Konu

7

Enstrümantal Analiz Yöntemleri
Doğrulama Aşamasında Kullanılan Kromatografik Yöntemler

Hasan ERTAŞ, Rukiye DÖĞER, Melike AYDOĞDU, F. Nil ERTAŞ

Adli bilimlerde, kötüye kullanılan maddelerin analizinde alınan biyolojik örnek transfer ve güvenlik zinciri izlenerek laboratuvar ortamına getirilir ve uygun bir ayırma işleminin ardından duyar ve seçici bir yöntemle ölçüme geçilir. Öncelikle tarama amaçlı immünoassay testlerine tabi tutulur ve doğrulama testleri ise genellikle kromatografik yöntemlerle yapılır.[1] Aşağıda bu yöntemlerin seçimine ışık tutması için dayandıkları temel ilke hakkında bilgi verilecektir.

➤ Kuramsal Bilgi

Kromatografinin geçmişi Tswett'in geçtiğimiz yüzyıl başlarındaki çalışmalarına dayanır. Tswett, doğal bitki pigmentlerini $CaCO_3$ ile paketli bir kolonda ayırmayı başarmış ve oluşan renkli katmanlardan esinlenerek, renk yazmak anlamında kromatografi adını vermiştir. Günümüzdeki anlamı ise bir analitin iki faz arasında dağılıma uğrayarak, örnek matriksinden ayrılması esasına dayalı bir yöntem grubu olarak genişletilmiştir.[2] IUPAC tanımı ise "*Kromatografi birbirinden ayrılması istenen bileşenlerin biri durgun ve diğeri belli bir yönde hareketli faz olmak üzere iki faz arasında dağıldığı bir fiziksel ayırma yöntemidir. Elüsyon kromatografisi kromatografik bir yatak üzerinden veya içinden hareketli fazın sürekli geçtiği ve örneğin ise sınırlı miktarda sisteme beslendiği prosedür*" biçimindedir.

Kromatografik yöntemler durgun fazın fiziksel konumuna göre başlıca düzlemsel ve kolon kromatografisi olarak sınıflandırılır.[2] Düzlemsel kromatografide durgun faz düz bir destek üzerinde tutturularak, üzerinden hareketli fazın geçtiği kapalı bir odacığa yerleştirilir. Daha yaygın kullanılan kolon kromatografisinde ise durgun faz dar bir boru içine sıkıca paketlenir ve hareketli faz ise yerçekimi etkisiyle veya basınç uygulayarak, durgun fazın içinden geçirilir. Durgun faz genellikle bir katı dolgu maddesinin yüzeyine veya kolonun iç çeperine kaplanmış ince bir sıvı filmdir. Hareketli faz olarak da gaz, sıvı veya süperkritik akışkan kullanılabilir. Kolon kromatografisi bu hareketli fazın fiziksel konumuna göre gaz kromatografi (GC), sıvı kromatografi (LC) ve süperkritik akışkanla yürütülen kromatografi

➤ Sonuç

Adli Bilimlerde kötüye kullanılan madde analizi için farklı biyolojik matriksler çeşitli örnek hazırlama işlemlerinden geçirilmiş ve farklı cihazlarla farklı kolonlar kullanılarak, saptamalar yapılmıştır. Adli tıpta kullanılan analitik teknikler her ne kadar diğer analitik uygulamalara çok benzer bir yol izler görünse de sonuçları itibari ile cezai soruşturma ve mahkeme süreçlerinde kanıt niteliğinde etkilediğinden, bu analiz sonucunda maddenin nitel (kalitatif) analizinin güvenilirliği ön plandadır. Bu da kalitatif analiz sınırında nicel (kantitatif) tayinin alt sınırlarını oluşturan yöntemin belirtme sınırı (LOD) ve saptama alt sınırının (LOQ) diğer analizlere göre çok daha özenle oluşturulması gereğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu gereklilikler cihaz alt yapısı kadar analitik bilince sahip eğitimli personelin de ne denli gerekli olduğunu vurgulamaktadır.

