

Toksikolojik Analizlerde Kullanılan Analitik Teknikler

Analytical Techniques Used in Toxicological Analysis

Hüseyin Kayadibi 

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Başvuru Tarihi / Received: 04.04.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 12.04.2023

ÖZET

Toksikolojik analizler toksik ve yasadışı maddelerin tespiti, ilişkili olduğu hastalıkların tanı, takip ve tedavisinin değerlendirilmesi için yapılır. Numune türü olarak idrar, serum, plazma, kan, saç, tükürük, ter, tırnak, mide aspiratı ve içerisinde yabancı bir maddenin arandığı her türlü katı veya sıvı kullanılır. Bu analizlerdeki tarama yöntemleri hızlı, ucuz, yüksek hassasiyetli ve düşük özgüllüklü iken, doğrulama yöntemleri yavaş, pahalı, yüksek hassasiyet ve özgüllüklüdür.

Tarama yöntemleri başlıca immunoassayler ve kromatografik teknikler olup negatif örnekleri pozitif örneklerden ayırmak için, doğrulama yöntemleri ise tarama testlerinde pozitif çıkan sonuçların doğrulanması için kullanılır. Altın standart doğrulama yöntemi kütle spektrometridir.

Immunoassayler özgül olmadığı için çapraz reaksiyonlar görülebilir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi polar ve uçucu olmayan örnekler için uygun iken, gaz kromatografi uçucu örnekler için uygundur. Gaz kromatografi kütle spektrometri yöntemi immunoassay ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi tekniğinden daha sensitif iken örnek hazırlama süresi daha uzundur. Çünkü separasyon için maddeler ve metabolitleri genellikle az polar ve daha uçucu türevlerine dönüştürülür. Sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometri tekniğinin ise özgüllüğü ve duyarlılığı yüksektir, ancak analizi kompleksdir, deneyimli personel gerekir ve maliyeti yüksektir.

Toksikolojik analizler için yeterli olabilen tek bir analitik teknik yoktur. Birden fazla tekniğin kombine edilmesi önerilir.

Anahtar kelimeler: Immunoassay, kromatografi, kütle spektrometri, toksikoloji.

Hüseyin Kayadibi : <https://orcid.org/0000-0002-3922-4517>

Yazışma adresi: Hüseyin Kayadibi
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,
Eskişehir, Türkiye
e-posta: mdkayadibi@yahoo.com

ABSTRACT

Toxicological analyses are performed to detect toxic and illegal substances and diagnose, follow up and evaluate the treatment of related disorders. Urine, serum, plasma, blood, hair, saliva, sweat, nails, stomach aspirates, and any solid or liquid in which a foreign substance is sought are used as a sample type. While the screening methods in these analyzes are fast, inexpensive, susceptible, and lowly specific, validation methods are slow, expensive, susceptible, and specific.

Screening methods are mainly immunoassays and chromatographic techniques, which are used to distinguish negative samples from positive samples, while confirmation methods are used to confirm positive results in screening tests. The gold standard confirmation method is mass spectrometry.

Since the immunoassays are not specific, cross-reactions may occur. High-pressure liquid chromatography is suitable for polar and non-volatile samples, while gas chromatography is suitable for volatile samples. Gas chromatography-mass spectrometry is more sensitive than immunoassay and high-pressure liquid chromatography, while sample preparation time is longer. Because substances and their metabolites are usually converted to less polar and more volatile derivatives for separation. On the other hand, liquid chromatography-tandem mass spectrometry has high specificity and sensitivity, but its analysis is complex, requires experienced personnel, and is costly.

There is no single analytical technique sufficient for toxicological analysis. It is recommended to combine more than one technique.

Keywords: Immunoassay, chromatography, mass spectrometry, toxicology.

GİRİŞ

Toksikoloji, kimyasal maddelerin canlı organizmalardaki sistemler üzerinde istenmeyen, zararlı ve olumsuz sonuçlar oluşturan etkileşimlerini inceleyen bir bilimdir. Toksikolojinin alt dallarından birisi olan adli toksikoloji kötüye kullanımı olabilen yasadışı maddelerle ilgili ya da adli amaçla yapılan toksikolojik analizler ile ilgilenir iken, klinik toksikoloji tanı, takip ve tedavinin değerlendirilmesi için yapılan toksikolojik analizler ile ilgilenir (1).

