

## Çift yönlü katı-faz ekstraksiyonu ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi ile kan örneklerinde sentetik kannabinoidlerin tayini

### An LC-MS/MS method for determination of synthetic cannabinoids in human blood using bidirectional solid-phase extraction

Oya Yeter

**Corresponding author:** Oya Yeter

Department of Chemistry, The Council of Forensic Medicine, Fevzi Cakmak M, Kimiz Sk. No:1 Bahcelievler, 34196 Istanbul, Türkiye  
email: [oyayeter@yahoo.com](mailto:oyayeter@yahoo.com)

#### ÖZET

**AMAÇ:** Son yıllarda kullanımı hızla artan sentetik kannabinoidlerin kan örneklerinde tayini için hassas ve güvenilir bir sıvı-kromatografisi ardışık kütle spektrometrik (LC-MS/MS) metod sunulması amaçlanmıştır.

**YÖNTEM:** Kan örnekleri çift-yönlü katı faz ekstraksiyonu (BD-SPE) ile ekstrakte edildikten sonra LC-MS/MS'e enjekte edilmiştir. Toplam olarak 57 adet sentetik kannabinoid ve metabolitleri Poroshell 2,7µm (150x4.6mm) analitik kolonu ile gradiyent akış programı uygulanarak kantitatif olarak tayin edilmiştir. Metod validasyonu uluslararası rehberlere göre yapılmıştır.

**BULGULAR:** Sadece 0,5mL kan örneği kullanılarak, tespit (LOD) ve tayin (LOQ) sınırları 0,3 ve 0,5ng/mL veya daha düşük olarak belirlenmiştir. Metod 0,5-100ng/mL arasında en düşük 0,990 belirleme katsayısı ile lineerdir. Geri kazanım oranları %54- %115 arasında ve ortalama %87'dir. Matriks etkisi analiz hassasiyetini negatif olarak etkilememekte, kesinlik ve doğruluk kabul edilebilir seviyelerdedir.

**SONUÇ:** Her bir analitin düşük konsantrasyonlarda olsa bile tayinine imkân sağlayan metod adli ve klinik toksikoloji laboratuvarlarının rutin uygulamalarında kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sentetik kannabinoid, adli toksikoloji, LC-MS/MS, metod validasyonu.

#### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To present a sensitive and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determination of synthetic cannabinoids in blood samples is aimed in this study.

**METHODS:** The samples were prepared using a bidirectional solid phase extraction (BD-SPE) followed by injected to LC-MS/MS. A total of 57 synthetic cannabinoids and metabolites were separated on an Agilent Poroshell 2.7µm (150 × 4.6 mm) column with gradient program and determined quantitatively. The method validation was done according to international guidelines.

**RESULTS:** Limits of detection for all target analytes are 0.3 ng/mL or better, with only 0.5 mL of specimen used for analysis. The method is linear from 0.5 to 100 ng/mL with a correlation coefficient (R<sup>2</sup>) greater than 0.990. Recovery values were in the ranges of 54.0% and 115.0% with a mean of 87%. Matrix effects did not negatively affect analytical sensitivity and precision and accuracy were acceptable at any quality control level.

**CONCLUSION:** The method allowing the determination of each analyte, even at low concentrations, can be used in the routine applications of forensic and clinical toxicology laboratories.

**Keywords:** Synthetic cannabinoid, forensic toxicology, LC-MS/MS, validation.

## GİRİŞ

Yeni psikoaktif maddeler (NPS) içinde en büyük hacme sahip olan sentetik kannabinoidler (SK), 2004 yılından beri "Spice" ve "K2" gibi ticari isimler altında esrara "yasal" bir alternatif olarak pazarlanmaktadır (1). İsviçre, Avusturya ve Almanya gibi Avrupa ülkelerinde en azından 2006 yılından

beri satıldığı bildirilmektedir (2). Esrara benzer psikoaktif etkilere sahip olmak üzere, kimyasal sentez yöntemleri ile üretilen SK'ler, kurutulmuş bitki kırıntıları üzerine spreylenecek hazırlanmakta ve genellikle internet üzerinden "tütsü", "insanların tüketimi için değildir" ve "araştırma kimyasalı" gibi etiketlerle tanıtılarak satılmaktadır (3). Aynı bitki materyalinde bir veya birden fazla sentetik kannabinoid bulunabilmektedir. Başlan-

gıçta kullanımı ve imalatı için yasal bir engel olmadığından kötüye kullanımı hızla artmıştır. İlk olarak 2008 yılı sonlarında "Spice" ürünlerinde JWH-018 olarak adlandırılan sentetik kannabinoid tespit edilmiş (4,5) ve 2009 yılı başlarından itibaren Avrupa Birliği ülkelerinde JWH-018 içeren ürünler yasaklanmaya başlanmıştır (2). Ancak o zamandan beri molekül yapılarında küçük modifikasyonlar yapılarak yüzlerce sentetik kannabinoid piyasaya sürülmüştür. 2016 UNODC Dünya Uyuşturucu Raporuna göre yeni psikoaktif madde piyasası artmaya devam etmektedir. UNODC'ye ilk kez bildirilen yeni psikoaktif madde sayısı 2014 yılında 66, 2015 yılında 75 adettir. 2012-2014 yılları arasında bu gruptaki en büyük oran sentetik kannabinoidlere aittir. 2016 Avrupa Uyuşturucu Raporuna göre ise, EMCDDA tarafından izlenen yeni psikoaktif madde sayısı 560'ın üzerine çıkmış ve yine sentetik kannabinoidler bu grubun içinde en büyük orana sahip olmuştur. Ele geçirilen yeni psikoaktif madde miktarlarında da 2014 yılında toplam ele geçirme vaka sayısının %60'ından fazlasını ve ele geçirilen miktarın neredeyse %35'ini sentetik kannabinoidler oluşturmuştur (6).

Amerika Madde Bağımlılığı ve Akıl Sağlığı Hizmetleri İdaresi (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, SAMHSA), 2010 yılında 11.406 olan sentetik kannabinoidlerle ilişkilendirilen acil servis başvurularının 2011 yılında 28.531'e yükselerek yaklaşık olarak 3 kat arttığını bildirmektedir (7). Benzer şekilde Amerika'daki zehir kontrol merkezlerine gelen sentetik kannabinoid kullanımına bağlı çağrılar 2015 (3572 çağrı) yılında 2014 (1085 çağrı) yılına göre (%229) oranında artmıştır (8).

