

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPIOİD KULLANIM BOZUKLUĞUNDA İDRAR VE
TÜKÜRÜK NUMUNELERİNDE YASAKLI MADDE
ANALİZLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Biyolog İlknur ÇOBAN

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPIOİD KULLANIM BOZUKLUĞUNDA İDRAR VE TÜKÜRÜK
NUMUNELERİNDE YASAKLI MADDE ANALİZLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Biyolog İlknur ÇOBAN

Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aslı PINAR

ANKARA

2023

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

17 /01/2023

İlknur ÇOBAN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilişkin patent başvurusu yapılmaması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü/ anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullandığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü/ anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarılan veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

^a Tez danışmanının önerisi ve enstitü/ anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. Aslı PINAR danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Biyolog
İlknur ÇOBAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, tecrübesi, zamanı, sabrı ve emekleri ile bana ışık tutan; farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, en zorlandığım zamanlarda bile hep desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Aslı PINAR'a en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından, TYL-2021-18764 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca eğitimime değerli katkılarda bulunan Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D. Başkanı Prof. Dr. Asuman ÖZKARA, Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT, Prof. Dr. İncilay LAY, Prof. Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ, Doç. Dr. Mukaddes GÜLER, Doç. Dr. Oytun PORTAKAL AKÇİN ve Dr. Öğr. Üyesi Başak ÇELTİKÇİ hocalarıma,

Değerli katkıları için tez değerlendirme jürisinde görev alan Prof. Dr. Neslihan BUKAN, Prof. Dr. Zeliha Günnur DİKMEN, Prof. Dr. Ebru BODUR ve Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN hocalarıma,

Hasta gruplarının oluşturulmasında desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Berna Diclenu ULUĞ, öğretim üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Şeref Can GÜREL ve Doç. Dr. Sertaç AK hocalarıma,

Numunelerin toplanmasında özverili destekleri için arkadaşlarım sevgili Tülay KARAYILAN ve sevgili Melisa OCAK'a,

Çalışmam boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'nda çalışan tüm mesai arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım süresince benden desteklerini, anlayışlarını esirgemeyen sevgili eşim Ömer Faruk ÇOBAN'a ve canım kızım Yağmur ÇOBAN'a sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Çoban İ., Opioid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numunelerinde yasaklı madde analizlerinin karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Opioid kullanım bozukluğu (OKB) tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Bu grup hastaların tanı ve tedavisinde opioid maddelerin yanı sıra tedavide kullanılan ilaçların da idrar, kan ve tükürük gibi hasta numunelerinde saptanması amacıyla laboratuvar analizlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında OKB tedavisinde kullanılan ilaçların, metabolitlerinin ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddelerin idrar ve tükürük numunelerinde kantitatif analizini gerçekleştirecek LC-MS/MS yöntemlerinin panel olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır. OKB tanı ve tedavi izleminde yararlı olacağı düşünülen 16 opioid grubu, 3 kokain grubu, 5 amfetamin grubu ve 2 gabapentinoid olmak üzere toplam 26 madde çalışma kapsamına alındı. Bu maddelerin (6-MAM, BEG, buprenorfin, dihidrokodein, EDDP, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, kokaetilen, kokain, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, metadon, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin, oksikodon, pregabalın ve tramadol) idrar ve tükürük numunelerinde LC-MS/MS ile analiz yöntemleri geliştirildi. Validasyonları tamamlanan yöntemlerle 76 hastanın idrar ve tükürük numunelerinde madde analizleri gerçekleştirildi. İdrar numunelerinin LC-MS/MS sonuçları, immünolojik yöntem ile çalışılan opiat, ekstazi ve amfetamin sonuçları ile uyumlu bulundu. Ayrıca, hastaların tedavisinde kullanılan ilaçların ve metabolitlerinin, opiat ölçümünde kullandığımız immünolojik yöntem üzerinde etkileşimlerinin olmadığı belirlendi. Çalışmamızda geliştirdiğimiz idrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemlerinin naltrekson düzeylerinin ölçümünün hastaların relaps riskini önlemede katkı sağlayacağı düşünüldü. Geliştirdiğimiz yöntemler ile yapılan analizler sonucunda idrar numuneleri için tespit edilen 14 madde ile tükürük numuneleri için tespit edilen 11 maddenin dahil edildiği minimize panellerin, OKB tanı ve tedavisinde kullanımının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Opioid kullanım bozukluğu, Sıvı kromatografi, Kütle spektrometri, Tükürük, İdrar

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-18764

ABSTRACT

Çoban İ., Comparison of illicit substance analysis in urine and saliva samples in opioid use disorder, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Biochemistry, Master's Degree Thesis, Ankara, 2023. Various drugs are used in the treatment of opioid use disorder (OUD). In the diagnosis and treatment of this group of patients, laboratory analyzes are required in order to detect the drugs used in the treatment as well as opioid substances in patient samples such as urine, blood and saliva. In this thesis, it is aimed to develop LC-MS/MS methods as a panel that will perform the quantitative analysis of drugs used in the treatment of OUD, their metabolites and commonly abused illicit substances in the opioid group in urine and saliva samples. A total of 26 substances, including 16 opioid group, 3 cocaine group, 5 amphetamine group and 2 gabapentoids, which are thought to be useful in the diagnosis and treatment follow-up of OUD, were included in the study. Analysis methods of these substances (6-MAM, BEG, buprenorphine, cocaethylene, cocaine, codeine, dihydrocodeine, EDDP, ethylmorphine, gabapentin, heroin, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, methadone, methamphetamine, morphine, naloxane, naltrexone, norbuprenorphine, norcodeine, normorphine, oxycodone, pregabalin and tramadol), in urine and saliva samples by LC-MS/MS were developed. Substance analyzes were performed in urine and saliva samples of 76 patients with the methods whose validations were completed. LC-MS/MS results of urine samples were found to be compatible with opiate, ecstasy and amphetamine results studied by immunological method. In addition, it was determined that the drugs used in the treatment of the patients and their metabolites did not interact with the immunoassay used in opiate measurement. It was thought that the measurement of naltrexone levels of the urine and salivary LC-MS/MS methods we developed in our study would contribute to preventing the risk of relapse of the patients. As a result of the analyzes made with the methods we developed, it was concluded that the minimalized panels, which included 14 substances detected for urine samples and 11 substances detected for saliva samples, would be beneficial in the diagnosis and treatment of OUD.

Key words: Opioid use disorder, Liquid chromatography, Mass spectrometry, Saliva, Urine.

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project No: TYL-2021-18764

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bağımlılık	3
2.1.1. Bağımlılığın Tanımı	3
2.1.2. Madde Kullanım Bozukluğu	3
2.2. Yasaklı Maddeler	5
2.2.1. Opioid Maddeler	5
2.2.2. Kokain	12
2.2.3. Amfetaminler	13
2.2.4. Benzodiazepinler	13
2.2.5. Esrar	13
2.2.6. İlişkili Diğer Bileşikler	14
2.3. Opioid Kullanım Bozukluğu ve Tedavi Yaklaşımları	15
2.3.1. Opioid Kullanım Bozukluğu	15
2.3.2. Opioid Kullanım Bozukluğu Tedavileri	16
2.4. Opioid Kullanım Bozukluğunda Yasaklı Madde Analizi	18
2.4.1. Hasta Başlı Testler	18

2.4.2. İmmunolojik Yöntemler	19
2.4.3. Kromatografik Yöntemler	20
2.4.4. Biyolojik Numune Tipleri	23
2.5. Çalışma Kapsamına Alınan Maddeler	27
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	29
3.1. Kimyasal ve Cihazlar	29
3.1.1. Kimyasallar ve Kitler	29
3.1.2. Cihazlar	30
3.1.3. Sarf Malzemeler	30
3.2. Etik Kurul İzni ve Çalışma Planı	31
3.3. Hasta Numunelerinin Toplanması	32
3.4. Yöntemler	33
3.4.1. İdrar Numuneleri İçin LC-MS/MS Yöntemi	33
3.4.2. Tükürük Numuneleri için LCMS/MS Yöntemi	37
3.4.3. Validasyon Çalışmaları	42
3.4.4. İdrar Numunelerinin Bütünlük Analizleri	48
3.4.5. İdrar Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi	49
3.4.6. İdrar Numunelerinin İmmünolojik Yöntem ile Analizi	49
3.4.7. Tükürük Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi	50
4. BULGULAR	51
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar	51
4.2. İdrar Numuneleri İçin LC-MS/MS Yöntemi Validasyonu	52
4.2.1. Analitik Aralık ve Doğruluk	54
4.2.2. Saptama ve Kantitasyon Sınırı	56
4.2.3. Bias ve Kesinlik	59
4.2.4. Sürüklenme	62
4.2.5. Girişim	63
4.2.6. İyonizasyon Etkileşim	65
4.2.7. Dilüsyon Bütünlüğü	66
4.2.8. Dayanıklılık	67
4.3. Tükürük Numuneleri İçin LC -MS/MS Yöntemi Validasyonu	68
4.3.1. Analitik Aralık ve Doğruluk	71

4.3.2. Saptama ve Kantitasyon Sınırı	73
4.3.3. Bias ve Kesinlik	76
4.3.4. Sürüklenme	80
4.3.5. Girişim	81
4.3.6. İyonizasyon Etkileşim	83
4.3.7. Dilüsyon Bütünlüğü	84
4.3.8. Dayanıklılık	85
4.4. Numunelerin Analiz Sonuçları	86
4.4.1. İdrar Numunelerinin Bütünlük Analizleri	86
4.4.2. İdrar Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi	88
4.4.3. İdrar Numunelerinin İmmünojenik Yöntem ile Analizi	88
4.4.4. Tükürük Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi	88
4.4.5. İdrar Numunelerinin Glukronidaz ile Analizi	93
5. TARTIŞMA	95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
7. KAYNAKLAR	106
8. EKLER	
Ek-1.Etik Kurul Onayı	
Ek-2.Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Aydınlatılmış Onam Formu	
Ek-3. Tez Çalışması Orjinallik raporu	
Ek-4 Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

6-MAM:	6-Monoasetil Morfin
APCI:	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
BEG:	Benzoilekgonin
BİAS:	Gerçeklik, hata
cAMP:	Siklik adenozin monofosfat
CEDIA:	Klonlanmış enzim donör immünolojik yöntem
CI:	Kimyasal iyonizasyon
CV:	Kesinlik değeri, varyasyon katsayısı
DSM:	Amerikan Psikiyatri Birliği Tanı Ölçütleri Başvuru El Kitabı
DOR:	Opioid delta reseptör
EDDP:	2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidine
EMIT:	Enzim çoğaltılmış immünolojik yöntem
EI:	Elektron iyonizasyon
ESI:	Elektrosprey iyonizasyon
FDA:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FPIA:	Floresans polarizasyon immünolojik yöntem
GC-MS:	Gaz kromatografisi- kütle spektrometrisi
G6PHD :	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GDP:	Guanozin difosfat
GTP:	Guanozin trifosfat
ICD-10:	Uluslararası hastalık sınıflandırılması
IS:	İnternal Standart
KIMS:	Mikropartiküllerin kinetik etkileşimi
KOR:	Opioid kappa reseptör
LC-MS/MS:	Sıvı kromatografisi-Üçlü kuadropol kütle spektrometrisi
LOD:	Saptama sınırı
LOQ:	Kantitasyon sınırı
MBDB:	1,3-Benzodioksolil-N-metilbütanamin
MDA:	3,4-Metilendioksiamfetamin

MDEA:	3,4-Metilendioksi-N-etilamfetamin
MDMA:	3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin
MOR:	Opioid mü resptörü
MS:	Kütle spektromet
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotid
OKB:	Opioid kullanım bozukluğu
pH:	Power of hydrogen, potansiyel hidrojen
SSS:	Santral sinir sistemi
SWGTOX:	Scientific Working Group for Forensic Toxicology Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology/ Adli toksikoloji bilimsel çalışma grubu adli toksikolojide metot validasyonu için standart uygulamalar
SRM:	Selected reaction monitoring, seçici reaksiyon izleme
MRM:	Multiple reaction monitoring, çoklu reaksiyon izleme

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Yasaklı maddeler ve ilişkili bileşiklerin yapıları	8-9
2.2. Opioid reseptör yapı ve mekanizması	11
2.3. Opioid agonist, seçici agonist ve antagonistlerinin reseptör yanıtları	12
2.4. Kütle spektrometrisi bileşenleri	21
2.5. Kuadropol yapısı	23
3.1. Çalışmada kullanılan akış gradienti	33
3.2. Protein ekstraksiyonu ile morfin maddesi kromatogramları	37
3.3. Uçurma işleminin morfin maddesi için karşılaştırılması	37
4.1. Hastaların demografik dağılım grafiği	51
4.2. İdrar LC-MS/MS yöntemi ile K4 kromatogram görüntüleri	52-53
4.3. İdrar LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri	55-56
4.4. İdrar LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri grafiği	59
4.5. İdrar LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri grafiği	60
4.6. İdrar LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri	61
4.7. İdrar LC-MS/MS sürüklenme grafiği	62
4.8. İdrar LC-MS/MS girişim grafiği	64
4.9. İdrar LC-MS/MS iyonizasyon etkileşim grafiği	65
4.10. İdrar LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü grafiği	66
4.11. İdrar LC-MS/MS dayanıklılık grafiği	67
4.12. Tükürük LC-MS/MS yöntemi ile K6 kromatogram görüntüleri	68-70
4.13. Tükürük LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri	72-73
4.14. Tükürük LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri grafiği	76
4.15. Tükürük LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri grafiği	77
4.16. Tükürük LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri	78
4.17. Tükürük LC-MS/MS dış merkez 300 ng/mL için Bias değerleri grafiği	79
4.18. Tükürük LC-MS/MS sürüklenme grafiği	80
4.19. Tükürük LC-MS/MS girişim grafiği	82
4.20. Tükürük LC-MS/MS iyonizasyon etkileşim grafiği	83

4.21 Tükürük LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü grafiği	84
4.22. Tükürük LC-MS/MS dayanıklılık grafiği	86

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Madde kullanım bozukluğı tanı kriterleri	4
2.2. Opioid maddelerin sentezlerine göre sınıflandırılmaları	6
2.3. Opioid reseptörleri ve afiniteleri	10
2.4. Kromatografi için iyonizasyon kaynakları	22
2.5. İdrar bütünlük analizleri ve değerlendirmeleri	25
2.6. Bazı yasaklı maddelerin kan, idrar ve tükürükte tespit süreleri	26
2.7. Yasaklı madde analizinde numune türlerinin karşılaştırılması	27
2.8. Çalışma kapsamına alınan yasaklı maddeler ve metabolitleri	28
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler	29
3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	30
3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	30
3.4. Çalışma planı	31
3.5. Çalışmaya dahil edilme kriterleri	32
3.6. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri	32
3.7. İdrar numuneleri için LC-MS/MS yöntemi koşulları	34
3.8. İdrar LC-MS/MS için seçilen iyon ve RT değerleri	35
3.9. İdrar LC-MS/MS için kalibratörlerin hazırlanması	36
3.10. Tükürük numuneleri için LC-MS/MS yöntemi koşulları	38
3.11. Tükürük LC-MS/MS için seçilen iyon ve RT değerleri	39
3.12. Tükürük LC-MS/MS için kalibratörlerin hazırlanması	41
3.13. Validasyon çalışma planı ve performans kriterleri	42
4.1. Hastaların demografik bilgileri	51
4.2. İdrar LC-MS/MS yönteminde analitik aralık ve doğrusallık çalışması	54
4.3. İdrar LC-MS/MS LOD değerleri	57-58
4.4 İdrar LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri	59
4.5. İdrar LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri	60
4.6 İdrar LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri	61
4.7 İdrar LC-MS/MS sürüklenme çalışması	62
4.8 İdrar LC-MS/MS girişim çalışması	64

4.9. İdrar LC-MS/MS % baskılanma veya artma değerleri	65
4.10 İdrar LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü çalışması sonuçları.	66
4.11. İdrar LC-MS/MS dayanıklılık çalışması	67
4.12. Tükürük LC-MS/MS yönteminde analitik aralık ve doğrusallık çalışması	71
4.13. Tükürük LC-MS/MS LOD değerleri	74-75
4.14. Tükürük LC-MS/MS 600, 300, 50 ng/mL için Bias değerleri	76
4.15. Tükürük LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri	77
4.16. Tükürük İdrar LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri	78
4.17. Tükürük LC-MS/MS dış merkez 300 ng/mL için Bias değerleri	79
4.18. Tükürük LC-MS/MS sürüklenme çalışması	80
4.19. Tükürük LC-MS/MS girişim çalışması	82
4.20. Tükürük LC-MS/MS % baskılanma veya artma değerleri	83
4.21 Tükürük LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü çalışması sonuçları	84
4.22. Tükürük LC-MS/MS dayanıklılık çalışması	85
4.23. İdrar bütünlük testleri sonuçları	86-87
4.24. İdrar ve tükürük numuneleri sonuçları	89-92
4.25. İdrar LC-MS/MS sonuçlarının hasta gruplarına göre karşılaştırılması	92
4.26. İdrar numunelerinde morfin sonuçlarının karşılaştırılması	93
4.27. Hasta numunelerinin morfin sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması	94
4.28. Hasta numunelerinin kodein sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması	94
4.29. Hasta numunelerinin 6-MAM sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması	94
4.30 Hasta numunelerinin metamfetamin sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması	94

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Afyon alkaloidi olan morfin gibi beyindeki opioid reseptörlere bağlanarak benzeri etki gösteren doğal, yarı sentetik ve sentetik bileşiklere genel olarak opioidler denilmektedir. Opioidlerin güçlü analjezik etkileri ve santral sinir sistemi depresif etkileri olup bağımlılık ve kötüye kullanım potansiyeli yüksektir.

Opioid kullanım bozukluğu (OKB) için ilaç tedavisinin yeri çok önemlidir. Bu amaçla metadon, buprenorfin ve naltrekson gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavi başarısı antagonist ilaçların hızla başlanmasına bağlıdır. OKB tanısında, tedaviye uyumun değerlendirilmesinde ve aşırı doz alımına bağlı akut entoksikasyonlarda idrar veya kan gibi hasta numunelerinde bu bileşiklerin laboratuvar analizlerine gereksinim duyulmaktadır. İdrar numunelerinde gerçekleştirilen analizlere ek olarak, tükürük numunelerinde madde analizleri de büyük önem taşımaktadır. Tükürük numunesinin yasaklı madde analizleri, terapötik ilaç izlemi veya klinik toksikoloji analizleri için kullanımı mümkündür. Yasaklı madde analizlerinde idrar yerine tükürük kullanımının avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar başlıca tükürük numunesinin kolay ve hızlı biçimde elde edilebilmesi, numune müdahalelerine imkân vermemesi, idrar numuneleri için gereken gözetim memuru bulundurulma zorunluluğu ve özel donanımlı tuvalet alt yapısına gereksinimlerinin olmaması olarak özetlenebilir.

Bu tez çalışmasında OKB tedavisinde kullanılan ilaçları, metabolitlerini ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddeleri bir panel olarak idrar ve tükürük numunelerinde kantitatif analizini gerçekleştiren LC-MS/MS yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmamız, OKB tedavisinde kullanılan ilaçları, metabolitlerini ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddeleri tükürük için geliştirilecek LC-MS/MS yönteminin idrar LC-MS/MS analizi ile uyumlu ve doğru olarak ölçüleceği hipotezine dayanmaktadır.

Bu tez çalışması şu amaçlarla planlanmıştır:

- 1) OKB hastalarının tedavisinde kullanılan ilaçları, metabolitlerini ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddeleri idrar numunelerinde saptayan bir LC-MS/MS tarama metodunu geliştirmek ve valide etmek.

- 2) OKB hastalarının tedavisinde kullanılan ilaçları, metabolitlerini ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddeleri tükürük numunelerinde saptayacak hızlı bir LC-MS/MS tarama metodu geliştirmek ve valide etmek.
- 3) OKB hastalarının tedavisinde kullanılan ilaçları, metabolitlerini ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddelerin idrar ve tükürük numunelerinde tespit miktarları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek.
- 4) OKB hastalarının tedavisinde kullanılan ilaçların, metabolitlerinin opiat ölçümü yapan immünolojik yöntemler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve sonuçların idrar ve tükürük için geliştirilen, validasyonları yapılan LC-MS/MS tarama yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında ele alınan bileşikler için idrar ve tükürük numunelerinde LC-MS/MS ile analiz metodları geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Validasyonu tamamlanan yöntemlerle OKB tedavisindeki hastalardan alınan idrar ve tükürük numuneleri analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Opioid reseptör agonist ve/veya antagonistleri veya metabolitleri, opiat ölçümü yapan immünolojik yöntemlerde kullanılan antikorlarla çapraz reaksiyon nedeni ile yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci kısmında opioid reseptör agonist ve/veya antagonistlerini tedavi amacı ile kullanan hastaların idrar numuneleri immünolojik yöntem ile çalışılmıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen ve validasyonları yapılan LC-MS/MS tarama yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağımlılık

2.1.1. Bağımlılığın Tanımı

Bağımlılık, kullanılan madde ile psikolojik, fiziksel ve sosyal sorunlar yaşamasına rağmen kişilerin kullanıma devam ettiği, tekrarlamalarla seyreden ruhsal bozukluktur. Heterojen özellikler gösterir, farklı nicel görünüşleri ve klinik açıdan farklı ağırlık dereceleri bulunmaktadır. Bu sebeple bağımlı olma ve olmama durumu arasında kesin bir çizgi yoktur [1]. Bağımlılık, davranışsal bağımlılıklar ve alkol veya madde bağımlılığı olarak iki ayrı başlıkta incelenmektedir [2]. Bağımlılıkla ilgili yapılan ilk çalışmalar bağımlılığa neden olan maddelerin akut ödüllendirici etkileri üzerinde çalışırken günümüzde bu maddelerin sürekli kullanımında beyinde oluşturdukları değişikliklere ilgili çalışmalar yoğunlaşmaktadır [3].

Bağımlılık, aşırı kullanım-intoksikasyon, çekilme-olumsuz duygulanım ve zihinsel uğraşı-beklenti olarak üç evreden oluşmaktadır. Sürekli tekrarlayan, zaman içinde kötüleşen, beyin ödül ve stres sistemleri ile yürütücü işlevlerde nöroplastik bozulmalarla seyreden değişimler görülmektedir [1].

2.1.2. Madde Kullanım Bozukluğu

Bilişsel, duygulanım ve davranışsal süreçlerde farklılıklar oluşturan, bağımlılığa yol açabilen kimyasallar genel bir ifade ile “Madde” olarak tanımlanmaktadır [4]. Ruhsal Bozuklukların Teşhis ve İstatistik El Kitabının (DSM) dördüncü baskısında (DSM-IV) madde kullanımıyla ilgili bozukluklar; “*Madde Kullanım Bozuklukları*” ve “*Madde Kullanımına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Bozukluklar*” şeklinde iki başlıkta sınıflanmaktadır. Madde kullanım bozuklukları da “*Madde Kötüye Kullanımı*” ve “*Madde Bağımlılığı*” şeklinde sınıflandırılmaktadır[5]. DSM-IV’te madde kötüye kullanımı ve madde bağımlılığı iki ayrı tanı kriteri olmaktan çıkarılıp “*Madde Kullanım Bozukluğu*” olarak tek tanı altında toplanmıştır [6]. DMS-5’e göre “*Madde Kullanım Bozukluğu*” tanı kriterleri Tablo 2.1.’de verilmiştir. Bir yıllık süre içinde belirtilen kriterlerinden en az ikisini karşılayanlar için, madde kullanım bozukluğu tanısı konmaktadır [6, 7].

Tablo 2.1. Madde kullanım bozukluğu tanı kriterleri [6]

Kriter*	
1	Çoğu kez, istenen miktardan daha fazla veya daha uzun süreli kullanım
2	Madde kullanımını sonlandırmak veya kontrol altına almak için istek veya tekrar eden sonuç vermeyen girişimlerin olması
3	Madde temin, kullanımı veya etkilerinden kurtulmak için daha fazla zaman ayırmak
4	Madde kullanımına karşı aşırı istek, kendini zorlanmış hissetmek
5	Sosyal hayattaki yükümlülüklerini yerini getirememeye sebep olan tekrar tekrar madde kullanımı
6	Madde etkilerinin arttırdığı veya doğrudan sebep olduğu tekrarlayan kişiler arası veya toplumsal sorunla olmasına rağmen madde kullanımına devam etmek
7	Bazı önemli eğlenme-dinlenme, toplumsal veya mesleki etkinliklerinin madde kullanımı sebebiyle azaltılması veya bırakılması
8	Tekrarlayan şekilde, tehlikeli olabilecek durumlarda madde kullanımı
9	Maddenin tetiklediği veya sebep olduğu, yineleyici veya kronik psikolojik yahut fiziksel bir sorun olduğunu bildiği halde madde kullanımına devam etme
10	Tolerans <ol style="list-style-type: none"> İstenilen etkiyi sağlamak için geçmişe oranla hissedilir oranda artan miktarda madde kullanma ihtiyacı Madde kullanımına aynı miktarda devam edilmesine rağmen daha az etki elde edilmesi
11	Yoksunluk <ol style="list-style-type: none"> Sözü edilen maddenin kendine özgü yoksunluk sendromu Yoksunluk belirtilerinden kurtulmak veya kaçmak için madde alımı

*2-3 ölçüt = hafif, 4-5 ölçüt = orta, 6 ya da daha fazla ölçüt = ağır derecede

Alınan madde, zamanla beyni etkileyerek bağımlılığın oluşmasına sebep olmaktadır. Bu maddeler ilk alındıklarında beynin ödül merkezini uyararak kişinin kendisini daha iyi hissetmesini sağlamaktadır. İlerleyen süreçte bu maddeleri almak için aşırı bir istek duyulmakta, madde kullanımı kişi için zorunluluk haline gelmektedir. Artan doz ve sıklıkta madde alınması ile ilerleyen süreçte ise madde alınmadığı zamanlarda yoksunluk yaşanmaktadır. Kişi, yoksunluğun kendisinde oluşturduğu olumsuz etkileri gidermek için madde kullanmaya devam etmektedir [8].

Bugüne kadar yapılan araştırmaların sonucunda en yaygın bağımlılık yapan maddeler sınıflandırılmıştır. DSM-5 ve Uluslararası Hastalıklar ve İlgili Sağlık Sorunları Sınıflandırmasının 10. revizyonunda (ICD-10) en yaygın bağımlılık yapan maddeler alkol, kafein, kenevir, halisünojenler, inhalanlar, opioidler, yatıştırıcılar, hipnotikler ve anksiyolitikler, uyarıcılar (amfetamin türevleri, kokain vb.), tütün ve diğer maddelerdir [7].

2.2. Yasaklı Maddeler

Psikoaktif maddelerin yasal veya yasaklı olup olmadığının tanımlanması 200 yıl öncesine dayanmaktadır. İki yüz yıl öncesinden bugüne kadar tıp bilimindeki gelişmeler, toplumsal ahlaki değişimler psikoaktif maddelerin kullanım amaçlarında ve taleplerinde değişikliklere neden olmuştur. Bu etkiler sonucu psikoaktif maddelerin yasal ve yasaklı olarak sınıflandırılması gereğini doğurmuştur [9]. Yasaklı maddeler elli yılı aşkın süredir uluslararası anlaşmalarla yasaklanmış tıbbi amaçla kullanılmayan maddelerdir. İnsanlarda uyuşturucu, uyarıcı veya hipnotik etkileri bulunan ciddi sağlık ve sosyal sorunlara yol açmaktadır[10]. DMS-5'te psikoaktif maddeler "Madde ile ilgili bozukluklar ve bağımlılık bozuklukları" başlıkları altında on altı grupta toplanmıştır. Bu başlıklar alkol, kokain, kenevir, halüsinojenler, inhalanlar, opioidler, hipnotikler, uyarıcılar, tütün ve diğer maddelerdir [11].

Ülkemizde Ulusal Uyuşturucu ile Mücadele Eylem Planı (2013-2015) doğrultusunda ve 09.10.2013 tarih ve 28790 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliği Tıbbi Laboratuvarların Çalışma Esasları'na uygun düzenlemeler yapılmıştır. Bu kapsamda, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Tıbbi Laboratuvar Hizmetleri Daire Başkanlığı tarafından 17.07.2014 tarih ve 2014/22 sayılı "Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Genelge" yayımlanmıştır. Tıbbi Laboratuvarların Çalışma Usul ve Esasları'nda Türkiye için madde taraması amaçlı standart test paneli olarak belirlenen Beşli Tarama içinde amfetaminler, benzodiazepinler, esrar, kokain ve opioidler bulunmaktadır. Standart test paneli ihtiyaçlara göre genişletilebilmektedir.

2.2.1. Opioid Maddeler

Opiatlar terimi, haşhaş bitkisi olan *Papaver somniferum*'dan elde edilen doğal alkaloidler (morfin, kodein, tebain, papaverin) için kullanılmakta olup, bu bileşikler SSS'de spesifik reseptörlerine bağlanarak analjezik ve narkotik etkilere sahiptir. Opioidler terimi ise, geniş anlamda merkezi sinir sisteminde spesifik reseptörlere bağlanarak analjezik ve narkotik etkiler gösteren yapısal olarak opiatlara benzerlik gösteren veya göstermeyen çeşitli bileşikler için kullanılmaktadır [12].

Opioidler endojen ve eksojen olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Endojen opioidler enkefalinler, endorfinler, endomorfinler, dinorfinler bunlara örnek olarak verilebilir. Eksojen opioidler vücuda dışardan verilen ve endojen opioidlerle aynı reseptörlere bağlanan bileşikleridir. Eksojen opioidler elde edilmelerine göre doğal, yarı sentetik ve sentetik olarak sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 2.1., Tablo 2.2.) [13, 14]. İnsanlık tarihinin bilinen en eski şifalı bitkilerinden biri olan *Papaver somniferum*'dan günümüzde narkotik analjezikler olan morfin ve kodeinin dışında tetrahidrobenzilzokinolin türevi yaklaşık seksen alkaloid üretilmektedir [15].

Tablo 2.2. Opioid maddelerin sentezlerine göre sınıflandırılmaları

Doğal	Yarı sentetik	Sentetik
Morfin	Eroin (Diamorfin)	Fentanil
Kodein	Dihidrokodein	Metadon
Tebain	Oksimorfon	Propoksifen
Papaverin	Hidromorfon	Meperidin
	Oksikodon	Tramadol
	Hidrokodein	Pentazosin
	Buprenorfin	Levorfanol

Morfin ilk olarak 1800 yıllarının başlarında eczacı Friedrich Sertürner tarafından *Papaver somniferum*'dan izole edilmiştir [16]. Fenantren çekirdeğindeki 3 numaralı karbona bağlı alkolik hidroksil ve etamin köprüsüne bağlı metil kökleri içeren bir formüle sahiptir (Şekil 2.1. A). Morfindeki hidroksillerin yerine farklı yan zincirler getirilmesi ile yeni maddeler meydana gelir [17].

Etilmorfin karaciğerde etilmorfin-N-demetilaz enzimi tarafından morfine metabolize olan güçlü bir narkotik analjezik ve antitussif ilaçtır [18].

Kodein molekülü de *Papaver somniferum*' dan elde edilmektedir. Kodein (3-Metilmorfin) morfinin fenolik hidroksil grubunun metillenmesi ile de sentezlenebilmektedir (Şekil 2.1. A) [19]. Kodein, karaciğerde endoplazmik retikulum enzimleri tarafından metabolize edilir [20]. Dihidrokodein kodeinin yarı sentetik bir türevidir [21].

Eroin ilk olarak morfine morfine alternatif bir anestezi olarak 1898'de üretilmiştir [22]. Bir süre kullanıldıktan sonra morfinden daha yüksek bir seviyede bağımlılık seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Eroin (Diasetil Morfin) morfin molekülünün asetillenmiş halidir (Şekil 2.1. B). Karaciğerde çok hızlı olarak 6-

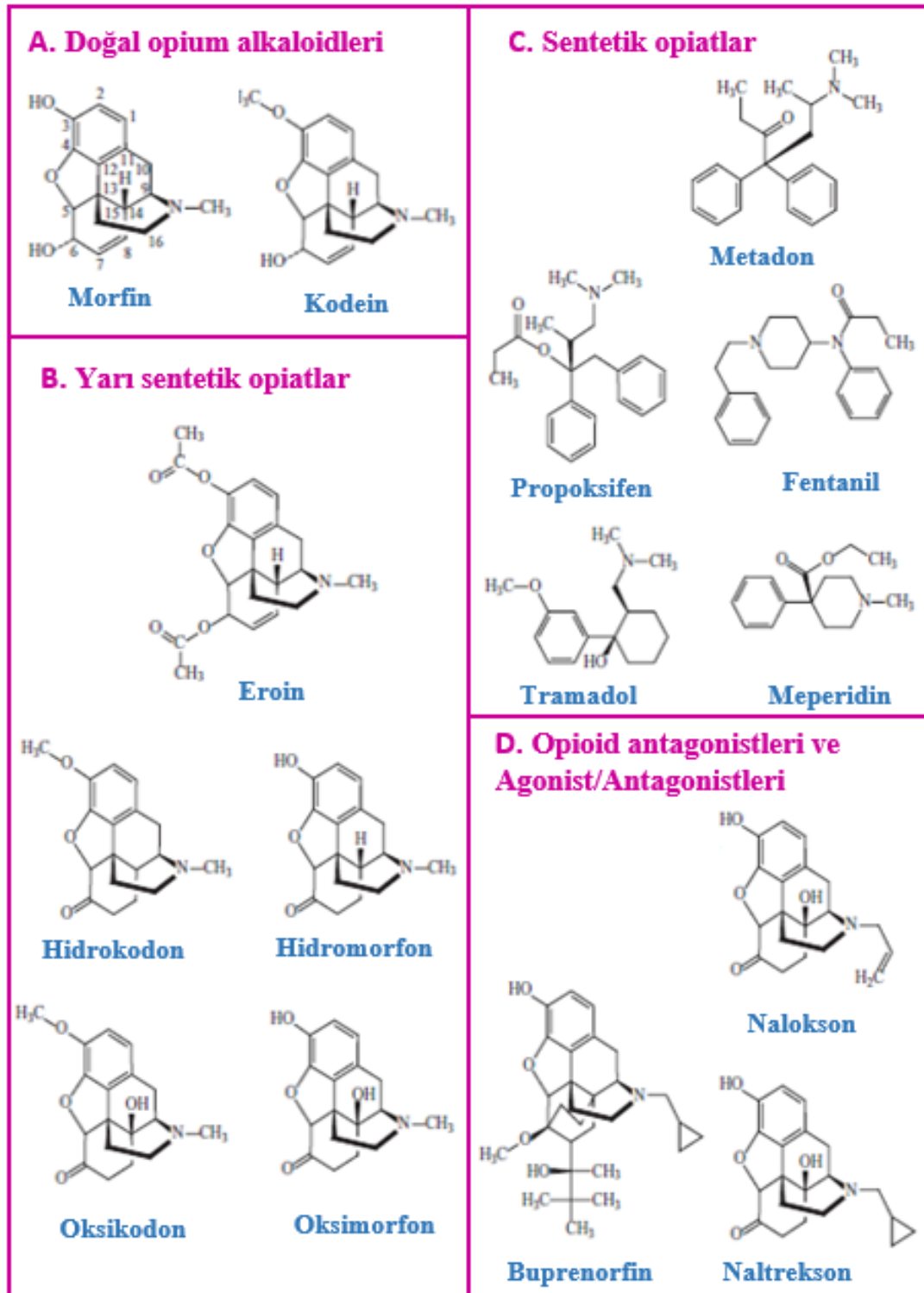
monoasetilmorfine (6-MAM) metabolize olur. 6-MAM da hidrolize uğrayarak morfine dönüşür [23].

Tramadol merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olan opioid özellikler gösteren sentetik ve analjezik bir ilaçtır. Her biri farklı etkiye sahip enantiomerlerinin bir karışımı halinde bulunan tramadol, kodeinin sentetik bir 4-fenilpiperidin analogudur [24]. İlk kez 1962’de sentezlenmiş, kullanım için 1995’de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi’nin (FDA) onayı alınmıştır [25]. Yaygın olarak ameliyat sonrası, kanser ağrılarında, nöropatik ağrı tedavilerde kullanılır (Şekil 2.1. C) [26].

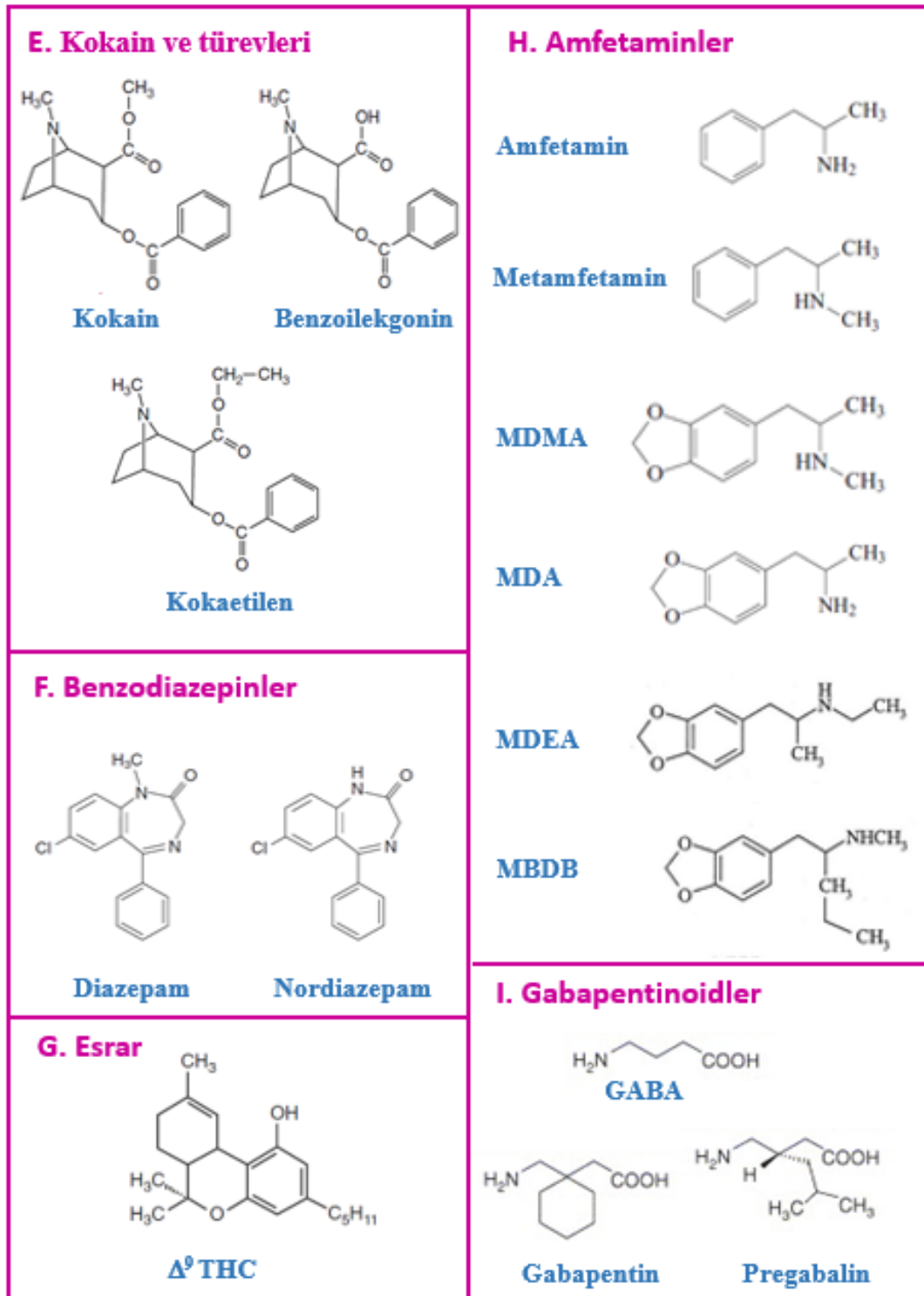
Opioidlerin güçlü analjezik etkileri vardır. Hepsinin az veya çok bağımlılık yapma potansiyeli vardır. Analjezik etkileri SSS yoluyla oluşmaktadır [27]. Tıbbi olarak ağrının nedenine bakılmaksızın kanser ağrılarında ve cerrahi sonrasında kullanılmaktadır.

Endojen opioid mekanizması β -endorfin, enkefalin, dinorfinler olmak üzere üç peptit ve μ (MOR), δ (DOR), κ (KOR) olmak üzere üç reseptörden oluşmaktadır (Tablo 2.3.) [28]. Bu reseptörlerin hepsi G proteinlerine bağlı reseptörlerdir.

Opioid reseptörler ve onların endojen ligandları ağrı düzenlenmesi başta olmak üzere periferik dokularda ve SSS’de geniş bir dağılım göstermektedir. Endojen opioid mekanizması supraspinal, spinal, periferik analjezi ve madde bağımlılığıyla ilişkili ödül, duyu düzenlenmesi ve de stres yanıt mekanizmalarında önemli role sahiptir [29]. Bu reseptörler çok farklı fonksiyonlar üretseler de aktivasyon sonrası benzer hücresel tepkiler gösterirler.



Şekil 2.1. Yasaklı maddeler ve ilişkili bileşiklerin yapıları. A. Doğal opium alkaloidleri: Morfin ve kodein; B. Yarı sentetik opiatlar: Eroin, hidrokodon, hidromorfon, oksikodon ve oksimorfon; C. Yarısentetik opiatlar: Metadon, propoksifen, fentanil, tramadol, ve meperidin; D. Opioid antagonistleri ve agonist/antagonistleri: Nalokson, buprenorfin ve naltrekson.