Bu derlemenin amacı toksikolojik analizlerde kullanılan analitik tekniklerin ölçüm prensiplerini, avantaj ve dezavantajlarını açıklamaktır. Bu derlemenin önemi toksikolojik analizlerde kullanılan kromatografik yöntemlerin tarama ve doğrulama için detaylı bir şekilde açıklanmış olmasıdır.

Toksik maddelerden kötüye kullanılanlar alkol, uçucu maddeler, halüsinojen, uyuşturucu, uyutucu, uyarıcı maddeler ve metabolitleridir. Bu maddelerin analizleri için Clinical and Laboratory Standards Institute C43-A2, C50-A, C52-A2 ve C62-A kılavuzlarından faydalanılır. Toksikoloji laboratuvarında kullanılan numuneler idrar, serum, plazma, kan, saç, tükürük, ter, tırnak, mide aspiratı ve içerisinde yabancı bir maddenin

arandığı her türlü katı veya sıvıdır. Bu numunelerdeki toksikolojik analizlerde kullanılan analitik teknikler başlıca immunoassayler ve kromatografik yöntemlerdir.

ANALİTİK TEKNİKLER

İmmunoassay ve kromatografik yöntemler tarama ve doğrulama yöntemleri şeklinde iki ana başlıkta sınıflandırılabilir (2-6).

Tarama ve Doğrulama Yöntemleri

Tarama yöntemleri hızlı, ucuz, yüksek hassasiyetli ve düşük özgüllüklüdür. Doğrulama yöntemleri ise yavaş, pahalı, yüksek hassasiyetli ve yüksek özgüllüklüdür. Tarama yöntemleri immunoassayler ve kromatografik teknikler olmak üzere iki ana başlıkta sınıflandırılabilir. Kromatografik teknikler gaz kromatografi (GC), gaz kromatografi kütle spektrometri (GC/MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ve sıvı kromatografi kütle spektrometri (LC/MS)'dir. Bu yöntemler negatif örnekleri pozitif olabilecek örneklerden ayırabilmek için kullanılır. Doğrulama yöntemleri ise düşük çözünürlüklü (üçlü kuadropol [QQQ], ion trap, Qtrap) ve yüksek çözünürlüklü (time of flight [TOF], orbitrap, Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı [FT-ICR]) kütle spektrometri teknikleri

şeklinde iki ana başlıkta sınıflandırılabilir. Düşük çözünürlüklü kütle spektrometrisi cihazı hedeflenmiş (bilinen madde) analizler için, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi cihazı ise hedeflenmiş (bilinen madde) ve hedeflenmemiş (bilinmeyen madde) analizler için kullanılır (2-8). Doğrulama yöntemleri tarama testlerinde pozitif çıkan sonuçların doğrulanması için kullanılır. Doğrulama yöntemi olarak altın standart yöntem kütle spektrometrisi olup bu yöntemler;

- Mümkünse ekonomik olmalıdır.
- Bir çok laboratuvarında standardizasyonu sağlanabilecek kadar basit olmalıdır.
- Sonuçlar kanuni olarak savunulabilir olmalıdır.
- Mümkün olan en doğru ve en özgül yöntemler kullanılmalıdır.
- Tarama yöntemleri ile aynı ya da daha yüksek hassasiyete sahip olmalıdır.
- Tarama yönteminden farklı ve daha özgül bir fizikokimyasal prensibe dayalı olmalıdır.
- 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.
- Eğer kimyasal türevlendirme ile alıkonma zamanları değiştirilir ise hem tarama hem de doğrulama için aynı kromatografik tekniğin kullanılması kabul edilebilir.
- Eğer tarama yöntemi olarak immunoassay kullanıldı ise doğrulama yöntemi olarak kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş kromatografik metodlar kullanılabilir. Ancak yeteri kadar özgül olmayacağı için gaz kromatografisi alev iyonlaştırma dedektörü uygun değildir.
- Etanolde yalancı pozitif sonuç beklenmesine de ikinci bir analitik sistem kullanılarak doğrulama yapılması tavsiye edilir. Örneğin; enzimatik olarak saptanan etanol yüksekliği GC-headspace ile doğrulanabilir. Alternatif olarak eğer alıkonma

zamanında ve bazı maddelerin elüsyon sırasında belirgin bir değişiklik olacağı başka bir GC kolonu kullanılarak yapılan doğrulama da kabul edilebilir (2-8).

