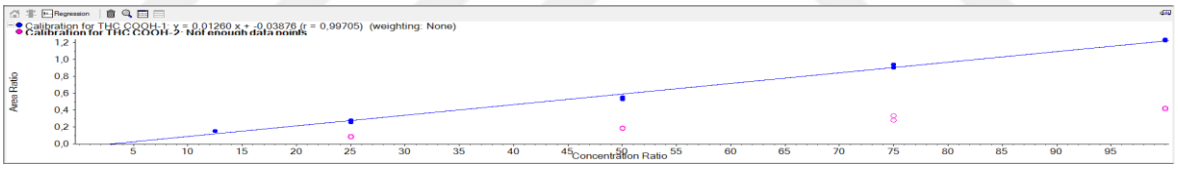


C

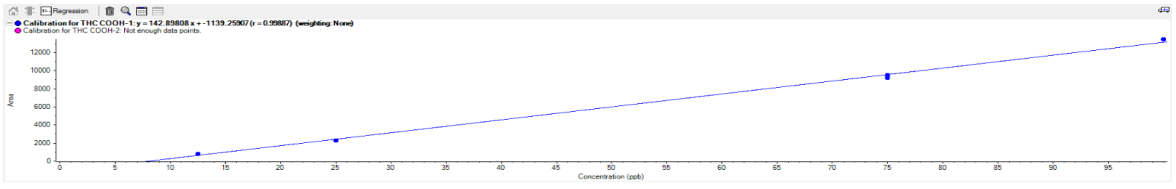


Şekil 23. Morfin için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri

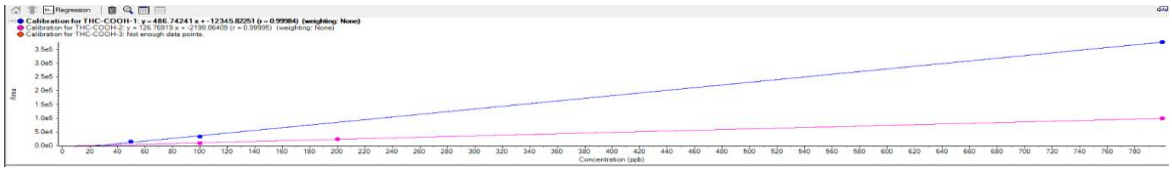
A



B



C



Şekil 24. THC-COOH için LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma (A), idrar (B) ve LC-MS/MS ticari yöntemi ile idrara (C) ait kalibrasyon eğrileri

4.3. Tükürük testinin tanısal yeterlilik analizi bulguları

Tükürük test kiti ile yapılan analizin LC-MS/MS ile doğrulama ve tanısal yeterlilik testlerine ait bulgular Tablo 23'te verilmiştir. Tükürük test kitinin benzodiazepinler, MDMA/MA, opiyatlar ve esrar için spesifitesi %100 olup, AMP ve kokain için sırasıyla % 96 ve 99 olarak belirlenmiştir. Kokain için sensitivite %100'tir. Çalışmada GP kannabinoid ve benzodiazepin sonucu tespit edilemediği için bu iki madde grubu için sensitivite belirlenememiştir. Sensitivenin en düşük olduğu grup MDMA/MA olup %67 olarak belirlenmiştir.

Tükürük testi sonuçları değerlendirilirken (Tablo 13) plazma LC-MS/MS sonuçları ile karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlar plazmaya göre değerlendirilirken pozitif/negatif atamasında plazma için LC-MS/MS testinin doğrulama cut-off değerleri; tükürük için ise POCT cihazının cut-off değerleri kullanılmıştır (3). Burada amaç metodolojik olarak rutin pratikte karşılaşılabilecek durumun benzerini oluşturmaktır. Çünkü trafik taramasında tükürükte POCT cihazı ile yapılan analizde pozitif elde edilen sonuçlar plazma LC-MS/MS testi ile doğrulanmaktadır. Esrar için Delta-9-THC'ye spesifik antikora göre test üretilmiş olup plazmadaki Delta-9-THC seviyeleri 25 ng/mL'nin altındaki sonuçlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Opiyatlar için plazmada opiyat metabolitlerinde elde edilen pozitif sonuçlar tükürük testi için de pozitif kabul edilmiş olup cut-off kullanılmamıştır. Sonuçlar plazmaya göre değerlendirilirken, pozitif/negatif atamasında plazma için LC-MS/MS testinin kendi cut-off değerleri de karşılaştırılmıştır. Yapıulan karşılaştırmada, esrar analizinde 4 kişide yalancı negatif sonuç elde edilmiş olup diğer parametrelerde doğrulama cutoff limitleriyle benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tükürük testi ile yapılan madde analizi sonuçları ve LC-MS/MS LGM yöntemi ile plazma ve idrar matrikslerine göre karşılaştırmaları Tablo 24'te gösterilmektedir.

Tablo 23. Tükürükte tanısal yeterlilik testlerinin plazma ile karşılaştırılması

	D-Amfetamin	**MDMA/ Metamfetamin**	**Nordiazepam**	**BZE**	**Morfin**	**Delta-9-THC**
GP	8	10	0	10	34	0
GN	85	85	100	89	63	100
YP	4	0	0	1	0	0
YN	1	5	0	0	3	0
Sensitivite	89	67		100	92	
Spesifite	96	100	100	99	100	100
Doğruluk	95	95	100	99	97	100
Prevalans	9	15	0	10	37	0
PPV	67	100		91	100	
NPV	99	94	100	100	95	100

Tablo 24. Tükürük, plazma ve idrarda maddelerin değerlendirilmesi

D-Amfetamin	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	8	8	8	4	0	2	7

D-Metamfetamin		**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
		Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	Metamfetamin	10	0	6	0	0	1	10
	MDMA	0	0	4	0	0	2	0

Tablo 24. Tükürük, plazma ve idrarda maddelerin değerlendirilmesi devamı

Benzodiazepinler		**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
		Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	Nordiazepam	0	0	0	0	0	0	0
	Diğer maddeler	0	0	0	0	13	0	0

Benzoilekgonin	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	10	0	0	1	0	3	10

Morifn	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	34	34	35	0	2	0	34

Esrar ve metabolitleri		**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
		Tükürükte ve plazmada	Tükürükte ve idrarda	İdrarda ve plazmada	Sadece Tükürükte	Sadece Plazmada	Sadece İdrarda	Tükürükte, idrarda ve plazmada
	Δ-9 THC	0	0	0	0	0	0	0
	THC-COOH	0	0	35	0	0	6	0

4.4. İdrar immünoassay yönteminin tanısal yeterlilik analizi bulguları

İdrar immünassay analizinin tanısal yeterlilik testleri değerlendirilirken benzodiazepinler haricinde LC-MS/MS (LGM) idrar analizi referans olarak kullanılmış olup benzodiazepinler için LC-MS/MS ticari yöntem referans olarak kullanılmıştır. Bunun nedeni idrar İA yönteminin nordiazepam metabolitine göre kalibre edilmesi ve LGM yönteminde nordiazepamın analiz edilmeyip ticari yöntemde analiz edilmesi nedeniyledir. İdrar İA yöntemine ait normal ve patolojik seviyeye ait 20 günlük günler arası internal kalite kontrol sonuçları Tablo 25'te verilmiştir. Matriks değerlendirilirken tükürük, idrar İA ve LC-MS/MS idrarda LGM metodu kullanılmıştır. Benzodiazepinler için tükürükte GP sonuç elde edilmemesi nedeniyle tükürük testi yerine plazma karşılaştırmaya dahil edilmişitir. Değerlendirmede tarama için AMATEM'de rutin kullanılan cut-off limitleri, doğrulama için ise Avrupa cut-off limitleri kullanılmıştır (Tablo 9). Yöntemin sensitivitesi amfetaminler, kokain, opiyatlar ve esrar için sırasıyla; 100, 100, 97, 100 olup benzodiazepinler için GP sonuç olmaması nedeniyle hesaplanamamıştır (Tablo 26). Spesifiteler % 84-100 arasında değişmektedir.

Opiyatlar için 11 kişide LC-MS/MS LGM ile karşılaştırıldığında YP sonuç elde edilmiş olup bu yalancı pozitif sonuçlar ticari LC-MS/MS ile değerlendirildiğinde 2 kişide GP sonuç elde edilmiştir. 11 YP kişiden 4'ünde opiyat seviyeleri immünoassay yöntem ile >2000 ng/mL olarak sonuçlanmıştır. 11 YP kişiden 2'si ankette 24 saatten önce eroin kullandığını beyan etmiş olup diğerleri THC kullanımını veya 48 saatten önce eroin kullandığını beyan etmiştir. 1 kişide YN sonuç elde edilmiş olup 6-12 saat önce 3,5-4 g eroin kullandığını beyan etmiş olup bu kişinin ticari LC-MS/MS ile elde edilen opiyat sonucu (6-MAM, morfin, hidromorfon ve kodein) da pozitiftir.

THC için sadece 1 kişide YN sonuç elde edilmiş olup immünoassay yöntemin sensitivitesi %97'dir.

Kokain için yalnızca 1 kişide YP sonuç elde edilmiş olup immünoassay yöntemin spesifitesi %99'dur. Bu örnek tükürük testinde pozitif iken idrar LC-MS-MS'te BZE değeri 82,49 ng/mL olup <100 ng/mL'den düşük olduğu için doğrulanmamıştır.

Amfetaminler için sensitivite ve spesifite %100 olup yöntemin performansı mükemmeldir.

Tablo 25. İdrar İA internal kalite kontrol bulguları

	Normal seviye kontrol					**Patolojik seviye kontrol**				
Günler arası	Amfetamin	Benzodiazepinler	Kokain	Opiyat	Esrar	Amfetamin	Benzodiazepinler	Kokain	Opiyat	Esrar
Ortalama	783	157	228	226	38,4	1303	256	387	375	65,6
SD	51,3	4,70	9,50	10,1	2,80	96,6	10,9	18,0	15,4	5,70
CV	6,50	3,00	4,20	4,50	7,20	7,40	4,20	4,60	4,10	8,70

Tablo 26. İdrar immünoassay yönteminin tanısal duyarlılığının LC-MS/MS yöntemi ile değerlendirilmesi

	D- Metamfetamin	**Nordiazepam**	**BZE**	**Morfin**	**THC-COOH**
GP	24	0	11	36	38
GN	76	84	88	52	61
YP	0	16	1	11	0
YN	0	0	0	1	1
Sensitivite	100		100	97	97
Spesifite	100	84	99	83	100
Doğruluk	100	84	99	88	99
Prevalans	24	0	11	37	39
PPV	100	0	92	77	100
NPV	100	100	100	98	98

Tablo 27. İdrar immünoassay ve tükürük testi/plazma ve LC-MS/MS yönteminin değerlendirilmesi

D-Amfetamin	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	İdrar İA ve tükürükte	Tükürükte ve idrar LC-MS-MS	İdrar İA ve idrar LC-MS-MS	Sadece Tükürükte	Sadece İdrar İA	Sadece idrar LC-MS-MS	Üç yöntemde de
	11	11	24	3	0	0	11

Benzodiazepinler		**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
		İdrar İA ve plazma	Plazma ve idrar LC-MS-MS	İdrar İA ve idrar LC-MS-MS	Sadece Plazmada	Sadece İdrar İA	Sadece idrar LC-MS-MS	Üç yöntemde de
	Nordiazepam	0	0	0	0	0	0	0
	Diğer maddeler	12	0	0	0	4	0	0

Benzoilekgonin	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	İdrar İA ve tükürükte	Tükürükte ve idrar LC-MS-MS	İdrar İA ve idrar LC-MS-MS	Sadece Tükürükte	Sadece İdrar İA	Sadece idrar LC-MS-MS	Üç yöntemde de
	10	0	11	1	0	3	9

Morifn	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**	**Pozitif**
	İdrar İA ve tükürükte	Tükürükte ve idrar LC-MS-MS	İdrar İA ve idrar LC-MS-MS	Sadece Tükürükte	Sadece İdrar İA	Sadece idrar LC-MS-MS	Üç yöntemde de
	34	31	34	0	8	0	31

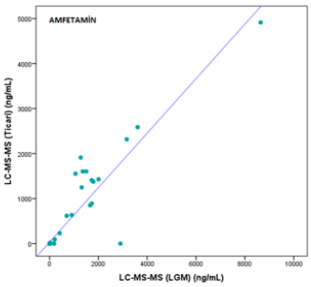
4.5. Yöntemlerin karşılaştırılması

4.5.1. LC-MS/MS ticari ve LGM

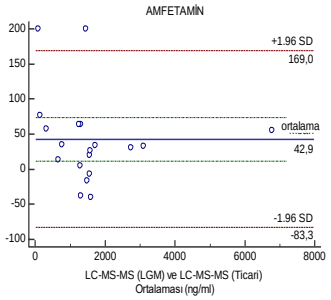
Çalışmamızda ticari yöntem ile idrarda 34 parametre analiz edilmiştir. Analiz sonucunda sayısal değer elde edilemeyip tespit limitinin altında olan veya sadece ticari veya sadece LGM yöntemi ile analiz edilen parametreler karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

İdrarda madde kötüye kullanımı analizinde LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerinin karşılaştırılmasında korelasyon, Passing-Bablok regresyon ve Bland-Altman analizi gerçekleştirilmiştir. Parametrelerin (amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA, psödoefedrin, THC-COOH, morfin, kodein ve oksazepam) korelasyon, Passing-Bablok regresyon ve Bland-Altman analizi grafikleri Şekil 25'te gösterilmekte olup korelasyon ve Bland-Altman analizi ve Passing-Bablok regresyon analizi bulguları Tablo 29-30'da yer almaktadır. Diğer parametreler sayısal değer elde edilemeyip tespit limitinin altında olması veya sadece ticari veya sadece LGM yöntemi ile analiz edilmesi nedeniyle karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

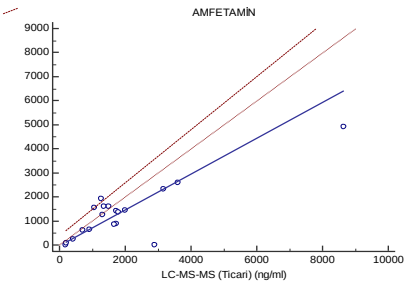
A-1



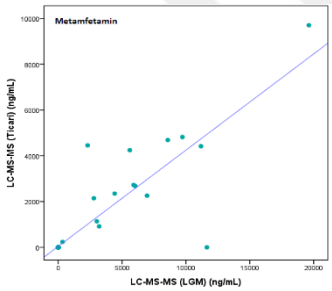
A-2



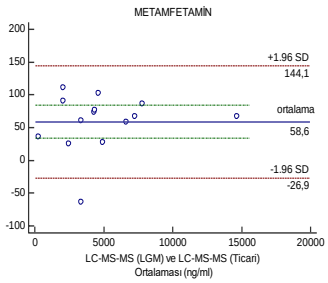
A-3



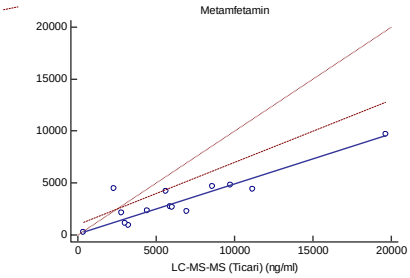
B-1



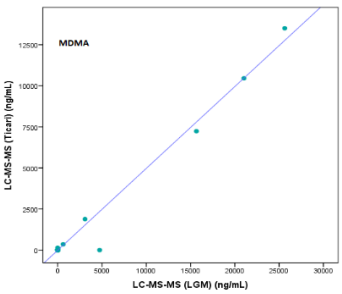
B-2



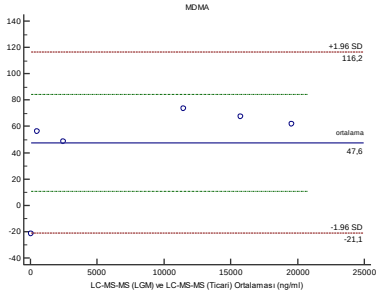
B-3



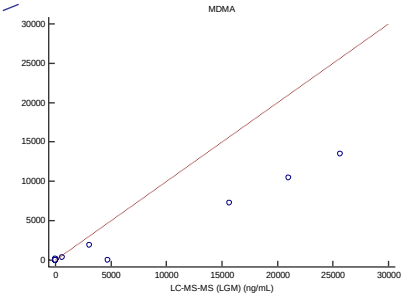
C-1



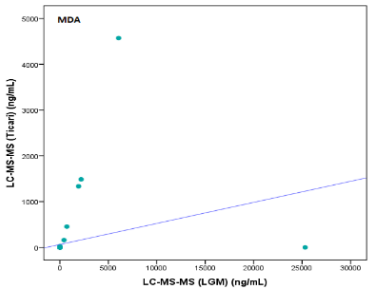
C-2



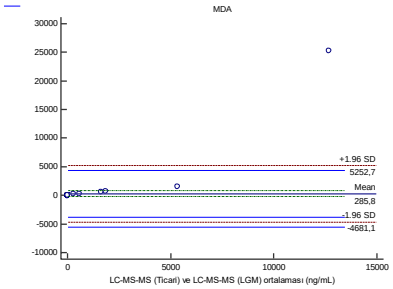
C-3



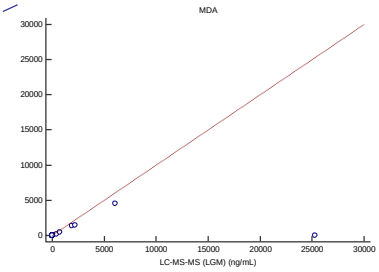
D-1



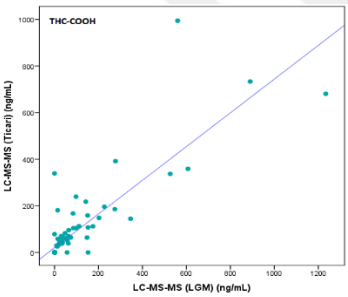
D-2



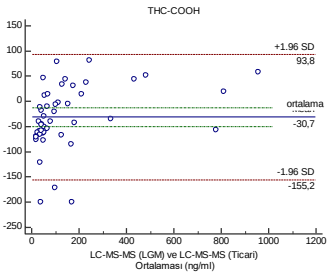
D-3



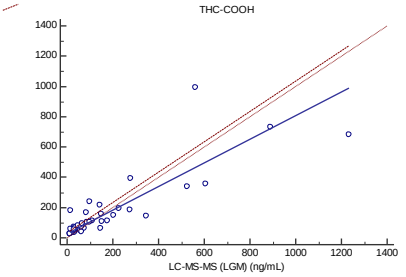
E-1



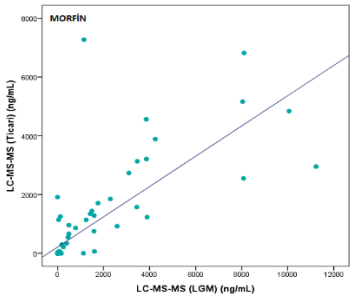
E-2



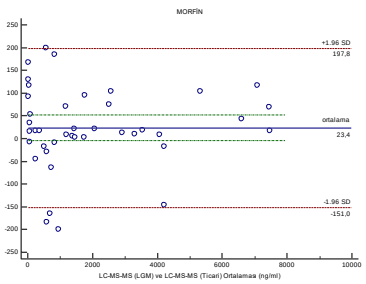
E-3



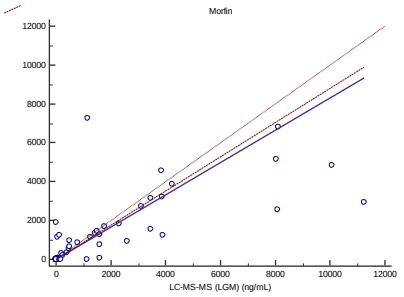
F-1



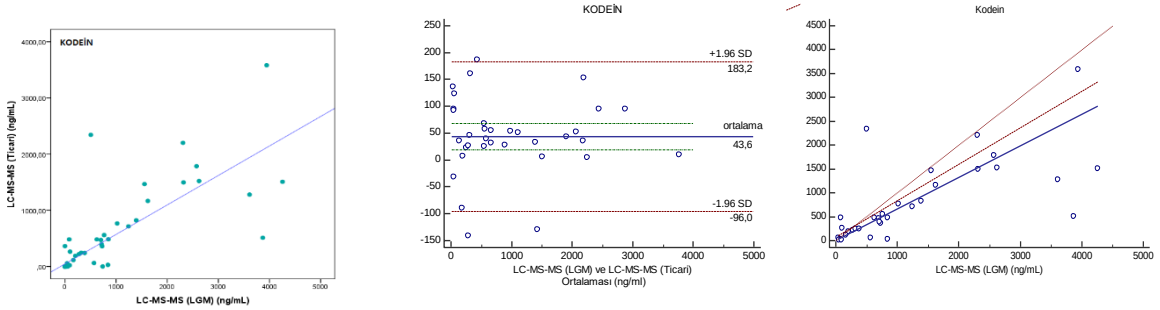
F-2



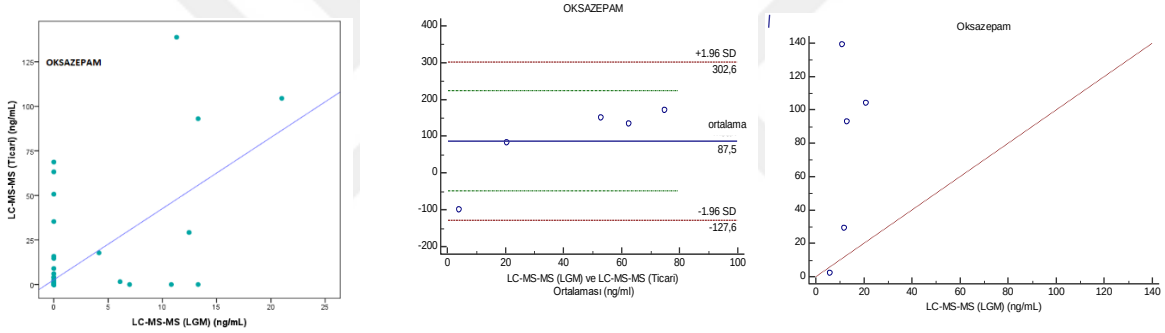
F-3



G-1 **G-2** **G-3**



H-1 **H-2** **H-3**



Şekil 25. LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerinin karşılaştırılmasında (A-H)-1'de korelasyon analizi, (A-H)-2'de Bland-Altman analizi ve (A-H)-3'te Passing-Bablok regresyon analizi yer almaktadır. Amfetamin grafikleri (A1,A2 ve A3), metamfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), MDMA grafikleri (C1, C2 ve C3), MDA grafikleri (D1, D2 ve D3), THC-COOH grafikleri (E1, E2 ve E3), morfin grafikleri (F1, F2 ve F3), kodein grafikleri (G1, G2 ve G3) ve oksazepam grafikleri (H1, H2 ve H3) olarak gösterilmektedir.

Tablo 28. Maddelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre korelasyon analizi

Analit	***r***	***p***	**R^2**
Amfetamin	*r*=0,92	*p*<0,01	R^2=0,94
Metamfetamin	*r*=0,88	*p*<0,01	R^2=0,78
MDMA	*r*=0,99	*p*<0,01	R^2=0,98
MDA	*r*=0,24	*p*<0,05	R^2=0,06
THC-COOH	*r*=0,85	*p*<0,01	R^2=0,72
Morfin	*r*=0,77	*p*<0,01	R^2=0,59
Kodein	*r*=0,81	*p*<0,01	R^2=0,65
Oksazepam	*r*=0,63	*p*<0,01	R^2=0,39

Tablo 29. Parametrelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre Bland-Altman analizi

Bland-Altman	**Bias (% 95 Güven aralığı)**	**Alt limit (% 95 Güven aralığı)**	**Üst limit (% 95 Güven aralığı)**
Amfetamin	42,9 (11,9 - 73,8)	-83,3 (-137 – (-29,3))	169 (115 - 223)
Metamfetamin	58,6 (33,4 - 83,8)	-26,9 (-70,9 - 17,3)	144 (100 - 188)
MDMA	47,6 (10,8 - 84,4)	-21,1 (-87,9 - 45,8)	116 (49,4 - 183)
MDA	47,6 (16,7 - 78,6)	-1,23 (-58,3 - 55,9)	96,5 (39,4 - 153)
THC-COOH	-30,7 (-49,4 - (-12,1))	-155 (-187 – (-123))	93,8 (61,7 - 125)
Morfin	23,4 (-4,7 - 51,5)	-151 (-199 – (-102))	197 (49,4 - 246)
Kodein	43,6 (18,8 - 68,5)	-95,9 (-138- (-53,1))	183 (140- 226)
Oksazepam	87,5 (-48,8 - 223)	-127 (-378 - 123)	302 (51,3 - 553)

Tablo 30. Parametrelerin LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemlerine göre Passing-Bablok regresyon analizi

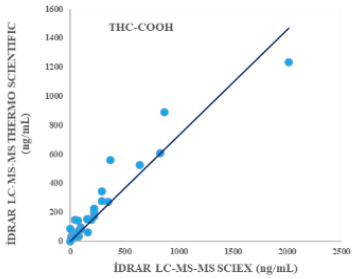
Passing-Bablok	**Denklem**	**Slope (% 95 Güven aralığı)**	**Intercept (% 95 Güven aralığı)**
Amfetamin	y = -41,9 + 0,74 x	0	0
Metamfetamin	y = 0,00 + 0,49 x	0,49 (0,45-0,69)	0
MDA	y = 0,00 + 0,67 x	0,67	0
MDMA	y = 0,00 + 0,56 x	1,31	20,3
THC-COOH	y = 0,00 + 1,22 x	1,22 (1,12 - 1,53)	7,53 (-19,8 -79,6)
Morfin	y = 0,00 + 0,83 x	0,83 (0,64-0,88)	0
Kodein	y = 0,00 + 0,62 x	0,62 (0,55 - 0,69)	0
Oksazepam	y=-169 + 20,2 x	20,2	-169

4.6. ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max Cihazlarının karşılaştırılması

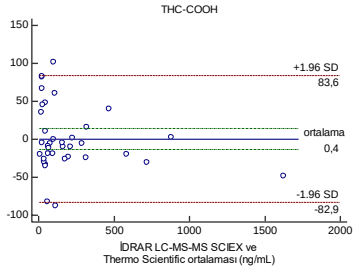
Çalışmamızda LGM yöntemi ile idrarda 55 parametre ve plazmada 58 madde analiz edilmiştir. Analiz sonucunda sayısal değer elde edilemeyip tespit limitinin altında olan veya sadece ABI SCIEX veya sadece Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max ile analiz edilen parametreler karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

İdrar ve plazmada madde kötüye kullanımı analizinde LC-MS/MS LGM yöntemi kullanılarak ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarının karşılaştırılmasında korelasyon, Passing-Bablok regresyon ve Bland-Altman analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen parametrelerin korelasyon, Passing-Bablok regresyon ve Bland-Altman analizi grafikleri Şekil 26-27'de gösterilmekte olup korelasyon, Passing-Bablok regresyon ve Bland-Altman analizi bulguları Tablo 31-36'da yer almaktadır.