Sentetik kannabinoid arzı ve kullanımındaki dramatik artış göz önünde bulundurulduğunda, bu maddelerin gerek bitki karışımlarında gerekse biyolojik örneklerde tespiti için güvenilir analitik metotlara ihtiyaç vardır. Bitkisel materyallerdeki SK'lerin analizi için gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/

**Tablo 1:** LC-MS/MS de uygulanan akış program (Mobil faz A:2mM Amonyum asetat, % 0,1 formik asit (%5metanol içinde) ve mobil faz B:metanol).

| Zaman (dk.) | A (%) | B (%) | Akış Hızı (mL/dk) |
|-------------|-------|-------|-------------------|
| 0           | 90    | 10    | 0,6               |
| 0,3         | 90    | 10    | 0,6               |
| 3           | 20    | 80    | 0,6               |
| 7           | 5     | 95    | 0,6               |
| 11,10       | 90    | 10    | 0,6               |

MS), sıvı kromatografisi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (LC-HR/MS) nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve infrared spektroskopisi (FT-IR) gibi yöntemler kullanılmaktadır (9-18). Biyolojik örneklerde SK'lerin analizi için ise kan (19-23), saç (24-27), tükürükte (28-31) daha çok maddenin kendisi, idrarda (32-37) ise metabolitlerinin tayini için çalışmalar bildirilmiştir. Biyolojik örneklerde SK tayini için genellikle LC-MS/MS tercih edilmektedir (19-37). GC/MS tekniği kullanıldığında ise -SK'ler genellikle polar fonksiyonel gruplara sahip oldukları için- stabilite ve yeterli hassasiyet için türevlendirme gerektirir (38,39). Sıvı kromatografisi uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-TOF/MS), sıvı kromatografisi-orbitrap-kütle spektrometresi (LC-Orbitrap/MS) gibi yüksek çözünürlüğe sahip cihazlar ise yapı aydınlatılmasında sağladığı avantajlar nedeniyle uyuşturucu madde piyasasında henüz yeni görülmeye başlamış ve uluslararası veri tabanlarında yer almamış, analitik karakteristikleri bilinmeyen SK'lerin tanımlanmasında tercih edilmektedir (40-47). Aynı zamanda farmakolojik özellikleri bilinmeyen yeni SK'lerin metabolit profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda üstünlük sağlamaktadır (48-54). Sürekli değişen yapılarının ve metabolitlerinin tanımlanması gerekliliği, üretilen yeni SK'lerin eş zamanlı olarak referans standart maddelerinin bulunamaması gibi nedenlerle SK'lerin analizi adli bilimler laboratuvarları için çeşitli zorluklar içerir. Ayrıca SK'ler, içerdikleri fenol,

indol ve alkol gibi çeşitli fonksiyonel gruplar nedeniyle biyolojik örneklerden ekstrakte edilirken genel bir yaklaşım gerekmektedir. Bu çalışmada, kanda 57 adet sentetik kannabinoid ve metabolitlerinin kantitatif tayini için LC-MS/MS metodu tanımlanmıştır.

Kan örnekleri otomatik BD-SPE ile hazırlanmış ve metot validasyonu yapılmıştır. BD-SPE sistemi, ekstraksiyon sürecindeki muhtemel kontaminasyon riskini tamamen ortadan kaldırmayı sağlamaktadır. Sistem, 3mL SPE kartuşu kullanarak, şartlandırma, yıkama, kurutma ve elusyon ba-

samaklarını içermektedir. Ancak kan numunesi kartuşun üst kısmından değil, alt ucundan aspire edilerek yüklenmekte ve daha sonra normal yönde sorbent yatağından geçirilerek atığa gönderilmektedir. Bu şekilde sorbent yatağından iki kez geçirilmiş kan numunesi, sistemin diğer parçaları ile herhangi bir temasta bulunmaz.

Bu çalışmada, 57 adet SK ve metabolitlerinin otomatik BD-SPE kullanarak hazırlanan kan örneklerinde kantitatif tayini için bir LC-MS/MS metodu sunulmuştur. Metot validasyonu uluslararası rehberlere göre yapılmıştır [55-58].

**Tablo 2:** Her bir analit için MRM geçişleri ve alıkonma zamanları.

| Analit                           | MRM (m/z)*                    | Alıkonma Zamanı(dk.) | İç Standart                            |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|--|
| CP 47,497 C8 homolog             | 331,1 -> <u>313,1</u> ; 259,1 | 10,2                 | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| CP 47,497                        | 317,2 -> <u>299,0</u> ; 245,0 | 9,7                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| WIN 55,212-2                     | 427,1 -> <u>155,0</u> ; 100,1 | 7,7                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| CP 55,940                        | 375,2 -> <u>357,0</u> ; 245,0 | 8,4                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| 5-floro PB 22-3-karboksiindol    | 250,2 -> <u>206,0</u> ; 118,0 | 6,4                  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| 5-floro AKB48                    | 384,2 -> <u>135,0</u> ; 107,1 | 9,7                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| 5-floro AKB48 N-4-hidroksipentil | 400,2 -> <u>135,1</u> ; 107,1 | 8,3                  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| 5-floro ADB                      | 378,3 -> <u>318,2</u> ; 233,2 | 7,8                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB FUBINACA M2                   | 399,2 -> <u>354,0</u> ; 253,3 | 6,0                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB PINACA-N-5-hidroksipentil     | 347,2 -> <u>302,1</u> ; 213,0 | 5,9                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB-PINACA pentanoikasıit         | 361,2 -> <u>344,1</u> ; 217,0 | 5,8                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB CHMINACA                      | 357,3 -> <u>340,2</u> ; 312,1 | 8,0                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB CHMINACA M1                   | 373,2 -> <u>328,1</u> ; 257,1 | 6,0                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AB CHMINACA M2                   | 358,2 -> <u>241,1</u> ; 145,0 | 8,4                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| ADB PINACA                       | 345,3 -> <u>300,2</u> ; 214,7 | 7,8                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| ADB-PINACA-N-pentanoikasıit      | 375,2 -> <u>330,1</u> ; 217,0 | 6,1                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| AKB48 N-5-hidroksipentil         | 382,1 -> <u>135,1</u> ; 93,0  | 8,6                  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| AKB48 N-pentanoikasıit           | 396,1 -> <u>135,1</u> ; 93,0  | 8,4                  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| AM 2201                          | 360,0 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 7,9                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| AM2201 6-hidroksiindol           | 376,0 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 6,9                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| CUMYL 4-CN-BINACA                | 361,2 -> <u>243,0</u> ; 225,7 | 6,8                  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| JWH 122                          | 356,1 -> <u>169,1</u> ; 141,0 | 9,7                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH 122 N-4-hidroksipentil       | 372,1 -> <u>169,0</u> ; 141,0 | 7,4                  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 203                          | 342,2 -> <u>188,0</u> ; 127,0 | 9,2                  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |

|   |                               |      |  |
|---|-------------------------------|------|--|
| JWH 203 N-pentanoik asit                | 370,0 -> <u>200,0</u> ; 125,0 | 6,7  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 210                                 | 370,1 -> <u>214,1</u> ; 183,1 | 10,0 | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH 210 5-hidroksiindol                 | 386,1 -> <u>183,1</u> ; 155,0 | 7,8  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 210 N-pentanoik asit                | 400,1 -> <u>183,0</u> ; 155,0 | 7,9  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-250                                 | 336,1 -> <u>121,0</u> ; 91,0  | 8,5  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH 250 N-4-hidroksipentil              | 352,1 -> <u>186,1</u> ; 121,1 | 6,7  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 250 N-pentanoik asit                | 366,1 -> <u>121,0</u> ; 91,0  | 6,5  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 398 N-5-hidroksipentil              | 392,0 -> <u>189,0</u> ; 161,0 | 7,9  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 398 N-pentanoik asit                | 406,0 -> <u>188,9</u> ; 160,9 | 7,7  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-018                                 | 342,2 -> <u>214</u> ; 154,9   | 9,2  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH-018 -N-pentanoik asit               | 372,2 -> <u>155,0</u> ; 127,1 | 6,9  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-018-5-hidroksipentil                | 358,0 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 7,0  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-019                                 | 356,1 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 9,7  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH-073                                 | 328,2 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 8,6  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH-073-4-hidroksibutil                 | 344,0 -> <u>155,0</u> ; 127,0 | 6,7  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-081                                 | 372,1 -> <u>214,0</u> ; 185,0 | 9,4  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH 081 4-hidroksinaftil                | 358,1 -> <u>214,0</u> ; 170,1 | 8,3  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH 081-5-hidroksipentil                | 388,1-> <u>230,0</u> ; 185,0  | 7,2  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| JWH-200                                 | 385,1 -> <u>155,0</u> ; 114,1 | 6,5  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| JWH-201                                 | 336,1 -> <u>135,0</u> ; 121,0 | 8,5  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| MAM 2201                                | 374,3 -> <u>169,1</u> ; 140,9 | 8,4  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| MAM 2201- 4-hidroksipentil              | 390,2 -> <u>169,0</u> ; 141,0 | 7,1  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| MAM 2201-N-pentanoik asit               | 386,2 -> <u>169,0</u> ; 141,0 | 7,3  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| PB 22-3-karboksi indol                  | 232,2 -> <u>132,0</u> ; 118,0 | 7,3  | AB PINACA-d <sub>9</sub>               |
| RCS 4                                   | 322,1 -> <u>135,0</u> ; 107,0 | 8,5  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| RCS 4-N-5-karboksipentil                | 352,0 -> <u>135,0</u> ; 77,1  | 6,4  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| RCS4-N-5-hidroksipentil                 | 338,1 -> <u>135,0</u> ; 77,1  | 6,7  | JWH018-5-hidroksipentil-d <sub>5</sub> |
| RCS-8                                   | 376,1 -> <u>121,0</u> ; 91,0  | 9,8  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| UR 144                                  | 312,1 -> <u>214,1</u> ; 125,1 | 9,7  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| UR 144 N-5-hidroksipentil               | 328,1 -> <u>125,1</u> ; 97,1  | 7,6  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| UR 144 N-pentanoik asit                 | 342,1 -> <u>244,0</u> ; 125,0 | 7,5  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| XLR 11                                  | 330,1 -> <u>232,1</u> ; 125,1 | 8,6  | JWH018-d <sub>9</sub>                  |
| XLR 11 N-4-hidroksipentil               | 346,1 -> <u>248,1</u> ; 143,9 | 7,1  | UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>  |
| AB PINACA-d <sub>9</sub>                | 340,3->295,2; 224,2           | 7,4  |  |
| JWH018-d <sub>9</sub>                   | 351,2->155,2; 127,0           | 9,1  |  |
| JWH018-5-hidroksi pentil-d <sub>5</sub> | 363,5->155,2; 127,0           | 7,0  |  |
| UR144-4-hidroksipentil-d <sub>5</sub>   | 333,2->125,1; 97,1            | 7,6  |  |

\*: Miktar analizi için kullanılan iyonlar altı çizili olarak belirtilmiştir.

**Tablo 3:** Herbir analit için LOD, LOQ, linearite, matriks etkisi ve geri kazanım oranları.

| Analit                           | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) | Matriks Etkisi (%) | Geri Kazanım (%) |
|----------------------------------|-------------|-------------|--------------------|------------------|
| CP 47,497 C8 homolog             | 0,1         | 0,3         | 89                 | 58               |
| CP 47,497                        | 0,1         | 0,3         | 114                | 56               |
| WIN 55,212-2                     | 0,1         | 0,3         | 102                | 86               |
| CP 55,940                        | 0,2         | 0,4         | 93                 | 58               |
| 5-floro PB 22-3-karboksiindol    | 0,2         | 0,4         | 105                | 115              |
| 5-floro AKB48                    | 0,2         | 0,4         | 85                 | 86               |
| 5-floro AKB48 N-4-hidroksipentil | 0,2         | 0,4         | 92                 | 86               |
| 5-floro ADB                      | 0,1         | 0,3         | 98                 | 92               |
| AB FUBINACA M2                   | 0,3         | 0,5         | 113                | 115              |
| AB PINACA-N-5-hidroksipentil     | 0,1         | 0,3         | 85                 | 81               |
| AB-PINACA pentanoikasıit         | 0,2         | 0,5         | 109                | 115              |
| AB CHMINACA                      | 0,1         | 0,3         | 92                 | 110              |
| AB CHMINACA M1                   | 0,1         | 0,3         | 105                | 84               |
| AB CHMINACA M2                   | 0,3         | 0,5         | 93                 | 54               |
| ADB PINACA                       | 0,1         | 0,3         | 98                 | 60               |
| ADB-PINACA-N-pentanoikasıit      | 0,1         | 0,3         | 97                 | 86               |
| AKB48 N-5-hidroksipentil         | 0,1         | 0,3         | 105                | 77               |
| AKB48 N-pentanoikasıit           | 0,1         | 0,3         | 104                | 85               |
| AM 2201                          | 0,1         | 0,3         | 92                 | 81               |
| AM2201 6-hidroksiindol           | 0,2         | 0,4         | 102                | 86               |
| CUMYL 4-CN-BINACA                | 0,07        | 0,1         | 92                 | 95               |
| JWH 122                          | 0,1         | 0,3         | 85                 | 76               |
| JWH 122 N-4-hidroksipentil       | 0,1         | 0,3         | 97                 | 79               |
| JWH 203                          | 0,1         | 0,3         | 85                 | 76               |
| JWH 203 N-pentanoikasıit         | 0,1         | 0,3         | 103                | 93               |
| JWH 210                          | 0,1         | 0,3         | 85                 | 91               |
| JWH 210 5-hidroksiindol          | 0,1         | 0,3         | 99                 | 115              |
| JWH 210 N-pentanoikasıit         | 0,1         | 0,3         | 106                | 108              |
| JWH-250                          | 0,1         | 0,3         | 95                 | 97               |
| JWH 250 N-4-hidroksipentil       | 0,1         | 0,3         | 95                 | 83               |
| JWH 250 N-pentanoikasıit         | 0,1         | 0,3         | 101                | 94               |
| JWH 398 N-5-hidroksipentil       | 0,1         | 0,3         | 98                 | 89               |
| JWH 398 N-pentanoikasıit         | 0,1         | 0,3         | 97                 | 86               |
| JWH-018                          | 0,1         | 0,3         | 85                 | 74               |
| JWH-018 -N-pentanoikasıit        | 0,1         | 0,3         | 102                | 86               |
| JWH-018-5-hidroksipentil         | 0,1         | 0,3         | 105                | 92               |

|                            |     |     |     |     |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| JWH-019                    | 0,1 | 0,3 | 87  | 74  |
| JWH-073                    | 0,1 | 0,3 | 89  | 95  |
| JWH-073-4-hidroksibutil    | 0,1 | 0,3 | 102 | 88  |
| JWH-081                    | 0,1 | 0,3 | 85  | 62  |
| JWH 081 4-hidroksinaftil   | 0,1 | 0,3 | 85  | 60  |
| JWH 081-5-hidroksipentil   | 0,1 | 0,3 | 87  | 65  |
| JWH-200                    | 0,1 | 0,3 | 104 | 94  |
| JWH-201                    | 0,1 | 0,3 | 95  | 97  |
| MAM 2201                   | 0,2 | 0,4 | 85  | 90  |
| MAM 2201- 4-hidroksipentil | 0,2 | 0,4 | 95  | 83  |
| MAM 2201-N-pentanoikasit   | 0,1 | 0,3 | 99  | 110 |
| PB 22 3 karboksiindol      | 0,3 | 0,5 | 111 | 90  |
| RCS 4                      | 0,1 | 0,3 | 93  | 112 |
| RCS 4-N-5-karboksipentil   | 0,2 | 0,4 | 101 | 108 |
| RCS4-N-5-hidroksipentil    | 0,1 | 0,3 | 102 | 110 |
| RCS-8                      | 0,1 | 0,3 | 94  | 91  |
| UR 144                     | 0,1 | 0,3 | 85  | 74  |
| UR 144 N-5-hidroksipentil  | 0,1 | 0,3 | 89  | 85  |
| UR 144 N-pentanoik asit    | 0,1 | 0,3 | 104 | 109 |
| XLR 11                     | 0,2 | 0,4 | 94  | 78  |
| XLR 11 N-4-hidroksipentil  | 0,1 | 0,3 | 101 | 89  |

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Adli Tıp Kurumu Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonunun izni ile gerçekleştirilmiştir (12/12/2017; 21589509/2017/584).

