

ADLİ TOKSİKOLOJİ LABORATUVARLARINDA DOĞRULAMA AMAÇLI KULLANILAN YÖNTEMLER



Hüseyin KAYADİBİ, MD, MSc

Tıbbi Biyokimya Uzmanı

Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi

S.B. Hitit Üniversitesi Çorum Eğitim ve Araştırma Hastanesi

TBD Sivas Biyokimya Günleri

04 Kasım 2016, Sivas

SUNUM PLANI

- Adli Toksikoloji nedir?
- Tarama testleri nelerdir?
- Doğrulama testi nedir?
- Doğrulama amaçlı kullanılan analitik yöntemler nelerdir?
 - Düşük çözünürlüklü MS'ler
 - Yüksek çözünürlüklü MS'ler

ADLİ TOKSİKOLOJİ NEDİR?

Kimyasal maddelerin canlı organizmalardaki sistemler üzerinde istenmeyen, zararlı, olumsuz sonuçlar oluşturan etkileşmelerini **hukuksal** açıdan inceleyen bir bilimdir.

KONUNUN ÖNEMİ NEDİR?

- Son on beş yıldır uyuşturucu, uyutucu ve uyarıcı madde çeşitliliğinin artması;
 - **Sentetik** kannabinoidler, katinonlar ve fenetilaminlerin piyasaya girmesi.
 - Yasal engellerin aşılabilmesi için piyasaya sürekli olarak **yeni bir sentez ürününün** sunulması nedeni ile psiko-aktif maddelerin laboratuvar ortamında analizinin güçleşmesi.
 - Bu maddelerin birçoğunun hala uyuşturucu madde kapsamında olmaması sebebi ile **yasal sorumsuzluk**.
 - Maddelerin **birçok farklı isim** altında pazarlanması.
 - Paketlerinin üzerinde **yasal amaçlar için kullanıldığı** intibainı yaratan ibarelerin bulunması.
 - Maddelerin pazarlama stratejisinde **bitkisel oldukları için zararsızdır algısı** oluşturulması.
 - **Kokusuz** olmaları nedeni ile sosyal ortamlarda dahi fark edilmeden kullanılabilmeleri ve teminindeki kolaylıklar.

ADLİ TOKSİKOLOJİ LABORATUVARINDA YAPILAN ANALİZLER

- **Uyuşturucu, Uyutucu, Uyarıcı Maddeler ve Metabolitleri;** Kannabinoidler, Katinonlar, Opiatlar ve Metabolitleri, Benzodiazepinler, Kokain ve Metabolitleri, Esrar ve Metabolitleri, Barbitüratlar, Trisiklik Antidepresanlar, Amfetaminler, ...
- **Alkol ve Metabolitleri;** Etanol, Metanol, Propanol, Etil Glukoronid, Etil Sülfat
- **Uçucu Maddeler;** Hekzan, Aseton, Toluen
-

KILAVUZ



CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

April 2007

C52-A2

Toxicology and Drug Testing in the Clinical
Laboratory; Approved Guideline—Second
Edition

KILAVUZ



March 2010

C43-A2

Gas Chromatography/Mass Spectrometry
Confirmation of Drugs; Approved
Guideline—Second Edition

ADLİ TOKSİKOLOJİ LABORATUVARINDA ÇALIŞILAN NUMUNELER

- İdrar
- Tam Kan
- Serum
- Kıl
- Tükürük
- Mide aspiratı
- İçerisinde yabancı bir etkenin arandığı her türlü katı ve/veya sıvı

TARAMA YÖNTEMLERİ

1. Immunoassayler

a) Point-of-Care Testing

b) Otomatize immunoassay analizleri; RIA, ELISA, Enzyme Multiplied IA, Fluorescent Polarization IA, Kinetic Interaction of Microparticles in Solution, Cloned Enzyme Donor IA

2. Spektrofotometre: UV, VIS, IR

3. Kromatografik teknikler: TLC, GC, GC/TOF, HPLC, UPLC, LC/QTOF

KARŞILAŞTIRMA

Tarama Yöntemleri

- Ucuz
- Hızlı
- Semi-kantitatif
- Yüksek hassasiyet
- Düşük özgüllük

Doğrulama Yöntemleri

- Pahalı
- Yavaş
- Kantitatif
- Yüksek hassasiyet
- Yüksek özgüllük
(düşük yanlış pozitiflik)

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

1. Düşük Çözünürlüklü MS'ler

- Q
- QQQ
- İon trap

2. Yüksek Çözünürlüklü MS'ler

- TOF
- QTOF
- Orbitrap
- QOrbitrap

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

- Tarama testinden **farklı** ve daha **spesifik** bir fizikokimyasal prensibe dayalı yöntem olmalıdır.
- Doğrulama yöntemi olarak altın standart yöntem **Kütle Spektrometresidir**.
- Eğer tarama yöntemi olarak immunoassay kullanıldı ise doğrulama yöntemi olarak MS ile birleştirilmiş kromatografik metodlar kullanılabilir. Ancak yeteri kadar spesifite olmayacağı için GC/FID uygun değildir.

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

- Eğer kimyasal türevlendirme ile **alı konma zamanları** değiştirilir ise hem tarama hem de doğrulama için aynı sistemin kullanılması kabul edilebilir.
- Etanolde yalancı pozitif sonuç beklenmese de ikinci bir analitik sistem kullanılarak **doğrulama yapılması tavsiye** edilmektedir.
- Ölçüm prensibinde biraz farklılık olsa bile farklı bir immunoassay yöntemi kullanılarak diğer immunoassay sonucunun doğrulanması **kabul edilemez**. Çünkü; her iki immunoassay ölçümünde de çapraz reaksiyonlar görülebilir.

DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

- Mümkün olan en **doğru** ve en **spesifik** testler kullanılmalıdır.
- Tarama testleri ile aynı ya da **daha yüksek hassasiyete** sahip olmalıdır.
- Mümkünse **ekonomik** olmalıdır.
- Bir çok laboratuvarda standardizasyonu sağlayabilecek kadar **basit** olmalıdır.
- Sonuçlar kanuni olarak **savunulabilir** olmalıdır.
- Etanol ve karbon monoksit dahil **tüm analitler** için ikinci bir doğrulama tekniğinin kullanılması tavsiye edilir.