Gerek daha hızlı ve güvenilir örnek hazırlama gerekse cihaz donanımlarındaki gelişmelere paralel daha duyar ve tekrarlanabilir sonuç veren yöntemlerin geliştirilmesini esas alan Analitik Kimya bilimindeki ilerlemeler, giderek daha zorlu analizlerin kapısını aralamaya devam etmektedir. Bu yolla biyolojik doku gibi çok karmaşık matrikslerde veya ağız sıvısı gibi çok az miktarda örneklerde eser düzeyde madde analizi için yöntem geliştirilmesi günümüzde mümkün hale gelmiştir. Buna karşın yeni sentezlenen tasarım maddelerin kullanımını artması gibi tehlikeler de yeni mücadele alanlarını oluşturmaktadır. Umarız ki gelecekte kötüye kullanılan ilaçların analizi için geliştirilen analitik yöntemler, bu kullanımın tamamen ortadan kalkmasında daha etkin bir rol üstlenecektir.

Kaynaklar

1. Ertaş FN. Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizi. Ed. Akgür S., Coşkunol H. Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi, E.Ü. Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü, Yayın No 3, 2014. p.211-232.
2. Harvey D. Modern Analytical Chemistry, Boston, Ed. Kate, K.T., McGraw-Hill, 2000.
3. Wells MJM. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics From Liquids in Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Ed. Mitra, S., New Jersey, John Wiley &Sons, 2003
4. Poole CF. The Essence of Chromatography, Amsterdam, Elsevier, 2003
5. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry URL: www.agilent.com/chem, (accessed: Tarihi:11.08.2017)
6. Sample Preparation Fundamentals For Chromatography, URL: https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf, (accessed: 11.08.2017)
7. Cunha RL, Lopes WA, Pereira PAP. Determination of free (unconjugated) amphetamine-type stimulants in urine samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and

Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (DLLME-GC-MS). Microchemical Journal 125 (2016) 230-235.

8. Concheiro M, dos Santos SM, Simoes S, Quintela O, de Castro A, Dias MJR, Cruz A, Lopez-Rivadulla M. Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. Forensic Sci Int. 2007;171: 44–51.
9. Fernández RMM, Wille SMR, Fazio V, Gosselin M, Samyn N. Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2010;878:1616–1622.
10. Lee HH, Lee JF, Lin SY, and Chen BH. Simultaneous identification of abused drugs, benzodiazepines, and new psychoactive substances in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Kaohsiung Journal of Medical Sciences 2016;32:118-127.
11. Wurita A, Hasegawa K, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I. et al. Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser. Legal Medicine (Tokyo) 2016;19:113-118.
12. Weinmann W, Vogt S, Goerke R, Müller C, Bromberger A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. Forensic Sci Int. 2000;113: 381–387.
13. Scheidweiler KB, and Huestis MA. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolitesin human urine by liquid chromatography–tandem massspectrometry. J. Chromatogr. A. 2014;1327:105–117.
14. Farina M, Yonamine M, and Silva OA. One-step liquid–liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. Forensic Sci Int. 2002;127 () 204–207.
15. Johansen SS, and Bhatia HM. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2007;852: 338–344.
16. Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, and Strand DH. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC–MS/MS. J. Chromatogr. B. 2009;877: 421–432.
17. Kim SY, Kim JY, Kwon W, In MK., Kim YE, and Paeng KJ. Method development for simultaneous determination of amphetamine type stimulants and cannabinoids in urine using GC–MS. Microchemical Journal. 2013; 110: 326–333.
18. Racamonde I, Rodil R, Quintana JB, and Cela R. In-sample derivatization-solid-phase microextraction of amphetamines and ecstasy related stimulants from water and urine. Analytica Chimica Acta. 2013;770: 75– 84.
19. Chepyala D, Tsai IL, Liao HW, Chen GY, Chao HC, and Kuo C. Sensitive screening of abused drugs in dried blood samples using ultra-high-performance liquid chromatography-ionbooster-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-IB-QTOF-MS). Journal of Chromatography A 2017;1491:57–66.