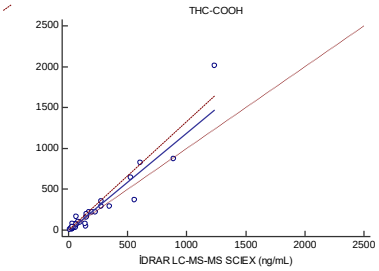
A1



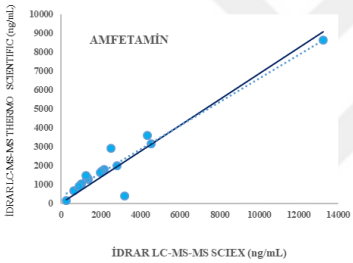
A2



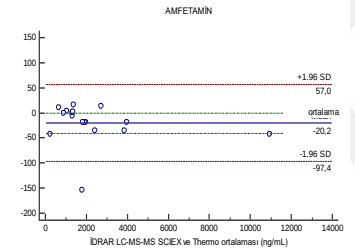
A3



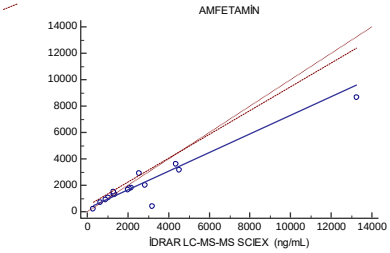
B1



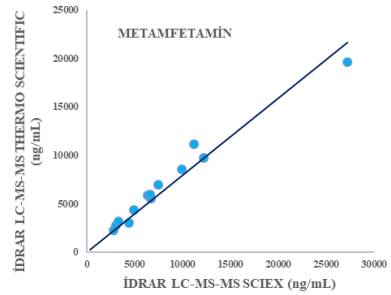
B2



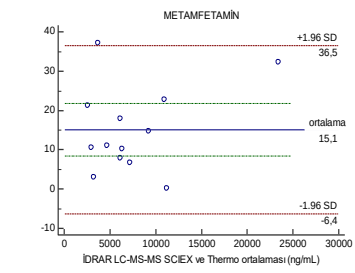
B3



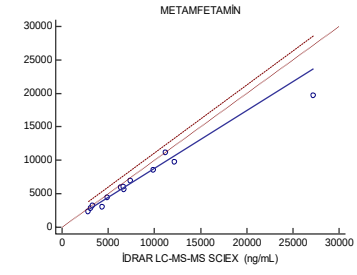
C1



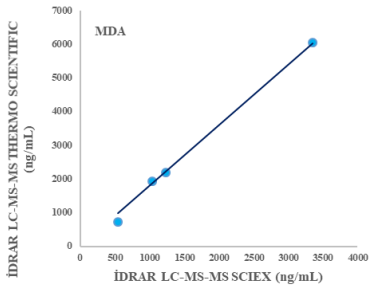
C2



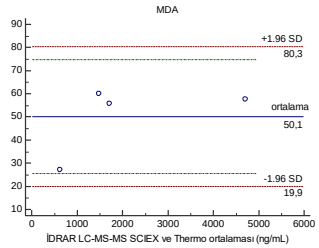
C3



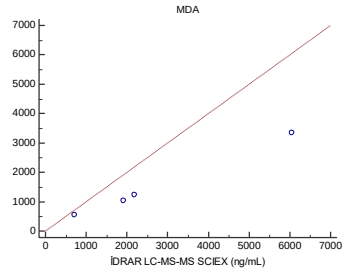
D1



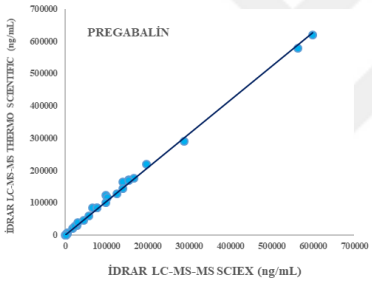
D2



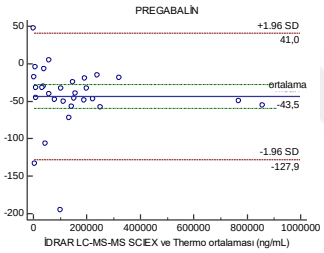
D3



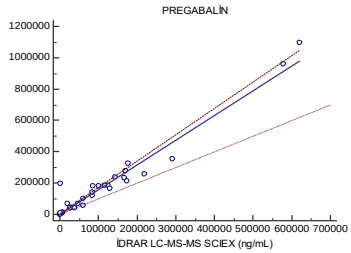
E1



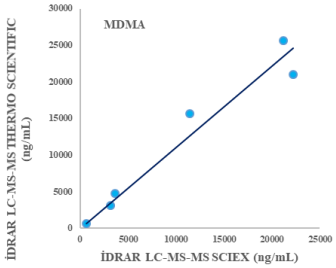
E2



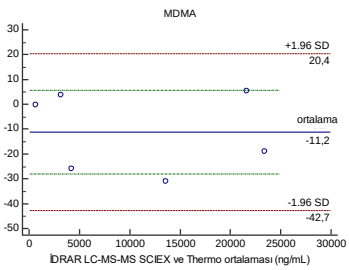
E3



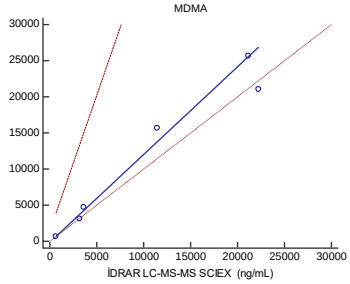
F1



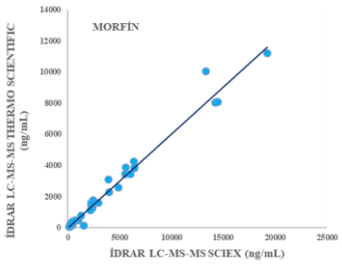
F2



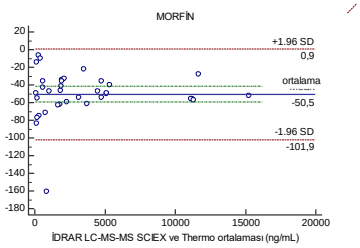
F3



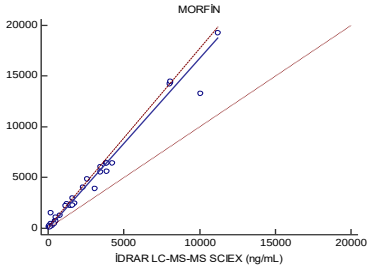
G1



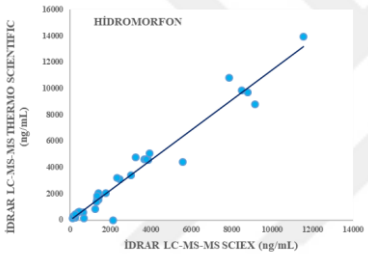
G2



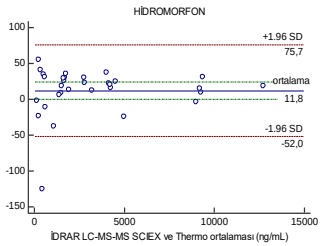
G3



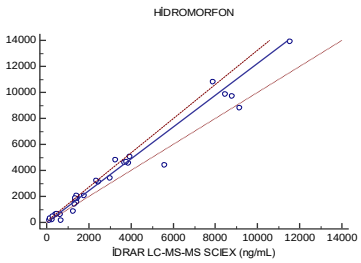
H1



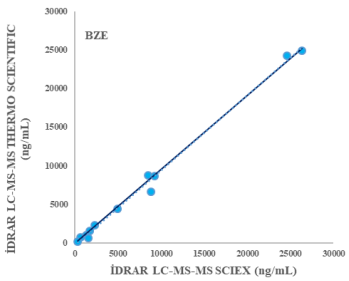
H2



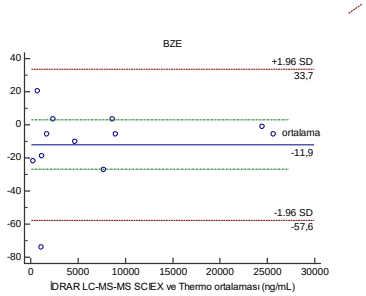
H3



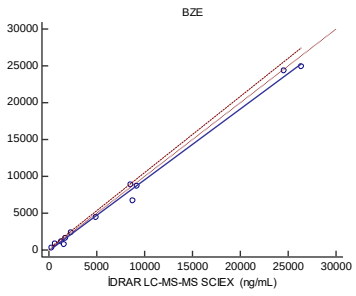
I1



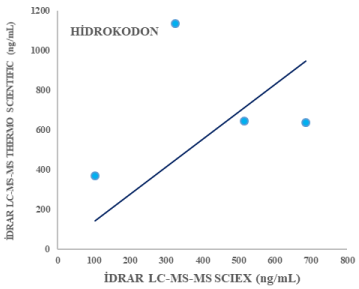
I2



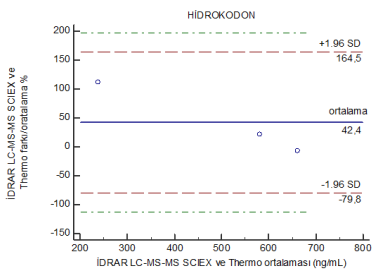
I3



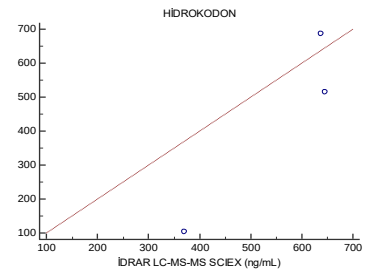
J1



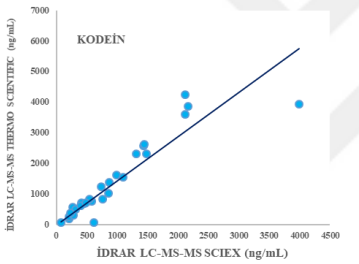
J2



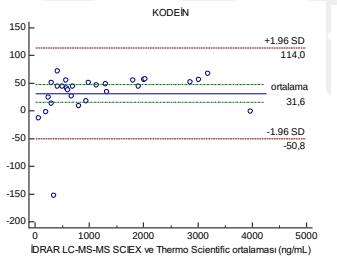
J3



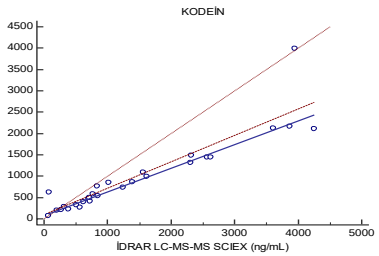
K1



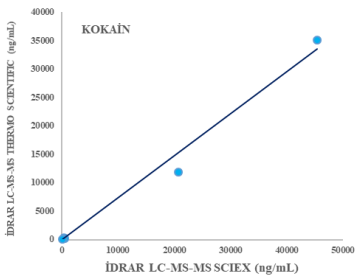
K2



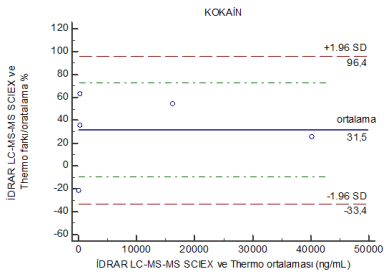
K3



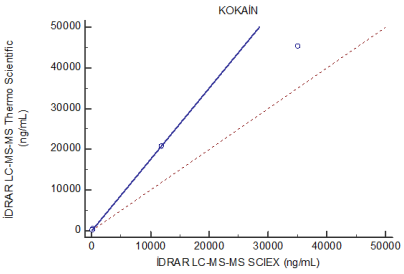
L1



L2



L3



Şekil 26. İdrarda maddelere ait LC-MS/MS ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarının karşılaştırılmasında (A-L)-1'de korelasyon analizi, (A-L)-2'de Bland-Altman analizi ve (A-L)-3'te Passing-Bablok regresyon analizi yer almaktadır. THC-COOH grafikleri (A1, A2 ve A3), amfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), metamfetamin grafikleri (C1, C2 ve C3), MDA grafikleri (D1, D2 ve D3), pregabalin grafikleri (E1, E2 ve E3), MDMA grafikleri (F1, F2 ve F3), morfin grafikleri (G1, G2 ve G3), hidromorfon grafikleri (H1, H2 ve H3), BZE grafikleri (I1, I2 ve I3), hidrokodon grafikleri (J1, J2 ve J3), kodein grafikleri (K1, K2 ve K3) ve kokain grafikleri (L1, L2 ve L3) olarak gösterilmektedir.

Tablo 31. İdrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazları analiz edilen maddelerin korelasyon analizi

Analit	***r***	***p***	**R^2**
THC-COOH	*r*=0,96	*p*<0,01	R^2=0,91
Amfetamin	*r*=0,96	*p*<0,01	R^2=0,91
Metamfetamin	*r*=0,98	*p*<0,01	R^2=0,97
Pregabalin	*r*=0,97	*p*<0,01	R^2=0,99
MDA	*r*=0,99	*p*<0,01	R^2=0,99
MDMA	*r*=0,98	*p*<0,01	R^2=0,95
Morfin	*r*=0,98	*p*<0,01	R^2=0,97
Hİdromorfon	*r*=0,98	*p*<0,01	R^2=0,95
BZE	*r*=0,99	*p*<0,01	R^2=0,99
Hidrokodon	*r*=0,17	*p*>0,05	R^2=0,86
Kodein	*r*=0,92	*p*<0,01	R^2=0,84
Kokain	*r*=0,99	*p*<0,01	R^2=0,99

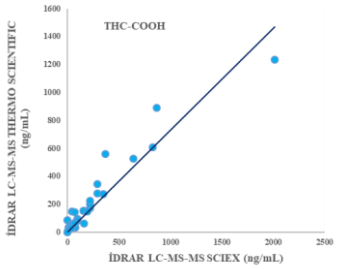
Tablo 32. Parametrelerin idrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Bland-Altman analizi

Bland-Altman	**Bias (% 95 Güven aralığı)**	**Alt limit (% 95 Güven aralığı)**	**Üst limit (% 95 Güven aralığı)**
THC-COOH	0,38 (-13,8 - 14,5)	-82,9 (-107 - (-58,5))	83,6 (59,2 – 108)
Amfetamin	-20,2 (-40,46 - 0,05)	-97,4 (-132 - (-62,1))	57,0 (21,6 – 92,3)
Metamfetamin	-15,1 (-21,7 - (-8,47))	-36,5 (-48,1 - (-24,9))	6,36 (-5,24 - 17,9)
Pregabalin	-43,5 (-59,6 - (-27,4))	-127,89 (-155 - (-100)	40,9 (13,2 - 68,8)
MDMA	11,2 (-5,7 - 28,0)	-20,4 (-51,1 - 10,3)	42,7 (11,9 - 73,4)
MDA	50,1 (25,6 - 74,6)	19,9 (-26,4 - 66,2)	80,3 (34,0 - 26,6)
Morfin	-50,4 (-59,5 – (-41,5))	-101 (-117 - (-86,4))	0,94 (-14,6 - 16,5)
Hidromorfon	11,8 (-0,10 - 23,8)	-51,9 (-72,6 – (-31,4))	75,6 (55,0 - 96,3)
BZE	-11,9 (-26,7 - 2,9)	-57,6 (-83,6 – (-31,6))	33,7 (7,66 - 59,70)
Hidrokodon	42,4 (-112- 197)	-79,8 (-384 - 225)	164 (-140 - 469)
Kodein	31,6 (15,27 - 47,9)	-50,8 (-79,0 - (-22,6))	113 (85,8 - 142)
Kokain	31,5 (-9,61 -72,6)	-33,4 (-109 - 42,4)	96,4 (20,6 - 172)

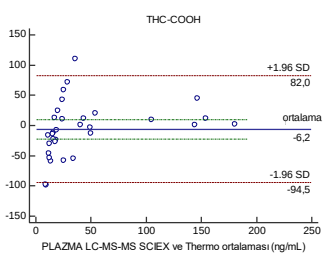
Tablo 33. Parametrelerin idrarda LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Passing-Bablok regresyon analizi

Passing-Bablok	**Denklem**	**Slope (% 95 Güven aralığı)**	**Intercept (% 95 Güven aralığı)**
THC-COOH	y = -10,9 + 1,20 x	1,20 (1,03 – 1,33)	-10,9 (-20,4 – 3,89)
Amfetamin	y = 267 + 0,70 x	267 (-71,2 – 441)	0,70 (0,61 – 0,90)
Metamfetamin	y = 21,9 + 1,13 x	1,15 (0,98 – 1,41)	-118 (-1269 – 616)
Pregabalin	y = -468 + 1,58 x	1,58 (1,37 – 1,68)	-468 (-6428 – 4517)
MDMA	y = 20,3 + 1,31 x	1,31	20,3
MDA	y = 81,2 + 0,54 x	0,54	81,2
Morfin	y = -50,4 + 1,68 x	1,68 (1,53 - 1,76)	-50,4 (-96,6 - 72,3)
Hidromorfon	y = -27,9 + 1,22 x	1,22 (1,15 - 1,32)	-27,9 (-157- 99,9)
BZE	y = -112 + 0,96 x	0,96 (0,91- 1,04)	-112 (-471-132)
Hidrokodon	y = -702 + 2,18 x	2,18	-702
Kodein	y = 72,5 + 0,56 x	0,56 (0,52 – 0,62)	72,5 (13,7 – 103)
Kokain	y = -90,3 + 1,75 x	1,75	-90,3

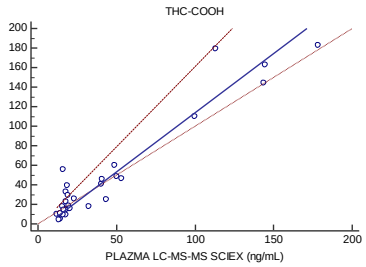
A1



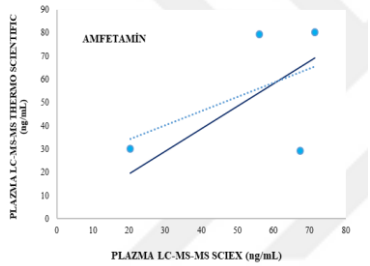
A2



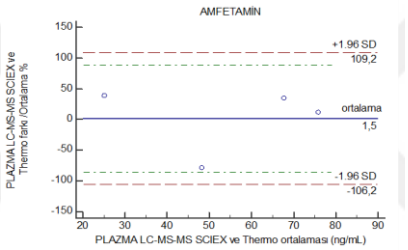
A3



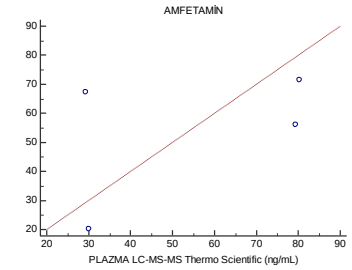
B1



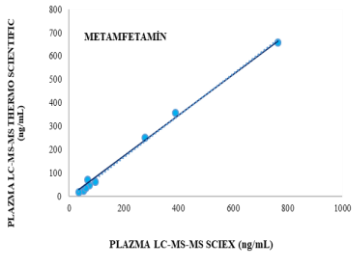
B2



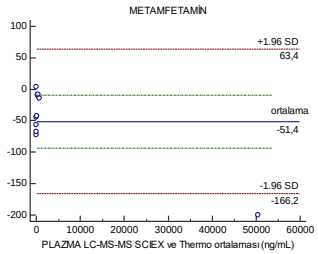
B3



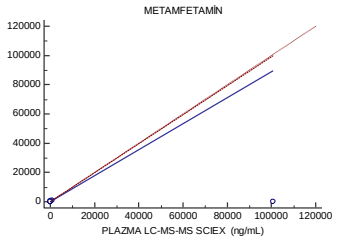
C1



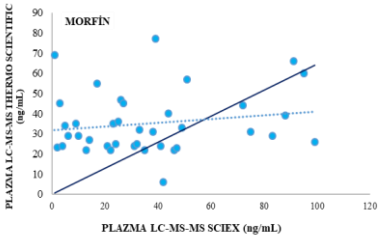
C2



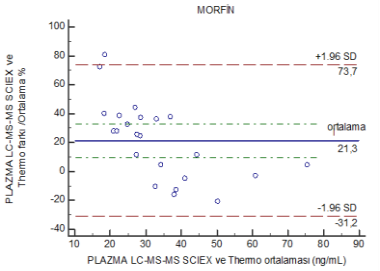
C3



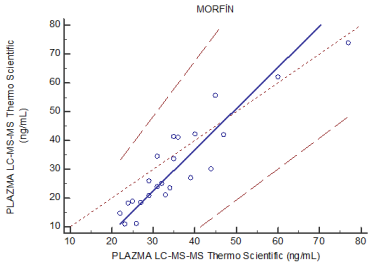
D1



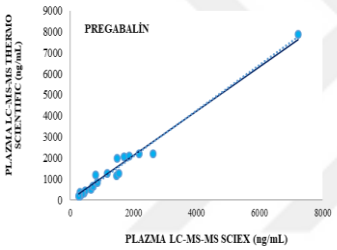
D2



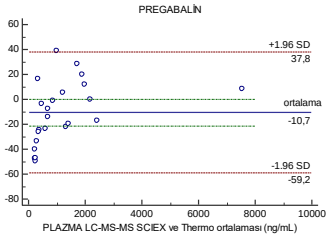
D3



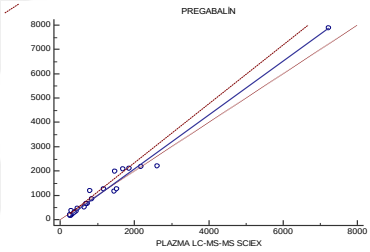
E1



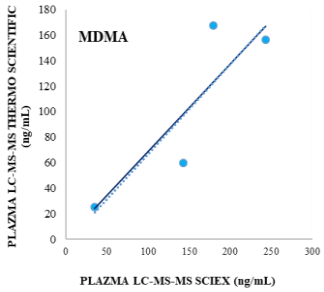
E2



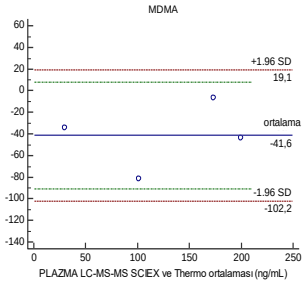
E3



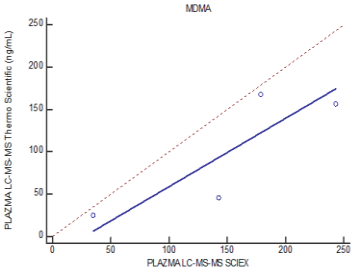
F1

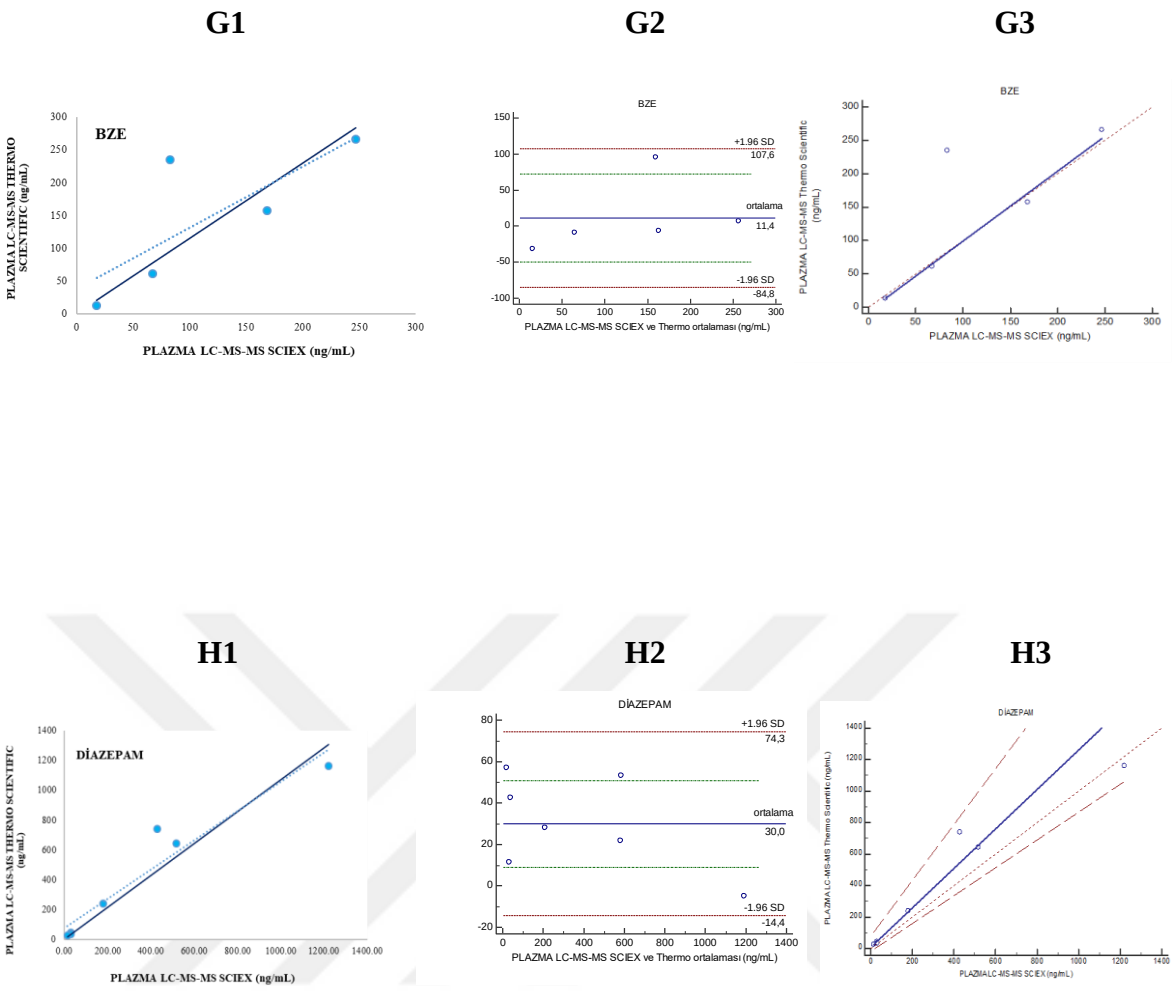


F2



F3





Şekil 27. Plazmada maddelere ait LC-MS/MS ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarının karşılaştırılmasında (A-I)-1'de korelasyon analizi, (A-I)-2'de Bland-Altman analizi ve (A-I)-3'te Passing-Bablok regresyon analizi yer almaktadır. THC-COOH grafikleri (A1, A2 ve A3), amfetamin grafikleri (B1, B2 ve B3), metamfetamin grafikleri (C1, C2 ve C3), morfin grafikleri (D1, D2 ve D3), pregabalin grafikleri (E1, E2 ve E3), MDMA grafikleri (F1, F2 ve F3), BZE grafikleri (G1, G2 ve G3), diazepam grafikleri (H1, H2 ve H3) olarak gösterilmektedir.