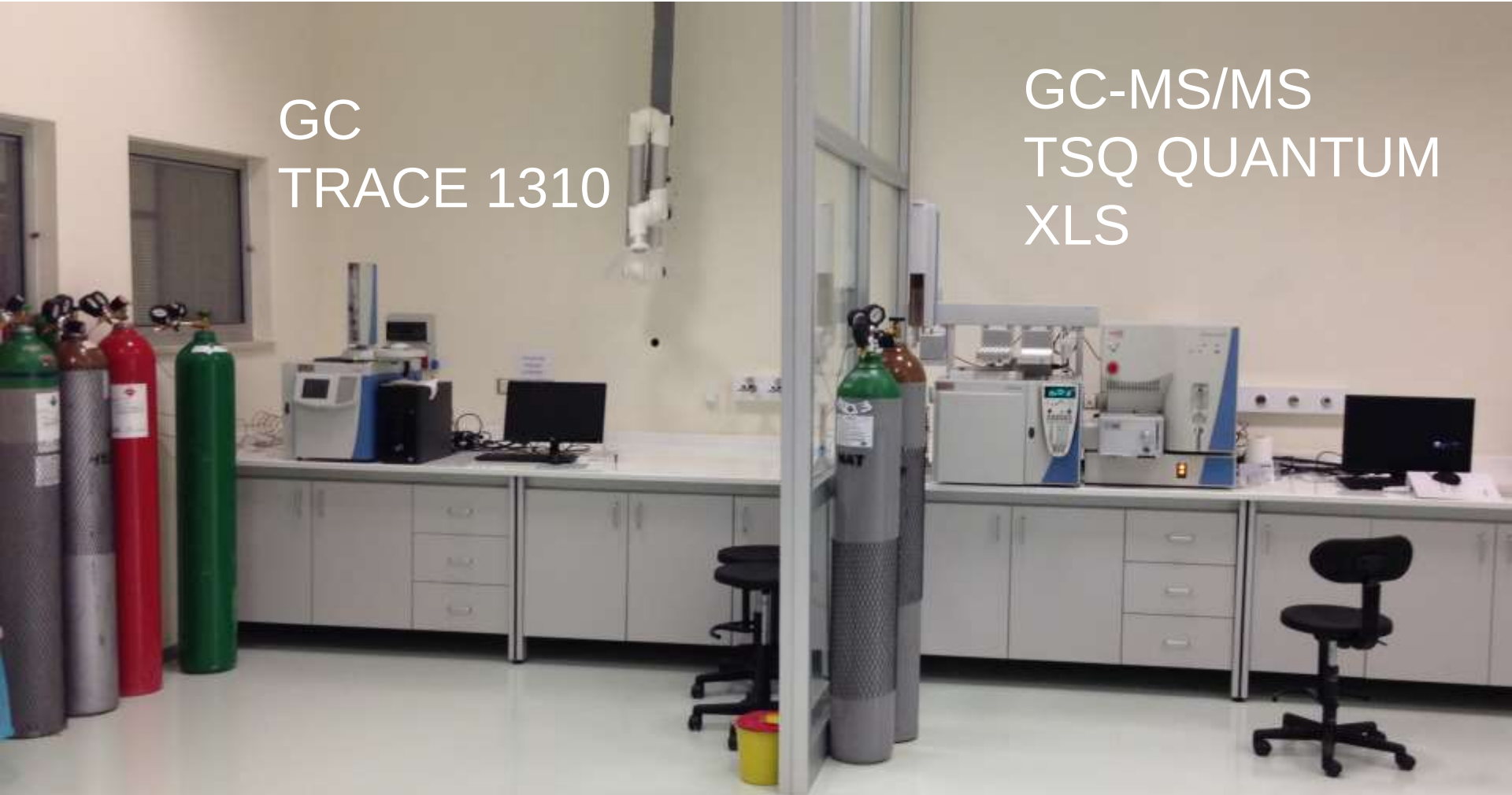
HİTİT ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL TEKNİK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ



HİTİT ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL TEKNİK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ

GC
TRACE 1310

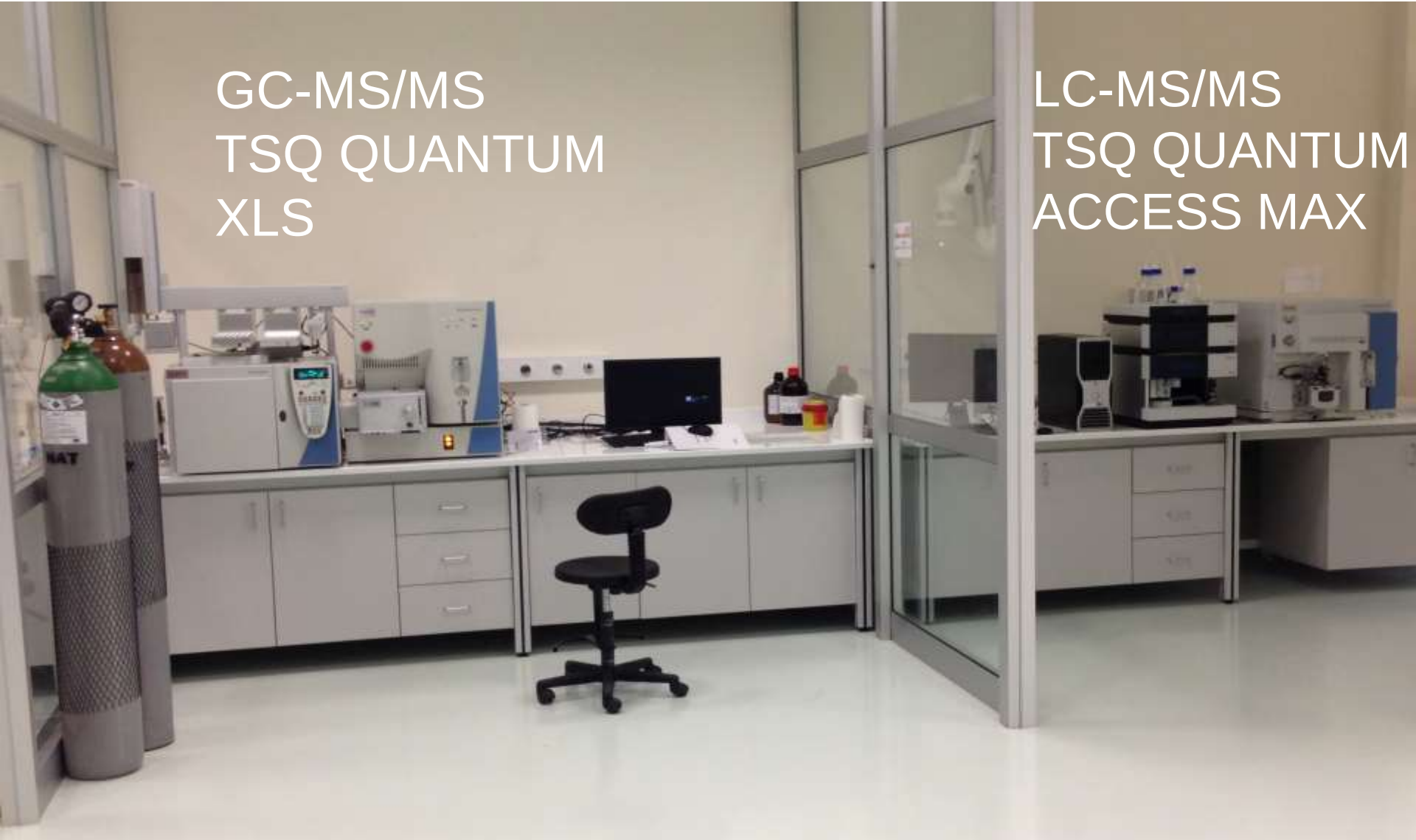
GC-MS/MS
TSQ QUANTUM
XLS



HİTİT ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL TEKNİK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA MERKEZİ

GC-MS/MS
TSQ QUANTUM
XLS

LC-MS/MS
TSQ QUANTUM
ACCESS MAX



KÜTLE SPEKTROMETRELERİ

10 dk-2 gün

3-20 dk

Örnek Hazırlama

Deproteinizasyon- Ekstraksiyon-Derivatizasyon

Pompa Sistemi

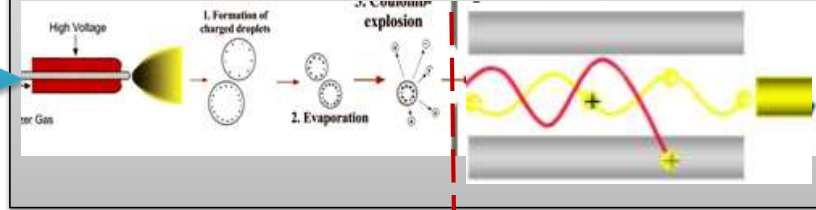
Örnek Girişi

Ayrıştırma

- HPLC
- GC
- CE

İyon Kaynağı

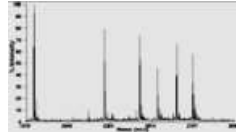
Kütle analizörü



EI CI ESI
APCI
MALDI
FAB
.....