İmmunoassayler

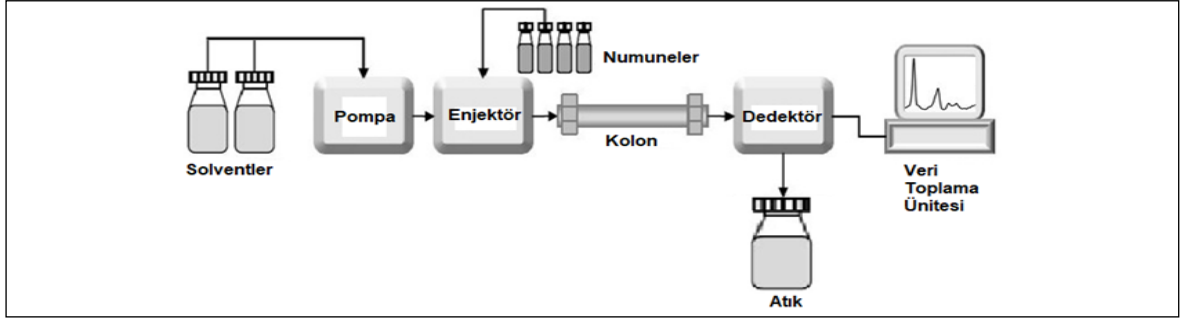
İmmunoassay yöntemleri özgül olmadığı için ölçülecek analite benzer yapıdaki maddelere karşı çapraz reaksiyonlar ve dolayısıyla yalancı pozitif sonuçlar görülebilir. Sadece farklı moleküller değil, madde veya maddenin inaktif metabolitleri de antikora karşı çapraz reaksiyon verebilir. İmmunoassaylerin avantajları; otomasyona uygunluğu, laboratuvar bilgi sistemine bağlanma kolaylığı, sınırlı manuel işlem gerekliliği ve sonuç verme süresinin kısalığıdır. Dezavantajları ise düşük hassasiyet, düşük özgüllük, interferansa açık olma, kapalı sistem olma, monoklonal antikor gerekliliği ve yüksek reaktif maliyetidir (9).

Kromatografi

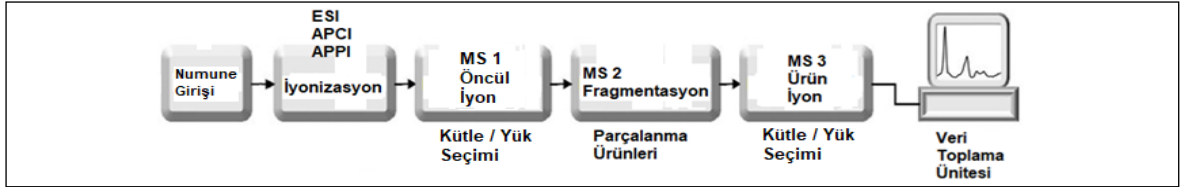
Toksikolojik analizlerde kullanılan diğer analitik teknik olan kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

a) Sıvı Kromatografi

Kromatografik tekniklerden HPLC polar ve uçucu olmayan örnekler için uygundur. HPLC'de numune mobil fazda çözünebilir. Bileşiklerin ısıya dayanıklı olması ve türevlendirilmesi gerekmez. HPLC tekniğinde madde sadece retansiyon zamanı ile tespit edilir iken sıvı kromatografisi sıralı kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) tekniğinde retansiyon zamanına ek olarak öncül ve ürün iyonlar ile tespit edilir (Şekil 1). Birinci kuadrupol filtrede kütle/yük oranına göre ayrılan moleküller (öncül iyon) collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi tutulur. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan moleküllerin (ürün iyon) üçüncü kuadrupol filtrede saptanması ile madde miktarı tayini yapılır (Şekil 2) (3-6, 10).