Tablo 34. Plazmada LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazları analiz edilen maddelerin korelasyon analizi

Analit	***r***	***p***	**R^2**
THC-COOH	*r*=0,96	*p*<0,01	R^2=0,91
Amfetamin	*r=0,49*	*p>0,05*	R^2=0,24
Metamfetamin	*r=0,99*	*p*<0,01	R^2=0,99
Pregabalin	*r=0,99*	*p*<0,01	R^2=0,98
MDMA	*r=0,87*	*p*>0,05	R^2=0,76
Morfin	*r=0,91*	*p*<0,01	R^2=0,*83*
BZE	*r=0,77*	*p*>0,05	R^2=0,59
Diazepam	*r=0,96*	*p*<0,01	R^2=0,94

Tablo 35. Plazmada maddelerin LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Bland-Altman analizi

Bland-Altman	**Bias (% 95 Güven aralığı)**	**Alt limit (% 95 Güven aralığı)**	**Üst limit (% 95 Güven aralığı)**
THC-COOH	-6,24 (-22,4- 9,98)	-94,4 (-122 - (-66,4))	81,9 (53,9 - 110)
Amfetamin	1,46 (-85,9 - 88,8)	-106 (-271 - 58,7)	109 (-55,8 - (274))
Metamfetamin	-51,3 (-93,2 - (-9,46)	-166 (-240- (-91,9))	63,4 (-10,7 - 137)
Pregabalin	-10,6 (-21,3-0,01)	-59,1 (-77,6- (-40,6))	37,7 (19,2 - 56,3)
MDMA	-41,5 (-90,8 - 7,69)	-102 (-195 – (-9,28))	19,1 (-73,8 - 112)
Morfin	21,2 (9,68 - 32,8)	-31,1 (-51,2 - (-11,1))	73,6 (53,6 - 93,7)
BZE	11,4 (-49,5 - 72,3)	-84,7 (-197 - 27,5)	107 (-4,79 - 219)
Diazepam	29,9 (9,04 - 50,8)	-14,3 (-52,1 - 23,2)	74,3 (36,6 - 111)

Tablo 36. Parametrelerin plazmada LC-MS/MS ABI SCIEX ve Thermo scientific cihazlarına göre Passing-Bablok regresyon analizi

Passing-Bablok	**Denklem**	**Slope** **% 95 CI**	**Intercept** **% 95 CI**
THC-COOH	y = 7,53 + 1,25 x	1,25 (0,89 -1,78)	7,53 (-19,7 -79,5)
Amfetamin	y = -2,13 + 0,87 x	0,87	-2,13
Metamfetamin	y = 21,8 + 1,13 x	1,13 (1,01 - 1,53)	21,8 (1,12 -27,6)
Pregabalin	y = 122 + 0,90 x	0,90 (0,82 - 1,02)	122 (84,5 - 149)
MDMA	y = -20,1 + 0,79 x	0,79	-20,12
Morfin	y = -20,3 + 1,43 x	1,43 (1,07 - 1,91)	-20,3 (-34,5 - (-9,01))
BZE	y = 5,37 + 0,96 x	0,96	5,37
Diazepam	y = -6,01 + 0,79 x	0,79 (0,56 - 1,13)	-6,01 (-89,7 - 11,1)

4.7. Metot Validasyonu

4.7.1. Kalibrasyon Eğrileri

İdrar ve plazma kalibratör setleri kullanılarak 5 seviyeli kalibrasyon eğrileri hazırlandı (Tablo 15).

4.7.2. Kesinlik (Precision)

Gün içi ve günler arası kesinlik değerlendirmesi için düşük ve yüksek seviyeli kontrol (Chiron, Lgc GmbH, Cerillian) materyalleri kullanıldı.

4.7.2.1. Gün İçi Kesinlik

Düşük seviye kontrol için 2,6-9,4 ve yüksek seviye kontrol için 1,2-9,1 olarak belirlenmiştir (Tablo 37).

4.7.2.2. Günler Arası Kesinlik

Düşük seviye kontrol için 4,5-11,4 ve yüksek seviye kontrol için 5,1-11,0 olarak belirlenmiştir (Tablo 37).

4.7.2.3. Gerçeklik (Trueness)

Düşük seviye kontrol için -9,4-9,2 ve yüksek seviye kontrol için -9,7-6,4 olarak belirlenmiştir (Tablo 37).

4.7.2.4. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Maddelerin LOD ve LOQ sonuçları Tablo 37'de gösterilmektedir.

4.7.2.5. Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık çalışmasının sonuçları Tablo 37'de verilmiştir.

4.7.2.6. Geri Kazanım (Recovery)

Geri kazanım tüm maddeler için %92-105 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 37. Validasyon çalışması sonuçları

		Düşük seviye kontrol				Yüksek seviye kontrol				Tespit Limitleri		Linearite
	Madde Adı	%CV (Gün İçi)	%CV (Günler Arası)	Gerçek Değer (ng/mL)	% Bias	% CV (Gün içi)	% CV Günler Arası	Gerçek Değer (ng/mL)	% Bias	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	(r^2)
1	Hidromorfon	4,5	6,7	50	-7,1	4,3	6,6	150	-8,4	0,4	2,0	0,99
2	Morfin	4,9	8,4	50	-3,2	4,8	7,9	150	-5,3	0,6	1,0	0,99
3	APINACA	7,7	10,1	5	-1,4	3,4	10,3	20	-6,5	0,2	0,5	0,99
4	4-OH-N-Metilamfetamin	3,4	7,1	50	7,4	3,9	6,9	250	6,9	0,4	2,0	0,99
5	Kodein	2,8	5,1	50	-6,4	3,1	5,0	150	-5,5	0,4	2,0	0,99
6	Oksikodon	7,4	8,8	50	-7,3	6,6	9,1	150	-6,4	0,4	2,0	0,99
7	Psödoefedrin	3,3	4,4	50	-2,3	1,4	5,6	150	1,1	0,4	2,0	0,99
8	Hidrokodon	5,3	8,9	50	-8,8	1,9	8,4	150	-4,5	0,6	2,0	0,99
9	MDA	5,2	7,7	50	6,4	2,2	10,0	250	5,3	0,4	2,0	0,99
10	MDMA	4,3	6,8	50	3,2	1,2	8,8	250	4,9	0,4	2,0	0,99
11	Amfetamin	5,7	7,6	50	7,2	2,3	7,1	250	6,4	0,4	2,0	0,99
12	Metamfetamin	3,6	8,8	50	6,6	1,9	8,3	250	5,4	0,4	2,0	0,99
13	MDEA	3,8	7,1	50	5,4	3,4	7,7	250	5,5	0,4	2,0	0,99
14	Ketamin	4,7	8,9	100	5,7	4,1	8,0	500	5,1	0,4	2,0	0,99
15	Benzolekgonin	4,4	6,6	50	-1,1	3,8	6,7	250	2,3	0,4	2,0	0,99
16	Oksimorfon	5,9	9,9	50	-8,9	5,7	9,1	150	-9,7	0,6	2,0	0,99
17	Eroin	4,1	7,9	50	-8,1	3,9	9,4	150	-6,0	0,4	2,0	0,99
18	Tebain	4,3	8,5	50	-6,0	4,1	8,0	150	-1,9	0,4	2,0	0,99
19	Metilfenidat	5,7	9,4	50	3,3	3,9	7,9	250	1,7	0,4	2,0	0,99
20	Kokain	5,1	6,4	50	1,1	2,8	6,3	250	-2,8	0,4	2,0	0,99
21	Alfa PVP	3,2	4,8	20	5,5	2,8	4,7	100	6,7	0,4	2,0	0,99
22	Liserjid	6,7	6,9	2	9,2	5,9	8,0	10	7,2	0,2	0,5	0,99
23	1-(4-Klorofenil) Piperazin	5,4	9,1	10	-4,9	5,2	11,0	50	-3,4	0,4	2,0	0,98
24	Katinon	5,1	7,3	50	1,2	4,5	6,7	250	3,1	0,4	2,0	0,99
25	Kokaetilen	3,8	8,1	50	0,9	3,5	7,1	250	-1,8	0,4	2,0	0,99
26	Fensiklidin	2,6	6,7	20	8,4	1,6	5,0	100	7,7	0,4	2,0	0,99

Tablo 37. Validasyon çalışması sonuçları devamı

		Düşük seviye kontrol				Yüksek seviye kontrol				Tespit Limitleri		Linearite
	Madde Adı	%CV (Gün İçi)	%CV (Günler Arası)	Gerçek Değer (ng/mL)	% Bias	% CV (Gün içi)	% CV Günler Arası	Gerçek Değer (ng/mL)	% Bias	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	(r^2)
27	Fentanil	4,0	6,9	50	3,3	3,4	7,1	150	1,0	0,4	2,0	0,99
28	Buprenorfin	5,1	7,3	50	0,7	5,0	6,5	150	3,7	0,4	2,0	0,99
29	Flurazepam	3,6	4,9	50	1,1	2,4	5,5	250	1,9	0,4	2,0	0,99
30	6-MAM	4,2	6,9	50	5,2	1,4	7,0	150	2,8	0,4	2,0	0,99
31	Midazolam	4,3	8,1	50	-0,7	3,1	5,9	250	1,7	0,4	2,0	0,99
32	EDDP	3,2	6,4	50	-6,0	3,2	5,7	150	-5,7	0,4	2,0	0,99
33	AB-PINACA	9,4	11,4	5	-2,8	9,1	10,2	20	-4,4	0,2	0,5	0,99
34	Metadon	5,1	10,5	50	-1,0	4,4	9,1	150	4,1	0,4	2,0	0,99
35	Flunitrazepam	4,1	9,1	50	-3,0	3,5	8,0	200	1,7	0,4	2,0	0,99
36	JWH-200	7,9	10,2	5	-5,5	7,3	10,0	20	-8,0	0,2	0,5	0,99
37	Alprazolam	3,3	6,9	50	-0,9	2,8	8,0	250	-2,5	0,4	2,0	0,99
38	Oksazepam	5,7	7,1	50	-3,1	4,1	6,9	200	1,4	0,4	2,0	0,99
39	Lorazepam	3,8	6,2	50	-2,2	3,1	6,7	250	1,1	0,4	2,0	0,99
40	Fenazepam	5,9	9,4	50	-3,9	3,3	8,1	250	-1,0	0,4	2,0	0,99
41	Diazepam	5,1	6,7	50	-1,9	4,6	7,3	250	4,0	0,4	2,0	0,99
42	AB-CHIMINACA	7,9	9,1	5	-6,1	7,6	9,9	25	-8,4	0,2	0,5	0,99
43	MDMB-CHIMICA	7,6	9,6	5	-1,4	7,4	9,9	25	-3,9	0,2	0,5	0,99
44	RCS-4	8,7	9,4	5	-8,7	7,1	9,1	25	-6,0	0,2	0,5	0,99
45	PB-22	9,4	10,6	5	-3,3	5,6	9,4	25	-2,3	0,2	0,5	0,99
46	XLR-11	6,1	8,9	5	-6,9	4,6	8,8	25	1,1	0,2	0,5	0,99
47	JWH-250	6,7	9,0	5	-4,8	4,7	8,1	25	0,9	0,2	0,5	0,99
48	Cumyl Butinaca	6,7	10,0	5	-9,4	4,7	9,1	25	-8,8	0,2	0,5	0,99
49	JWH-122	5,9	9,5	5	-5,3	5,6	8,9	25	-1,4	0,2	0,5	0,99
50	THC-COOH	5,6	10,3	25	-4,5	5,4	9,4	75	-2,1	1,0	3,0	0,99
51	Trans-Delta9-THC	7,1	9,7	25	-3,8	5,2	9,9	75	-3,1	1,0	3,0	0,99
52	Trans-11-OH-Delta9-THC	5,9	9,3	25	-4,1	3,2	9,1	75	-2,9	1,0	3,0	0,99
53	Pregabalin	2,6	4,5	100	4,0	2,1	5,1	500	3,6	2,0	10,0	0,99

5. TARTIŞMA

Madde kullanım bozukluğu, madde kullanımının yol açtığı tıbbi, ekonomik, sosyal, mesleki sorunlara rağmen kişinin kompulsif tarzda madde kullanmasına neden olan bilişsel, fizyolojik, davranışsal belirtilerin varlığıdır.

Madde kullanım bozukluğunun bireyde ve toplumda yol açtığı problemler oldukça önemlidir. EMCDDA tarafından yayımlanan 2019 yılı Türkiye Ülke Uyuşturucu Raporu'na göre madde kötüye kullanımının giderek yaygınlaştığı ve 15-64 yaş arası yetişkinlerde en sık kötüye kullanılan maddenin kannabis olduğu belirtilmiştir (5). Ayrıca AMATEM kliniklerine başvuru yapan madde kullanıcıların çoğunluğunun primer olarak opioid kullanım bozukluğu için ardından esrar ve uyarıcılar (kokain dışındaki) için tedaviye geldiği belirtilmiştir. Son yıllarda özellikle sentetik kannabinoidler olmak üzere, diğer yasadışı maddelerin kullanımı için tedaviye gelen kullanıcıların oranı artmıştır. Ülkemizde uyuşturucu madde kullanımı 5237 sayılı Türk Ceza Kanunu 191.maddesi hükmü gereğince yasaktır. Uyuşturucu kullandığı tespit edilen bireyler bir defaya mahsus tedaviyi kbul etmeleri şartıyla denetimli serbestlik uygulamasından faydalanabilmektedir. Uyuşturucu maddelerin farklı amaçlarla analizi yapılabilmektedir. Adli Tıp Kurumlarında adli nedenle madde analizine yönlendirilen bireylerin örnekleri, Denetimli Serbestlik kapsamında uyuşturucu kullanırken yakalanıp tedavi olma taahhüdünde bulunan kişilerin bu durumu suistimal edip etmediklerinin anlaşılması, Emniyet Genel Müdürlüğü Trafik Daire Başkanlığı'nın son dönemde başlattığı uygulama kapsamında trafikte madde etkisi altında olup olunmadığının tespiti, AMATEM'lerde tedavi başlangıç ve takibinde, çeşitli nedenlerle yapılan toksikolojik analizler gibi birçok durumda uyuşturucu madde analizi gerçekleştirilmektedir.

Farklı amaçlarla yapılan analizler; temelde tarama yöntemleri ve doğrulama yöntemleri olarak gruplandırılabilir. Madde kötüye kullanımı analizinde kullanılan tarama yöntemleri; immünokromatografi esasına dayanan POCT, immünoassay ve kromatografik yöntemlerden oluşur. Doğrulamada ise kromatografik yöntemler kullanılır.

Çalışma popülasyonunun taranan maddeler için yüksek prevalansı varsa daha güvenilir sensitivite sonucu elde edilmektedir. Ayrıca çalışma popülasyonundaki örneklerde

bulunan maddelerin konsantrasyonları son kullanım nedeniyle yüksekse, sensitivite bir dereceye kadar artar. Yöntemin doğruluğu ise tüm test sonuçlarından elde edilen gerçek negatif ve gerçek pozitif sonuçların yüzdesidir. Bununla birlikte, tek başına doğruluğun yüksek olması, cihazların pozitif durumları doğru tanımlamak için mutlaka iyi olduğu anlamına gelmez. Bu nedenle performans değerlendirmesi yaparken yöntemlerin sensitivitesi, spesifitesi ve doğruluğunun test için kullanılan çalışma popülasyonu ile birlikte düşünülmesi gerekir. Tükürük yönteminin tanısal duyarlılığı değerlendirildiğinde, spesifitesi tüm maddeler için %96-100, doğruluğu %95-100 olup oldukça yüksek performansa sahipken, sensitivitesi %67-100 arasında bulunmuştur. Ayrıca benzodiazepinler ve esrar için GP sonuç olmaması nedeniyle sensitivite sonucu elde edilememiştir (Tablo 23). Prevalansı en yüksek madde %37 ile morfin olup yöntemin sensitivitesi de prevalansla orantılı olarak yüksek elde edilmiştir (%92). NPV, test sonucu negatif bulunan bir bireyin hangi oranda gerçekten madde kullanmayan bir birey olduğunu gösterir ve sensitivitesi yüksek bir yöntem ile elde edilen sonuç negatifse madde kullanımını ekarte ettirir. Tükürük yönteminin tüm maddeler için NPV sonuçları %94-100 arasında olup tükürük testi yöntemin madde kullanımını ekarte etmek açısından tanısal performansı yüksektir.

İdrar immün yöntemin ise tüm maddeler için sensitivitesi %97-100, doğruluğu %84-100, NPV %98-100 arasında değişmektedir Tablo 26. Sensitivite tüm maddeler için benzodiazepin hariç oldukça yüksek olup spesifite benzodiazepin ve morfin için sırasıyla %84 ve %83'tür. İmmün yöntemlerin dezavantajı spesifitelerinin zayıf olması olup çapraz reaksiyon nedeniyle yalancı pozitif sonuç elde edilmektedir (73). Kullandığımız immün yöntemin de spesifitesi morfin ve benzodiazepinler için zayıf olmasa da düşüktür ve bu durum da doğrulama analizlerine gönderilen örnek sayısının gereksiz artışına neden olmaktadır.

Çalışmamızın birinci amacı; trafikte uyuşturucu ve/veya uyarıcı madde kullanımının taranması amacıyla kullanılmaya başlanan tükürükte uyuşturucu madde tarama cihazının tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesiydi.

POCT cihazlarının örnek tipi olarak daha çok oral sıvı kullanılması nedeniyle pratik bir şekilde olay yerinde analize olanak sağlaması, analiz süresinin kısa olması ve kullanımını kolay olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak eşik değer konsantrasyonlarında yeterli

sensitivite ve spesifiteye sahip olmaması, kalitatif olup doğrulanmaya ihtiyaç duyulması, maddeye değil madde sınıfına spesifik olması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

POCT cihazlarının analitik performanslarını ve trafikte kullanımını değerlendiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Edwards ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada trafikte POCT cihazının kullanımının faydalı olduğunu değerlendirmiştir (125). Çok merkezli çalışmalar olan ROSITA (9 farklı cihaz) ve DRUID (8 farklı cihaz) projelerinde ise POCT cihazlarının güvenirliği sınırlı bulunmuştur (126). Blencowe ve ark. 8 farklı POCT cihazının tanısal yeterliliği değerlendirmiş ve taramada kullanılan POCT cihazlarının performanslarının değerlendirilmesinde kötüye kullanılan maddelerin prevalansına dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (127). POCT cihazlarının analitik performansını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. POCT yönteminin immün yöntem olması nedeniyle kullanılan aglütinasyon reaksiyonları, kromojenik antikorlar, kromojenik ilaç konjugatları, floresan antikor konjugatı veya floresan ilaç konjugatı gibi faktörler yöntemin performansını etkilemektedir (126). Çapraz reaktivite ile yalancı pozitif sonuçların elde edilmesi POCT yönteminin performansını olumsuz etkilemektedir. POCT cihazlarının cut-off limitleri genelde üretici firmaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Walsh rehberine göre madde kötüye kullanımı analizinde kullanılan POCT cihazlarının cut-off konsantrasyonları maddenin terapötik aralığındaki alt seviyeyi saptayabilir özellikte olmalıdır (126). Çünkü POCT ile madde taraması yapılırken kalibre edilen konsantrasyonların üstünde değer elde edilmesi maddenin pozitif olduğunu ve altında değer elde edilmesi maddenin negatif olduğunu ifade eder ancak maddenin veya metabolitinin varlığını ekarte ettirmez.

Çalışmamızda, ülkemizde halen trafikte madde kötüye kullanımı taramasında kullanılan UTC Armas Elektronik Tükürükte uyuşturucu madde test cihazının analitik performansını plazmada LC-MS/MS doğrulama yöntemi ile karşılaştırmak suretiyle değerlendirdik. Tükürükteki madde konsantrasyonlarının yakın zamanda madde kullanımını göstermesi açısından plazma konsantrasyonları ile büyük oranda uyumlu olması nedeniyle madde kötüye kullanımının ve tükürük testinin tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesinde maddelerin plazma LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları kullanılmıştır (125). Klinik sensitivite ve spesifite değerleri hesaplanırken; rutin pratikte karşılaşılacak durumu net olarak yansıtmak için pozitif negatif ayrımında her yöntemin kendi cut off değerleri kullanılmış; tartışma bölümünde uyumsuz sonuçlar değerlendirilirken tükürük:plazma oranları dikkate alınarak açıklamalar yapılmıştır (Tablo 4).

Maddelerin kandan tükürüğe geçişini maddenin pKa, proteinlere bağlanma, yağda çözünme özelliği, moleküler ağırlığı, uzaysal konfigürasyon gibi özellikleri ve maddenin toplanma metodu etkilemektedir (70, 128). Bu faktörlerin içinde en önemlisi pKa değeri olup tükürüğün pH değeri kandan daha düşük olması nedeniyle bazik maddeler olan amfetaminler, kokain ve opiyatlar tükürükte daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurken asidik maddeler örneğin benzodiazepinler daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (128).

Tartışmanın bu bölümünde ilk olarak tükürükte POCT ile yapılan analizlerin madde özelinde performansı değerlendirilecektir.

Opiyat

Çalışmamızda opiyat analizinde tükürükte morfin ile plazmadaki opiyat-opioid grubu bileşikler (eroin, 6-MAM, morfin, hidromorfon, hidrokodon, kodein, oksimorfon, oksikodon, metadon, EDDP, buprenorfin, tebain) değerlendirilmiştir. Opiyat analizinde önemli sorunlardan biri opiyat analitlerinin eroin, kodein, oksikodon, buprenorfin, hidromorfon ve hidrokodon dahil olmak geniş yelpazede olmasıdır. Opiyat analizinde plazma ve tükürük için tespit pencereleri benzer olup tükürük örneği madde toksikasyonunu iyi yansıtması nedeniyle trafikte madde taranması açısından idrara göre daha iyi bir matrikstir. Ancak tükürükte opiyatların yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle tek doz opiyat kullanımından sonra tükürük örneklerinde pozitif opiyat sonucu elde edilme olasılığı idrara göre daha düşüktür (129). Çalışmamızda tükürükte opiyat analizi ile 3 YN sonuç elde edilmiş ve YP örnek sayısı 0 olarak belirlenmiştir. YN elde edilen 3 kişinin idrar sonucu LC-MS/MS ile pozitif bulunmuştur. Bu kişilerin ikisinde sadece plazma örneğinde morfin ve hidromorfon tespit edilmiştir. YN elde edilen 2 kişi en son eroin kullanımını (folyo yoluyla) <48 saat ve >72 saat önce olarak beyan etmiştir. Bu örneklerden <48 saat için morfin tespiti için kişilerin beyanı ile örnek alım zamanı uygundur, çünkü morfin ilk 24 saatte plazmada pozitifken idrarda 48 saatten sonra saptanmaktadır. Ancak >72 saat olarak beyan eden kişinin sonucu ile beyanı uyumsuz olup son kullandığı maddeyi THC olarak beyan etmiştir. YN sonucu olan üçüncü kişi ise 6-12 saat önce eroin kullandığını (enjeksiyon yoluyla) beyan etmiş, idrarında morfin, kodein ve hidromorfon ve plazmasında morfin saptanmıştır. Bu kişi kronik kullanıcı olarak değerlendirilmiş olup idrarında 48 saatten önce morfin tespit edilmiştir. Ayrıca morfin için folyo yoluyla kullanımda tükürük:plazma oranı 0,8–154,2 (34, 35) ve IV kullanımda 0–1,8 (36) olarak raporlanmış olup YN sonuç elde edilen kişilerin tükürük:plazma oranının düşük olması ve bu nedenle tükürükteki morfin

konsantrasyonlarının plazmaya göre daha düşük olması nedeniyle negatif sonuç elde edilmiş olabileceği değerlendirilmiştir.