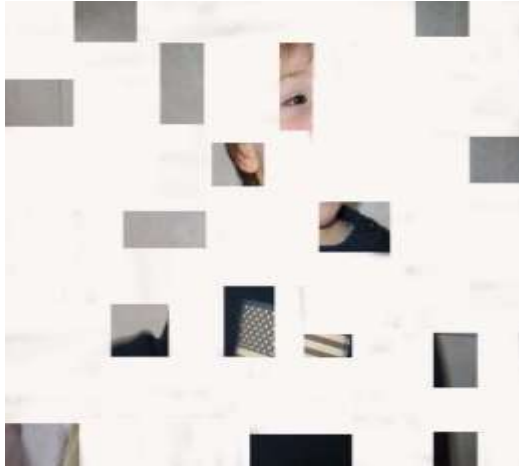
Quadrupole
TOF
Ion trap
Orbitrap
Fourier Transform (ICR)

Sonuç Değer



ÇÖZÜNÜRLÜK

QQQ



Ion Trap

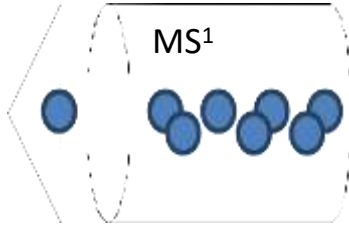


Orbitrap

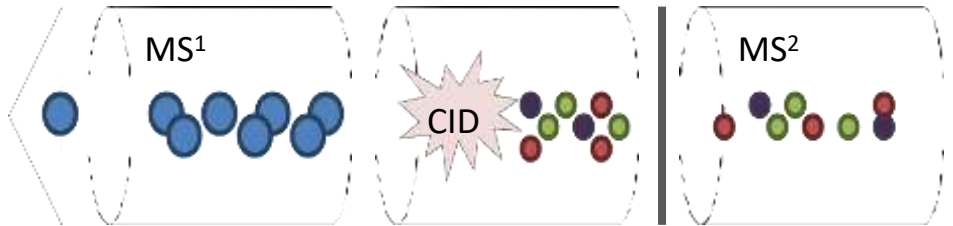


DÜŞÜK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'LER

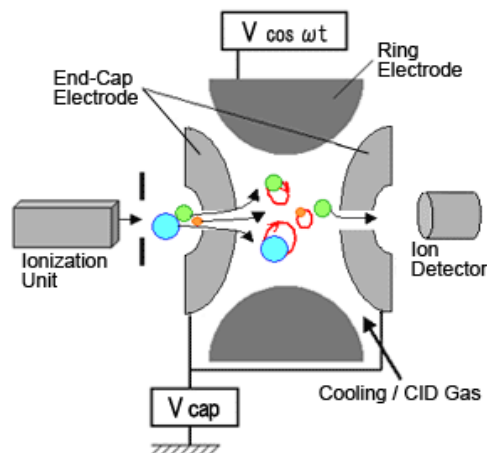
Q



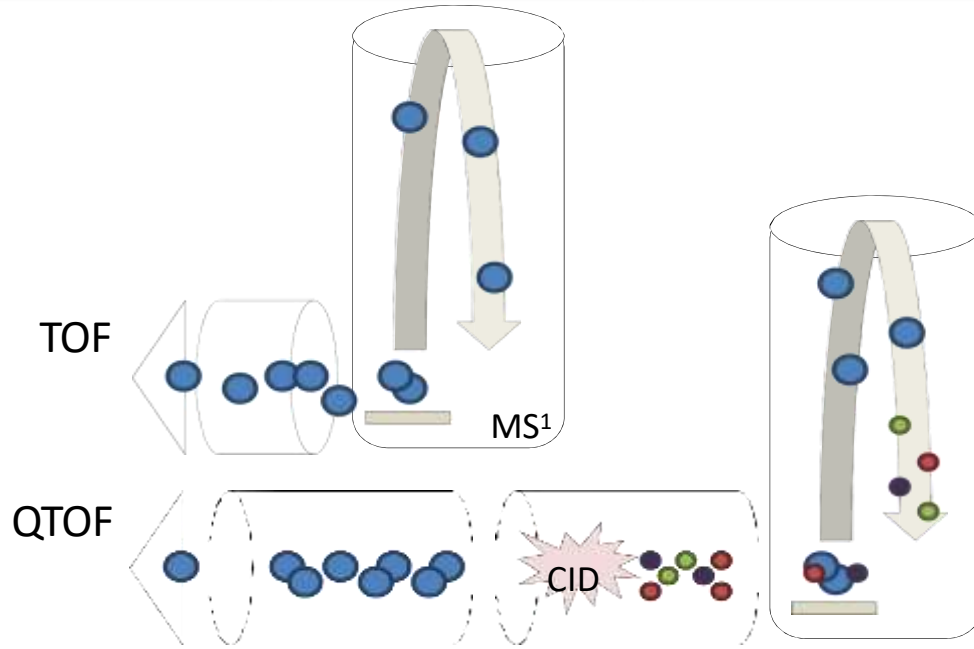
QQQ



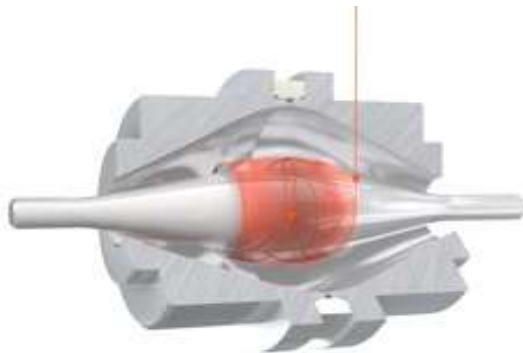
Ion trap MS



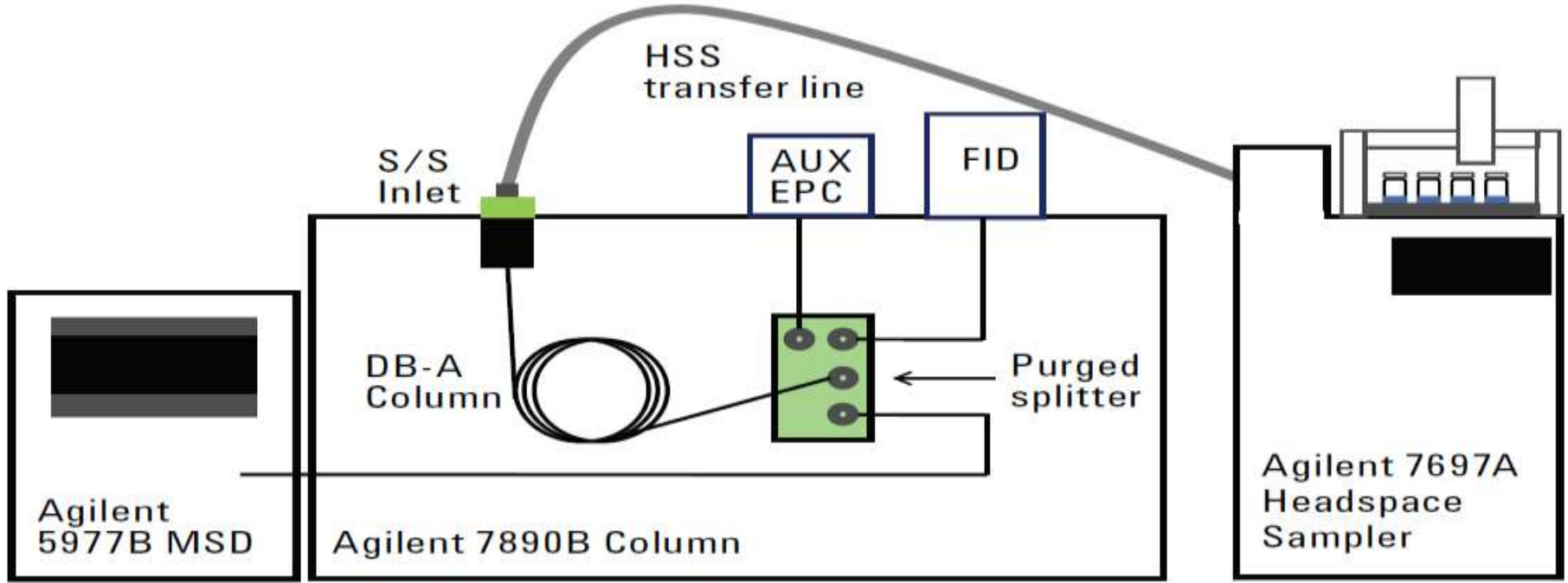
YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'LER