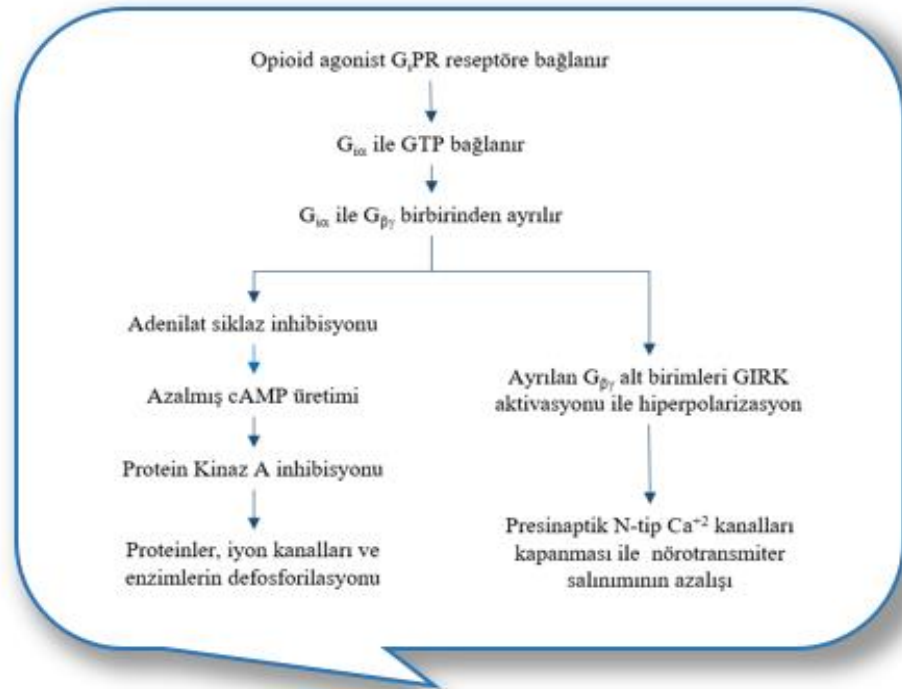
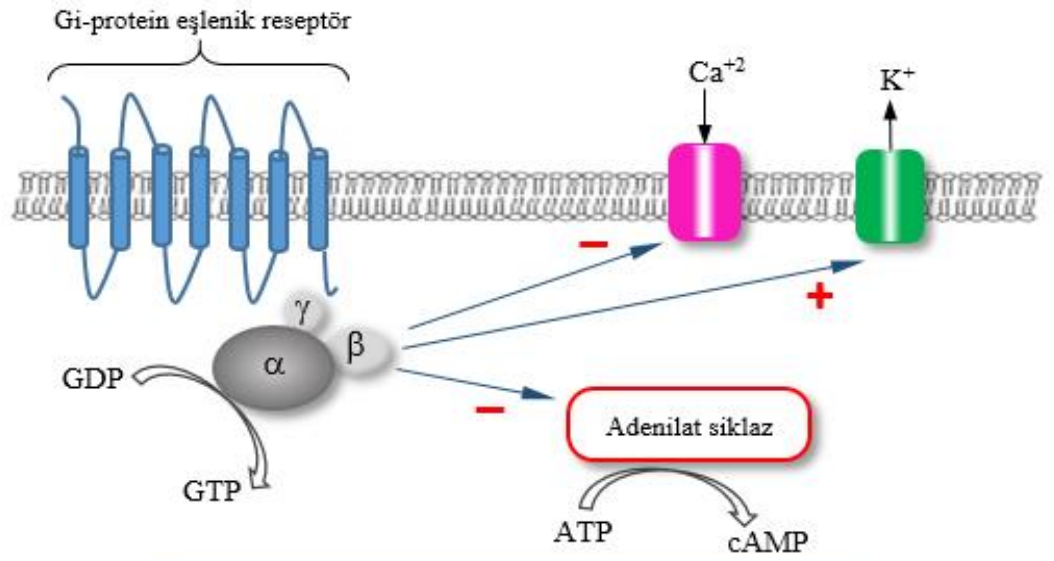
Şekil 2.1. (Devamı) Yasaklı maddeler ve ilişkili bileşiklerin yapıları. E. Kokain ve türevleri: Kokain, benzoilekgonin ve kokaetilen; F. Benzodiazepinler: diazepam ve nordiazepam; G. Esrar: Δ^9 THC; H. Amfetaminler: Amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA, MDEA ve MBDB; I Gabapentinoidler: GABA, gabapentin, ve pregabalin [12, 30].

Tablo 2.3. Opioid reseptörleri ve afiniteleri [31, 32]

OPIOİDLER	μ (MOR)	δ (DOR)	κ (KOR)
Endojen Opioidler			
β -endorfin	+++	+	+
Enkefalinler	++	+++	-
Dinorfinler	++	+	+++
Eksojen Opioidler			
Agonist			
Morfin	+++	+	+
Petidin	++	+	+
Metadon	+++	-	-
Fentanil	+++	+	-
Kısmi/Seçici Agonist			
Buprenorfin	(+++)	-	xx
Nalorfin	xx	-	(++)
Antagonist			
Nalokson	xxx	x	xx
Naltrekson	xxx	x	xxx

+= agonist aktivite (= seçici agonist aktivite; x= antagonist aktivite; -=zayıf veya olmayan aktivite

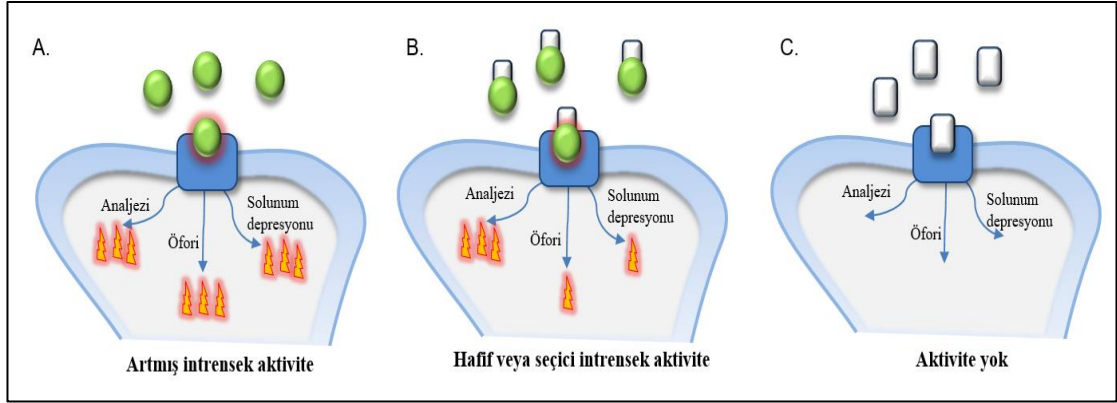
Opioid reseptörleri, yedi transmembran geçişli hücre içinde G proteinleri ile ilişkili “*G-protein eşlenik*” reseptörlerdir (Şekil 2.2.) [28]. G-protein eşlenik reseptörler efektör proteinlere doğrudan iletim yerine G-protein aracılığı ile sinyal iletmektedirler. Opioid ligand bağlayan reseptörler inhibitör G-proteinler olan G-proteinlerle eşleniktir. Bir opioid agonistin (endojen veya eksojen), reseptörün transmembran kısmındaki ekstraselüler N-terminal domaine bağlanması reseptörün intraselüler C-terminalinde bulunan $G_{i\alpha}$ proteinde GDP ile GTP yer değiştirmesine sebep olur. Klasik bir opioid agonistin G_i -protein reseptörüne bağlanması, adenilil siklazın inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu da hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerinde bir azalmaya sebep olur. Aynı zamanda, bu bağlanma sonucunda G-protein den ayrılan $G_{\beta\gamma}$ alt birimlerinin içeri doğrultucu potasyum kanalları olan GIRK kanallarının aktivasyonu sonucunda nöronların hiperpolarizasyonuna yol açar. Ayrıca, N-tip voltaj kapılı kalsiyum kanalları, opioid agonistlerle uyarılan G_i -protein ilişkili reseptör beta gama alt biriminin önemli bir hedefidir. Bu etkileşimler potasyum iletkenliğinin aktivasyonunu ve kalsiyum iletkenliğinin inhibisyonunu sağlar. Tüm bu değişikliklerin net etkisi, hücre içi cAMP'nin azalması, hücrenin hiperpolarizasyonu ve nöronal hücreler için azaltılmış nörotransmitter salınımıdır [33].



- Nöron hiperpolarizasyonu
- Azalmış nörotransmitter salınımı
- Azalmış hücre içi cAMP

Şekil 2.2. Opioid reseptör yapı ve mekanizması. Yedi transmembran geçişli G-proteinine bağlı opioid reseptörünün aktivasyonu, hücre içi sinyal yolları aracılığı ile nöronların hiperpolarizasyonuna, nörotransmitter salınımında azalmaya ve hücre içi cAMP düşüşüne neden olur (Kaynak [28]'den yararlanılmıştır)

Bir opioidin etkisi reseptörlerinin herbiri üzerindeki aktivitelerine bağlıdır. Opioidler, reseptörler üzerinde agonist, kısmi/seçici agonist veya antagonist olarak etki gösterirler (Şekil 2.3. ve Tablo 2.3.). Agonist, bağlandığı reseptörü aktive eder. Antagonist, reseptörü aktive etmeden bağlanır. Seçici agonist, tek başına agonistik etkili iken, bir agonist ile kullanıldığında antagonistik etki gösterir [34].



Şekil 2.3. Opioid agonist, seçici agonist ve antagonistlerinin reseptör yanıtları. A: Opioid agonist; B: Opioid seçici agonist; C: Opioid antagonist (Kaynak [35] den yararlanılmıştır)

2.2.2. Kokain

Kokain, ilk kez 1859 yılında Albert Niemann adlı Alman kimyager tarafından koka bitkisinin (*Erythroxylon coca*) yapraklarından sentezlenmiştir [36]. Metabolize edilmesi sonucunda metil grubunu kaybederek ana metaboliti olan Benzoilekgonin (BEG) oluşur. BEG kokainin kimyasal hidrolizi ile oluşurken, kokain ve alkolün beraber kullanımı sonucu kokaetilen metaboliti oluşur (Şekil 2.1. E). Lipofilik yapıda olan kokaetilen kokaine göre metabolizma için daha toksiktir [37]. Herhangi bir mukozadan emilim yoluyla vücuda alınabilen kokain SSS'de toksik etki gösteren bir alkaloiddir [38].

Kokain periferik sinir sisteminde voltaj kapılı sodyum kanallarını inhibe eder. Böylece aksiyon potansiyellerinin başlatılması ve iletilmesini engeller. Kokain merkezi sinir sisteminde ilgili taşıyıcıları ile dopamin, noradrenalin, serotonin alımını engeller ve bu etkisi ile bağımlılık yaptığı düşünülmektedir. Bugüne kadar spesifik bir antagonist tespit edilememiştir. Bağımlılık tedavi geliştirme çalışmaları devam etmektedir [39].

2.2.3. Amfetaminler

Feniletilamin kimyasal yapısından türeyen uyarıcı ve halusinojenler genel olarak amfetaminler olarak adlandırılır (Şekil 2.1.-H) Amfetamin tipi maddelerin hem merkezi hem de periferik sinir sistemi üzerinde uyarıcı etkisi vardır [40].Merkezi sinir sisteminde dopamin, serotonin ve noradrenalin gibi hücre dışı monoamin nörotransmitterlerin sinaptik etkinliğini arttıran maddelerdir [41]. Amfetamin grubu maddeler tıbbi olarak narkolepsi, obezite, dikkat eksikliği ve hiperaktivite tedavisinde kullanılması yanı sıra 1990'lerden sonra popüler hale gelmiş sentetik bir bağımlılık yapıcıdır. Amfetamin türevleri, tablet formlarında “ekstazi” adı ile piyasaya sunulmaktadır. En çok kullanılan türevler metamfetamin, 3,4-Metilendioksiamfetamin (MDA), 3,4-metilenedioksi-N-metilamfetamin (MDMA), 3,4-Metilendioksi-N-etilamfetamin (MDEA), 1,3-Benzodioksolil-N-metilbütanamin (MBDB) dir.

2.2.4. Benzodiazepinler

Benzodiazepinler 1959 yılında klordiazepoksid ile benzer farmakolojik yapıya sahip ilaçların geliştirilmesi ile elde edilmişlerdir. Epilepsi, uykusuzluk, anksiyete bozuklukları ve alkol kesilmesi gibi tedavilerde kullanılmaktadırlar. Benzodiazepin terimi yedili dizepin halkasına kaynaşmış bir benzen halkası ve diazepin halkasının 5 konumuna bağlı bir fenil halkasından oluşan yapının genel ismidir (Şekil 2.1.-F) [42]. Uzun süreli benzodiazepin grubu ilaç kullanmak bağımlılık riski oluşturmaktadır [43].

2.2.5. Esrar

Kannobinoidler *Cannabis sativa* bitkisinden köken almaktadır. Kannobinoidlerin kullanımını çok eski tarihlere dayansada farmakolojik etki mekanizmalarının anlaşılması son zamanlardaki çalışmalar ışığında ortaya çıkmıştır [44]. Bitkinin 100'den fazla bileşeni tespit edilmiştir. Ana psikoaktif bileşeni Δ^9 -trans tetrahidrokanabinol (THC)'dir (Şekil 2.1.-G) [45]. Bağlandıkları reseptörler CB₁ ve CB₂ olarak adlandırılmıştır THC bu reseptörlere bağlanarak psikoaktif etkiler göstermektedir [46]. Genel kullanım yolu sigara kağıdına sarılıp dumanın solunması şeklinde olmaktadır. Duman inhalasyonu ile hızlı bir şekilde akciğerlerden emilir.

Δ^9 -trans tetrahidrokanabinol ve metabolitleri plazma proteinlerine bağlanır ve hızlıca dokulara dağılır. Sonra karaciğerde metabolize edilir [47].

2.2.6. İlişkili Diğer Bileşikler

OKB hastalarında suistimali en çok görülen madde grubundan biri de gabapentinoidlerdir (Şekil 2.1.-I). Gabapentinoidler, glutamat ve noradrenalin nörotransmitterlerin salınımını azaltarak etkilerini gösteren antiepileptik bir ilaç grubudur. Gabapentinoidler, gama-aminobütirik asit (GABA) analogu olan bir antiepileptik ilaç grubu olup GABA'ya dönüşmezler, GABA alımı ve yıkımını değiştirmezler ve reseptörlerine bağlanmazlar [48]. Mekanizması tam aydınlatılmamış olmakla beraber, nöron son-uçlarında depolarizasyona bağlı kalsiyum akışını azalttığı gösterilmiştir [49]. Gabapentinoidlerin kötüye kullanımının mekanizması henüz açıklanamamış olmakla birlikte öforik ve disosiyatif etkilerinin kötüye kullanımını arttırdığı düşünülmektedir. Kötüye kullanımının artması sebebiyle 2020 yılında FDA'nin "*Kontrollü Kullanılması Gereken Maddeler V*" listesine girmiştir [50].

Bir gabapentinoid olan gabapentin, ilk olarak Japonya'da kas gevşetici ve antispazmodik olarak geliştirilmiş ancak daha sonra antiepileptik olarak kullanılmaya başlanmıştır [51]. Gabapentin lipofilik sikloheksan halkasına kovalent bağlı GABA molekülünden oluşmaktadır [23].

Bir diğer gabapentinoid olan pregabalin, kan beyin bariyerini geçebilmesi için GABA yapısına alifatik yan zincir eklenmesiyle oluşturulan lipofilik bir ilaçtır [52]. Pregabalin, epilepsi, anksiyete ve nöropatik ağrı durumlarında kullanılmaktadır, bilinen bir ilaç etkileşimi yoktur [53]. Pregabalinin ayrıca benzodiazepin ve opioid detoksifikasyonunun yoksunluk fazının belirtilerinin azaltılmasında da kullanımı mevcuttur [54]. Plazma proteinlerine bağlanmaz, çok az oranda metabolize edilerek böbreklerden atılır. Bu yüzden, kullanım sonrası böbrek fonksiyonu normal kişilerde idrarda 5-6 gün süresince tespit edilebilmektedir [55].

2.3. Opioid Kullanım Bozukluğu ve Tedavi Yaklaşımları

2.3.1. Opioid Kullanım Bozukluğu

Opioid kullanım bozukluğu (OKB) biyopsikososyal bir bozukluktur. Maddenin kullanılmaya başlanması, kullanımın sürdürülmesi ve bırakıldıktan sonra tekrar başlanması gibi etkilerle süren bir bozukluktur. Farmakolojik, sosyal, genetik, çevresel, ailesel ve kişilikle ilgili faktörler OKB’nda opioid kullanımının sürekli hale gelmesinde en önemli faktörlerdir [56].

Dünya Uyuşturucu Raporu’na (2019) göre tıbbi veya tıbbi olmayan sebeplerle opioid kullanan kişiler değerlendirildiğinde, 2017 yılında tüm dünyada 53,4 milyon opioid kullanıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Bölgesel açıdan karşılaştırıldığında %4 oranla en yüksek kullanım Kuzey Amerika’dadır. Ayrıca madde kullanımına bağlı ölümlerin % 66’sı opioid kullanımı sebeplidir [56].

Opioid kullanım yaygınlığı cinsiyet ve yaş ile değişmektedir. Hem tıbbi amaçlı hem de tıbbi amaçlı olmayan opioid kullanımında en büyük oran 18-25 yaş arasındadır. Giderek kullanıma başlama yaşında düşüş görülmektedir [57]. Erkeklerde opioid kullanımı ve aşırı doz daha fazla orandadır. Kadınlarda ise reçeteli opioid kullanım sıklığı daha fazladır [58]. Ülkemizde 2019 Türkiye Uyuşturucu Raporu’na göre, uyuşturucu kaynaklı olay sayısı bir önceki yıla göre %22,23 oranında artmıştır. Yine bu rapora göre, tedavi gören hastalar aldıkları maddelere göre incelendiğinde eroin kullanımının %62,1 ile en fazla olduğu görülmüştür [59].

Opioid kullanım bozukluğu, kompleks mekanizmalar sonucunda nöronal sistemde bağımlılığa, aşırı madde isteğine ve sürekli madde kullanımına sebep olan bir beyin hastalığıdır. Opioidlerin asıl etkisi μ (MOR) reseptörleri ile beyin “ödül” mekanizmaları üzerindedir [60].

OKB’na sebep olan opioidlerin neredeyse tamamı μ (MOR) reseptör agonistidir (Tablo 2.3.). Bu agonistler santral sisteminde bulunan reseptörlere bağlanarak analjezi, solunum depresyonu, öfori, miyozis gibi etkiler oluşturur. Morfinin tekrarlı kullanımları sonucunda bu etkilere karşı tolerans gelişse de bir süre sonra fizyolojik bağımlılık oluşur [61].

2.3.2. Opioid Kullanım Bozukluğu Tedavileri

Dünyada ve ülkemizde OKB tedavisinde temel iki farmakolojik yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki “yerine koyma” olarak tanımlanan agonist ilaçlarla yapılan tedavidir. İkincisi ise son yıllarda kullanımı artan ana bileşen olarak naltreksonun kullanıldığı antagonist tedavidir. Tedavide psikososyal müdahalelerin etkileri yadsınmayacak düzeyde olsa da bir farmakolojik tedavi eklenmeden yürütüldüklerinde bu müdahalelerin tek başına etkili olmadıkları saptanmıştır [62, 63].

2.3.2.a. Agonistik Tedaviler

Yerine koyma tedavisi olarak da ifade edilen agonist tedavi yaklaşımında buprenorfin ve metadon gibi opioid agonist ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar madde çekilme ve yoksunluk semptomlarını baskılamak, diğer opioidlerin etkilerini bloke ederek kullanımlarını azaltmak amaçları ile kullanılmaktadır. Yerine koyma tedavilerinin başarısı ile ilgili kanıt düzeyi yüksektir ve hali hazırda bu tedaviler altın standart olarak kabul edilmektedir [64]. Metadon 1947 yılında FDA tarafından öncelikle analjezik ve antitussif kullanımı için ve 1970 yılında opioid bağımlılık tedavisi için onaylanmıştır [65]. Pür μ (MOR) reseptör agonisti olan metadonun ülkemizde kullanım izni bulunmamaktadır. Ülkemizde opioid kullanım bozukluğu tedavisinde kullanılan buprenorfin/nalokson kombinasyon preperatı 2009 yılında ruhsatlandırılıp kullanılmaya başlanmıştır. Uygun doz ayarlandığında opioid yoksunluğunun 24 saat boyunca ortaya çıkmasını önlemektedir.

Yerine koyma tedavilerinde kullanılan ilaçların da kötüye kullanım potansiyeline sahip olması ve mevzuata ilişkin zorluklar tedavinin geniş kitlelere ulaşmasına engel teşkil etmektedir. Bu tedavilerdeki temel sorun agonistik ilaçların opioidler ile aynı biyolojik etkiyi göstermesinden kaynaklı, bağımlılık ile ilgili nörobiyolojik süreçlerin sürmesi ve yıllar boyunca bağımlılığın devam etmesidir. Bu tedavilerde, sadece %30-50 uyum sağlanmakta ve bu hastaların sadece %10'unda tedavi tamamlanabilmektedir [66]. Kesilme belirtileri, madde isteği ve arama davranışı gibi semptomlara neden olan tüm biyolojik süreçler yerine koyma tedavilerinde devamlılığını sürdürmekte [67] tedavi aksaması nedeniyle relaps görülebilmektedir [60].

Buprenorfin, tebainden üretilen kısmi μ (MOR) reseptör agonistidir [68]. Norbuprenorfin, buprenorfinin karaciğerde glukronidasyonu sonucu oluşan başlıca metabolitidir. Nalokson tam bir opioid antagonistidir olup, günümüzde acil servislerde opioid zehirlenmelerinde kullanılmaktadır.

Metadon bir μ (MOR) reseptör agonistidir ve opioid kullanım bozukluğunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, Türkiye’de kullanım izni bulunmamaktadır. Metadon tipik olarak oral yolla alınan bir tedavi seçeneğidir. Metadon, opioid bağımlı hastalarda μ (MOR) reseptörüne eroir veya fentanilden daha uzun süreli bağlanarak madde alma isteğini ve kesilme belirtilerini azaltmaktadır [69]. Metadonun, opioid bağımlılarını aşırı doz ölümlerinden kurtaran önemli bir tedavi seçeneği olduğu bildirilmektedir [70]. 2-Etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin (EDDP) metadonun demetilasyonu sonucu oluşan ana metabolitidir. Metadonun büyük bir kısmı değişmeden atılsa da, EDDP metabolitinin ölçümü bağımlılık tedavisinin uyumluluğunu takip için metadon maddesi ile birlikte analitik olarak değerlendirilmesi tam kanıt sağlaması açısından önem taşır [71].

2.3.2.b Antagonistik Tedaviler

Antagonistik OKB tedavisi opioid maddelerin bağlandığı μ (MOR) reseptörlerine tam antagonistik afinite ile bağlanarak opioidlerin etkilerini engelleyen naltrekson ile yapılmaktadır. Naltrekson 1965 yılında bulunan, 1984 yılında ABD’de ilk olarak alkol bağımlılığı için kullanımına izin verilen bir ilaçtır. Alkol ve opioid kullanım bozukluğu tedavisinde kullanılan naltreksonun oral, kas içi ve cilt altı implant uygulamaları bulunmaktadır [72]. Serum naltrekson düzeylerinin 2 ng/mL civarında olması ile opioid alım etkilerini engellediği ve hastanın madde kullanımının bir etkisinin kalmadığı belirlenmiştir. [73]. Naltreksonun agonistik ilaçlara göre en büyük avantajı tedavi sonlandırıldığında kesilme belirtilerinin görülmemesi ve kendisine ait bir bağımlılık potansiyelinin olmamasıdır [74]. Günlük düzenli kullanım gerekliliği ve OKB hastalarında uyum sorunu yaşanması naltreksonun kısa etkili oral tablet formunun dezavantajıdır. Tedavi başarısının, düzenli kullanımla doğru orantılı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir [67]. Bu zorlukları aşmak için uzun etkili formülasyonları, kas içi ve cilt altı implant uygulamaları geliştirilmiştir.

2.4. Opioid Kullanım Bozukluğunda Yasaklı Madde Analizi

OKB teşhisinin konmasında, tedavi başlangıcında ve izleminde madde analizi yapılmaktadır. Bu analizler tanıda, tedavinin başlangıcında ve idamesinde büyük önem taşımaktadır. Yeni hasta saptanmasında tarama analizleri önemli olmakla beraber tedavide hastanın uyumunun takibi açısından madde analizlerinin yapılması gereklidir [75].

Madde analizinde öncelikle numunede belirli bir bileşiğin veya bileşik grubunun olup olmadığını sistematik olarak ölçen bir tarama yöntemi kullanılır. Günümüzde tarama analizleri için yaygın olarak immünojenik yöntem kullanılmaktadır. İmmün yöntemde yanlış pozitif sonuçları önlemek amacı ile doğrulama analizlerine başvurulmaktadır [76]. Doğrulama yöntemi olarak GS-MS veya LC-MS/MS kullanılmaktadır. Günümüzde yasaklı madde analizi için idrarda geniş panellerde LC-MS/MS gibi yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometrik analizler önerilmektedir [77].

Hastanın tedavi başlangıcında madde kullanımının olmadığını saptanması, OKB tedavisi için verilen ilaçlara uyumunun izlenmesi, tedavi sürecinde opioid ve diğer yasaklı maddelerin kullanım durumunun değerlendirilmesi açısından rastgele ve aralıklı olarak idrar numunelerinde madde analizi yapılması gerekmektedir [75]. İmmün yöntemler ve hasta başı analiz yöntemleri panel olarak tarama yapılabilmesi, hızlı sonuç alınabilmesi, kolay erişilebilir olmaları gibi avantajlara sahip olmakla birlikte opioidleri birbirinden ayıramamakta, farklı bileşiklerle pozitif veya negatif interferans gösterebilmektedirler [78]. Öte yandan, LC-MS/MS yöntemi ile madde analizleri maliyetli, deneyimli bir laboratuvar alt yapısına gereksinim duymakla beraber tüm opioidleri ve tedavi amaçlı kullanılan maddeleri ayırt edebilmekte ve daha duyarlı olarak saptayabilmektedir.

2.4.1. Hasta Başı Testler

Yasaklı madde analizinde kullanılan hasta başı test cihazları immünojenik prensibe göre çalışmaktadır. Kart test olarak da adlandırılmaktadır. Hasta başında ölçümün klinik kararı etkilemesi bekleniyor ise tercih edilmektedir.

İmmünokromatografik kart testlerin üstü plastik bir parça ile kapalıdır. Açıkta sadece bir damlatma alanı ve gözlem alanı bulunmaktadır. Damlatma alanının altında sıvı tutma kapasitesi yüksek bir ped bulunmaktadır. Buraya damlatılan numune konjugasyon pedine doğru kapiller akım kuvveti ile ilerler. Konjugasyon pedi antikor ile kaplıdır ve numune içindeki madde antikor ile reaksiyona girerek bu konjugatların salınmasına neden olur. Bu salınan konjugatlar pede temas eden nitroselüloz membrana doğru ilerler. Nitroselüloz membranın ilk kısmı kapalıdır. İlerleyen kısmında test çizgisi ve kontrol çizgisi vardır. Kapiller akım kuvveti ile test çizgisi ve kontrol çizgisinde gerekli reaksiyonlar gerçekleşir ve sonunda test çizgilerinde renk değişimi ile sonuç oluşur. Tüm bu olaylar 1-2 dk içinde gerçekleşir [79]. Renk değişimi yani oluşan çizgi test üretim tekniğine göre pozitif veya negatif değerlendirilir.

Kart testlerin üretim maliyetinin düşük olması, analizin hastanın yanında yapılabilmesi, analizin kolay uygulanabilmesi, uzman personel olmadan gözle değerlendirilebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır [80]. Dezavantajları ise sonuçların kantitatif olmaması, yanlış değerlendirmelere açık olması, kanıt olarak kullanılamaması ve kısıtlı sayıda maddenin değerlendirilebilmesidir.

2.4.2. İmmünolojik Yöntemler

İmmünolojik yöntemler, biyolojik matrikste yer alan protein veya kimyasal maddenin tayini için, antikor özgüllüğünü kullanarak yapılan ölçümlerdir. Yöntemin amacı antikor ve antijen arasındaki bağlanmanın ve bağlanmamanın arasında farklılığın tespitidir. İmmünolojik yöntemin en önemli özelliği, ilgili antijen ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip spesifik antikorların kullanılmasıdır [81].

Madde analizinde yaygın olarak kullanılan homojen immünolojik yöntem floresan polarizasyon immünolojik yöntemi (FPIA), enzim çoğaltılmış immünolojik yöntemi (EMIT), klonlanmış enzim donör immünolojik yöntemi (CEDIA) ve mikropartiküllerin kinetik etkileşimi (KIMS) yöntemleridir [82].

İmmünolojik yöntemlerde belirli madde grupları için sınırlı özgüllük söz konusu olduğu için benzer madde grupları pozitif test sonucuna neden olabilmektedir. Bu nedenle, tarama amaçlı kullanılan immünolojik yöntemlerde alınan pozitif sonuçların

daha kesin analiz yapan yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Doğrulama analizleri için GC-MS ve LC-MS/MS analizleri kullanılmaktadır.

Hızlı sonuç alınması, orta düzeyde personel deneyimi ve yatırım maliyeti gereksinimi olması avantajlarıdır. İmmün yöntemlerde kullanılacak antikorların geliştirilmesi için zaman gereksinimi vardır. Bu nedenle kısıtlı sayıda madde grupları analiz edilebilmektedir.

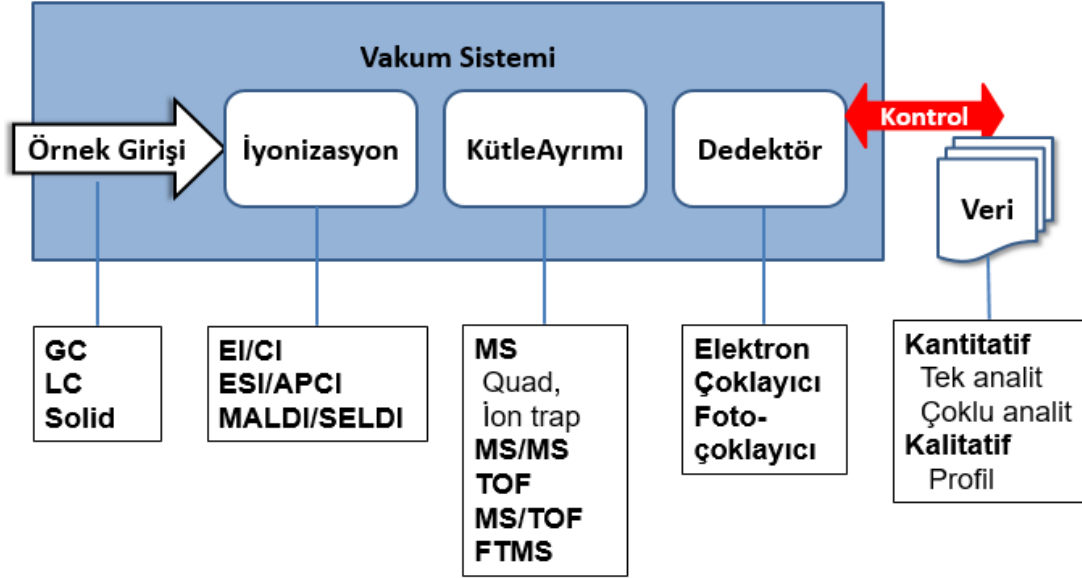
2.4.3. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerinin iki farklı ortama relatif ilgilerinin farklılığına göre ayrılmasını sağlayan tekniktir. Yöntemde temel bileşenler; numuneyi taşıyan hareketli faz (sıvı veya gaz), hareketli fazın aktığı sabit faz, sabit fazı tutan kolon ve ayrılan bileşiklerdir. Bunların içinde ince tabaka kromatografi (Thin Layer Chromatography; TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC), sıvı kromatografi-sıralı kütle spektrometri (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry; LC-MS/MS), gaz kromatografi-kütle spektrometri (Gas Chromatography Mass Spectrometry; GC-MS) bulunmaktadır. Günümüzde, bu yöntemler içinde TLC ve HPLC uzun numune hazırlama prosedürü, uzun analiz süresi, bakılabilecek madde sayısının az olması gibi dezavantajları nedeni ile tercih edilmemektedir. Kromatografik yöntemler içinde yer alan daha sofistike yöntemler olan LC-MS/MS ve GC-MS ile tanımlanmış bütün madde ve ilaçlar taranabilmektedir. Diğer yöntemlerde taranması mümkün olmayan pek çok maddenin taranabilmesi en büyük avantajlarından olup kalitatif ve kantitatif analizler mümkündür Ancak, yatırım maliyetlerinin yüksekliği, ileri düzeyde deneyimli personel gereksinimi ve hızlı sonuç alınmaması dezavantajlarıdır [83].

Kütle spektrometri (MS), numuneyi iyonlaştırıp oluşan iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre ayrıştırarak kaydeden cihazdır. Kütle spektrometri sistemi numune girişi, iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü, iyon dedektörü ve veri analiz sistemi olmak üzere beş ana bileşenden oluşur (Şekil 2.4.).

Numunelerin MS öncesinde kromatografik yöntemlerle (GC, LC gibi) ayrılması gerekmektedir. Bu ayırma işlemiyle sistemin özgülüğü ve duyarlılığı artırılır. Gaz kromatografik (GC) ayırma yöntemi uçucu veya uçucu hale getirilebilen bileşiklerin ayrılmasında kullanılır [84]. Sıvı kromatografik (LC) ayırma yöntemi çözünmüş

bileşiklerin hareketli sıvı faz ile durgun faz arasında seçici olarak dağılması ilkesine dayanır [12].



Şekil 2.4. Kütle spektrometri bileşenleri [85]

Madde analizlerinde GC-MS yöntemi altın standart metot olmasına rağmen yüksek maliyetli zaman alıcı numune hazırlama basamakları ve uzun analiz süresi gibi dezavantajlara sahiptir.

Uygun numune hazırlık prosedürleri ile belirlenen sayıda maddenin tek bir numunede taranabildiği, kantitasyon kabiliyeti daha yüksek olan LC-MS/MS yönteminin çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bu yöntemin GC-MS yöntemine göre avantajları daha hızlı ve basit numune hazırlığı, polar ve uçucu analitler ile uyumluluğu, çalışma zamanının daha kısa olması, yüksek analit seçiciliği ve kantitatif sonuç alınabilmesidir.

Kütle spektrometrilerde bir numuneye öncelikle uçuculuk kazandırılır, sonra yüklü moleküler iyonlar ve parçacıklar oluşturmak için iyonize edilir. İyon kaynağı iyonizasyonu sağlayan mekanik cihazlardır. İyonizasyon çok önemlidir. Maddelerin özelliklerine göre iyonizasyon kaynağı seçilmelidir. İyonizasyon için elektron iyonizasyon (EI), kimyasal iyonizasyon (CI), elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kullanılmaktadır (Tablo 2.5.). Madde analizi taramaları ve sıvı fazdaki numune analizi için yaygın olarak elektrosprey

iyonizasyon (ESI) tekniği kullanılmaktadır. ESI, iyonların analize tabi tutulmadan önce çözeltiden gaz fazına geçişine yardımcı olmak için elektrik enerjisini kullanır [86].

Tablo 2.4. Kromatografi için iyonizasyon kaynakları

İyon Kaynağı	Özellikleri
EI (Elektron iyonizasyon)	GS-MS'te yaygın kullanım Küçük moleküller için (500 Da)
ESI (Elektrospey iyonizasyon)	Polar ve bazik bileşikler için (70000 Da-200000 Da)
APCI (Atmosferik basıçta kimyasal iyonizasyon)	Nonpolar bileşikler için 1000 Da'dan büyük bileşikler için

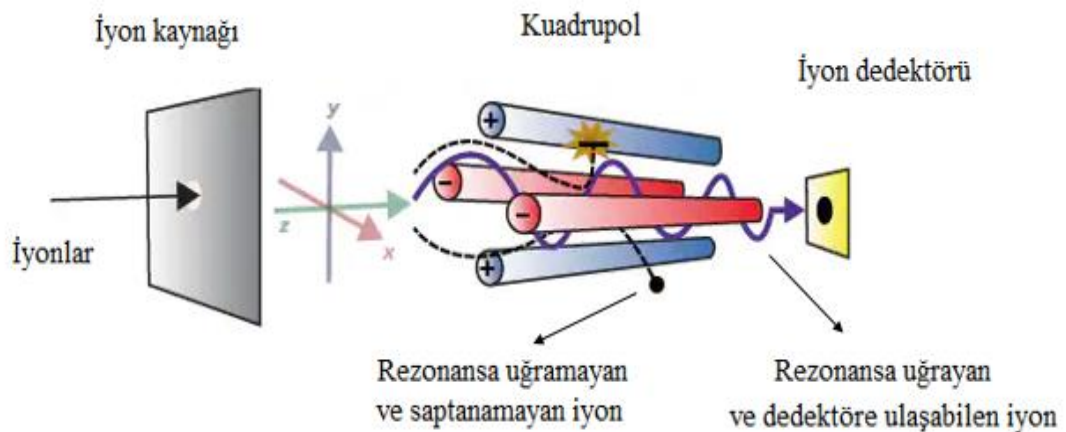
Günümüzde, kuadropol en yaygın kullanılan kütle analizörüdür. Gerçek m/z ölçümü, gaz fazı iyonlarının kütle analizörüne geçmesi ile gerçekleşir. Kuadropolde bulunan dört çubuk iki set halinde çapraz olarak düzenlenerek oluşturduğu elektriksiz alan ile sadece seçilmiş olan m/z oranına sahip iyonların analizörden geçerek dedektöre ulaşmasını sağlar [87]. İyonlar analizörden geçtikten sonra elektron çoğaltıcı olarak kullanılan dedektöre ulaşır. Yüklü parçacıkların dedektör membranına çarpması sonucu elektron salınımı gerçekleşir. Her çarpışma sonucu oluşan akım dijital sinyal oluşturur ve dedektöre ulaşan sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişimi iyon kromatogramı olarak kaydedilir [88].

Tandem MS'ler (MS/MS) ile daha büyük bir seçicilik ve daha düşük saptama limitleri elde edilmektedir. En yaygın MS/MS formu seri halinde üç kuadropolü bağlar, üçlü kuad ("triple quad") olarak adlandırılır. Genellikle her bir kuadropolün ayrı bir fonksiyonu vardır. Uygun bir iyonizasyon yöntemini takiben ilk kuadropol (Q1, MS1), önceden belirlenmiş bir m/z aralığı boyunca tarama yapmak ve ilgili bir iyonu seçmek için kullanılır. Bu seçilen madde ikinci kuadropolde (Q2, çarpışma hücresi) azot gazı ile parçalanır ve fragmanlarına ayrılır. Analizörden ilk geçen öncül iyon "ana iyon" ve parçalanması sırasında oluşan iyonlar, "yavru iyonlar" olarak adlandırılır. Üçüncü kuadropol (Q3, MS2), Q2'de meydana getirilen yavru iyonları analiz etmek için kullanılır. Üçüncü kuadropolde (Q3) fragmanlar aynı hıza getirilerek dedektöre yollar. Yüklü olan partiküllerin dedektöre çarpması sonucunda elektron salınımı gerçekleşir ve çarpma sonucu sinyal oluşur. Oluşan sinyalin yoğunluğunun zamana

bağlı değişimi ile iyon kromatogramı kaydedilerek tam bir tarama spektrumu üretilir [89].

Alternatif olarak, belirli hedef analitleri izlemek için spesifik kütleler seçilebilir, seçilmiş iyon izleme (selected ion monitoring, SİM) olarak adlandırılır.

Böylelikle tam bir yavru iyon taraması üretebilmek için bütün ürün iyonları taranabilir. Tek bir analizde birden fazla geçiş izleniyor ise çoklu reaksiyon izlemi (MRM, multiple reaction monitoring) gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.5. Kuadrupol yapısı [90]

2.4.4. Biyolojik Numune Tipleri

Yasaklı madde analizinde farklı biyolojik numune çeşitleri kullanılabilir. Numune seçiminde maddenin atılım yolu, biriktiği doku ve yarılanma ömrü gibi kriterler göz önünde bulundurulur. Madde analizi için kan, idrar, tükürük, mide içeriği, ter, göz sıvısı ve saç kullanılabilir [91]. Madde analizinin uygulama ve kullanım amacı da (klinik, adli veya işyeri toksikolojisi) seçilecek numune tipine karar verilmesinde önem taşımaktadır. Yasaklı madde analizi, biyolojik sıvılardaki çok sayıda maddeyi saptamaya yöneliktir. Bağımlılık tanısı için bilgi veren bir analiz bulunmama ile beraber kişiden düzenli olarak alınan numunelerinde yapılan analizler sonucunda, o kişi ile ilgili madde kullanımına dair detaylı bir profile ulaşılmaktadır. Analiz edilecek madde için biyolojik numune tipine karar verilmesinde, o maddenin farmakokinetiğinin bilinmesi çok önemlidir. Numune alınma zamanı, kullandığı

reçeteli ilaçlar ve madde metabolizmasında rol oynayan karaciğer ve böbrek gibi organların fonksiyonunu etkileyecek fizyolojik durumlar da bilinmelidir [92].

2.4.4.a. Kan

Analiz edilecek maddelerin ve metabolitlerinin miktar belirlenmesinde özellikle biyolojik materyal olarak kan kullanılmaktadır. Böylelikle yasaklı maddenin dozu ve yarılanma süresi hakkında bilgi edinilebilmektedir. Özellikle doz ve etki arasında ilişkinin tespiti için kan tercih edilen numune tipi olmaktadır. Kullanılan yasaklı maddeler hızlı bir şekilde kanı terk ettiği için kan numuneleri yakın zamanda kullanılan madde analizleri için uygundur. Kan numunesi için, yapısında bulunan serum proteinleri, lipitler ve diğer makromoleküller nedeniyle analiz öncesi kapsamlı bir ekstraksiyon işlemi gerekmektedir. Yasaklı maddelerin yarılanma sürelerinin çok kısa olması, numune alımı için eğitimli personel gereksinimi ve numune alma-toplama aşamasında bulaşıcı hastalıklara yakalanma riski gibi dezavantajları bulunmaktadır [93].