Kokain

AMATEM'e başvuran hastalarda tükürük POCT testinin kokain için sensitivitesi %100 ve spesifitesi %99 bulunmuş olup tükürük testinin tanısal performansı oldukça iyidir. Sadece 1 örnekte YP kokain sonucu elde edilmiştir. Bu kişinin tükürük örneğinde COC pozitif iken plazma ve idrarında COC saptanamamıştır. Literatürde tükürükte BZE seviyelerinin belirlenmesi açısından tükürük:plazma oranının çalışmalar arası farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Langel ve ark., (130) kokain ve metabolitleri için tükürük:plazma oranlarını 1,7-17 , Wille ve ark., BZE için 0,2-11 kokain için 4-119 (32), Samyn ve ark., kokain için 15-36 ve BZE için 0,6-1,3 (34) olarak raporlamış olup bu çalışmalardan hareketle ortalama tükürük:plazma oranları kokain ve BZE için ilk birkaç saat için >1 olarak belirtilmiştir. Dolayısıyla tükürükte YP COC bulunmasının nedeninin kokainin tükürük:plazma oranının yüksek olması olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca YP kokain sonucu olan gönüllünün anket verilerine bakıldığında rivotril (klonazepam) ilacından 2 gün içinde 20 tablet ve Lyrica (pregabalin) ilacından 1 gün içinde 13 tablet kullandığını beyan etmiş olup kokain kullandığına dair beyanda bulunmamıştır. Bu ilaçlar ile kokain etkileşimine dair literatürde bulgu yoktur.

Kokain gibi bazik maddeler tükürüğün stimüle edilmesi (ör; sitrik asit şekeri) durumunda tükürüğün pH'sının artması ve iyon tuzağı nedeniyle tükrük:plazma oranı (0.5-3.0) azalır. Stimüle edilmeyen tükürükte bu oranın 5 veya daha fazla olduğu raporlanmıştır. Tükürük pH'sının düşmesi durumunda da tükürükteki bazik maddelerin konsantrasyonu artar. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerden örnek vermeden önce yiyecek veya içecek alanlar çalışmadan dışlanmıştır. Dolayısıyla stimülasyonun neden olabileceği YN'lik elimine edilmiştir.

Amfetamin

Çalışmamızda amfetamin analizi ile 4 YP sonuç elde edilmiştir. Amfetaminler zayıf bazik özellikte bileşikler olması nedeniyle tükürükte iyon tuzağına uğrar. Tükürükteki seviyeleri plazmadan daha yüksektir ve tespit penceresi geniştir (39). Çalışmamızda 4 kişide YP sonuç elde edilmesinin nedenlerinden biri amfetamin tükürük:plazma oranının 2,8-15,3

arasında değişmekte olup tükürükteki amfetamin seviyelerinin plazmaya göre daha yüksek olmasıdır (39).

Amfetaminin kötüye kullanımı sonucu tükürük testinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birinin ağız kuruluğu olduğu belirtilmiştir. Amfetamin kullandığını beyan eden gönüllerde tükürük testi gerçekleştiilirken 1 kişinin ağız kuruluğunun şiddetli olması ve yetersiz tükürük salgısı nedeniyle test iptal edilmiştir. Bazı hastalarda da tükürük salgısının azlığı nedeniyle tükürük testinin analiz süresi uzamıştır (129).

Çalışmamızda metamfetamin/MDMA analizi ile 5 YN sonuç elde edilmiştir. 5 YN sonuçtan 4'ünün idrar ve plazmasında MDMA saptanırken tükürük testinde negatif sonuçlanmıştır (Tablo 24). MDMA için tükürük:plazma oranı 0,7–24,3 (40) arasında değişmekte olup oranlar bireyler arasında değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda YN sonuç elde edilen kişilerden 2'si ekstazi(MDMA) tabletini en son kullanım zamanını 24 ve >72 saat olarak beyan etmiştir. MDMA ve MDA'nın tükürük:plazma oranı dikkate alındığında bu bileşiklerin tükürükten elimine olma zamanından geçtikten sonra tükürük numunesi alındığı düşünülmüştür (Şekil 9 B). Ayrıca metamfetamin/MDMA için tükürük testinin cut-off limiti 50 ng/mL olup tükürük analizi ile YN sonuç elde edilmesinin nedenleri; tükürük:plazma oranlarının metamfetamin/MDMA için düşük olmasına bağlı olarak LC-MS/MS ile bulunan plazma konsantrasyonlarının tükürükteki konsantrasyonlardan yüksek olması ve gönüllülerden elde edilen örneklerinin metamfetamin/MDMA taraması için uygun zamanda alınmaması olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla tükürükte metamfetamin/MDMA konsantrasyonlarının POCT yönteminin cut-off limitinin altında olması nedeniyle YN olan 3 sonuç GP olarak bulunmamış olabileceği düşünülmüştür.

Esrar

AMATEM'e başvuran hastalarda tükürük analizi ile GP Delta-9-THC sonucu elde edilmemiş olup tüm sonuçlar GN'tir. Maddeler sigara şeklinde kullanıldığında oral kullanıma kıyasla genellikle tükürükte kana göre daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Maddelerin tükürük ve kanda dağılım oranları birçok madde için büyük varyasyon göstermektedir. Langel ve ark. THC için tükürük:plazma oranlarını THC için 14, amfetaminler için 19-22 olarak raporlarken, başka bir çalışmada THC için bu oran 0,01-569 arasında rapolanmış olup bizim çalışmamızda kullandığımız oran 1,2'dir. Dolayısıyla

maddeler için tükürük:plazma oranları zamanla değişmekte ve çalışmalar arasında farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda tükürük veya plazmada Delta-9-THC seviyeleri 25 ng/mL'den fazla olan örnek bulunmaması nedeniyle sonuçlar GN olarak raporlanmıştır. Literatürde THC'nin sigara olarak içilmesinden sonra tükürükteki konsantrasyonlarının ilk 2-4 saatte hızla düşmekte olup THC içildikten birkaç saat sonra idrarda tespit edilemediği belirtilmiştir (131, 132). Cone ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1 veya 2 tane esrar sigarası içiminden sonra 500 µg/L konsantrasyonunu aşan örneklerde seviyelerin 7. saatte 10 µg/L'ye düştüğü ve bu süre boyunca tükürük THC konsantrasyonlarının plazma THC konsantrasyonlarından yüksek olduğu belirtilmiştir (133). Ayrıca esrar sigarası içiminden sonra 1. Saatte yapılan tükürük ölçümünde 100 µg/L olarak bulunan THC seviyelerinin birkaç saat sonra 1 µg/L'den daha düşük seviyelere indiği belirlenmiştir (54). Yaptığımız anket verilerine göre <6 saat önce 1 kişi skunk (sentetik esrar) ve 1 kişi esrar sigarası kullandığını beyan etmiştir. Esrar kullanan kişi 15 yıldır kronik kullanıcı olup en son 3-4 tane sigara içtiğini beyan etmiş ancak bu kişinin plazmasında Delta-9-THC saptanmamış olup 11-OH THC ve THC-COOH seviyeleri sırasıyla; 5,4 ve 59,66 ng/mL olarak saptanmıştır. <6 saat önce sentetik skunk kullanan kişide de Delta-9-THC saptanmamış olup 11-OH-THC ve THC-COOH seviyeleri sırasıyla 4,84 ve 48,47 ng/mL olarak saptanmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda da belirtildiği üzere bu çalışmada tükürükte GP Delta-9-THC sonucu elde edilmemesinin nedenleri; esrar sigarası içildikten 2-4 saat içerisinde tükürük örneği verilmemiş olması ve kullanılan cut-off limitinin (25 ng/mL) maddelerin pozitif olarak saptanması için yüksek olması olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan POCT testi Emniyet Genel Müdürlüğü Trafik Daire Başkanlığı'nın şartnamesinde belirtilen özelliklere göre tasarlanmıştır. Burada amaç trafikte esrar etkisi altında araç kullanan kişilerin doğru saptanması olduğu için 25 ng/mL cut-off limiti belirlenmiştir ve bireylerin yakın zamandaki madde kulanımı taranmaktadır.

Çalışmamızda hastaların %65'i esrar kullanıcısı olup alkol kullanımına da evet yanıtı vermiştir. Maseda ve ark. tarafından esrar içiminden hemen sonra içilen 200 mL biranın 1. saatte ölçülen THC konsantrasyonlarını düşürdüğü raporlanmıştır (134). Dolayısıyla bu hastaların esrar kullanımından sonra alkol kullanmalarının da THC konsantrasyonlarının düşmesine katkıda bulunabileceği değerlendirilmiştir.

Benzodiazepinler

Çalışmamızda tükürük analizi ile GP benzodiazepin sonucu elde edilmemiştir. Benzodiazepinlerin etki gücü farklı olan çok sayıda ilaçtan oluşması, konsantrasyonlarının ve stabilitelerinin düşük olması ve yüksek oranda lipofilik olmaları gibi nedenlerden dolayı oral sıvıda analizleri zordur (71). Benzodiazepinlerin asit pKa değerleri ve plazmadaki proteinlere bağlanma oranlarının yüksek olması (%95-99) nedeniyle tükürük:plazma oranı düşüktür (0,01–0,08) (135). Yaygın kullanılan uzun etkili benzodiazepinlerden diazepam (pKa 3,3) ve metabolitleri, tükürükte 2-5 µg/L konsantrasyonlarında bulunur ve tükürük:plazma oranı 0,02'dir. Kronik diazepam kullanıcılarında tükürük:plazma oranı diazepam için 0,016 ± 0,003, nordiazepam için 0,029 ± 0,01 olarak rapor edilmiştir (131). Tükürükte benzodiazepin seviyelerinin düşük olması ve özellikle klonazepam ve diazepamın deteksiyon sürelerinin kısa olması nedeniyle tükürükte benzodiazepin tespit edilebilmesi için sensitif metotlar kullanılmalıdır (131, 136).

Tükürükte nordiazepam için cut-off değeri üretici tarafından 20 ng/mL olarak belirlenmiş olup tükürük:plazma oranına göre plazmadaki değerinin yaklaşık olarak 2000 ng/mL (benzodiazepin cut-off 20 ng/mL x 100=2000 ng/mL) olması durumunda tükürükte pozitif test sonucu beklenir. Bakke ve ark. tükürükteki benzodiazepinlerin kana göre daha düşük seviyelerde bulunduğunu tespit etmiş olup çalışmamızla aynı görüşü savunmaktadır (137). Çalışmaya dahil edilen örneklerin hiçbirinde nordiazepam plazma değerinin 2000 ng/mL'yi geçmemesi nedeniyle GP sonuç elde edilememiştir. En yüksek plazma diazepam düzeyi 988 ng/mL olup tükürük testi sonucu negatif elde edilmiştir. YN sonucun nedenleri; tespit süresinin kısa olması nedeniyle ölçüm için uygun zamanda örnek alınmaması, benzodiazepinlerin kandaki plazma proteinlerine fazla miktarda bağlanmış olup tükürüğe daha düşük seviyede geçmiş olması olarak değerlendirilmiştir. Temte ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diazepamın tükürükte 6 gün, alprazolam ve metabolitlerinin ise 26 saate kadar tespit edilebildiği raporlanmıştır (72). Ancak bu çalışmada LOQ=0,5585 ng/mL kullanılmıştır. Ancak kullandığımız tükürük testinde trafikte algıyı bozacak benzodiazepin düzeylerinin tespit edilmesi hedeflendiği için, GP sonuçların elde edilmesi için belirlenen cut-off limitini geçmesi gereklidir.

Kullandığımız tükürük POCT cihazının plazma LC-MS/MS yöntemi ile uyumu değerlendirildiğinde; THC ve benzodiazepin grubu maddeler için POCT cihazının cut-off

limitleri düşürüldüğü takdirde GP sonuçların elde edilmesi mümkündür. Örneğin esrar grubu için THC-COOH'a spesifik hedef antikor kullanılsaydı ve SAMHSA'nın da tükürük tarama testi için önerdiği cut-off limiti olan 4 ng/mL seçilseydi 35 örnekte GP sonuç elde edilebilirdi. Metamfetmin/MDMA testi için POCT cihazının cut-off limiti düşürüldüğünde YN sonuç sayısının azalacağı düşünülmektedir. Diğer parametreler için seçilen cut-off limitleri plazma ile uyumludur. Ancak tükürük testinin kullanım amacı trafikte madde taranmasında bireyin madde etkisi altında bulunup bulunmadığının doğru belirlenmesidir. Dolayısıyla trafikte kullanılan POCT cihazı ile taranan maddelerin cut-off limitleri, bireyin etki altında olduğunu tespit edecek düzeyde ve spesifitesi yüksek olacak şekilde ayarlanmıştır. Trafikte kullanılan cut-off limitlerinin düşürülmesi durumunda algısı bozulmayan ama madde kullanan kişiler tespit edilecek, daha da önemlisi cut off değerinin düşürülmesi nedeniyle spesifite da azalacağı için madde kullanmayan bir kişi yanlışlıkla madde kullanmıştır olarak değerlendirilebilecektir. Madde kullanımının yasa dışı olduğu ülkemizde bir bireyin yanlış olarak madde kullanımı ile itham edilmesi, telafisi mümkün olmayan mağduriyetlere yol açabilecektir. Sonuç olarak tükürük testinin yasadışı maddeler için spesifitesinin %96-100 arasında olması nedeniyle seçilen cut-off limitlerinin kullanım amacına uygun olduğu değerlendirilmiştir (Tablo 23).

Çalışmamızın ikinci amacı; AMATEM kliniklerinde kullanılan ve tarama yöntemi olarak kabul edilen idrar immünoassay yönteminin tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesiydi. İmmünoassayler, idrarda madde kötüye kullanımı taraması için yaygın olarak kullanılır; ancak, spesifitelerinin düşük olması ve yaygın olarak kullanılan ilaçlarla ortaya çıkan çapraz reaksiyon bu yöntemler için devam eden bir sorun haline gelmiştir. İmmünoassay analizinde çok sayıda faktör çapraz reaksiyona neden olmaktadır. Kullanılan yöntemdeki antikorların veya reaktiflerin bileşimindeki değişiklikler nedeniyle çapraz reaksiyonlar farklılık göstermektedir. Bu noktada immün yöntemin seçimi önemli olup seçilecek yöntem laboratuvardaki mevcut cihaza, kullanım amacı gibi faktörlere bağlıdır.

Laboratuvar uzmanının immün yöntem ile madde analizinde dikkat etmesi gereken durumlar bulunmaktadır. Laboratuvar uzmanı kullandığı yöntemin kalibratör ve kontrollerdeki hedef analit veya analitlerin konsantrasyonlarının farkında olmalı, kit prospektüslerini kontrol etmeli ve gerektiğinde üretici ile iletişime geçip prospektüsleri güncellemesini talep etmelidir. Çapraz reaksiyon çalışmaları değerlendirildiğinde, üreticiler tarafından potansiyel interferan maddelerin klinik kullanım dozlarından daha düşük

seviyeleri çapraz reaksiyon açısından değerlendirilmekte olup bu önemli bir sorundur. Ayrıca üreticiler tarafından endojen metabolitlerin çapraz reaksiyona etkisi genelde değerlendirilmemektedir (138). Çapraz reaksiyon için lottan lota da değişiklik gözlenebilmektedir. Üreticinin çapraz reaksiyon için kullandığı reaktif miktarlarıyla farklı cihazlarda kullanılan reaktif miktarları değişkenlik gösterebilir. İdeal olanı laboratuvar uzmanının en yaygın çapraz reaksiyon veren maddeleri kullanarak kendi cihazı veya yönteminde çapraz reaksiyon çalışmalarını kendisinin uygulamasıdır.

İmmün yöntemler ve interferansları opiyatlar, kokain, amfetaminler, THC ve benzodiazepinler için sırasıyla değerlendirilecektir.

Opiyat

İdrarda opiyatların taranmasında en sık kullanılan teknik immünoassay yöntemdir. Yakın zamanda eroin kullanımı 6-MAM seviyelerinin tespit edilmesiyle belirlenir, ancak 6-MAM yarı ömrü kısa olup sabah ilk idrardan sonra genelde tespit edilemez (81).

SAMHSA 2010 yılında idrarda 6-MAM'ın taranmasında cut-off limitini 10 ng/mL olarak belirlemiştir. Opiyat ölçümünde kullanılan immünoassayler idrarda 6-MAM seviyelerini morfin kadar iyi analiz edemeyebilir ve yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir. Holler ve ark., 6-MAM düzeylerinin idrarda tespiti için CEDIA ve Roche Abuscreen Online opiyat yöntemlerini karşılaştırmıştır. GC-MS yöntemiyle 6-MAM varlığı saptanan 87 idrar numunesi CEDIA ile yeniden analiz edildiğinde tüm numuneler pozitif olarak sonuçlanırken Roche Abuscreen Online ile 12 numune negatif olarak sonuçlanmıştır (139). Borriello ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 6-MAM'ın idrar ve kanda analizinde EMIT® II Plus ve LC-MS/MS yöntemleri kullanılmış ve idrarda iki yöntemin doğruluğu, sensitivitesi ve spesifitesi %100 olarak, kanda ise sensitivite %95 olup sensitivite ve spesifite %100 olarak değerlendirilmiştir. 6-MAM analizinde kullanılan EMIT yöntemi idrar için geliştirilmiş ancak kanda da oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir (81). Mevcut çalışmada opiyatlar için immün yöntemin sensitivitesi ve spesifitesi sırasıyla % 97 ve % 83 olarak bulunmuştur. YN opiyat sonucu elde edilen kişinin idrar LC-MS/MS LGM ile analizinde 6-MAM pozitif bulunmuş olup bu sonuç kişinin eroini son kullanma zamanı ile de uyumludur.

AMATEM'de immünoassay ile opiyat analizinde kullanılan cut-off limiti 300 ng/mL olup bu yöntemde aplikasyona göre 300 ve 2000 ng/mL cut-off limitlerinde çalışılabilmektedir. Cut-off limiti olarak 2000 ng/mL alındığında elde edilen YP sonuçlardan 8 tanesi GN olarak sonuçlanmakta ve yöntemin spesifitesi % 83'ten %95'e çıkmakta ancak sensitivitesi (%97) değişmemektedir. Dolayısıyla bu yöntemin spesifitesi opiyat sonuçları için 2000 ng/mL'nin altında düşüktür.

AMATEM'de opioid bağımlılığı tanısı alan hastaların tedavisinde bileşiminde nalokson ve buprenorfin bulunan Suboxone® ilacı kullanılmaktadır. Buprenorfin düzeyleri opiyat analizinde morfin antikorlarının kullanıldığı immünoassaylerle tespit edilemez. Suboxone® tedavisinin uygunluğunun takibinde idrarda buprenorfini tespit edebilen spesifik immünoassay kullanılmalıdır. Hull ve ark., 5 ng/mL cut-off düzeyinde idrarda buprenorfin düzeyinin tespit edilmesinde CEDIA buprenorfin immünoassay yöntemi ile GC-MS yöntemini karşılaştırmış ve %97,9 oranında uyum elde etmiştir (140). Nalokson ise opioid doz aşımının tersine çevrilmesi için uygulanır ve opioid reseptörlerine bağlanarak opioidlerin etkilerini bloke eder. Nalokson ile opiyat immünoassayin çapraz reaksiyonu sonucu yalancı pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Siemens'in EMIT madde kötüye kullanım idrar çapraz reaktivite listesinde 11.000 ng/mL'den daha yüksek nalokson konsantrasyonunun opiyat analizi ile çapraz reaksiyona girebileceği gösterilmektedir (86). Ancak çalışmamızda immünoassay yöntemi ile YP opiyat sonucu elde edilen kişilerin örneklerinin LC-MS/MS ile analizinde pozitif buprenorfin veya nalokson sonucu elde edilmemiştir. YP opiyat sonucu olan kişilerin 5'inin opiyata ilaveten diğer yasadışı maddeleri kullandığı tespit edilmiştir. Birçok immünoassay yönteminde opiyat ve opioid analizi için kalibrasyon yapılırken morfin kullanılır ancak morfin nonspesifiktir. Bu durumda morfin benzeri opioidler ve bazı metabolitlerle çapraz reaksiyon gözlenebilir. Dolayısıyla YP sonuçların bu sebeple elde edilebileceği değerlendirilmektedir.

Opiyatların immünoassay ile analizinde yalancı pozitif sonuçlara neden olan önemli interferanslardan biri haşhaş tohumlu besinlerin tüketimidir. Haşhaş tohumu içeren besin tüketiminden 24 saat sonra dahi cut-off limiti 300 ng/mL olan opiyat tarama testinde test sonucu pozitif gözlenir. Ancak haşhaş tohumu içeren 1-2 adet kek, çörek veya simit yedikten sonra cut-off limiti 2000 ng/mL olan opiyat tarama testinde test sonucunun pozitif olma olasılığı çok düşüktür. Dolayısıyla tarama testindeki opiyat seviyesinin 2000 ng/mL'den fazla olması durumunda, haşhaş tohumu tüketimi dışlanabilir şeklinde değerlendirilmiştir

(2). Samano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada haşhaş tohumunun çiğ veya pişirilmiş olarak tüketimi sonrasında 2000 ng/mL cut-off limiti kullanan immünoassay ile idrarda morfin analizinde morfin seviyeleri 2000 ng/mL'nin altında tespit edilmiştir. Buna karşılık, Mule ve Casella 2 adet haşhaşlı simit tüketiminden sonra morfin seviyelerinin 2000 ng/mL'yi aştığını raporlamıştır. Diğer çalışmalarda 9–21 g ve 40 g çiğ haşhaş tohumlarının alımından sonra idrardaki morfin konsantrasyonlarının 2000 ng/mL'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (141, 142).

Özbunar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 10 gönüllü 3 farklı haşhaş türüne ait (morfin içerikleri; 1,9, 4,0 ve 2,6 mg/kg) 100 g haşhaş tohumu ezmesi tüketmiş. Gönüllülerin idrar örneklerinde CEDIA yöntemi (cut-off 300 ve 2000 ng/mL) ile opiyat ve 6-MAM (cut-off 10 ng/mL) analiz edilmiş ve sonuçlar GC-MS ile karşılaştırılmıştır. 300 ng/mL cut-off kullanıldığında opiyat konsantrasyonları 48 saate kadar, 2000 ng/mL kullanıldığında ise 12 saate kadar pozitif olarak saptanmıştır. Tüm idrar örneklerinde tebain tespit edilirken 6-MAM tespit edilmemiştir.

Smith ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 19 gönüllüye 31,4 mg morfin ve 6 mg kodein içeren 45g haşhaş tohumu verilmesinden sonra idrarda morfin konsantrasyonları ≥2,000 ng/mL iken ikinci dozdan 19 saat sonra aynı cut-off limiti için hiçbir örnek kodein için pozitif olarak sonuçlanmamıştır. Bu çalışmada Roche Opiates II immunoassay sonuçları GC-MS ile karşılaştırılmıştır ve idrarda morfin konsantrasyonlarının 2000 µg/L ve 300 µg/L cut-off limitleri için sırasıyla % 26,6 ve % 83,4 olduğu ve pik seviyelerinin 6,6. saatte elde edildiği raporlanmıştır (143).

Bu çalışmalar ile idrarda opiyat analizine haşhaş tüketimin etkisi açısından eğer 6-MAM immünoassay ile analiz imkânı yoksa başka markerların kullanılabileceğini göstermektedir. Bu amaçla; asetil- kodein tespit edilmesi, morfin/kodein oranının >1 olması, morfin seviyelerinin >2000 ng/mL olması, tebainin tespit edilememesi, ATM4G'nin (asetillenmiş-tebain-4-metabolit glukuronid) tespit edilmesi durumunda haşhaş kullanımına bağlı yükseklik dışlanır. 6-AC plazma yarı ömrü 237 ± 18 dakika olup idrarda yaklaşık 8 saate kadar tespit edilebilir. 6-AC, sokakta kullanılan eroinde (safsızlık durumunda) bulunup farmasötik eroin, haşhaş tohumu ürünleri, afyon preparatları ve özel ilaçlarda bulunmadığı için yasadışı eroin kullanımı için spesifik bir belirteç olarak kabul edilebilir. Tebain haşhaş kullanımı sonucu idrarda saptanırken eroin kullanımı sonrası idrarda saptanmaz. ATM4G eroin kullanımını sonucu idrarda tespit edilen spesifik bir biyomarkerdır (144). Haşhaş

kullanımı sonucunda idrarda tespit edilmemesi nedeniyle eroin ve haşhaş kullanımı arasında ayrım yapılmasına olanak tanır (145). Ancak çalışmamızda tebain seviyeleri pozitif olan hiç bir sonuca rastlanmamış olup elde edilen YP sonuçların haşhaş kullanımına bağlı olmadığı değerlendirilmiştir.

Opiyat immünoassaylerde yalancı pozitif sonuçlara neden olan diğer interferanslar arasında bazı florokinolon antibiyotikler yer almaktadır. Baden ve ark. tek doz levofloksasinin opiyat enzim immünoassay ile etkileşerek yalancı pozitif sonuca neden olduğunu ve levofloksasinin klirensine bağlı olmakla birlikte 24 saat boyunca opiyatların pozitif kaldığını raporlamıştır(146). Levofloksasin dışında ofloksasin ve pefloksasin gibi kinolonların da yalancı pozitif sonuçlara neden olduğu belirtilmiştir (147).

Rifampisin (tüberküloz tedavisinde kullanılır) kullanan hastalarda yapılan opiyat taramasında Cobas Integra analizöründe (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) KIMS yöntemi kullanıldığında yalancı pozitif sonuçlar raporlanmıştır (148).

Morfin ile yapısal benzerliğinden ötürü semisentetik opioid olan folkodin (antitusif) immünoassaylerle çapraz reaksiyon verir ve tek oral terapötik dozda dahi 10 güne kadar pozitif sonuçlar elde edilir. Ayrıca kromatografik analizde de pozitif morfin sonuçları elde edilmiştir (145). Ancak çalışmaya dahil edilen kişiler bahsedilen ilaçların kullanıldığına dair beyanda bulunmamıştır.

