T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Prof. Dr. Bayram ÜNAL

11-Hidroksi THC'nin Analizine Yönelik Moleküler Damgalı Polimerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYAGER ÖZGÜR DAYANIR

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Prof. Dr. Bayram ÜNAL

11-Hidroksi THC'nin Analizine Yönelik Moleküler Damgalı Polimerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYAGER ÖZGÜR DAYANIR

İSTANBUL, 2022

Bu tez İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: **35617**).

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerini bizimle paylaşan, bilgileriyle bizleri aydınlatan ve desteklerini eksik etmeyen saygıdeğer hocalarım*; Prof.Dr. Bayram Ünal, Doç. Dr. Zeynep Türkmen, Doç.Dr.Burcu Okutucu, Prof. Dr. Gülten Gürdağ, Öğr.Gör.Dr. Umut Şahar* ve *Öğr.Gör. Ömer Karataş'a*

Çalışmam boyunca her türlü yardım ve destekte bulunan arkadaşlarım***;*** *Hüseyin Özay'a, Ehsan Sanattalab'a* ve *Ege MİKAL* ailesine

Tez çalışmam boyunca her zaman bana destek olan nişanlım *Sümeyra Gaygusuz'a* ve bugünlere gelmemde emekleri olan, uzakta olsalar dahi varlıklarını hep yanımda hissettiğim *annem Aynur Dayanır*, *babam Mümin Dayanır* ve *abim As. Dr. Onur Barış Dayanır'a* teşekkürü bir borç bilirim.

Özgür Dayanır

İstanbul, Mayıs 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....i

İÇİNDEKİLER..... ii

ÖZET.....1

ABSTRACT.....2

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....3

2. GENEL BİLGİLER.....5

2.1. Moleküler Damgalı Polimerler.....5

2.1.1 Moleküler Damgalı Polimerler Sentezleme Stratejileri.....11

2.2. Moleküler Damgalı Polimerlerin Adli Bilimler'de Kullanımı.....14

2.3. Kannabinoidler.....16

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....23

3.1. Kullanılan Ekipman.....23

3.2. Kullanılan Kimyasallar.....25

3.3. Çalışma Basamakları.....26

3.3.2. Damgalı Olmayan Polimerlerin (NIP) Hazırlanması.....27

3.3.3. THC-OH Damgalı Polimerlerin (MIP) Hazırlanması.....30

3.3.4. THC-OH Damgalı Polimerlere THC-OH'ın Geri Bağlanması.....31

3.3.5. FTIR Analizi.....31

4.BULGULAR 32

4.1. Damgalı Olmayan Polimerler Denemeleri Sonuçları 32

4.2. THC-OH Damgalı Polimer Denemeleri Sonuçları 34

4.3. THC-OH Damgalı Polimerlere THC-OH'ın Geri Bağlanması Sonuçları 35

4.4. FTIR Analizi Sonucu 39

5.TARTIŞMA 41

6.SONUÇ 44

KAYNAKÇA 45

ÖZGEÇMİŞ 50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Moleküler damgalama işleminde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında afinite oluşturulmasının şematik olarak gösterimi. 6

Şekil 2.2 Modellemede ve polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin yapısı.....9

Şekil 2.3 MIP sentezinde kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar. 10

Şekil 2.4 Bilinen endokannabinoidlerin moleküler yapıları 18

Şekil 2.5 Bazı fitokannabinoidlerin moleküler yapılar 19

Şekil 2.6 Bazı sentetik kanabinoidlerin moleküler yapısı a) HU-210 sentetik THC analoğu b) CP-47,497 CB1 agonisti c) JWH-018 aminoalkilindol 20

Şekil 2.7 Δ9-Tetrahidrokannabinol'ün moleküler yapısı 20

Şekil 2.8 Δ9-THC'nin, birincil aktif metaboliti 11-OH-THC ve birincil aktif olmayan THC-COOH'ın metabolik yolu(25) 21

Şekil 3.1 Moleküler damgalı polimerlerin genel hazırlanma şeması 27

Şekil 4.1 THC-OH HPLC Standart Grafiği 35

Şekil 4.2 MIP1'e uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 35

Şekil 4.3 MIP1'e uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 36

Şekil 4.4 MIP3'e uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 36

Şekil 4.5 MIP3'e uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 37

Şekil 4.6 MIP6'ya uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 37

Şekil 4.7 MIP6'ya uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı 38

Şekil 4.8 THC-OH Damgalı polimerin yıkama öncesi, yıkama sonrası ve damgalı olmayan polimerin FTIR analizi 40