2.4.4.b. İdrar

Başlıca atılım yollarından biri olan idrar, birçok yasaklı maddenin birkaç gün önceki kullanımını tespit etmek için uygun bir biyolojik numunedir. İdrar numunelerinin kana göre en büyük avantajı kullanılan madde ve metabolitlerini yüksek düzeylerde içerebilmesidir. Ve ayrıca kan numunelerine göre numune toplama aşaması daha kolaydır [94]. İdrar numunelerinin yapısında protein, lipitler ve makro moleküllerin bulunmaması sebebiyle numune hazırlığı daha kolaydır.

İdrarda yasaklı madde analizleri doğrudan hasta başı testler, immünojenik yöntemlerle veya uygun bir çözücü ile ekstraksiyondan sonra kromatografik yöntemlerle yapılabilmektedir [95].

İdrar pH'ı bazı maddelerin atılımında önemli olabilmektedir. Amfetamin gibi zayıf bazik maddeler asidik idrarda, zayıf asidik özellikteki maddeler bazik idrarda hızlı atılmaktadır [95].

İdrar numunelerinin analizinin en önemli dezavantajı uzun süreli maruziyet hakkında bilgi vermemesidir. Diğer bir dezavantajı ise, aynı metabolik ürüne

metabolize olan ayrı gruba dahil maddelerin analiz sonuçlarının yorumlanmasında ortaya çıkan zorluktur.

İdrar bütünlük testleri örneğin toplanma aşamasında idrarın saflığının bozulup bozulmadığını değerlendirmek için uygulanır (Tablo 2.5.). Yasaklı madde analizlerinde madde kullanan bireyler analizleri yanıltmak amacıyla çeşitli yöntemler kullanmaktadır. En yaygın olarak, idrar numunesinin aşırı sıvı tüketimi ya da haricen sıvı eklenmesi gibi müdahalelerle dilüe edilerek analizi yanıltmaya çalışılmaktadır. İdrar numunelerinin çeşitli idrar olmayan çözeltilerle değiştirilmesi, analizleri geçersiz kılacak çeşitli bileşenlerin eklenmesi gibi hilelere başvurulabilmektedir. Bu tip müdahalelerin önüne geçmek için idrar numunelerinin özel düzenlenmiş tuvaletlerde gözetimli olarak alınması özellikle adli ve iş yeri tarama analizlerinde gereklidir. Numunede dilüsyon, hile yapıldığı veya yapısı değiştirildiği saptanır ise raporda belirtilmelidir [85, 96].

Tablo 2.5. İdrar bütünlük analizleri ve değerlendirmeleri

	Kreatinin (mg/dL)	Dansite	pH	Nitrit (mg/L)
Normal idrar	>20	1.003-1.035	3-11	Negatif
Dilüsyon şüpheli	≥2 ile <20	>1.001 ile <1.003		
Yapısı değiştirilmiş (Herhangi biri)	>200	>1.035	<3 veya >11	Pozitif (>500)
İdrar değil	<2	≤ 1.001 veya ≥1.020		

2.4.4.c. Saç

Yasaklı madde analizinde saç numunesi kullanmanın en büyük avantajı, kan ve idrar örneği ile saptanamayan daha uzun sürelerdeki madde kullanımını tespit edebilmesidir (Tablo 2.6.). Saç örnekleri dayanıklı bir biyolojik materyal olduğu için ölümden yıllar sonra bile madde tespitinde kullanılabilir [97]. Numune alma aşaması en kolay olan biyolojik materyallerden biridir. Saç analizinin duyarlılığı oldukça yüksektir. Tek doz oral kodein alımı bile saç numunelerinde saptanabilmektedir [98]. Saç numunesinin avantajları yanında dayanıklı bir biyolojik materyal olduğu için ön işlem aşamasında yıkama, hidroliz, ekstraksiyon basamakları

çok daha uzun sürmektedir. Bu basamakların fazla olması ve uzun sürmesi analiz maliyetini diğer biyolojik materyallere göre arttırmaktadır.

2.4.4.d. Tükürük

Tükürük; örnek toplama aşamasının kolay olması, toplama işlemi için yetkin sağlık personeline ihtiyaç olmaması, içerik olarak diğer vücut sıvılarına daha basit olması ve analizinin kolay olması gibi sebeplerle öne çıkan bir yasaklı madde analizinde öne çıkan bir biyolojik materyaldir (Tablo 2.7.) [99]. Maddeler ve metabolitleri, kılcal damarlardan tükürük kanallarına pasif difüzyon ile taşınır. Tükürükteki madde konsantrasyonları kan düzeyleri ile paraleldir (Tablo 2.6.) [100].

Tablo 2.6. Bazı yasaklı maddelerin kan, idrar ve tükürükte tespit süreleri [92, 101]

Madde	Kan	İdrar	Tükürük
6-MAM	20 dakika	2-4 saat	0,5-8 saat
Amfetamin	12 saat	2-3 gün	12-24 saat
BEG	7,5 saat	2-3 gün	12-24 saat
Buprenorfin	8 saat	48-56 saat	
Eroin	2 dakika		
Kodein	3 saat	24 saat	12-24 saat
Kokain	1 saat	6-8 saat	5-12 saat
MDMA	6 saat	30-48 saat	
Metadon	36 saat	7-9 gün	
Morfin	3 saat	24 saat	12-24 saat

Yasaklı madde analizlerinde numune türü seçimi elde edilme biçimi, tespit süreleri göz önüne alınarak çalışma amacına, kanıt değeri gerekip gerekmemesine göre (adli, klinik veya işyeri analizi) avantaj ve dezavantajları değerlendirilerek gerçekleştirilmektedir (Tablo 2.6. ve Tablo2.7.).

Tablo 2.7. Yasaklı madde analizinde numune türlerinin karşılaştırılması [92]

Numune Türü	Avantajları	Dezavantajları
İdrar	-Madde konsantrasyonu daha yüksek -Maliyeti daha uygun -Hasta başı cihazlarda kullanılabilir	-Numuneye hile yapılma ihtimali var -Madde konsantrasyonu hidrasyona göre değişir -Madde konsantrasyonu ve doz ilişkisi bulunmuyor
Kan	-Numuneye hile yapılma riski çok düşük - Yakın kullanımı gösterir	-Numune alımı için eğitimli personel gerekir -Madde tespit süresi kısa
Tükürük	-Numuneye hile yapılma riski düşük -Hasta başı cihazlarda kullanılabilir -Numune alımı kolay, eğitimli personel gerekmez	-Madde tespit süresi kısa -Pasif maruziyet nedeniyle kontaminasyon olabilir
Saç	-Madde tespit süresi en yüksek numune matriksi -Numune alımı kolay	-Yakın zamandaki madde kullanımını göstermez -Analiz yöntemleri sofistike ve pahalı

2.5. Çalışma Kapsamına Alınan Bileşikler

Analiz edilecek maddeleri belirlerken OKB hastalarına hem bağımlılık yapan hem de tedavide kullanılan 16 opiat madde (morfin, normorfin, kodein, norkodein, dihidrokodein, eroin, etilmorfin, oksikodon, 6-MAM, buprenorfin, norbuprenorfin, metadon, EDDP, nalokson, naltrekson ve tramadol) seçildi. Bu opiat maddelerden buprenorfin, norbuprenorfin, nalokson, metadon, EDDP, naltrekson maddeleri OKB hastalarının tedavilerinde kullanılan maddelerdir [102]. Tedavi takibi için analiz kapsamına alınan maddelerdir. OKB hastalarında opioid grupla birlikte kullanıldığında aşırı doz ölümlerine sebep olabilecek ve suistimaline sıklıkla rastlanan 3 adet kokain grubu madde (kokain, kokaetilen, BEG) ve 5 adet amfetamin grubu madde (metamfetamin, MBDB, MDA, MDEA, MDMA) dahil edildi. Ayrıca son yıllarda özellikle OKB hastalarında suistimalinde artış olduğu bildirilen [103] gabapentinoidlerden pregabalin ve gabapentin de panele eklendi (Tablo 2.8.).

Tablo 2.8. Çalışma kapsamına alınan yasaklı maddeler ve metabolitleri

	Madde	Özelliği
1. Grup: Opiatlar		
1	Morfin	Bağımlılık yapan doğal opiat alkaloidi,
2	Normorfin	Morfin metaboliti
3	Kodein	Tedavi amaçlı kullanılan suistimalive bağımlılığı bulunana doğal opioid alkaloidi
4	Norkodein	Kodein metaboliti
5	Dihidrokodein	Kodein metaboliti
6	Eroin	Bağımlılık yapan doğal opiat alkaloidi,
7	Etilmorfin	Morfin metaboliti
8	Oksikodon	Kodein metaboliti
9	6-MAM	Eroin metaboliti
10	Buprenorfin	OKB tedavisinde kullanılan seçici agonistik etkisi olan yarı sentetik opiat alkaloidi
11	Norbuprenorfin	Buprenorfin major aktif metaboliti
12	Metadon	OKB tedavisinde kullanılan seçici antagonistik etkisi olan yarı sentetik opiat alkaloidi
13	EDDP	Metadon aktif metaboliti
14	Nalokson	OKB tedavisinde kullanılan seçici antagonistik etkisi olan yarı sentetik opiat alkaloidi
15	Naltrekson	OKB tedavisinde kullanılan seçici antagonistik etkisi olan yarı sentetik opiat alkaloidi
16	Tramadol	Tedavi amaçlı kullanılan suistimalive bağımlılığı bulunana sentetik opioid alkaloidi
2. Grup: Kokain ve metabolitleri		
17	Kokain	OKB hastalarında sıklıkla suistimali görülen yasaklı madde
18	Kokaetilen	Kokainin aktif metaboliti
19	BEG	Kokain aktif metaboliti
3. Grup: Amfetaminler		
20	Metamfetamin	OKB hastalarında yaygın suistimali olan amfetamin türevi
21	MBDB	OKB hastalarında yaygın suistimali olan amfetamin türevi
22	MDA	OKB hastalarında yaygın suistimali olan amfetamin türevi
23	MDEA	OKB hastalarında yaygın suistimali olan amfetamin türevi
24	MDMA	OKB hastalarında yaygın suistimali olan amfetamin türevi
4. Grup: Gabapentinoidler		
25	Pregabalin	Tedavi amaçlı kullanılan suistimali ve bağımlılığı bulunanan gabapentinoid
26	Gabapentin	Tedavi amaçlı kullanılan suistimali ve bağımlılığı bulunanan gabapentinoid

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasallar ve Kitler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasal	Firma	Ürün Kodu
6-MAM D3	Lipomed	M-44-HC-ILM
Benzeklogonin D3	Lipomed	COC-294-HY-ILM
MDEA D5	Lipomed	MDE-734-HC-ILM
MDA D5	Lipomed	MDA-927-HC-ILM
Morfin IS D3	Lipomed	M-39-HC-I
Metamfetamin IS D5	Lipomed	AMP-623-HC-ILM
MDMA IS D5	Lipomed	MDM-324-HC-ILM
EDDP	Lipomed	EDD-738-CL-ILM
6-MAM	Lipomed	M-43-HC-ILM
Benzoilekgonin	Lipomed	COC-204-FB-ILM
Buprenorfin	Lipomed	BUP-399-HC-ILM
Dihidrokodein	Lipomed	C-102-HC-ILM
Eroin (Diasetilmorfin)	Lipomed	M-29-FB-ILA
Etilmorfin	Lipomed	C-820-HC-ILM
Gabapentin	Lipomed	GAB-1474-ILM
Kodein	Lipomed	C-69-HC-ILM
Kokaetilen	Lipomed	COC-207-FB-ILA
Kokain	Lipomed	COC-156-FB-ILA
MBDB	Lipomed	MBD-193-HC-ILM
MDA	Lipomed	MDA-79-HC-ILM
MDEA	Lipomed	MDE-191-HC-ILM
MDMA	Lipomed	MDM-94-HC-ILM
Metamfetamin	Lipomed	AMP-732-HC-ILM
Metadon	Lipomed	MET-637-HC-ILM
Morfin	Lipomed	M-35-HC-I
Nalokson	Lipomed	NAL-195-HC-ILM
Naltrekson	Sigma	N-007
Norbuprenorfin	Lipomed	BUP-982-FB-ILM
Norkodein	Lipomed	C-36-FB-ILM
Normorfin	Lipomed	M-34-HC-ILM
Oksikodon	Lipomed	C-404-HC-ILM
Pregabalin	Lipomed	PRE-1475-ILM
Tramadol	Lipomed	TRA-779-HV-ILM

Metanol	Sigma-Aldrich	34885
Asetonitril	Sigma-Aldrich	00687
Amonyum Format	Carlo Erba	419741
Formik Asit	Carlo Erba	303912
Mobil Faz A(MA)	Obikrom	LR3600M1
Mobil Faz B (MB)	Obikrom	LR3600M2
Reaktif A (IS)	Obikrom	LR3600A
Reaktif B (Glukronidaz)	Obikrom	LR3600HR-B
Opiat ölçüm kiti	Abbott	3L34-20
Ekstazi Ölçüm kiti	Abbott	3L42-20
Amfetamin/Metamfetamin Ölçüm Kiti	Abbott	3L37-20

3.1.2. Cihazlar

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Firma
Kütle Spektrometri Sıvı Kromatografi	Shimadzu LC-MS/MS 8040, Japonya Shimadzu UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20AD (A pompası), LC20AD (B pompası), SIL20 A HT (otosampler) ve CTO-10AS VP (kolon fırını) Japonya
İmmünojenik Yöntem Analizörü	Abbott marka c8000 model ABD
Biyokimya Analizörü	Beckman Coulter AU680, ABD
Tam Otomatik İdrar Analizörü	İChem Velocity, ABD
Santrifüj	NüveNF-1200R
Azot Uçurucu	VLM GmbH 33689 Bielefeld 1302001
Vorteks Karıştırıcı	Velp Scientifica (Heidolph Reax 2000 shaker)

3.1.3. Sarf Malzemeler

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma
LCMS/MS kolonu	Restek Allure PFPP 5 µm 50x2,1 mm
İnsert	Shimadzu (200 µL)
Vial	Shimadzu (5 mL)
Polipropilen tüp	Eppendorf (1,5-2,0 mL)
Kilit kapaklı mikro santrifüj tüp	Fıratmed (1,5-2,0 mL)
Mikropipet	Transferpette 10-100 µL, 100-1000 µL
Pipet uçları	Pipette Tip 10-100 µL, 100-1000 µL

3.2. Etik Kurul İzni ve Çalışma Planı

Bu Yüksek Lisans Tez çalışması Helsinki Deklarasyonu ve iyi Klinik Uygulamalarının etik kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. “*Opioid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numunelerinde yasaklı madde analizlerinin karşılaştırılması*” konulu Hacettepe Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje ID 18764) için etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 17.03.2020 tarihinde Proje No GO 20/257 ve Karar No 2020/06-51 olarak onaylanmıştır (Ek 1).

Başlıca dört aşamada planlanan çalışma özeti Tablo 3.4.'de verilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında hastalardan idrar ve tükürük numuneleri toplandı. Çalışmada 18/Mart/2020-18/Mart/2021 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından Opioid Kullanım Bozukluğu tedavisine başvuran ve OKB tedavisinde takip edilen hasta grubundan idrar ve tükürük numuneleri toplanmıştır. Çalışmaya dahil edilmeden önce tüm katılımcılardan “Araştırma amaçlı çalışma için aydınlatılmış onam formu” (Ek-2) alınmıştır.

Tablo 3.4. Çalışma planı

Aşama	Gerçekleştirilen Çalışma
I	Hastaların idrar ve tükürük numunelerinin toplanması
II	LC-MS/MS yöntem validasyonları
IIa	İdrar numuneleri için yöntem validasyonu
IIb	Tükürük numuneleri için yöntem validasyonu
III	Numunelerin analizi
IIIa	İdrar numunelerinin bütünlük analizi
IIIb	İdrar numunelerinin LC-MS/MS yöntemi ile madde analizi
IIIc	İdrar numunelerinin immünolojik yöntem ile madde analizi
IIId	Tükürük numunelerinin LC-MS/MS yöntemi ile madde analizi
IV	Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışmanın ikinci aşamasında, bu tez çalışması kapsamına alınan maddeler için idrar ve tükürük numunelerinde LC-MS/MS yöntemleri geliştirilerek validasyon çalışmaları

yapıldı. Çalışma kapsamına alınan madde listesi Tablo 2.8’de verilmiştir. Çalışmanın üçüncü aşamasında immünolojik yöntemle idrar numuneleri analiz edildi. Dördüncü aşamada elde edilen veriler değerlendirilerek karşılaştırıldı.

3.3. Hasta Numunelerinin Toplanması

Çalışmaya alınan hastalar için aşağıda belirtilen “Dahil edilme” (Tablo 3.5.) ve “Dahil edilmeme” (Tablo 3.6.) kriterleri uygulanarak toplam 76 hastadan eş zamanlı idrar ve tükürük örnekleri toplandı.

Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan eş zamanlı olarak idrar ve tükürük numuneleri alındı. İdrar numuneleri 5 dakika 12.000 rpm’de santrifüjlenerek üst süzüntü beş porsiyon şeklinde kilit kapaklı mikro santrifüj tüpüne konarak analize kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Tükürük numuneleri hastalardan en az 5 mL olacak şekilde 10 mL’lik Falcon tüplerine toplandı. Tükürük numuneleri 5 dakika 12.000 rpm’de santrifüj edilerek üst süzüntü kilit kapaklı mikro santrifüj tüpüne konarak analize kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.5. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri
- 18 yaşının üstünde olan
- SCID-I (Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders/ DSM-IV Eksen- I Bozuklukları İçin Yapılandırılmış Klinik Görüşme Formu)ile doğrulanmış DSM-4 “opioid bağımlılığı” tanısı olan.
- Opioid kullanım bozukluğu tanısı ile ilaç destekli (buprenorfin veya naltrekson) tedavi amacı ile başvuran ve çalışmayı kabul eden hastalar

Tablo 3.6. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri
- Çalışmayı kabul etmeyen ve araştırma evreninde yer almayan
- İdrar numunesi veremeyen
- Tükürük numunesi veremeyen
- Demans bulunan
- Zekâ geriliği bulunan
- Organik beyin hastalığı bulunan
- Herhangi bir nedenle aydınlatılmış onamını çeken hastalar

3.4. Yöntemler

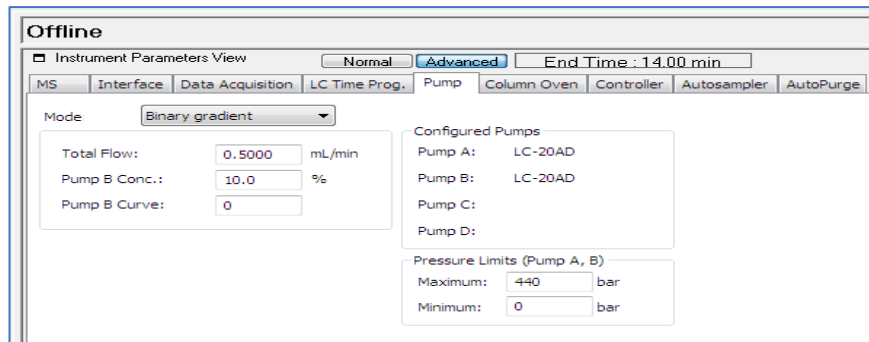
3.4.1. İdrar Numuneleri için LC-MS/MS Yöntemi

Bu tez çalışması için hedeflenen 26 maddenin idrar numunelerinde LC-MS/MS yöntemi ile en yüksek pik intensitesini elde etmek için optimum parametreleri belirlendi ve metot uygulaması yapıldı.

Vial içine reaktif A'dan 400 µL ve üzerine 100 µL idrar numunesi eklendi. Vial kapağı kapatılarak karışım 30 saniye vortekslendi. Vialler otosamlere yerleştirilerek analiz başlatıldı. İdrar numunelerinin 1/2, 1/3 ve 1/4 dilüsyonlarındaki pikleri değerlendirilerek 1/4 dilüsyonda en uygun intensite elde edildi. Enjeksiyon volümleri 10, 20 ve 30 µL olarak denemeler yapılarak en uygun enjeksiyon volümünün 20 µL olduğuna karar verildi.

İdrar numunelerinde kantitatif olarak LC-MS/MS yöntemi ile yasaklı madde derişimlerini belirlemek için Shimadzu UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20AD (A pompası), LC20AD (B pompası), SIL20 A HT (otosampler) ve CTO-10AS VP (kolon firmı), Shimadzu markalı LCMS-8040 modeli Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometri, kromatografik ayırım için Restek Allure PFPP 5 µm (50 x 2.1 mm) kolonu kullanılarak pozitif iyon modunda analizler gerçekleştirildi. İdrar numuneleri için saptanan optimum LC-MS/MS koşulları Tablo 3.7'de ve akış gradienti Şekil 3.1.'de verilmiştir. Yirmi altı yasaklı maddenin seçilen ana iyon ve yavru iyon kütle/yük (m/z) değerleri idrar matriksi dikkate alınarak belirlenip tarama tipi çoklu reaksiyon tarama (Multiple Reaktion Monitoring, MRM) olarak seçildi (Tablo 3.8).

Çalışma sonuçları LabSolutions Version 5.60 SP2 (2008-20013 Shimadzu Corporation) yazılımı ile değerlendirildi.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan akış gradienti

Tablo 3.7. İdrar numuneleri için LC-MS/MS yöntemi koşulları

Çalışma Koşulları	Açıklama		
<u>LC Koşulları</u>			
Enjeksiyon volümü	20 µL		
Kolon	Restek Allure PFPP 5 µm (50 x 2,1 mm)		
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C		
Akış hızı	0,5 mL/dk		
Akış programı			
Gradient (dk)	Akış Hızı (µL/min)	MA (%)	MB (%)
0.00	500	90	10
10.00	1.000	10	90
14.00	500	90	10
15.00	500	90	10
<u>MS/MS Koşulları</u>			
İyonlaştırıcı gaz	N ₂		
Argon gazı basıncı	230 kPa		
İyonlaştırıcı gaz akışı	3 L/dk		
Kurutucu gaz akışı	15 L/dk		
İyonizasyon	Elektro sprey iyonizasyon (ESI), pozitif iyon		
Tarama hızı	15.000 u/sn		
Tarama tipi	MRM		
Dwell time	<12 msn		
Analiz süresi	15 dk		

Tablo 3.8. İdrar LC-MS/MS için seçilen iyon ve RT değerleri

Madde	RT (dk)	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)
6-MAM	2.2	327.90	164.90
BEG	2.2	290.10	168.10
Buprenorfin	5,4	468.15	396.20
Dihidrokodein	1,6	302.20	199.20
EDDP	6,4	278.00	249.00
Eroin	3,4	370.00	165.00
Etilmorfin	2,3	314.20	152.20
Gabapentin	1,4	172.15	154.10
Kodein	1,7	300.05	164.90
Kokaetilen	4,7	318.10	196.20
Kokain	4,0	304.15	182.10
MBDB	3,0	208.00	135.00
MDA	2,2	179.90	163.10
MDEA	3,0	207.95	163.30
MDMA	2,5	193.95	163.00
Metamfetamin	2,4	149.95	91.00
Metadon	6,5	310.25	265.20
Morfin	0,9	285.95	151.80
Nalokson	1,8	328.00	212.00
Naltrekson	2,1	342.10	267.20
Norbuprenorfin	3,8	414.30	152.00
Norkodein	0,9	286.10	152.00
Normorfin	0,7	272.10	152.00
Oksikodon	2,1	316.10	212.20
Pregabalin	1,5	160.20	142.10
Tramadol	3,2	264.15	58.20
Nalorfin (IS)	1,6	312.20	201.20

3.4.1.a Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İdrar metodumuzda analizini planladığımız 6-MAM, BEG, buprenorfin, dihidrokodein, EDDP, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, kokaetilen, kokain, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, metadon, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin, oksikodon, pregabalin ve tramadol maddeleri sıvı formunda 1mg/mL olarak temin edildi. Bu maddelerin herbirinden 10 µL temiz bir vial içine alındı. Her bir maddeden 10 µL alınarak elde edilen 260 µL hacim üzerine 740 µL metanol eklenip toplam hacim 1 mL'ye tamamlanarak (her maddeden 1 mL'de 10 µg içeren derişimi 10 mg/L (10.000 ng/mL) olacak şekilde) stok kalibratör çözeltisi hazırlandı. İlaç ya da madde kullanımı olmayan sağlıklı bir bireyden temin edilen ve çalışma kapsamındaki maddeler için LC-MS/MS yöntemi ile Tablo 3.8'de belirtilen RT'lerde hiçbir pik vermediği doğrulanmış idrar numunesi "*Boş İdrar*" olarak kullanıldı. Stok kalibratör çözeltisinin boş idrar numunesi ile Tablo 3.9'da belirtilen şekilde dilüsyonları ile dört seviye kalibratör çözeltisi hazırlanıp -20 °C'de depolandı

Tablo 3.9. İdrar LC-MS/MS için kalibratörlerin hazırlanması

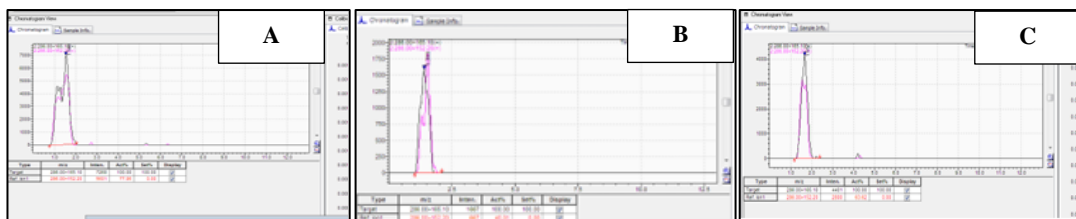
Kalibratör	Final Konsantrasyon (ng/mL)	Eklenen Kalibratör (µL)	Boş İdrar (µL)
K4	400	60 Stok Kal	1.440
K3	200	750 K4	750
K2	100	750 K3	750
K1	50	750 K2	750
K0	0	-	1.500

3.4.2. Tükürük Numuneleri için LC-MS/MS Yöntemi

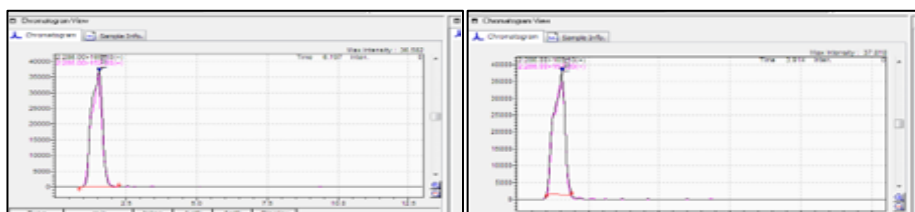
Tükürük numuneleri için geliştirilen LC-MS/MS yönteminde çalışma kapsamına alınan 26 madde için en yüksek intensiteye sahip pikleri elde etmek üzere optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Numune ön hazırlık aşamasının optimizasyonunda protein ekstraksiyonu için farklı çöktürücüler (%100 metanol veya %100 asetonitril ve %50 metanol+%50 asetonitril) denendi. Tükürük numunesi 300 µL alınıp üzerine 900 µL çöktürücü ilave edildi. Çözeltiler 30 saniye vortekslenip sonrasında 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant fazından 100 µL alınıp üzerlerine 100 µL metanol eklenip 10 saniye vorteksledikten sonra analiz edilip kromatogramlar karşılaştırıldığında en iyi pik intensitesi %100 metanol ekstraksiyonu ile elde edildi (Şekil 3.2.).

Numune ön hazırlık aşamasının optimizasyonunda ayrıca ekstrakte edilen numunelere uçurma işleminin etkisi de değerlendirildi. Metanol ile ekstrakte edilen numuneler 40 °C, N₂ gazı altında 30 dakika boyunca sıvı hacmi tamamen buharlaşmaya kadar uçurma işlemi uygulandı. Uçurma işlemi uygulanan numuneden 100 µL alınıp üzerine 100 µL metanol eklendi. Uçurma işlemi uygulanmayan ve uçurma işlemi uygulanan numuneler pik intensiteleri açısından karşılaştırıldı. Her iki numune enjeksiyonundan eş pik intensiteleri elde edildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. Protein ekstraksiyonu ile morfin maddesi kromatogramları, A. %100 asetonitril, B. %50 metanol+%50 asetonitril, C. %100 Metanol



Şekil 3.3. Uçurma işleminin morfin maddesi için karşılaştırılması A. Uçurma işlemi uygulanarak, B. Uçurma işlemi uygulanmadan

Tablo 3.10. Tükürük numuneleri için LC-MS/MS yöntemi koşulları

Çalışma Koşulları	Açıklama		
<u>LC Koşulları</u>			
Enjeksiyon volümü	20 µL		
Kolon	Restek Allure PFPP 5 µm (50 x 2,1		
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C		
Akış hızı	0,5 mL/dk		
Akış programı			
	Gradient	Akış Hızı	M1
	(dk)	(µL/min)	(%)
	0.00	500	90
	10.00	1.000	10
	14.00	500	90
	15.00	500	90
			M2
			(%)
			10
			90
			10
			10
<u>MS/MS Koşulları</u>			
İyonlaştırıcı gaz	N ₂		
Argon gazı basıncı	230 kPa		
İyonlaştırıcı gaz akışı	3 L/dk		
Kurutucu gaz akışı	15 L/dk		
İyonizasyon	Elektro spre yonizasyon (ESI), pozitif iyon		
Tarama hızı	15.000 u/sn		
Tarama tipi	MRM		
Dwell time	<12 msn		
Analiz süresi	18 dk		

Tablo 3.11. Tükürük LC-MS/MS için seçilen iyon ve RT değerleri

Madde	RT (dk)	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)
6-MAM	3.9	327.90	165.20
BEG	3.9	290.00	168.30
Buprenorfin	7.8	468.10	396.20
Dihidrokodein	3.6	302.20	199.10
EDDP	8.4	270.20	249.10
Eroin	5.5	370.00	165.00
Etilmorfin	4.3	314.20	165.00
Gabapentin	3.1	172.00	154.20
Kodein	3.5	300.00	215.20
Kokaetilen	7	318.20	196.00
Kokain	6.2	303.90	182.20
MBDB	5.7	208.20	77.00
MDA	4.5	180.10	105.00
MDEA	5.6	208.00	163.20
MDMA	5	194.10	163.00
Metamfetamin	4.7	150.10	119.20
Metadon	9.2	310.20	265.10
Morfin	2.2	286.00	165.10
Nalokson	3.7	328.10	212.10
Naltrekson	4	342.10	267.20
Norbuprenorfin	6.8	414.20	83.20
Norkodein	3.3	286.10	152.00
Normorfin	1.8	272.10	152.00
Oksikodon	4	316.10	298.20
Pregabalin	3.4	160.20	55.10
Tramadol	5.9	264.10	58.20
d ₃ 6-MAM	3.9	331.20	165.10
d ₃ -BEG	2.2	293.10	171.10
d ₅ -MDA	2.4	185.10	168.10
d ₅ -MDEA	3.2	213.15	163.10
d ₃ -MDMA	2.7	199.15	165.10
d ₅ -Metamfetamin	2.5	155.10	92.10
d ₃ -Morfin	0.9	289.10	165.10

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda tükürük numunesinin %100 metanol ile ekstrakte edilip uçurma işlemi yapılmadan hazırlanmasına karar verildi.

Tükürük numunelerinde kantitatif olarak LC-MS/MS yöntemi ile yasaklı madde derişimlerini belirlemek için Shimadzu markalı LCMS-8040 modeli Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometri, kromatografik ayırım için Restek Allure PFPP 5 µm (50 x 2.1 mm) kolonu kullanılarak pozitif iyon modunda analizler gerçekleştirildi. Tükürük numuneleri için saptanan optimum LC-MS/MS koşulları Tablo 3.10.'da verilmiştir. Yirmi altı yasaklı maddenin ana iyon ve yavru iyon kütle/yük (m/z) değerleri idrar matriksi dikkate alınarak belirlenip tarama tipi çoklu reaksiyon tarama (Multiple Reakzion Monitoring, MRM) olarak seçildi (Tablo 3.11.). Çalışma sonuçları LabSolutions Version 5.60 SP2 (2008-20013 Shimadzu Corporation) yazılımı ile değerlendirildi.

3.4.2.a Çözeltilerin Hazırlanması

Analizini planladığımız 6-MAM, BEG, buprenorfin, dihidrokodin, EDDP, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, kokaetilen, kokain, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, metamfetamin, metadon, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodin, normorfin, oksikodon, pregabalin ve tramadol maddeleri sıvı formunda 1mg/mL olarak temin edildi. Bu maddelerin herbirinden 10 µL temiz bir vial içine alındı. Her bir maddeden 10 µl alınarak elde edilen 260 µl hacim üzerine 740 µL metanol eklenip toplam hacim 1 mL'ye tamamlanarak (her maddeden 1 mL'de 10 µg içeren derişimi 10 mg/L (10.000 ng/mL) olacak şekilde) stok kalibratör çözeltisi hazırlandı. İlaç ya da madde kullanımı olmayan sağlıklı bir bireyden temin edilen ve çalışma kapsamındaki maddeler için LC-MS/MS yöntemi ile Tablo 3.11'de belirtilen RT'lerde hiçbir pik vermediği doğrulanan tükürük numunesi "*Boş Tükürük*" olarak kullanıldı. Stok kalibratör çözeltisinin, boş tükürük numunesi ile Tablo 3.12'de belirtilen şekilde dilüsyonları ile altı seviye kalibratör çözeltisi hazırlanıp -20 °C'de depolandı.

İnternal standart olarak çalıştığımız parametrelerden döteryum ile işaretlenmiş d₃-MDMA, d₅-Metamfetamin, d₃-Morfin, d₅-MDA, d₅-MDEA, d₃-BEG, d₃-6-MAM standartlarının sıvı formunda 1mg/ml olarak temin edildi. Yedi maddeden 10 µL alıp temiz bir vialin içine alındı. 70 µL olan bu döteryum karışımı üzerine 930 µL metanol

ile 1 mL'ye tamamlanan ana stoğun derişimi 10.000 ng/mL'dir. Yöntemde kullanılmak üzere dilüsyon solüsyonu haline getirmek için 1/50 oranında metanol ile seyreltildi. Stoktan 50 µL alınıp üzerine 4950 µL metanol eklendi.

Tablo 3.12. Tükürük LC-MS/MS için kalibratörlerin hazırlanması

Kalibratör	Final Konsantrasyon (ng/mL)	Eklenen Kalibratör (µL)	Boş Tükürük (µL)
K6	800	120 Stok Kal	1380
K5	400	750 K6	750
K4	200	750K5	750
K3	100	750 K4	750
K2	50	750 K3	750
K1	25	750 K2	750
K0	0	-	1.500

Mobil Faz 1 (M1): 500 mL 2mM amonyum format çözeltisine %1 formik asit eklenmesiyle hazırlandı.

Mobil Faz 2 (M2): 500 mL asetonitril içine %1 formik asit eklenmesiyle hazırlandı. Mobil fazlar çalışma günlerinde hazırlanıp artan miktarları 2-8 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2.b. Numune Hazırlanması

Tükürük numuneleri ön hazırlık olarak ilk önce proteinlerinden uzaklaştırmak için 300 µl tükürük numunesi ependorfa alındı ve üzerine 900 µL metanol eklendi. Çözelti 30 saniye vortekslendi. 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz alınarak tükürük numuneleri hazır hale getirildi. Temiz bir vial içine çöktürülmüş numunenin üst fazında 100 µL alınıp üzerlerine 100 µL internal standart için dilüsyon solüsyonu eklenip 10 saniye vorteksledikten sonra numune analiz için hazır hale getirildi.

Kalibratör ve numunelerden 100 µL alınarak 100 µL IS çözeltisi (1/50 seyreltilen internal standart) temiz vial içindeki 1 mL'lik insert içine pipetlenerek vidalı kapağı ile kapatıldı. 10 saniye vorteks sonrası enjeksiyona hazır hale getirilerek numune yükleyiciye yerleştirildi.

3.4.3 LC-MS/MS Yöntemi Validasyon Çalışmaları

İdrar ve tükürük için geliştirilen LC-MS/MS yöntemlerinin validasyon çalışmaları, Adli Bilimler Çalışma Grubu Adli Toksikolojide Metot Validasyonunda Standart Uygulamalar'a (SWGTOX) göre planlandı (Tablo 3.13.)[104].

Tablo 3.13. Validasyon çalışma planı ve performans kriterleri

Parametre	Çalışma	Performans Kriteri
Analitik Aralık ve Doğrusallık	<ul style="list-style-type: none"> En az dört konsantrasyon düzeyinde, beş tekrar çalışma ve verilerin birleştirilmesi 	<ul style="list-style-type: none"> Regresyon değeri $\geq 0,99$ olmalıdır. Her bir kalibratör için hedef değerin %20'si aşılmamalıdır.
Saptama Sınırı	<ul style="list-style-type: none"> Doğrusal kalibrasyon grafiği çiziminden hesaplama yapılması 	<ul style="list-style-type: none"> LOD düzeyinde Bias ve kesinlik çalışmaları hedef içinde ve analit yanıtı tatmin edici düzeyde olmalıdır.
Kantitasyon Sınırı	<ul style="list-style-type: none"> Karar sınırındaki konsantrasyonda, her çalışmada üçer analiz olmak üzere, üç ayrı çalışma 	<ul style="list-style-type: none"> LOQ düzeyinde Bias ve kesinlik çalışmaları hedef içinde ve analit yanıtı tatmin edici düzeyde olmalıdır.
Bias ve Kesinlik	<ul style="list-style-type: none"> Üç konsantrasyon düzeyinde üçer analiz, her çalışmada yeni kalibrasyon oluşturarak beş farklı çalışma 	<ul style="list-style-type: none"> Bias \pm %20 aşılmamalıdır. % CV %20 aşılmamalıdır.
Sürüklenme	<ul style="list-style-type: none"> Beş günlük çalışma sürecinde kullanılan her bir kalibratörün ardından boş numune çalışılması 	<ul style="list-style-type: none"> En yüksek düzey kalibratör ardından okutulan boş numune sinyali en düşük kalibratörün %10'u aşılmamalıdır.
Girişim	<ul style="list-style-type: none"> Aynı matriks için on farklı numune, IS eklenmeden Bir boş numune + IS Bir yüksek konsantrasyonda madde katkılı numune, IS eklenmeden Analizi yapılan maddenin bulunmadığı girişim yapma ihtimali olan boş, katkılı veya gerçek numuneler 	<ul style="list-style-type: none"> Matriks, IS veya sık kullanılan ilaç ve yasaklı maddelerden girişim olmadığı gösterilmelidir.
İyonizasyon Etkileşimi	<ul style="list-style-type: none"> On adet matriks uyumlu iki set, ekstraksiyon sonrası düşük ve yüksek düzeyde madde katkılı boş numune ekstraktı Boş standartlar (düşük ve yüksek), altı kez enjekte edilir 	<ul style="list-style-type: none"> Ortalama $\leq \pm$ % 25 baskılanma veya artma, Matriks etkisi $<$ % 15 CV olmalıdır.
Dilüsyon Bütünlüğü	<ul style="list-style-type: none"> Yüksek konsantrasyonda madde katkılı numune 1/2, 1/5 ve 1/10 dilüsyonda üçer kez çalışılması 	<ul style="list-style-type: none"> Bias ve kesinlik kriterlerinin dilüsyondan etkilenmediği gösterilmelidir.
Dayanıklılık	<ul style="list-style-type: none"> Ekstrakte edilen numunelerin oda sıcaklığında 0, 6, 12, 24, 30 ve 36. saate analiz edilip pik alanları karşılaştırılmalıdır. 	<ul style="list-style-type: none"> Ekstrakte edilen numunelerin oda sıcaklığında değişmeden kalabildiği süre belirlenmelidir. Bias \pm %20 aşılmamalıdır.

3.4.3.a. Analitik Aralık ve Doğruluk

- Analitik aralık, yöntemin doğru ve güvenilir sonuçları için ölçülen madde konsantrasyonuna orantılı yanıt veren aralığın tanımıdır.
- İdrar metodu için günlük hazırlanan K1 (50 ng/mL), K2 (100 ng/mL), K3 (200 ng/mL) ve K4 (400 ng/mL) kalibratörleri ardışık beş gün analiz edildi.
- Tükürük metodu için günlük hazırlanan K1 (25 ng/mL), K2 (50 ng/mL), K3 (100 ng/mL), K4 (200 ng/mL), K5 (400 ng/mL) ve K6 (800 ng/mL) kalibratörleri ardışık beş gün analiz edildi.
- İdrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemleri ile çalışmaya dahil edilen 26 madde için regresyon ve korelasyon değerleri hesaplandı.
- İdrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemleri için kalibratör verilerinin ortalamaları kullanılarak doğrusal kalibrasyon grafikleri çizildi.
- Ortalama regresyon değeri $\geq 0,99$ olmalıdır.

3.4.3.b. Saptama ve Kantitasyon Sınırları

- Saptama sınırı (LOD), yöntemin ölçülebilen maddenin varlığını saptayabildiği ancak doğru kantitasyon yapamadığı konsantrasyonun tanımıdır. Kantitasyon sınırı (LOQ), yöntemin kantitatif olarak doğru ölçebildiği en düşük konsantrasyonun tanımıdır.
- Her maddenin doğrusallık denkleminde yararlanılarak y noktasını kestiği nokta ve doğrunun eğim değeri hesaplandı.
- Hesaplama için aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$LOD = (3.3 s_y) / Avg_m \quad (\text{Eşitlik 1})$$

s_y : y kesim noktalarının standart sapması

Avg_m : Eğim değerlerinin ortalaması

- İdrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemleri ile çalışmaya dahil edilen 26 madde için LOD değerleri “Eşitlik 1” kullanılarak hesaplandı.
- İdrar metodu LOQ çalışması için en düşük kalibratör (50 ng/mL) üç ayrı çalışmada üçer kez analiz edildi ve sinyal okumalarının %CV değerleri hesaplandı.