Davis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KIMS (Roche Cobas Integra 400 analizörü) yöntemi ile yapılan opiyat analizinde 13 adet yalancı negatif sonuç elde edilmiştir. Bu 13 örnekte hidrokodon, hidromorfon ve dihidrokodein bulunmakta olup yalancı negatif sonuçlar bu bileşikler ile meydana gelen zayıf çapraz reaksiyon nedeniyle olmuş olabileceği belirtilmiştir (149). Çalışmamızda opiyat analizinde YN sonucu olan 1 örnek bulunmakta olup bu kişinin idrarındaki hidromorfon seviyesi LC-MS/MS LGM yöntemi ile 1865 olarak belirlenmiştir. Çalıştığımız Roche-Cobas 6000 analizörünün opiyat kit prospektüsünde hidromorfon çapraz reaktivitesinin 300 ng/mL cut-off kullanılan aplikasyon için %21 olduğu belirtilmiştir (150). Elde edilen YN sonucun Davis ve arkadaşlarının çalışmasına (149) benzer şekilde hidromorfonun yüksek seviyelerinin oluşturduğu zayıf çapraz reaktiviteden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Kokain

Kokain analizinde kullanılan immün yöntemlerin sensitivite ve spesifiteleri genelde iyi olarak değerlendirilmektedir (151). Çalışmamızda da bu durum sensitivitenin %100 ve spesfisitenin %99 olmasıyla doğrulanmakta olup kullandığımız immünoassayin performansı oldukça iyidir. Kokain analizinde Armbruster ve ark., yaptığı çalışmada EMIT II ve Abuscreen Online immünoassaylerle pozitif saptanan numunelerin %99'unu GC-MS yöntemi ile de pozitif olarak saptamış ve bu nedenle kokain analizinde kullanılan immünoassaylerin sensitivite ve spesifitelerinin iyi olduğunu belirtmiştir.

Kokainin immün yöntemler ile analizinde YP sonuçlara neden olan maddelerin listesi Tablo 12'de verilmiştir. Ayrıca immün yöntemler ile pasif kokain maruziyetinin tespit edilemediği, Latin Amerika'dan gelen çay ürünlerinde (yerba mate gibi) yalancı pozitif sonuçların elde edildiği bildirilmiştir. Koka çayı içildikten 36 saat sonra Abbott AxSym immünoassay sistemi kullanılarak yapılan analizde BZE pozitif olarak bildirilmiştir (152). Mazor ve ark., bir bardak koka çayı içirilen beş sağlıklı gönüllünün idrar örneklerinde kokain çayının tüketiminden 2 saat sonra BZE'nin pozitif olduğunu ve beş gönüllüden üçünün idrar örneğinde pozitif sonuçların 36 saate kadar sürdüğünü ve ortalama BZE seviyelerinin 1 ng/mL olarak tespit edildiğini bildirmiştir (153). Koka çayı tüketimi ülkemizde pek yaygın olmayıp bu duruma bağlı YP sonuç beklenmemektedir.

COC analizinde numune bütünlüğünü bozucu maddeler olan levamizol ve lidokain bileşiklerinin tespiti önemlidir. Kim ve ark. EMIT II Plus (cut-off 300 ng/mL) ve LC-MS (cut-off 7,8 ng/mL) yöntemi kullanarak kokain analizinde lidokain ilacının (lokal anestezik) çapraz reaksiyona etkisini değerlendirmiştir. Lidokain, kokain analizinde numune bütünlüğünü bozucu olarak kullanılmakta olduğu için YP sonuçlara neden olabileceği değerlendirilmiş olup yapılan analiz sonucunda hiçbir örnekte YP sonuç elde edilmemiştir. Çapraz reaksiyon görülmemesinin nedeni lidokainin ekgonin epitopu ile birleşememesi ve kokainin ester tipte lokal anestezik olup lidokainin amid tipi lokal anestezik olması olarak değerlendirilmiştir (154).

Amfetamin

İmmünoassay ile analizde interferansın en çok gözlendiği madde sınıfı amfetaminlerdir. Çalışmamızda sensitivite ve spesifitenin %100 olması nedeniyle kullandığımız immünoassay yöntemin amfetamin performansının oldukça iyi olduğu belirlenmiştir.

İmmünoassay ile amfetamin analizinde; sempatomimetikler, Vicks Vapoinhaler, H2 reseptör blokeri (ranitidin), antidepresan (fluoksetin, trazodon, bupropiyon), antiaritmik (meksiletin) gibi ilaçların kullanımının interferansa neden oluğu bildirilmiştir [4,5].

Literatürde amfetaminlerin idrarda immün analizleri değerlendirilmiştir. Amfetaminlerin immünoassay ile analizinde CEDIA ve DRI immünoassaylerin Thermo Indiko Plus analizöründe değerlendirildiği Katharina ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metamfetamin ve MDMA testlerinin spesifitesinin iyi olmaması nedeniyle düşük cut-off değerlerinde idrardaki endojen feniletilaminler nedeniyle çapraz reaksiyon gözlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada sadece THC'nin sensitivitesi %91 elde edilmiş, ancak diğer parametrelerin (THC, OPI, COC, AMP, MAMP, MDMA, BENZ) sensitivitesi %100 olarak bulunmuştur. Bunun sebebinin dışlanacak 1 adet hasta örneğinin oksidanlarla muamele edilerek idrar örneğinin saflığının bozulması ve bu örneğin dışlanmamış olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir [7].

İdrarda amfetaminlerin tespitinde 6 immünoassay yöntemin (ADx, AxSYM, EMIT, EMIT N, KIMS, KIMS X) sensitivite ve spesifitisiteleri Verstraete ve ark. tarafından karşılaştırılmış ve sonuçlar LC-MS /MS ile doğrulanmıştır. KIMS X ve ADx yöntemlerinin ROC eğrisindeki eğri altında kalan alanları sırasıyla; 0,972 ve 1,000'dır. Optimal cut-off kosantrasyonları EMIT-N için cut-off konsantrasyonları 271 ng/mL ve AxSYM için 723 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm metotlar için sensitivite %93-95 arasındadır (ADx %100 hariç). Spesifite %88-100 arasında değişmekle birlikte KIMS için %88 ve EMIT N için %100'dür. Yalancı negatif sonuçlar 0-6 arasında değişmekte olup (ADx için 0), (EMIT N için 6) arasında olup yalancı pozitif sonuçlar 0-16 arasında (EMIT N için 0), (KIMS için 16) bulunmuştur [9].

İmmün yöntemlerde yalancı pozitif amfetamin sonuçlarının minimuma indirilmesinde çeşitli yaklaşımlar uygulanır. Bu yaklaşımlardan biri pozitif örneklerin hepsi farklı bir üreticiye ait farklı çapraz reaksiyonu olan immünoassay ile tekrarlamaktır. Diğer bir yaklaşım analizden önce kimyasal modifikasyon veya reaksiyon uygulayarak aynı yöntemle analizi tekrarlamaktır. Bu amaçla numuneler bazik solüsyonda sodyum periyodat ile muamele edilir. Bu yaklaşımda çapraz reaksiyona neden olan efedrin, psödoefedrin ve fenilpropanolamin gibi bileşiklerin OH grupları oksitlenir ve çapraz reaksiyon elimine edilir. Diğer bir yaklaşım ise amfetamin/metamfetamin içeren numuneleri çapraz reaksiyona giren bileşiklerden ayırt etmek ve immünoassayın pozitif prediktif değerini arttırmak için seri dilüsyon ve optimal cut-off eğrilerinin kullanılmasıdır [4]. Ancak bizim kullandığımız immünoassay yöntemin tanısal duyarlılığının iyi olması nedeniyle bu yaklaşımlara ihtiyaç kalmamıştır.

Esrar

Çalışmamızda immün yöntem ile THC analizinde YN sonuç sayısı 1 olup spesifite %100'dür. İmmün yöntemlerde spesifitenin genelde düşük olması beklenirken bu yöntemin spesifitesi mükemmel bulunmuştur. THC analizi için değerlendirilen immünoassay yönteminin performansını başarılı olarak değerlendirdik. İmmünoassay ile THC analizinde genelde Tablo 12'de yer alan ilaçlarla etkileşim nedeniyle YP sonuçlar elde edilirken bu çalışmada elde edilmemiştir.

Benzodiazepinler

İmmün yöntemlerin benzodiazepinleri saptama özelliği bu grup ilaçların etkinliği, yapısı, metabolizması ve eliminasyonundaki varyasyonlar nedeniyle problemli olmaktadır. İmmünassaylerdeki en önemli limitasyon ise farklı yapısal özellikteki benzodiazepin sınıfı ilaçlara kaşı geliştirilmiş antikorların immünoreaktivitesinin farklı olması nedeniyle yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların görülme sıklığının artmasıdır. Dolayısıyla benzodiazepin immünassaylerin sensitivitesi yüksek iken spesifitesi değişkenlik göstermektedir.

Çalışmamızda immün yöntem ile benzodiazepin analizinde YN sonuç sayısı 0 ve YP sonuç sayısı 16 olup spesifite %87'dir. LC-MS/MS LGM yöntemi ile idrarda benzodiazepin

analizinde hiçbir örnekte pozitif sonuç elde edilmemiş ancak sadece plazmada 12 örnekte pozitif benzodiazepin sonucu elde edilmiştir. Ticari LC-MS/MS yönteminde nordiazepam varlığı hiçbir örnekte doğrulanmamıştır. İdrarda LC-MS/MS ile pozitif benzodiazepin sonucu elde edilmemesinin nedenlerinden birini çalışmamızda oksazepam dışındaki diğer metabolitlerin analiz edilmemesi olarak değerlendirdik. Ayrıca kullandığımız immün yöntemin örnekte tespit etmediğimiz ancak mevcut olan diğer benzodiazepinlere veya gönüllünün kullandığı başka ilaca bağlı (Tablo 12) çapraz reaktivite göstermesi nedeniyle YP sonuçlar elde edilmiş olabilir. Hastalara yaptığımız ankette benzodiazepin kullanımına dair beyan bulunmamaktadır. Bu nedenle LC-MS/MS ile elde edilen sonuçların da negatif olması sebebiyle immün yöntemde pozitif bulunan örnekler yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda idrarda LC-MS/MS ile alprazolam, midazolam, lorazepam, flurazepam, klonazepam ve fenazepam gibi ana maddelere ait metabolit analizi yapılmamıştır. Bunun yerine sıkılıkla suistimal edilen klordiazepoksit, diazepam, klorazepat ve prazepam gibi benzodiazepinlerin son metabolizma ürünü olan oksazepam analiz edilmiştir. Benzodiazepinlerin immün analizinde genelde YN sonuçlar elde edilmektedir. Çünkü Benzodiazepin analizinde kullanılan immün yöntemler genellikle oksazepamı hedefler (12). Oksazepam dışında nordiazepam, nitrazepam veya lormetazepam kullanılmaktadır. Ancak oksazepam, veya nordiazepama metabolize olmayan flurazepam, lorazepam, alprazolam, klonazepam ve triazolam gibi benzodiazepin sınıfı ilaçlar immün yöntemle tespit edilemeyebilir. Tüm metabolitleri tespit edebilen bir immün yöntem halihazırda bulunmadığı için yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir. Bizim de çalışmamızda YN sonuç bulunmamasının nedeni LC-MS/MS yönteminde de oksazepam düzeylerine bakmamız benzodiazepinlerin diğer idrar metabolitlerini ölçmemiz olabilir.

Çalışmamızın üçüncü amacı; analizde kullanılan farklı örnek türlerinin analizlere etkisinin değerlendirilmesi idi. Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizinde alım kolaylığı, kullanılan cihaz ve yönteme uygunluk, kısa veya uzun süre önce kullanımın saptanma ihtiyacı gibi nedenlerle farklı örnek tiplerinde analiz yapılır. Bu örnekler idrar, tükürük, kan, saç, ter ve tırnaktan oluşmaktadır.

Uyuşturucu ve uyarıcı madde analizinde tükürük, idrar ve kan matriksinin çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Tükürük ve kan yakın zamanda madde kullanımının ve bireyin madde etkisi altında olup olmadığının değerlendirilmesi açısından

önemlidir. Tükürük örneğinin en önemli avantajı noninvaziv olarak elde edilmesi, POCT cihazlarının olması nedeniyle olay yerinde incelemeye elverişli bir örnek olması ve örneğe madde karıştırılması riskinin düşük olmasıdır. Kan örneğinin en önemli avantajı ise maddenin ana bileşiğinin tespit edilmesi nedeniyle madde bozunması ile klinik korelasyonunun iyi olmasıdır. İdrarda madde metabolitlerinin yüksek konsantrasyonlarda bulunması ve tespit süresinin tükürük ve kana göre uzun olması idrarı diğer matrikslere göre avantajlı kılmaktadır. Ancak, idrara madde karıştırılması riskinin yüksek olması ve idrarın gözetim altında toplanması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Kanın ise en önemli dezavantajı invaziv bir işlem olup flebotomi ile ilgili risklerinin olmasıdır.

Tartışmanın bu bölümünde, bağımlılık yapıcı maddelerin analizinde tükürük, idrar ve kan matrikslerinin özelliklerini madde özelinde değerlendirmeye çalışacağız.

Opiyat

Opiyat madde sınıfı içerisinde en yaygın kullanılan madde eroindir. Eroinin yarı ömrü yaklaşık 2 ile 5 dakika arasında olup hızlı bir şekilde 6-MAM'a ve 6-MAM ise 30 dakika içinde morfine hidrolize edilir. Kandaki yüksek esteraz aktivitesi nedeniyle, 6-MAM bir eroin dozundan sonra 1,5-2 saatten daha uzun süre kanda ölçülemez ve sabah ilk idrardan sonra genelde idrarda tespit edilemez (81). Eroinin önemli bir metaboliti olan morfinin plazmadaki yarı ömrü 2-3 saattir. Ancak kullanılan tespit limitine (LOD 0,6 ng/mL) veya kullanım şekline göre plazmada 24 saate kadar tespit edilmektedir. Kronik kullanıcıların kanında, toplam morfinin (LOD 25 ng/mL) ortalama 29,2 saat (maksimum 5 gün) ve serbest morfinin (LOD 10 ng/mL) 14,4 saat (maksimum 5 gün) tespit edildiği raporlanmıştır (12). 6-MAM tükürükte 0,5-8 saate kadar, morfin 24 saate kadar tespit edilebilmektedir (59, 60). İdrarda morfin genelde son kullanımdan 48-72 saat sonra saptanmaktadır ve kronik kullanıcılarda 11 güne kadar tespit edilmektedir. Ayrıca morfin bazik yapıda ve pKa değeri 8 civarında olduğu için oral alımda gastrointestinal sistemde iyi absorbe olmaması nedeniyle morfinin IV kullanımı oral kullanıma göre daha etkilidir.

Metabolik faktörler (enzim inhibisyonu, genetik polimorfizm vb.), kullanılan matriks, maddenin kullanım şekli ve dozu maddenin tespit zamanını etkilemektedir. Bu yazılanlar dikkate alındığında; eroin analizinde kullanılacak olan metabolitin ve matriksin seçiminde eroinin son kullanım şekli, dozu ve zamanının bilinmesi önemlidir. Akut eroin kullanımından sonra analiz ilk 2 saat içerisinde yapılacaksa kanda ve/veya tükürükte 6-MAM metabolitinin, 2. saat ile 24 saat arasında analiz yapılacaksa kanda ve/veya tükürükte

morfin metabolitinin kullanılması önerilir. Eroinin plazmadaki ve tükürükteki yarı ömrünün kısa olması nedeniyle eroinin son kullanımından 1 gün sonra yapılacak analizlerde idrar örneğinde morfin metabolitinin tespit edilmesi önerilir. Kronik eroin kullanımının değerlendirilmesinde morfinin idrarda tespit süresinin uzun olması (11 gün) nedeniyle idrar en ideal örnek olup eroin analizinde idrar örneğinin kullanılması önerilir.

Çalışmamızda tükürük analizi ile 3 bireyde YN morfin sonucu bulunmuş olup bu sonucun matriks etkisi nedeniyle saptanamadığı değerlendirilmiştir.

Kokain

Kokain, vücutta ana metabolitleri olan BZE ve EME'ye dönüşmektedir. BZE'nin yarı ömrünün (4-7 saat), kokainin yarı ömründen (0,5-1,5 saat) daha uzun olduğu belirlenmiştir (23). Tükürükte kokain 12 saate kadar ve BZE 24 saate kadar tespit edilebilmektedir. Plazmada kokainin 12 saate kadar ve BZE'nin 48 saate kadar tespit edilebildiği ve plazmada kokainin spontan hidrolize uğraması nedeniyle stabilitesinin düşük olduğu belirtilmiştir (155). İdrarda ise kokain BZE olarak 72 saate kadar tespit edilebilmekte olup bu süre kronik kullanıcılarda 22 güne kadar çıkmaktadır (Tablo 8) (10).

Bu yazılanlar dikkate alındığında; akut kokain kullanımından sonra analiz 12 saat içerisinde yapılacaksa kanda ve/veya tükürükte kokain bileşiğinin kullanılması önerilir. Kokain kullanımından sonraki 12-24 saat arasında analiz yapılacaksa kanda ve/veya tükürükte BZE metabolitinin kullanılması önerilir. Kronik kokain kullanımı değerlendirilecekse, idrar örneğinde ortalama 72 saate kadar BZE tespit edilmektedir ve kronik kullanıcılarda BZE'nin 22 güne kadar tespit edilebilmesi nedeniyle idrar matriksinin kullanılması önerilir.

Çalışmamızda tükürük ve plazmada kokain sonuçları uyumlu bulunmuştur. Sadece 3 kişinin idrarında kokain mevcut iken kan ve tükürükte tespit edilememiştir. Bu durumun nedeni kokainin idrarda, tükürük ve kana göre daha uzun süre tespit edilebilmesi olarak değerlendirilmiştir.

Amfetaminler

Amfetamin grubu bileşikler ve bunların sentetik analoglarının (MDMA, MDA) genelde tükürükteki seviyeleri plazmaya göre yüksektir. Tükürükte amfetamin ve metamfetaminler ortalama 24 saate kadar, plazmada 24-48 saate kadar ve idrarda ise 2-4 gün arasında tespit edilmekte olup kronik kullanımda idrarda 6-9 güne kadar tespit edilmektedir (Tablo 6 ve Tablo 8). MDMA, kan ve tükürükte 24 saate kadar tespit edilmektedir ve MDMA kullanımından 36 saat sonra idrar ile atılmaktadır. Amfetaminlerin tükürükte iyon tuzağına uğramaları nedeniyle tükürükteki konsantrasyonları genelde kandaki konsantrasyonlarından yüksektir (40, 68).

Bu yazılanlar dikkate alındığında; ilk 24 saat içerisinde amfetamin veya metamfetamin kullanımı değerlendirilecekse amfetamin, metamafetamin ve MDMA'nın tükürükteki konsantrasyonlarının plazmaya göre yüksek olması nedeniyle tükürük matriksinin kullanılması önerilir. Tükürük örneğinin plazma ile eş zamanlı olarak değerlendirilmesi daha faydalı olacaktır. Amfetaminlerin 6-9 gün gibi kronik kullanımı değerlendirilecekse idrar matriksi tercih edilmelidir ancak MDMA'nın 36 saatten sonra idrarda tespit edilebildiği unutulmamalıdır.

Çalışmamız diğer çalışmalar (32, 156, 157) ile amfetaminlerin tükürükteki konsantrasyonunun plazmaya göre yüksek olması açısından uyumludur. Çalışmamızda tükürükte amfetamin ve metamfetamin/MDMA analizinde sadece idrarda tespit edilen örnek sayısı amfetamin, metamfetamin ve MDMA için sırasıyla 2, 1, ve 2 olarak bulunmuştur. Tespit zamanı matrisklere göre farklılık göstermekte olup idrarda bu maddelerin 6-9 güne kadar tespit edilebilmesi nedeniyle pozitif sonuç elde edildiği düşünülmüştür (Tablo 8) (158).

Esrar

Esrarın tükürükte ana bileşiği olan Delta-9-THC analiz edilen yöntemin tespit limiti, esrarın kullanım şekline göre değişmekle birlikte esrar sigara olarak kullanılması durumunda ortalama 2-4 saate kadar, plazmada THC-COOH olarak 36 saate kadar ve idrarda THC-COOH olarak 87 saate kadar tespit edilmektedir. Kronik esrar kullanıcılarının idrarında THC-COOH metabolitinin 95 güne kadar tespit edildiği raporlanmıştır (Tablo 8).

Bu yazılanlar dikkate alındığında; esrar analizi 2-4 saat içerisinde yapılacaksa tükürük örneğinin kullanılması önerilir. 4-36 saat arasında ise plazma örneği tercih edilebilir. Esrar kullanımından hemen sonra içilen 200 mL biranın 1. saatte ölçülen esrar konsantrasyonlarını düşürdüğünün unutulmaması ve tükürük örneğinde analiz yapılacaksa bireyin alkol alıp almadığının sorgulanması önerilir. Kronik esrar kullanımı değerlendirilecekse idrar matriksinin kullanılması önerilir. Adipoz dokuda uzun süre kalması nedeniyle esrarın son kullanımdan 95 gün sonra bile tespit edilebildiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda tespit zamanının kısa olması nedeniyle tükürük örneğinde pozitif esrar sonucu elde edilememiştir. İdrar ve plazma örneklerinde 35 örnekte THC-COOH saptanmış olup bu iki matriksin esrar tespiti açısından son derece uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

Benzodiazepinler

Benzodiazepinler tükürük, plazma ve idrar matriksleri açısından değerlendirildiğinde, tükürük ve idrardaki tespit zamanı literatürde tam olarak belirtilmemekle birlikte çalışmalara göre farklılık göstermektedir. Temte ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diazepam metabolitlerinin idrarda 11 gün ve tükürükte 6 güne kadar alprazolamın ise idrarda 36 ve tükürükte 26 saate kadar tespit edildiği raporlanmıştır (72). En sık reçetelenen benzodiazepin sınıfı ilaç olan alprazolamın kandaki terapotik aralığı 3-30 ng/mL, diazepamın ise 69-225 ng/mL olarak raporlanmıştır. Nitrazepam, flunitrazepam ve klonazepamın kanda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu ve tükürükteki tespit zamanının kısa olduğu belirtilmiştir (159). Oksazepamın ise idrarda tespit edilme zamanı 24-72 saat olup kronik kullanımda 30-40 güne kadar tespit edilebilmektedir. Benzodiazepinlerin tükürükteki konsantrasyonlarının düşük olması plazmadaki seviyelerinin ve terapotik aralıklarının farklılık göstermesi nedeniyle tükürük ve plazma seviyeleri genelde uyum göstermemektedir. Plazmadaki seviyeleri terapotik aralığın üzerinde olduğunda tükürükte saptanabilmekte ve dolayısıyla tükürük analizi genelde plazma konsantrasyonlarını tahmin etmede kullanılamamaktadır. İdrarda tespit zamanının uzun olması nedeniyle idrarda saptanırken diğer matrikslerde saptanamamaktadır.

Bu yazılanlar dikkate alındığında; benzodiazepin analizinde kullanılan metabolit ve matriks, analiz sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. En sık reçetelenen benzodiazepinlerden diazepam ve alprazolamın tükürükte 6 gün ve 26 saate kadar tespit

edilebildiği bilinmektedir. Ancak tükürükteki konsantrasyonlarının genelde plazmaya göre oldukça düşük olması nedeniyle tükürükte tespit edilebilmesi için ya yüksek dozda benzodiazepin alınması ya da sensitif bir yöntemin kullanılması gerekmektedir. Dolayısıyla tarama amaçlı kullanılacaksa aşırı doz benzodiazepin kullanımı dışında tükürük matriksi ideal bir matriks değildir. Benzodiazepinlerin plazmada yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle akut ve kronik kullanımda plazma örneği tercih edilebilir. Kullanılan benzodiazepine göre plazmada analiz edilecek metabolit farklılık göstermekte olup plazma için ana bileşik ve metaboliti değerlendirilmelidir. Genelde yaygın kullanılan benzodiazepinlerin ortak metaboliti olan nordiazepam veya oksazepam analizde tespit edilir. Ancak bu iki bileşiğe metabolize olmayan benzodiazepin kullanımı mevcutsa yalancı negatif sonuç elde edilebilecektir. Plazmada benzodiazepinleri değerlendirirken kısa, orta ve uzun etkili bileşiklerin farklı yarı ömre sahip olduğu da unutulmamalıdır (Tablo 3). Benzodiazepin kullanımı 24 saatten sonra değerlendirilecekse idrar matriksi tercih edilebilir. İdrarda benzodiazepin analizinde sık kullanılan metabolit oksazepam olup kronik benzodiazepin kullanıcılarında 30-40 güne kadar tespit edilmesi nedeniyle kronik kullanımın değerlendirilmesinde idrar matriksi önerilir. Ancak oksazepama metabolize olmayan benzodiazepinlerin kullanılması durumunda yine idrar örneğinde oksazepam dışında metabolit analizi yapılmıyorsa yalancı negatif sonuç elde edilmesi beklenmektedir.

Çalışmamızda matriks etkisi ile ilgili veriler değerlendirildiğinde, hiçbir tükürük örneğinde benzodiazepin tespit edilmediği ancak 13 örnekte plazmada benzodiazepinlerin tespit edildiği verisi, matriks etkisi olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızın dördüncü amacı; idrarda madde kullanım bozukluğu tanısının değerlendirilmesinde kullanılan ticari kit ve LGM LCMS-MS yönteminin karşılaştırılmasıydı. LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemleri arasındaki korelasyon incelendiğinde; amfetamin, metamfetamin, MDMA, THC-COOH ve kodein parametreleri için çok kuvvetli ilişki ($0,801< r <0,999$, $p<0,01$); morfin ve oksazepam için kuvvetli ilişki ($0,601< r <0,800$, $p<0,01$) elde edilmiştir (Tablo 28). MDA için korelasyon zayıf olarak elde edilmiş olup analiz edilen örnek sayısı azdır ($p>0,05$).

