

POSTMORTEM KANDA LC-MS/MS İLE YASADIŞI MADDE TARAMASI: 62 POSTMORTEM ADLİ OLGUDA UYGULANMASI *

A screening method using LC-MS/MS for illicit drugs in postmortem blood: An application to 62 postmortem cases

Serap A. AKGÜR¹, Ceyhun DOLMA¹, Hasan ERTAŞ¹, Ceyda TEKER², Ali R. MORAL¹

Akgür SA, Dolma C, Ertaş H, Teker C, Moral AR. Postmortem kanda LC-MS/MS ile yasadışı madde taraması: 62 postmortem adli olguda uygulanması. Adli Tıp Bülteni, 2007;12(1):15-20

ÖZET

Biyolojik örneklerdeki yasadışı madde taraması adli olaylarda büyük bir öneme sahiptir. Kan veya plazma, madde derişimleri ile bu maddelerin farmakolojik etkileri arasında iyi bir korelasyonun bulunması nedeniyle genellikle tercih edilen materyallerdir. Yasadışı madde analizinde, birçok laboratuvar immunoassay yöntemleri ile tarama ve Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile doğrulama şeklinde bir uygulama yapmaktadır. Bununla birlikte, sıvı kromatografi tekniklerinin gelişmesiyle birlikte Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ve tandem LC-MS (LC-MS/MS) birleştirilmiş tekniklerinde özellikle polar ve ısıya dayanıksız olan maddelerin nitel ve nicel analiz amaçlı olarak kullanımı zamanla artmaktadır. Bu çalışmada, LC-ESI (Electrospray İonisation)-MS/MS de morfin, (±)-amfetamin, (±)-metamfetamin, kokain, benzolekgonin, kokaetilen ve (-)-11-nor-9-karboksi-9-THC maddeleri taranmış ve tayin edilmiştir. Sonuç olarak, postmortem kanda uygulanabilecek, türevlendirme işlemine gerek duymayan, duyarlı ve seçimli olarak, çok düşük düzeylerdeki maddelerin doğru ve kesin olarak saptanmasını sağlayacak, LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve 62 postmortem adli olguya başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Yasadışı madde, tarama, LC/MS/MS, postmortem kan

SUMMARY

Screening of biological specimens in the presence of illicit drugs is of great importance, particularly in criminal cases. The most relevant matrices to be analyzed for this purpose are plasma or blood, due to providing a good correlation between their concentration and pharmacological effects. For majority of laboratories, a common method for screening illicit drugs has been immunoassay methods and Gas Chromatography-coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) that is widely employed for confirmation purposes. However, the widespread use of liquid chromatography coupled single-stage or tandem mass spectrometry (LC-MS, LC-MS/MS) is becoming increasingly significant for both qualitative and quantitative analysis of target analyte which could be polar and thermally labile. This assay method, consisted of morphine, (±)-amphetamine, (±)-methamphetamine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and (-)-11-nor-9-carboxy-9-THC was based on the detection of LC-ESI-MS. In this study, LC-MS/MS method for illicit drugs in postmortem blood was developed. These data provided a documentation to use LC-MS/MS technique without any precipitation for postmortem blood to detect low concentrations of some illicit drugs and applied to 62 postmortem forensic cases.

Key words: Illicit drug, screening, LC-MS/MS, postmortem blood

¹ Ege Üniversitesi Zehirlenmeler Araştırma ve Uygulama Merkezi, İzmir

² Adli Tıp Kurumu İzmir Grup Başkanlığı, İzmir

* The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2006 Ljubljana/ Slovenya'da poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde yasadışı madde kullanımının yasalarla kontrol altına alınması çabasına karşın, madde kötü kullanımının; hastane, okul, trafik, işyerleri gibi farklı ortamlarda arttığı bildirilmektedir. Bu maddelerle bağlantılı zehirlenme olguları yanında, madde kullanımının suç işleme ile reddedilemez bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (1-4). Adli olaylarda, yasadışı madde taraması biyolojik örneklerdeki bu nedenle özellikle önem kazanmaktadır (5-8). Kan veya plazmadaki derişimleri ile onların farmakolojik etkileri arasındaki ilişki nedeniyle, bu materyallerdeki analizler genellikle tercih edilmektedir. Birçok analitik yöntemde kan ve plazma birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber, postmortem kanda hemoliz nedeniyle analizde farklı yaklaşımlar gerektirmektedir.