### Kimyasallar

Panreac (Barselona, İspanya) marka metanol, etilasetat ve ultra distile su, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) marka asetik asit, formik asit ve amonyum asetat kullanılmıştır. Tüm çözücüler HPLC veya LC-MS analizlerine uygun saflıktadır. Katı faz ekstraksiyonu için OASIS HLB (60mg, 3mL) kartuşlar (Waters, Milford Massachusetts, USA) kullanılmıştır. XLR11, XLR 11 N-4-hidroksipentil, UR144, MAM 2201-4-hidroksipentil, 5-floro AKB48 N-4-hidroksipentil ve ADB PINACA referans standartları Chiron (Norway) firmasından diğer sentetik kannabinoidler ve iç standartlar (AB PINACA-d<sub>9</sub>, JWH018-d<sub>9</sub>,

JWH018-5-hidroksi pentil-d<sub>5</sub>, UR144-4-hidroksipentil-d<sub>3</sub>) ise Cayman (Ann Arbor, MI, USA) firmasından satın alınmıştır.

### Cihazlar

Numuneler Free Style otomatik BD-SPE sistemi LCTech (Germany) ile hazırlanmıştır. Analizler Agilent 1290 UPLC ve Agilent 6460 Jetstream (AJS) Triple Quad (Agilent Technologies, CA, USA)'den oluşan LC-MS/MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

### Stok Çözeltiler

Her bir referans standart 1,0mg/mL konsantrasyonda metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra tüm standartları içeren (1000ng/mL) karışım çözeltisi hazırlanmış ve gerekli oranlarda seyreltilerek (1-500ng/mL) arasında çalışma çözeltileri yapılmıştır. Kör kan örneğine, çalışma çözeltilerinden belir-

lenen miktarlarda eklenerek istenen konsantrasyonlarda kan örnekleri hazırlanmıştır. Kalite kontrol örnekleri ve kalibratörler için standart madde ekleme işlemi ekstraksiyon öncesinde yapılmıştır.

## Numune Hazırlama

0,5mL kan örneği üzerine 50 µL iç standart çözeltisi ve 2,0 mL distile su eklenerek titreşimli karıştırıcıda karıştırılır ve 5000 rpm de 10 dakika santrifüjlenir. İç standart çözeltisi her bir iç standart 200ng/mL konsantrasyonunda içermektedir ve metanol içinde hazırlanmıştır. Daha sonra üst faz otomatik BD-SPE sistemine ait 10mL'lik örnek kaplarına konulur.

Kartuşlar sırasıyla 2mL etil asetat, 2mL metanol ve 2mL distile su ile şartlandırılır. Kan örne-

ğinin tamamı kartuşa yüklendikten sonra 2mL %5'lik metanol çözeltisi ile 2 kez yıkanır. Kurutulan kartuşlardan sırasıyla 0,5mLx2 metanol ve etil asetat ile geçirilerek toplanan eluatlar birleştirilir. N2 altında kuruluğa kadar buharlaştırılan eluat 0,5 mL metanol/su (%20, v/v) ile yeniden çözülerek 10 µL eluat LC-MS/MS'e enjekte edilir.

## LC-MS/MS

LC-MS/MS sistemi Agilent 1290 UPLC ve Agilent 6460 Jet Stream (AJS) kütle spektrometresinden (Agilent Technologies, CA, USA) oluşmaktadır. Kromatografik ayırım 40°C'de Poroshell 2,7µm (150x4,6mm) analitik kolonu (Agilent, CA) kullanılarak gradiyent akış programı uygulanarak sağlanmıştır (Tablo 1).

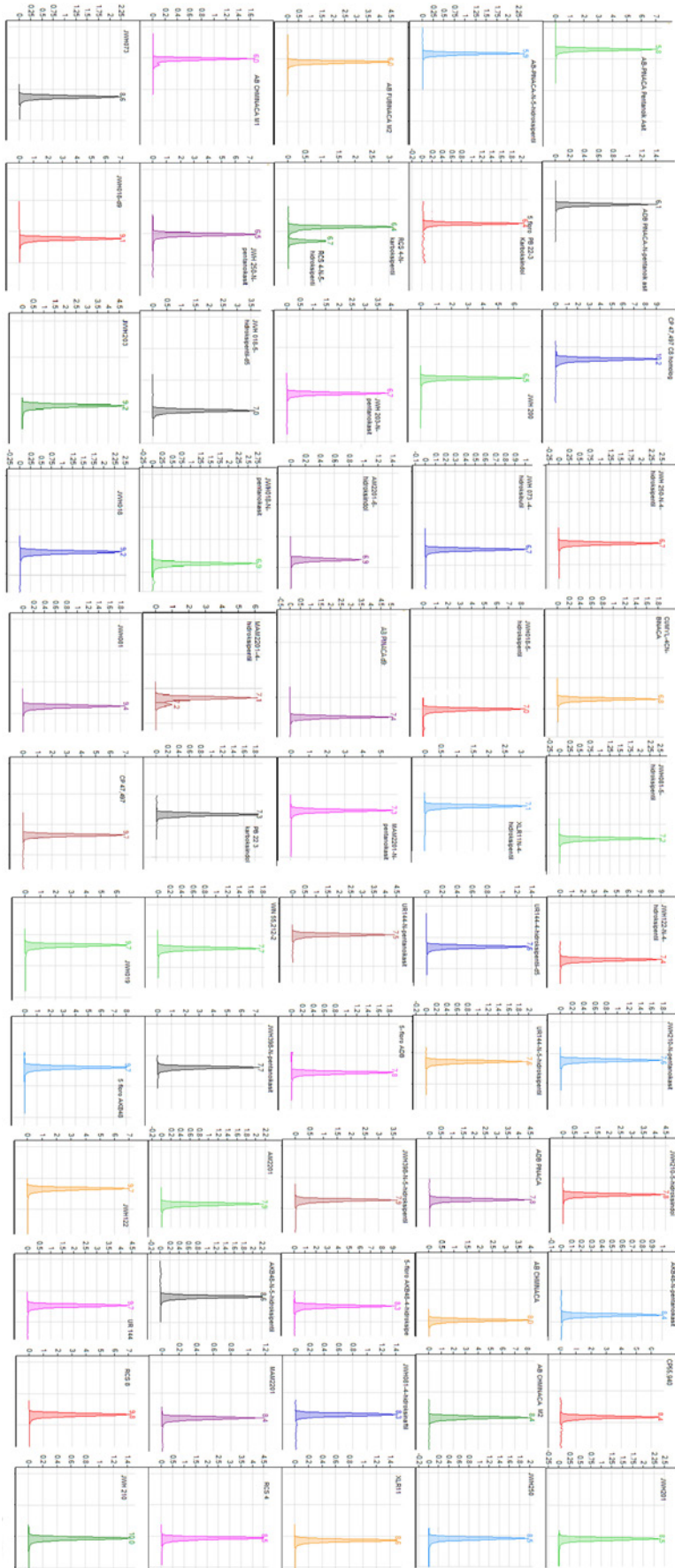
**Tablo 4:** Herbir analit için doğruluk ve gün-içi ile günler-arası kesinlik değerleri.