İki yöntemin Bland-Altman analizleri değerlendirildiğinde; % bias -30,71 ile 87,47 arasında değişmekte olup THC-COOH seviyeleri açısından ticari yöntemde LGM yöntemine göre daha yüksek değerler elde edilmekte iken diğer parametrelerde LGM ile elde edilen değerler daha yüksektir. Passing-Bablok regresyon analizi ve Bland-Altman

analizinde; LC-MS/MS ticari ve LGM yöntemleri arasında en uyumlu sonuçlar THC, metamfetamin, MDMA, MDA, morfin analizlerinde elde edildi (Passing-Bablok intercept=0). Yöntemler arasındaki uyumun ve ilişkinin en kötü olduğu parametre oksazepam olarak belirlendi.

Ticari ve LGM yöntemlerinin korelasyonu anlamlı ve yöntemlerin uyumu oksazepam haricinde diğer parametrelerde oldukça iyidir (Tablo 28-30). Ticari yöntem ve LGM yönteminde sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ticari yöntemde örnek hazırlığı aşamasında enzimatik hidroliz, LGM yönteminde ise kimyasal (asit ve baz) hidroliz kullanılmıştır. Nakanishi ve ark. da çalışmalarında SSE ekstraksiyon ile MDMA ve metabolitlerinin analizini gerçekleştirmiş ve yöntemin doğruluğu ve presizyonunu tatmin edici olarak belirlenmiştir. LGM ve ticari kitte SSE ekstraksiyonu kullanmış olup doğruluğu ve presizyonu yüksektir.

Ticari ve LGM LC-MS/MS yöntemlerinin 34 analit için elde edilen sonuçlarının karşılaştırmasında ayrıca yöntemlerin kendi cutoff limitleri kullanılarak da değerlendirme yapılmış ve iki yöntem arasında hiçbir parametrede pozitif-negatif ataması yönünden klinik uyumsuzluk gözlenmemiştir.

Çalışmamızın beşinci amacı; laboratuvarda geliştirilen yöntemin validasyonu ve bu yöntemin kullanıldığı iki farklı cihazın karşılaştırılmasıydı. Bu amaçla CLSI EP 15 kılavuzuna göre validasyon kriterlerini karşılayan LGM yöntemi ile ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazarında analiz edilen idrar ve plazma örneklerinin sonuçlarını karşılaştırdık. LGM yöntemi ile idrarda 55 parametre ve plazmada 58 madde, her madde için analiz süresi 15 dakika olacak şekilde eş zamanlı olarak analiz edilmiştir.

ABISCIEX Triple Quad™ 3500 ve Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max cihazlarında kullanılan LC-MS/MS LGM yöntemi idrarda değerlendirildiğinde, hidrokodon (r=173, p>0,05) hariç tüm maddeler için çok kuvvetli ilişki (0,80< r <0,99, p<0,01) elde edilmiş olup R^2 değerleri Tablo 31'de verilmiştir. Plazmada ise BZE ve amfetamin hariç tüm parametreler için çok kuvvetli ilişki (0,80< r <0,99, p<0,01) elde edilmiştir (Tablo 34).

İdrarda madde analizinde iki cihazın uyumu Bland-Altman analizi ile değerlendirildiğinde; % bias -50,4 ile 50,1 arasında değişmektedir (Tablo 32). Amfetamin,

metamfetamin, pregabalin, morfin ve BZE seviyeleri açısından ABISCIEX cihazında, Thermo scientific cihazına göre daha düşük değerler elde edilmekte olup diğer maddelerde ABISCIEX cihazı ile elde edilen değerler daha yüksektir. Plazmada madde analizinde iki cihazın uyumu Bland-Altman analizi ile değerlendirildiğinde; % bias -51,4 ile 29,9 arasında değişmektedir (Tablo 35). Amfetamin, morfin, diazepam ve BZE seviyeleri ABISCIEX cihazında Thermo scientific cihazına göre daha yüksek değerler elde edilmekte olup diğer parametrelerde Thermo scientific cihazı ile elde edilen değerler daha yüksektir.

İdrarda cihazların uyumu Passing-Bablok regresyon analizi ile değerlendirildiğinde hidrokodon haricinde cihazlar uyumlu olarak belirlendi. (Passing-Bablok slope 1'e yakın). Cihazlar arasındaki uyumun ve ilişkinin en kötü olduğu parametre hidrokodon olarak belirlendi (32). Plazmada cihazların uyumu Passing-Bablok regresyon analizi ile değerlendirildiğinde cihazlar uyumlu olarak belirlendi (Passing-Bablok slope 1'e yakın).

Çalışmamızda kullanılan LGM yöntemi, ayrıca plazma ve idrarda ABISCIEX ve Thermo scientific cihazları açısından yöntemin validasyonunda kullanılan cutoff limitleri esas alınarak karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda iki cihaz arasında hiçbir parametrede pozitif-negatif ataması yönünden klinik uyumsuzluk gözlenmemiştir.

Ticari ve LGM yöntemlerinin korelasyonu anlamlı ve yöntemlerin uyumu birkaç parametre haricinde oldukça iyi olarak değerlendirildi. Cihazlar arasında küçük farklılıkların numunelerin ABI SCIEX cihazı ile analizden sonra -20 ^{o}C'ye transfer edilip yeniden çözülerek analiz edilmesi ve dondurucuda saklanma aşamasında maddelerin organik çözücüde kalması ya da numunelerin çalışma sürecinde oda sıcaklığında beklemesi sürecinde bazı maddelerin bozulması olarak değerlendirildi.

Literatürde LC-MS/MS yöntemi ile analiz ettiğimiz maddelerin değerlendirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaları analiz ettiğimiz her bir madde sınıfı için değerlendirdik.

Madde analizinde LC-MS yöntemlerinin genel olarak GC-MS yöntemine göre avantajlı olduğu bilinmektedir. GC-MS yönteminde ekstraksiyon öncesinde özellikle glukuronid metabolitleri için alkali ve/veya enzimatik hidroliz gerekmekte ve örnek hazırlığı süresi uzun olmaktadır. GC-MS yönteminde hidrolizin tamamlanamaması veya uygun koşullarda olmaması durumunda hidrolize bileşiklerin katkısı nedeniyle analitlerin konsantrasyonu daha yüksek elde edilebilmektedir (160).

Plazmada LC-MS/MS ile esrar analizi için; Ferreirós ve ark., küçük plazma hacimlerinde (200 µl) esrar kullanımından 2-3 saat sonra THC ve faz I metabolitleri 11-OH-THC ve THC-COOH'nin analizinde SPE-LC-MS/MS yöntemini geliştirmiştir. Bu metodun majör avantajı sensitivitesi olup THC ve THC-COOH için LOQ: 0,05 ng/mL iken 11-OH-THC için 0,2 ng/mL'dir. Bu yöntemin sensitivitesi GC-MS yöntemlerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Metodun sensitivitesine ilaveten hızı da oldukça yüksek olup kromatografik ayırım 5 dakika sürmektedir (161).

Skopp ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SPE-LC-MS/MS tekniği kullanılarak plazmada THC-COOH ve THC-COOH-glukuronid analiz edilerek stabiliteleri değerlendirilmiştir. Bileşikler lipofilik yapıda olmaları nedeniyle esrar kullanımından sonra 10 güne kadar plazmada tespit edilmiştir. +4 ºC'de muhafaza edildiklerinde THC-COOH-glukuronidin 2 güne kadar stabil olduğu ancak yine de az miktarda THC-COOH oluştuğu raporlanmıştır. THC-COOH-glukuronidin 20 ºC'de bekletildiğinde 1 günden sonra konsantrasyonlarının değiştiği ve 25 ºC'de bekletildiğinde ise artan seviyelerde THC-COOH bulunduğu gözlenmiştir (162). Çalışmamızda da ABI SCIEX ile analiz edildikten sonra Thermo scientific ile analiz edilmek üzere transfer edilen numunelerde THC-COOH parametresinin Thermo scientific ile daha yüksek elde edilmesinin nedeninin oda sıcaklığında bekletilmiş olması olarak değerlendirdik.

İdrarda LC-MS/MS ile esrar analizinde solid faz ekstraksiyon yöntemi oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Montesano ve ark., idrarın (90 µl) E. Coli kaynaklı β-glukuronidaz ile enzimatik hidrolizi (2 saat boyunca) sonrasında µ-SPE-LC-MS/MS yöntemini kullanarak THC-COOH, THC, THC-OH, CBD ve CBN'yi tespit etmiştir. µ-SPE ile ekstraksiyon ile tatmin edici geri kazanım değerleri ve ihmal edilebilir bir matriks etkisi ile elde edilmiştir. Yöntemin avantajları analiz için gereken enzim ihtiyacının ve gereken zamanı azaltılmasıdır. Toplam analiz süresi 5,8 dakikadır. Analizde asetonitril kullanımından kaçınılmıştır. Çünkü sinyalde önemli derecede supresyona neden olduğu önceki çalışmalarda raporlanmıştır (105).

Sempio ve ark., idrarda THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN, kannabigerol (CBG), tetrahidrokannabivarin (THCV) ve 11-nor-9-karboksi-THCV (THCVCOOH) analizinde tandem alkali/E. coli β-glukuronidaz hidrolizi içeren LC-MS/MS kullanmıştır.

Yöntemin hidroliz ön işlem süresi 16 saat olup oldukça uzundur (106). Bizim çalışmamızda asit ve baz hidrolizi kullanan LGM yöntemi ve enzimatik hidrolizi kullanan ticari yöntem kullanılmış olup ön hazırlık süresi sırasıyla 55 ve 70 dakikadır.

Bir başka yaklaşım olan örneklerin dilüe edilerek LC-MS/MS sistemine direkt enjeksiyon metodu yaygın kullanılan bir yaklaşım olsa da bu yöntemde tuzlar, üre, amino asitler, proteinler (örneğin, albümin ve immünoglobülinler) ve hücreler (örneğin, beyaz ve kırmızı kan hücreleri, bakteri ve mantar hücreleri) gibi idrar matriks bileşenleri ortadan kaldırılamadığı için bu bileşenler kromatografik sistemi ve iyon kaynağını kirletebilir veya tıkayabilir. Bunun sonucunda iyon kaynağı ve MS sinyali baskılanabilir veya artırılabilir. Bu istenmeyen etkiler örnekler arasında değişebilir ve sonuç olarak kantitatif analizin doğruluğunu tehlikeye atar (107). Bu nedenle, potansiyel olarak karışabilen matriks bileşenlerinin çıkarılması için yeterli numune hazırlama işlemi genellikle LC-MS/MS analizinde önemli bir adımdır. Ayrıca, izotop işaretli internal standartların kullanılması, matris etkilerini telafi etmeye yardımcı olabilir. Çalışmamızda ticari yöntemde izotop olmayan IS kullanılmış ve izotop IS kullanılan LGM yöntemine oranla MS sinyalinin baskılandığı gözlenmiştir.

Plazmada opiyat analizi değerlendirilecek olursa; GC-MS ile analizdeki türevlendirme aşaması eroinin hidrolizini indüklemesi nedeniyle dezavantajlıdır (108). LC-MS/MS yöntemi GC-MS'e göre daha avantajlıdır.

Plazmada opioid analizinde ekstraksiyon aşamasında sıvı sıvı ekstraksiyon, solid faz ekstraksiyon, protein presipitasyonu, HILIC (normal faz kromatografisinin bir şekli) yöntemleri kullanılmaktadır. Opioidler SSE ile ekstrakte edilirken pH 8-10 arasındaki çözeltilerden ziyade düşük polaritedeki organik çözeltide optimum olarak ekstrakte edilmektedir. SPE ile ekstrakte edilirken hidrofobik ve katyon değiştirici kopolimerik yapıdaki materyalden yapılmış emici kullanılmaktadır. Opioid analizinde ekstraksiyonda SPE metodu daha yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Rook ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eroin, metadon ve bu iki maddenin metabolitleri ve eşzamanlı kokain, asetil kodein ve metabolitlerinin tespitinde SPE-LC-MS/MS metodu kullanılmıştır. Kan örneklemesi için plazma esteraz aktivitesini inhibe etmek ve böylece eroin miktarını dengelemek amacıyla sodyum florür içeren tüpler kullanılmıştır. Plazma örnekleri buzlu suda saklanmış, SPE'den önce eroinin stabilitesinin

korunması amacıyla çözüldükten hemen sonra asidifiye edilmiştir. Eroinin plazmada düşük sıcaklık (0-4 ºC) ve pH değerlerinde (3,5-5,2) stabil olduğu gözlenmiştir. Ayrıca analitlerin asidik şartlarda protonlanmasının SPE performansı için oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Polar mobil fazdan apolar mobil faza geçilerek analiz süresi 15 dakikaya düşürülmüştür (109).

Etil asetat ile basit bir tek aşamalı SSE kullanarak insan plazmasında kodein ve morfinin eşzamanlı olarak belirlenmesi için hızlı ve duyarlı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. ESI'nin analitler için APCI'dan daha yüksek sensitivite sağlaması nedeniyle ESI modu tercih edilmiştir (LOQ'lar kodein için 0,2 ng/mL ve morfin için 0,5 ng/mL ve analizde 0,5 mL insan plazması kullanılmıştır) (163). Bizim çalışmamızda da ESI modu ile elde edilen sensitivitenin daha yüksek olması nedeniyle ESI tercih edilmiştir.

İdrarda opiyat analizi değerlendirilecek olursa; French ve ark., yaptığı çalışmada idrarda opioidler ve glukuronid metabolitleri SPE–LC-MS/MS ve SPE-GC-MS ile karşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. 20 örnek için 4 saat olan örnek hazırlama süresi LC-MS/MS metodu ile 80 dakikaya indirilmiştir. 1 ml idrar kullanılarak (LOQ'lar, 0,31-2.5 ng/ml) hem ana madde hem de glukuronid metabolitlerinin dahil olduğu toplam çalışma süresi, 17 dakika olarak belirtilmiştir (110). Jager ve ark., aynı numune hacmini çevrimiçi SPE prosedürü ile 14 dakikalık analitik çalışma süresi ile morfin, kodein ve glukuronid metabolitlerinin analizini gerçekleştirmişlerdir (25 ng/ml'lik bir LOQ) (23). Çalışmamızda ise 500 µl idrar örneği kullanılarak SSE metodu ile ekstraksiyon sağlanmış ve ön hazırlık aşaması 55 dakika sürmüş olup LOQ morfin ve kodein için 1 ve 2 ng/mL'dir.

Coles ve ark., idrarda sadece ana maddenin (özellikle kodein, morfin, hidrokodon, hidromorfon, oksikodon ve 6-asetilmorfin) ölçüldüğü ve cutoff değerinin 5 ng/ml olduğu LC-MS/MS yöntemi geliştirmişler. Coles ve ark cutoff değerinin 5 ng/ml'ye kadar inmesi durumunda metabolitlerinin ölçümüne gerek kalmadan opioid analizinin yapılabileceğini belirtseler de yalancı negatiflerin rapor edilmediğinden emin olmak için glukuronid bileşiklerinin tespit edilmesi gerektiği belirtilmiştir (110).

Andersson ve ark., idrarda opiyat analizinde seçilmiş iyon izleme (SIM) modu LC-MS/MS deteksiyonu ile kombine olarak idrar dilüsyonu yöntemini kullanmıştır. Ayrıca, analiz süresini kısaltan, ayrılma gücünü arttıran ve 6-MAM'nin düşük konsantrasyonlarda ölçülmesine izin veren 2 µm'lik partikül boyutlu kolon ile daha etkili kromatografik ayrım

sağlayan yöntem geliştirilmiştir. İlk kez bu çalışmada morfin-3-sülfat ve morfin-6-sülfatın olası etkileşimi göz önünde bulundurulmuştur (164). Bizim çalışmamızda da LGM LC-MS/MS yönteminde SIM modu kullandık ve multiple reaksiyon izleme (MRM) moduna göre daha etkili analiz gerçekleştirdik. Ayrıca kullandığımız partikül ve organik faz içeren ekstraksiyon tüpü ile tuz ve proteinlerin çöktürülmesini sağlayarak maddelerin organik faza alınmasını sağladık. Böylece ön analiz sürecini kısaltarak saf kromatogramlar elde ettik.

COC ve metabolitlerinin plazmada kantitasyonda çok sayıda yöntem bulunmakta olup LC-MS/MS yöntemleri GC-MS'e göre daha çok tercih edilmektedir. Kokain ve metabolitlerinin çoğu alkali koşullarda ve yüksek ısılarda hidrolize dayanıklı değildir. Ayrıca plazma ve karaciğer esterazları ile in vitro hidroliz gerçekleşebilmektedir. Stabilite problemi dışında kokain ve kokaetilen pH 8-9'da n-butil klorid ile kolayca ekstrakte edilmektedir (12).

Popa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada COC ve BZE SSE ve SPE-LC-MS/MS ile analiz edilmiştir (LOQ:20 ng/mL). COC ve BZE hidrofilik ve bazik yapıda olup özellikle BZE'nin polartesi daha fazladır. Dolayısıyla SSE ile yapılan ekstraksiyonun yeterince efektif olmadığı belirtilmiştir (111). Bizim çalışmamızda COC, BZE ve kokaetilen için LOQ değeri 2 ng/mL olup SSE ile ekstraksiyon yapılmıştır.

İdrarda kokain analizi değerlendirilecek olursa; LC-MS/MS yöntemi GC-MS'e göre avantajlıdır. Kokain GC-MS ile analiz edildiğinde enjektör kısmının sıcaklığının >210 ^{o}C'yi aşması nedeniyle kokainin degrade olduğu rapor edilmiş olup bu durum LC-MS/MS sisteminde gözlenmemektedir. COC analizinde kullanılan yöntemlerin çoğunluğu ekstraksiyonda SPE metodunu kullanır.

Fiorentin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tükürük, idrar ve plazmada COC, BZE, CE ve AEME'nin analizinde tek aşamalı, HILIC kolonunun kullanıldığı ve ekstraksiyon aşaması içermeyen LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. SPE yönteminde gereken örnek hacmi ve analiz süresinin artması nedeniyle tek aşamalı HILIC LC-MS yöntemine göre dezavantajlı olduğu vurgulanmıştır (115). Fiorentin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tükürük, idrar ve plazmada COC, BZE, CE ve AEME'nin analizinde tek aşamalı, HILIC kolonunun kullanıldığı ve ekstraksiyon aşaması içermeyen LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Kullanılan yöntem valide olup LOQ değeri 5 ng/mL olarak elde edilmiştir (115).

Amfetaminlerin analizinde GC-MS altın standarttır ancak, birçok avantajı nedeniyle LC-MS doğrulama metodu olarak daha fazla tercih edilmektedir. Plazmada amfetaminler 24-48 saate kadar tespit edilmekte olup taramada pozitif çıkan amfetamin analizinin doğrulanması oldukça önemlidir. Bazı reçeteli ilaçların vücutta amfetamin ve/veya metamfetamine metabolize olması nedeniyle pozitif bir amfetamin sonucu her zaman yasadışı amfetamin kullanımını göstermeyebilir (yalancı pozitif). Farmasötik bileşiklerden benzfetamin (Didrex), klorobenzoreks (Rexigen), famprofazon (Gewodin), fenetilin (Captagon), fenproporeks (Perfoxene), lisdeksamfetamin (Vyvanse) ve selegilin (Atapryl) insan vücudunda amfetamin ve/veya metamfetamine çevrilir. Örneğin, selegilin L-enantiyomerdir ve vücutta sadece L-amfetamin ve L-metamfetamine dönüşmesi nedeniyle D-izomeri bulgusu selegilin kullanımıyla uyumsuz olacaktır ve amfetaminin yasadışı kullanımını düşündürecektir (gerçek pozitif). Ayrıca hastanın tıbbi kayıtlarının taranmasıyla pozitif sonuçların yanlış yorumlanmasının önüne geçilebilir.

Reçeteli veya yasadışı kullanılan AMP ayrımı AMP'nin enantiyomerik bileşiminin belirlenmesi ile mümkündür. Yasadışı AMP'ler genellikle iki enantiyomerin 50:50 rasemik bir karışımından oluşurken, reçeteli AMP'ler ya d-AMP (örneğin, Dexedrine®, ProCentra®, Elvanse®) ya da D- ve L-enantiyomerlerin farklı oranlarda (örneğin, Adderall®, 3: 1) D- ve L-AMP) karışımını içermektedir. Enantiyomerik ayrımında GC, GC-MS, HPLC, LC-MS ve kapiler elektroforez (CE) kullanılmaktadır (165). Analizde en sık kullanılan teknik offline türevlendirme ile GC-MS tekniğidir (28).

Amfetaminlerin enantiyomerik ayrımında kullanılan teknikler; kiral sabit fazlar (CSP), kiral türevlendirme reaktifleri (CDR) ve mobil fazdaki kiral seçimidir (CDS). Kiral sabit fazlar LC-MS veya GC-MS teknikleriyle kullanılabilmektedir. LC-MS metodu ile kiral sabit fazlardaki AMP enantiyomerleri kiral kolonlar kullanılarak ya da UV veya floresans detektör ile kiral türevlendirme sonrasında ters faz kolonlar ile ayrılmaktadır (27).

Newmeyer ve ark., Marfey reaktifi ile ön-kolon türevlendirme sonrasında plazmada AMP ve MA tespiti için enantiyoselektif LC-ESI-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Marfey reaktifi kullanımı, numune hazırlama süresini yaklaşık 2 saat arttırsa da, C18 kolonundaki geleneksel ters faz koşulları kullanılarak kromatografik ayırma süresi 10 dakika ile sınırlandırılmış olup tükürük ve plazma matrikslerinde sensitivitesi oldukça yüksektir (1 µg/L LOQ) .

Literatürde kiral ayrım yapan çok sayıda MS yöntemi bulunurken ülkemizde bu tekniklerinin kullanımı bulunmamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız LGM metodunda olduğu gibi esktraksiyonda SSE metodunu kullanan çalışmalar bulunmaktadır. Fernández ve ark., plazmada (100 µl) SSE ile ekstrakte edilen örneklerde amfetaminlerin analizinde UPLC–MS–MS yöntemini valide etmiştir. Yöntemin LOQ değeri 2,5 ng/mL iken SSE metodu ile temiz matriks elde edilmiş olup iyon supresyonu etkisinden kaçınılmıştır (166).

İdrarda amfetaminlerin analizi değerlendirildiğinde; analiz edilen idrarın pH'sı maddenin eliminasyon süresini değiştirmektedir. Asidik idrarın maddenin atılım hızını arttıması nedeniyle kullanıcıların sirke veya vişne suyu içtikleri bildirilmiştir (31).

Lin ve ark. tarafından idrarda amfetamin, ketamin ve opiyat analizinde SPE metodunun kullanıldığı LC-MS/MS geliştirilmiştir. Bu yöntemde analiz süresi 6,7 dakika olup kullanılan örnek hacmi 2 ml olarak belirtilmiştir. LOQ değerleri amfetaminler için 1,3-20 ng/mL arasında değişmektedir (167). Çalışmamızda LC-MS/MS LGM yöntemi ile analizde amfetaminler için LOQ 2 ng/mL olarak elde edilmiş olup analiz süresi 15 dakikadır.

Literatürdeki idrarda amfetamin analizi çalışmalarında daha çok kiral ayrımın kullanıldığı yöntemler bulunmaktadır. Hädener ve ark., idrarda D ve L-AMP'nin ayrılması ve miktar tayini için kiral durgun fazın kullanıldığı basit ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde kolon değiştirici HPLC sistemi ile akiral ters faz trapping kolon ve MS-MS ile kombine kiral analitik kolon kullanılarak çevrimiçi (online) numune saflaştırma tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde aynı analitik kolon içinde yer alan birkaç örneğin eşzamanlı analizi sağlanmaktadır (28). Enantiyoselektif AMP analizi için yaygın olarak kullanılan çevrimdışı SPE ve SSE prosedürleri ile karşılaştırıldığında, çevrimiçi örnek saflaştırmanın, zaman ve maliyet etkin olması ve numune kontaminasyonuna, kullanıcı hatasına ve yeniden üretilebilirlik gibi problemlere daha az eğilimli olması gibi avantajları bulunmaktadır.

Wang ve ark., AMP ve MA'nın idrarda kiral olarak ayrılması ve kantitasyonu için Vankomisin bazlı kiral durağan faz olan Chirobiotic ™ V2 ve basit dilüsyon yönteminin kullanıldığı hızlı bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, ekstraksiyon veya türevlendirme gerekmemesi nedeniyle yayınlanan GC-MS metotlarına göre basit ve hızlı olduğu belirtilmiştir (165). Nakanishi ve ark., tarafından MDMA, MDA ve metabolitlerinin eşzamanlı enantiyomerik tespiti için D-FDLA (kiral türevlendirme reaktifi, Marfey'in

reaktifi) ile direkt türevlendirme sonrasında LC-MS/MS ile insan idrarındaki analizi yapılmıştır (168).

Benzodiazepinler plazmada değerlendirilecek olursa; benzodiazepinler metabolize edilirken polaritelerinin ve suda çözünme kabiliyetlerinin arttırılması için glukuronid ile konjuge edilmektedir. Benzodiazepin analizinde glukuronid bağlarının hidrolizinde asit hidroliz veya *abalone, Patella vulgata* ve *Helix pomatia* gibi bazı glukuronidaz yöntemleriyle enzimatik hidroliz kullanılmaktadır. GC-MS ile benzodiazepinlerin glukuronid bağının ayrılması için zaman alıcı numune hazırlığı gerekmesi ve enjeksiyon prosedüründe bazı benzodiazepinlerin tam veya kısmi termal bozunumu nedeniyle LC-MS/MS avantajlıdır.

Kang ve ark., çok sayıda benzodiazepinin LC-MS/MS ile analizinde üç protein çökeltme plakasını ve 4 farklı *β*-glukuronidaz enzimini hidroliz verimleri açısından kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Rekombinant IMCSzyme *β*-glukuronidaz enzimi, *abalone, Patella vulgata ve Helix pomatia β*-glukuronidazdan daha yüksek hidroliz etkinliği göstermiştir (LOQ:5 ng/ml) (116).