Yasadışı madde analizinde, birçok laboratuvar immunoassay yöntemleri ile tarama ve Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile doğrulama şeklinde bir uygulama yapılmaktadır (9-12). GC-MS yöntemi günümüzde referans olarak kullanılan en yaygın analitik yöntemdir. Diğer yandan kromatografik tekniklerdeki gelişmelerle beraber Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ve tandem LC-MS (LC-MS/MS) de özellikle polar ve ısıya dayanıksız olan maddelerde nitel ve nicel analiz yöntemi olarak hızla yükselmektedir (13-15). Son yıllarda toksikolojik analiz kapsamında LC-MS kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, postmortem kanda LC-MS/MS'de yasadışı maddelerin taramasında kullanılacak bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu yöntemde, LC-ESI (Electrospray Ionisation)-MS/MS'de (Agilent LC-MS Trap SL) morfin, (\pm)-amfetamin, (\pm)-metamfetamin, kokain, benzolekgonin, kokaetilen ve (-)-11-nor-9-karboksi- Δ 9-THC bakılmıştır.

Tablo 1. Bileşikler için seçilen iyon ve yakalanma zamanları.

Bileşik	Seçilen m/z oranı*	Alıkonma zamanı (dk)	İç standart
Morfin (M)	286 (201)	5.3	M-D3
Metamfetamin (MA)	150 (119)	1.2	MA-D5
Amfetamin (A)	136 (119)	1.2	A-D5
Benzolekgonine (B)	290 (168)	0.9	B-D3
Kokain (C)	304 (182)	1.2	C-D3
Kokaetilen(CE)	318 (196)	1.2	CE-D3
THC-C00H	345 (299)	4.3	THC-C00H-D3

* Parçalanma iyonları parentez içinde verilmiştir.

Bileşiklerin stok çözeltileri, kokain ve kokaetilen (deutorium analogları) metanolde, kokain ve kokaetilen (döteryum analogları) asetonitril'de hazırlanmıştır. Analitik referans materyaller olarak madde standartları ve döteryum iç standartlar Cerilliant (USA) firmasından temin edilmiştir. Yöntemin geçerli kılınması aşamasında, kullanılan kan, E.Ü. Kan Merkezi'nden ve olgu örneklerine ait kanlar Adli Tıp Kurumu İzmir Grup Başkanlığı'ndan temin edilmiştir. Örnekler analiz edilinceye kadar -70°C 'de saklanmıştır.

Ekstraksiyon için $500\mu\text{L}$ kan kullanılmıştır. Postmortem kanın yoğunluğunun fazla olmasından dolayı, kan üzerine 1:1 distile su eklenmiştir. 4 mM 'lık amonyum karbonat tamponundan 1 mL (0.01 M , $\text{pH}:9.4$) $500\mu\text{L}$ örneğe eklenir ve vortekste 30 sn. karıştırılır. Bu karışım daha sonra 15 dk. 10000g devirde santrifüjlenir. Elde edilen süpernatant ($\text{MeOH } 2\text{ mL}$, $\text{H}_2\text{O } 2\text{ mL}$) ile şartlanmış SPE kartuşlarına uygulanır. Elde edilen ekstrakt 40°C 'de azot gazı altında uçurulur. Elde edilen kuru ekstrakt, $20\mu\text{L}$ e LC-MS mobile faz (4 mM amonyum asetat) ile tamamlanır. $5\mu\text{L}$ 'lik kısım LC-MS/MS e analiz için enjekte edilir.

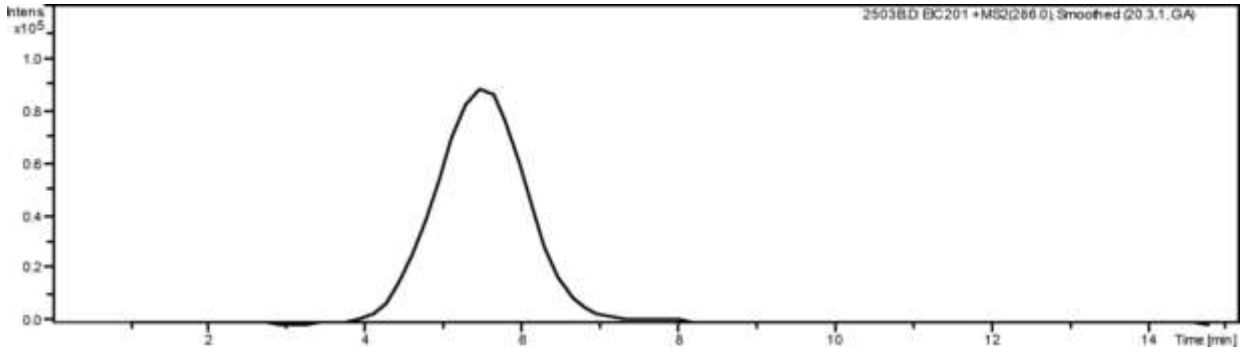
Kromatografik ayırmada, C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz, izokratik $40\% \text{ A}$ (ACN): $60\% \text{ B}$ (4 mM , $\text{pH } 4.6$ amonyum asetat) olarak ayarlanmıştır. Seçilmiş iyon monitoring (SIM) uygulanmıştır.