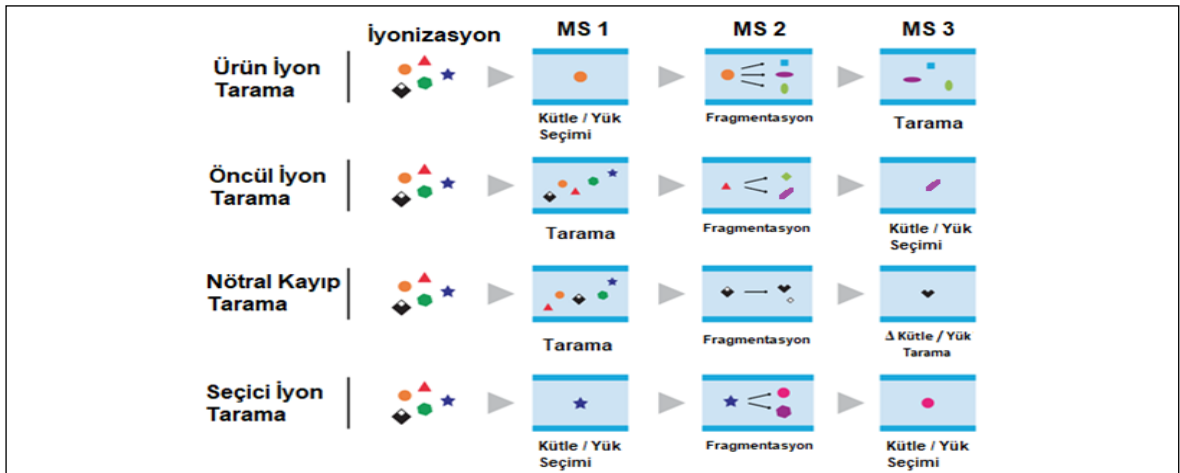
Şekil 1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi şeması



Şekil 2. Sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometri tekniği şeması

LC-MS/MS’de yapılacak analize özgü olarak dört farklı operasyon modu vardır. Bunlar ürün iyon tarama, öncül iyon tarama, nötral kayıp tarama ve seçici iyon taramadır (Şekil 3).

- Ürün iyon tarama: Birinci kütle analizöründe öncül iyon seçilir, ikinci kütle analizöründe argon gazı ile en zayıf bağlarından parçalarına ayrılır, üçüncü kütle analizöründe ise ürün iyonlar taranır.
- Öncül iyon tarama: Birinci kütle analizöründe tüm iyonlar taranır, ikinci kütle analizöründe argon gazı ile en zayıf bağlarından parçalarına ayrılır, üçüncü kütle analizöründe ise özgül fragment iyon seçilir.
- Nötral kayıp tarama: Birinci kütle analizöründe belirli bir kütle aralığındaki tüm iyonlar taranır, ikinci kütle analizöründe argon gazı ile en zayıf bağlarından parçalarına ayrılır, üçüncü kütle analizöründe ise nötral kayba uygun kütle aralığındaki iyonlar taranır.
- Seçici iyon tarama: Birinci kütle analizöründe öncül iyon seçilir, ikinci kütle analizöründe argon gazı ile en zayıf bağlarından parçalarına ayrılır, üçüncü kütle analizöründe ise bir ya da daha fazla fragment iyon seçilir.



Şekil 3. LC-MS/MS operasyon modları (11)

LC-MS/MS'in avantajları şunlardır;

- Özgülüğü yüksektir.
- Duyarlılığı yüksektir.
- Reaktif kullanım hacmi düşüktür.
- Immunoassaylere kıyasla yeni testler daha düşük maliyetle ve daha hızlı geliştirilebilir.
- Aynı numunede birden fazla analit eşzamanlı ölçülebilir.