- Tükürük metodu LOQ çalışması için en düşük kalibratör (25 ng/mL) üç ayrı çalışmada üçer kez analiz edildi ve sinyal okumalarının %CV değerleri hesaplandı.
- Tanımlamanın doğruluğu için Bias $\pm\%20$ içinde ve %CV değeri $<\%20$ olmalıdır.

3.4.3.c. Bias ve Kesinlik

- Bias, yöntem tarafından ölçülen konsantrasyonların ortalamasının gerçeğe ne kadar yakın olduğunu ifade etmektedir. Kesinlik, yöntemde aynı koşullarda aynı örneğin ardışık ölçümlerinin birbirine yakınlığını ifade etmektedir.
- İdrar metodu Bias ve kesinlik çalışması için düşük (75 ng/mL), orta (150 mg/mL) ve yüksek (300 ng/mL) düzeylerde idrar numuneleri hazırlandı.
- Tükürük metodu Bias ve kesinlik çalışması için düşük (50 ng/mL), orta (300 ng/mL), yüksek (600 ng/mL) düzeylerde tükürük numuneleri hazırlandı.
- Beş gün boyunca her gün yeni kalibrasyon oluşturularak her düzeyde üçer kez analiz yapıldı.
- Tükürük metodu Bias çalışmasında ek olarak 300 ng/mL konsantrasyonda olan tükürük numunesi akredite bir kurumda eş zamanlı analiz edilerek sonuçlar arasındaki Bias hesaplandı.
- Bias hesaplaması için aşağıdaki denklem kullanıldı.
- % Bias değeri $\pm\%20$ olmalıdır.

$$\%Bias = \frac{\text{Ortalama konsantrasyon} - \text{Bilinen konsantrasyon}}{\text{Bilinen konsantrasyon}} \times 100$$

- Hem gün içi hem günler arası ortalamalar alınarak hesaplamalar yapıldı. Hesaplamalarda aşağıdaki denklemler kullanıldı.
- %CV değerleri $<\%20$ olmalıdır.

$$\%CV \text{ Gün içi} = \frac{\text{Gün içi çalışmanın standart sapması}}{\text{Gün içi çalışmanın ortalaması}} \times 100$$

$$\%CV \text{ Günlerarası} = \frac{\text{Beş günlük çalışmanın standart sapması}}{\text{Beş günlük çalışmanın ortalaması}} \times 100$$

3.4.3.d. Sürüklenme

- Sürüklenme, yöntemde bir maddenin analizi sonrası ardındaki numuneye analit bulaşına denir.
- İdrar metodu için en yüksek düzey kalibratör (400 ng/mL) ardından ardışık 6 boş numune analiz için yüklendi.
- Tükürük metodu için en yüksek düzey kalibratör (800 ng/mL) ardından ardışık 6 boş numune analiz için cihaza analiz için yüklendi.
- Bu işlem üç gün tekrar edildi.
- 26 altı maddenin kromatogramdaki gelme zamanlarındaki sinyal ölçümleri yapıldı.
- Bu sinyallerin ortalama değeri en düşük kalibratör seviyesinin %10'undan az olmalıdır.

3.4.3.e. Girişim

- Analitik özgüllük, yöntemin kompleks bir karışım içinden belirli bir analitin diğer analitlerden etkilenmeden ölçülebilmesini ifade etmektedir. Analitik özgüllük değerlendirilmesi için girişim çalışmaları yapılır.
- Girişim çalışması için internal standart (IS) içermeyen bir boş numune (idrar/tükürük) analiz edildi.
- İnternal standart içermeyen boş numune (idrar/tükürük) ardından girişim yapabileceği düşünülen 10 maddeyi içeren numuneler analiz edildi. Bu numunelerde 26 madde için kromatogramlar değerlendirildi.
- Ayrıca internal standart (IS) eklenmeyen yüksek konsantrasyonlu numune (idrar/tükürük) enjeksiyonu sonucunda internal standartın kromatogramdaki gelme zamanında anlamlı sinyal alınmadığı gösterildi.
- İdrar metodu için girişim çalışması için sertralin, klozapin, parasetamol, efedrin, amlodipin, nikotin, klobozam, ketiapin, levetrisetam ve sitolopram kullanımı olan kişilerin idrar numuneleri analiz edilip 26 maddenin kromatogramdaki gelme zamanlarındaki sinyal ölçümleri yapıldı.
- Tükürük metodu için ağız bakım suyu, sakız çiğneme, limon suyu tüketimi ve çeşitli medikasyonların (ketiapin, parol, amlodipin, sitalopram, efedrin,

levetirasetam ve sertralin) tükürük numuneleri analiz edilip 26 maddenin kromatogramdaki gelme zamanlarındaki sinyal ölçümleri yapıldı.

3.4.3.f. İyonizasyon Etkileşimi

- LC-MS/MS analizlerinde birlikte elüe olan bileşikler, ölçüm yapılan analitin iyonizasyonu etkileyebilmektedir. İyonizasyon baskılanması veya artışının değerlendirilmesi önerilmektedir. Çalışmamızda iyonizasyonun baskılanmasını veya artışını kantitatif olarak değerlendirmenin mümkün olduğu post kolon ekstraksiyon metodu kullanıldı.
- Bu çalışma için, temiz standart pik alanı için Set 1 ve ekstraksiyon sonrası katkılı numuneler için Set 2 numuneleri hazırlanarak pik alanları karşılaştırıldı.
- İlaç ya da madde kullanımı olmayan sağlıklı on farklı bireyden 10 adet numune (idrar/tükürük) alındı. Bu numunelerde, çalışmaya dahil ettiğimiz maddeler için LC-MS/MS yöntemi ile Tablo 3.8’de belirtilen RT’lerde hiçbir pik vermediği doğrulanan numuneler “Boş Numune” olarak kullanıldı.
- Set 1: Metanol içinde bir düşük (50 ng/mL), bir yüksek (400 ng/mL) madde konsantrasyonu içeren temiz standart seti hazırlandı ve her biri altı kez analiz edildi.
- Set 2: Birbirinden farklı on boş numune (idrar/tükürük) ekstrakte edildi. Her biri ayrı ayrı enjekte edilerek analiz edildi. Ardından her biri bir düşük (50 ng/mL) ve bir yüksek (400 ng/mL) madde konsantrasyonları sağlanacak şekilde katkılılandırıldı.
- Her iki konsantrasyon için Set 1 ve Set 2 ortalama pik alanları hesaplandı.
- İdrar ve tükürük metodundaki her madde için aşağıdaki formül yardımıyla % baskılanma/artma hesaplandı.

$$\%Baskılanma\ veya\ Artma = \left(\frac{Set\ 2\ Alan\ Ortalaması}{Set\ 1\ Alan\ Ortalaması} - 1 \right) \times 100$$

- Ortalama $\leq \pm\%25$ baskılanma veya artma olmalıdır.

3.4.3.g. Dilüsyon Bütünlüğü

- Dilüsyon bütünlüğü, yüksek konsantrasyonda bir analitin bulunması durumunda analitik aralığa uygun şekilde sonuç alabilmek için yapılan dilüsyon işleminin analize etkisinin değerlendirilmesidir.
- Dilüsyon bütünlüğü çalışması için yüksek konsantrasyonda (1600 ng/mL) bir numune (idrar/tükürük) hazırlandı.
- Hazırlanan numune (idrar/tükürük) üç kez 1/1, üç kez 1/2 dilüsyonda, üç kez 1/5 dilüsyonda, üç kez 1/10 dilüsyonda analiz edildi.
- Her bir madde için tüm dilüsyonların %Bias ve % CV değerleri hesaplandı.
- Metodun dilüsyondan etkilenmediğini göstermek için Bias \pm %20 ve CV değerinin <%20 olduğu gösterilmelidir.

3.4.3.h. Dayanıklılık

- Dayanıklılık çalışması için işlenmiş numunede (ekstrakte edilmiş) analit düzeyleri zamana karşı değerlendirildi. Madde düzeyleri 400 ng/mL olarak hazırlanan numuneler (idrar/tükürük) ekstrakte edilerek oda sıcaklığında (22 °C) 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36. saat bekletildikten sonra analiz edildi.
- Maddelerin kromatogramdaki alanları değerlendirildi.
- Çalışma kaspamındaki tüm maddeler için ekstrakte edilen numunelerde oda sıcaklığında değişmeden kalabildiği süreler belirlenir.
- % Bias değeri \pm %20 olmalıdır.

3.4.4. İdrar Numunelerinin Bütünlük Analizleri

3.4.4.a. Kreatinin Analizi

İdrar numunelerinin bütünlük testlerinden olan idrar kreatinin analizi için Beckman Coulter kreatinin kiti (OSR6178) ile Beckman Coulter AU680 (ABD) cihazı kullanıldı. Kit kreatinin analizi için kit kinetik renk testini (Jaffe yöntemi) kullanmaktadır.

Kreatinin analizi için Beckman Coulter idrar kalibratörü (Ref:B64606; Lot: 1032; 169 mg/dL) kullanılarak kalibrasyon yapıldı. İç kalite kontrol için iki düzey Liquichek idrar kontrolleri (L1 Ref:387; Lot:88161;54,5 mg/dL) ve (L2 Ref:398; Lot:88162; 127 mg/dL) kullanıldı.

3.4.4.b. pH, Dansite ve Nitrit Analizi

İdrar numunelerinin bütünlük testlerinden olan pH, dansite ve nitrit ölçümleri iChem Velocity idrar sribi (Ref:800-7204; Lot: 7204607M) kullanılarak iChem Velocity 2000 (Beckman Coulter Inc.; ABD) cihazında analiz yapıldı. Analiz için Bio-Rad qUAntify Plus kontrol kullanıldı

pH ölçümü için çift indikatör kullanılan bir sistemdir. İndikatörler metil kırmızısı ve bromotimol mavisi turuncudan yeşil ve maviye belirgin bir renk değişikliği oluşturur. pH 5-9 aralığında ölçüm yapılmaktadır.

Dansite ölçümü idrardaki iyonik çözünenler polielektrolitlerden protonların salınmasına yol açar. Protonlar serbestleştikçe pH düşerek bromotimol mavisi, yeşil ve turuncu arası renklere döner. Renk dönüşümleri ile dansite eşleştirilerek 1001-1035 aralığında dansite değeri belirlenir.

Nitrit ölçümü, nitritin bir aromatik aminle diazotasyon reaksiyonu ve diazonyum tuzu oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon alanında diazonyum tuzunun azo eşleşmesi ile devam eder. Azo boyası beyazdan pembeye doğru bir renk değişimi ile -, +, ++, +++ olarak nitrit değerlendirilir.

3.4.5. İdrar Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analiz

İdrar numuneleri için validasyonu tamamlanan LC-MS/MS yöntemi ile 76 hasta numunesi analiz edildi. Çalışmaya kadar -80 °C’de muhafaza edilen idrar numunelerinden birer porsiyon alınarak oda sıcaklığına gelmesi için 20 dk beklendi. Oda sıcaklığına gelen numuneler 60 saniye vortekslenerek homojenize edildi. Vial içine reaktif A’dan 400 µL ve üzerine 100 µL idrar numunesi eklendi. Vial kapağı kapatılarak karışım 30 saniye vortekslendi. Vialler numune yükleyiciye yerleştirildi, 20 µl enjeksiyon volümü ile MRM pozitif iyon modunda analizler gerçekleştirildi. Eş zamanlı hazırlanan kalibratör seti ve tüm hasta numuneleri ardışık olarak aynı çalışmada analiz edildi. Çalışma sonuçları LabSolutions Version 5.60 SP2 (2008-20013 Shimadzu Corporation) yazılımı ile değerlendirildi.

İdrar numunelerinde morfin maddesinin kantitatif sonucunu değerlendirmek amacı ile glukronidaz çalışması yapıldı. İdrar örneklerinden 500 µL bir ependorf içine alınarak glukronidaz çözeltisinden 100 µL eklendi. 60 °C’ de bir saat inkübasyona bırakılıp sonrasında oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Hidrolizlenmiş numuneden 100 µL ve 500 µL Reagent A (IS) ile karıştırılıp 30 saniye vortekslendi. Bu işlemin sonunda numuneler analiz edildi.

3.4.6. İdrar Numunelerinin İmmünolojik Yöntem ile Analizi

İdrar numunelerinin immünolojik yöntem ile alınan sonuçlarının karşılaştırılması amacı ile Microgenics Corporation (Dağıtıcı: Abbott Laboratories Inc; ABD) firmasının opiat, ekstazi ve amfetamin kitleri ile ARCHITECT c8000 klinik kimya analizöründe (Abbott; ABD) analiz edilip sonuçları kaydedildi.

Opiat (MULTIGENT Opiates), amfetamin/metamfetamin (MULTIGENT Amphetamine/Metamphetamine) ve ekstazi (MULTIGENT Ecstasy) analizi için kullanılan kitler homojenik enzim immünolojik yöntemlerdir. İdrarda aranan madde için geliştirilen monoklonal antikorlar kullanılır. Analiz, spesifik antikor epitopları için bir enzim işaretli madde ve idrardaki maddenin rekabetine dayanır. Madde numunede yoksa, spesifik antikor glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) etiketli maddeye bağlanır ve enzim aktivitesi engellenmektedir. G6PDH enzim aktivitesi nikotinamid

adenin dinükleotid (NAD)'in NADH'ya dönüşmesini spektrofotometrik olarak 340/412 nm'de ölçerek belirler.

Opiat analizi için kalitatif uygulama ile 5 düzey kalibratör (0, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 ng/mL Morfin) kullanılarak 6.000 ng/mL'ye kadar kalibrasyon grafiği ve 2.000 ng/mL eşik değer kullanıldı. Bu yöntem için uygun olan kalibratör seti (3L43-10 MULTIGENT DOA MC) ile iç kalite kontrolleri gerçekleştirildi.

Amfetamin/metamfetamin analizi için kalitatif uygulama ile 5 düzey kalibratör (0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 ng/mL d-Metamfetamin) kullanılarak 2.000 ng/mL'ye kadar kalibrasyon grafiği ve 500 ng/mL eşik değer kullanıldı. Bu yöntem için uygun olan kalibratör seti (4P51-10 MULTIGENT DOA MC) ile iç kalite kontrolleri gerçekleştirildi.

Ekstazi analizi için kalitatif uygulama ile 5 düzey kalibratör (0, 250, 500, 750, 1.000 ng/mL MDMA) kullanılarak 1.000 ng/mL'ye kadar kalibrasyon grafiği ve 500 ng/mL eşik değer kullanıldı. Bu yöntem için uygun olan kalibratör seti (3L42-11 MULTIGENT DOA MC) ile iç kalite kontrolleri gerçekleştirildi.

3.4.7. Tükürük Numunelerinin LS-MS/MS Yöntemi ile Analizi

Tükürük numuneleri için validasyonu tamamlanan LC-MS/MS yöntemi ile 76 hasta numunesi analiz edildi. Çalışmaya kadar -80 °C'de muhafaza edilen tükürük numunelerinden birer porsiyon alınarak oda sıcaklığına gelmesi için 20 dk beklendi. Oda sıcaklığına gelen numuneler 60 saniye vortekslenerek homojenize edildi. 300 µl tükürük numunesi ependorfa alındı ve üzerine 900 µL metanol eklenerek protein ekstraksiyonu yapıldı. Çözelti 30 saniye vortekslendi. 10 dakika 12.000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz alınarak tükürük numuneleri hazır hale getirildi. Temiz bir vial içine ekstraksiyonu yapılmış numunenin üst fazından 100 µL alınıp üzerlerine 100 µL internal standart için dilüsyon solüsyonu eklenip vial kapağı kapatılarak karışım 10 saniye vortekslendi. Vialler numune yükleyiciye yerleştirildi, 20 µL enjeksiyon volümü ile MRM pozitif iyon modunda analizler gerçekleştirildi. Eş zamanlı hazırlanan kalibratör seti ve tüm hasta numuneleri ardışık olarak aynı çalışmada analiz edildi. Çalışma sonuçları LabSolutions Version 5.60 SP2 (2008-20013 Shimadzu Corporation) yazılımı ile değerlendirildi.

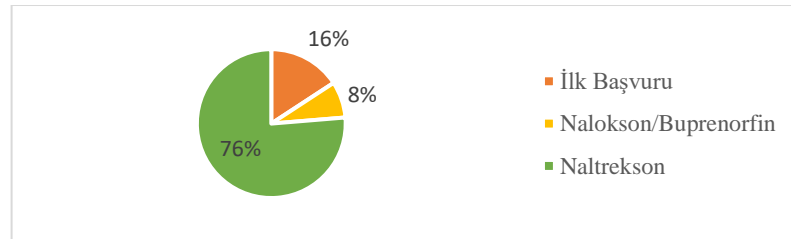
4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hastalar

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen bu çalışmaya katılmayı kabul eden hastalarına “Dahil edilme” ve “Dahil edilmeme” kriterleri uygulanarak toplam 76 hastadan eş zamanlı idrar ve tükürük örnekleri toplandı. Bu hastalardan 70'i erkek 6'sı kadın olup, 76 hastanın yaş ortalaması ise 28 yıl bulundu. 52 erkek hasta ve 6 kadın hasta naltrekson tedavisi; 6 erkek hasta nalokson/buprenorfin tedavisi; 12 erkek hasta da tedaviye ilk başvuru hastasıydı (Şekil 4.1). Bu hastaların demografik verileri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların demografik bilgileri

Tanı	Kadın	Yaş	Erkek	Yaş	Toplam	Yaş
İlk Başvuru	-		12	30 (26-39)	12	30 (26-39)
Nalokson/Buprenorfin	-		6	27 (23-39)	6	27 (23-39)
Naltrekson	6	27 (23-33)	52	28 (21-41)	58	28 (21-41)
Toplam	6	27 (23-33)	70	28 (21-41)	76	28 (21-41)



Şekil 4.1. Hastaların demografik dağılım grafiği

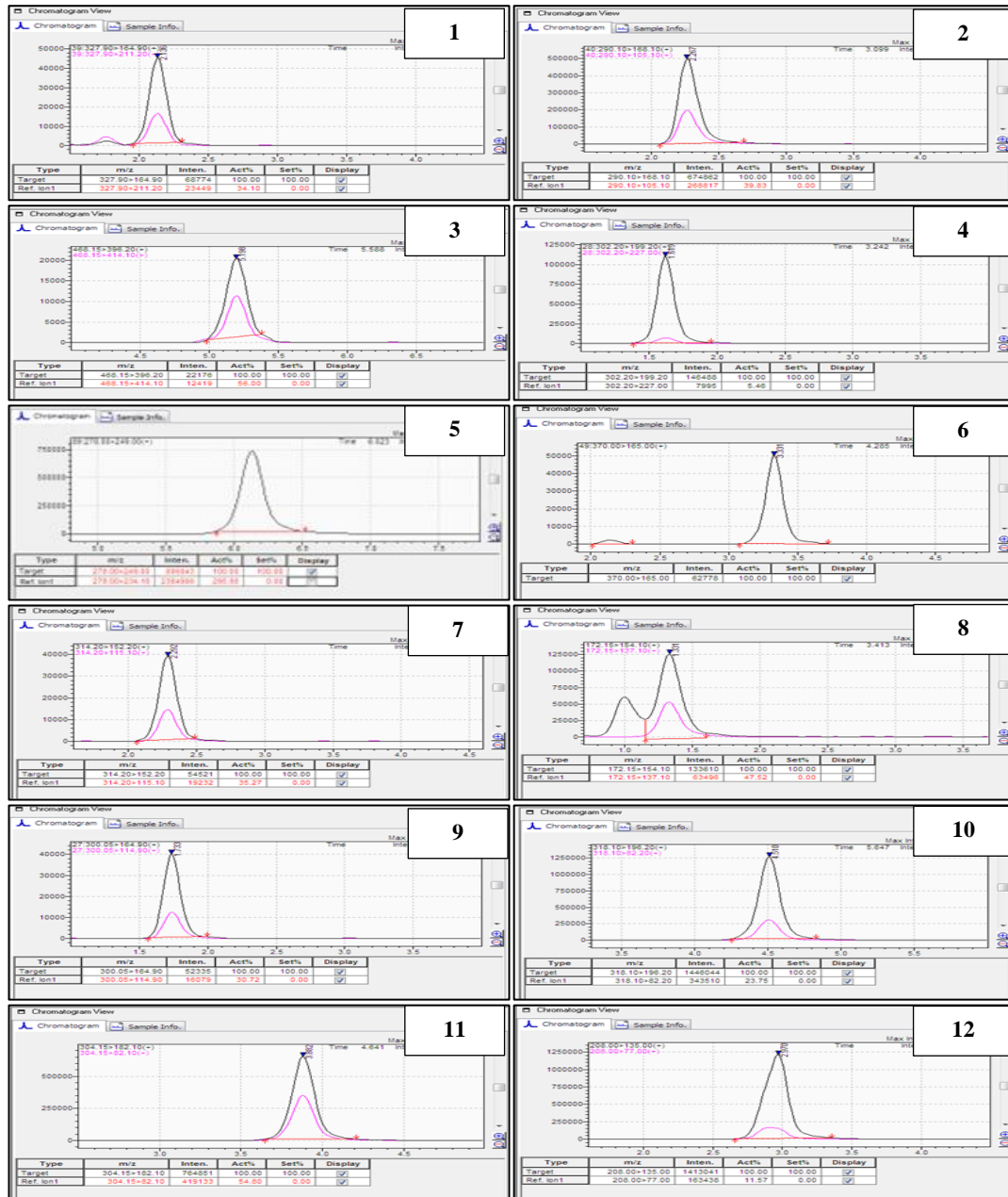
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından Opioid Kullanım Bozukluğu tedavisine başvuran ve OKB tedavisinde takip edilen hasta grubunda çalışmayı kabul eden hastalar şu tedavileri almaktaydı.

Nalokson/Buprenorfin tedavisi alan hastalar Suboxone (8mg) tablet kullanan hastalara günlük 2x8mg dozda verilmekteydi.

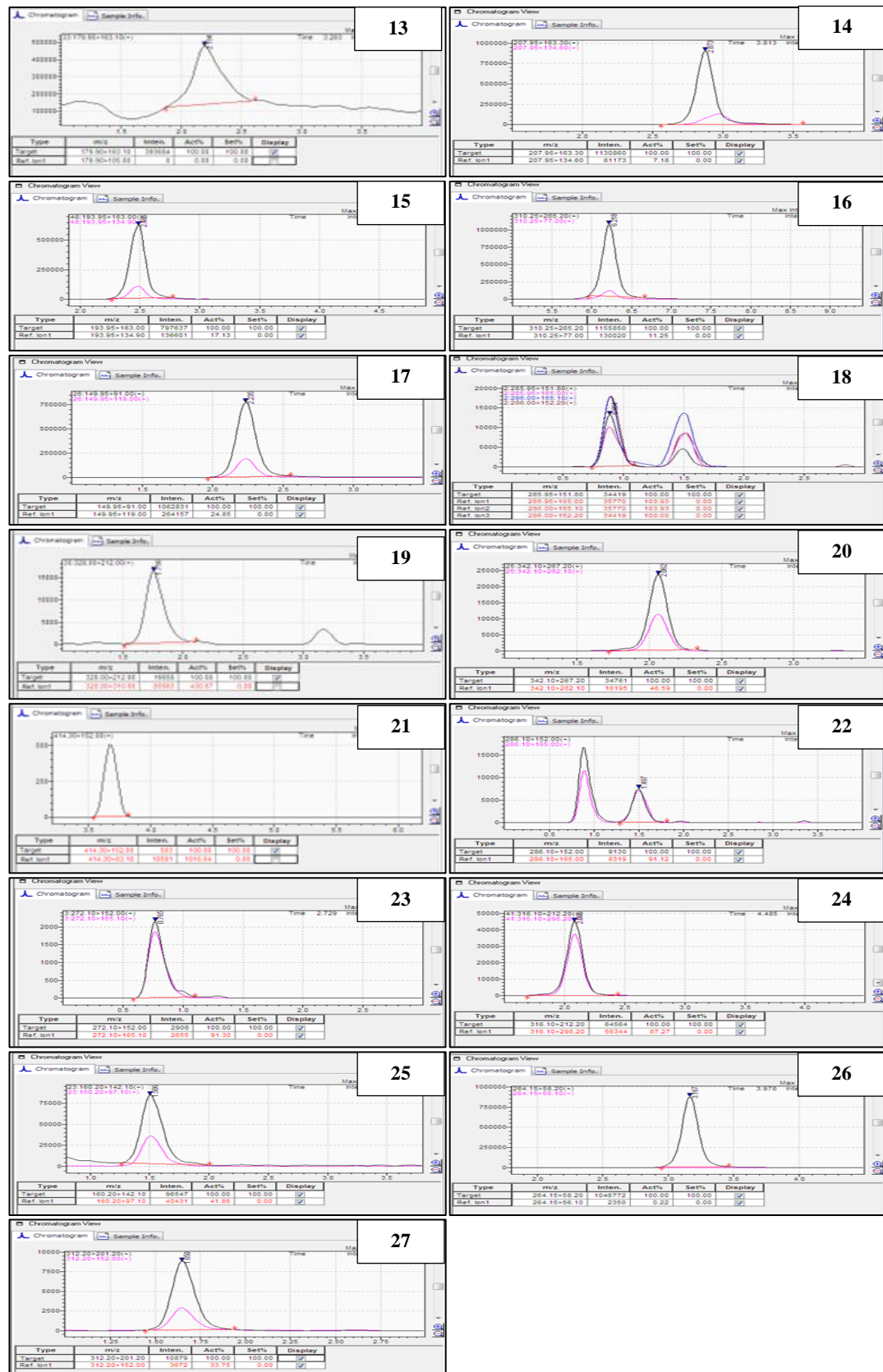
Naltrekson tedavisi alan hastalara Naltrekson Pellet ve ProdetoXon adlı 1.000 mg'lık implant 3 ay süreler için uygulanmaktaydı. Ülkemizde 765 mg, 1.000 mg ve 1.865 mg'lık cilt altı uygulama için pelet formunda 3 ay süre ile etkili naltrekson implantları bulunmaktadır.

4.2. İdrar Numuneleri İçin LC-MS/MS Yöntemi Validasyonu

İdrar numuneleri için geliştirilen LC-MS/MS yöntemi için belirlenen optimum koşullarda (Tablo 3.7) idrar metodu için hazırlanan standartlar K0 (0 ng/mL), K1 (50 ng/mL), K2 (100 ng/mL), K3 (200 ng/mL) ve K4 (400 ng/mL) çalışıldı. En yüksek standart (K4) için alınan kromatogramlar Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. İdrar LC-MS/MS yöntemi ile K4 kromatogram görüntüleri. 1. 6-MAM; 2. BEG; 3. Buprenorfin; 4. Dihidrokodein; 5. EDDP; 6. Eroin; 7. Etilmorfin; 8. Gabapentin; 9. Kodein; 10. Kokaetilen; 11. Kokain; 12. MBDB



Şekil 4.2. (Devamı) 13. MDA; 14. MDEA; 15. MDMA; 16. Metadon; 17. Metamfetamin; 18. Morfin; 19. Nalokson; 20. Naltrekson; 21. Norbuprenorfin; 22. Norkodein; 23. Normorfin; 24. Oksikodon; 25. Pregabalin; 26. Tramadol; 27. Nalorfin

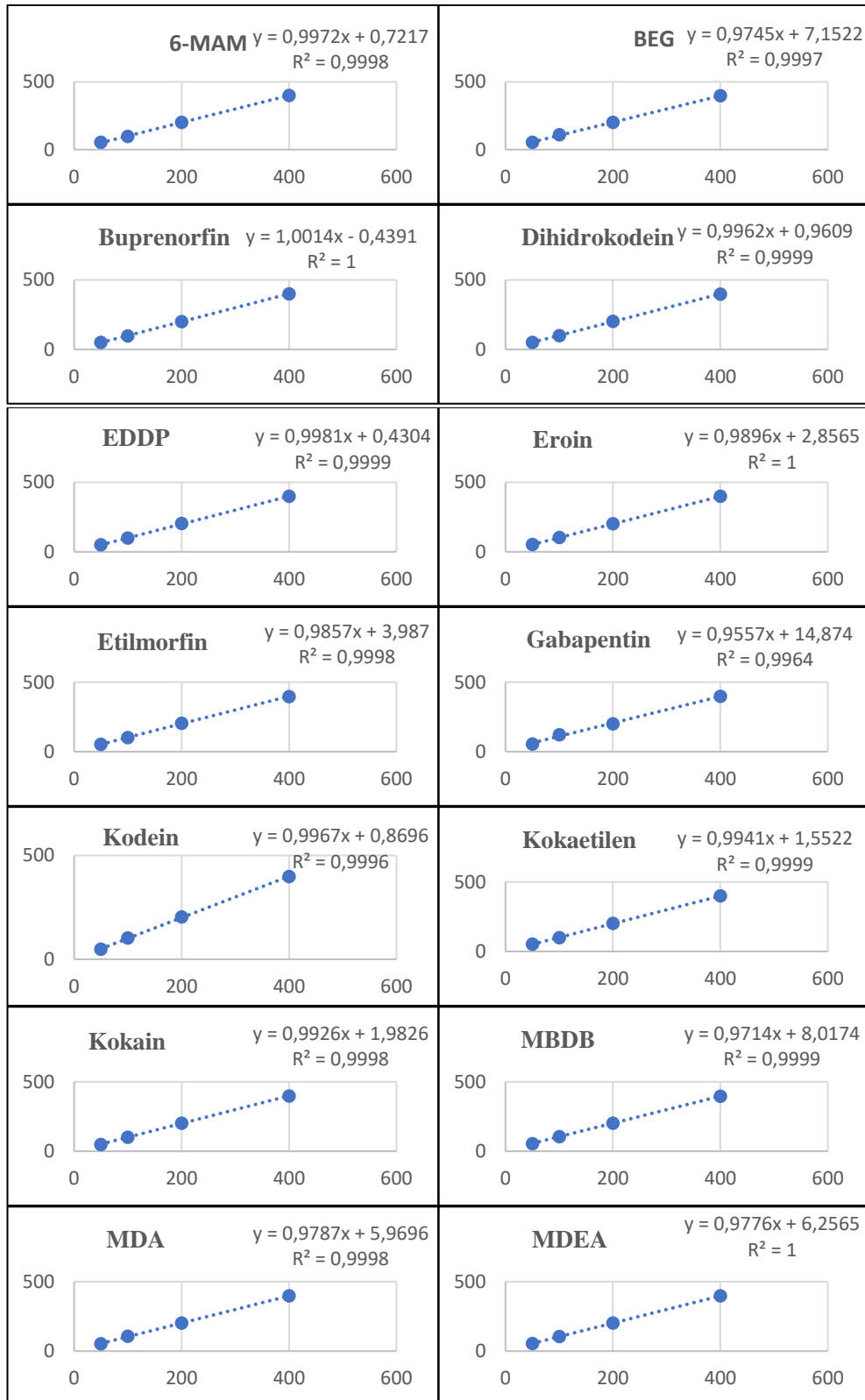
4.2.1. Analitik Aralık ve Doğruluk

K1 (50 ng/mL), K2 (100 ng/mL), K3 (200 ng/mL) ve K4 (400 ng/mL) standartlarının ardışık beş gün çalışılması ile elde edilen verilerden regresyon ve korelasyon değerlerinin ortalamaları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Her bir analiz için elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiklerinin regresyon sabitleri $\geq 0,990$ bulundu.

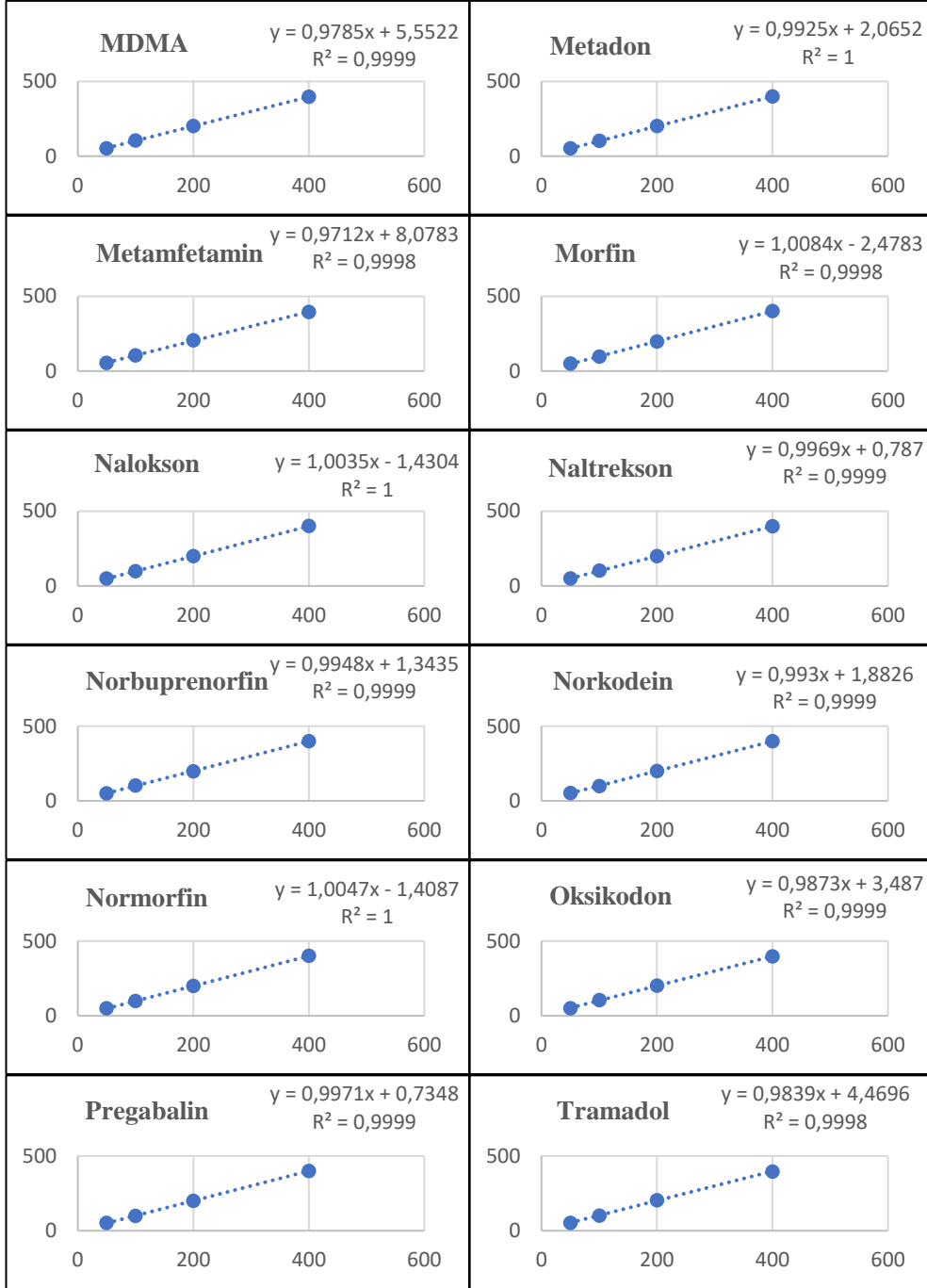
Tablo 4.2. İdrar LC-MS/MS yönteminde analitik aralık ve doğrusallık çalışması

Madde	R ²	r	Madde	R ²	r
6-MAM	0,99969304	0,99984654	MDEA	0,99985102	0,9999255
BEG	0,99961736	0,99980866	MDMA	0,99974702	0,99987348
Buprenorfin	0,99812418	0,99973558	Metadon	0,99978166	0,9998908
Dihidrokodein	0,99957248	0,99978618	Metamfetamin	0,99769522	0,9960576
EDDP	0,99941816	0,99970902	Morfin	0,99904112	0,99952038
Eroin	0,99977806	0,99988902	Nalokson	0,9997908	0,9980954
Etilmorfin	0,99928848	0,9996442	Naltrekson	0,99907108	0,9995354
Gabapentin	0,99961306	0,9998065	Norbuprenorfin	0,99893608	0,99946786
Kodein	0,99705696	0,99942826	Norkodein	0,9992165	0,99817498
Kokaetilen	0,99970294	0,999950401	Normorfin	0,999758406	0,99987948
Kokain	0,99965408	0,99982704	Oksikodon	0,99900714	0,99950342
MBDB	0,99977448	0,99988724	Pregabalin	0,99920248	0,99960112
MDA	0,9989168	0,99945816	Tramadol	0,99964102	0,9998205

Analitik aralık ve doğrusallık çalışmaları için K1-K4 standartlarının ardışık beş gün çalışılması ile elde edilen verilerin ortalamaları ile çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İdrar LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri



Şekil 4.3. (Devamı) İdrar LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri

4.2.2. Saptama ve Kantitasyon Sınırı

Analitik aralık ve doğrusallık için yapılan çalışmada elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğim ve y kesim noktası verileri kullanılarak çalıştığımız yirmi altı madde için LOD değerleri hesaplandı (Tablo 4.3.). Elde edilen LOD değerlerinin hepsi en düşük kalibratör değeri olan 50 ng/mL'nin altında bulundu. Tüm maddeler için en

düşük kalibratör (50 ng/mL) düzeyinde Bias \pm %20 ve %CV değerlerinin <%20 olduğu belirlenerek LOQ değeri olarak 50 ng/mL olarak alındı.