BULGULAR

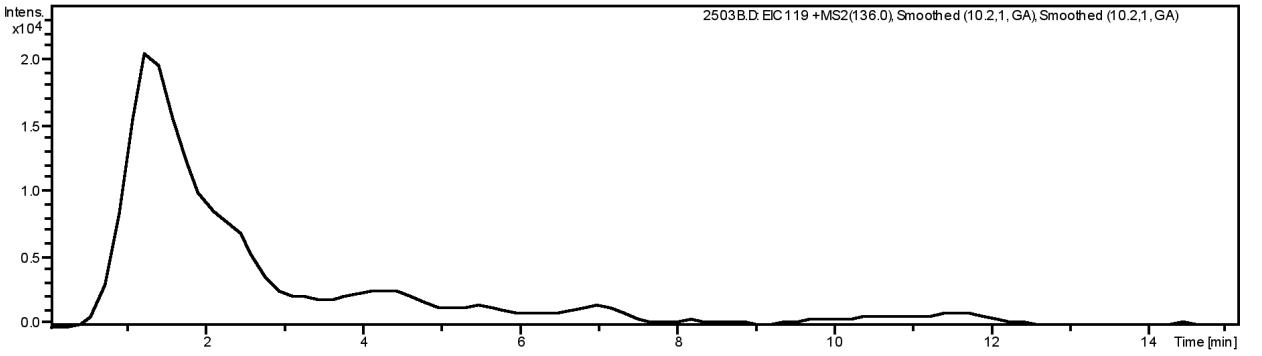
Her madde için altı ayrı derişimde hazırlanan standartlardan $10\text{-}250\text{ ng/mL}$ aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Her bir bileşik için seçilen iyon ve alıkonma zamanı Tablo 1'de verilmektedir. Her bir madde için 10 ng/mL deki LC-MS/MS iyon spektrumları, Şekil 1'de görülmektedir. En düşük saptama sınırı $4\text{-}9\text{ ng/mL}$ arasında elde edildi. Korelasyon katsayısı $r^2 = 0.994$ ve geri kazanım her bir madde için $\%79\text{-}87$ arasındaydı.

Şekil 1. Morfin, (\pm)-amfetamin, (\pm)-metamfetamin, kokain, benzolekgonin, kokaetilen ve (-)-11-nor-9-karboksi- ϵ -9-THC için LC-MS/MS iyon kromatogramları -10 ng/mL.