ORBITRAP

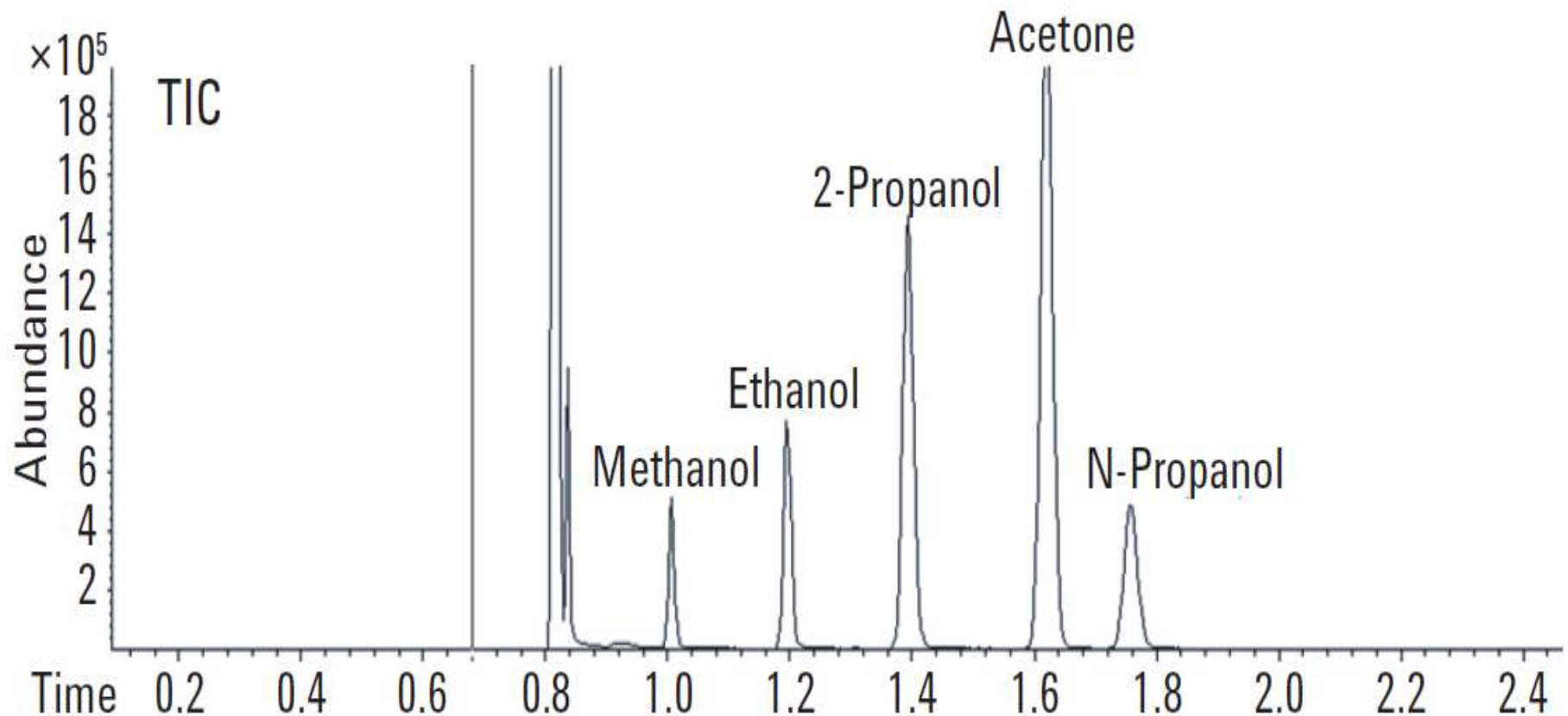


HEAD SPACE / GAZ KROMATOGRAFI

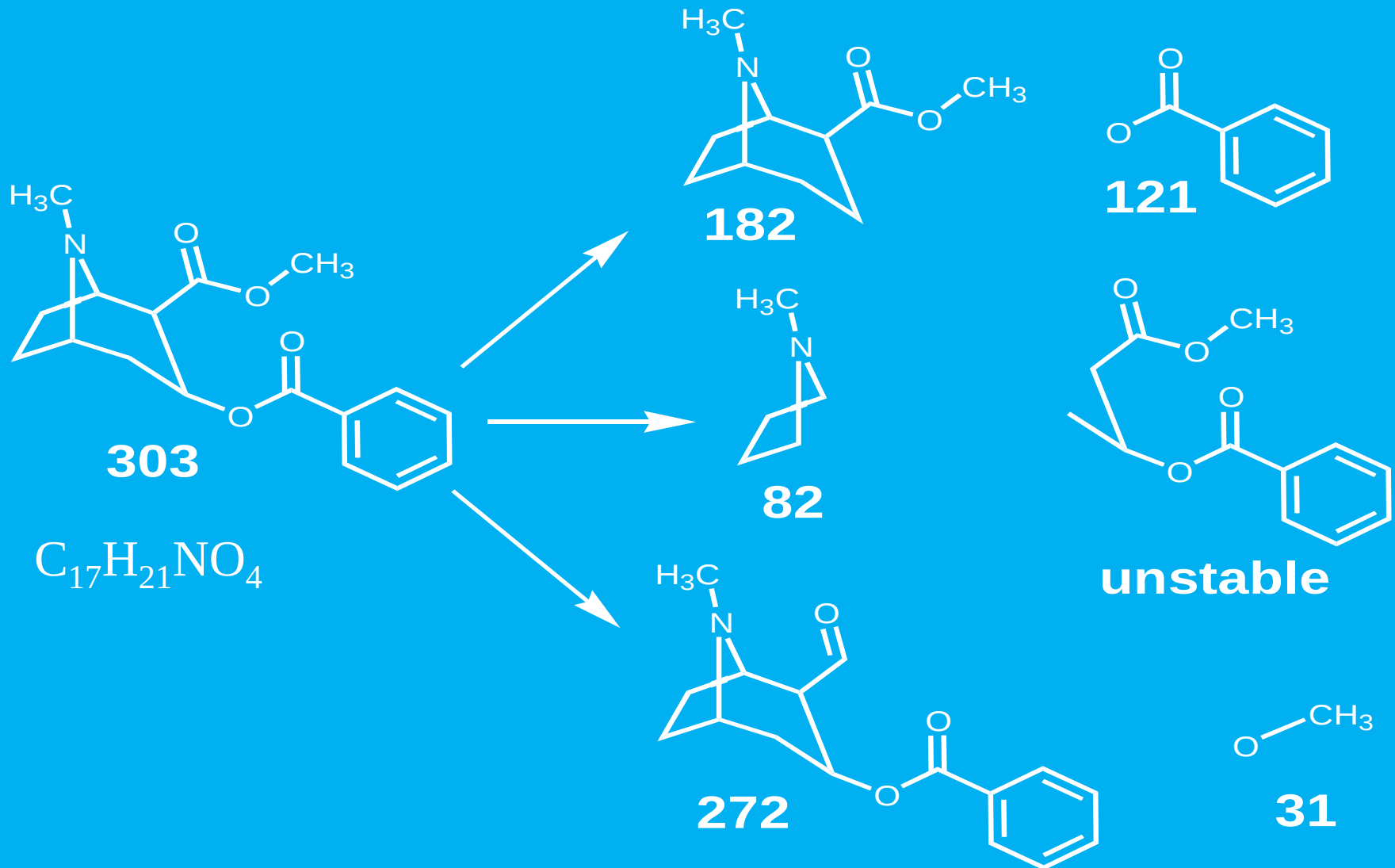


- **Alkol ve diğer uçucu toksik bileşiklerin** analizlerinde kullanılır.
- 7 ml kadar sıvı alabilecek bir cam tüpe 0.2 - 0.5 ml numune konur, ağzı sıkıca kapatılarak uygun bir sıcaklıkta 10 dakika dengeye bırakılır. Böylece uçucu madde gaz fazına geçmiş olur. Bu gaz fazındaki numune kolona enjekte edilir.