Tablo 4.3. İdrar LC-MS/MS LOD değerleri

6-MAM	Eğim	Y kesim	BEG	Eğim	Y kesim	Buprenorfin	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0226	6,4391	Run 1	0,9765	6,6087	Run 1	1,0079	2,2522
Run2	0,9809	5,4087	Run2	0,9628	10,478	Run2	0,9854	4,0826
Run 3	0,9914	2,3826	Run 3	0,9835	4,6478	Run 3	0,9925	2,1087
Run 4	0,9953	1,287	Run 4	0,977	6,4609	Run 4	1,0056	1,6435
Run 5	0,9957	1,1522	Run 5	0,9724	7,7783	Run 5	1,0157	4,4913
Ortalama	0,9972	2,7782667	Ortalama	0,9744	7,19474	Ortalama	1,0014	2,91566
STD Sapma	0,0154	2,4393466	STD Sapma	0,0076	2,1499538	STD Sapma	0,011	1,2800532
		8,0726087			7,2809487			4,2181858
LOD		8	LOD		7,2	LOD		4,2
Dihidrokodein	Eğim	Y kesim	EDDP	Eğim	Y kesim	Eroin	Eğim	Y kesim
Run 1	1,007	2,0391	Run 1	1,0071	2,0522	Run 1	0,972	7,8783
Run2	0,9855	4,0348	Run2	0,9789	5,9304	Run2	0,985	4,2174
Run 3	0,9815	5,213	Run 3	0,9926	2,0391	Run 3	1,0089	2,5478
Run 4	0,9965	0,9087	Run 4	0,9998	0,0043	Run 4	1,0052	1,5
Run 5	1,0107	3,1087	Run 5	1,0118	3,3957	Run 5	0,9776	6,3
Ortalama	0,9962	3,06086	Ortalama	0,998	2,68434	Ortalama	0,9897	4,4887
STD Sapma	0,0128	1,5005559	STD Sapma	0,0129	2,1818277	STD Sapma	0,0165	2,6240817
		4,9705237			7,2141712			8,7492369
LOD		4,9	LOD		7,2	LOD		8,7
Etilmorfin	Eğim	Y kesim	Gabapentin	Eğim	Y kesim	Kodein	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9753	6,9739	Run 1	0,9916	2,3435	Run 1	0,9961	1,087
Run2	0,973	7,5826	Run2	0,974	7,3435	Run2	0,9973	0,7304
Run 3	0,9909	2,5087	Run 3	0,9833	3,3087	Run 3	0,9891	3,013
Run 4	0,9871	3,613	Run 4	0,9791	6,1348	Run 4	1,0058	1,7174
Run 5	1,0015	0,4652	Run 5	0,973	7,5609	Run 5	0,9953	1,2652
Ortalama	0,9856	4,22868	Ortalama	0,9802	5,33828	Ortalama	0,9967	1,5626
STD Sapma	0,0117	3,0119009	STD Sapma	0,0076	2,3813491	STD Sapma	0,006	0,8852714
		10,084899			8,0171923			2,9310095
LOD		10	LOD		8	LOD		2,9
Kokaetilen	Eğim	Y kesim	Kokain	Eğim	Y kesim	MBDB	Eğim	Y kesim
Run 1	0,998	0,3	Run 1	0,9903	2,6696	Run 1	0,9769	6,487
Run2	0,9754	6,8826	Run2	0,9901	2,787	Run2	0,9665	9,4522
Run 3	1,0055	1,5739	Run 3	0,9905	2,6304	Run 3	0,977	6,4957
Run 4	0,9874	3,5174	Run 4	0,9989	0,2652	Run 4	0,9575	11,97
Run 5	1,0037	1,0913	Run 5	0,9928	1,9783	Run 5	0,9788	5,9435
Ortalama	0,994	2,67304	Ortalama	0,9925	2,0661	Ortalama	0,9713	8,06968
STD Sapma	0,0126	2,6350839	STD Sapma	0,0037	1,0551414	STD Sapma	0,0091	2,5800576
		8,7482664			3,5082079			8,7654065
LOD		8,7	LOD		3,5	LOD		8,7
MDA	Eğim	Y kesim	MDEA	Eğim	Y kesim	MDMA	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9775	6,313	Run 1	0,9917	2,287	Run 1	0,9819	5,0913
Run2	0,9971	0,7696	Run2	0,9623	10,613	Run2	0,9796	5,7565
Run 3	0,9792	5,8565	Run 3	0,9849	4,2304	Run 3	0,9942	1,5391
Run 4	0,9816	5,1565	Run 4	0,9741	7,2522	Run 4	0,9586	9,5609
Run 5	0,9578	11,939	Run 5	0,9741	7,2522	Run 5	0,9792	5,8435
Ortalama	0,9786	6,00692	Ortalama	0,9774	6,32696	Ortalama	0,9787	5,55826
STD Sapma	0,014	3,9830459	STD Sapma	0,0113	3,1937093	STD Sapma	0,0128	2,8510299
		13,430936			10,782715			9,6131591
LOD		13,4	LOD		10,7	LOD		9,6

Tablo 4.3. (Devamı) İdrar LC-MS/MS LOD değerleri

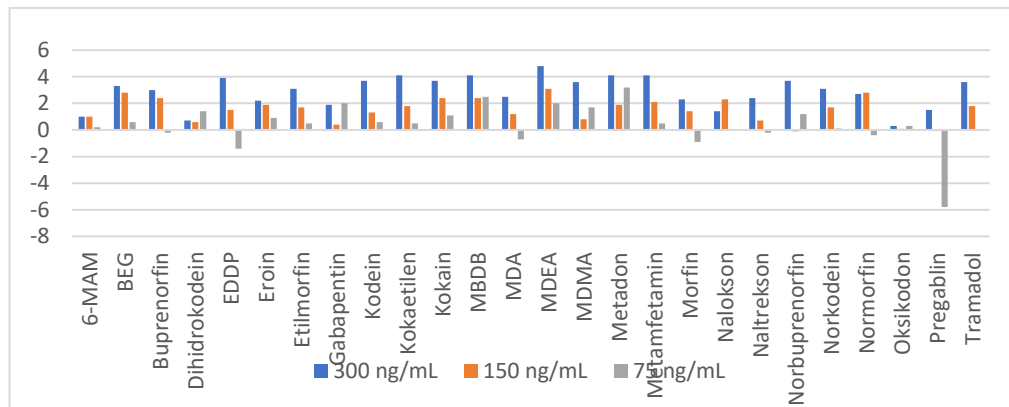
Metamfetamin	Eğim	Y kesim	Metadon	Eğim	Y kesim	Morfin	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9865	3,8087	Run 1	0,981	5,3043	Run 1	1,0244	7
Run2	0,9611	10,948	Run2	0,9839	4,5478	Run2	1,0018	0,5609
Run 3	0,972	7,8783	Run 3	1,0042	1,2609	Run 3	1,0109	3,113
Run 4	0,9612	10,943	Run 4	1,02	5,7217	Run 4	0,9991	0,1913
Run 5	0,9753	6,9652	Run 5	0,9721	7,887	Run 5	1,0054	1,5826
Ortalama	0,9712	8,10864	Ortalama	0,9922	4,94434	Ortalama	1,0083	2,48956
STD Sapma	0,0106	2,9977307	STD Sapma	0,0195	2,4040633	STD Sapma	0,01	2,7639216
		10,185654			7,9954537			9,0456813
LOD		10	LOD		7	LOD		9
Nalokson	Eğim	Y kesim	Naltrekson	Eğim	Y kesim	Norbuprenorfin	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0387	12,787	Run 1	1,0036	1,0783	Run 1	0,9994	0,1391
Run2	1,0081	2,3261	Run2	0,9965	0,9304	Run2	0,9937	1,7087
Run 3	1,0127	3,687	Run 3	0,9809	5,3652	Run 3	0,9989	0,287
Run 4	0,9846	4,2957	Run 4	0,9894	2,9957	Run 4	0,9876	3,4
Run 5	0,9726	7,7174	Run 5	1,014	4	Run 5	0,995	1,3609
Ortalama	1,0033	6,16264	Ortalama	0,9969	2,87392	Ortalama	0,9949	1,37914
STD Sapma	0,0258	4,2021638	STD Sapma	0,0127	1,9033447	STD Sapma	0,0048	1,315607
		13,820978			6,3006956			4,3636704
LOD		13,8	LOD		6,3	LOD		4,3
Norkodein	Eğim	Y kesim	Normorfin	Eğim	Y kesim	Oksikodon	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0027	0,7739	Run 1	1,0086	2,5174	Run 1	0,9887	3,1348
Run2	0,9905	2,6522	Run2	1,0048	1,3783	Run2	0,9885	4,0348
Run 3	0,988	3,3217	Run 3	0,9994	0,1043	Run 3	0,9783	6,0913
Run 4	0,9947	1,413	Run 4	1,0122	3,5174	Run 4	0,9815	5,2261
Run 5	0,9887	3,1348	Run 5	0,998	0,5435	Run 5	1,0029	0,8913
Ortalama	0,9929	2,25912	Ortalama	1,0046	1,61218	Ortalama	0,988	3,87566
STD Sapma	0,0061	1,1149216	STD Sapma	0,006	1,4071039	STD Sapma	0,0095	2,0132904
		3,7054762			4,6221808			6,724689
LOD		3,7	LOD		4,6	LOD		6,7
Pregabalin	Eğim	Y kesim	Tramadol	Eğim	Y kesim			
Run 1	0,9944	1,5435	Run 1	0,9685	8,887			
Run2	0,9923	2,1348	Run2	0,9887	2,1348			
Run 3	0,9873	3,5304	Run 3	0,985	4,2174			
Run 4	0,9987	0,3348	Run 4	0,9799	5,613			
Run 5	1,0127	3,6522	Run 5	0,9974	0,7043			
Ortalama	0,9971	2,23914	Ortalama	0,9839	4,3113			
STD Sapma	0,0096	1,3951168	STD Sapma	0,0107	3,1775727			
		4,6173682			10,657577			
LOD		4,6	LOD		10,6			

4.2.3. Bias ve Kesinlik

Beş günlük çalışmaların ortalamalarıyla elde ettiğimiz sonuçlardan maddelerimizin % Bias değerleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Tüm maddeler için % Bias değerleri -5,1 ile 4,1 arasında ve %Bias değerlerinin ± 20 içinde olduğu bulundu.

Tablo 4.4 İdrar LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri

Madde	300 ng/mL % Bias	150 ng/mL % Bias	75 ng/mL % Bias
6-MAM	1,0	1,0	0,2
BEG	3,3	2,8	0,6
Buprenorfin	3,0	2,4	-0,2
Dihidrokodein	0,7	0,6	1,4
EDDP	3,9	1,5	-1,4
Eroin	2,2	1,9	0,9
Etilmorfin	3,1	1,7	0,5
Gabapentin	1,9	0,4	2,0
Kodein	3,7	1,3	0,6
Kokaetilen	4,1	1,8	0,5
Kokain	3,7	2,4	1,1
MBDB	4,1	2,4	2,5
MDA	2,5	1,2	-0,7
MDEA	4,8	3,1	2,0
MDMA	3,6	0,8	1,7
Metadon	4,1	1,9	3,2
Metamfetamin	4,1	2,1	0,5
Morfin	2,3	1,4	-0,9
Nalokson	1,4	2,3	-0,04
Naltrekson	2,4	0,7	-0,2
Norbuprenorfin	3,7	-0,1	1,2
Norkodein	3,1	1,7	0,1
Normorfin	2,7	2,8	-0,4
Oksikodon	0,3	0,08	0,3
Pregablin	1,5	-0,09	-5,8
Tramadol	3,6	1,8	-0,03

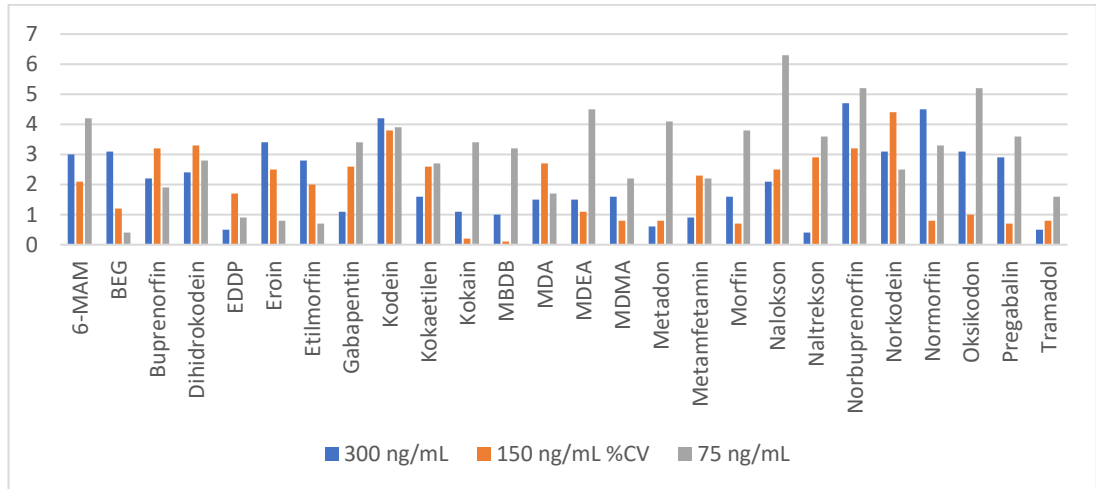


Şekil 4.4. İdrar LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri grafiği

Kesinlik çalışması için gün içi (Tablo 4.5. ve Şekil 4.5.) ve günler arası (Tablo 4.6. ve Şekil 4.6.) çalışmalarında %CV hesaplandı. Tüm maddeler için %CV değerleri gün içi %0,1 ile %6,3 arasında; günler arası %1,9 ile %8,8 arasında ve %20'nin altında bulundu.

Tablo 4.5. İdrar LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri

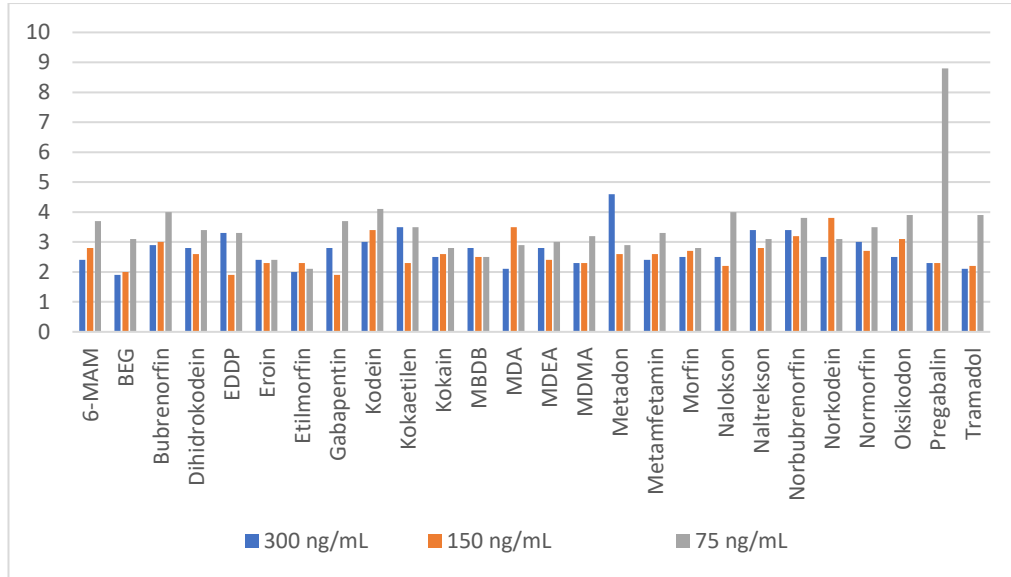
Madde	300 ng/mL	150 ng/mL	75 ng/mL
	%CV	%CV	%CV
6-MAM	3,0	2,1	4,2
BEG	3,1	1,2	0,4
Buprenorfin	2,2	3,2	1,9
Dihidrokodein	2,4	3,3	2,8
EDDP	0,5	1,7	0,9
Eroin	3,4	2,5	0,8
Etilmorfin	2,8	2,0	0,7
Gabapentin	1,1	2,6	3,4
Kodein	4,2	3,8	3,9
Kokaetilen	1,6	2,6	2,7
Kokain	1,1	0,2	3,4
MBDB	1,0	0,1	3,2
MDA	1,5	2,7	1,7
MDEA	1,5	1,1	4,5
MDMA	1,6	0,8	2,2
Metadon	0,6	0,8	4,1
Metamfetamin	0,9	2,3	2,2
Morfin	1,6	0,7	3,8
Nalokson	2,1	2,5	6,3
Naltrekson	0,4	2,9	3,6
Norbuprenorfin	4,7	3,2	5,2
Norkodein	3,1	4,4	2,5
Normorfin	4,5	0,8	3,3
Oksikodon	3,1	1,0	5,2
Pregabalin	2,9	0,7	3,6
Tramadol	0,5	0,8	1,6



Şekil 4.5. İdrar LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri grafiği

Tablo 4.6 İdrar LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri

Madde	300 ng/mL	150 ng/mL	75 ng/mL
	%CV	%CV	%CV
6-MAM	2,4	2,8	3,7
BEG	1,9	2,0	3,1
Bubrenorfin	2,9	3,0	4,0
Dihidrokodein	2,8	2,6	3,4
EDDP	3,3	1,9	3,3
Eroin	2,4	2,3	2,4
Etilmorfin	2,0	2,3	2,1
Gabapentin	2,8	1,9	3,7
Kodein	3,0	3,4	4,1
Kokaetilen	3,5	2,3	3,5
Kokain	2,5	2,6	2,8
MBDB	2,8	2,5	2,5
MDA	2,1	3,5	2,9
MDEA	2,8	2,4	3,0
MDMA	2,3	2,3	3,2
Metadon	4,6	2,6	2,9
Metamfetamin	2,4	2,6	3,3
Morfin	2,5	2,7	2,8
Nalokson	2,5	2,2	4,0
Naltrekson	3,4	2,8	3,1
Norbubrenorfin	3,4	3,2	3,8
Norkodein	2,5	3,8	3,1
Normorfin	3,0	2,7	3,5
Oksikodon	2,5	3,1	3,9
Pregabalin	2,3	2,3	8,8
Tramadol	2,1	2,2	3,9



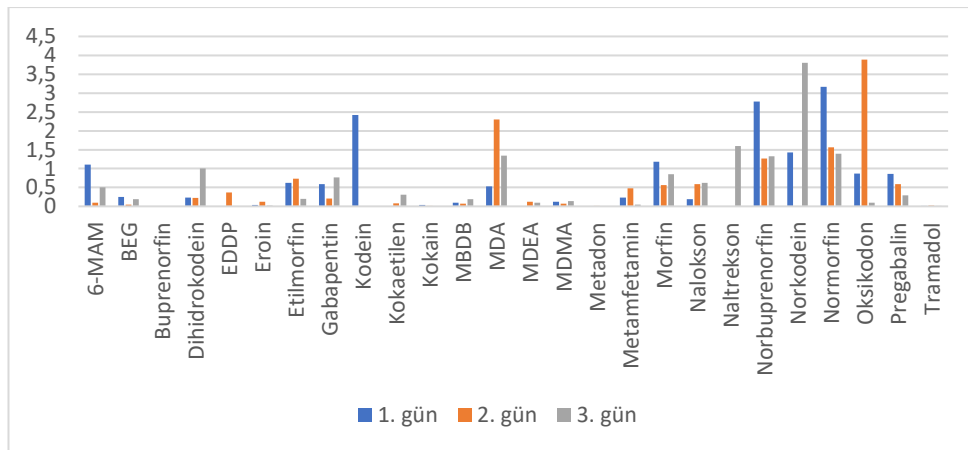
Şekil 4.6. İdrar LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri

4.2.4. Sürüklenme

En yüksek kalibratör K4 (400 ng/mL) sonrası üç gün ardarda verdiğimiz boş numunelerden aldığımız sinyallerin konsantrasyonları Tablo 4.7. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Alınan okumaların en düşük kalibratör düzeyi olan 50 ng/mL'nin %10 değerinin altında olduğu bulundu.

Tablo 4.7 İdrar LC-MS/MS sürüklenme çalışması

K4 sonrası alınan sinyal için konsantrasyon (ng/mL)			
Madde	1. gün	2. gün	3. gün
6-MAM	1,11	0,1	0,5
BEG	0,25	0,05	0,19
Buprenorfin	0	0	0
Dihidrokodein	0,23	0,22	1
EDDP	0	0,37	0
Eroin	0,04	0,12	0,02
Etilmorfin	0,62	0,73	0,2
Gabapentin	0,59	0,21	0,77
Kodein	2,42	0	0
Kokaetilen	0	0,08	0,31
Kokain	0,04	0,01	0
MBDB	0,1	0,07	0,19
MDA	0,53	2,3	1,34
MDEA	0	0,12	0,1
MDMA	0,12	0,07	0,14
Metadon	0	0,01	0
Metamfetamin	0,23	0,48	0,05
Morfin	1,18	0,56	0,85
Nalokson	0,19	0,59	0,62
Naltrekson	0	0	1,6
Norbuprenorfin	2,78	1,27	1,33
Norkodein	1,43	0	3,8
Normorfin	3,17	1,56	1,39
Oksikodon	0,87	3,89	0,1
Pregabalin	0,86	0,59	0,29
Tramadol	0,01	0,02	0,01



Şekil 4.7. İdrar LC-MS/MS sürüklenme grafiği

4.2.5. Girişim

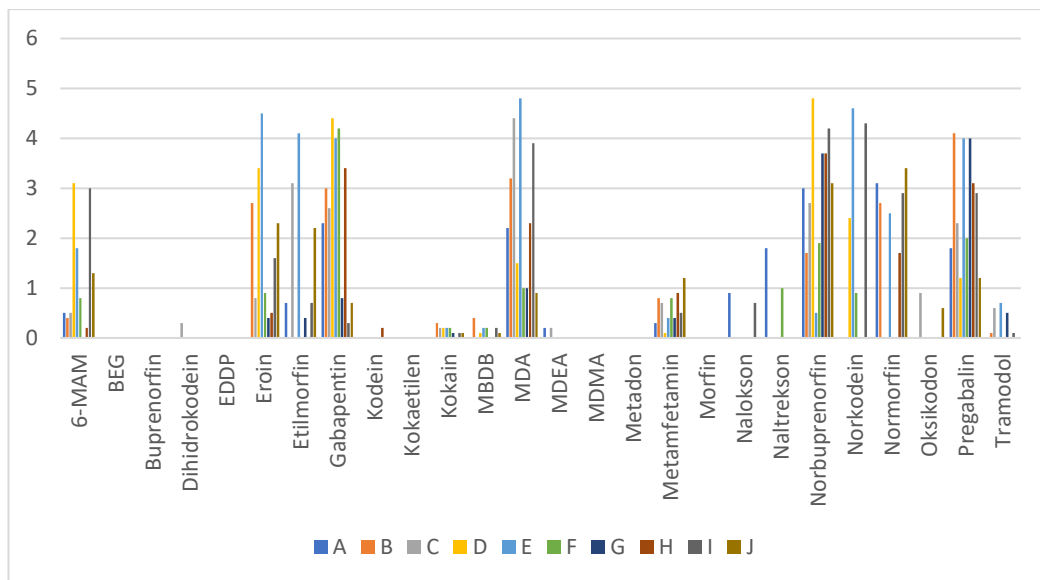
İdrar girişim çalışmasında matriksin madde analizlerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile internal standart içermeyen üç farklı “boş idrar” numunesi analiz edildi. İnternal standart için belirlenen pik tespit zamanında (RT) sinyal alınmadığı gösterildi.

Ayrıca internal standart eklenmeyen yüksek konsantrasyonlu numune enjeksiyonu sonucunda internal standartın kromatogramdaki gelme (RT) zamanında anlamlı sinyal alınmadığı belirlendi.

Girişim çalışması için sertralin, klozapin, parasetamol, efedrin, amlodipin, nikotin, klobozam, ketiapin, levetrisetam ve sitolopram kullanımı olan kişilerin idrar numuneleri kullanıldı. Bu numunelerde yirmi altı maddenin geliş zamanlarındaki (RT) sinyaller değerlendirildi (Tablo 4.8. ve Şekil 4.8.). Sonuçlar 0 – 4,8 arasında bulunarak hedeflenen en düşük kalibratör düzeyinin (50 ng/mL) %10’undan (<5 ng/mL) az olduğu belirlendi. Girişim çalışması için seçilen bileşiklerle etkileşim olmadığı sonucuna varıldı.

Tablo 4.8. İdrar LC-MS/MS girişim çalışması (*)

Madde	Madde konsantrasyon (ng/mL)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
6-MAM	0,5	0,4	0,5	3,1	1,8	0,8	0	0,2	3	1,3
BEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Buprenorfin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dihidrokodein	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0
EDDP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eroin	0	2,7	0,8	3,4	4,5	0,9	0,4	0,5	1,6	2,3
Etilmorfin	0,7	0	3,1	0	4,1	0	0,4	0	0,7	2,2
Gabapentin	2,3	3	2,6	4,4	4	4,2	0,8	3,4	0,3	0,7
Kodein	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0
Kokaetilen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kokain	0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0	0,1	0,1
MBDB	0	0,4	0	0,1	0,2	0,2	0	0	0,2	0,1
MDA	2,2	3,2	4,4	1,5	4,8	1	1	2,3	3,9	0,9
MDEA	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0
MDMA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metadon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metamfetamin	0,3	0,8	0,7	0,1	0,4	0,8	0,4	0,9	0,5	1,2
Morfin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalokson	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0,7	0
Naltrekson	1,8	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Norbuprenorfin	3	1,7	2,7	4,8	0,5	1,9	3,7	3,7	4,2	3,1
Norkodein	0	0	0	2,4	4,6	0,9	0	0	4,3	0
Normorfin	3,1	2,7	0	0	2,5	0	0	1,7	2,9	3,4
Oksikodon	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0,6
Pregabalin	1,8	4,1	2,3	1,2	4	2	4	3,1	2,9	1,2
Tramadol	0	0,1	0,6	0	0,7	0	0,5	0	0,1	0



Şekil 4.8. İdrar LC-MS/MS girişim grafiği (*)

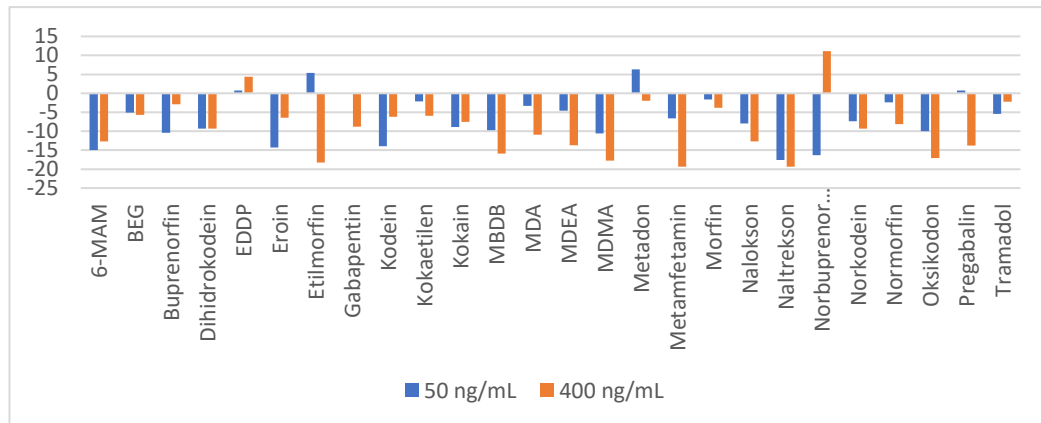
*A: sertralın, B: klozapın, C: parasetamol, D: efedrin, E: amlodipin, F: nikotin, G: klobozam, H: ketiapin, I: evetrisetam, J: sitolopram

4.2.6. İyonizasyon Etkileşimi

İyonizasyon etkileşim çalışmasının sonuçları aşağıdaki Tablo 4.9. ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. İyonizasyon etkileşiminin değerlendirilmesinde tüm parametreler için % değişim (baskılanma veya artmanın) %-19,4 ile %11 aralığında bulunup %25'in altında olduğu saptandı.

Tablo 4.9. İdrar LC-MS/MS % baskılanma veya artma değerleri

Madde	% Değişim 50 ng/mL	% Değişim 400 ng/mL
6-MAM	-15,0	-12,7
BEG	-5,1	-5,7
Buprenorfin	-10,4	-2,9
Dihidrokodein	-9,3	-9,3
EDDP	0,7	4,4
Eroin	-14,3	-6,4
Etilmorfin	5,4	-18,3
Gabapentin	-7,0	-8,8
Kodein	-14	-6,2
Kokaetilen	-2,1	-5,9
Kokain	-8,9	-7,5
MBDB	-9,7	-15,9
MDA	-3,3	-10,9
MDEA	-4,6	-13,7
MDMA	-10,6	-17,8
Metadon	6,3	-2,0
Metamfetamin	-6,6	-19,4
Morfin	-1,6	-3,8
Nalokson	-8,0	-12,7
Naltrekson	-17,6	-19,4
Norbuprenorfin	-16,3	11,1
Norkodein	-7,4	-9,3
Normorfin	-2,4	-8,1
Oksikodon	-10,0	-17,1
Pregabalin	0,7	-13,8
Tramadol	-5,4	-2,2



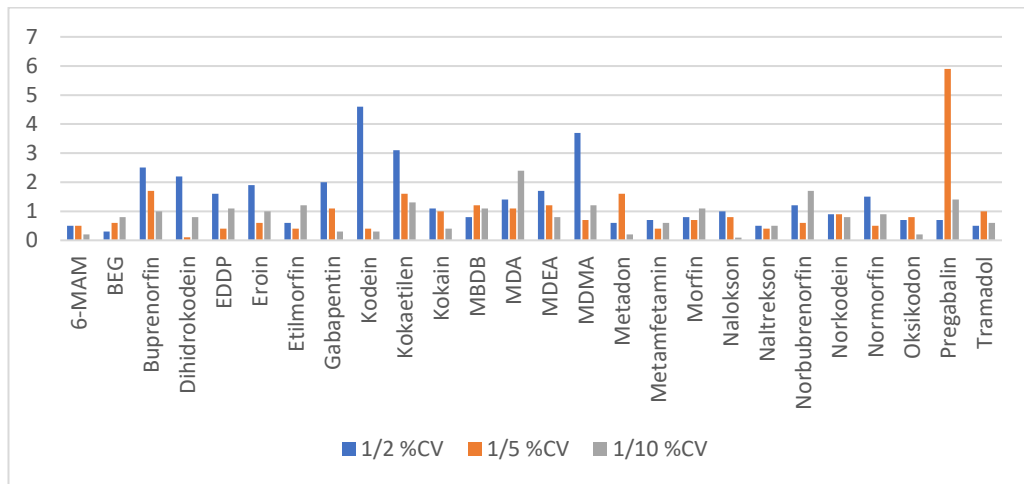
Şekil 4.9. İdrar LC-MS/MS iyonizasyon etkileşim grafiği

4.2.7. Dilüsyon Bütünlüğü

İdrar dilüsyon bütünlüğü çalışması her bir maddenin 1600 ng/mL olarak hazırlandığı numunenin 1/2, 1/5, 1/10 dilüsyonlarını hazırlayarak bu dilüsyondaki BİAS ve kesinlik değerleri aşağıdaki Tablo 4.10 ve Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10 İdrar LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü çalışması sonuçları.

Madde 1600 ng/mL	1/2 Bias	1/5 Bias	1/10 Bias	1/2 %CV	1/5 %CV	1/10 %CV
6-MAM	0,3	0,8	0,9	0,5	0,5	0,2
BEG	0,6	0,5	1	0,3	0,6	0,8
Buprenorfin	0,6	2,3	2,2	2,5	1,7	1
Dihidrokodein	2,6	0,6	0,5	2,2	0,1	0,8
EDDP	3,1	0,4	1,9	1,6	0,4	1,1
Eroin	1	0,08	0,5	1,9	0,6	1
Etilmorfin	1,7	1	1,4	0,6	0,4	1,2
Gabapentin	0,3	1,2	0,6	2	1,1	0,3
Kodein	2	1,4	0,02	4,6	0,4	0,3
Kokaetilen	0,5	0,4	0,6	3,1	1,6	1,3
Kokain	1,2	2,1	0,06	1,1	1	0,4
MBDB	1,2	2,7	2,3	0,8	1,2	1,1
MDA	2,2	0,7	0,1	1,4	1,1	2,4
MDEA	0,3	1	0,1	1,7	1,2	0,8
MDMA	0,8	0,2	0,4	3,7	0,7	1,2
Metadon	1	1,4	0,1	0,6	1,6	0,2
Metamfetamin	2,8	0,5	0,8	0,7	0,4	0,6
Morfin	3,5	3,6	2,9	0,8	0,7	1,1
Nalokson	0	0,7	1,4	1	0,8	0,09
Naltrekson	1	1	0	0,5	0,4	0,5
Norbubrenorfin	3,1	5,5	3,5	1,2	0,6	1,7
Norkodein	0,1	0,9	2	0,9	0,9	0,8
Normorfin	1,1	0,8	1	1,5	0,5	0,9
Oksikodon	0,4	0,1	0,8	0,7	0,8	0,2
Pregabalin	0,9	4,6	0,3	0,7	5,9	1,4
Tramadol	2,3	1,5	0,1	0,5	1	0,6



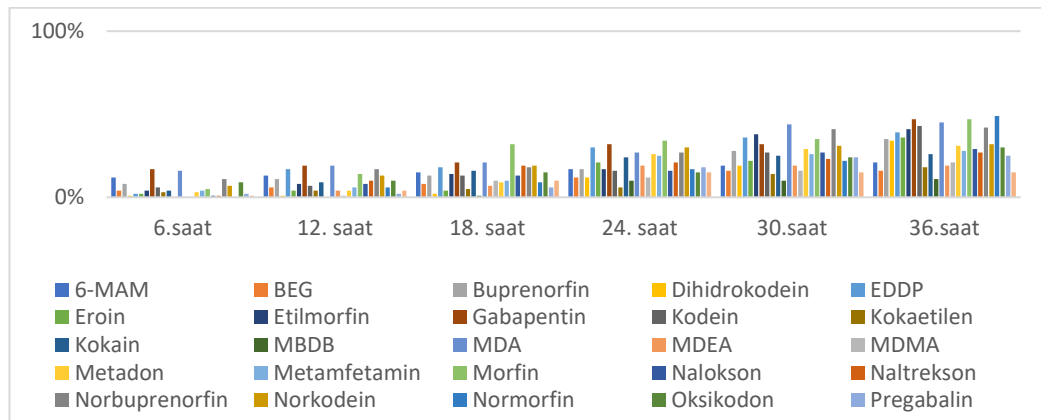
Şekil 4.10. İdrar LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü grafiği

4.2.8. Dayanıklılık

Dayanıklılık çalışması için ekstrakte edilen numuneler oda sıcaklığında (22 °C) 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36. saate bekletildikten sonra analiz edildi. Her madde için % değişim değerleri belirlendi (Tablo 4.11. ve Şekil 4.11.). Her maddeyi kapsayacak şekilde oda sıcaklığında en fazla 12 saat beklemenin %20 değişimi aşmadığı belirlendi.

Tablo 4.11. İdrar LC-MS/MS dayanıklılık çalışması

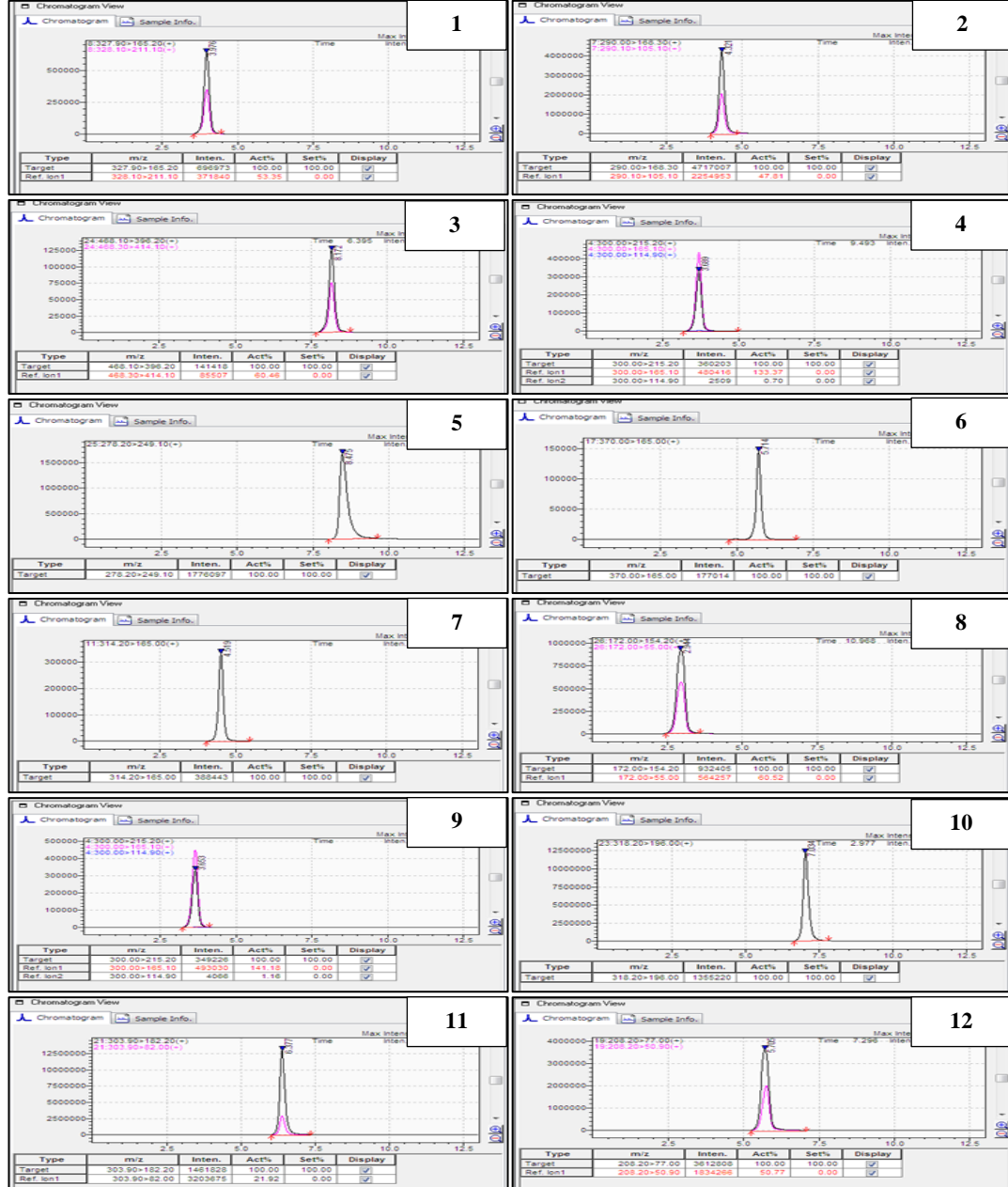
Madde	Oda sıcaklığında (22 °C) bekleme süreleri ve % değişim					
	6.saat	12. saat	18. saat	24. saat	30.saat	36.saat
6-MAM	12%	13%	15%	17%	19%	21%
BEG	4%	6%	8%	12%	16%	16%
Buprenorfin	8%	11%	13%	17%	28%	35%
Dihidrokodein	1%	1%	2%	12%	19%	34%
EDDP	2%	17%	18%	30%	36%	39%
Eroin	2%	4%	4%	21%	22%	36%
Etilmorfin	4%	8%	14%	17%	38%	41%
Gabapentin	17%	19%	21%	32%	32%	47%
Kodein	6%	7%	13%	16%	27%	43%
Kokaetilen	3%	4%	5%	6%	14%	18%
Kokain	4%	9%	16%	24%	25%	26%
MBDB	0%	0%	1%	10%	10%	11%
MDA	16%	19%	21%	27%	44%	45%
MDEA	0%	4%	7%	19%	19%	19%
MDMA	0%	1%	10%	12%	16%	21%
Metadon	3%	4%	9%	26%	29%	31%
Metamfetamin	4%	6%	10%	25%	26%	28%
Morfin	5%	14%	32%	34%	35%	47%
Nalokson	1%	8%	13%	16%	27%	29%
Naltrekson	1%	10%	19%	21%	23%	27%
Norbuprenorfin	11%	17%	18%	27%	41%	42%
Norkodein	7%	13%	19%	30%	31%	32%
Normorfin	0%	6%	9%	17%	22%	49%
Oksikodon	9%	10%	15%	15%	24%	30%
Pregabalin	2%	2%	6%	18%	24%	25%
Tramadol	1%	4%	10%	15%	15%	15%



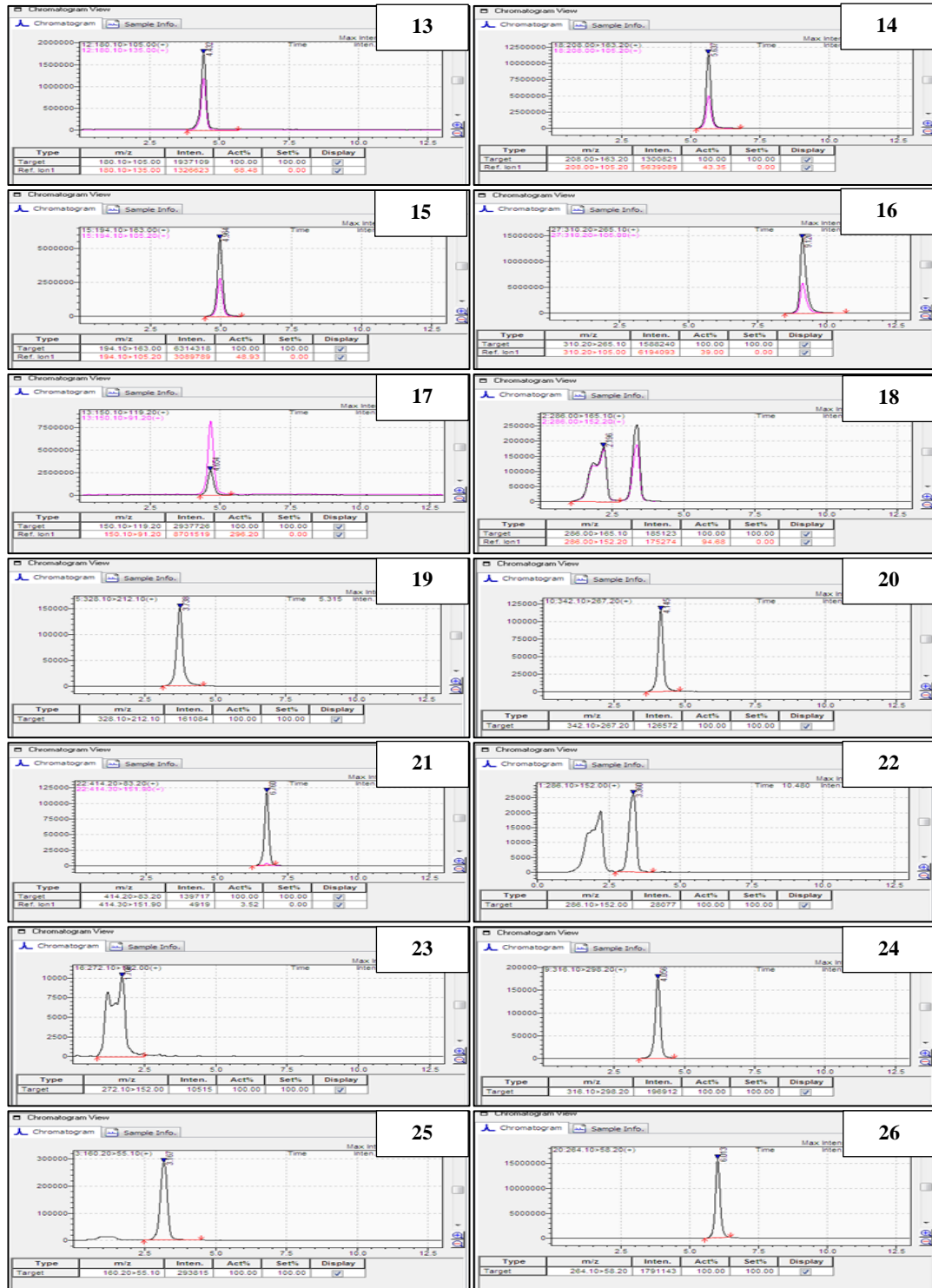
Şekil 4.11. İdrar LC-MS/MS dayanıklılık grafiği