Şekil 5.1 11-hidroksi-Δ^9-Tetrahidrokannabinol'ün moleküler yapısı 43

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I. Cihaz ve sarf malzeme listesi.....24

Tablo II. Kimyasallar ve kullanım amaçları listesi 25

Tablo III. NIP sentezi denemeleri 28

Tablo IV. THC-OH damgalı polimer sentezi denemeleri 30

Tablo V. NIP denemeleri sonuçları 32

Tablo VI. MIP denemeleri sonuçları 34

Tablo VII. THC-OH damgalı polimerlerine THC-OH'ın geri bağlanma sonuçları 38

KISALTMALAR DİZİNİ

4-VPy:	4-vinylpyridin
µg:	Mikrogram
µL:	Mikrolitre
ADVN:	azobisdimetilvaleronitril
ACE:	Aseton
ACM:	Akrilamid
ACID:	4,4′-azo(4-siyanovalerik asit
AIBN:	azobisizobütironitril
APS:	Amonyum persülfat
CB1:	Kannabinoid Reseptör 1
CB2:	Kannabinoid Reseptör 2
CYP:	Sitokrom P450
DMSO:	Dimetil sülfoksit
EGDMA:	Etilenglikol dimetakrilat
FTIR:	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
GC:	Gaz Kromatografisi
GC/MS:	Gaz Kromatografisi / Kütle spektroskopisi
HEMA:	2-hidroksietil metakrilat

H_2SO_4:	Sülfürik Asit
LC-MS/MS:	Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometresi
MAA:	Metakrilik Asit
MALDI/MS:	Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi
MBA:	n,n-metilenbisakrilamid
MeOH:	Metanol
MetACM:	Metakrilamid
mg:	miligram
MIP:	Molecularly Imprinted Polymer (Moleküler Damgalı Polimer)
MISPE:	Moleküler Damgalı Katı Faz Ekstraksiyonu
MÖ:	Milattan Önce
NIP:	non-Imprinted Polymer (Damgalı Olmayan Polimer)
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
ppm:	Milyonda bir (part per million)
SCB:	Sentetik Kannabinoidler
TEMED:	N,N,N,N-tetrametiletilendiamin
THC:	Tetrahydrokannabinol
THC-OH:	11-hydroxy- Δ9-tetrahydrokannabinol

THC-COOH: 11-nor-Δ9-tetrahydrokannabinol-9-karboksilik asit

TLC: İnce Tabaka kromatografisi

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, kannabisin ana etken maddelerinden birisi olan ve kişide psikoaktif etkiler gösteren 11-hydroxy- Δ9-tetrahydrokannabinol (THC-OH) tayinine yönelik bir yöntem geliştirmek amacıyla moleküler damgalı polimerler sentezlenerek ilerleyen araştırmalara ışık tutabilecek bir çalışma yapmak hedeflenmiştir.

Moleküler damgalama yöntemi, bir kalıp (hedef) molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kompleks oluşması ardından, oluşan kompleksin bir çapraz bağlayıcı varlığında polimerizasyonu ve son olarak kalıp molekülün uzaklaştırılması ile kalıp moleküle spesifik boşluklara sahip polimer elde edilmesiyle sonuçlanır. Stabilitesi ve düşük maliyeti nedeniyle moleküler olarak damgalı polimerler; kromatografi, ilaç salınımı, hedefleme ve sensörlerdeki uygulamalar için araştırılmıştır.

Kısaca bu yöntemde kalıp molekül olarak kannabis etken maddelerinden birisi olan THC-OH kullanılarak yalnızca bu kalıp moleküle spesifik tanıma bölgeleri bulunan bir moleküler damgalı polimer sentezlenecektir. Sentezlenen damgalı polimerin tanıma kapasitesinin yüksek verimde olması durumunda kolon doldurma materyali olarak kullanılabilmesinin veya sensör çalışmalarında kullanılabilmesinin önünü açacaktır.

ABSTRACT

Within the scope of this study, it was aimed to develop a method for the determination of 11-hydroxy-Δ9-tetrahydrokannabinol (THC-OH), which is one of the main active ingredients of kannabis and shows psychoactive effects in the individual. In this direction, it is aimed to make a study that can shed light on further research by synthesizing molecularly imprinted polymers.