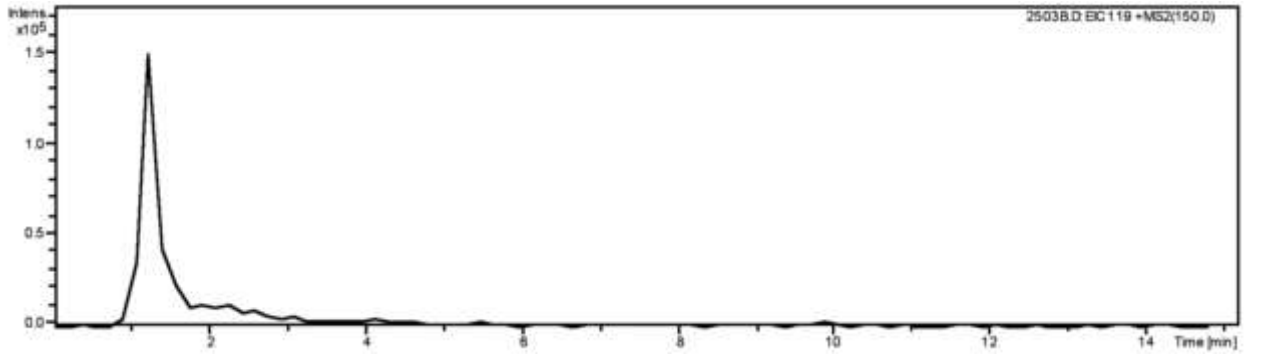
Morfin



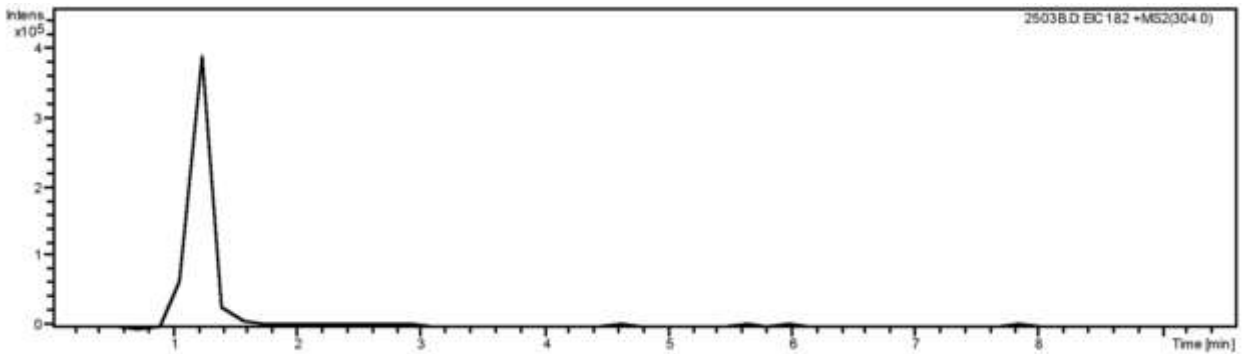
Amfetamin



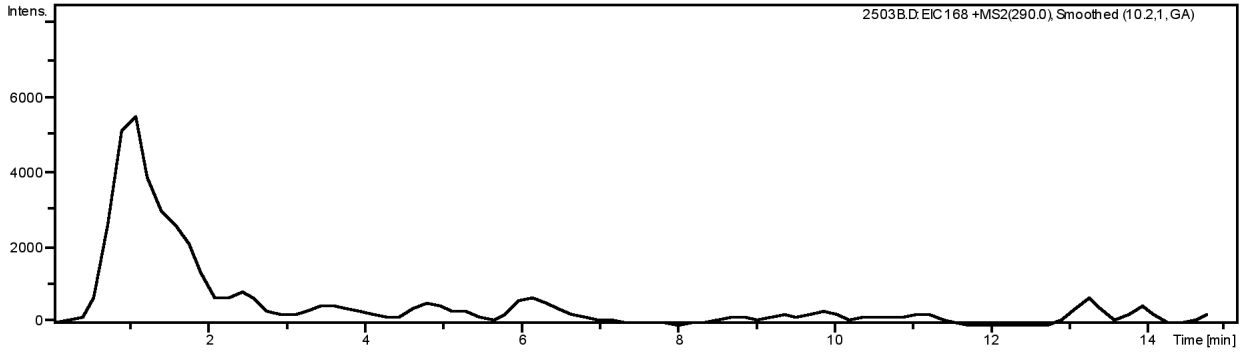
Metamfetamin



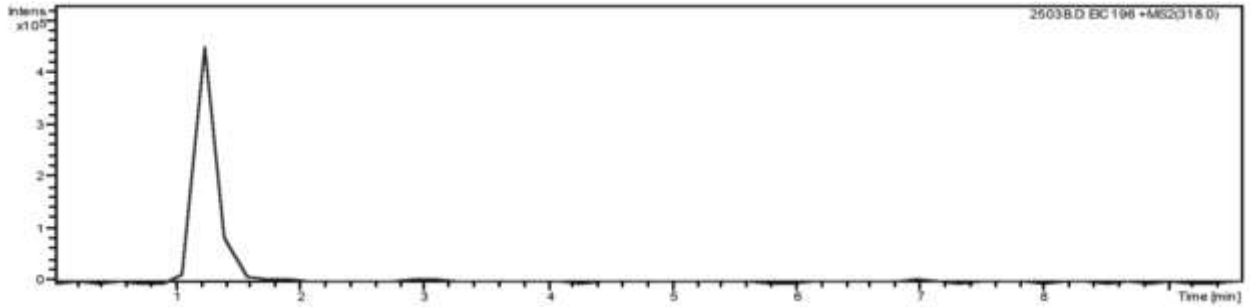
Kokain



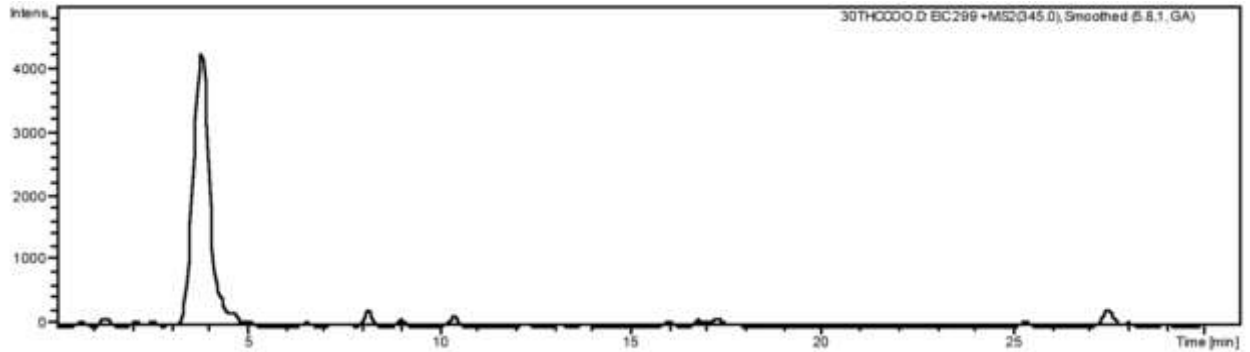
Benzolekgonin



Kokaetilen



THC-COOH



Toplam 62 adli olguya ait olay nedeni; ateşli silah yaralanması (n=23), trafik kazası (n=12), kesici-delici silah yaralanması (n=13), ası (n=7) ve darp (n=7) şeklindeydi. Yapılan analiz sonucunda 2 trafik kazası olgusunda THC-COOH pozitif bulundu (103 ve 110 ng/mL).

TARTIŞMA

Adli olgularda yasadışı madde analizinin önemi tartışılmaz ve bir çok laboratuvar bu maddelerin analizi için immunoassay ve/veya kromatografik yöntemler kullanmaktadır (16-18). Son yıllarda düşük maliyetli MS detektörlerinin gelişimi sonrası, insan vücudunda yabancı maddelerin varlığının analizi, LC-MS ve GC-MS (Gas

Chromatographic-MS) sistemlerinin uygulanabilirliği ile önemli bir ilerleme göstermiştir. İlaç ve kötüye kullanımı olan maddeler invivo olarak polar bileşiklere metabolize olurlar. Geleneksel gaz kromatografik sistemler, polar ve hidrofilik bileşiklerin analizini hedeflememiştir; bununla birlikte bu metabolitlerin gaz kromatografisi için uygun bileşiklere dönüşümü türevlendirilme işlemi ile sağlanabilmektedir. Bazı türevlendirme maddeleriyle polaritenin azaltılması ve uçuculuğunun artırılması ile bu analitlerin elde edilen karakteristik kütle spektrumu ile GC'de tanımlanmasında fırsat sağlanmakta ise de, böyle maddeler için likid kromatografik sistemleri son yıllarda önemli gelişmeler göstermiştir (10,19). Polar ve/veya ısıya dayanıksız maddelerin analizinde artık sıvı