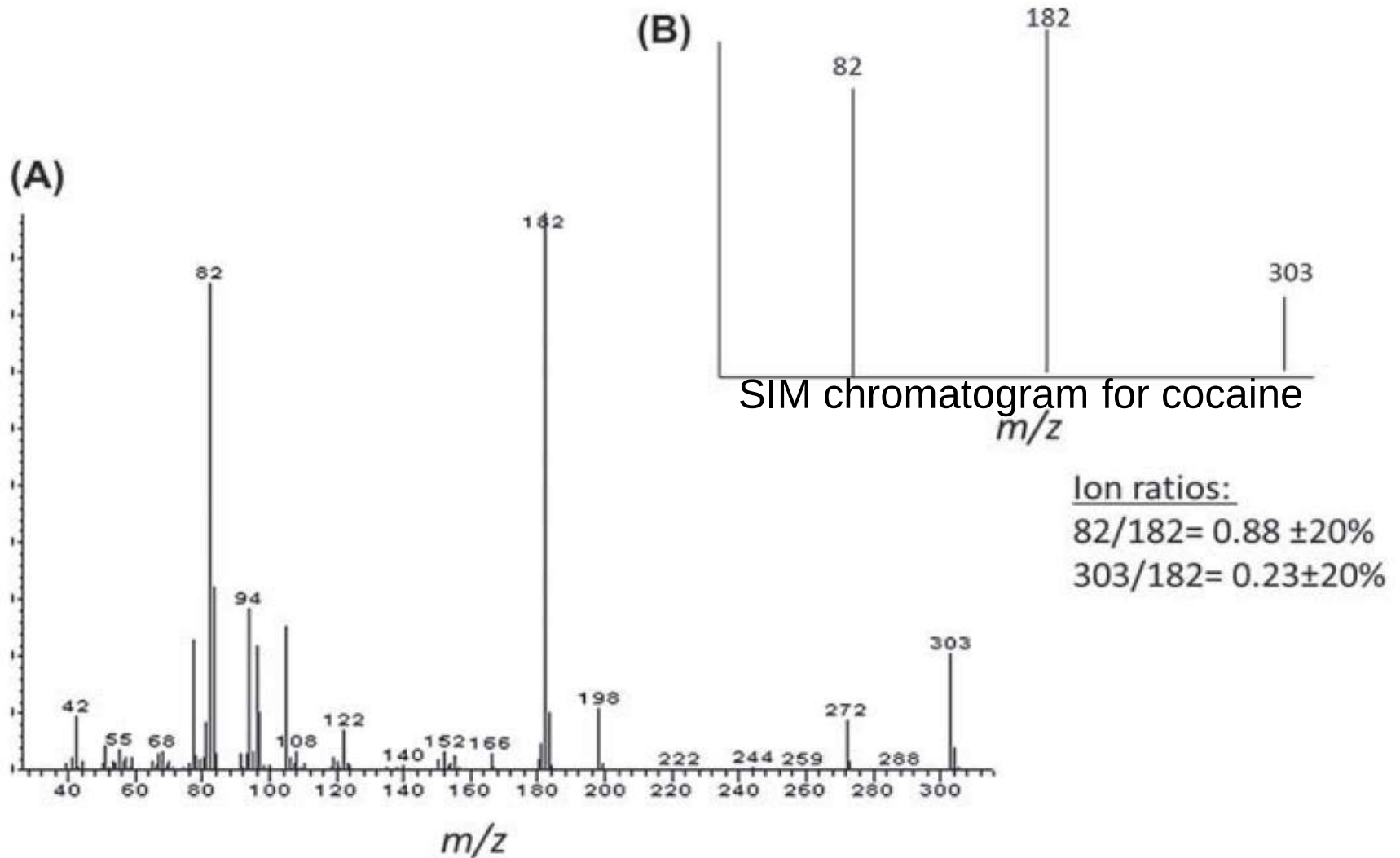
HEAD SPACE / GAZ KROMATOGRAFI



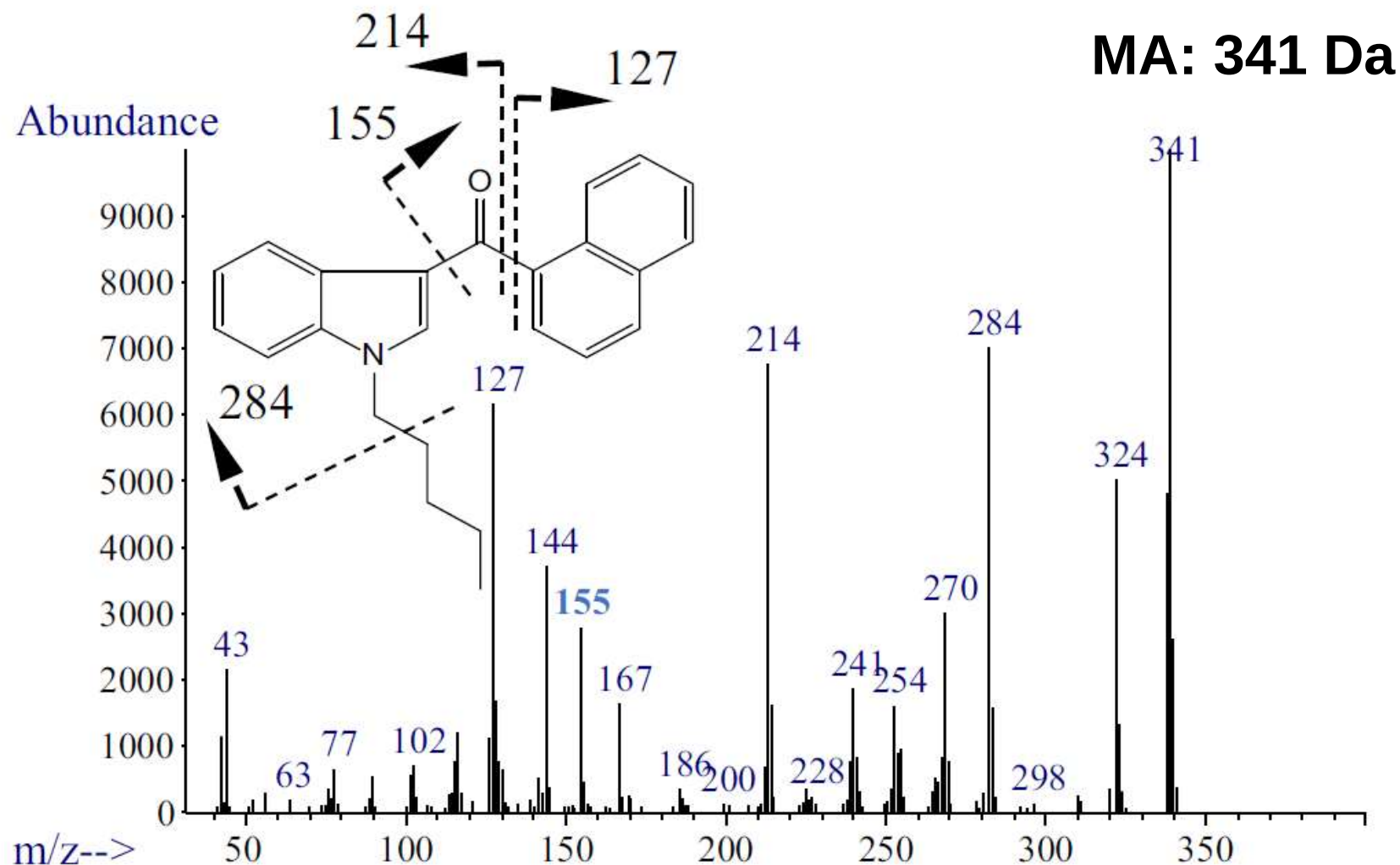
GC-MS / KOKAİN



GC-MS / KOKAİN



GC-MS / JWH-018



GC-MS AVANTAJ-DEZAVANTAJLARI

Avantajları

- IA ve HPLC-UV'den daha fazla sensitiftir.
- Yüksek tekrarlanabilirlik.
- Kütüphane.
- Headspace autosampler ile bağlantı sayesinde uçucuların analizi için idealdir.