The molecular imprinting method results in the formation of a complex between a template (target) molecule and functional monomers, followed by polymerization of the resulting complex in the presence of a crosslinker, forming specific cavities for the template molecule, and finally removing the template molecule to obtain polymer with specific cavities for the template molecule. Because of its stability and low cost, molecularly imprinted polymers have been explored for applications in chromatography, drug delivery, targeting, and sensors.

Briefly, in this method, a molecularly imprinted polymer with specific recognition sites for this template molecule will be synthesized by using THC-OH, one of the active ingredients of Cannabis, as a template molecule. If the recognition capacity of the synthesized stamped polymer is high, it will pave the way for it to be used as column filling material or used in sensor studies.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kannabis (esrar, marijuana) dünyada en fazla kullanılan psikoaktif maddelerden biridir. Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisine (*United Nations Office on Drugs and Crime*) göre 2018 yılında dünyada 192 milyon kişinin kannabis kullandığı belirlenmiştir. Bu sebeple, kannabis varlığının analizi Adli Bilimler alanında oldukça ilgi çekici hale gelmektedir. Analiz kannabisin etken maddelerinden olan ve kişide psikoaktif etkiler gösteren THC-OH ve Δ9-tetrahydrokannabinol (THC) tayiniyle veya diğer metabolitleri olan fakat psikoaktif etki göstermeyen 11-nor-9-karboksi-Δ9-tetrahydrokannabinol (THC-COOH) asit ve idrarda karşılaşılan THC-glukronid konjugatı tayiniyle gerçekleştirilebilir.

Tipik bir moleküler damgalı polimer sentezlenmesi işlemi, seçilen kalıp molekül ve onu tamamlayıcı fonksiyonel monomerin bir başlatıcı (insiyatör) ile çapraz bağlayıcı varlığında polimerizasyonunun gerçekleşmesidir. Ardından uygun eluentler kullanılarak kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılır ve kalıp moleküle spesifik boşluklar polimer üzerinde olduğu gibi kalır. Bunun sonucunda elde edilen polimer kompozit, moleküler damgalı polimer olarak adlandırılır. Bu prosedür için gerekli olan bileşenler düşük maliyetli olması, MIP (moleküler damgalı polimer) sistemlerinin stabilitesi ve yüksek tanıma kabiliyetlerine sahip olmaları, MIP'lerin birçok alanda araştırma konusu olmalarını sağlamıştır.

Adli tıp ve Adli Bilimler, suçların araştırılması ve kanıtlanması için bilimsel tekniklere ihtiyaç duyulması nedeniyle ortaya çıkmıştır. Suçların aydınlatılması için toplanan fiziksel delillerin analizinde ilgilenilen fiziksel delilin ne olduğunu tanımlayabilmek ve kaynağına ulaşabilmek oldukça önemlidir. Moleküler olarak damgalanmış polimerler analizlenmesi hedeflenen maddeye yüksek seçicilik ve afinite göstermesi sebebiyle Adli Bilimler'de özellikle de adli toksikolojide

kullanışlı bir analiz seçeneği olabilir. Yasadışı ilaçların ve metabolitlerinin analizi, toksik madde analizi, ateşli silah atış artıklarının analizi gibi alanlarda kullanışlı olabilmektedir.(2)

MIP'lerin analizde kullanılması dışında sensör teknolojisi ile entegre olabilmesi onları daha ilgi çekici kılmaktadır. Yüksek seçicilikleri olması sebebiyle transdüserler üzerine tanıma materyali olarak eklenerek çeşitli sensör çalışmaları yapılmaktadır.(2)

Bu çalışmada, kannabis kullanımının yaygınlığına bağlı olarak kannabis varlığının analizinin Adli Bilimler açısından önemi dikkate alınarak ve kannabis analizi için pratik bir sensör geliştirmek için ön bir adım olarak THC damgalı polimerlerin sentezlenmesi amaçlanmaktadır.