| Analit                           | Doğruluk (Bias)<br>PK, ng/mL |       |      | Gün-içi Kesinlik (%CV)<br>PK, ng/mL |      |      | Günler-arası Kesinlik (%CV)<br>PK, ng/mL |      |      |
|----------------------------------|------------------------------|-------|------|-------------------------------------|------|------|--|------|------|
|                                  | 0,5                          | 5     | 50   | 0,5                                 | 5    | 50   | 0,5                                      | 5    | 50   |
| CP 47,497 C8 homolog             | -9,5                         | -8,4  | 7,9  | 11,1                                | 6,1  | 5,2  | 19,2                                     | 6,5  | 5,5  |
| CP 47,497                        | 5,5                          | 13,3  | 9,8  | 11,1                                | 7,6  | 5,6  | 19,1                                     | 7,3  | 5,8  |
| WIN 55,212-2                     | -8,9                         | -5,5  | -8,6 | 6,7                                 | 8,7  | 8,6  | 5,9                                      | 7,8  | 7,2  |
| CP 55,940                        | 6,3                          | 9,3   | 8,9  | 19,6                                | 7,2  | 6,1  | 19,3                                     | 7,6  | 6,3  |
| 5-floro PB 22-3-karboksiindol    | 19,7                         | -1,6  | -1,1 | 14,5                                | 10,1 | 8,9  | 13,2                                     | 10,2 | 7,4  |
| 5-floro AKB48                    | 14,7                         | 12,2  | 9,1  | 18,3                                | 7,4  | 4,6  | 18,1                                     | 7,3  | 4,5  |
| 5-floro AKB48 N-4-hidroksipentil | 19,4                         | 7,5   | 4,2  | 10,6                                | 5,8  | 5,5  | 7,1                                      | 8,7  | 7,4  |
| 5-floro ADB                      | 19,2                         | 9,6   | 5,6  | 9,8                                 | 6,5  | 5,6  | 9,6                                      | 9,4  | 6,7  |
| AB FUBINACA M2                   | 18,9                         | 6,8   | 4,5  | 19,1                                | 15,5 | 5,7  | 17,8                                     | 10,4 | 5,9  |
| AB PINACA-N-5-hidroksipentil     | -3,6                         | -2,4  | -2,2 | 9,9                                 | 8,8  | 2,6  | 12,0                                     | 10,4 | 5,4  |
| AB-PINACA pentanoikasıit         | -17,4                        | -2,5  | -2,0 | 14,7                                | 10,8 | 10,6 | 19,7                                     | 11,0 | 9,7  |
| AB CHMINACA                      | -18,6                        | 12,1  | 8,6  | 17,7                                | 14,5 | 13,2 | 19,9                                     | 15,9 | 12,5 |
| AB CHMINACA M1                   | -5,7                         | -1,7  | -1,5 | 10,1                                | 5,8  | 2,8  | 12,3                                     | 6,7  | 6,0  |
| AB CHMINACA M2                   | -18,3                        | -3,9  | -1,2 | 16,4                                | 11,0 | 9,6  | 17,9                                     | 15,6 | 15,5 |
| ADB PINACA                       | 14,7                         | -14,3 | -7,7 | 4,8                                 | 2,6  | 3,8  | 6,0                                      | 4,9  | 2,9  |
| ADB PINACA-N-pentanoikasıit      | -8,9                         | -7,6  | -5,8 | 11,6                                | 10,1 | 7,1  | 18,5                                     | 16,6 | 8,7  |
| AKB48 N-5-hidroksipentil         | -18,7                        | 12,8  | 11,2 | 12,4                                | 6,1  | 4,7  | 12,0                                     | 6,0  | 5,9  |
| AKB48 N-pentanoikasıit           | -17,4                        | -1,5  | -1,1 | 11,6                                | 6,6  | 5,2  | 13,7                                     | 8,7  | 6,3  |
| AM 2201                          | -16,5                        | 2,1   | 3,1  | 13,1                                | 8,5  | 6,1  | 11,5                                     | 8,6  | 5,6  |



|                            |       |       |       |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| AM2201 6-hidroksiindol     | 18,2  | 7,8   | 5,6   | 13,9 | 8,3  | 5,9  | 13,4 | 10,7 | 6,5  |
| CUMYL 4-CN- BINACA         | 10,4  | 10,5  | 7,3   | 3,7  | 2,3  | 2,9  | 8,5  | 8,5  | 7,8  |
| JWH 122                    | -12,5 | 10,3  | 9,9   | 18,2 | 8,6  | 4,4  | 14,8 | 8,0  | 6,3  |
| JWH 122 N-4-hidroksipentil | 7,9   | 9,2   | 8,9   | 4,8  | 5,7  | 4,5  | 9,6  | 5,7  | 5,1  |
| JWH 203                    | -11,1 | 8,4   | 7,6   | 7,1  | 7,2  | 2,6  | 7,5  | 6,9  | 4,8  |
| JWH 203 N-pentanoikasil    | -19,5 | -8,7  | -9,0  | 18,1 | 14,1 | 14,7 | 16,4 | 14,7 | 10,1 |
| JWH 210                    | -8,9  | 7,3   | 6,5   | 19,9 | 15,1 | 8,0  | 16,1 | 14,1 | 9,0  |
| JWH 210 5-hidroksiindol    | 8,3   | 6,7   | 7,4   | 8,7  | 7,8  | 6,1  | 10,6 | 6,8  | 6,2  |
| JWH 210 N-pentanoikasil    | -15,6 | -9,2  | -9,8  | 17,1 | 11,2 | 10,3 | 15,4 | 14,6 | 12,4 |
| JWH-250                    | -19,8 | -8,9  | -9,2  | 8,3  | 4,4  | 3,5  | 6,4  | 5,4  | 3,7  |
| JWH 250 N-4-hidroksipentil | -18,7 | -7,7  | -8,4  | 8,2  | 2,3  | 4,3  | 7,1  | 4,9  | 4,6  |
| JWH 250 N-pentanoikasil    | -17,9 | -11,2 | -6,1  | 18,8 | 15,3 | 13,4 | 16,5 | 13,9 | 12,0 |
| JWH 398 N-5-hidroksipentil | -11,8 | 10,2  | 2,5   | 11,1 | 5,5  | 6,0  | 10,4 | 8,5  | 6,7  |
| JWH 398 N-pentanoikasil    | -15,3 | -10,1 | -7,4  | 14,3 | 11,1 | 6,8  | 12,1 | 10,8 | 9,6  |
| JWH-018                    | -17,9 | 10,5  | 9,8   | 6,5  | 5,1  | 4,8  | 6,5  | 5,4  | 4,1  |
| JWH-018 -N-pentanoikasil   | -19,4 | -9,2  | -8,4  | 19,1 | 12,7 | 3,7  | 18,1 | 12,0 | 10,6 |
| JWH-018-5-hidroksipentil   | -17,9 | -4,8  | -3,8  | 4,2  | 3,8  | 3,8  | 6,4  | 5,3  | 4,0  |
| JWH-019                    | -11,4 | 11,7  | 11,5  | 16,7 | 9,2  | 4,2  | 15,6 | 10,6 | 7,9  |
| JWH-073                    | -19,1 | -10,3 | -6,1  | 4,9  | 4,5  | 4,1  | 6,0  | 4,9  | 3,6  |
| JWH-073-4-hidroksibutil    | -18,9 | -14,9 | -4,9  | 5,9  | 2,8  | 3,0  | 7,5  | 6,1  | 4,3  |
| JWH-081                    | -16,4 | 14,1  | 10,1  | 9,4  | 4,6  | 4,0  | 7,7  | 5,5  | 5,5  |
| JWH 081 4-hidroksinaftil   | 8,9   | 10,5  | 9,8   | 17,9 | 12,9 | 4,2  | 19,5 | 12,0 | 8,2  |
| JWH 081-5-hidroksipentil   | -17,9 | -9,8  | -8,6  | 16,5 | 10,8 | 4,4  | 18,2 | 13,5 | 8,6  |
| JWH-200                    | -15,9 | -14,7 | -10,1 | 18,4 | 12,2 | 4,2  | 19,3 | 13,4 | 7,8  |
| JWH-201                    | -17,5 | -9,2  | -4,9  | 8,3  | 4,4  | 3,5  | 6,4  | 5,4  | 3,7  |
| MAM 2201                   | 16,7  | -11,6 | -9,8  | 14,7 | 14,3 | 7,6  | 15,1 | 12,3 | 8,2  |
| MAM 2201- 4-hidroksipentil | 16,5  | -13,8 | -4,7  | 19,7 | 13,4 | 9,1  | 19,9 | 15,2 | 13,4 |
| MAM 2201-N-pentanoikasil   | 16,3  | -10,3 | -8,4  | 4,8  | 8,6  | 6,1  | 7,2  | 5,8  | 5,1  |
| PB 22 3 karboksiindol      | -19,9 | -6,4  | -4,5  | 18,7 | 6,3  | 7,2  | 18,8 | 6,7  | 7,6  |
| RCS 4                      | -19,7 | -14,8 | 2,9   | 6,6  | 5,1  | 2,8  | 6,1  | 5,1  | 3,5  |
| RCS 4-N-5-karboksipentil   | -19,5 | -14,1 | -10,3 | 3,9  | 8,5  | 5,6  | 4,0  | 7,8  | 7,8  |
| RCS4-N-5-hidroksipentil    | -17,6 | -14,9 | -10,5 | 8,3  | 3,5  | 3,1  | 7,9  | 7,1  | 4,8  |
| RCS-8                      | -14,9 | 11,5  | 4,5   | 12,9 | 7,8  | 6,1  | 15,1 | 9,1  | 7,7  |
| UR 144                     | -16,8 | 1,6   | -0,8  | 19,8 | 12,2 | 7,3  | 19,9 | 10,6 | 8,8  |
| UR 144 N-5-hidroksipentil  | -19,6 | -12,7 | -10,1 | 6,6  | 11,0 | 4,1  | 8,0  | 7,8  | 3,9  |
| UR 144 N-pentanoikasil     | -18,7 | -11,7 | -9,6  | 13,7 | 15,6 | 6,1  | 14,3 | 10,3 | 5,6  |
| XLR 11                     | -19,9 | -14,7 | 9,9   | 13,3 | 6,3  | 2,8  | 11,9 | 5,5  | 4,3  |
| XLR 11 N-4-hidroksipentil  | -19,9 | -6,2  | -5,3  | 19,3 | 9,8  | 6,5  | 19,6 | 17,3 | 11,7 |