20. Scheidweiler KB, Newmeyer MN, Barnes AJ, and Huestis MA. Quantification of cannabinoids and their free and glucuronidemetabolites in whole blood by disposable pipette extraction andliquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 2016;1453:34–42.
21. Popa DS, Vlase L, Leucu a SE, and Loghin F. Determination of cocaine and benzoylecgonine in human plasma by LC-MS/MS. Farmacia 2009;57(3) 301-308.
22. Johansen SS, and Bhatia HM. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J Chromatogr B. 2007; 852: 338–344.
23. González JS, Carballal SG, Cabarcos P, Tabernero MJ, Barrera PB, Pi˜neiro AM. Determination of cocaine and its metabolites in plasma by porousmembrane-protected molecularly imprinted polymermicro-solid-phase extraction and liquid chromatography—tandemmass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2016;1451: 15–22.
24. Liu Y, Li X, Xu A, Nasser AF, and Heidbreder C. Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphineand naloxone in human plasma by liquid chromatography/tandemmass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2016;120:142–152.
25. Fernández P, González M, Regenjo M, Ares AM, Fernández AM, Lorenzo RA, et al. Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction bypacked sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 2017;1485:8–19.
26. Lin Z, Li J, Zhang X, Qiu M, Huang Z, Rao Y. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for thedetermination of seven recreational drugs in human whole bloodusing gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2017;1046:177–184.
27. Barnes AJ, De Martinis BS, Gorelick DA, Goodwin RS. Kolbrich E. A, Huestis M. A. Disposition of MDMA and Metabolites in Human Sweat Following Controlled MDMA Administration. Clin Chem. 2009;55(3): 454–462.
28. Huestis MA, Scheidweiler KB, Saito T, Fortner N, Abraham T, Gustafson RA. et al. Excretion of 9-tetrahydrocannabinol in sweat. Forensic Sci Int, 2008; 174:173–177.
29. Concheiro M, Shakleya DM, and Huestis MA. Simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates and nicotine metabolites in sweat by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 2011;400(1): 69–78.
30. Yonamine M, Tawil N, Moreau RLM, and Silva OA. Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. J Chromatogr B, 2003; 789: 73–78.
31. Kala SV, Harris SE, Freijo TD, and Gerlich S. Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral fluids by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. J. of Analytical Toxicology, 2008;32: 605-611.

32. Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, and Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. Clinical Chemistry, 2009;55(11):2004–2018.
33. Fritch D, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, and Cone EJ. Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates, and phencyclidine in oral fluid by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 2009;33: 569-577.
34. Sergi M, Montesano C, Odoardi S, Rocca LM, Fabrizi G, Compagnone D, and Curini R. Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. Journal of Chromatography A, 2013;1301: 139– 146.
35. de Castroa A, Pineiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M. Quantification of selected synthetic cannabinoids and 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2013;1295: 99– 106.
36. Milman G, Schwope DM, Gorelick DA, and Huestis MA. Cannabinoids and metabolites in expectorated oral fluid following controlled smoked cannabis. Clinica Chimica Acta, 2012;413:765–770.
37. de Toledo FCP, Yonamine M, de Moraes Moreau R L, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr B, 2003;798: 361–365.
38. Argente-García A, Moliner-Martínez Y, Campíns-Falcó P, Verdú-Andrés J, Herráez-Hernández R. Determination of amphetamines in hair by integrating sample disruption, clean-up and solid phase derivatization. Journal of Chromatography A 2016;1447: 47–56.
39. Leung KW, Wong ZCF, Ho JYM, Yip AWS, Ng JSC, Ip SPH. et al. Determination of hair ketamine cut-off value from Hong Kong ketamine users by LC–MS/MS analysis. Forensic Science Int. 2016;259: 53–58.
40. Shi Y, Cui X, Shen M, and Xiang P. Quantitative analysis of the endogenous GHB level in the hair of the Chinese population using GC/MS/MS. Journal of Forensic and Legal Medicine 2016;39:10-15.
41. Vandellia D, Palazzolia F, Verria P, Rustichellib C, Marchesia F, Ferraric A. et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandemmass spectrometric assay for quantitative analyses of triptans in hair. Journal of Chromatography B 2016:1017–1018;136–144.
42. Cappelle D, De Doncker M, Gys C, Krysiak K, De Keukeleire S, Maho W. et al. A straightforward, validated liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of nine drugs of abuse and their metabolites in hair and nails. Analytica Chimica Acta 2017;960: 101-109.