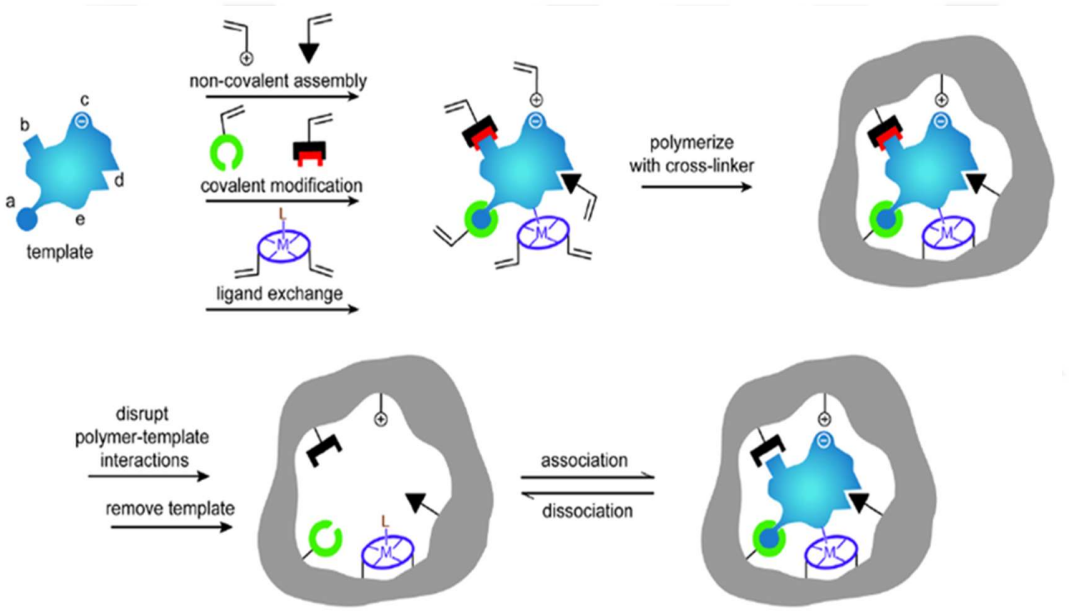
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Damgalı Polimerler

Moleküler olarak damgalı polimerler, bir hedef molekülün spesifik olarak tanınmasını ve bağlanmasını sağlayan yapay reseptörlerin tasarlanması ve geliştirilmesi için araçlar sağlar. Moleküler damgalama, fonksiyonel monomerleri hedef molekülle etkileşebilen yan gruplar ile birleştirerek yüzeyde veya bir polimer matrisinde (örneğin ince film veya parçacıklar) tanıma bölgesi veya bağlayıcı bir boşluk oluşturulmasını içeren bir yaklaşımdır. Polimerizasyondan sonra, kalıp molekülün polimerik matristen uzaklaştırılması ardından fonksiyonel grupların hedefe şekil, boyut ve mekansal dağılımını tamamlayıcı şekilde tanıma bölgeleri oluşur. Böylece karışık bir ortamda bile sadece hedef molekülü tanır. Stabilitesi ve düşük maliyeti nedeniyle, moleküler olarak damgalı polimerler; kromatografi, ilaç salınımı, hedefleme ve sensörlerdeki uygulamalar için araştırılmıştır.(3,4)

Moleküler damgalı polimerlerin ana avantajları; damgalama prosedüründe kullanılan hedef molekül için yüksek seçicilikleri ve afiniteleridir. Damgalı polimerler; proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik sistemlere kıyasla daha yüksek fiziksel dayanıklılığa, yüksek sıcaklığa ve basınca dayanıklılığa, ayrıca asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı inertliğe sahiptir. Bununla birlikte sentezlenme maliyetleri daha düşüktür ve polimerlerin depolama ömrü birkaç yıl boyunca oda sıcaklığında tanıma kapasitelerini koruyarak çok yüksek olabilmektedir. Moleküler damgalama yöntemleri küçük moleküllerin spesifik olarak tanınması için büyük bir potansiyel göstermesine rağmen proteinler, büyük hücreler ve virüsler gibi biyolojik makro moleküllerin baskılanmasına ilişkin çalışmalar çok az sayıda bulunmaktadır. Bunun sebebi büyük molekül boyutları, kompleks yapıları ve bu biyomoleküllerin çevreye olan duyarlılığından kaynaklıdır. Buna rağmen sensör ve diagnostik gibi alanlarda kullanılmaktadır.(4,5)

Moleküler damgalama yöntemi genellikle Şekil 2.1'de tarif edildiği gibi arzu edilen etkileşim tiplerine bağlı olarak bir dizi strateji (örneğin; kovalent, kovalent olmayan, semikovalent ve metal iyon aracılı damgalama) ile elde edilebilir. Özetle söyleyecek olursak moleküler damgalama yöntemi, bir kalıp (hedef) molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kompleks oluşması ardından, oluşan kompleksin bir çapraz bağlayıcı varlığında polimerizasyonu ile kalıp moleküle spesifik boşluklar oluşması ve son olarak kalıp molekülün uzaklaştırılması ile kalıp moleküle spesifik boşluklara sahip polimer elde edilmesiyle sonuçlanır.(6)