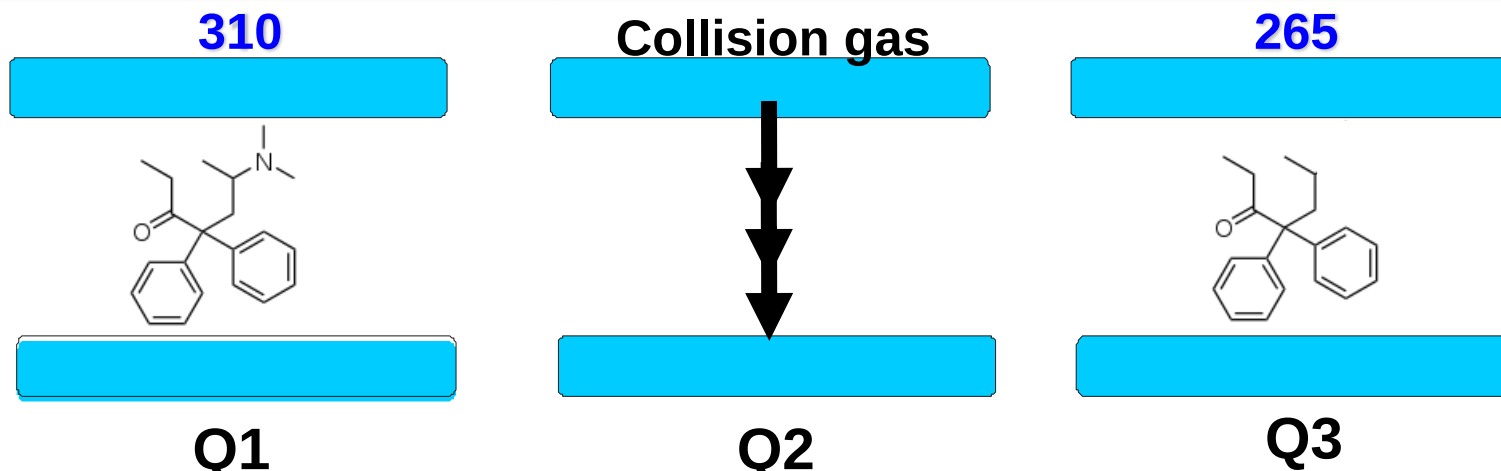
Dezavantajları

- Uçucu olmayan, polar ve ısıya dayanıksız bileşikleri ölçemez.
- Uzun örnek hazırlama gerektirir. Çünkü separasyon olması için genellikle, maddeler ve metabolitleri az polar ve daha uçucu türevlerine dönüştürülmelidir.

SIVI KROMATOGRAFI-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS)

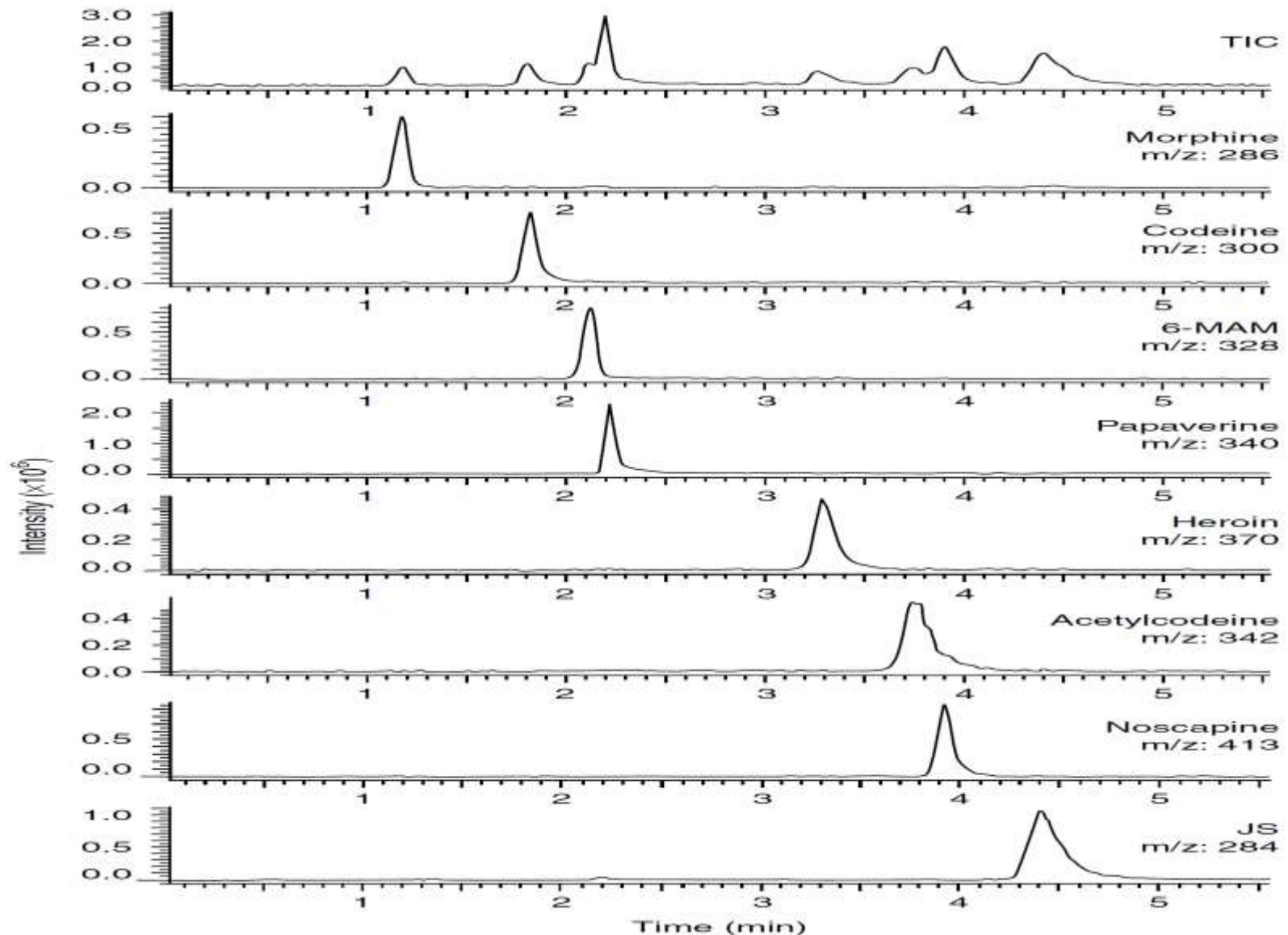
- Standart HPLC tekniğinde madde sadece retansiyon zamanı ile teşhis edilir iken LC-MS/MS teknolojisi ile retansiyon zamanına ek olarak “precursor ve product” iyonlar ile değerlendirilmektedir.
- Aynı m/z oranına sahip pek çok molekül mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10.000’dir.