Şekil 1: Tüm analitleri [ng/mL] içeren kan örneği ekstraktına ait MRM kromatogramı.

Cihaz parametreleri; gaz temp:300, gaz akış hızı:10mL/min, nebulizer:40psi ve kapiler voltaj:2500V olarak seçilmiştir.

## Metot Validasyonu

Metot validasyonu linearite, doğruluk, gün-içi ve günler-arası kesinlik, seçicilik, geri kazanım, LOD (tespit limiti), LOQ (tayin limiti) ve matriks etkisi parametreleri ile uluslararası rehberlere göre yapılmıştır(62-65).Seçicilik için 6 farklı kör kan örneği çalışılmış ve analit ve iç standart alıkonma zamanlarında girişim yapan herhangi bir pik görülmemiştir. Linearite 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında kirlenilen kör kan örneklerinin her bir konsantrasyonda 3 bağımsız tekrar analizi ile değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri %20 kesinlik değerini sağlayan en düşük konsantrasyonda kirlenilen kör kan örneklerinin (n=10) analizi ile belirlenmiştir. Kalite kontrol örnekleri, kör kan örneğinin düşük (0,5ng/mL), orta (5ng/mL) ve yüksek (50ng/mL) konsantrasyonlarda analit ile kirlenilerek hazırlanmış, doğruluk ve gün-içi kesinlik parametreleri her bir seviyenin 10 tekrar analiz sonuçları ile değerlendirilmiştir. Günler-arası kesinlik ise 5 ardışık günde her bir konsantrasyon seviyesinde 3 tekrar analiz yapılarak belirlenmiştir. Doğruluk ve kesinlik parametreleri sırasıyla %bias ve %CV olarak ifade edilmiştir. Numuneler arasında taşınma olup olmadığı kör matriks ile en yüksek kalibratör arka arkaya analiz edilerek kontrol edilmiştir (n=6). Geri kazanım, matriks etkisi düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (n=6), Matuszewski ve ark. önerdiği yaklaşımla incelenmiştir (58).

## BULGULAR

LC-MS/MS metodu her bir analit için 2 fragment ion ile dinamik MRM (multiple- reaction monitoring) modunda çalışılmıştır.5ng/mL seviyesinde tüm analitleri içeren kan örneği ekstraktına ait MRM kromatogramı Şekil 1'de verilmiştir. Analitler için alıkonma zamanları Tablo 2'de verilmiştir. Seçicilik çalışması 6 farklı kaynaktan alınan kör kan örnekleriyle yapılmış ve ilgili alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlenmemiştir.

Tüm analitler için lineer aralık en az 0,990 korelasyon katsayısı ve (1/x) regresyon modeli (x,konsantrasyon) ile 0,5-100ng/mL olarak tespit edilmiştir. Numuneler arasında herhangi bir analit için taşınma tespit edilmemiştir. Metodun validasyon sonuçları Tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla (0,07-0,3ng/mL) ve (0,1-0,5ng/mL) arasındadır. En düşük LOD (0,07ng/mL) ve LOQ (0,1ng/mL) değerleri CUMYL-4CN-BINACA için bulunmuştur. Geri kazanım oranları %54- %115 arasında ve ortalama %87 olarak hesaplanmıştır. Doğruluk sonuçları düşük, orta ve yüksek konsantrasyon seviyelerinde sırasıyla (%3,6-19,9), (%1,5-14,9) ve (%1,1-11,5) arasındadır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik düşük seviyede (%3,7-19,9) ile (%4,0-19,9), orta seviyede (%2,3-15,6) ile (%4,9-16,6) ve yüksek seviyede (%2,6-14,7) ile (%2,9-15,5) arasındadır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Yeni psikoaktif maddeler birçok ülkede artmakta ve biyolojik örneklerdeki analizleri hem adli hem de klinik laboratuvarlar için zorluklar barındırmaktadır. Yeni psikoaktif maddeler içinde önemli bir hacme sahip sentetik kannabinoidlerin biyolojik örneklerde analizi için adli ve klinik toksikoloji laboratuvarlarının hassas ve güvenilir metotlara ihtiyacı vardır. İdeal olarak kullanılan metotların hassas, güvenilir ve aynı zamanda çok sayıda maddeyi hızlı bir şekilde tarayabilmesi beklenir. Literatürde SK'lerin tek bir analiz ile hassas ve güvenilir bir şekilde taranması ve tayinine imkân sağlayan çalışma sayısı sınırlıdır. Kan örnekleri kullanılan SK ve metabolitlerinin birlikte tayin edilebilmesine imkân sağlar. Böylece ana maddenin bilinmesi ile hangi SK in kullanıldığına karar verilebilir.