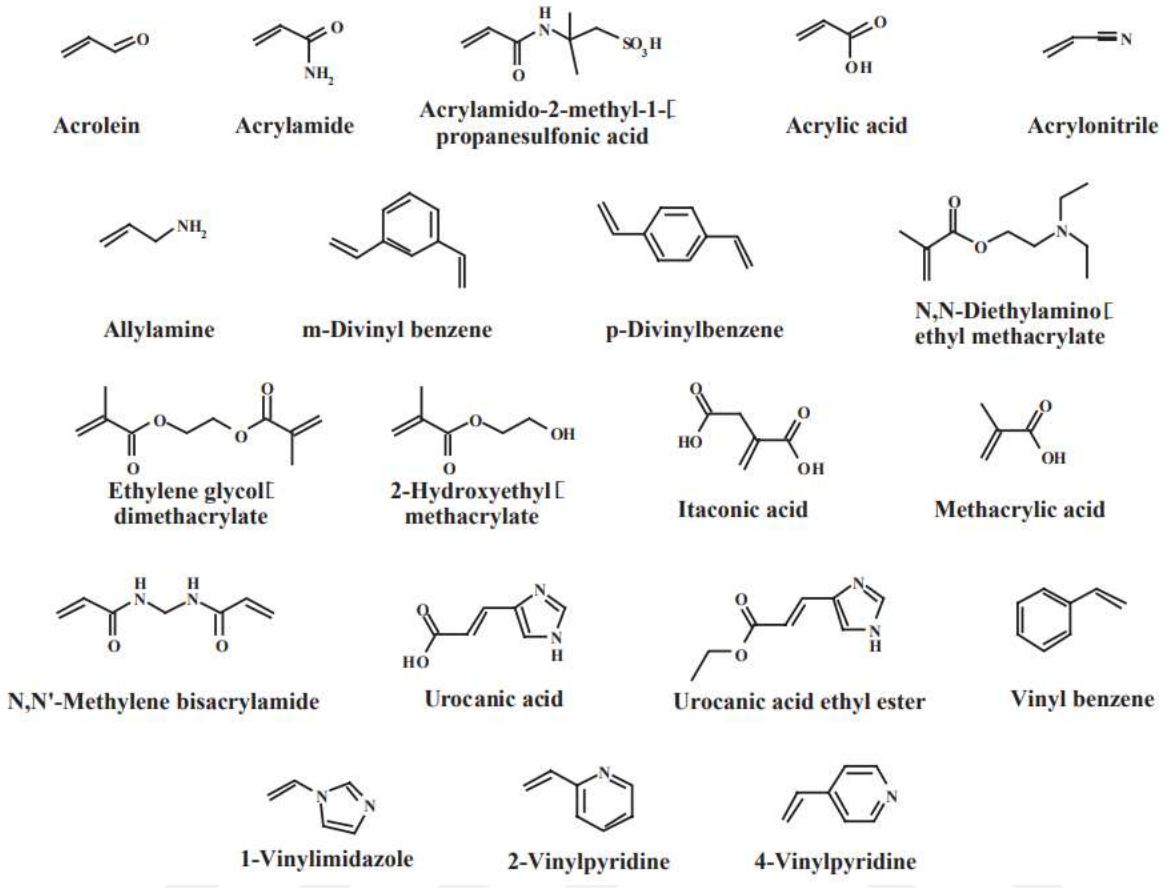
Şekil 2.1 Moleküler damgalama işleminde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında afinite oluşturulmasının şematik olarak gösterimi. Şemada belirtilen stratejiler: (a) kovalent bağlanma, (b) kalıp molekül polimerize olan gruba kovalent olarak bağlıdır. Kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra yeniden bağlanma olayı kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşir. (semikovalent bağlanma), (c) elektrostatik etkileşimşler, (d) hidrofobik veya van der Waals etkileşimleri, (e) metal merkezi ile koordinasyon (ligand değişimi). Bu stratejilerin her biri fonksiyonel gruplar veya kalıp molekülün yapısal elemanları ile oluşur. Bir çapraz bağlayıcı varlığında kalıp boşluklarının yer aldığı bir matris üretilir, bunlar daha sonra polimer-kalıp etkileşimlerinin (a-e) bozulmasıyla ortadan kaldırılabilir ve matristen çıkarılabilir.(7)