Kromatografik (HPLC, LC-MS, LC-MS/MS) teknikler kullanılmaktadır (14,15,20,21).

Madde kullanımı ile suç işleme arasındaki ilişki nedeniyle, bu çalışmada toksikolojik analiz için farklı adli olgular seçilmiştir. Yapılan toksikolojik analiz sonucunda 2 trafik kazası olgusunda THC-COOH pozitif bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar trafikte madde kullanımının kaza riskini alkol kullanımında olduğu gibi artırdığını göstermektedir (7,22). Özellikle kötü kullanımı olan maddelerden kannabisin (esrar) tüm ülkelerde ilk iki sırada yer aldığı bildirilmektedir (23). Adli olaylarda, biyolojik örneklerdeki yasadışı madde taramasında hızlı, hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi olayın aydınlatılmasında önemli bir hizmet sağlayacaktır. LC-MS/MS’de, kromatogram, üç boyutlu spektrum, ve total iyon/parçalanma iyonlarına göre değerlendirme yapılması, doğrulamanın yöntem içinde yapılmış olmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada postmortem kanda uygulanabilecek, türevlendirme işlemine gerek duyulmadan uygulanabilen, çok düşük düzeylerdeki maddelerin doğru ve kesin olarak saptanmasını sağlayabilecek, LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve yöntem 62 adli olguya başarıyla uygulanmıştır.