4.3. Tükürük Numuneleri İçin LC-MS/MS Yöntemi Validasyonu

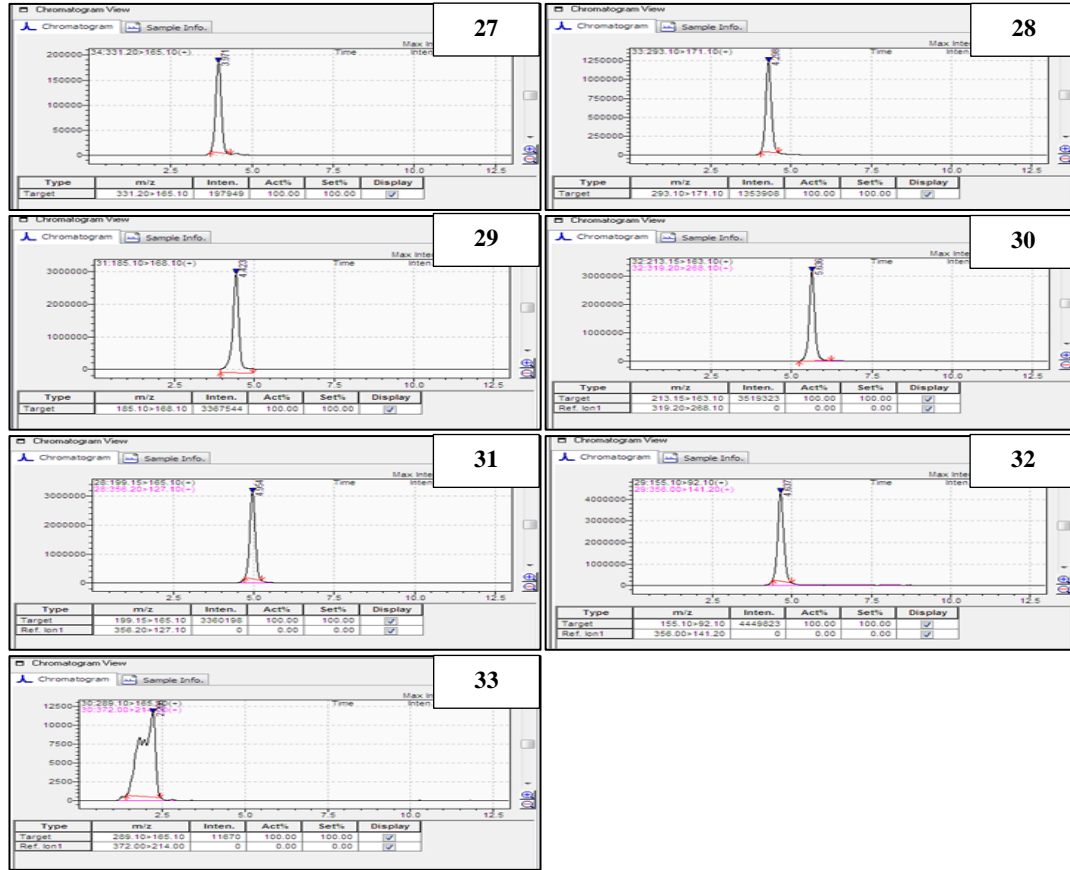
Tükürük numuneleri için geliştirilen LC-MS/MS yöntemi için belirlenen optimum koşullarda (Tablo 3.10.) tükürük metodu için hazırlanan standartlar K0 (0 ng/mL), K1 (25 ng/mL), K2 (50 ng/mL), K3 (100 ng/mL), K4 (200 ng/mL), K5 (400 ng/mL) ve K6 (800 ng/mL) çalışıldı. En yüksek standart (K6) için alınan kromatogramlar Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Tükürük LC-MS/MS yöntemi ile K6 kromatogram görüntüleri. 1. 6-MAM; 2. BEG; 3. Buprenorfin; 4. Dihidrokodein; 5. EDDP; 6. Eroin; 7. Etilmorfin; 8. Gabapentin; 9. Kodein; 10. Kokaetilen; 11. Kokain; 12. MBDB



Şekil 4.12. (Devamı) Tükürük LC-MS/MS yöntemi ile K6 kromatogram görüntüleri. 13. MDA; 14. MDEA; 15. MDMA; 16. Metadon; 17. Metamfetamin; 18. Morfin; 19. Nalokson; 20. Naltrekson; 21. Norbuprenorfin; 22. Norkodein; 23. Normorfin; 24. Oksikodon; 25. Pregabalin; 26. Tramadol



Şekil 4.12. (Devamı) Tükürük LC-MS/MS yöntemi ile K6 kromatogram görüntüleri.27. d₃-MAM; 28. d₃-BEG; 29. d₅-MDA; 30. d₅-MDEA; 31. d₃-MDMA; 32. d₅-Metamfetamin; 33. d₃-Morfin

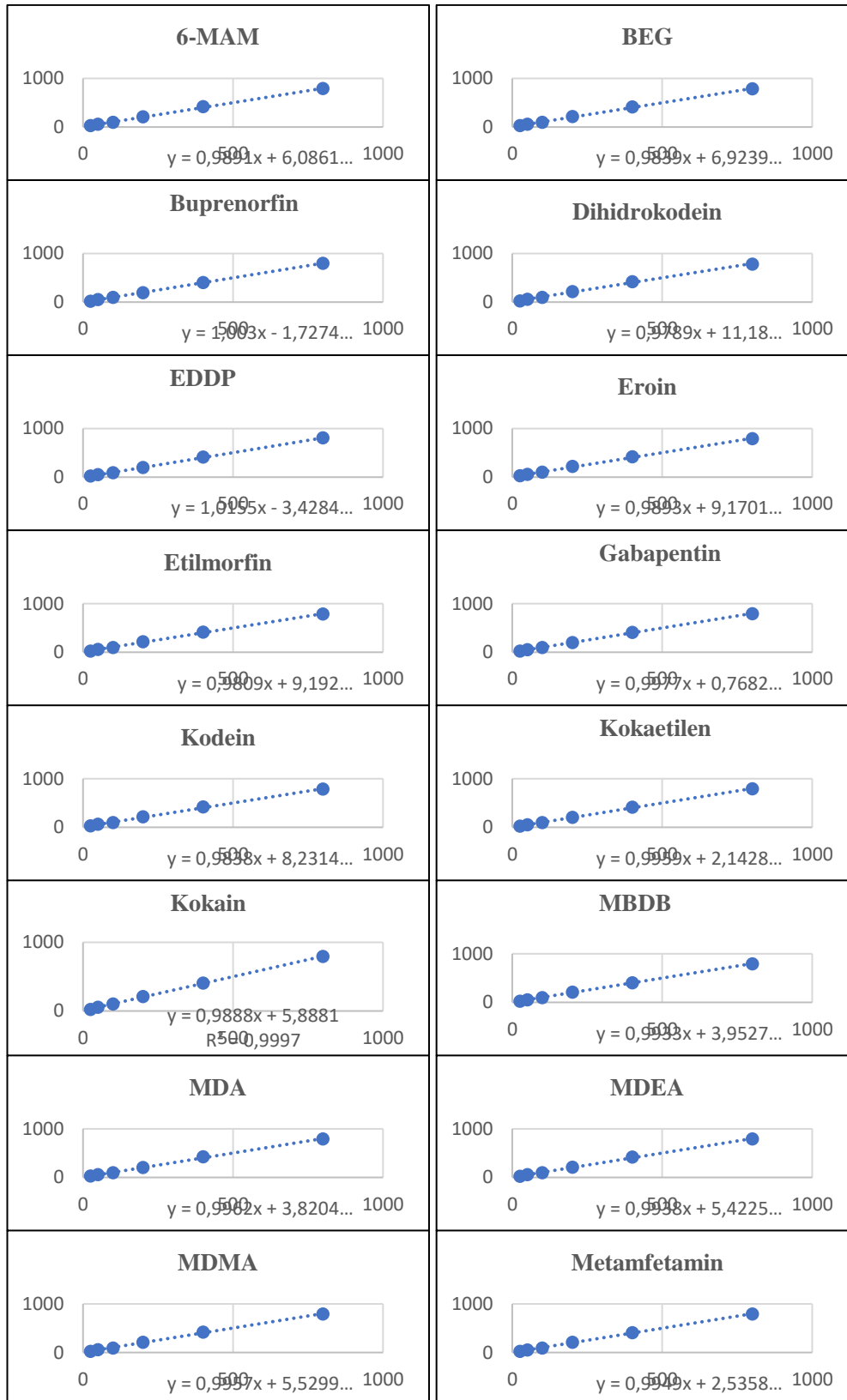
4.3.1. Analitik Aralık ve Doğruluk

Beş gün artarda yapılan kalibratör seti (0, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL) analizleri sonucunda ortaya çıkan yirmi altı maddenin regresyon ve korelasyon değerlerinin ortalaması Tablo 4.12’de gösterilmiştir. Doğrusal kalibrasyon modelimiz regresyon sabitinin $\geq 0,990$ olduğu bulunmuştur.

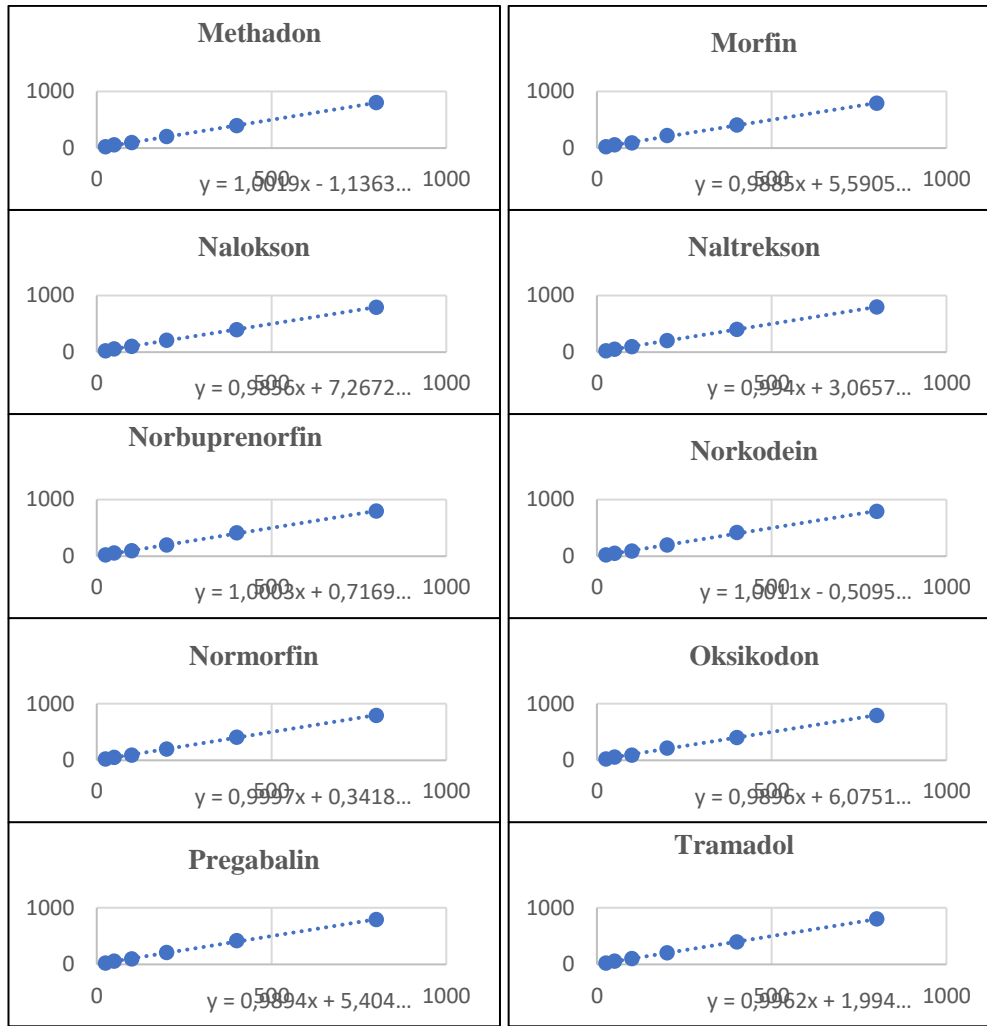
Tablo 4.12 Tükürük LC-MS/MS yönteminde analitik aralık ve doğrusallık çalışması

Madde	R²	r	Madde	R²	r
6-MAM	0,99810006	0,99904942	MDEA	0,99765996	0,99882898
BEG	0,99786544	0,9989317	MDMA	0,99582078	0,99790458
Buprenorfin	0,9968724	0,9984346	Metadon	0,99911004	0,99955488
Dihidrokodein	0,99656206	0,9982776	Metamfetamin	0,99750724	0,99875162
EDDP	0,99540842	0,9976998	Morfin	0,99771964	0,99885886
Eroin	0,99341692	0,99670174	Nalokson	0,9982227	0,99915106
Etilmorfin	0,99694758	0,99847204	Naltrekson	0,99859442	0,99929686
Gabapentin	0,99676184	0,99837912	Norbuprenorfin	0,99738114	0,9986891
Kodein	0,99784064	0,9989194	Norkodein	0,99786606	0,998932
Kokaetilen	0,99866182	0,99933054	Normorfin	0,9981713	0,9990852
Kokain	0,99925486	0,99962736	Oksikodon	0,99540828	0,99769846
MBDB	0,99702942	0,99851312	Pregabalin	0,99613012	0,9980626
MDA	0,99713708	0,99856702	Tramadol	0,99891058	0,99945512

Analitik aralık ve doğrusallık çalışmaları için K1-K6 standartlarının ardışık beş gün çalışılması ile elde edilen verilerin ortalamaları ile çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Tükürük LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri



Şekil 4.13. (Devamı) Tükürük LC-MS/MS kalibrasyon grafikleri

4.3.2. Saptama ve Kantitasyon Sınırı

Analitik aralık ve doğrusallık için yapılan çalışmada elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğim ve y kesim noktası verileri kullanılarak çalıştığımız yirmi altı madde için LOD değerleri hesaplandı (Tablo 4.13.). Elde edilen LOD değerlerinin hepsi en düşük kalibratör değeri olan 25 ng/mL'nin altında bulundu. Tüm maddeler için en düşük kalibratör (25 ng/mL) düzeyinde Bias \pm %20 ve %CV değerlerinin <%20 olduğu belirlenerek LOQ değeri olarak 25 ng/mL olarak alındı.

Tablo 4.13. Tükürük LC-MS/MS LOD değerleri

6-MAM	Eğim	Y kesim	BEG	Eğim	Y kesim	Buprenorfin	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9814	10,009	Run 1	0,9964	1,9318	Run 1	1,0054	2,9627
Run2	0,9819	9,7507	Run2	0,9981	0,99	Run2	1,0159	8,6383
Run 3	1,0041	0,9965	Run 3	0,9806	10,338	Run 3	0,9935	3,4652
Run 4	0,9882	7,01	Run 4	0,9808	10,331	Run 4	0,9897	5,596
Run 5	0,99	4,7025	Run 5	0,964	11,212	Run 5	1,011	5,9806
Ortalama	0,9891	5,41145	Ortalama	0,984	6,96056	Ortalama	1,0031	5,32856
STD Sapma	0,0092	3,763627	STD Sapma	0,0139	5,0442473	STD Sapma	0,01	2,2649759
		12,556585			16,917027			7,4513214
LOD		12,5	LOD		16,9	LOD		7,4
Dihidrokodein	Eğim	Y kesim	EDDP	Eğim	Y kesim	Eroin	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9598	20,586	Run 1	1,0098	5,1846	Run 1	0,9736	11,984
Run2	0,9672	17,438	Run2	1,0297	9,007	Run2	0,9919	13,609
Run 3	0,9869	7,0463	Run 3	1,0055	1,7637	Run 3	0,999	3,1567
Run 4	0,9804	10,24	Run 4	1,0122	4,609	Run 4	0,9962	8,2363
Run 5	0,98	10,449	Run 5	1,023	3,6527	Run 5	0,9856	9,105
Ortalama	0,9749	13,15186	Ortalama	1,016	4,8434	Ortalama	0,9893	9,2182
STD Sapma	0,011	5,0338788	STD Sapma	0,01	2,6650162	STD Sapma	0,0101	4,0201834
		17,04019			8,6557156			13,410635
LOD		17	LOD		8,6	LOD		13,4
Etülmorfin	Eğim	Y kesim	Gabapentin	Eğim	Y kesim	Kodein	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9849	8,1104	Run 1	1,0001	0,1388	Run 1	0,9824	9,2582
Run2	0,9883	6,2836	Run2	1,0029	1,5975	Run2	0,9772	12,285
Run 3	0,9625	19,971	Run 3	0,9838	9,9179	Run 3	0,9916	4,4667
Run 4	0,9881	6,2383	Run 4	0,9877	5,9891	Run 4	0,9885	6,1771
Run 5	0,9803	5,7502	Run 5	1,0136	8,7269	Run 5	0,9849	8,3468
Ortalama	0,9808	9,2707	Ortalama	0,9976	5,27404	Ortalama	0,9849	8,10676
STD Sapma	0,0107	6,0488605	STD Sapma	0,012	4,2978665	STD Sapma	0,0056	2,9922712
		20,351583			14,216795			10,025682
LOD		20,3	LOD		14,2	LOD		10
Kokaetilen	Eğim	Y kesim	Kokain	Eğim	Y kesim	MBDB	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0029	1,5662	Run 1	0,9841	8,5642	Run 1	0,9911	4,7602
Run2	1,0021	1,206	Run2	0,9939	3,652	Run2	1,009	4,9527
Run 3	0,9935	3,4652	Run 3	0,9889	6,0035	Run 3	1,0065	3,593
Run 4	0,9966	2,3662	Run 4	0,9914	4,5781	Run 4	0,9994	0,3144
Run 5	0,9839	7,999	Run 5	0,986	7,1876	Run 5	0,9906	5,4642
Ortalama	0,9958	3,32052	Ortalama	0,9889	5,99708	Ortalama	0,9993	3,8169
STD Sapma	0,0077	2,7553887	STD Sapma	0,004	1,9697962	STD Sapma	0,0085	2,0743126
		9,1311335			6,573557			6,8498896
LOD		9,1	LOD		6,5	LOD		6,8

Tablo 4.13. (Devamı) Tükürük LC-MS/MS LOD değerleri

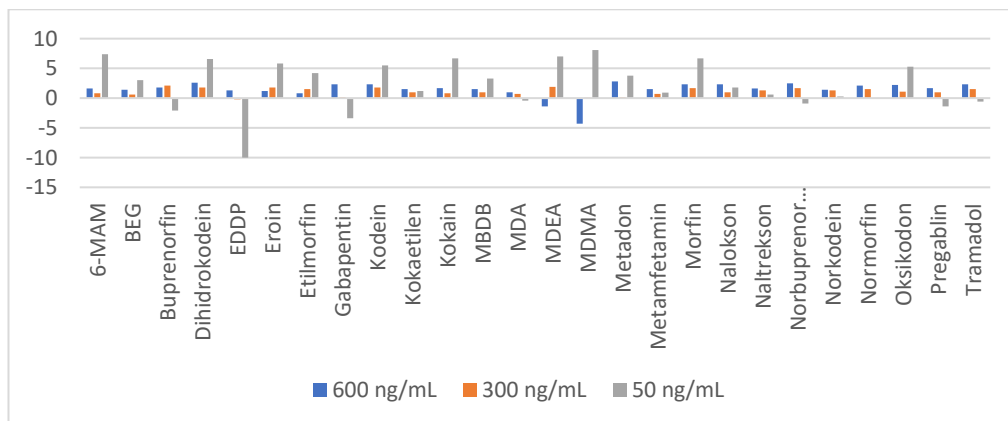
MDA	Eğim	Y kesim	MDEA	Eğim	Y kesim	MDMA	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0221	12,036	Run 1	0,9945	4,1841	Run 1	1,0069	2,5164
Run2	0,9886	6,098	Run2	1,0072	1,0701	Run2	1,0226	2,9776
Run 3	0,9909	4,8617	Run 3	0,9827	9,307	Run 3	0,98	10,797
Run 4	0,9852	7,9602	Run 4	0,9905	5,0647	Run 4	0,9887	6,105
Run 5	0,994	12,399	Run 5	0,9946	7,6279	Run 5	0,9803	10,605
Ortalama	0,9962	8,67098	Ortalama	0,9939	5,45076	Ortalama	0,9957	6,6002
STD Sapma	0,0149	3,4226284	STD Sapma	0,0089	3,1841081	STD Sapma	0,0186	3,9905335
		11,338213			10,572046			13,225631
LOD		11,3	LOD		10,5	LOD		13,2
Metamfetamin	Eğim	Y kesim	Metadon	Eğim	Y kesim	Morfin	Eğim	Y kesim
Run 1	1,0168	9,4318	Run 1	1,0105	5,7552	Run 1	0,993	3,7692
Run2	0,9903	5,2333	Run2	1,0283	15,376	Run2	1,0008	0,4348
Run 3	0,9902	5,2398	Run 3	0,9945	2,9259	Run 3	0,9733	14,413
Run 4	0,9769	12,492	Run 4	0,9886	6,1537	Run 4	0,984	8,3577
Run 5	1,0001	0,7005	Run 5	0,9877	6,6418	Run 5	0,9803	10,605
Ortalama	0,9949	6,61948	Ortalama	1,0019	7,37052	Ortalama	0,9863	7,51594
STD Sapma	0,0148	4,507077	STD Sapma	0,0174	4,7027465	STD Sapma	0,0108	5,5227007
		14,950198			15,489324			18,478436
LOD		14,9	LOD		15,4	LOD		18,4
Nalokson	Eğim	Y kesim	Naltrekson	Eğim	Y kesim	Norbuprenorfin	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9888	5,9841	Run 1	0,9969	1,6219	Run 1	0,9936	1,1701
Run2	0,9895	5,6453	Run2	1,0019	0,4667	Run2	1,0096	5,2353
Run 3	0,9765	12,596	Run 3	0,9883	6,3254	Run 3	0,9992	0,5264
Run 4	0,9811	9,8816	Run 4	0,9783	11,374	Run 4	0,9825	9,6085
Run 5	0,9931	2,7383	Run 5	1,0051	3,4269	Run 5	1,0057	1,3498
Ortalama	0,9858	7,36906	Ortalama	0,9941	4,64298	Ortalama	0,9981	3,57802
STD Sapma	0,0068	3,8719233	STD Sapma	0,0109	4,3641797	STD Sapma	0,0107	3,8467094
		12,961399			14,487268			12,718051
LOD		12,9	LOD		14,4	LOD		12,7
Norkodein	Eğim	Y kesim	Normorfin	Eğim	Y kesim	Oksikodon	Eğim	Y kesim
Run 1	0,9946	2,4483	Run 1	1,0099	5,4159	Run 1	0,9929	4,4254
Run2	1,0065	3,9622	Run2	1,0158	7,3159	Run2	1,0053	0,3736
Run 3	1,0128	6,0134	Run 3	0,9874	6,7333	Run 3	0,9858	7,3154
Run 4	0,9972	1,4413	Run 4	0,9934	3,5313	Run 4	0,9858	7,6194
Run 5	1,0024	1,3736	Run 5	0,9918	4,3562	Run 5	0,978	11,566
Ortalama	1,0027	3,04776	Ortalama	0,9997	5,47052	Ortalama	0,9896	6,25996
STD Sapma	0,0073	1,9604909	STD Sapma	0,0124	1,5815584	STD Sapma	0,0103	4,1572508
		6,4521992			5,2209177			13,863664
LOD		6,4	LOD		5,2	LOD		13,8
Pregabalin	Eğim	Y kesim	Tramadol	Eğim	Y kesim			
Run 1	0,9996	0,2318	Run 1	0,9951	2,5731			
Run2	0,9945	2,9378	Run2	0,9926	3,9313			
Run 3	0,9711	15,585	Run 3	0,9979	1,403			
Run 4	0,9843	8,0995	Run 4	0,9942	3,0269			
Run 5	0,9974	0,4214	Run 5	1,0018	1,3308			
Ortalama	0,9894	5,4551	Ortalama	0,9963	2,45302			
STD Sapma	0,0118	6,4916393	STD Sapma	0,0036	1,105779			
		21,652358			3,6625489			
LOD		21,6	LOD		3,6			

4.3.3. Bias ve kesinlik

Beş günlük çalışmaların ortalamalarıyla elde ettiğimiz sonuçlardan maddelerimizin %Bias değerleri Tablo 4.14. ve Şekil 4.14.'de gösterilmiştir Tüm maddeler için % Bias değerleri -10,0 ile 7,4 arasında ve %Bias değerlerinin ± 20 içinde olduğu bulundu.

Tablo 4.14. Tükürük LC-MS/MS 600, 300, 50 ng/mL için Bias değerleri

Madde	600 ng/mL % Bias	300 ng/mL % Bias	50 ng/mL % Bias
6-MAM	1,6	0,8	7,4
BEG	1,4	0,6	3,0
Buprenorfin	1,8	2,1	-2,1
Dihidrokodein	2,6	1,8	6,6
EDDP	1,3	-0,2	-10,0
Eroin	1,2	1,8	5,8
Etilmorfin	0,8	1,5	4,2
Gabapentin	2,3	0,1	-3,4
Kodein	2,3	1,8	5,5
Kokaetilen	1,5	1,0	1,2
Kokain	1,7	0,8	6,7
MBDB	1,5	1,0	3,3
MDA	1,0	0,7	-0,4
MDEA	-1,4	1,9	7,0
MDMA	-4,3	0,04	8,1
Metadon	2,8	0,1	3,8
Metamfetamin	1,5	0,7	0,9
Morfin	2,3	1,7	6,7
Nalokson	2,3	1,0	1,8
Naltrekson	1,6	1,3	0,6
Norbuprenorfin	2,5	1,7	-0,9
Norkodein	1,4	1,3	0,3
Normorfin	2,1	1,5	-0,1
Oksikodon	2,2	1,1	5,3
Pregablin	1,7	1,0	-1,4
Tramadol	2,3	1,5	-0,6

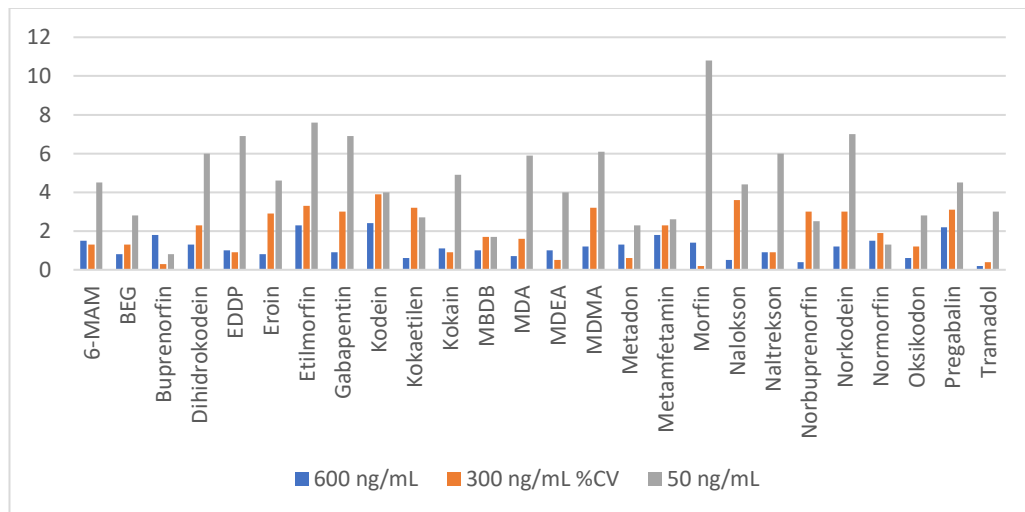


Şekil 4.14. Tükürük LC-MS/MS 300, 150, 75 ng/mL için Bias değerleri grafiği

Kesinlik çalışması için gün içi (Tablo 4.15. ve Şekil 4.15) ve günler arası (Tablo 4.16. ve Şekil 4.16.) çalışmalarında %CV hesaplandı. Tüm maddeler için gün içi %CV değerleri %0,2 ile %6,3 arasında; günler arası %CV değerleri %1,0 ile %8,8 arasında ve %20'nin altında bulundu.

Tablo 4.15. Tükürük LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri

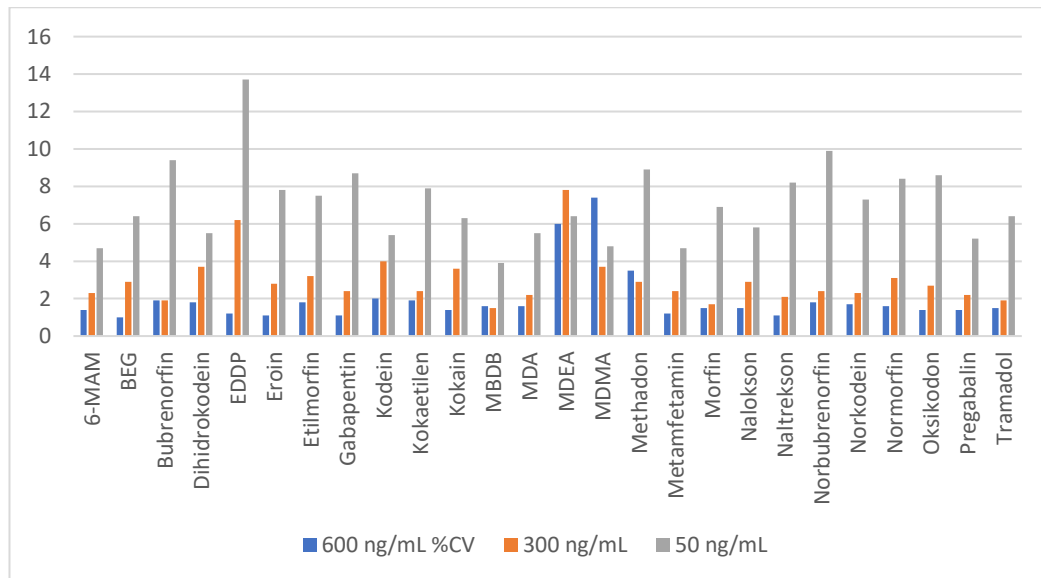
Madde	600 ng/mL	300 ng/mL	50 ng/mL
	%CV	%CV	%CV
6-MAM	1,5	1,3	4,5
BEG	0,8	1,3	2,8
Buprenorfin	1,8	0,3	0,8
Dihidrokodein	1,3	2,3	6,0
EDDP	1,0	0,9	6,9
Eroin	0,8	2,9	4,6
Etilmorfin	2,3	3,3	7,6
Gabapentin	0,9	3	6,9
Kodein	2,4	3,9	4,0
Kokaetilen	0,6	3,2	2,7
Kokain	1,1	0,9	4,9
MBDB	1,0	1,7	1,7
MDA	0,7	1,6	5,9
MDEA	1,0	0,5	4,0
MDMA	1,2	3,2	6,1
Metadon	1,3	0,6	2,3
Metamfetamin	1,8	2,3	2,6
Morfin	1,4	0,2	10,8
Nalokson	0,5	3,6	4,4
Naltrekson	0,9	0,9	6,0
Norbuprenorfin	0,4	3,0	2,5
Norkodein	1,2	3,0	7,0
Normorfin	1,5	1,9	1,3
Oksikodon	0,6	1,2	2,8
Pregabalin	2,2	3,1	4,5
Tramadol	0,2	0,4	3,0



Şekil 4.15. Tükürük LC-MS/MS gün içi varyasyon (%CV) değerleri grafiği

Tablo 4.16. Tükürük LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri

Madde	600 ng/mL %CV	300 ng/mL %CV	50 ng/mL %CV
6-MAM	1,4	2,3	4,7
BEG	1,0	2,9	6,4
Bubrenorfin	1,9	1,9	9,4
Dihidrokodein	1,8	3,7	5,5
EDDP	1,2	6,2	13,7
Eroin	1,1	2,8	7,8
Etilmorfin	1,8	3,2	7,5
Gabapentin	1,1	2,4	8,7
Kodein	2,0	4,0	5,4
Kokaetilen	1,9	2,4	7,9
Kokain	1,4	3,6	6,3
MBDB	1,6	1,5	3,9
MDA	1,6	2,2	5,5
MDEA	6,0	7,8	6,4
MDMA	7,4	3,7	4,8
Methadon	3,5	2,9	8,9
Metamfetamin	1,2	2,4	4,7
Morfin	1,5	1,7	6,9
Nalokson	1,5	2,9	5,8
Naltrekson	1,1	2,1	8,2
Norbubrenorfin	1,8	2,4	9,9
Norkodein	1,7	2,3	7,3
Normorfin	1,6	3,1	8,4
Oksikodon	1,4	2,7	8,6
Pregabalin	1,4	2,2	5,2
Tramadol	1,5	1,9	6,4

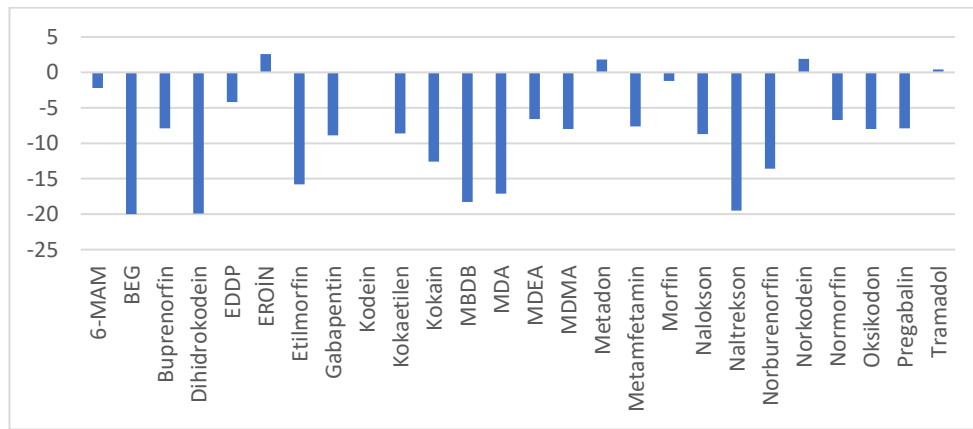


Şekil 4.16. Tükürük LC-MS/MS günler arası varyasyon (%CV) değerleri

Tükürük LC-MS/MS yöntemi için ayrıca Bias çalışması için hazırlanan numune akredite bir merkezde de çalışılarak sonuçlar karşılaştırıldı. Tüm maddeler için % Bias değerleri (Tablo 4.17. ve Şekil 4.17.) -19,9 ile 2,6 arasında ve ± 20 içinde olduğu belirlendi.

Tablo 4.17. Tükürük LC-MS/MS dış merkez 300 ng/mL için Bias değerleri

Madde	300 ng/mL % fark
6-MAM	-2,2
BEG	-20
Buprenorfin	-7,9
Dihidrokodein	-19,9
EDDP	-4,2
EROİN	2,6
Etilmorfin	-15,8
Gabapentin	-8,9
Kodein	-0,006
Kokaetilen	-8,6
Kokain	-12,6
MBDB	-18,3
MDA	-17,1
MDEA	-6,6
MDMA	-8
Metadon	1,8
Metamfetamin	-7,6
Morfin	-1,2
Nalokson	-8,7
Naltrekson	-19,5
Norbuprenorfin	-13,6
Norkodein	1,9
Normorfin	-6,7
Oksikodon	-8
Pregabalin	-7,9
Tramadol	0,44



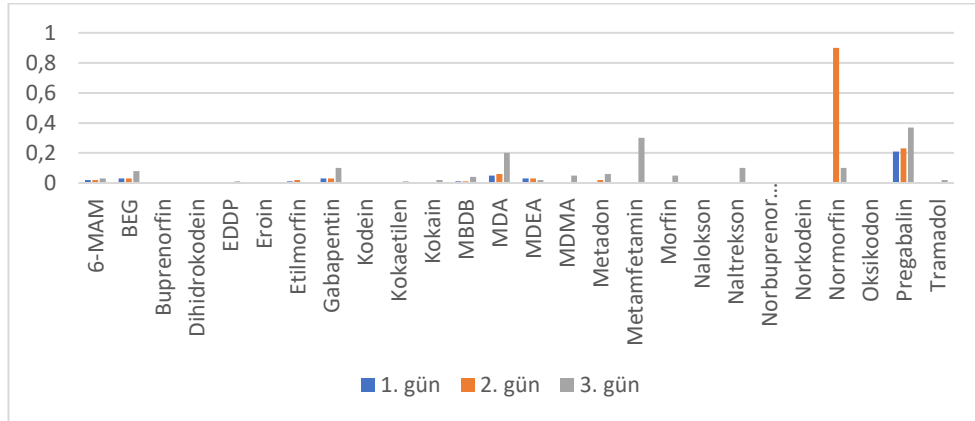
Şekil 4.17. Tükürük LC-MS/MS dış merkez 300 ng/mL için Bias değerleri grafiği

4.3.4. Sürüklenme

En yüksek kalibratör K6 (800 ng/mL) sonrası üç gün ardarda verdiğimiz boş numunelerden aldığımız sinyallerin konsantrasyonları Tablo 4.18 ve Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Sinyal'in en düşük kalibratör olan 25 ng/mL %10 değerinin altında olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.18. Tükürük LC-MS/MS sürüklenme çalışması

K6 sonrası alınan sinyal için konsantrasyon (ng/mL)			
Madde	1. gün	2. gün	3. gün
6-MAM	0,02	0,02	0,03
BEG	0,03	0,03	0,08
Buprenorfin	0	0	0
Dihidrokodein	0	0	0
EDDP	0	0	0,01
Eroin	0	0	0
Etilmorfin	0,01	0,02	0
Gabapentin	0,03	0,03	0,1
Kodein	0	0	0
Kokaetilen	0	0	0,01
Kokain	0	0	0,02
MBDB	0,01	0,01	0,04
MDA	0,05	0,06	0,2
MDEA	0,03	0,03	0,02
MDMA	0	0	0,05
Metadon	0	0,02	0,06
Metamfetamin	0	0	0,3
Morfin	0	0	0,05
Nalokson	0	0	0
Naltrekson	0	0	0,1
Norbuprenorfin	0	0	0
Norkodein	0	0	0
Normorfin	0	0,9	0,1
Oksikodon	0	0	0
Pregabalin	0,21	0,23	0,37
Tramadol	0	0	0,02



Şekil 4.18. Tükürük LC-MS/MS sürüklenme grafiği

4.3.5. Girişim

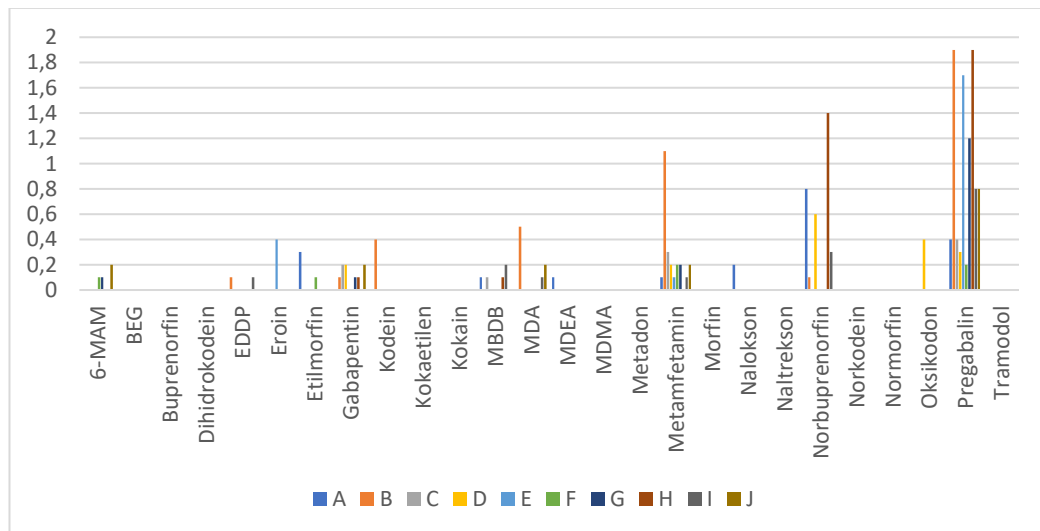
Tükürük girişim çalışmasında matrisin madde analizlerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile internal standart içermeyen üç farklı “boş tükürük” numunesi analiz edildi. İnternal standart için belirlenen pik tespit zamanında (RT) sinyal alınmadığı gösterildi.

Ayrıca internal standart eklenmeyen yüksek konsantrasyonlu numune enjeksiyonu sonucunda internal standartın kromatogramdaki gelme zamanında anlamlı sinyal alınmadığı belirlendi.

Ağız bakım suyu, sakız çiğneme, limon suyu tüketimi ve çeşitli medikasyonların (ketiapin, parol, amlodipin, essitalopram, efedrin, levetirasetam ve sertralin) tükürük numunelerinde madde analizine etkileri değerlendirildi (Tablo 4.19. ve Şekil 4.19.). Bu numunelerde yirmi altı maddenin geliş zamanlarındaki (RT) sinyaller değerlendirildi. Sonuçlar 0 – 1,9 arasında bulunarak hedeflenen en düşük kalibratör düzeyinin (25 ng/mL) %10’undan (<2,5 ng/mL) az olduğu belirlendi. Girişim çalışması için seçilen bileşiklerle etkileşim olmadığı sonucuna varıldı.

Tablo 4.19 Tükürük LC-MS/MS girişim çalışması (*)

Madde	Madde konsantrasyonu (ng/mL)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
6-MAM	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0,2
BEG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Buprenorfin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dihidrokodein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EDDP	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0
Eroin	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0
Etilmorfin	0,3	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0
Gabapentin	0	0,1	0,2	0,2	0	0	0,1	0,1	0	0,2
Kodein	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
Kokaetilen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kokain	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MBDB	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0,1	0,2	0
MDA	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0,1	0,2
MDEA	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MDMA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metadon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metamfetamin	0,1	1,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0	0,1	0,2
Morfin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nalokson	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Naltrekson	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Norbuprenorfin	0,8	0,1	0	0,6	0	0	0	1,4	0,3	0
Norkodein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normorfin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oksikodon	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0
Pregabalin	0,4	1,9	0,4	0,3	1,7	0,2	1,2	1,9	0,8	0,8
Tramadol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.19. Tükürük LC-MS/MS girişim grafiği

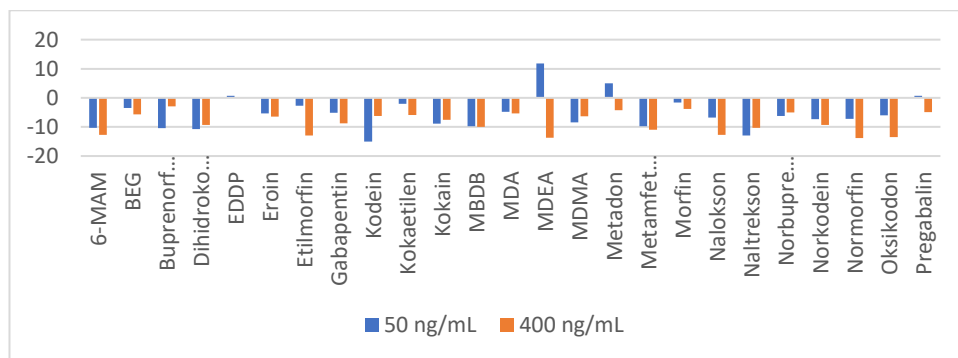
*A: Ağız bakım suyu, B: sakız çiğneme, C: limon suyu tüketimi, D: ketiadin, E: parol, F: amlodipin, G: sitalopram, H: efedrin, I: levetirasetam, J: sertralin

4.3.6 İyonizasyon Etkileşimi

İyonizasyon etkileşim çalışmasının sonuçları aşağıdaki Tablo 4.20 ve Şekil 4.20.'de gösterilmiştir. İyonizasyon etkileşim değerlendirmesinde tüm parametreler için % değişim (baskılanma veya artma) %-13,8 ile %11,8 aralığında bulunup %25' in altında olduğu saptandı.