LC-ESI-MRM



Compound	Molecular Weight	Prekürsör ion	Product ion	Dwell Time (msec)	Collision Energy (CE)	Retention Time
Alprazolam	308.0829	309.1	205	25	50	8.03
Amitriptyline	277.183	278.2	91	25	42	7.8
Cocaethylene	317.37	318.2	196	25	39	4.32
Cocaine	303.1471	304.1	82	25	40	3.6
Fentanyl	336.2202	337.2	188	25	43	5.18
Methadone	309.2093	310.1	265	25	35	7.56
Methamphetamine	149.1204	150.1	91	25	27	2.96
Oxycodone	315.1471	316.1	241	25	40	2.6
THC	314.2246	315.1	193	25	34	14.91

LC-MS/MS ANALİZ ÖRNEKLERİ



LC-MS/MS AVANTAJ-DEZAVANTAJLARI

(GC-MS ile karşılaştırma)

Avantajları

- Artmış sensitivite ve spesivite
- Minimal örnek hazırlama
- Uçucu olmayan, polar ve ısıya dayanıksız bileşikleri tespit edebilme
- Toksikoloji testlerinde yeni “gold standard” metod mudur?

Dezavantajları

- Kütüphanesinin yetersiz olması
- Metod validasyonunda matriks etkisi

YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS

Analytica Chimica Acta 927 (2016) 13–20



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Review

Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices – Where do we stand today?



Markus R. Meyer ^{a,*}, Hans H. Maurer ^b

^a Department of Pharmacology and Pharmacoepidemiology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

^b Department of Experimental and Clinical Toxicology, Saarland University, Homburg, Germany

HIGHLIGHTS

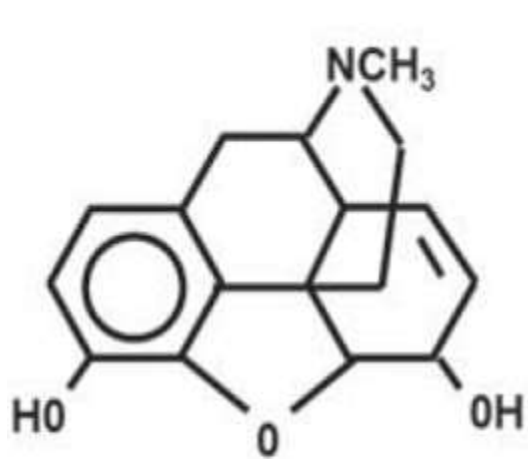
- Application of LC coupled to low- and high-resolution MS are reviewed.
- Only articles considered for new psychoactive substances screening.
- Latest developments and applications are highlighted.
- Selected papers critically discussed.

GRAPHICAL ABSTRACT

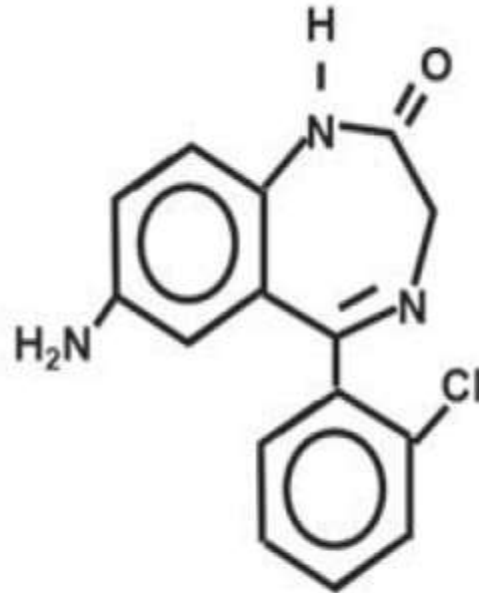


YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS

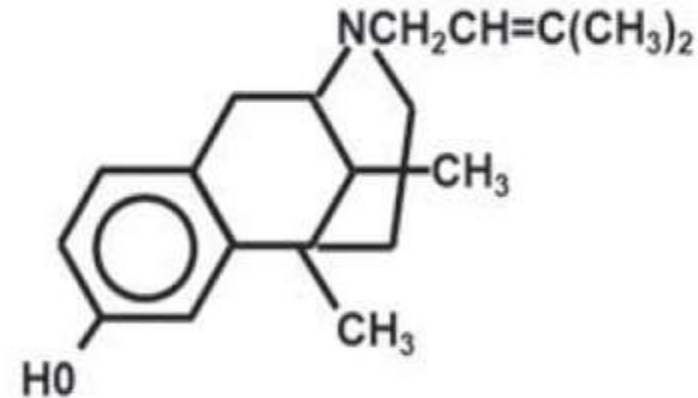
- GC-MS ve LC-MS/MS'deki kısıtlılık aynı prekürsör iyon (aynı nominal kütleli, izobarik) sahip olan bileşiklerin **kromatografik olarak ayrılması gerekliliğidir**. Aksi takdirde bu bileşikler birbirinden ayıramaz.
- Ancak LC-HR/MS aynı nominal kütleyle sahip olan bileşikleri birbirinden ayırabilir. Bu nedenle matriks kaynaklı iyon sinyalinde artma ya da baskılanma olmadığı sürece bu bileşiklerin **kromatografik olarak ayrıştırılması gerekmez**.



Morfin (C₁₇H₁₉NO₃)
MA: 285.1365 Da



7-aminoklonazepam (C₁₅H₁₂ClNO₃)
MA: 285.0669 Da



Pentazosin (C₁₉H₂₇NO)
MA: 285.2093 Da

YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'İN AVANTAJLARI

- Kuadrupol MS ve ion trap MS düşük çözünürlüklüdür (unit resolution) ve **1 m/z fark** ile iyonları ayırabilir.
- TOF ve Orbitrap yüksek çözünürlüklüdür. **0.0006 m/z fark** ile iyonları ayırabilir. En önemli avantajlarından birisi “full scan mod” ile elde edilen doğru molekül kütlelerinin kullanımı sayesinde yeni ilaç ve metabolitlerinin mevcut olan tarama programlarına hızlı bir şekilde ilave edilebilmesidir.
- LC–HRMS/MS izobarik bileşiklerin ayrıştırılabilmesini sağlar.

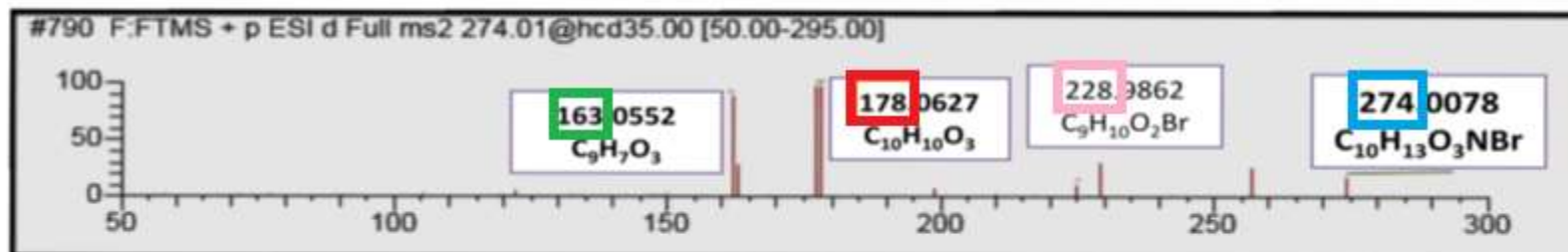
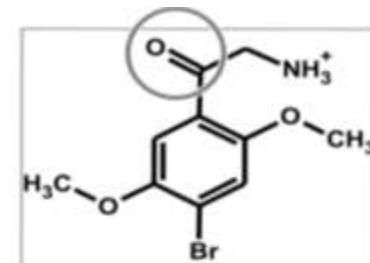
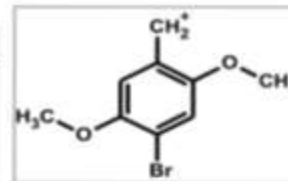
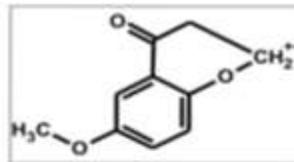
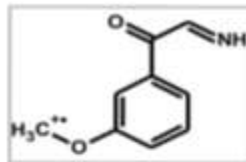
YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ MS'İN DEZAVANTAJLARI

- Yapısal ya da stereo izomer gibi aynı moleküler formüle sahip olan bileşikleri ayırt edemez. Bu durumda **kromatografik separasyon gerekir**.
- Kütle spektrum kütüphaneleri genellikle bir enstrümandan diğerine transfer edilemediği için **enstrümana özgü** kütüphanelerin oluşturulması gerekir.
- LC-HR/MS'in dinamik aralığı LC-MS/MS'inkisinden **daha küçüktür**. Dinamik aralık bir kütle analizörünün doğru olarak ölçebileceği en yüksek konsantrasyon demektir.
- **Pahalıdır**.