SK'lerin toksisiteleri hakkında oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. 5 floro ADB gibi bazı SK'lerin, esrar etkin maddesi  $\Delta^9$ -THC'ye (Tetrahidrokanabinol) göre daha potent oldukları (59) ve bu nedenle düşük dozlarının dahi toksisiteye neden olabileceği düşünülmektedir. SK vakalarında bildirilen kan konsantrasyon düzeylerinin genellikle 1ng/mL nin altında (47,60-62) ya da biraz üstünde olması bu bilgiyi desteklemektedir.

Burada kan örneklerinde 57 adet SK ve metabolitin taranması ve miktar analizi için bir LC-MS/MS metodu sunulmaktadır. Metot, kanda SK'lerin ve metabolitlerinin tek bir enjeksiyonla hızlı, yüksek bir hassasiyetle ve güvenilir bir şekilde taranması ve kantitatif tayinini sağlamaktadır. Kullanılan numune hazırlama yöntemi BD-SPE ile ekstraksiyon sırasında örnekler arası olası bir çapraz kirlenme engellenmiş ve kan örneği SPE sorbentinden iki kez geçirildiği için analit geri

kazanım oranları da artırılmıştır. Metot yüksek geri kazanım oranları ile tekrarlanabilir ve yeniden üretilebilir sonuçlar sağlamaktadır. Bu anlamda literature katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Her bir analitin düşük konsantrasyonlarda olsa bile tayinine imkân sağlayan metot adli ve klinik toksikoloji laboratuvarlarının rutin uygulamalarında kullanılabilir. Hatta ihtiyaca göre daha fazla analit ve iç standartlar eklenerek metodun kapsamı genişletilebilir.

## KAYNAKLAR

1. UNODC, World Drug Report 2015. New York, 2015 Available at: [https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World\\_Drug\\_Report\\_2015.pdf](https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf). (cited: 4 March 2018).
2. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; c2009. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA, Understanding the 'Spice' phenomenon. 2009. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/spice>. (cited: 4 March 2018).
3. UNODC, Synthetic cannabinoids in herbal products. 2011. Available at: [https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic\\_Cannabinoids.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf). (cited: 4 March 2018).
4. Hudson S, Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Test Anal* 2011;3(7-8):466-78.
5. Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Müller M, Pütz M, Ferreirós N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J Mass Spectrom* 2009;44(5):832-7.
6. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; c2009. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA, European Drug Report, 2016. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001TRN.pdf>. (cited: 4 March 2018).
7. Rockville, MD. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Center for Behavioral Health Statistics and Quality. (December 4, 2012). Drug-Related Emergency Department Visits Involving Synthetic Cannabinoids. Available at: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/SR-1378/SR-1378.pdf>. (cited: December 2017).
8. Law R, Schier J, Martin C, Chang A, Wolkin A. (CDC), C.f.d.c., 2015. Notes from the Field: Increase in Reported Adverse Health Effects Related to Synthetic Cannabinoid Use – United States, January-May 2015. Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6422a5.htm>. (cited: December 2017).
9. Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J, Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci Int* 2010;198:31-8.
10. Logan BK, Reinhold LE, Xu A, Diamond FX. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States. *J Forensic Sci* 2012;57:1168-80.
11. Uchiyama N, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y. URB-754: a new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products. *Forensic Sci Int* 2012;227:21-32.
12. Hudson S, Ramsey J, King L, Timbers S, Maynard S, Dargan PI, Wood DM. Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabinomimetics in 'herbal high' products. *J Anal Toxicol* 2010;34:252-60.
13. Dresen S, Ferreiros N, Pütz M, Westphal F, Zimmermann R, Auwärter V. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *J Mass Spectrom* 2010;45(10):1186-94.
14. Moosmann B, Kneisel S, Girreser U, Brecht V, Westphal F, Auwärter V. Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[[5-fluoropentyl]-1H-indol-3yl]-[4-methylnaphthalen-1-yl]methanone using GC-MS, NMR analysis and a flash chromatography system. *Forensic Sci Int* 2012;220:e17-22.

15. Park Y, Lee C, Lee H, Pyo J, Jo J, Lee J, Choi H, Kim S, Hong RS, Park Y, Hwang BY, Choe S, Jung JH. Identification of a new synthetic cannabinoid in a herbal mixture: 1-butyl-3-(2-methoxybenzoyl) indole. *Forensic Toxicol* 2013;31(2):187-96.
16. Angerer V, Bisel P, Moosmann B, Auwärter V. Separation and structural characterization of the new synthetic cannabinoid JWH-018 cyclohexyl methyl derivative "NE-CHMIMO" using flash chromatography, GC-MS, IR and NMR spectroscopy. *Forensic Sci Int* 2016;266:e93-98.
17. Lee JH, Park HN, Leem TS, Jeon J, Cho S, Lee J, Baek SY. Identification of new synthetic cannabinoid analogue APINAC (adamantan-1-yl 1-pentyl-1H-indazole-3-carboxylate) with other synthetic cannabinoid MDMB(N)-Bz-F in illegal products. *Forensic Toxicol*;2017:35(1):45-55.
18. Uchiyama N, Asakawa K, Hanajiri RK, Tsutsumi T, Hakamatsuka T. A new pyrazole-carboxamide type synthetic cannabinoid AB-CHFUPYCA [N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide] identified in illegal products. *Forensic Toxicol* 2015;33(2):367-73.
19. Schaefer N, Kettner M, Laschke MW, Schlote J, Peters B, Bregel D, Menger MD, Maurer HH, Ewald AH, Schmidt PH. Simultaneous LC-MS/MS determination of JWH-210, RCS-4,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, and their main metabolites in pig and human serum, whole blood, and urine for comparing pharmacokinetic data. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(13):3775-86.
20. Ozturk S, Ozturk YE, Yeter O, Alpertunga B. Application of a validated LC-MS/MS method for JWH-073 and its metabolites in blood and urine in real forensic cases. *Forensic Sci Int* 2015;257:165-71.
21. Ozturk YE, Yeter O, Alpertunga B. Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC-MS/MS: Monitoring in forensic cases. *Forensic Sci Int* 2015;248:88-93.
22. Yeakel JK, Logan BK. Blood synthetic cannabinoid concentrations in cases of suspected impaired driving. *J Anal Toxicol* 2013;37(8):547-51.
23. Kneisel S, Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J Mass Spectrom* 2012;47:825-35.
24. Hutter M, Kneisel S, Auwärter V, Neukamm MA. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012;903:95-101.
25. Salomone A, Gerace E, D'Urso F, Corcia DD, Vincenti M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *J Mass Spectrom* 2012;47(5):604-10.
26. Kima J, Park Y, Park M, Kim E, Yang W, Baeck S, Lee S, Han S. Simultaneous determination of five naphthoylindole-based synthetic cannabinoids and metabolites and their deposition in human and rat hair. *J Pharm Biomed Anal* 2015;102(5):162-75.
27. Meejung P, Seonghoon Y, Jaesin L. Determination of XLR-11 and its metabolites in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2015;114(1):184-9.
28. Montesano C, Simeoni MC, Curini R, Sergi M, Lo Sterzo C, Compagnone D. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(13):3647-58.
29. Kneisel S, Auwärter V, Kempf J. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2013;5(8):657-69.
30. Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Romolo FS, Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, "spice" and stimulants in oral fluid. *J Chromatogr A* 2012;1258:37-42.
31. de Castro A, Piñeiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M. Quantification of selected synthetic cannabinoids and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013;1295:99-106.
32. Wohlfarth A, Scheidweiler KB, Chen XH, Liu HF, Huestis MA. Qualitative confirmation of 9 synthetic cannabinoids and 20 metabolites in human urine using LC-MS/MS and library search. *Anal Chem* 2013;85(7):3730-8.