Tablo 4.20. Tükürük LC-MS/MS % baskılanma veya artma değerleri

Madde	% Değişim 50 ng/mL	% Değişim 400 ng/mL
6-MAM	-10,3	-12,7
BEG	-3,5	-5,7
Buprenorfin	-10,4	-2,9
Dihidrokodein	-10,7	-9,3
EDDP	0,7	-0,03
Eroin	-5,4	-6,4
Etilmorfin	-2,7	-12,9
Gabapentin	-5,1	-8,8
Kodein	-15	-6,2
Kokaetilen	-2,1	-5,9
Kokain	-8,9	-7,5
MBDB	-9,7	-10
MDA	-4,8	-5,4
MDEA	11,8	-13,7
MDMA	-8,4	-6,3
Metadon	5	-4,3
Metamfetamin	-9,7	-11
Morfin	-1,6	-3,8
Nalokson	-6,8	-12,7
Naltrekson	-12,9	-10,3
Norbuprenorfin	-6,2	-5
Norkodein	-7,3	-9,3
Normorfin	-7,2	-13,8
Oksikodon	-6	-13,5
Pregabalin	0,7	-4,9
Tramadol	-6	-2,2



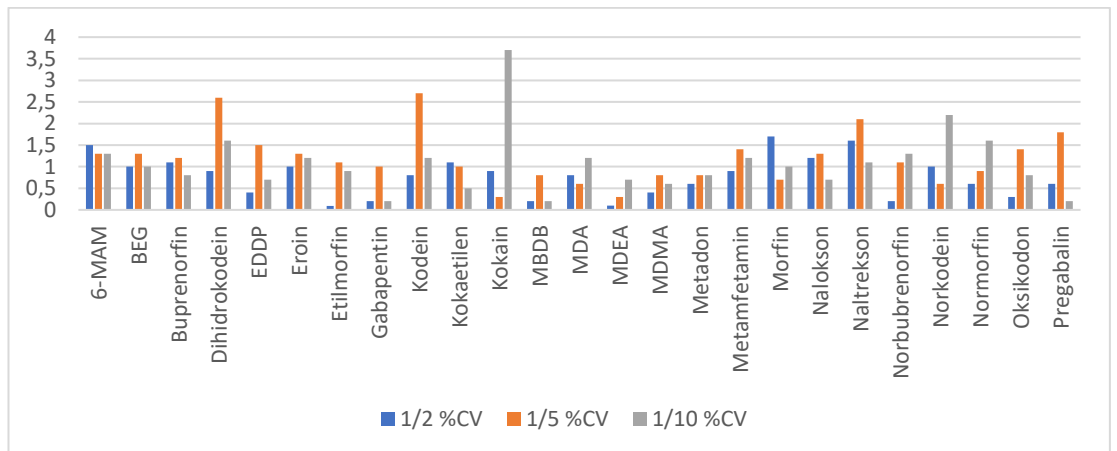
Şekil 4.20. Tükürük LC-MS/MS iyonizasyon etkileşim grafiği

4.3.7 Dilüsyon Bütünlüğü

Tükürük dilüsyon bütünlüğü çalışması her bir maddenin 1600 ng/mL olarak hazırlandığı numunenin 1/2, 1/5, 1/10 dilüsyonlarını hazırlayarak bu dilüsyondaki BİAS ve kesinlik değerleri aşağıdaki Tablo 4.21. ve Şekli 4.21.'de gösterilmiştir

Tablo 4.21. Tükürük LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü çalışması sonuçları

Madde 1600 ng/mL	1/2 Bias	1/5 Bias	1/10 Bias	1/2 %CV	1/5 %CV	1/10 %CV
6-MAM	1	1,3	0,4	1,5	1,3	1,3
BEG	0,5	1,3	0,04	1	1,3	1
Buprenorfin	1,1	0,08	0,2	1,1	1,2	0,8
Dihidrokodein	0,04	1,4	1,1	0,9	2,6	1,6
EDDP	0,7	1	1	0,4	1,5	0,7
Eroin	0,1	0,7	1,2	1	1,3	1,2
Etilmorfin	0,4	0,2	0,1	0,09	1,1	0,9
Gabapentin	0,1	0,8	1,2	0,2	1	0,2
Kodein	0,3	0,7	0,5	0,8	2,7	1,2
Kokaetilen	0,7	0,3	0,8	1,1	1	0,5
Kokain	2,2	1,1	0,08	0,9	0,3	3,7
MBDB	0,1	2,2	1	0,2	0,8	0,2
MDA	0	0,3	0,6	0,8	0,6	1,2
MDEA	1,2	2,1	1	0,1	0,3	0,7
MDMA	0,2	1,5	0,5	0,4	0,8	0,6
Metadon	0,8	0,8	0,4	0,6	0,8	0,8
Metamfetamin	0,7	0,7	0,2	0,9	1,4	1,2
Morfin	2,7	0,3	0,3	1,7	0,7	1
Nalokson	0,9	1,1	0,6	1,2	1,3	0,7
Naltrekson	2,5	2,5	1	1,6	2,1	1,1
Norbubrenorfin	0,1	0,2	0,8	0,2	1,1	1,3
Norkodein	0,1	1,1	0,9	1	0,6	2,2
Normorfin	0,7	0,3	0,5	0,6	0,9	1,6
Oksikodon	0,9	0,8	0,1	0,3	1,4	0,8
Pregabalin	2,1	1,7	0,4	0,6	1,8	0,2
Tramadol	0,1	0,1	0,9	1,2	0,4	0,3



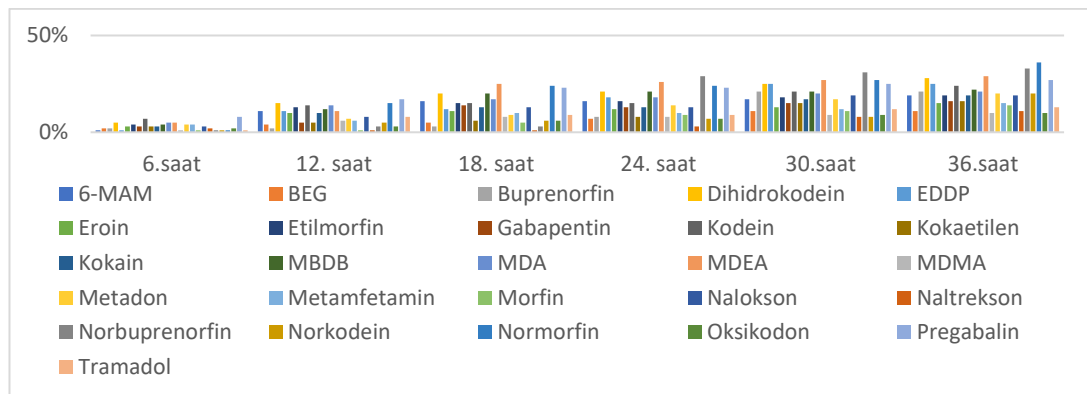
Şekil 4.21. Tükürük LC-MS/MS dilüsyon bütünlüğü grafiği

4.3.8. Dayanıklılık

Dayanıklılık çalışması için ekstrakte edilen numuneler oda sıcaklığında (22 °C) 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36. saate bekletildikten sonra analiz edildi. Her madde için % değişim değerleri belirlendi (Tablo 4.22. ve Şekil 4.22). Oda sıcaklığında 12 saate kadar beklemenin tüm maddeler için %20 değişimi aşmadığı belirlendi.

Tablo 4.22. Tükürük LC-MS/MS dayanıklılık çalışması

Madde	Oda sıcaklığında (22 °C) bekleme süreleri ve % değişim					
	6.saat	12. saat	18. saat	24. saat	30.saat	36.saat
6-MAM	1%	11%	16%	16%	17%	19%
BEG	2%	4%	5%	7%	11%	11%
Buprenorfin	2%	2%	3%	8%	21%	21%
Dihidrokodein	5%	15%	20%	21%	25%	28%
EDDP	1%	11%	12%	18%	25%	25%
Eroin	3%	10%	11%	12%	13%	15%
Etilmorfin	4%	13%	15%	16%	18%	19%
Gabapentin	3%	5%	14%	13%	15%	16%
Kodein	7%	14%	15%	15%	21%	24%
Kokaetilen	3%	5%	6%	8%	15%	16%
Kokain	3%	10%	13%	13%	17%	19%
MBDB	4%	12%	20%	21%	21%	22%
MDA	5%	14%	17%	18%	20%	21%
MDEA	5%	11%	25%	26%	27%	29%
MDMA	1%	6%	8%	8%	9%	10%
Metadon	4%	7%	9%	14%	17%	20%
Metamfetamin	4%	6%	10%	10%	12%	15%
Morfin	1%	1%	5%	9%	11%	14%
Nalokson	3%	8%	13%	13%	19%	19%
Naltrekson	2%	1%	1%	3%	8%	11%
Norbuprenorfin	1%	3%	3%	29%	31%	33%
Norkodein	1%	5%	6%	7%	8%	20%
Normorfin	1%	15%	24%	24%	27%	36%
Oksikodon	2%	3%	6%	7%	9%	10%
Pregabalin	8%	17%	23%	23%	25%	27%
Tramadol	1%	8%	9%	9%	12%	13%



Şekil 4.22. Tükürük LC-MS/MS dayanıklılık grafiği

4.4. Numunelerin Analiz Sonuçları

4.4.1. İdrar Numunelerinin Bütünlük Analizleri

Çalışma kapsamındaki tüm idrar numuneleri için kreatinin, pH, dansite ve nitrit analizleri yapılarak bütünlük değerlendirmeleri yapıldı. Analizler sonucunda numunelerde dilüsyon veya müdahale düşündürecek bir sonuç saptanmadı. Bir hastada nitrit değerinin (++) sonucunun tam idrar test parametreleri ve idrar mikroskopisi ile birlikte değerlendirilerek enfeksiyon kaynaklı gerçek bir nitrit pozitifliği olduğu belirlenerek oksidan müdahale olmadığı saptandı. İdrar numunelerinin bütünlük değerleri Tablo 4.23.'de yer almaktadır.

Tablo 4.23. İdrar bütünlük testleri sonuçları

Hasta No	Kreatinin (mg/dL)	pH	Dansite	Nitrit
Hasta 1	62,65	6,5	1010	Negatif
Hasta 2	43,61	6,5	1009	Negatif
Hasta 3	130,45	5	1023	Negatif
Hasta 4	59,83	6	1005	Negatif
Hasta 5	55,89	7	1006	Negatif
Hasta 6	30,42	5	1008	Negatif
Hasta 7	80,1	8,5	1017	Negatif
Hasta 8	17,75	7	1015	Negatif
Hasta 9	79,33	7	1005	Negatif
Hasta 10	38,75	7	1006	Negatif
Hasta 11	151,88	5	1026	Negatif
Hasta 12	55,26	7	1006	Negatif
Hasta 13	25,96	5	1005	Negatif
Hasta 14	64,2	5	1024	Negatif
Hasta 15	83,41	5,5	1021	Negatif
Hasta 16	60,89	7,5	1011	Negatif
Hasta 17	77,5	6	1023	Negatif
Hasta 18	153,64	5	1026	Negatif
Hasta 19	26,56	7,5	1005	Negatif
Hasta 20	32,99	6	1014	Negatif
Hasta 21	381,9	6	1029	Negatif
Hasta 22	157,56	5	1016	Negatif
Hasta 23	22,02	7	1005	Negatif
Hasta 24	74,82	5	1016	Negatif
Hasta 25	236,04	8,5	1018	Negatif
Hasta 26	32,52	6,5	1008	Negatif
Hasta 27	139,53	7	1018	Negatif
Hasta 28	286,7	5	1020	Negatif
Hasta 29	395,4	5	1031	Negatif

Hasta 30	26,1	7	1006	Negatif
Hasta 31	134,19	5	1017	Negatif
Hasta 32	142,88	6,5	1023	Negatif
Hasta 33	210,35	5	1023	Negatif
Hasta 34	89,02	6,5	1016	Negatif
Hasta 35	34,27	7	1003	Negatif
Hasta 36	69,69	7,5	1013	Negatif
Hasta 37	82,08	5	1013	Negatif
Hasta 38	136,7	6	1020	Negatif
Hasta 39	21,48	5,5	1005	Negatif
Hasta 40	140	5	1021	Negatif
Hasta 41	158,8	5	1020	Negatif
Hasta 42	359,9	5	1034	Negatif
Hasta 43	297,2	5	1027	Negatif
Hasta44	120,7	5	1021	Negatif
Hasta45	82,52	5	1021	Negatif
Hasta 46	25,2	6,5	1005	Negatif
Hasta 47	97,2	8	1018	Negatif
Hasta 48	91,1	6	1017	Negatif
Hasta 49	183,25	5	1025	Negatif
Hasta 50	32,99	5,5	1008	++
Hasta 51	118,93	7	1010	Negatif
Hasta 52	89,21	6,5	1018	Negatif
Hasta 53	235,21	5	1021	Negatif
Hasta 54	66,08	5,5	1020	Negatif
Hasta 55	80,11	9	1014	Negatif
Hasta 56	12,07	6	1002	Negatif
Hasta 57	44,62	8	1011	Negatif
Hasta 58	141,76	7	1020	Negatif
Hasta 59	118,76	7,5	1018	Negatif
Hasta 60	128,03	5	1023	Negatif
Hasta 61	365,26	5	1027	Negatif
Hasta 62	239,16	5	1028	Negatif
Hasta 63	191,01	5	1021	Negatif
Hasta 64	72,22	5	1018	Negatif
Hasta 65	362,97	5	1027	Negatif
Hasta 66	140,39	7,5	1020	Negatif
Hasta 67	94,62	5	1020	Negatif
Hasta 68	48,01	6,5	1009	Negatif
Hasta 69	251,49	5	1028	Negatif
Hasta 70	191,83	5	1024	Negatif
Hasta 71	191,4	5	1027	Negatif
Hasta 72	227,28	5	1021	Negatif
Hasta 73	156,14	5	1019	Negatif
Hasta 74	374,13	5	1029	Negatif
Hasta 75	277,61	5	1025	Negatif
Hasta 76	70,02	6	1016	Negatif

4.4.2. İdrar Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi

İdrar numuneleri için validasyonu tamamlanan LC-MS/MS yöntemi ile 76 hastadan alınan idrar numuneleri analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.24'te verilmiştir.

4.4.3. İdrar Numunelerinin İmmünolojik Yöntem ile Analizi

İdrar numunelerinin immünolojik yöntem ile alınan sonuçlarının karşılaştırılması amacı ile idrar numuneleri çalışıldı. İmmünolojik yöntem ile elde edilen opiat, ekstazi ve amfetamin sonuçları Tablo 4.24'te verilmiştir.

4.4.4. Tükürük Numunelerinin LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi

Tükürük numuneleri için validasyonu tamamlanan LC-MS/MS yöntemi ile 76 hastadan alınan tükürük numuneleri analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.24'te verilmiştir.

Tablo 4.24. İdrar ve tükürük numuneleri sonuçları

	Tükürük, LC-MS/MS	İdrar, LC-MS/MS	İdrar, İmmünolojik yöntem		
			Opiat	Ekstazi	Amfetamin
1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
2	Morfin 28 ng/mL	Norkodein 79 ng/mL Pregabalin 122501 ng/mL	2318 ng/mL	Negatif	Negatif
3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4	Pregabalin 211 ng/ mL	Pregabalin 214921 ng/ mL	Negatif	Negatif	Negatif
5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6	Gabapentin 75 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
7	Pregabalin 49 ng/mL	Pregabalin 65453 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
8	Norkodein 37 ng/mL Pregabalin 62 ng/mL	Pregabalin 76631 ng/mL	49 ng/mL	Negatif	Negatif
9	Pregabalin 102 ng/mL	Pregabalin 143876 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
10	Pregabalin 27 ng/mL	Pregabalin 42376 ng/mL	10 ng/mL	Negatif	Negatif
11	Negatif	Pregabalin 1596 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
12	Pregabalin 51 ng/mL	Pregabalin 200769 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
13	Pregabalin 792 ng/mL	Pregabalin 148756 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
14	Gabapentin 239 ng/mL	Metamfetamin 92 ng/mL Gabapentin 107660 ng/mL	Negatif	Negatif	124 ng/mL
15	Pregabalin 25763ng/mL Metamfetamin 946 ng/mL	Pregabalin 222243 ng/mL Metamfetamin 5977 ng/mL	137 ng/mL	Negatif	2144 ng/mL
16	Negatif	Pregabalin 2757 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
17	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
18	Pregabalin 152 ng/mL	Pregabalin 297835 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
19	Morfin 1013 ng/mL Kodein 186 ng/mL 6-MAM 112 ng/mL	Morfin 433 ng/mL Norkodein 507 ng/mL 6-MAM 183 ng/mL	597 ng/mL	Negatif	Negatif
20	Pregabalin 436 ng/mL	Pregabalin 375802 ng/mL	Negatif	Negatif	170 ng/mL
21	Pregabalin 38 ng/mL	Pregabalin 74373 ng/mL	291 ng/mL	Negatif	Negatif
22	Morfin 900 ng/mL Kodein 147 ng/mL 6-MAM 671 ng/mL	Morfin 3035 ng/mL Kodein 362 ng/mL 6-MAM 1386 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif
23	Pregabalin 304 ng/mL	Pregabalin 299431 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
24	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
25	Pregabalin 720 ng/mL Metamfetamin 1004 ng/mL	Pregabalin 724475 ng/mL Metamfetamin 1320 ng/mL	212 ng/mL	Negatif	1569 ng/mL
26	Pregabalin 311 ng/mL	Pregabalin 53772 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
27	Pregabalin 68 ng/mL	Morfin 58 ng/mL Norkodein 123 ng/mL Pregabalin 592271 ng/mL Normorfin 86 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif
28	Pregabalin 25 ng/mL	Pregabalin 146062 ng/mL	346 ng/mL	Negatif	Negatif
29	Morfin 662 ng/mL Kodein 72 ng/mL 6-MAM 56 ng/mL Metamfetamin 164 ng/mL	Morfin 1193 ng/mL Norkodein 1546 ng/mL Kodein 187 ng/mL 6-MAM 582 ng/mL Metamfetamin 259 ng/mL Normorfin 91 ng/mL	> 3000 ng/mL	85 ng/mL	3358 ng/mL

30	Pregabalin 401 ng/mL	Pregabalin 257359 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
31	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
32	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
33	Negatif	Pregabalin 4309 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
34	Pregabalin 206 ng/mL	Pregabalin 348217 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
35	Pregabalin 481 ng/mL	Pregabalin 329026 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
36	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
37	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
38	Pregabalin 899 ng/mL Metamfetamin 80 ng/mL	Pregabalin 702860 ng/mL Metamfetamin 1163 ng/mL	Negatif	Negatif	1806 ng/mL
39	Pregabalin 485 ng/mL Metamfetamin 313 ng/mL	Pregabalin 59955 ng/mL Metamfetamin 773 ng/mL	Negatif	Negatif	1285 ng/mL
40	Pregabalin 320 ng/mL	Pregabalin 342476 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
41	Pregabalin 97 ng/mL	Morfin 52 ng/mL Norkodein 93 ng/mL Pregabalin 146208 ng/mL Norbuprenorfin 53 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	106 ng/mL
42	Negatif	Norkodein 93 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	111 ng/mL
43	Buprenorfin 623 ng/mL Nalokson 30 ng/mL	Pregabalin 18371 ng/mL Norbuprenorfin 143 ng/mL	437 ng/mL	Negatif	197 ng/mL
44	Negatif	Pregabalin 3703 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
45	Pregabalin 142 ng/mL	Pregabalin 377369 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
46	Pregabalin 58 ng/mL	Pregabalin 79577 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
47	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
48	Pregabalin 63 ng/mL	Pregabalin 268334 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
49	Pregabalin 33 ng/mL Metamfetamin 113 ng/mL	Pregabalin 113633 ng/mL Metamfetamin 4132 ng/mL	36 ng/mL	Negatif	3527 ng/mL
50	Pregabalin 510 ng/mL	Pregabalin 211005 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
51	Pregabalin 130 ng/mL Metamfetamin 258 ng/mL	Pregabalin 323517 ng/mL Metamfetamin 2345 ng/mL	Negatif	Negatif	2199 ng/mL
52	Pregabalin 583 ng/mL	Pregabalin 736023 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
53	Pregabalin 135 ng/mL Metamfetamin 448 ng/mL	Pregabalin 384474 ng/mL Metamfetamin 7301 ng/mL Gabapentin 826 ng/mL	Negatif	Negatif	3138 ng/mL
54	Gabapentin 177 ng/mL	Gabapentin 151441 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
55	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
56	Pregabalin 76 ng/mL	Pregabalin 39240 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
57	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
58	Pregabalin 802 ng/mL Metamfetamin 35 ng/mL	Norkodein 61 ng/mL Pregabalin 564856 ng/mL Metamfetamin 244 ng/mL	2230 ng/mL	Negatif	Negatif
59	Pregabalin 292 ng/mL	Morfin 111 ng/mL Norkodein 324 ng/mL Pregabalin 724755 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif

60	Morfin 47 ng/mL Gabapentin 383 ng/mL	Morfin 379 ng/mL Norkodein 710 ng/mL Kodein 87 ng/mL Naltrekson 176 ng/mL Normorfin 55 ng/mL Gabapentin 155660 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif
61	Morfin 1141 ng/mL Kodein 188 ng/mL	Morfin 2389 ng/mL Norkodein 5503 ng/mL Kodein 1324 ng/mL 6-MAM 1809 ng/mL Etilmorfin 115 ng/mL Normorfin 255 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	114 ng/mL
62	Pregabalin 311 ng/mL	Pregabalin 380674 ng/ml	Negatif	Negatif	Negatif
63	Nalokson 37 ng/mL Buprenorfin 754 ng/mL	Norbuprenorfin 189 ng/mL Norkodein 129 ng/mL	1192 ng/mL	Negatif	Negatif
64	Negatif	Morfin 69 ng/mL Norkodein 129 ng/mL	2581 ng/mL	Negatif	Negatif
65	Eroin 44 ng/mL Morfin 577 ng/mL Pregabalin 860.7 ng/mL Kodein 75 ng/mL 6-MAM 625 ng/mL Metamfetamin 1539 ng/mL Buprenorfin 65 ng/mL	Morfin 688 ng/mL Norkodein 1314 ng/mL Pregabalin 445788 ng/mL Kodein 161 ng/mL 6-MAM 487 ng/mL Metamfetamin 7003 ng/mL Norbuprenorfin 107 ng/mL	> 3000 ng/mL	48 ng/mL	2709 ng/mL
66	Morfin 274 ng/mL Pregabalin 156 ng/mL 6-MAM 63 ng/mL Metamfetamin 92 ng/mL	Morfin 597 ng/mL Norkodein 1070 ng/mL Pregabalin 213735 ng/mL Kodein 148 ng/mL 6-MAM 249 ng/mL Metamfetamin 469 ng/mL Normorfin 69 ng/mL Norbuprenorfin 88 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	401 ng/mL
67	Morfin 290 ng/mL 6-MAM 59 ng/mL	Morfin 431 ng/mL Norkodein 894 ng/mL Kodein 304 ng/mL 6-MAM 64 ng/mL Normorfin 133 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif
68	Gabapentin 313 ng/mL	Pregabalin 739 ng/mL Gabapentin 297072 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
69	Negatif	Negatif	1003 ng/mL	Negatif	Negatif
70	Morfin 273 ng/mL Kodein 30 ng/mL 6-MAM 153 ng/mL	Morfin 506 ng/ml Norkodein 1110 ng/ml Kodein 91 ng/mL 6-MAM 694 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	123 ng/mL
71	Morfin 815 ng/mL Kodein 40 ng/mL 6-MAM 295 ng/mL Metamfetamin 2883 ng/mL	Morfin 649 ng/mL Norkodein 1563 ng/mL Kodein 210 ng/mL 6-MAM 907 ng/mL Metamfetamin 5131 ng/mL Normorfin 90 ng/mL	> 3000 ng/mL	56 ng/mL	3219 ng/mL
72	Naltrekson 86 ng/mL	Naltrekson 472 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif

73	Morfin 1823 ng/mL Kodein 90 ng/mL 6-MAM 195 ng/mL Pregabalin 973 ng/mL	Morfin 420 ng/mL Norkodein 954 ng/mL Pregabalin 420643 ng/mL Kodein 185 ng/mL 6-MAM 31 ng/mL Normorfin 60 ng/ml	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif
74	Naltrekson 41 ng/mL	Naltrekson 417 ng/mL	Negatif	Negatif	Negatif
75	Morfin 128 ng/mL Metamfetamin 1227 ng/mL	Metamfetamin 7406 ng/mL	> 3000 ng/mL	74 ng/mL	3736 ng/mL
76	Normorfin 41 ng/mL Morfin 2930 ng/mL Kodein 157 ng/mL 6-MAM 734 ng/mL	Morfin 989 ng/mL Norkodein 2180 ng/mL Kodein 377 ng/mL 6-MAM 580 ng/mL Etilmorfin 25 ng/mL Normorfin 229 ng/mL Metamfetamin 83 ng/mL	> 3000 ng/mL	Negatif	Negatif

Tablo 4.25. İdrar LC-MS/MS sonuçlarının hasta gruplarına göre karşılaştırılması

	İlk başvuru	Nal/Bup	Naltrekson
Negatif	1	0	13
Pregabalin	1	0	28
Gabapentin	1	0	1
Pregabalin/Gabapentin ve yasaklı madde	4	5	11
Yasaklı madde	5	1	5
Toplam	12	6	58

4.4.5. İdrar Numunelerinin Glukronidaz ile Analizi

İdrar numunelerinde morfin düzeylerine glukronidasyonun etkisini değerlendirmek amacı ile glukronidaz çalışması yapıldı. İmmünojenik yöntem ile opiat sonuçları negatif dışında sonuç veren tüm idrar numuneleri glukronidaz enzimi ile 60 dk inkübe edildi. Bu işlem sonrası numunelerde idrar LC-MS/MS yöntemi ile madde analizleri gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde sadece morfin pikleri için kantitatif okumalar gerçekleştirildi. Bu çalışmada elde edilen morfin sonuçları (Glukronidaz +) işlem öncesi alınan morfin analiz sonuçları (Glukronidaz -) ve immünojenik yöntem opiat sonuçları ile karşılaştırıldı. Tablo 4.26'da idrar numunelerinde immünojenik yöntemde en düşük kalibratör değerinin üzerinde sonuç alınan idrar numunelerinin sonuçları verilmiştir. İmmünojenik yöntem için 2.000 ng/mL eşik değer ve LC-MS/MS yöntemi için 50ng/mL eşik değeri (LOQ) kullanılarak sonuçlar karşılaştırıldı.

Tablo 4.26. İdrar numunelerinde morfin sonuçlarının karşılaştırılması

Hasta No	LC-MS/MS Glukronidaz - Morfin (ng/mL)	LC-MS/MS Glukronidaz + Morfin (ng/mL)	İmmünojenik Yöntem Glukronidaz - Morfin (ng/mL)
2	45	828	2318,7
15	43	357	Negatif
19	433	1007	Negatif
22	3035	7051	>3000
27	58	734	>3000
29	1193	3249	>3000
41	52	594	>3000
42	28	835	>3000
43	Negatif	55,1	Negatif
58	21,4	438	2230,8
59	111	1793	>3000
60	379	3040	>3000
61	2389	7837	>3000
63	Negatif	410	Negatif
64	69	1421	2581
65	688	4182	>3000
66	597	3350	>3000
67	431	3511	>3000
69	Negatif	57,4	Negatif
70	506	3074	>3000
71	649	4005	>3000
73	420	3765	>3000
75	17,8	205	>3000
76	989	4325	>3000

Tablo 4.27. Hasta numunelerinin morfin sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması.

Grup	Grup tanımı	Hasta sayısı	Yüzde (%)
A	TL(-) İL(-) İY (-)	56	74
B	TL(+) İL(+) İY (+)	11	14
C	TL(-) İL(+) İY (+)	4	5
D	TL(+) İL(-) İY (+)	2	3
E	TL(-) İL(-) İY (+)	2	3
F	TL(+) İL(+) İY (-)	1	1
	Toplam	76	100

*TL: Tükürük LC-MS/MS, İL: İdrar LC-MS/MS, İY: İdrar İmmünolojik Yöntem

Tablo 4.28. Hasta numunelerinin kodein sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması

Grup	Grup tanımı	Hasta sayısı	Yüzde (%)
A	TL(-) İL(-)	64	84
B	TL(+) İL(+)	8	11
C	TL(-) İL(+)	3	4
D	TL(+) İL(-)	1	1
	Toplam	76	100

*TL: Tükürük LC-MS/MS, İL: İdrar LC-MS/MS, İY: İdrar İmmünolojik Yöntem

Tablo 4.29. Hasta numunelerinin 6-MAM sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması

Grup	Grup tanımı	Hasta sayısı	Yüzde (%)
A	TL(-) İL(-)	65	86
B	TL(+) İL(+)	10	13
C	TL(-) İL(+)	1	1
	Toplam	76	100

*TL: Tükürük LC-MS/MS, İL: İdrar LC-MS/MS, İY: İdrar İmmünolojik Yöntem

Tablo 4.30. Hasta numunelerinin metamfetamin sonuçlarının gruplandırılarak karşılaştırılması

Grup	Grup tanımı	Hasta sayısı	Yüzde (%)
A	TL(-) İL(-) İY (-)	61	80
B	TL(+) İL(+) İY (+)	11	14
C	TL(-) İL(+) İY (-)	2	3
D	TL(+) İL(+) İY (-)	2	3
	Toplam	76	100

*TL: Tükürük LC-MS/MS, İL: İdrar LC-MS/MS, İY: İdrar İmmünolojik Yöntem

5. TARTIŞMA

Opioid kullanım bozukluğu (OKB) için ilaç tedavisinin yeri çok önemlidir. Bu amaçla metadon, buprenorfin, nalokson ve naltrekson gibi ilaçlar kullanılmaktadır. OKB tanısında, tedaviye uyum değerlendirilmesinde ve aşırı doz alımına bağlı akut entoksikasyonlarda idrar veya kan gibi hasta numunelerinde bu bileşiklerin laboratuvar analizlerine gereksinim duyulmaktadır. İdrar numunelerinde gerçekleştirilen analizlere ek olarak, noninvaziv ve kolay elde edilebilen tükürük numunelerinde madde analizleri de büyük önem taşımaktadır. Tükürük numunesinin yasaklı madde analizleri, terapötik ilaç izlemi veya klinik toksikoloji analizleri için kullanımı mümkündür. Yasaklı madde analizlerinde idrar yerine tükürük kullanımlarının avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar başlıca tükürük numunesinin kolay ve hızlı biçimde elde edilebilmesi, numune müdahalelerine imkân vermemesi, idrar numuneleri için gereken gözetim memuru bulundurulma zorunluluğu ve özel donanımlı tuvalet alt yapısına gereksinimlerinin olmaması olarak özetlenebilir. Bu nedenlerle, bu tez çalışmasında idrar numuneleri için LC-MS/MS metodlarının kullanımının yasaklı madde analizleri için yaygın kullanımı bulunmakla beraber dezavantajları düşünülerek tükürük numuneleri için de bir LC-MS/MS metodu geliştirildi.

Çalışmamızda, OKB tedavisinde kullanılan ilaçların, metabolitlerinin ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddelerin bir panel olarak idrar ve tükürük numunelerinde kantitatif analizini gerçekleştiren LC-MS/MS yöntemlerinin geliştirilmesi hedeflendi. Bu amaçla hem idrar hem de tükürük LC-MS/MS metodları için 16 opioid grubu madde, 3 kokain grubu madde, 5 amfetamin grubu madde ve pregabalin, gabapentin maddelerinin çalışmaya alınmasına karar verildi (Tablo 2.8.).

Günümüzde OKB hastalarının tedavi yaklaşımlarında öncelikle detoksifikasyon, sonra idame olmak üzere iki aşama bulunmaktadır. Detoksifikasyon tedavisinin amacı kişiyi bağımlılık yapan maddelerden arındırmak, yoksunluk belirtilerini yatıştırmak ve idame tedavisine geçişi sağlamaktır [105]. Güvenli bir detoksifikasyon tedavisine başlangıç için hastalarda opioid madde analizi yapılması ve negatif sonuç alınması gerekmektedir. Opioid madde analiz sonuçları OKB tedavilerinin planlanması için büyük önem taşımaktadır. Analiz sonucu pozitif alındığı durumda detoksifikasyona

başlamak için tedavi sürecinin ertelenmesi, negatif sonuç alınıncaya kadar beklenmesi en güvenilir yoldur [106]. Bu nedenle, opioidlerin kullanımının olup olmadığının tespiti için morfin, normorfin, kodein, norkodein, dihidrokodein, eroin, etilmorfin, oksikodon, 6-MAM ve tramadol maddeleri analiz kapsamına alındı.

Detoksifikasyon tamamlandığında geçilen idame aşamasında agonist veya antagonist tedaviler uygulanır. Agonist tedavilerinde kullanılan Nalokson/Buprenorfin preparatlarının reçete yazımı öncesinde tedaviye uyumun değerlendirilmesi, yasaklı madde kullanımı ve tedavi edilen ilacın suistimalinin olup olmadığını tespiti için bu maddelerin analizleri gerekmektedir [107]. Antagonistik idame tedavisinde kullanılan cilt altı naltrekson implant uygulaması öncesi hastalardan madde analizi istenmektedir. Çünkü, bu uygulamada opioid kullanımı kontrendike olup madde saptanması durumunda tedavi ertelenmektedir [108]. Naltrekson tedavisinde kullanılan cilt altı implantların ortalama üç aylık etkinlik süresi olduğu kabul edilerek hastalara implant değişimleri için bu süreye göre planlama yapılmaktadır. Ancak, kişiler arası farmakokinetik farklılıklar nedeni ile, bireysel ilaç düzeyi izleminin tedavi optimizasyonu için yararlı olacağı bir gerçektir. Bu tedavinin uygunlandığı merkezlerde implanttaki salınımı takip için naltrekson maddesinin düzeylerinin analizinin de süreç yönetiminde gerekli olduğu düşünülmüştür [109]. Bu gereksinimler göz önüne alınarak, çalışmamızda tedavi sürecinin izlemi için agonist ve antagonist ilaçlar ve metabolitleri (buprenorfin, norbuprenorfin, nalokson, naltrekson, metadon ve EDDP) de analiz kapsamına eklendi.

Genellikle OKB hastalarında opioid bağımlılığı ile birlikte amfetamin, kokain, esrar ve benzodiazepin grubu madde kullanımlarına da rastlanmaktadır [110]. Tedavi sırasında beraber kullanıldığında aşırı doz ölümlerine sebep olabilecek [111, 112] kokain, kokaetilen, BEG, metamfetamin, MBDB, MDA, MDEA ve MDMA bu nedenle çalışma kapsamına alındı. Opioid yoksunluk semptomlarının giderilmesi amacı ile OKB tedavilerinde reçete edilen ancak büyük oranda suistimalinin de görüldüğü gabapentinoidler grubunda olan pregabalin ve gabapentin de çalışma kapsamına alınmıştır (Tablo 2.8.). Öte yandan, esrar kullanımının tedavi süreç yönetiminde bir etkisi bulunmamaktadır. Ülkemizde benzodiazepinler yeşil reçete ile temin edilmekte ve suistimaline az rastlanmaktadır. Bu nedenlerle esrar ve

benzodiazepinler, panelimizi minimal olarak düzenlemek amacı ile analiz kapsamına alınmamıştır [113, 114].

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na OKB tedavisi için ilk kez başvuran veya OKB tanısı alarak tedavi izlemine alınanlar içinden çalışmamıza katılmaya kabul edenler "Dahil edilme" (Tablo 3.5.) ve "Dahil edilmeme" (Tablo 3.6.) kriterlerine göre değerlendirildi ve çalışma için toplam 76 hasta seçildi. Hastalardan eş zamanlı olarak idrar ve tükürük numuneleri toplandı. Hastalarımızın 70'i erkek (%92) ve 6'sı (%8) kadın ve yaş ortalaması 28 (21-41) yaş olarak uluslararası ve ulusal yayınlardaki verilerle uyumlu olarak bulundu [115, 116]. Çalışmaya dahil edilen hastaların 12'si (%16) kuruma tedavi için ilk kez başvuruda bulunan hastalar iken, 6'sı (%8) nalokson/buprenorfin (oral) ve 58'i (%76) naltrekson (S.C. implant) tedavisi almaktaydı.

Çalışmamız için toplanan idrar numuneleri için bütünlük testi olarak pH, dansite, nitrit ve kreatinin analizleri yapıldı. Analizler sonucunda numunelerde dilüsyon veya müdahale düşündürecek bir sonuç saptanmadı (Tablo 4.23.).

İdrar ve tükürük için geliştirilen LC-MS/MS yöntemlerinin validasyon çalışma planları ve performans kriterleri SWGTOX'a uygun biçimde belirlenerek gerçekleştirildi (Tablo 3.13.).

İdrar ve tükürük LC-MS/MS metodu için analizine karar verilen maddelerin MRM taramalarında kullanılmak üzere ana ve yavru iyon seçimleri için literatür taraması yapıp [117-122] en iyi pik intensitesi veren kütle/yük (m/z) değerleri seçilerek metot aplikasyonları gerçekleştirildi (Tablo 3.7., Tablo 3.8., Tablo 3.10., Tablo 3.11.). Analitik aralık ve doğrusalılık çalışmasında idrar için 50-400 ng/mL aralığında, tükürük için 25-800 ng/mL aralığında doğrusal yanıt alındığı ve her iki matriks için de regresyon değerlerinin $\geq 0,99$ olduğu saptandı (Tablo 4.2. ve 4.12.). LOD değerlerinin idrar için 2,9- 13,8 arasında (Tablo 4.3.) tükürük için 3,6-21,6 arasında (Tablo 4.13.) olduğu belirlendi. Çalışma kapsamında alınan 26 madde için idrar LC-MS/MS yönteminde kantitasyon sınırı (LOQ) 50 ng/mL ve tükürük LC-MS/MS yönteminde kantitasyon sınırı (LOQ) 25 ng/mL olarak belirlendi. İdrar LC-MS/MS yönteminde tüm maddeler için % Bias değerleri -5,1 ile 4,1 arasında tükürük LC-MS/MS yönteminde % Bias değerleri -10,0 ile 7,4 arasında ve her ikisi için de belirlenen hedefler içinde bulundu. Tükürük yöntemi için akredite bir merkezle

yapılan Bias karşılaştırması sonuçları da tüm maddeler için -19,9 ile 2,6 arasında ve ± 20 içinde bulundu. Tükürük Bias değerlerinin idrar yöntemine göre daha yüksek bulunmasının matris etkisinden, hazırlık işleminden kaynaklandığı düşünüldü. İdrar metodu için gün içi ve günler arası % CV değerleri %0,1- %6,3 ve %1,9- %8,8 arasında bulundu. Tükürük metodu için gün içi ve günler arası % CV değerleri %0,2- %10,8 ve %1- %13,7 arasında bulundu. İdrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemleri için gerçekleştirilen sürüklenme, girişim ve iyonizasyon etkileşimi çalışmaları belirlenen hedefler içinde ve birbiri ile uyumlu olarak bulundu. Her iki yöntem için de validasyon çalışmaları tamamlandı.

Bu tez çalışmasında OKB hastalarının tanı ve tedavi izleminde yararlanılmak üzere klinik amaçla kullanılacak yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle geliştirilen yöntemler yapılan hasta numune analizlerinin değerlendirilmesinde eşik değer olarak kantitasyon sınırları kullanıldı. Krock ve arkadaşları da tedavi izlemi amaçlı kullanılan madde analizlerinde duyarlılığı yüksek LC-MS/MS yöntemleri için düşük eşik değerlerin seçilmesinin hasta uyumunun değerlendirilmesinde daha yararlı olduğunu bildirmişlerdir [123].

Yaptığımız literatür araştırmamızda, tükürük numunelerinde LC-MS/MS ile madde analizlerinin etken maddeler için genellikle ayrı ayrı geliştirildiği kimi zaman da sadece opioidler için birkaç maddenin analiz edildiği belirlendi [124-126]. Tükürük numunelerinin LC-MS/MS metodu ile çalışılması için genellikle ön hazırlık aşaması uzun prosedürler gerektirmektedir [126-128]. Birçok çalışmada; tükürük toplamak için özel toplama kapları, tükürük numunelerinde protein çöktürme sonrası filtre kullanımı [129], protein çöktürme sonrası süzüntüyü azot altında kurutma [127] gibi hem çalışmanın numune hazırlama aşamasını uzatan hem de fazla sarf malzeme kullanımı gerektiren uygulamalar olduğu görüldü. Çalışmamızda tükürük numuneleri ön hazırlık aşaması için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu optimizasyon çalışmaları sonucunda tükürük numunelerinin ön hazırlığı için sırasıyla %100 metanol ile çöktürme, santrifügasyon ve ardından süzüntünün elde edilmesi basamaklarının uygulanmasına karar verildi. Bu şekilde ön hazırlık aşaması maliyetli sarfların kullanımını gerektirmeden hızlı biçimde gerçekleştirilmiş oldu.

Hastalarımızdan eş zamanlı olarak alınan idrar ve tükürük numunelerinin validasyonları tamamlanan metodlarla analizleri gerçekleştirildi (Tablo 4.24.).

Çalışma için toplanan 76 adet idrar ve tükürük numunesinde çalışma kapsamına alınan 26 madde'den 14 tanesinin (6-MAM, buprenorfin, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin, pregabalin) kullanımı tespit edildi. Hastalarımızda diğer 12 maddenin (EDDP, BEG, dihidrokodein, kokain, kokaetilen, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, metadon, oksikodon, tramadol) kullanımı tespit edilmedi.