İZOBARİK BİLEŞİKLER; HRMS

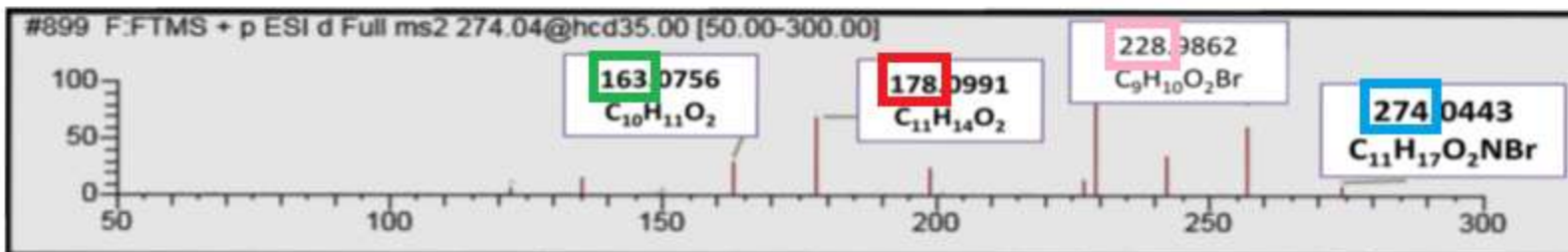
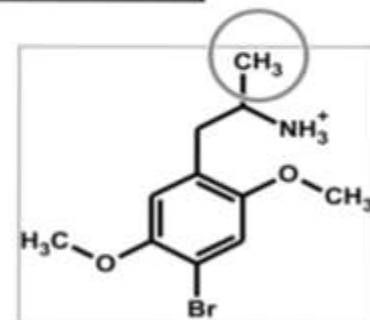
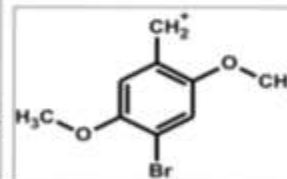
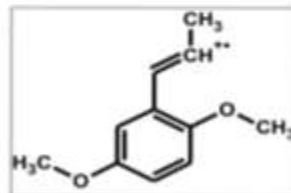
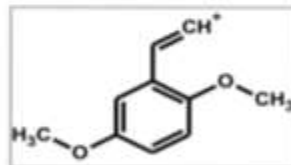
2-amino-1-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanone

Beta-keto-2CB

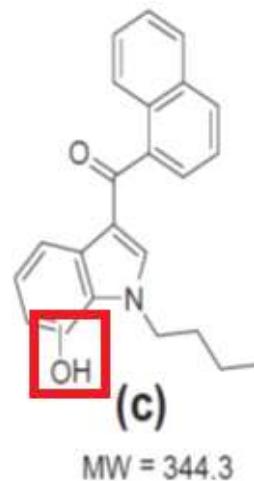
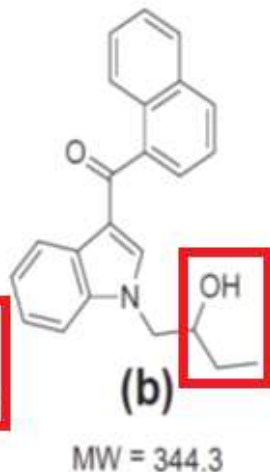
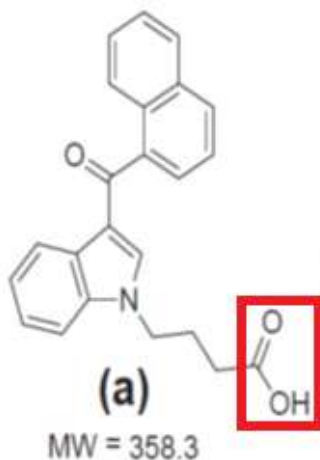
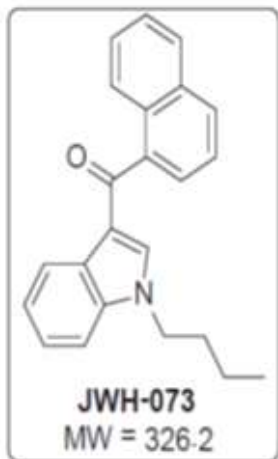


2,5-dimethoxy-4-bromamphetamine

DOB



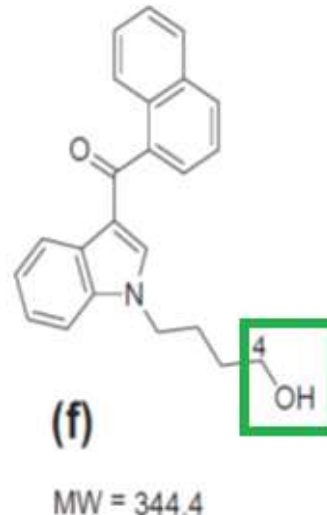
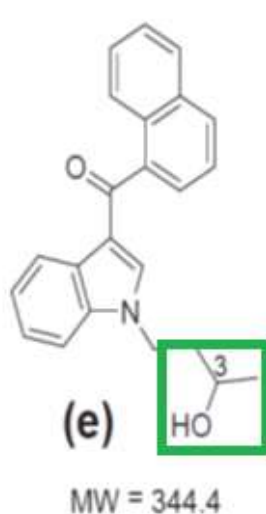
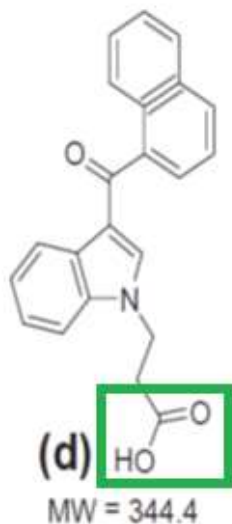
SENTETİK KANNABİNOİDLER



(a) Carboxylation the N-alkyl chain

(b) Monohydroxylation at the N-alkyl chain

(c) Monohydroxylation at the indole moiety



(d) Demethylation and carboxylation at the N-alkyl chain

(e, f) Monohydroxylation at the N-alkyl chain

ÖZET

- Adli toksikoloji laboratuvarındaki **tüm analizler için yeterli tek bir teknik yoktur.**
- GC-MS, LC-MS/MS ve LC-HRMS'in toksikolojik analizlerde **avantaj ve dezavantajları** vardır. Bu nedenle de **birden fazla tekniğin kombine kullanılması** gerekir.
- Full scan ile karşılaştırıldığında SIM ve SRM modları analitik sensitiviteyi en az 100 kat artırır. Bu nedenle, **GC-MS ve LC-MS/MS özellikle targeted analizlerde** tercih edilmelidir.

ÖZET

- **Yüksek çözünürlüklü MS'ler** referans standartlar olmadan da fullscan MS ve MS/MS modlarında bileşiklerin doğru kütlelerini belirleyerek kütüphanede olmayan analitlerin tespitini yapabildiği için **nontargeted taramalarda gold standarttır**. Ancak pratikteki temel sıkıntı izomerik bileşiklerin ayrımıdır.
- Yeni bileşiklerin tespiti için; numuneler öncelikle **LC-HR/MS** ile full-scan modda taranır. Bu sayede tespit edilen tüm bileşiklerin elemental yapısı belirlenir.
- Sonraki basamakta ise; bu bileşiklerin kimyasal yapısını ortaya çıkaracak bilgilere ulaşabilmek için işe yarayabileceği düşünülen her bir sinyal için **LC-MS/MS** ile product iyonlar belirlenir.