43. Míguez-Framil M, Moreda-Pi˜neiro A, Bermejo-Barreda P, Alvarez-Freire I, Tabernero MJ, Bermejo AM. Matrix solid-phase dispersion on-column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs in human hair. J. Chromatogr. A 2010;1217: 6342–6349.
44. Baciu T, Borrull F, Aguilar C, and Calull M. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. Analytica Chimica Acta 2015;856: 1-26.
45. Valente-Campos S, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA. Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass spectrometry. Forensic Sci Int. 2006;159:218–222.
46. Lemos NP, Anderson RA, and Robertson JR. Nail analysis for drugs of abuse: extraction and determination of cannabis in fingernails by RIA and GC-MS. J Anal Toxicol. 1999; 23:147-152.
47. Beck O, Sandqvist S, Dubbelboer I, and Franck J. Detection of 9-tetrahydrocannabinol in exhaled breath collected from cannabis users. J Anal Toxicol. 2011;35:541-544.
48. Berchtold C, Meier L, and Zenobi R. Evaluation of extractive electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for the detection of narcotics in breath. Int. J. Mass Spectrom. 2011;299: 145–150.
49. Beck O, Stephanson N, Sandqvist S, and Franck J. Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: comparison with plasma, urine and self-reporting in 47 drug users. J. Breath Res. 2013;7:1-11.
50. Concheiro M, Shakleya DM, and Huestis MA. Simultaneous quantification of buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine-glucuronide and norbuprenorphine-glucuronide in human umbilical cord by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Forensic Sci Int. 2009;188:144–151.
51. de Castroa A, Concheiro M, Shakleya DM, Huestis MA. Development and validation of a liquid chromatography mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates and metabolites in human umbilical cord. J. Chromatogr. B. 2009; 877:3065–3071.
52. Jones J, Rios R, Jones M, Lewis D, and Plate C. Determination of amphetamine and methamphetamine in umbilical cord using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2009; 877: 3701–3706.
53. Joya X, Pujadas M, Falcon M, Civit E, Garcia-Algar O, Vall O. et al. Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. Forensic Sci Int. 2010;196: 38–42.
54. de Castro A, Concheiro M, Shakleya DM, and Huestis M. A. Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. J Anal Toxicol. 2009;33(5):243-252.
55. Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. Anal Bioanal Chem. 2009 393(8):1977–1990.

56. Gunn JA, Sweeney B, Dahn T, Bell S, Newhouse R, and Terrell AR. Simultaneous Quantification of Amphetamine and Methamphetamine in Meconium using ISOLUTE® HM-N-Supported Liquid Extraction Columns and GC–MS. J Anal Toxicol. 2008; 32(7):485-490.
57. Peng Y, Hall S, and Gautam L. Drugs of abuse in drinking water – a review of current detection methods, occurrence, elimination and health risks. Trends in Analytical Chemistry. 2016;85: 232–240.
58. Mendoza A., Zonja B., Mastroianni N., Negreira N., López de Alda M., Pérez S. et al. Drugs of abuse, cytostatic drugs and iodinated contrast media in tap water from the Madrid region (central Spain):A case study to analyse their occurrence and human health risk characterization. Environment International 2016;86: 107–118.
59. Bujak R., Gadzała-Kopciuch R, Nowaczyk A., Raczak-Gutknecht J., Kordalewska M., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., Buszewski B. Selective determination of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in environmental samples by newly developed sorbent materials. Talanta 2016;146:401–409.
60. Klupczynska A., Derezi´nski P., Krysztofiak J., Kokot Z. J. Estimation of drug abuse in 9 Polish cities by wastewater analysis. Forensic Science Int. 2016;260:14–21.
61. Castrignanò E., Lubben A., Kasprzyk-Hordern B. Enantiomeric profiling of chiral drug biomarkers in wastewater withthe usage of chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2016;1438:84–99.