33. Wohlfarth A, Scheidweiler KB, Castaneto M, Gandhi AS, Desrosiers NA, Klette KL, Martin TM, Huestis MA. Urinary prevalence, metabolite detection rates, temporal patterns and evaluation of suitable LC-MS/MS targets to document synthetic cannabinoid intake in US military urine specimens. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(3):423-34.
34. Scheidweiler KB, Jarvis MJ, Huestis MA. Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(3):883-97.
35. Jang M, Shin I, Kim J. Simultaneous quantification of 37 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 2015(2);33:221-34.
36. de Jager AD, Warner JV, Henman M, Ferguson W, Hall A. LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine-An Australian perspective. *J Chromatogr B* 2012;897:22-31.
37. Scheidweiler KB, Huestis MA. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014;1327:105-17.
38. Gambaro V, Arnoldi S, Bellucci S, Casagni E, Dell'Acqua L, Fumagalli L, Pallavicini M, Roda G, Rusconi C, Valoti E V. Characterization of in vitro metabolites of JWH-018, JWH-073 and their 4-methyl derivatives, markers of the abuse of these synthetic cannabinoids. *J Chromatogr B* 2014;957:68-76.
30. Grigoryev A, Melnik A, Savchuk S, Simonov A, Rozhanets V. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabinimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures. *J Chromatogr B* 2011; 879:2519-26.
40. Lovett DP, Yanes EG, Herbelin TW, Knoerzer TA, Levisky JA. Structure elucidation and identification of a common metabolite fornaphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference Standard. *Forensic Sci Int* 2013;226:81-7.
41. Shevyrin V, Melkozerov V, Nevero A, Eltsov O, Shafran Y. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid. *Forensic Sci Int* 2013;232:1-10.
42. Choi H, Heo S, Kim E, Hwang B.Y, Lee C, Lee J. Identification of (1-pentylindol-3-yl)-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone and its 5-pentyl fluorinated analog in herbal incense seized for drug trafficking. *Forensic Toxicol* 2013;31(1):86-92.
43. Shevyrin V, Melkozerov V, Nevero A, Eltsov O, Morzherin Y, Shafran Y. 3-Naphthoylindazoles and 2-naphthoylbenzimidazoles as novel chemical groups of synthetic cannabinoids: Chemical structure elucidation, analytical characteristics and identification of the first representatives in smoke mixtures. *Forensic Sci Int* 2014;242:72-80.
44. Shevyrin V, Melkozerov V, Nevero A, Eltsov O, Shafran Y, Morzherin Y, Lebedev AT. Identification and analytical characteristics of synthetic cannabinoids with an indazole-3-carboxamide structure bearing a N-1-methoxycarbonylalkyl group. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(21):6301-15.
45. Shevyrin V, Melkozerov V, Nevero A, Eltsov O, Shafran Y, Morzherin Y. Synthetic cannabinoid 3-benzyl-5-[1-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)-1H-indol-3-yl]-1,2,4-oxadiazole. The first detection in illicit market of new psychoactive substances. *Forensic Sci Int* 2016;259:95-100.
46. Blakey K, Boyd S, Atkinson S, Wolf J, Slottje PM, Goodchild K, McGowan J. Identification of the novel synthetic cannabinimimetic 8-quinolinyl 4-methyl-3-(1-piperidinylsulfonyl) benzoate (QMPSB) and other designer drugs in herbal incense. *Forensic Sci Int* 2016;260:40-53.
47. Yeter O. Identification of the synthetic cannabinoid 1-[4-cyanobutyl]-N-[2-phenylpropan-2-yl]-1H-indazole-3-carboxamide (CUMYL-4CN-BINACA) in plant material and quantification in post-mortem blood samples. *J Anal Toxicol* 2017;41(9):720-8.
48. Diao X, Carlier J, Zhu M, Pang S, Kronstrand R, Scheidweiler KB, Huestis MA. In vitro and in vivo human metabolism of a new synthetic cannabinoid NM-2201 (CBL-2201). *Forensic Toxicol* 2017;35(1):20-32.
49. Diao X, Scheidweiler KB, Wohlfarth A, Zhu M, Pang S, Huestis MA. Strategies to distinguish new synthetic cannabinoid FUBIMINA (BIM-2201) intake from its isomer THJ-2201: Metabolism of FUBIMINA in human hepatocytes *Forensic Toxicol* 2016;34(2):256-67.
50. Kim JH, Kim HS, Kong TY, Lee JY, Kim JY, In MK, Lee HS. In vitro metabolism of a novel synthetic cannabinoid, EAM-2201, in human liver microsomes and human recombinant cytochrome P450s. *J Pharm Biomed Anal* 2016;119:50-8.

51. Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G. Study on the phase I metabolism of novel synthetic cannabinoids, APICA and its fluorinated analogue. *Drug Test Anal* 2015;7(2):131-42.
52. Fietzke, M, Thomas, A, Beike J, Rothschild MA, Thevis M, Bender K. In vitro elucidation of the metabolic profile of the synthetic cannabinoid receptor agonists JWH-175 and JWH-176. *Forensic Toxicol* 2016;34(2):353-62.
53. De Brabanter N, Esposito S, Tudela E, Lootens L, Meuleman P, Leroux-Roels G, Deventer K, Van Eenoo P. In vivo and in vitro metabolism of the synthetic cannabinoid JWH-200. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013;27(18):2115-26.
54. Ozturk YE, Yeter O, Ozturk S, Karakus G, Ates I, Buyuk Y, Yurdun T. Detection of metabolites of the new synthetic cannabinoid CUMYL-4CN-BINACA in authentic urine samples and human liver microsomes using high-resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal* 2017;1-11.
55. FDA Bioanalytical Method Validation Guide 2011. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> (cited: 4 March 2018).
56. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred Qual Assur* 2002;7(11):441-9.
57. Eurachem the fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. Available at: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) (cited: 4 March 2018).
58. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75(13):3019-30.
59. Banister SD, Longworth M, Kevin R, Sachdev S, Santiago M, Stuart J, Mack J.B.C, Glass M, McGregor IS, Connor M, Kassiou M. Pharmacology of valinate and tert-leucinate synthetic cannabinoids 5F-AMBICA, 5F-AMB, 5F-ADB, AMB-FUBINACA, MDMB-FUBINACA, MDMB-CHMICA, and their analogues. *ACS Chem Neurosci* 2016;7(9):1241-54.
60. Angerer V, Jacobi S, Franz F, Auwärter VV, Pietsch J. Three fatalities associated with the synthetic cannabinoids 5F-ADB, 5F-PB-22, and AB-CHMINACA. *Forensic Sci Int* 2017;281:e9-15.
61. Rojek S, Kłys M, Maciów-Gtąb M, Kula K. A new challenge in forensic toxicology exemplified by a case of murder under the influence of a synthetic cannabinoid-AM-2201. *Leg Med* 2017;27:25-31.
62. Adamowicz P, Gieroń J, Gil D, Lechowicz W, Skulska A, Tokarczyk B. The effects of synthetic cannabinoid UR-144 on the human body—A review of 39 cases. *Forensic Sci Int* 2017;273:e18-21.