LC-MS/MS'in dezavantajları şunlardır;

- Otomasyon uyumu yeterli değildir.
- Örnek hazırlığında manuel işlem gerekir.
- Analizi komplekstir.
- Deneyimli personel gerekir.
- Cihazın kurulum ve bakım maliyeti yüksektir.
- Onaylanmış ve geliştirilmiş kitler az veya yoktur (5, 6, 12, 13).

b) Gaz Kromatografi

Gaz kromatografideki analizler için ise bileşiklerin non-polar ve ısıya dayanıklı olması gerekir. Gaz kromatografi uçucu örnekler için uygundur. Gaz kromatografide mobil faz ile numune reaksiyona girmemelidir ve genellikle türevlendirme gerekir (Şekil 4).

GC-MS'in avantajları şunlardır;

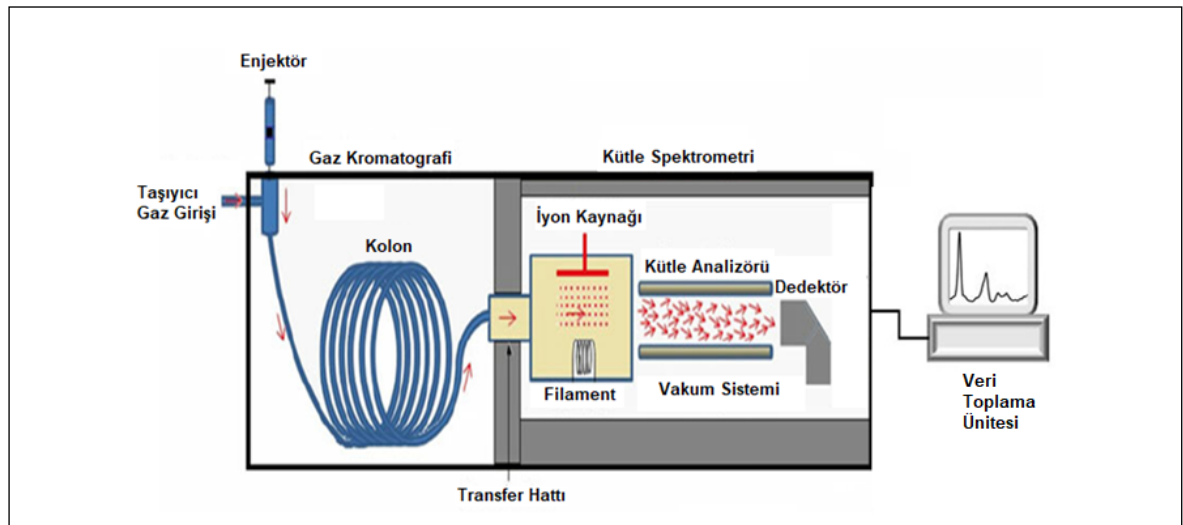
- Duyarlılığı immunoassay ve HPLC-UV'den yüksektir.
- Tekrarlanabilirliği yüksektir.
- Kütüphanesi olduğu için sistematik toksikolojik tarama, bu bileşiklerin eşleştirildiği kütüphanelerin kullanımıyla gerçekleştirilebilir.
- Headspace autosampler ile bağlantı sayesinde uçucuların analizi için idealdir.

GC-MS'in dezavantajları şunlardır;

- Uçucu olmayan, polar ve ısıya dayanıksız bileşikler için uygun değildir.
- Örnek hazırlama süresi uzundur. Çünkü separasyon olması için maddeler ve metabolitleri genellikle az polar ve daha uçucu türevlerine dönüştürülmelidir (3-5).

Düşük ve Yüksek çözünürlüklü Kütle Analizörleri

Kuadrupol gibi düşük çözünürlüklü kütle analizörlerinde aynı nominal kütleli iyonlara sahip bileşikler sadece kromatografik olarak ayrılabilir. Ancak yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri aynı nominal kütleyle sahip bileşikleri birbirinden ayrılabilir. Matriks kaynaklı iyon sinyalinde artma ya da baskılanma olmadığı sürece aynı nominal kütleyle sahip bileşiklerin kromatografik olarak ayrılması gerekmez (7, 8, 15, 16).



Şekil 4. Gaz kromatografi kütle spektrometri tekniği şeması (14)

Yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin avantajları şunlardır;

- TOF ve orbitrap gibi yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri 0,0001 dalton fark ile molekülleri ayırabilir.
- *Full scan mod* ile elde edilen doğru molekül kütlelerinin kullanımı sayesinde yeni madde ve metabolitleri mevcut olan tarama programlarına hızlı bir şekilde ilave edilebilir.

Yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin dezavantajları şunlardır;

- Aynı moleküler formüle sahip olan bileşikler ayırt edebilmek için kromatografik separasyon gerekir.
- Yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin dinamik aralığı düşük çözünürlüklü kütle analizörlerinininkisinden daha küçüktür. Dinamik aralık bir kütle analizörünün doğru olarak ölçebileceği en yüksek konsantrasyon demektir. Bu nedenle de yüksek konsantrasyonlardaki maddelerin analizinde daha fazla dülasyon gerekir.
- Elde edilen kromatogramlarda pikler kütle spektrometr cihazlarının lisanslı kütüphaneleri ile karşılaştırıldığında eşleştirilemez ise bu maddelerin tanımlaması yapılamaz.
- Çok pahalıdır (7, 8, 15, 16).

SONUÇ

Günümüzde toksikolojik analizler için yeterli olabilen tek bir analitik teknik yoktur. Bu analizlerdeki doğrulama için kullanılan altın standart analitik teknik kütle spektrometridir. Düşük ve yüksek çözünürlüklü kütle analizörlerinin her birinin avantaj ve dezavantajları olduğu için birden fazla tekniğin kombine kullanılması önerilir. Düşük çözünürlüklü kütle analizörleri özellikle bilinen maddelerin analizlerinde tercih edilir. Piyasaya yeni çıkmış ve kimliği henüz bilinmeyen yeni maddelerin analizlerinde düşük çözünürlüklü kütle analizörleri yeterli değildir. Çünkü; bu maddelerin kimliği bilinmemektedir, kütle spektrometr cihazlarının lisanslı kütüphanelerinde yoktur ve bu maddelere özgü referans standart materyaller henüz piyasaya çıkmamıştır. Piyasaya yeni çıkmış ve kimliği henüz bilinmeyen yeni maddelerin tespiti için

yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Akgür SA, Dağlıoğlu N. Temel Adli Toksikoloji. Akademisyen Kitabevi. 1. Basım, 2018.
2. Küme T, Karakükçü Ç, Uzun NK, Pınar A. Tıbbi laboratuvarlarda madde analizleri. Türk Klinik Biyokimya Dergisi. 2016;14:58-71.
3. CLSI C43-A2. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Confirmation of Drugs; Approved Guideline, Second Edition.
4. CLSI C52-A2. Toxicology and Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, Second Edition.
5. C50-A. Mass Spectrometry In The Clinical Laboratory: General Principles And Guidance; Approved Guideline.
6. CLSI C62-A. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline, First Edition.
7. Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. Forensic Toxicol. 2015;33:175-94.
8. Wu AH, Gerona R, Armenian P, French D, Petrie M, Lynch KL. Role of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. Clin Toxicol. 2012;50:733-42.
9. Ghazal K, Brabant S, Prie D, Piketty ML. Hormone Immunoassay Interference: A 2021 Update. Ann Lab Med. 2022;42:3-23
10. Himmelsbach M. 10 years of MS instrumental developments--impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012;883-884:3-17.
11. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238> (Kailasam S, LC-MS, What is LC-MS, LC-MS analysis and LC-MS/MS, 2021).
12. Wu AHB, French D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. Clin Chim Acta. 2013;420:4-10.
13. Seger C. Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. Wien Med Wochenschr. 2012;162:499-504.
14. Emwas AHM, Al-Talla ZA, Kharbatia NM. Gas chromatography-mass spectrometry of biofluids and extracts. Methods Mol Biol. 2015;1277:75-90.
15. Fagiola M. Current and future directions of high resolution and tandem mass spectrometry in postmortem and human performance toxicology. Leg Med (Tokyo). 2019;37:86-94.
16. Alves VL, Gonçalves JL, Aguiar J, Caldeira MJ, Teixeira HM, Câmara JS. Highly sensitive screening and analytical characterization of synthetic cannabinoids in nine different herbal mixtures Anal Bioanal Chem. 2021;413:2257-73.