Teşekkür

Bu çalışmanın yapılmasında gerekli postmortem örneklerin temini için Adli Tıp Kurumu İzmir Grup Başkanlığı’na ve gerekli standartların sağlanmasında verdiği desteklerden dolayı SEM Lab A.Ş’den Cahit Çökelez’e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Hernandez-Avila CA, Bureson JA, Poling J, Tennen H, Rounsaville BJ, Kranzler HR. Personality and substance use disorders as predictors of criminality. *Comprehensive Psychiatry* 2000;41(4):276-83.
- Giroud C, Menetrey A, Augsburg M. Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC and Δ^9 -THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people. *Forensic Sci Int* 2001;123(2-3):159-64
- Boles SM and Miotto K. Substance abuse and violence: A review of the literature. *Aggression and Violent Behavior* 2003;8(2):155-74.
- Lo CC. Sociodemographic factors, drug abuse and other crimes: How they vary among male and female arrestees. *Journal of Criminal Justice* 2004;32(5):399-409.
- Smink BE, Ruiter KJ, Lusthof KJ, Zweipfenning PGM. Driving under the influence of alcohol and /or drugs in the Netherlands 1995-1998 in view of German and Belgian legislation. *Forensic Sci Int* 2001;120:195-203.
- Bush MD. “Forensic drug testing”, Federal Bureau of Investigation. FBI-Laboratory Symposium on Forensic Toxicology 2004;33-38.
- Drummer OH, Gerostamoulos G, Batziris H, Chu M, Caplehorn J, Robertson MD, Swann P. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. *Accident Analysis & Prevention* 2004;36(2):239-48.
- Toennes SW, Kauert GF, Steinmeyer S and Moeller MR. Driving under the influence of drugs-evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine and correlation with impairment symptoms. *Forensic Sci Int* 2005;152(2-3):149-55.
- Gjerde H, Christophersen AS, Skuterud B. Screening for drugs in forensic blood samples using EMIT urine assays. *Forensic Sci Int* 1990;44:179-85.
- Segura J, Ventura R, Jurado C. Derivatization procedures for GC-MS determination of xenobiotics in biological samples with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications* 1998;713:61-90.
- Grönholm M and Lillsunde P. A comparison between on-site immunassay drug-testing devices and laboratory results. *Forensic Sci Int* 2001;121(1-2):37-46.
- Steinmeyer S, Bregel D, Warth S. Improved and validated for the determination of Δ^9 -THC and 11-OH- Δ^9 -THC in serum and in human liver microsomal preparations using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;772;(2):239-48.

13. Maurer HH. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;733(1-2):3-25.
14. Marquet P, Saint-Marcoux F, Gamble TN, Leblanc JCY. Comparison of a preliminary procedure for the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole-linear ion-trap mass spectrometer with a liquid chromatography-mass spectrometry reference technique. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003;789(1-5):9-18.
15. Maurer HH. 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):310-18.
16. Cagle JC, McCurdy HH, Pan YM et al. Evaluation of the CEDIA™ DAU assays and the AxSYM™ system for the analysis of cannabinoids in whole blood. *J Anal Toxicol* 1988;21(36):213-17.
17. Drummer OH. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;33: 27-45.
18. Maralikova B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004;811(1-5):21-30.
19. Marcoux FS, Lachâtre G, Marquet P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid-chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography—diode array detection. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 2003;14(1):14-22.
20. Decaestecker TN, Coopman EM, Van Peteghem CH, Van Bocxlaer JF. Suitability testing of commercial solid-phase extraction sorbents for sample clean-up in systematic toxicological analysis using liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003;789(1-5):19-25.
21. Thieme D, Sachs H. Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2003;492(1-2):171-86.
22. Mura P, Kintz P, Ludes B, Gaulier JM, Marquet P, Martin-Dupont S, Vincent F, Kaddour A, Gouille JP, Nouveau J, Moulisma M, Tilhet-Coartet S, Pourrat O. Comparison of the prevalence of alcohol cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: Results of a french collaborative study. *Forensic Sci Int* 2003;133:79-85.
23. Verstraete AG. Roadside testing for drugs: Recent development in Europe. *Proceedings of TIAFT, Helsinki. 2000:84-88.*

İletişim

Serap A. Akgür

Ege Üniversitesi

Zehirlenmeler Araştırma ve Uygulama Merkezi (ZAUM), Bornova, 35100, İzmir

E-posta: serap.akgur@ege.edu.tr