Çalışmamız kapsamındaki hastaların ilk başvuru grubunda olan 12 hastadan 1'i negatif; 2'si pregabalin veya gabapentin, 4'ü pregabalin/gabapentin ile birlikte yasaklı madde ve 5'i yasaklı madde pozitif olarak belirlendi. Nalokson/Buprenorfin tedavisi altındaki hasta grubundan 5'i pregabalin veya norbuprenorfin ile birlikte yasaklı madde ve 1'i yasaklı madde pozitif olarak belirlendi. Naltrekson grubundaki hastalardan 13'ü negatif, 28'i sadece pregabalin, 1'i pregabalin ve gabapentin, 11'i pregabalin/gabapentin ile birlikte yasaklı madde ve 5'i sadece yasaklı madde pozitif olarak belirlendi. Hasta gruplarına göre pozitif sonuçlar Tablo 4.27'de özetlenmiştir. Naltrekson grubunda hastaların %50'sinin gabapentinoid madde saptanmakla beraber hastaların %19'unda gabapentinoid madde ile beraber yasaklı madde tespit edildi. Antagonist Naltrekson tedavi grubundaki 58 hastanın idrar LC-MS/MS yöntemi analizleri incelendiğinde sadece 3'ünde (%5) naltrekson tespit edilerek bu hastaların implantlarından naltrekson salınımının devam etmekte olduğu belirlendi. Bu gruptaki hastalar implant takıldıktan 3 ay sonra yeni implantın takılması için randevü olarak geldikleri dönemde numune alınmıştı. Bu nedenle bu hasta grubunun büyük çoğunluğunda (%95) implantlarındaki madde salınımı sonlanmış olarak bulundu. Naltrekson implantlarından madde salınımı hasta metabolizmasına göre değişmektedir. Naltrekson düzeylerinin reçete edilme süresi olan 3 aylık süreler beklenmeden daha kısa aralıklarla belirlenmesi ve negatif bulunan hastalara yeni implant için planlama yapılmasının gerektiği belirlenmiştir. Çalışmamızda geliştirilen yöntem ile naltrekson ölçümlerinin yapılmasının bu tedavinin uygunlandığı merkezlerde yararlı olacağı sonucuna varılmıştır. Naltrekson tedavisinde kullanılan cilt altı implantların ortalama üç aylık etkinlik süresi olduğu kabul edilmesine karşın, farmakokinetik farklılıklar nedeni ile, naltrekson düzeyi izleminin tedavi optimizasyonu için yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

İdrar ve tükürük numunelerinin morfin analizleri karşılaştırıldığında 56 (%74) hasta sonucunun negatif olarak uyumlu olduğu görüldü (Tablo 4.27. Grup A). Aynı şekilde 11 (%14) hastanın pozitiflik oranlarının uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 4.27. Grup B). Tüm hastalar içinde pozitiflik ve negatifliklerin uyumu %88 olduğu saptandı. Dört hastada (27, 41, 60, 64. hastalar) immünolojik yöntem ve idrar sonuçları pozitif olarak saptanırken tükürük sonuçlarının negatif olduğu belirlendi (Tablo 4.27. Grup C). Bu hastaların idrar morfin düzeylerinde glukronidaz aktivitesi sonrası belirgin artış saptandı (Tablo 4.26). Morfinin yaklaşık olarak %60'ı morfin 3-glukronid, %5'i morfin 6-glukronid maddelerine metabolize olmaktadır [130]. Bu hastalarda, morfin glukronid olarak bulunan morfin metabolitlerinin yüksek bulunması nedeni ile tükürükte negatif sonuç alındığı düşünüldü. İki hastada (2 ve 75. hastalar) immünolojik yöntem ve tükürük analizlerinde pozitif sonuç alınırken idrar LC-MS/MS yönteminde negatif sonuç olduğu görüldü. Bu hastaların idrar numunelerinin glukronidaz aktivitesi sonrası değerlendirmelerinde pozitif sonuç alındı. Bu hastalar için idrar morfin sonuçlarının LOQ altında olmakla beraber LOD değeri olan 9 ng/mL üzerinde olduğu (2. hasta için 45,7 ng/mL, 75. hasta için 17,8 ng/mL) görüldü. Rutin analiz sürecinde glukronidaz aktivitesinin gerekli olmadığı düşünülmeyle birlikte morfin için LOD değerlerinin üzerindeki sonuçların glukronidaz aktivitesi sonrası tekrar değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı. İki hastada (42. ve 58. hastalar) immünolojik yöntem ile pozitif sonuç alınırken LC-MS/MS yöntemlerinde tükürük ve idrar için negatif sonuç alındı. Bu hastalardan 42. hastanın tükürük ve idrar morfin sonuçları LOD değerinin üzerinde ve 58. hastanın idrar morfin sonucunun LOD üzerinde olduğu saptandı. Glukronidaz aktivitesi sonrası her iki hastanın idrar morfin sonuçlarının da pozitif olduğu belirlendi. Ancak hasta 58 için tükürükte morfin belirlenmedi. Rutin analiz sürecinde glukronidaz aktivitesinin gerekli olmadığı düşünülmeyle birlikte morfin için LOD değerlerinin üzerindeki sonuçların Glukronidaz aktivitesi sonrası tekrar değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı. Ayrıca bir hastada (Hasta 19.) immünolojik yöntem sonucu negatif bulunurken idrar LC-MS/MS (Glukronidaz öncesi 433 ng/mL, glukronidaz sonrası 1007 ng/mL) ve tükürük (1.013,6 ng/mL) sonuçlarının pozitif olduğu saptandı. Bu hasta için idrar bütünlük testlerinin belirlenen hedefleri aşmamakla birlikte (kreatinin 26.35, dansite 1005) oldukça dilüsyonlu olduğu belirlendi. İmmünolojik yöntem için sonucun eşik

değer altında olmakla beraber 597 ng/mL düzeylerinde olması nedeni ile bu idrar numunesi için dilüsyon nedeni ile negatif sonuç alınmış olabileceği düşünüldü.

İdrar ve tükürük numunelerinin LC-MS/MS kodein analizleri karşılaştırıldığında 64 hasta sonucunun (%84) negatif olarak (Tablo 4.28. Grup.A) ve 8 hasta sonucunun (%11) pozitif olarak (Tablo 4.28. Grup.B) uyumlu olduğu belirlendi. Tüm hastalar için pozitif-negatif sonuç uyumluluğu %95 olarak bulundu. Üç hastada (60., 66. ve 67. hastalar) idrar sonuçları pozitif saptanırken tükürük sonuçlarının negatif olduğu belirlendi (Tablo 4.28. Grup. C). Bir hastada (19. hasta) idrar sonucu negatif bulunurken tükürük sonucu pozitif saptandı (Tablo 4.28. Grup.D). Tükürük ve idrar numunelerinde yasaklı madde analizi için birçok saptama penceresi çalışmaları bulunmaktadır. Alain G. Verstraete 2004 yılında yaptığı çalışma ile madde alımından sonra idrar numunelerinde ortalama saptama penceresini 1,5 – 4 gün aralığında, tükürük numunelerinde 5 – 48 saat aralığında bildirmiştir[93]. [101]. Bu hastalarda kodein tespit edilememesi sebebinin tükürük için saptama penceresinin dışında olduğu düşünüldü.

6-MAM maddesinin idrar ve tükürük LC-MS/MS analizleri karşılaştırıldığında 65 (%86) hastanın sonucunun negatif olarak uyumlu olduğu görüldü (Tablo 4.29. Grup.A). Aynı şekilde 10 (%13) hastanın pozitiflik oranlarının uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 4.29. Grup.B). Tüm hastalar için pozitif negatiflik uyumluluğu %99 olduğu saptandı. Bir hastada (61) idrar sonucu pozitif tespit edilirken tükürük sonucu negatif tespit edildi. Bu hastanın 6-MAM maddesinin tükürük saptama penceresi penceresi dışında olduğu düşünüldü [101].

Normorfin, norkodein ve etilmorfin maddelerinin idrar ve tükürük LC-MS/MS analizleri karşılaştırıldığında 60 (%79) hastanın sonucunun negatif olarak uyumlu olduğu görüldü. 16 hastanın idrar numunesinde norkodein, 8 hastanın idrar numunesinde normorfin, 2 hastanın idrar numunesinde etilmorfin tespit edildi. Tükürük matriksine pasif difüzyon mekanizması ile 300 Da'dan küçük ve polar olan bileşikler geçmektedir[131]. Opioid maddelerin metabolitleri yüksek polarite ve zayıf lipofilik özelliğe sahip olduğu için tükürük matriksine pasif difüzyon ile daha zor geçmektedir [132]. Çalışmamızdaki morfinin ve kodeinin karaciğerde Sitokrom P450 oksidasyonu sonucu oluşan normorfin [133] ve norkodein [134]ve morfin maddesine kimyasal olarak etoksi grubu eklenmesiyle türetilen [135] etilmorfin analizleri idrar ve

tükürük numunelerinde karşılaştırıldığında tükürük numunelerinde bu metabolitlerin yüksek polariteleri yüzünden geçemediği için tespit edilmediği düşünüldü.

İdrar ve tükürük numunelerinin LC-MS/MS metamfetamin, immünolojik amfetamin grup analizleri karşılaştırıldığında 61 (%81) hastanın sonucunun negatif olarak uyumlu olduğu görüldü (Tablo 4.30. Grup.A). Aynı şekilde 11 (%14) hastanın pozitiflik oranlarının uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 4.30. Grup.B). Tüm hastalar için pozitif negatiflik uyumluluğu %95 olduğu saptandı. İki hastada (14. ve 76. hasta) idrar LC-MS/MS analizleri pozitif saptanırken tükürük LC-MS/MS ve idrar immünolojik yöntemde negatif saptandı (Tablo 4.30. Grup.C). Diğer iki hastada (58. ve 66. hasta) immünolojik yöntem amfetamin grubu negatif saptanırken idrar ve tükürük LC-MS/MS yönteminde pozitif saptandı (Tablo 4.30. Grup.D). Bu farklı saptanan sonuçlardan 14. ve 66. Hastaların immünolojik yöntem sonuçları sırasıyla 124, 401 ng/mL'lik konsantrasyonlar saptandığı ama bunların eşik değer altında olduğu için negatif saptandığı görüldü. 58. ve 76. hastaların idrar LC-MS/MS yöntemi konsantrasyonlarının da düşük olduğu görüldü.

Pregabalin maddesinin idrar ve tükürük LC-MS/MS analizlerin de 44(%58) hastada tespit edildi. 41 hastada hem tükürük hemde idrarda pozitif bulunurken 5 hastada (2., 11., 16., 44. ve 68. Hasta) tükürük numunelerinde tespit edilmedi. Pregabalin maddenin idrar ve tükürük analizleri karşılaştırıldığında tüm hastalar için pozitif negatiflik uyumluluğu %93 olduğu saptandı. Pregabalin maddesi proteine bağlı değildir, karaciğer enzimlerini indüklemeyen ve idrardan metabolize olmadan atılır [136]. Pregabalin idrar numuneleri konsantrasyonları sonuçlarımızda 739 – 795.577 ng/mL aralığında, tükürük numunelerinde 25 – 25.763 ng/mL aralığında bulundu. Pregabalin konsantrasyonları idrar numunelerinde oransal olarak büyük fark %98'inin metabolize olmadan atılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Pregabalin gibi GABA analogu olan gabapentin maddesi 4 eş idrar ve tükürük numunesin de tespit edilirken 6 nolu hasta da sadece tükürükte, 53 nolu hastada sadece idrarda tespit edildi.

İlk başvuru yapan 12 hastanın LC-MS/MS yöntemi analizleri incelendiğinde öncelikle %50 oranında opioid madde, %33 oranında metamfetamin kullanımı tespit edildi. Bu sonuçlara göre ilk tedaviye gelen hastaların detoksifikasyona başlamak için analizlerin önemi görüldü.

Agonist nalokson/buprenorfin tedavisi alan 6 hastanın idrar LC-MS/MS yöntemi analizleri incelendiğinde %66 oranında opioid kullanımı tespit edildi. Yapılan çalışmalarda da olduğu gibi agonistik tedavi alan hastaların relaps riskinin olduğu bilinmektedir[137]. Bu risk sebebiyle agonistik tedavide opioid madde analizinin önemli olduğu görüldü.

Antagonist naltrekson tedavi alan grupta %15 oranında opioid madde pozitifliği belirlendi. Yasaklı madde kullanımlarının bu oranda olmasının naltrekson düzeylerinin düşük ya da negatif olması ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü.

Tüm bu eş zamanlı alınan idrar ve tükürük numune sonuçları karşılaştırıldığında çıkan sonuçlar çoğunlukla birbirine uymaktadır. Geliştirdiğimiz idrar ve tükürük LC-MS/MS metodları OKB hastalarının tanı ve tedavisinde kullanılmak için faydalı olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, OKB tedavisinde kullanılan ilaçların, metabolitlerinin ve opioid grubundaki yaygın olarak kötüye kullanılan yasaklı maddelerin (6-MAM, BEG, buprenorfin, dihidrokodein, EDDP, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, kokaetilen, kokain, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin, oksikodon, pregabalın ve tramadol) bir panel olarak idrar ve tükürük numunelerinde kantitatif analizini gerçekleştiren LC-MS/MS yöntemleri geliştirildi ve validasyonları tamamlandı. Çalışmamız bu kapsamda yer alan maddelerin idrar ve tükürük analizlerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.

Validasyon sonuçlarına göre geliştirilen idrar ve tükürük LC-MS/MS metodlarının doğruluğu ve güvenilirliği gösterildi. Analitik aralık ve doğruluk, saptama ve kantitasyon sınırı, bias ve kesinlik, sürüklenme, girişim, iyonizasyon etkileşimi, dilüsyon bütünlüğü, dayanıklılık validasyon sonuçları belirlenen hedefler içinde ve birbiri ile uyumlu olarak bulundu. Validasyonu tamamlanan yöntemlerde idrar numuneleri için 50 ng/mL (LOQ), tükürük numuneleri için 25 ng/mL (LOQ) olarak karar sınırları belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 70'i erkek (%92) ve 6'sı (%8) kadın ve yaş ortalaması 28 (21-41) yaş, 12'si (%16) kuruma tedavi için ilk kez başvuruda bulunan hastalar iken, 6'sı (%8) nalokson/buprenorfin (oral) ve 58'i (%76) naltrekson (S.C. implant) tedavisi almaktaydı.

Çalışma için toplanan 76 adet idrar ve tükürük numunesinde çalışma kapsamına alınan 26 madde'den 14 tanesinin (6-MAM, buprenorfin, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin, pregabalın) kullanımını tespit edildi.

İdrar numunelerinin LC-MS/MS sonuçları, immünolojik yöntem ile çalışılan opiat, ekstazi ve amfetamin sonuçları ile karşılaştırıldı. İki yöntem pozitif-negatif sonuçlar için %92 oranında uyumlu bulundu. Ayrıca hastaların tedavisinde kullanılan ilaçların ve metabolitlerinin, opiat ölçümünde kullandığımız immünolojik yöntem üzerinde etkileşimlerinin olmadığı belirlendi.

Tüm hastalarda tükürük LC-MS/MS, idrar LC-MS/MS ve idrar immünolojik yöntem sonuçları karşılaştırıldığında morfin için %88 ve metamfetamin için %95 pozitif-negatif sonuç uyumluluğu bulundu.

Hastaların tedavisinde kullanılan ilaçların ve metabolitlerinin, opiat ölçümünde kullandığımız immünolojik yöntem üzerinde etkileşimlerinin olmadığı belirlendi.

LC-MS/MS yöntemi ile çalışılan tükürük ve idrar analizi sonuçları karşılaştırıldığında, tüm hastalarda kodein için %95, 6-MAM için %99, pregabalin için %93 pozitif-negatif sonuç uyumluluğu bulundu. Norkodein, normorfin ve etilmorfin idrar numunelerinde saptanırken tükürük numunelerinde tespit edilmedi. Tükürük matrisine geçmediği belirlenen bu maddelerin panelden çıkarılmasının uygun olacağı belirlendi.

İdrar numunelerinin LC-MS/MS yöntemi ile yapılan madde tarama analizlerinde morfin sonuçlarının LOD üzerinde bulunması durumunda glukronidaz aktivitesi sonrası tekrar değerlendirilme gerektiği sonucuna varıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların %54'ünde pregabalin maddesi tespit edildi. OKB tedavisinde yaygın olarak reçete edilmekte olan pregabalinin hasta numunelerinde analizinin tedaviye uyumu takip etmek açısından yararlı olduğu bu nedenle panelimizde bulunmasının önemli olduğu sonucuna varıldı.

OKB tedavisi için naltrekson cıaltı implantı yerleştirilen hastaların düzenli aralıklarla kontrole çağırılarak ilaç düzeylerinin izleminin gerekli olduğu belirlendi. Çalışmamızda geliştirdiğimiz idrar ve tükürük LC-MS/MS yöntemlerinin naltrekson düzeylerinin ölçümünde yararlı olacağı, hastaların relaps riskini önlemede katkı sağlayacağı düşünüldü.

Geliştirdiğimiz yöntemler ile yapılan analizler sonucunda idrar numuneleri için tespit edilen 14 madde (6-MAM, buprenorfin, eroin, etilmorfin, gabapentin, kodein, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin, norkodein, normorfin ve pregabalin) ile tükürük numuneleri için tespit edilen 11 maddenin (6- MAM, buprenorfin, eroin, gabapentin, kodein, metamfetamin, morfin, nalokson, naltrekson, norbuprenorfin ve pregabalin) dahil edildiği minimalize panellerin, opioid kullanım bozukluğu tanı ve tedavisinde kullanımının yararlı olacağı sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis*. The Lancet Psychiatry, 2016. **3**(8): p. 760-773.
2. Tarhan, N. and S. Nurmedov, *Bağımlılık (6. Bs.)*. İstanbul: Timaş, 2018.
3. Turgut, E., *Opioid Kullanım Bozukluğu Olan Hastalarda Sosyodemografik ve Klinik Özelliklerin İncelenmesi*. 2019.
4. Uzbay, İ.T., *Madde bağımlılığı: Tüm boyutlarıyla bağımlılık ve bağımlılık yapan maddeler*. 2015: İstanbul Tıp Kitabevi.
5. Widiger, T.A., et al., *DSM-IV sourcebook, Vol. 3*. 1997: American Psychiatric Publishing, Inc.
6. Regier, D.A., et al., *The conceptual development of DSM-V*. American Journal of Psychiatry, 2009. **166**(6): p. 645-650.
7. Güleç, G., F. Köşger, and A. Eşizoğlu, *DSM-5'te alkol ve madde kullanım bozuklukları*. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 2015. **7**(4): p. 448-460.
8. Uzbay, İ.T., *Beyin nasıl bağımlı oluyor*. Türk Eczacıları Birliği Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 2009. **21**: p. 34-48.
9. Barton, A., *Illicit drugs: Use and control*. 2011: Routledge.
10. Degenhardt, L. and W. Hall, *Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease*. The Lancet, 2012. **379**(9810): p. 55-70.
11. Vahia, V.N., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5: A quick glance*. Indian journal of psychiatry, 2013. **55**(3): p. 220.
12. Burtis, C.A. and D.E. Bruns, *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
13. Weid, M., J. Ziegler, and T.M. Kutchan, *The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, Papaver somniferum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(38): p. 13957-13962.
14. Pathan, H. and J. Williams, *British Journal of Pain*. British Journal of Pain, 2012. **6**(1): p. 11-16.
15. Kayaalp, S., *Opioid analjezikler; Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Basım*, Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık, 2005: p. 796-7.
16. Özden, S.Y., *Uyuşturucu madde bağımlılığı: teşhis-tedavi-tebdir*. 1992: Nobel.
17. Lu, X., et al., *LC-MS-based metabonomics analysis*. Journal of Chromatography B, 2008. **866**(1-2): p. 64-76.
18. ElMeshad, A.N., et al., *Core in cup ethylmorphine hydrochloride tablet for dual fast and sustained pain relief: formulation, characterization, and pharmacokinetic study*. AAPS PharmSciTech, 2020. **21**(7): p. 1-11.
19. Aşıcıoğlu, F., et al., *KODEİN VE KODEİN İÇEREN TIBBİ MÜSTAHZARLAR HAKKINDA UZMAN GÖRÜŞÜ*. Adli Tıp Dergisi, 2013.
20. Tang Girdwood, S.C., et al., *Perspectives from the Society for Pediatric Research: pharmacogenetics for pediatricians*. Pediatric Research, 2022. **91**(3): p. 529-538.

21. Debbag, S. and N. Çelebi, *KANSER AĞRISINDAKİ YENİ GELİŞMELER*. 2021.
22. Van Ree, J.M., M.A. Gerrits, and L.J. Vanderschuren, *Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine*. Pharmacological reviews, 1999. **51**(2): p. 341-396.
23. Brunton, L., J. Lazo, and K. Parker, *Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*, Çev. Ed: Süzer Ö, İstanbul, 2009: p. 1133-52.
24. Kapral, S., et al., *Tramadol added to mepivacaine prolongs the duration of an axillary brachial plexus blockade*. Anesthesia & Analgesia, 1999. **88**(4): p. 853-856.
25. Organization, W.H., *Tramadol Update Review: Report Agenda item 6.1*. Geneva: World Health Organization, 2014.
26. Kaneko, K., et al., *The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia*. Neuroscience letters, 2014. **562**: p. 28-33.
27. Camilleri, M., et al., *Emerging treatments in neurogastroenterology: a multidisciplinary working group consensus statement on opioid-induced constipation*. Neurogastroenterology & Motility, 2014. **26**(10): p. 1386-1395.
28. Dhaliwal, A. and M. Gupta, *Physiology, opioid receptor*. 2019.
29. Benarroch, E.E., *Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations*. Neurology, 2012. **79**(8): p. 807-814.
30. Porter, R.J., et al., *Mechanisms of action of antiseizure drugs*. Handbook of clinical neurology, 2012. **108**: p. 663-681.
31. Maremmani, I., M. Pacini, and P.P. Pani, *Basics on addiction: a training package for medical practitioners or psychiatrists who treat opioid dependence*. Heroin Addiction and Related Clinical Problems, 2011. **13**(2): p. 5-40.
32. Zadina, J.E., et al., *A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 499-502.
33. Calo, G., et al., *Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target*. British journal of pharmacology, 2000. **129**(7): p. 1261-1283.
34. Rang, H., et al., *How drugs act: general principles*. Pharmacology, 2007: p. 8-23.
35. Poortaheri, N., et al., *Health needs assessment of the residents of the informal settlements in South-eastern Iran: A case study of Bam city*. Journal of Education and Health Promotion, 2021. **10**.
36. Treadwell, S.D. and T.G. Robinson, *Cocaine use and stroke*. Postgraduate medical journal, 2007. **83**(980): p. 389-394.
37. Lewis, R.J., et al., *Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2004. **806**(2): p. 141-150.
38. Şatır, U.D.T.T., U.D.A. Kalyoncu, and U.D.Ö. Pektaş, *KOKAİN KULLANIM BOZULUĞUNDA BİRBİRİNİ TAKİP İKİ SÜRECİN DEĞERLENDİRİLMESİ*.
39. Masters, S.B., A.J. Trevor, and B.G. Katzung, *Basic and clinical pharmacology*. 2009: McGraw-Hill Companies, Incorporated.

40. Logan, B.K., *Methamphetamine-effects on human performance and behavior*. Forensic Science Review, 2002. **14**(1): p. 133-151.
41. Westfall, T.C. and D.P. Westfall, *Adrenergic agonists and antagonists*. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. New York, McGraw-Hill, 2006: p. 237-315.
42. Levine, B.S. and M. LeBeau, *Miscellaneous central nervous system depressants*, in *Principles of Forensic Toxicology*. 2020, Springer. p. 333-346.
43. Mackler, S. and E. Schweizer, *Benzodiazepines as anxiolytic agents: the risks of long-term treatment*. Hospital Practice (Office ed.), 1992. **27**(9A): p. 109-12, 115.
44. Zuardi, A.W., *History of cannabis as a medicine: a review*. Brazilian Journal of Psychiatry, 2006. **28**: p. 153-157.
45. Lipparini, F., A.S. De Carolis, and V. Longo, *A neuropharmacological investigation of some trans-tetrahydrocannabinol derivatives*. Physiology & Behavior, 1969. **4**(4): p. 527-532.
46. Hua, T., et al., *Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB1*. Cell, 2016. **167**(3): p. 750-762. e14.
47. Sharma, P., P. Murthy, and M.S. Bharath, *Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications*. Iranian journal of psychiatry, 2012. **7**(4): p. 149.
48. de Guglielmo, G., et al., *Pregabalin reduces cocaine self-administration and relapse to cocaine seeking in the rat*. Addiction biology, 2013. **18**(4): p. 644-653.
49. Ben-Menachem, E., *Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice*. Epilepsia, 2004. **45**: p. 13-18.
50. Administration, D.E., *Drug Enforcement Administration*. Letter to DEA Qualifying Practitioners, 2020.
51. Henney, J.E., *Safeguarding patient welfare: who's in charge?* Annals of Internal Medicine, 2006. **145**(4): p. 305-307.
52. Silverman, R.B., *Analgesic R&D*. NATURE REVIEWS| DRUG DISCOVERY, 2008. **7**: p. 711.
53. Kavoussi, R., *Pregabalin: from molecule to medicine*. European Neuropsychopharmacology, 2006. **16**: p. S128-S133.
54. Bobes, J., et al., *Pregabalin for the discontinuation of long-term benzodiazepines use: an assessment of its effectiveness in daily clinical practice*. European psychiatry, 2012. **27**(4): p. 301-307.
55. Taylor, C.P., T. Angelotti, and E. Fauman, *Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel $\alpha 2-\delta$ (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery*. Epilepsy research, 2007. **73**(2): p. 137-150.
56. Sadock, B.J., V.A. Sadock, and P. Ruiz, *Comprehensive textbook of psychiatry*. Vol. 1. 2000: lippincott Williams & wilkins Philadelphia.
57. Abuse, S., *Mental Health Services Administration; The NSDUH report, State Estimates of Nonmedical Use of Prescription Pain Relievers*. 2013.
58. Rosenbloom, J.M., et al., *Race/ethnicity and sex and opioid administration in the emergency room*. Anesthesia and analgesia, 2019. **128**(5): p. 1005.

59. BAKANLIĞI, T.C.İ., E.G. Müdürlüğü, and N.S.M.D. Başkanlığı, *Türkiye Uyuşturucu Raporu 2019*, N.S.M.D. Başkanlığı, Editor. 2019.
60. Noble, F. and N. Marie, *Management of opioid addiction with opioid substitution treatments: beyond methadone and buprenorphine*. *Frontiers in psychiatry*, 2019. **9**: p. 742.
61. Howland, R.D., et al., *Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology*. 2006: Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
62. Ling, W., et al., *Comparison of behavioral treatment conditions in buprenorphine maintenance*. *Addiction*, 2013. **108**(10): p. 1788-1798.
63. Weiss, R.D., et al., *Adjunctive counseling during brief and extended buprenorphine-naloxone treatment for prescription opioid dependence: a 2-phase randomized controlled trial*. *Archives of general psychiatry*, 2011. **68**(12): p. 1238-1246.
64. Connock, M., et al., *Methadone and buprenorphine for the management of opioid dependence: a systematic review and economic evaluation*. NIHR Health Technology Assessment programme: Executive Summaries, 2007.
65. Yarmolinsky, A. and R.A. Rettig, *Federal regulation of methadone treatment*. 1995.
66. Gossop, M., et al., *The national treatment outcome research study (NTORS): 4–5 year follow-up results*. *Addiction*, 2003. **98**(3): p. 291-303.
67. Volpicelli, J.R., et al., *Naltrexone and alcohol dependence: role of subject compliance*. *Archives of General Psychiatry*, 1997. **54**(8): p. 737-742.
68. Kronstrand, R., T.G. Seldén, and M. Josefsson, *Analysis of buprenorphine, norbuprenorphine, and their glucuronides in urine by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of analytical toxicology*, 2003. **27**(7): p. 464-470.
69. Kreek, M., et al., *Circadian rhythms and levels of β -endorphin, ACTH, and cortisol during chronic methadone maintenance treatment in humans*. *Life sciences*, 1983. **33**: p. 409-411.
70. Rosenblum, A., et al., *Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions*. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 2008. **16**(5): p. 405.
71. Galloway, F.R. and N.F. Bellet, *Methadone conversion to EDDP during GC-MS analysis of urine samples*. *Journal of analytical toxicology*, 1999. **23**(7): p. 615-619.
72. Bellizzi, G., *Mese: marzo 2022*.
73. Brewer, C. and E. Krupitsky, *Antagonists for the treatment of opioid dependence*, in *Interventions for Addiction*. 2013. p. 427-438.
74. Comer, S.D., M.A. Sullivan, and G.K. Hulse, *Sustained-release naltrexone: novel treatment for opioid dependence*. *Expert opinion on investigational drugs*, 2007. **16**(8): p. 1285-1294.
75. Milone, M.C., *Laboratory testing for prescription opioids*. *Journal of medical toxicology*, 2012. **8**(4): p. 408-416.
76. Küme, T., et al., *Assessment of the results of a three-year program for National Standardization and Quality Improvement of Medical Laboratories on Drug of Abuse Testing by the Ministry of Health in Turkey*. *Drug Testing and Analysis*, 2019. **11**(2): p. 215-222.

77. Bakanlığı, S., *İdrar Numunelerinde Yasadışı ve Kötüye Kullanılan İlaç ve Madde Analizi Yapan Tıbbi Laboratuvarlar ile Madde Bağımlılığı Teşhis ve Tedavi Merkezlerindeki Tıbbi Laboratuvarların İşleyiş Esasları*. 2016.
78. Swarm, R.A., et al., *Adult cancer pain, version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2019. **17**(8): p. 977-1007.
79. Rosen, S., *Market trends in lateral flow immunoassays*, in *Lateral Flow Immunoassay*. 2009, Springer. p. 1-15.
80. Liu, J., et al., *A lateral flow strip based on gold nanoparticles to detect 6-monoacetylmorphine in oral fluid*. Royal Society open science, 2018. **5**(6): p. 180288.
81. Kisieliūtė, A., *Scanning electrochemical microscopy for the investigation of biosensors*. 2021, Vilniaus universitetas.
82. Jeon, S.I., X. Yang, and J.D. Andrade, *Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay*. Analytical biochemistry, 2004. **333**(1): p. 136-147.
83. Rifai, N., et al., *Principles and applications of clinical mass spectrometry: small molecules, peptides, and pathogens*. 2018: Elsevier.
84. Bishop, M.L., E. Fody, and L. Schoeff, *Clinical Chemistry Seventh Edition Principles Techniques and Correlation*. 2013, Lippincott Williams and Wilkins. United State Of America.
85. Armbruster, D.A., et al., *CLSI.C52A2 Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Ed*. 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute.
86. Ho, C.S., et al., *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*. The Clinical Biochemist Reviews, 2003. **24**(1): p. 3.
87. ELKATMIŞ, A. and R. KANGI, *KUADRUPOL KÜTLE SPEKTROMETRESİ ve KARARLILIK ÖLÇÜMLERİ*.
88. Lifshitz, C. and T. Märk, *Mass Spectrometry, Ionization Theory*. 2017.
89. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte*. International journal of analytical chemistry, 2012. **2012**.
90. SHIMADZU. *mass_analyzers Quadrupole MS*. 2022; Available from: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html.
91. Vicente, J. and L. Wiessing, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction annual report 2007: positive assessment of HIV in IDUs though hepatitis C still very high*. Weekly releases (1997–2007), 2007. **12**(47): p. 3317.
92. Wolff, K., et al., *A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness*. Addiction, 1999. **94**(9): p. 1279-1298.
93. Wolff, K., *A Review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness: Symposium Abstracts; Society for the Study of Addiction*. Addiction Biology, 1999. **4**(2): p. 243-243.
94. Gallardo, E., M. Barroso, and J. Queiroz, *LC-MS: a powerful tool in workplace drug testing*. Drug testing and analysis, 2009. **1**(3): p. 109-115.
95. Skopp, G., *Preanalytic aspects in postmortem toxicology*. Forensic science international, 2004. **142**(2-3): p. 75-100.

96. SAMHSA, *Clinical Drug Testing in Primary Care*. Vol. TAP 32 2012.
97. Pragst, F. and M.A. Balikova, *State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse*. Clinica chimica acta, 2006. **370**(1-2): p. 17-49.
98. Rollins, D., D. Wilkins, and G. Krueger, *Codeine disposition in human hair after single and multiple doses*. European journal of clinical pharmacology, 1996. **50**(5): p. 391-397.
99. Gallardo, E. and J. Queiroz, *The role of alternative specimens in toxicological analysis*. Biomedical Chromatography, 2008. **22**(8): p. 795-821.
100. Drummer, O.H., *Drug testing in oral fluid*. Clinical Biochemist Reviews, 2006. **27**(3): p. 147.
101. Verstraete, A.G., *Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid*. Therapeutic drug monitoring, 2004. **26**(2): p. 200-205.
102. Bergeria, C.L. and E.C. Strain, *Opioid use disorder: pernicious and persistent*. American Journal of Psychiatry, 2022. **179**(10): p. 708-714.
103. ÇİÇEK, E. and B. DEMİREL, *Opioid Kullanım Bozukluğu Olan Hastalarda Gabapentin ve Pregabalin Kullanım Sıklığı*. Bağımlılık Dergisi, 2022. **23**(2): p. 139-144.
104. Toxicology, S.W.G.f.F., *Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology*. Journal of Analytical Toxicology, 2013. **37**(7): p. 452-474.
105. Evren, C., *Alkol ve Madde Kullanım Bozuklukları Temel Başvuru Kitabı*, C. Evren, Editor. 2019. p. 190-205.
106. KAHVECİ, R., et al., *TÜRKİYE CUMHURİYETİ SAĞLIK BAKANLIĞI'NIN KLİNİK UYGULAMA REHBERLERİ ALANINDAKİ FAALİYETLERİ*. Hacettepe Sağlık İdaresi Dergisi, 2020. **23**(4): p. 737-755.
107. Evren, C., et al., *Suboxone (buprenorfin: nalokson) uygulama kılavuzu*. Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, AMATEM Kliniği, Şubat, 2012.
108. Treatment, C.f.S.A., *Incorporating alcohol pharmacotherapies into medical practice*. 2009.
109. Krupitsky, E.M. and E.A. Blokhina, *Long-acting depot formulations of naltrexone for heroin dependence: a review*. Current opinion in psychiatry, 2010. **23**(3): p. 210-214.
110. Mahoney III, J.J., et al., *High prevalence of co-occurring substance use in individuals with opioid use disorder*. Addictive behaviors, 2021. **114**: p. 106752.
111. LaRue, L., et al., *The cyclical and evolving nature of methamphetamine use: an evaluation of near real-time urine drug test results*. Journal of addiction medicine, 2021. **15**(5): p. 396.
112. Seaman Jr, R.W. and G.T. Collins, *Impact of morphine dependence and withdrawal on the reinforcing effectiveness of fentanyl, cocaine, and methamphetamine in rats*. Frontiers in pharmacology, 2021. **12**: p. 691700.
113. Öztürk, A.B., *Türkiye'de Büyüyen Tehlike: Esrar*. Konuralp Medical Journal/Konuralp Tıp Dergisi, 2016. **8**(3).
114. Lake, S. and M.S. Pierre, *The relationship between cannabis use and patient outcomes in medication-based treatment of opioid use disorder: A systematic review*. Clinical Psychology Review, 2020. **82**: p. 101939.

115. Demir, B., et al., *Substance use characteristics, treatment completion rates and related factors of patients in Gaziantep AMATEM in 2019; a retrospective study*. Journal of Substance Use, 2022. **27**(2): p. 128-134.
116. Kırılı, U. and O. Nart, *Opioid kullanım bozukluğu sürdürüm tedavisinde naltrekson implant ile oral buprenorfin-nalokson kullanan hastaların tedaviyi yarıda bırakma risklerinin karşılaştırılması*. Klinik Psikiyatri Dergisi, 2021. **24**(3): p. 342-349.
117. Bell, C., et al., *Development of a rapid LC-MS/MS method for direct urinalysis of designer drugs*. Drug testing and analysis, 2011. **3**(7-8): p. 496-504.
118. Parker, P.D., B. Beers, and M.J. Vergne, *What Is in Your Wallet? Quantitation of Drugs of Abuse on Paper Currency with a Rapid LC-MS/MS Method*. Journal of Chemical Education, 2017. **94**(10): p. 1522-1526.
119. Maurer, H.H., *Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology*. Clinical biochemistry, 2005. **38**(4): p. 310-318.
120. Ling, S., et al., *A systematic review of sex differences in treatment outcomes among people with opioid use disorder receiving buprenorphine maintenance versus other treatment conditions*. Drug and Alcohol Dependence, 2019. **197**: p. 168-182.
121. Palmquist, K.B. and M.J. Swortwood, *Quantification of fentanyl analogs in oral fluid using LC-QTOF-MS*. Journal of forensic sciences, 2021. **66**(5): p. 1871-1878.
122. Vincenti, F., et al., *Simultaneous Quantification of 25 Fentanyl Derivatives and Metabolites in Oral Fluid by Means of Microextraction on Packed Sorbent and LC-HRMS/MS Analysis*. Molecules, 2021. **26**(19): p. 5870.
123. Krock, K., et al., *Lower cutoffs for LC-MS/MS urine drug testing indicates better patient compliance*. Pain Physician, 2017. **20**(7): p. E1107.
124. Grabenauer, M., et al., *Development of a quantitative LC-MS-MS assay for codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone and oxymorphone in neat oral fluid*. Journal of Analytical Toxicology, 2018. **42**(6): p. 392-399.
125. Pang, B., et al., *Recent Update on Pretreatment and Analysis Methods of Buprenorphine in Different Matrix*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2022: p. 1-30.
126. Li, X.S., S. Li, and G. Kellermann, *Simultaneous determination of three estrogens in human saliva without derivatization or liquid-liquid extraction for routine testing via miniaturized solid phase extraction with LC-MS/MS detection*. Talanta, 2018. **178**: p. 464-472.
127. Dziurkowska, E. and M. Wesolowski, *Solid phase extraction purification of saliva samples for antipsychotic drug quantitation*. Molecules, 2018. **23**(11): p. 2946.
128. Antonelli, G., et al., *Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome*. Clinica Chimica Acta, 2015. **451**: p. 247-251.

129. Sergi, M., et al., *Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009. **393**(2): p. 709-718.
130. Ohno, S., K. Kawana, and S. Nakajin, *Contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A8 to morphine-6-glucuronidation and its kinetic properties*. Drug metabolism and disposition, 2008. **36**(4): p. 688-694.
131. Ventura, M., et al., *Stability studies of principal illicit drugs in oral fluid: preparation of reference materials for external quality assessment schemes*. Therapeutic drug monitoring, 2007. **29**(5): p. 662-665.
132. Chen, Z., et al., *Disposition and metabolism of codeine after single and chronic doses in one poor and seven extensive metabolisers*. British journal of clinical pharmacology, 1991. **31**(4): p. 381-390.
133. Borges, R.S., et al., *An antioxidant mechanism of morphine and related derivatives*. Medicinal Chemistry Research, 2016. **25**(5): p. 852-857.
134. Armstrong, S.C. and K.L. Cozza, *Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, Part II*. Psychosomatics, 2003. **44**(6): p. 515-520.
135. Prakash, M.A., R.J. Bhor, and N.S. Murlidhar, *International Journal of Modern Pharmaceutical Research*.
136. Zareba, G., *Pregabalin: a new agent for the treatment of neuropathic pain*. Drugs Today (Barc), 2005. **41**(8): p. 509-16.
137. Nehlin, C., et al., *Overcoming heroin addiction without the use of pharmaceuticals: A qualitative interview study*. Journal of Psychoactive Drugs, 2020. **52**(3): p. 211-217.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

Ek-2 Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Aydınlatılmış Onam Formu

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Opioid kullanım bozukluğu ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “**Opioid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numunelerinde yasaklı madde analizlerinin karşılaştırılması**”dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, idrar ve tükürük numunelerinde opioid maddeler için yeni bir tarama metodu geliştirmektir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalları'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr. Şeref Can Gürel uygun görürse bu çalışmaya alınamazsınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için 30 ml idrar ve 5 ml kadar tükürük vermeniz istenecektir. Alınan örneklerde opioid grubu bileşiklerin miktarı ölçülecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dr. Şeref Can Gürel tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalları'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Şeref Can Gürel'i 0312 305 14 40 (iş) veya 0530 993 06 12 (cep) no'lu telefonlardan ve HÜTF Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız aşağıdaki kutucuğu X ile işaretleyiniz ve devam ediniz.

Kabul ediyorum.

Ek-3 Tez Çalışması Orjinallik Raporu

Opiooid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numunelerinde yasaklı madde analizlerinin karşılaştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

%9	%8	%3	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.gov.uk İnternet Kaynağı	%1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	Watson, W.A.. "2003 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System", American Journal of Emergency Medicine, 200409 Yayın	<%1
5	acikerisim.ybu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	sunlongbiotech.com İnternet Kaynağı	<%1
7	TEK, Sevgi, KILIÇARSLAN, M. Ragıp, TEK, Çağatay and SABUNCU, Ahmet. "Tavşanlarda	<%1

Ek-4 Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: İlknur Çoban
Ödev başlığı: Opioid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numuneleri...
Gönderi Başlığı: Opioid kullanım bozukluğunda idrar ve tükürük numuneleri...
Dosya adı: Turnitin_Tez_Bas_m_16.01.2023.docx
Dosya boyutu: 5.53M
Sayfa sayısı: 123
Kelime sayısı: 22,897
Karakter sayısı: 142,674
Gönderim Tarihi: 16-Oca-2023 04:14ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1993571320



9.ÖZGEÇMİŞ