Fernandez ve arkadaşları tarafından insan plazmasında alprazolam, bromazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam ve tetrazepamın eşzamanlı tayini için basit ve hızlı bir SPE- HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir. SPE yöntemi ile elde edilen sonuçların LLE yöntemi ile elde edilenden daha iyi olduğu belirlenmiştir (117).

Marin ve ark. tarafından benzodiazepinler ve metabolitlerden, α-hidroksialprazolam, α-hidroksietilflurazepam, α-hidroksitriazolam, alprazolam, desalkilflurazepam, diazepam, lorazepam, midazolam, nordiazepam, oksazepam, temazepam, klonazepam, ve 7-aminoklonazepamın doğrulanması ve kantitasyonunda idrar ve serum/plazma için *β*-glukuronidazla hidroliz aşamasını içeren SPE-LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde her idrar serisinin yeterli enzim hidrolizinin sağlanması için bir kontrol olarak oksazepam glukuronid kullanılmıştır. Tüm analit ve matrikslerde LOQ 20 ng/ml'dir (169).

Fernández ve ark., insan plazma örneklerinde yedi benzodiazepin (alprazolam, bromazepam, klonazepam, diazepam, lorazepam, lormetazepam ve tetrazepam) tayini için basit ve etkili ultrason destekli dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (UA-DLLME) yöntemini geliştirmiştir. Kloroform ve metanol, sırasıyla özütleyici ve dağıtıcı çözücüler olarak kullanılmıştır. Çeşitli değişkenlerin etkisi (örneğin, dağıtıcı ve ekstraksiyon

çözücülerinin tipi ve hacmi, pH, ultrasonik zaman ve iyon gücü) asimetrik bir tarama tasarımı 3242//16 kullanılarak dikkatli bir şekilde değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir (LOQ: 4,3–13,2 ng/ml) (170).

Marin ve ark., SSE ve UPLC-MS/MS kullanarak serum veya plazmada 21 benzodiazepin, metabolitlerinin ölçümü için hassas bir yöntem geliştirmiş ve doğrulamıştır. Toplam analiz süresi 2,5 dakika ve LOQ değeri 1 ng/mL olarak belirlenmiştir. (171). Çalışmamızda plazmada benzodiazepinler için LOQ değeri 2 ng/mL olarak elde edilmiştir.

Perez ve ark., idrarda alfa-hidroksialprazolam, oksazepam, lorazepam, nordiazepam ve temazepamın analizinde *β*-glukuronidaz hidroliz aşamasını içeren SPE-LC-MS/MS ve SPE-GC-MS yöntemlerini geliştirmiş ve karşılaştırmıştır. LC-MS/MS yönteminin hızlı olması örnek hazırlığı aşamasının daha kısa olması gibi avantajlarının yanında döteryumlu IS kulanılmasına rağmen nordiazepam bileşiğinin 2-hidroksietilflurazepam tarafından baskılanmasından dolayı nordiazepam konsantrasyonunda% 39 artış olmuştur. Ancak LC-MS/MS bu dezavantajına rağmen diğer analitler için GC-MS'e göre üstündür (118).

Benzodiazepinler iyonizasyon modu açısından idrarda hem ESI hem de APCI kullanılarak analiz edilmektedir. APCI yöntemi matriks etkisine daha az duyarlı ancak yöntemin sensitivitesi daha düşüktür. Dolayısıyla literatürde APCI kullanılırken duyarlılığı arttırılabilmektedir. Sinyal/gürültü açısından ESI'ye göre APCI daha avantajlıdır. Dunlop ve ark., 7 farklı benzodiazepinin analizinde (oksazepam, temazepam, nordiazepam, desalkilflurazepam, alprazolam ve α-hidroksialprazolam) *β*-glukuronidaz hidroliz aşamasını içeren basit bir dilüsyon ve bunu takiben MRM modunda HPLC-APCI-MS-MS kullanılmıştır. Yöntemin LOQ değeri 20 ng/mL'dir (172).

Lee ve ark., idrarda benzodiazepinlerin (alprazolam, bromazepam, klonazepam, 7-amino-klonazepam, diazepam, nordazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, flurazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, oksazepam, temazepam) analizinde SSE-LC-MS/MS yöntemini geliştirmiş ve valide etmiştir (LOQ değerleri 0,5-10 ng/ml). Yöntemin sensitivitesi diğer yöntemlere göre üstündür (173, 174). Çalışmamızda idrarda benzodiazepinler için LOQ değeri 2 ng/mL olarak elde edilmiştir.

Çalışmamızın altıncı amacı; rutin pratikte elde ettiğimiz verilerin ne şekilde kullanılacağı ile ilişkili "hangi matriks, hangi yöntem, hangi durumda kullanılmalıdır?" sorusunun cevabını tartışmaktır.

Ülkemizde madde kullanımının yasadışı olması gerçeğinden hareketle farklı amaçlar için yaygın olarak tarama yöntemlerinin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Zira doğrulama yöntemleri maliyet, işgücü, donanım, pratiklik açısından daha dezavantajlı yöntemlerdir. Standardizasyonları zordur; bu nedenle tarama yöntemlerinin şüpheli çıktığı durumlarda ya da adli işlemlere konu olacak durumlarda daha kesin sonuç vermek için kullanılmaktadır. Çalışmamızdaki veriler de standardizasyonun her aşamasının titizlikle çalışılması gerektiğini doğrulamaktadır ve ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Tarama yöntemleri ise AMATEM kliniklerinde kullanılan otomatize idrar immün yöntemleri, farklı amaçlarla kullanılan POCT cihazları (tükürük ya da idrarda) ve kart testlerdir. Çalışmamızdaki verilerden hareketle;

Otomatize idrar immünoassay cihazlarından alınan sonuçlar rutin pratikte kullanılırken dikkat edilmesi gereken noktalar;

- İmmün yöntemlerin spesifiteleri zayıftır, pozitif verdiği sonuçların bir kısmı çapraz reaktivite nedeniyle pozitif çıkmış olabilir. Madde kullanımının suç sayıldığı ülkemizde, idrar immün yöntemlerinin adli amaçla kullanılmaması, rutin pratikte de uygulandığı üzere yalnızca tarama testi olarak ya da klinik amaçlarla kullanılması gerekmektedir.
- İmmün yöntemler madde sınıfına spesifiktir. Hedef bileşikle yapısal olarak ilişkili olan veya olmayan bileşiklerin çapraz reaksiyon yoluyla yalnızca yalancı pozitif değil, yalancı negatif sonuçlara da neden olabileceğinin dikkate alınması gerekmektedir.
- İmmünoassaylerle elde edilen özellikle pozitif sonuçların doğrulanması gerekmektedir.

Trafikte uyuşturucu tespiti için kullanımı başlayan POCT tükürük analizini yorumlarken dikkat edilmesi gereken noktalar;

- POCT cihazının spesifitesi yüksek ancak sensitivitesi zayıftır çünkü trafikteki kullanımı sırasında yalancı pozitif sonucun telafi edilmesi birey açısından çok daha büyük bir sıkıntı oluşturacaktır. Cut off değerleri bu nedenle spesifitesi yüksek tutulacak şekilde ayarlanmıştır. Değerlendirilen cihaz farklı bir amaçla kullanılacak ise yöntemin bireyin gerçekten madde kullanmadığını doğru olarak tespit etmekte yeterli iken madde kullanan bireyleri tespit etmede özellikle bazı madde grupları (MDMA/metamfetamin ve morfin grubu) açısından yetersiz kalacağı dikkate alınmalıdır.

- Kullanılan POCT cihazı için çok küçük örnek hacimleri testin çalışması için yetersiz kalmakta viskozitesi yüksek olan tükürük örneklerinde ise testin analiz süresi uzadığı için kontrol çizgisi ya geç oluşmakta ya da hiç oluşmamaktadır.
- POCT cihazı ile elde edilen sonuçlar kalitatif olup elde edilen pozitif sonuçların gerekli durumlarda, özellikle adli işlemlerde kullanılacaksa doğrulanması gerekmektedir.
- POCT cihazının ölçüm prensibi de immün yöntem esasına dayanmaktadır dolayısıyla çapraz reaksiyona bağlı yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlarla bu yöntemde de karşılaşılabilir.

Tarama ihtiyacı duyulan alanlardan bir tanesi de **Denetimli Serbestlik Uygulaması**dır. Adalet Bakanlığı ilgili mevzuat uyarınca uyuşturucu kullanırken yakalanan bireyleri bir defaya mahsus tedaviyi kabul etmeleri şartıyla (Denetimli Serbestlik Uygulaması kapsamında) takibe almakta ve izlemektedir. Bu uygulama süresince bireyler bir yandan tedavi için AMATEM kliniklerine devam etmekte ve bu süre içinde uyuşturucu kullanmadıklarına dair rapor da AMATEM hekimlerince verilmektedir. Buradaki sıkıntı, asıl amacı kendi isteği ile tedaviye başvuran bireylerin bağımlılıktan kurtulmasına yardım etmek olan hekimler sıklıkla AMATEM'deki süreci atlatarak uyuşturucu kullanmaya devam etme girişimleriyle karşı karşıya kalmaktadır. Denetimli Serbestlik kapsamındaki analizler, bireyin önceden planlanmış bir zaman ve randevu sistemi ile AMATEM'de örnek vermesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu durumda hastalar analizde yakalanması daha zor olan sentetik kannabinoid kullanımına yönlenmekte ya da belli bir süre maddeyi kullanmayarak sistemi yanıltmaktadır. Bu da bireyi daha fazla risk altında bırakmaktadır. Yapılması gereken ise bir adli kontrol uygulaması olan Denetimli Serbestlik'in kolay uygulanabilir POCT gibi pratik yöntemlerle güçlendirilmesi ve analizlerin Denetimli serbestlik altındaki bireylerin haberi olmadan gerçekleştirilmesidir. Bu uygulamanın önündeki en önemli engel ülkemizde bu amaçla POCT cihazların henüz deneme aşamasında olması ve güvenilirliğinin denenmemiş olmasından kaynaklanan endişelerdir.

Çalışmamız trafikte kullanılan POCT cihazının güvenilirliğini test eden ilk çalışmadır. Bu anlamda hem deneme aşamasındaki trafik uygulamasına hem de Denetimli Serbestlik'te halen devam eden ihtiyaca yönelik anlamlı veriler içermektedir.

Trafikte kullanılan tükürük POCT cihazında yüksek spesifite hedeflenmiş ve daha önce bahsedildiği şekilde yüksek cut-off değerleri belirlenmiştir. Dolayısıyla bu sistem

Denetimli Serbestlikteki ihtiyaca cevap verebilecek bir sistem değildir. Trafikte kullanmaya uygunluğu test edilen ve spesifite değerleri çok iyi bulunan tükürük POCT cihazı hedefe yönelik doğru bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Denetimli Serbestlik için ise farklı

cut-off değerleri belirlenerek sensitivitesi yüksek bir sistemin oluşturulması rutin ihtiyacı karşılamak için elzemdir.

Hangi amaçla hangi test kullanılacak olursa olsun yürüttüğümüz çalışmaya benzer kapsamlı değerlendirmelerin rutin periyotlarla yapılması ve yöntemlerin değerlendirilmesi önemlidir.

Uyuşturucu madde taramasında kullanılan yöntemlerin hiç birinde sentetik kannabinoidler ve psikoaktif bileşikler gibi yasadışı maddelerin analizi yapılmamaktadır. Uyuşturucu maddelerin doğrulama analizlerinde ise uyuşturucu madde ve metabolitleri tespit edilmektedir ancak bilinmeyen maddelerin analizi yapılmamaktadır. Ayrıca sentetik kannabinoidlerin ve psikoaktif bileşiklerin kimyasal yapısı sürekli değiştirilmekte ve analiz yöntemlerinde tespit edilememektedir. Bilinmeyen bileşiklerin tespiti ancak QTOF gibi sensitivitesi yüksek metotlarla sağlanmaktadır. Dolayısıyla uyuşturucu madde analizinde her ne kadar kapsamlı tarama ve doğrulama analizi yapılsa da bilinmeyen bileşiklerin tespit edilmeme olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Uyuşturucu madde analizleri farklı amaçlarla, farklı örnek türleri kullanılarak, farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Rutin pratikte yaygın olarak kullanılan analizlerin doğru bir şekilde değerlendirilmesi, özellikle bu maddelerin kullanımının yasadışı olması ve yanlış bir sonucun geri dönüşü olmayan mağduriyetlere yol açabileceği gerçeği unutulmadan titizlikle yapılmalıdır. Bu bağlamda uyuşturucu/uyarıcı madde analizinde kullanılan tarama ve doğrulama testlerinin performanslarının değerlendirilmesi ve mutlaka her testin kendi özelinde matriksten, yöntemden ve cihazdan ne şekilde etkilendiğinin araştırılması elzemdir.

Çalışmamız kapsamında trafikte madde kullanımının belirlenmesi amacıyla kullanılan POCT testinin değerlendirilmesi yapılmıştır ve spesifitesi amacına uygun olarak yüksek bulunan POCT cihazının trafik denetimine uygun sonuçlara sahip olduğu bulunmuştur. Ancak bu cihazın amacına uygun cut off değerleriyle üretildiği ve klinik sensitivitenin yüksek olmasının amaçlandığı durumlarda kullanımının uygun olmayacağının akılda tutulması gerekmektedir.

Sahadaki ihtiyaç değerlendirildiğinde, Denetimli Serbestlik kapsamında madde kullanılıp kullanılmadığının tespiti nedeniyle AMATEM'e yönlendirilen bireylerin aslında habersiz bir şekilde sensitivitesi yüksek bir POCT ile değerlendirmesinin klinik ihtiyaca daha uygun olduğu göze çarpmaktadır. Bu bağlamda, uyuşturucu/uyarı madde analizinde yeni POCT tarama testleri geliştirilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz POCT cihazının Denetimli Serbestlik kurumlarında kullanılması uygun değildir. Çünkü kullanılan POCT cihazının madde taramasında spesifitesi yüksek istendiği için cut-off değeri bu ihtiyaca özel planlanmış iken Denetimli Serbestlik kurumlarında kullanılacak olan POCT cihazları ile eser miktardaki maddeyi bile yakalamak amaçlanacaktır. Dolayısıyla sensitivitesi yüksek bir cihaza ihtiyaç vardır. Geliştirilecek olan bu cihaz sayesinde olan bireylerin AMATEM kliniklerine yönlendirilmesine gerek kalmadan ve haberi olmadan madde taraması yapılarak sistemi yanıltmalarının önüne geçilebilecektir.

Acil servislerde bilinci yerinde olmayan veya intoksikasyonu olan bireylerin taranmasında idrar örneği alınmasının güç olduğu durumlarda tükürük örneği alınmasının daha kolay olması nedeniyle tükürükte POCT cihazı kullanımının yaygınlaşması önerilebilir. Ancak bu durumda da amaca özel cut off limitine sahip cihazların üretilmesi

gerekecektir. Ayrıca, tükürükte LC-MS/MS ile standardize bir yöntem geliştirilerek tükürükte POCT cihazı ile elde edilen ve doğrulamaya gönderilecek sonuçların plazmaya ilaveten tükürükle de doğrulanması önerilmektedir.

Başka bir tarama yöntemi olan otomatize idrar immünoassay sistemleri yaygın olarak AMATEM kliniklerinde kullanılmaktadır. AMATEM klinikleri, temel olarak kendi isteğiyle tedavi olmaya gelen bireylerle ilgilenmektedir ve çalışmamızda da doğruladığımız üzere çapraz reaksiyon verme riski olan (sensitivite %97-100; spesifite %83-100) idrar immün analiz yöntemleri, klinisyen tarafından gerek duyulduğunda doğrulamaya gönderilmektedir. Sonuçlar klinik tedavi sırasında muayene ve yüz yüze görüşmeler ile elde edilen verilerle birlikte kullanıldığı için doğrulamaya gerek kalmaksızın klinik ihtiyacı büyük oranda karşılamaktadır. Çalışmamızda AMATEM'de kullanılan immün yöntemin cut-off limitinin opiyatlar için 300 ng/mL yerine SAMHSA'nın da önerdiği şekilde 2000 ng/mL olarak seçilmesi durumunda yöntemin spesifitesi % 83'ten %95'e yükseldiği saptanmıştır. Bu nedenle YP sonuçların ve doğrulamaya giden örnek sayısının azaltılması adına opiyatlar için 2000 ng/mL cut-off limitinin kullanılması önerilmektedir. Bu sistemlerin kullanımındaki en önemli dikkat edilecek unsur, idrarın uygun şartlarda ve gözetim altında toplanmasının sağlanacağı altyapıyı oluşturmaktır. AMATEM kliniklerinde ayrıca denetimli serbestlik kapsamında takip edilen bireylerin madde kullanıp kullanmadıklarının da değerlendirilmesi bu yöntemlerle yapılmaktadır. Bu konunun dezavantajı ve çözüm önerisi yukarıda tartışılmıştır.

Madde analizinde dikkat edilecek bir diğer unsur, madde özelinde kullanım zamanının ve o zamana uygun örnek türünün kullanımının kararının verilmesidir. Genel olarak tükürük ve kan yakın zamanda madde kullanımının ve bireyin madde etkisi altında olup olmadığının değerlendirilmesi açısından önemlidir. Tükürük örneğinin en önemli avantajı noninvaziv olarak elde edilmesi, POCT cihazlarının olması nedeniyle olay yerinde incelemeye elverişli bir örnek olması ve örneğe madde karıştırılması riskinin düşük olmasıdır. Kan örneğinin en önemli avantajı ise maddenin ana bileşiğinin tespit edilmesi nedeniyle madde bozunması ile klinik korelasyonunun iyi olmasıdır. İdrarda madde metabolitlerinin yüksek konsantrasyonlarda bulunması ve tespit süresinin tükürük ve kana göre uzun olması idrarı diğer matrikslere göre avantajlı kılmaktadır. Ancak, idrara madde karıştırılması riskinin yüksek olması ve idrarın gözetim altında toplanması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Kanın ise en önemli dezavantajı invaziv bir işlem olup flebotomi ile ilgili risklerinin olmasıdır.

Çalışmamızda değerlendirilen ticari ve LGM LC-MS/MS yöntemlerinin birbirleriyle uyumları yüksek bulunmuştur. LC-MS/MS yöntemlerinde ekstraksiyon yöntemi, iyonizasyon modu, kullanılan standartlar gibi farklılığa neden olabilecek birçok parametre bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda korelasyonun yüksek bulunması ekstraksiyon yöntemi ve iyonizasyon modunun yöntemlerde birbirine benzer olmasından kaynaklanabilir. Zaman alıcı ve zahmetli olmasına karşılık LC MS-MS yöntemleri validasyonlarının yapılması kaydıyla halen en yaygın kullanılan doğrulama yöntemleridir. Çalışmamızda bu yöntemlerin validasyon parametreleri ve yöntem ayrıntıları da tüm yönleriyle tartışılmıştır.

Yaptığımız çalışma, madde analizi ve rutin pratikteki uygulaması konusunda "hangi yöntem, hangi matriks, hangi durumda kullanılmalıdır?" sorusunun cevabına katkı sağlayabilecek ayrıntılı veriler içermektedir. Her bir veri kendi özelinde rutin pratikle bağlantısı özelinde tartışılmış ve önerilerde bulunulmuştur.

Sonuç olarak uyuşturucu/uyarıcı madde analizinde verilen pozitif ya da negatif sonucun kişinin tutuklanmasına kadar gidecek adli sürecin bir parçası olduğunun akıldan çıkarılmaması önemlidir. Yapılan analizlerin analitik aşamada validasyonu ve verifikasyonu kadar madde özelinde kullanım zamanının ve analizin yapıldığı örnek tipinin sonuca etkisini de iyi bilerek değerlendirmeyi buna göre yapmak elzemdir. Ayrıca kullanım amacına özel POCT cihazlarının geliştirilmesi ve mutlaka geliştirilen her cihazın performans değerlendirmesinin de yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Uzbay İT. Madde bağımlılığı: tüm boyutlarıyla bağımlılık ve bağımlılık yapan maddeler: İstanbul Tıp Kitabevi; 2015.

2. Evren C, Ögel K, Uluğ B. Alkol madde bağımlılığı tanı ve tedavi el kitabı. Birinci Basım TPD Yayınları. 2012.

3. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®): American Psychiatric Pub; 2013.

4. Birliği AP. DSM-5 tanı ölçütleri başvuru el kitabı. E Köroğlu (Çev) Ankara: Hekimler Yayın Birliği. 2013;158.

5. EMCDDA. Turkey Country Drug Report 2019. p. 24.

6. T.C. İçişleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Suçlarla Mücadele Daire Başkanlığı Türkiye Uyuşturucu Raporu 2019 [07.11.19]. Available from: http://www.narkotik.pol.tr/kurumlar/narkotik.pol.tr/TUB%C4%B0M/Ulusal%20Yay%C4%B1nlar/2019-TURKIYE-UYUSTURUCU-RAPORU.pdf.

7. Uyuşturucu ile Mücadele Ulusal Strateji Belgesi ve Eylem Planı [cited 2019 20.10.2019]. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tutun-mucadele-bagimlilik-db/haberler/uyusturucu_eylem_plani/2018-2023_Uyusturucu_ile_Mucadele_Ulusal_Strateji_Belgesi_ve_Eylem_Plani.pdf.

8. Mercan S, Kuloglu M, Tekin T, Turkmen Z, Dogru AO, Safran AN, et al. Wastewater-based monitoring of illicit drug consumption in Istanbul: Preliminary results from two districts. The Science of the total environment. 2019;656:231-8.

9. McCance-Katz EF. The Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA): New Directions. Psychiatric services (Washington, DC). 2018;69(10):1046-8.

10. Evren C. Madde kullanım bozukluğunda tanı ve tedavi kılavuzu 2018. 139 p.

11. Murray RM, Quigley H, Quattrone D, Englund A, Di Forti M. Traditional marijuana, high-potency cannabis and synthetic cannabinoids: increasing risk for psychosis. World Psychiatry. 2016;15(3):195-204.

12. Kwong TC, Magnani B, Rosano TG, Shaw LM. The clinical toxicology laboratory: Contemporary practice of poisoning evaluation: AACC Press; 2013.

13. Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kardos S, Fries T, Waga J, et al. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. Journal of analytical toxicology. 2001;25(5):289-303.

14. Schwilke EW, Schwope DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL, et al. Δ9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. Clinical chemistry. 2009;55(12):2180-9.

15. Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. Therapeutic drug monitoring. 2006;28(2):155-63.

16. Jagerdeo E, Montgomery MA, Karas RP, Sibum M. A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010;398(1):329-38.

17. Shaw LM. The clinical toxicology laboratory: contemporary practice of poisoning evaluation: Amer. Assoc. for Clinical Chemistry; 2001.

18. Dasgupta A, Sepulveda JL. Accurate results in the clinical laboratory: A guide to error detection and correction: Elsevier; 2019.

19. French D. The challenges of LC–MS/MS analysis of opiates and opioids in urine. Bioanalysis. 2013;5(22):2803-20.

20. Moreno-Vicente R, Fernandez-Nieva Z, Navarro A, Gascon-Crespi I, Farre-Albaladejo M, Igartua M, et al. Development and validation of a bioanalytical method for the simultaneous determination of heroin, its main metabolites, naloxone and naltrexone by LC-MS/MS in human plasma samples: Application to a clinical trial of oral administration of a heroin/naloxone formulation. J Pharm Biomed Anal. 2015;114:105-12.

21. Wang L, Ni C, Shen H, Sheng Z, Liang C, Wang R, et al. Comparison of the Detection Windows of Heroin Metabolites in Human Urine Using Online SPE and LC–MS/MS: Importance of Morphine-3-Glucuronide. Journal of analytical toxicology. 2019.

22. Heideloff C, McShane AJ, Bunch DR, Lembright K, Lawson S, Wang S. Monitoring two transitions by LC–MS/MS may not be sufficient to positively identify benzoylecgonine in patient urine samples. Clinica Chimica Acta. 2016(456):67-8.

23. De Jager AD, Bailey NL. Online extraction LC–MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: Amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. Journal of Chromatography B. 2011;879(25):2642-52.

24. Farré M, De la Torre R, Llorente M, Lamas X, Ugena B, Segura J, et al. Alcohol and cocaine interactions in humans. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1993;266(3):1364-73.

25. Langman LJ, Bjergum MW, Williamson CL, Crow FW. Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in urine. Journal of analytical toxicology. 2009;33(8):447-55.

26. Snozek CL, Bjergum MW, Langman LJ. Cocaine and metabolites by LC-MS/MS. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2012;902:91-103.

27. Leis HJ, Fauler G, Windischhofer W. Enantioselective quantitative analysis of amphetamine in human plasma by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 2014;406(18):4473-80.

28. Hädener M, Bruni PS, Weinmann W, Frübis M, König S. Accelerated quantification of amphetamine enantiomers in human urine using chiral liquid chromatography and on-line column-switching coupled with tandem mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 2017;409(5):1291-300.

29. Bertol E, Vaiano F, Borsotti M, Quercioli M, Mari F. Comparison of immunoassay screening tests and LC–MS-MS for urine detection of benzodiazepines and their metabolites: results of a national proficiency test. Journal of analytical toxicology. 2013;37(9):659-64.

30. Kayaalp O. Tıbbi farmakoloji: Hacettepe-Taş; 1996.

31. Dasgupta A. Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing: Academic Press; 2019.

32. Wille SM, Raes E, Lillsunde P, Gunnar T, Laloup M, Samyn N, et al. Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs. Ther Drug Monit. 2009;31(4):511-9.

33. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. Clarke's analysis of drugs and poisons: Pharmaceutical press London; 2011.

34. Samyn N, van Haeren C. On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. International journal of legal medicine. 2000;113(3):150-4.

35. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. The Clinical biochemist Reviews. 2006;27(3):147-59.

36. Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. Journal of analytical toxicology. 1995;19(6):359-74.

37. O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah A, Cheever ML. Correlation of saliva codeine concentrations with plasma concentrations after oral codeine administration. Journal of analytical toxicology. 1999;23(6):452-9.

38. Kim I, Barnes AJ, Oyler JM, Schepers R, Joseph RE, Jr., Cone EJ, et al. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. Clin Chem. 2002;48(9):1486-96.

39. Engblom C, Gunnar T, Rantanen A, Lillsunde P. Driving under the influence of drugs--amphetamine concentrations in oral fluid and whole blood samples. Journal of analytical toxicology. 2007;31(5):276-80.

40. Desrosiers NA, Barnes AJ, Hartman RL, Scheidweiler KB, Kolbrich-Spargo EA, Gorelick DA, et al. Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. Anal Bioanal Chem. 2013;405(12):4067-76.

41. Schiano T, Dove L, Wong M, Poordad F. Substance Abuse and Mental Health Services Administration Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs; Request for Information Regarding. Curr Infect Dis Rep. 2008;15:67-76.

42. Prego-Meleiro P, Lendoiro E, Concheiro M, Cruz A, López-Rivadulla M, de Castro A. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of cannabinoids and phase I and II metabolites in meconium. Journal of Chromatography A. 2017;1497:118-26.

43. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. Clinical Biochemist Reviews. 2006;27(3):147.

44. Brcak M, Beck O, Bosch T, Carmichael D, Fucci N, George C, et al. European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. Drug testing and analysis. 2018;10(3):402-15.

45. Ventura M, Pichini S, Ventura R, Zuccaro P, Pacifici R, de la Torre R. Stability studies of principal illicit drugs in oral fluid: preparation of reference materials for external quality assessment schemes. Therapeutic drug monitoring. 2007;29(5):662-5.

46. Wu AH, Forte E, Casella G, Sun K, Hemphill G, Foery R, et al. CEDIA for screening drugs of abuse in urine and the effect of adulterants. Journal of forensic sciences. 1995;40(4):614-8.

47. Mikkelsen SL, Ash KO. Adulterants causing false negatives in illicit drug testing. Clin Chem. 1988;34(11):2333-6.

48. Wong RC, Tran M, Tung JK. Oral fluid drug tests: effects of adulterants and foodstuffs. Forensic Sci Int. 2005;150(2-3):175-80.

49. Yasadışı İN. Kötüye Kullanılan ilaç ve Madde Analizi Yapan Doğrulama Laboratuvarlarının Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Genelge (2015). Ankara, Sağlık Bakanlığı.

50. Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. Therapeutic drug monitoring. 2004;26(2):200-5.

51. Kaya E, Akata I, Bakırcı S, Dereli D, Küçükgüven E, Yılmaz İ. İMMÜNOKROMATOGRAFİK KART TESTLERİN ÇALIŞMA PRENSİBİ VE ÜRETİM TEKNİKLERİ. Duzce Medical Journal. 2014;16(3).

52. Liu J, Hu X, Cao F, Zhang Y, Lu J, Zeng L. A lateral flow strip based on gold nanoparticles to detect 6-monoacetylmorphine in oral fluid. Royal Society open science. 2018;5(6):180288.

53. Idowu OR, Caddy B. A review of the use of saliva in the forensic detection of drugs and other chemicals. Journal - Forensic Science Society. 1982;22(2):123-35.

54. Cone EJ. Saliva testing for drugs of abuse. Annals of the New York Academy of Sciences. 1993;694(1):91-127.

55. Niedbala RS, Kardos K, Waga J, Fritch D, Yeager L, Doddamane S, et al. Laboratory analysis of remotely collected oral fluid specimens for opiates by immunoassay. Journal of analytical toxicology. 2001;25(5):310-5.

56. Moore C, Rana S, Coulter C. Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. Journal of Chromatography B. 2007;852(1-2):459-64.

57. Heiskanen T, Langel K, Gunnar T, Lillsunde P, Kalso EA. Opioid concentrations in oral fluid and plasma in cancer patients with pain. Journal of pain and symptom management. 2015;50(4):524-32.

58. Presley L, Lehrer M, Seiter W, Hahn D, Rowland B, Smith M, et al. High prevalence of 6-acetylmorphine in morphine-positive oral fluid specimens. Forensic Sci Int. 2003;133(1-2):22-5.

59. Moore L, Wicks J, Spiehler V, Holgate R. Gas chromatography-mass spectrometry confirmation of Cozart RapiScan saliva methadone and opiates tests. Journal of analytical toxicology. 2001;25(7):520-4.

60. Jenkins AJ, Keenan RM, Henningfield JE, Cone EJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. Journal of analytical toxicology. 1994;18(6):317-30.

61. Flood JG, Khaliq T, Bishop KA, Griggs DA. The new Substance Abuse and Mental Health Services Administration oral fluid cutoffs for cocaine and heroin-related analytes applied to an addiction medicine setting: Important, unanticipated findings with LC-MS/MS. Clinical chemistry. 2016;62(5):773-80.

62. Schramm W, Smith RH, Craig PA, Kidwell DA. Drugs of abuse in saliva: a review. Journal of analytical toxicology. 1992;16(1):1-9.

63. Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. Journal of analytical toxicology. 1995;19(6):359-74.

64. Moolchan ET, Cone EJ, Wstadik A, Huestis MA, Preston KL. Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. Journal of analytical toxicology. 2000;24(7):458-66.

65. Jufer RA, Wstadik A, Walsh SL, Levine BS, Cone EJ. Elimination of cocaine and metabolites in plasma, saliva, and urine following repeated oral administration to human volunteers. Journal of analytical toxicology. 2000;24(7):467-77.

66. Cone EJ, Kumor K, Thompson LK, Sherer M. Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. Journal of analytical toxicology. 1988;12(4):200-6.

67. Cone EJ, Oyler J, Darwin WD. Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal, and smoked administration. Journal of analytical toxicology. 1997;21(6):465-75.

68. Busardo FP, Pichini S, Pellegrini M, Montana A, Lo Faro AF, Zaami S, et al. Correlation between Blood and Oral Fluid Psychoactive Drug Concentrations and Cognitive Impairment in Driving under the Influence of Drugs. Current neuropharmacology. 2018;16(1):84-96.

69. Suzuki S, Inoue T, Hori H, Inayama S. Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography. Journal of analytical toxicology. 1989;13(3):176-8.

70. Huestis MA, Cone EJ. Methamphetamine disposition in oral fluid, plasma, and urine. Ann N Y Acad Sci. 2007;1098:104-21.

71. Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. Clinical chemistry. 2009;55(11):1910-31.

72. Logan BK, Lowrie KJ, Turri JL, Yeakel JK, Limoges JF, Miles AK, et al. Recommendations for toxicological investigation of drug-impaired driving and motor vehicle fatalities. Journal of analytical toxicology. 2013;37(8):552-8.73. Melanson SE. The utility of immunoassays for urine drug testing. Clinics in laboratory medicine. 2012;32(3):429-47.

74. Jeon SI, Yang X, Andrade JD. Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay. Analytical biochemistry. 2004;333(1):136-47.

75. Datta P, Dasgupta A. Bidirectional (positive/negative) interference in a digoxin immunoassay: importance of antibody specificity. Therapeutic drug monitoring. 1998;20(3):352-7.

76. Cotten SW, Duncan DL, Burch EA, Seashore CJ, Hammett-Stabler CA. Unexpected interference of baby wash products with a cannabinoid (THC) immunoassay. Clinical biochemistry. 2012;45(9):605-9.

77. Zawilska JB. "Legal highs" - new players in the old drama. Current drug abuse reviews. 2011;4(2):122-30.

78. Vardakou I, Pistos C, Spiliopoulou C. Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. Toxicology letters. 2010;197(3):157-62.

79. Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in ‘herbal mixtures’ using LC-MS/MS techniques. Journal of Mass Spectrometry. 2012;47(1):54-65.

80. Kneisel S, Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. Journal of mass spectrometry. 2012;47(7):825-35.

81. Borriello R, Carfora A, Cassandro P, Petrella R. Clinical and Forensic Diagnosis of Very Recent Heroin Intake by 6-acetylmorphine Immunoassay Test and LC-MS/MS Analysis in Urine and Blood. Annals of clinical and laboratory science. 2015;45(4):414-8.

82. von Euler M, Villen T, Svensson JO, Stahle L. Interpretation of the presence of 6-monoacetylmorphine in the absence of morphine-3-glucuronide in urine samples: evidence of heroin abuse. Ther Drug Monit. 2003;25(5):645-8.

83. Dasgupta A, Wahed A. Drugs of Abuse Testing. 2014. p. 289-306.

84. Shea JL. Bioanalytical methods for quantitation of levamisole, a widespread cocaine adulterant. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2013;51(1):205-12.

85. Melanson S. KIMS, CEDIA, and HS-CEDIA immunoassays are inadequately sensitive for detection of benzodiazepines in urine from patients treated for chronic pain. Pain Physician. 2014;17:359-66.

86. Saitman A, Park H-D, Fitzgerald RL. False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: a review. Journal of analytical toxicology. 2014;38(7):387-96.

87. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

88. Grob RL, Barry EF. Modern practice of gas chromatography: Wiley Online Library; 1977.

89. Garg U, Hammett-Stabler H. Clinical applications of mass spectrometry. Methods and Protocols. 2010:2010.

90. Burtis CA, Bruns DE. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book: Elsevier Health Sciences; 2014.

91. Ristimaa J, Gergov M, Pelander A, Halmesmäki E, Ojanperä I. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010;398(2):925-35.

92. Jones J, Tomlinson K, Moore C. The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine, and oxycodone in hair and oral fluid. Journal of analytical toxicology. 2002;26(3):171-5.

93. Enders JR, McIntire GL. A dilute-and-shoot LC–MS method for quantitating opioids in oral fluid. Journal of analytical toxicology. 2015;39(8):662-7.

94. Clark ZD, Cutler JM, Pavlov IY, Strathmann FG, Frank EL. Simple dilute-and-shoot method for urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta. 2017;468:201-8.

95. Kong TY, Kim JH, Kim JY, In MK, Choi KH, Kim HS, et al. Rapid analysis of drugs of abuse and their metabolites in human urine using dilute and shoot liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Archives of pharmacal research. 2017;40(2):180-96.

96. O'Connor D, Clarke DE, Morrison D, Watt AP. Determination of drug concentrations in plasma by a highly automated, generic and flexible protein precipitation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method applicable to the drug discovery environment. Rapid communications in mass spectrometry. 2002;16(11):1065-71.

97. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2003;785(2):263-75.

98. Pawliszyn J, Lord HL. Handbook of sample preparation: Wiley Online Library; 2010.

99. Alders L. Liquid-liquid extraction: theory and laboratory experiments: Elsevier; 1955.

100. Thurman EM. Solid-phase extraction: principles and practice. Chemical analysis; 147. 1998.

101. Niessen WM. Current practice of gas chromatography-mass spectrometry: CRC Press; 2001.

102. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;403(6):1523-48.

103. Schebb NH, Inceoglu B, Rose T, Wagner K, Hammock BD. Development of an ultra fast online-solid phase extraction (SPE) liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) based approach for the determination of drugs in pharmacokinetic studies. Analytical Methods. 2011;3(2):420-8.

104. Desrosiers NA, Himes SK, Scheidweiler KB, Concheiro-Guisan M, Gorelick DA, Huestis MA. Phase I and II cannabinoid disposition in blood and plasma of occasional and frequent smokers following controlled smoked cannabis. Clinical chemistry. 2014;60(4):631-43.

105. 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. Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis. 2014;91:169-75.

106. 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 testing and analysis. 2018;10(3):518-29.

107. Hädener M, Weinmann W, van Staveren DR, König S. Rapid quantification of free and glucuronidated THCCOOH in urine using coated well plates and LC–MS/MS analysis. Bioanalysis. 2017;9(5):485-96.

108. Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, van Ree JM, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2005;824(1-2):213-21.

109. Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, van Ree JM, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid

chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2005;824(1-2):213-21.

110. French D, Wu A, Lynch K. Hydrophilic interaction LC-MS/MS analysis of opioids in urine: significance of glucuronide metabolites. Bioanalysis. 2011;3(23):2603-12.

111. Popa D-S, Vlase L, Leucuta SE, Loghin F. Determination of cocaine and benzoylecgonine in human plasma by LC-MS/MS. Farmacia. 2009;57:301-8.

112. Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D'ascenzo G, Roccia C, et al. Determination of illicit drugs in urine and plasma by micro-SPE followed by HPLC–MS/MS. Chromatographia. 2012;75(1-2):55-63.

113. Ambre J. The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data. Journal of analytical toxicology. 1985;9(6):241-5.

114. Robandt PP, Reda LJ, Klette KL. Complete automation of solid-phase extraction with subsequent liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of benzoylecgonine, m-hydroxybenzoylecgonine, p-hydroxybenzoylecgonine, and norbenzoylecgonine in urine—application to a high-throughput urine analysis laboratory. Journal of analytical toxicology. 2008;32(8):577-85.

115. Fiorentin TR, D'Avila FB, Comiran E, Zamboni A, Scherer JN, Pechansky F, et al. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2017;86:60-6.

116. Kang M-G, Lin H-R. Systematic Evaluation and Validation of Benzodiazepines Confirmation Assay Using LC–MS-MS. Journal of analytical toxicology. 2018;43(2):96-103.

117. Fernández P, Vázquez C, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM. Development of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of six benzodiazepines in human plasma after solid-phase extraction. Analytical Letters. 2010;43(6):1075-84.

118. Perez ER, Knapp JA, Horn CK, Stillman SL, Evans JE, Arfsten DP. Comparison of LC–MS-MS and GC–MS analysis of benzodiazepine compounds included in the drug demand reduction urinalysis program. Journal of analytical toxicology. 2016;40(3):201-7.

119. ISO I. 9000-Quality management systems–Fundamentals and vocabulary. Quality management systems, Berlin: Beuth Verlag GmbH. 2005:22-5.

120. CLSI EP-10 A3 [21.10.2019]. Available from: https://clsi.org/media/1434/ep10a3amd_sample.pdf.

121. CLSI document EP15-A2 [21.10.2019]. Available from: https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep15/.

122. CLSI EP05-A2 [21.10.2019]. Available from: https://webstore.ansi.org/standards/clsi/clsiep05a2.

123. CLSI EP09-A2 [21.10Ç2109]. Available from: http://www.zxyjhjy.com/upload/attached/file/20170406/20170406155102_6304.pdf.

124. CLSI EP17-A [21.10.2019]. Available from: https://webstore.ansi.org/standards/clsi/ep17.

125. Edwards LD, Smith KL, Savage T. Drugged Driving in Wisconsin: Oral Fluid Versus Blood. Journal of analytical toxicology. 2017;41(6):523-9.

126. Scherer JN, Fiorentin TR, Borille BT, Pasa G, Sousa TRV, von Diemen L, et al. Reliability of point-of-collection testing devices for drugs of abuse in oral fluid: A systematic review and meta-analysis. J Pharm Biomed Anal. 2017;143:77-85.

127. Blencowe T, Pehrsson A, Lillsunde P, Vimpari K, Houwing S, Smink B, et al. An analytical evaluation of eight on-site oral fluid drug screening devices using laboratory confirmation results from oral fluid. Forensic Sci Int. 2011;208(1-3):173-9.

128. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. Forensic Sci Int. 2005;150(2-3):119-31.

129. Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. Clin Chem. 2009;55(11):1910-31.

130. Langel K, Gjerde H, Favretto D, Lillsunde P, Oiestad EL, Ferrara SD, et al. Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. Drug testing and analysis. 2014;6(5):461-71.

131. Kelly T. Clarke's analysis of drugs and poisons. Taylor & Francis; 2012.

132. Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kunsman KP, Blum KA, Newland GA, et al. Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing. II. Two studies of extreme cannabis smoke exposure in a motor vehicle. Journal of analytical toxicology. 2005;29(7):607-15.

133. Thompson LK, Cone EJ. Determination of δ9-tetrahydrocannabinol in human blood and saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1987;421:91-7.

134. Maseda C, Hama K, Fukui Y, Matsubara K, Takahashi S, Akane A. Detection of Δ9-THC in saliva by capillary GCECD after marihuana smoking. Forensic Sci Int. 1986;32(4):259-66.

135. Tjaden UR, Meeles MT, Thys CP, van der Kaay M. Determination of some benzodiazepines and metabolites in serum, urine and saliva by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography. 1980;181(2):227-41.

136. Samyn N, De Boeck G, Cirimele V, Verstraete A, Kintz P. Detection of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in oral fluid after controlled administration of rohypnol. Journal of analytical toxicology. 2002;26(4):211-5.

137. Bakke E, Hoiseth G, Arnestad M, Gjerde H. Detection of Drugs in Simultaneously Collected Samples of Oral Fluid and Blood. Journal of analytical toxicology. 2019;43(3):228-32.

138. Williams RH, Erickson T, Broussard LA. Evaluating sympathomimetic intoxication in an emergency setting. Laboratory Medicine. 2000;31(9):497-508.

139. Holler JM, Bosy TZ, Klette KL, Wiegand R, Jemionek J, Jacobs A. Comparison of the Microgenics CEDIA heroin metabolite (6-AM) and the Roche Abuscreen ONLINE opiate immunoassays for the detection of heroin use in forensic urine samples. Journal of analytical toxicology. 2004;28(6):489-93.

140. Hull MJ, Bierer MF, Griggs DA, Long WH, Nixon AL, Flood JG. Urinary buprenorphine concentrations in patients treated with suboxone as determined by liquid chromatography-mass spectrometry and CEDIA immunoassay. Journal of analytical toxicology. 2008;32(7):516-21.

141. Rohrig TP, Moore C. The determination of morphine in urine and oral fluid following ingestion of poppy seeds. Journal of analytical toxicology. 2003;27(7):449-52.

142. Samano KL, Clouette RE, Rowland BJ, Sample RH. Concentrations of Morphine and Codeine in Paired Oral Fluid and Urine Specimens Following Ingestion of a Poppy Seed Roll and Raw Poppy Seeds. Journal of analytical toxicology. 2015;39(8):655-61.

143. Smith ML, Nichols DC, Underwood P, Fuller Z, Moser MA, LoDico C, et al. Morphine and codeine concentrations in human urine following controlled poppy seeds administration of known opiate content. Forensic Sci Int. 2014;241:87-90.

144. Maas A, Kramer M, Sydow K, Chen PS, Dame T, Musshoff F, et al. Urinary excretion study following consumption of various poppy seed products and investigation of the new potential street heroin marker ATM4G. Drug testing and analysis. 2017;9(3):470-8.

145. Maas A, Madea B, Hess C. Confirmation of recent heroin abuse: Accepting the challenge. Drug testing and analysis. 2018;10(1):54-71.

146. Zacher JL, Givone DM. False-positive urine opiate screening associated with fluoroquinolone use. Annals of Pharmacotherapy. 2004;38(9):1525-8.

147. Shafiq Q, Mutgi A. Urine opiate screening: false-positive result with levofloxacin. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2010;182(15):1644-5.

148. de Paula M, Saiz LC, González-Revaldería J, Pascual T, Alberola C, Miravalles E. Rifampicin causes false-positive immunoassay results for urine opiates. Clinical chemistry and laboratory medicine. 1998;36(4):241-3.

149. Johnson-Davis KL, Thompson CD, Clark CJ, McMillin GA, Lehman CM. Method comparison of the Ortho Vitros Fusion 5, 1 chemistry analyzer and the Roche COBAS

Integra 400 for urine drug screen testing in the emergency department. Journal of analytical toxicology. 2012;36(5):345-8.

150. ONLINE DAT Benzodiazepines II [19.10.2019]. Available from: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/gb/en/Documents/GetDocument?documentId=fdc0891b-796e-e611-4aad-00215a9b3428.

151. Armbruster DA, Schwarzhoff RH, Pierce BL, Hubster EC. Method comparison of EMIT II and online with RIA for drug screening. Journal of forensic sciences. 1993;38(6):1326-41.

152. Mazor SS, Mycyk MB, Wills BK, Brace LD, Gussow L, Erickson T. Coca tea consumption causes positive urine cocaine assay. European Journal of Emergency Medicine. 2006;13(6):340-1.

153. Mazor SS, Mycyk MB, Wills BK, Brace LD, Gussow L, Erickson T. Coca tea consumption causes positive urine cocaine assay. European journal of emergency medicine : official journal of the European Society for Emergency Medicine. 2006;13(6):340-1.

154. Kim E, Murray BP, Salehi M, Moran TP, Carpenter JE, Koch DD, et al. Does Lidocaine Cause False Positive Results on Cocaine Urine Drug Screen? Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology. 2019.

155. Isenschmid DS. Cocaine. Wiley Encyclopedia of Forensic Science. 2009.

156. Verstraete AG. Oral fluid testing for driving under the influence of drugs: history, recent progress and remaining challenges. Forensic Sci Int. 2005;150(2-3):143-50.

157. Walsh JM, de Gier JJ, Christopherson AS, Verstraete AG. Drugs and driving. Traffic injury prevention. 2004;5(3):241-53.

158. Andas HT, Enger A, Oiestad AM, Vindenes V, Christophersen AS, Huestis MA, et al. Extended Detection of Amphetamine and Methamphetamine in Oral Fluid. Ther Drug Monit. 2016;38(1):114-9.

159. Vindenes V, Lund HM, Andresen W, Gjerde H, Ikdahl SE, Christophersen AS, et al. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. Forensic Sci Int. 2012;219(1-3):165-71.

160. Hadener M, Weinmann W, van Staveren DR, Konig S. Rapid quantification of free and glucuronidated THCCOOH in urine using coated well plates and LC-MS/MS analysis. Bioanalysis. 2017;9(5):485-96.

161. Ferreirós N, Labocha S, Walter C, Lötsch J, Geisslinger G. Simultaneous and sensitive LC–MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma. Analytical and bioanalytical chemistry. 2013;405(4):1399-406.

162. Skopp G, Pötsch L, Mauden M, Richter B. Partition coefficient, blood to plasma ratio, protein binding and short-term stability of 11-nor-Δ9-carboxy tetrahydrocannabinol glucuronide. Forensic Sci Int. 2002;126(1):17-23.

163. Liao Q, Deng Y, Xie Z, Pan B, Zhang L. Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: Application to a clinical pharmacokinetic study. Journal of separation science. 2009;32(2):202-11.

164. Andersson M, Stephanson N, Öhman I, Terzuoli T, Lindh JD, Beck O. Direct and efficient liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for opiates in urine drug testing–importance of 6-acetylmorphine and reduction of analytes. Drug testing and analysis. 2014;6(4):317-24.

165. Wang T, Shen B, Shi Y, Xiang P, Yu Z. Chiral separation and determination of R/S-methamphetamine and its metabolite R/S-amphetamine in urine using LC–MS/MS. Forensic Sci Int. 2015;246:72-8.

166. Fernandez Mdel M, Samyn N. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of amphetamines in plasma. Journal of analytical toxicology. 2011;35(8):577-82.

167. Lin HR, Choi KI, Lin TC, Hu A. Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2013;929:133-41.

168. Nakanishi K, Katagi M, Zaitsu K, Shima N, Kamata H, Miki A, et al. Simultaneous enantiomeric determination of MDMA and its phase I and phase II metabolites in urine by

liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chiral derivatization. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;404(8):2427-35.

169. Marin SJ, Coles R, Merrell M, McMillin GA. Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS. Journal of analytical toxicology. 2008;32(7):491-8.

170. Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. Analytica chimica acta. 2013;767:88-96.

171. Marin SJ, Roberts M, Wood M, McMillin GA. Sensitive UPLC–MS-MS Assay for 21 Benzodiazepine Drugs and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone in Serum or Plasma. Journal of analytical toxicology. 2012;36(7):472-6.

172. Dunlop S, Hayes K, Leavy P, Cusack D, Maguire R. An atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatographic–tandem mass spectrometry method for the analysis of benzodiazepines in urine. Journal of Chromatography B. 2017;1064:22-7.

173. Quintela O, Sauvage F-L, Charvier F, Gaulier J-M, Lachatre G, Marquet P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: method with forensic applications. Clinical chemistry. 2006;52(7):1346-55.

174. Fuh M-R, Lin S-W, Chen L-L, Lin T-Y. Determination of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in human urine by on-line solid phase extraction liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. Talanta. 2007;72(4):1329-35.

175. French D, Wu A, Lynch K. Hydrophilic interaction LC–MS/MS analysis of opioids in urine: significance of glucuronide metabolites. Bioanalysis. 2011;3(23):2603-12.

8. EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 26379996 / 283 28.11.2018

KONU :28 11.2018 Tarih ve 243 Sayılı Kurul Kararı

Sayın: **Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ**
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi -
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacılığını yapmış olduğunuz **"Tükürükte Uyuşturucu Madde Analizinin İmmunoassay Tarama Ve LC-MS-MS Doğrulama Testleri İle Karşılaştırılması Ve Validasyonu"** isimli **Dr. Gamze AVCUOĞLU'** nun tez çalışması Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **28.11.2018** tarih ve **243** sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur

(13.04.2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan "İlaç Ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik" gereği klinik araştırmaların etik kurul onayı alındıktan sonra yılda en az bir ara raporunun, araştırma sonlandırıldıktan sonra bir yıl içerisinde sonuç raporunun Etik Kurula geri bildirimi gerekmektedir. Gerekli bildirimi yapmayanların sonraki Etik Kurul başvuruları kabul edilmeyecektir.)

Bilgilerinize rica ederim

Yrd. Doç. Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi - Etik Kurul Sekreteryası
Bilkent Yolu Lodumlu Mevki 3.Km. Çankaya /Ankara
Telefon: 0(312) 291 25 25 / 36 45

ÖZGEÇMİŞ

Gamze AVCIOĞLU 12.09.1990 tarihinde Mersin iline bağlı Tarsus ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini İskenderun'da tamamladı. 2008 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 2013 yılında mezun oldu. 2014 ve 2015 yılları arasında Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde görev yaptı. 2015 yılından bu yana Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda asistan doktor olarak görev yapmaktadır.