Moleküler damgalama yönteminin temeli 1931 yılında Polyakov tarafından yapılan çalışmaya dayanmaktadır.(8) Polyakov, yeni hazırlanmış bir silikanın kurutulması sırasında farklı çözücülerin (benzen, toluen ve ksilen) varlığının silika gözenek yapısı üzerindeki etkilerini bildirmiştir. Polimerizasyon başlatıcısı (insiyatör) olarak H_2SO_4 kullanıldığında, yüzey alanları arasında pozitif bir korelasyon buldu ve silica üzerinde denemiş olduğu toluene spesifik tanıma bölgelerinin oluştuğunu belirledi. Daha sonra 1949'da Dickey, sodyum silikatın dört farklı boya (metil, etil, n-propil ve n-bütil orange) varlığında polimerizasyonunu bildirdi. Boyalar daha sonra çıkarıldı ve yeniden bağlama deneylerinde bu "kalıp moleküllerinden" herhangi birinin varlığında hazırlanan silikanın, kalıp molekül olmayan diğer boyalara tercihen kalıp molekül olarak kullanılan boya moleküllerini bağladığını buldu. Bu çalışma ortaya çıktıktan kısa bir süre sonra, birkaç araştırma grubu Dickey'nin yöntemini kullanarak belirli adsorbanların hazırlanmasını sürdürdü. Merck'in, damgalı olmayan silikadan %10,7 daha fazla nikotin adsorbe edebilen, nikotin damgalı silikadan oluşan bir nikotin filtresinin(9) patentini almış olması da bazı ticari ilgileri göstermiştir. Malzeme sigara, puro ve boru filtrelerinde kullanılmak üzere tasarlandı. Bu çalışma ortaya çıktıktan kısa bir süre sonra moleküler damgalama, 1931–2009 döneminde (Scifinder'dan) bu alanda yayınlanan 4000 orijinal makaleye yansıdığı gibi, bilim camiasından büyük ilgi gördü. Bununla birlikte, tekniğe olan ilgi yeni olmasına rağmen genellikle moleküler olarak damgalanmış tekniğin, moleküler ağırlığı <1000 olan küçük molekülleri hedeflediğinde etkili olduğu gösterilmiştir.(10)

Moleküler damgalı polimerlerin sentezlenmesinde polimerin içeriğini oluşturan kalıp molekül, çapraz bağlayıcı, fonksiyonel monomer, insiyatör ve porojenin her birinin polimerin kullanım amacına göre belirlenmesi hususu önemlidir. Bu hususta MIP üretiminde kalıp molekül, monomerlerin fonksiyonel grupları arasında kovalent veya nonkovalent etkileşimler gerçekleştirmesi sebebiyle ve analizi hedeflenen molekül olması sebebiyle MIP oluşumunu

sağlayan en temel bileşendir. Damgalanmak istenen kalıp molekülün kimyasal olarak inert olması sentez için daha uygun olmaktadır. Ayrıca pestisitler, aminoasitler, şekerler, peptitler ve steroidler gibi küçük organik moleküllerin tercih edilmesi damgalama işlemi için çok daha uygun olmaktadır. Proteinler, virüsler gibi büyük yapılar küçük moleküllere göre esnekliği daha azdır. Bu tip büyük yapıların kalıp molekül olarak kullanıldığı MIP sistemlerde uzaklaştırma işlemi problem yaratabilmektedir ve geri bağlanma işleminde polimer ağına nüfuz edememeleri sebebiyle biyomoleküler yapıda bozulmalar meydana gelebileceğinden MIP daha az seçicilik gösterebilmektedir. Bu problemlerin üstesinden gelmek amacıyla genellikle biyo-moleküler damgalama için yüzey damgalama teknikleri benimsenir.(11)

Fonksiyonel monomerlerin ana görevi ise kalıp molekülle etkileşerek polimer üzerinde spesifik tanıma bölgelerinin oluşmasını sağlamaktır. Ön polimerizasyon işleminde, kalıp molekül ile güçlü etkileşime sahip ve seçici donör-alıcı veya antikor-antijen kompleksleri oluşturabilen uygun bir fonksiyonel monomer bulmak MIP sentezinde çok önemli bir adımdır. Fonksiyonel monomer ve kalıp moleküller, stokiyometrik bir şekilde bağlanır. Ancak kovalent moleküler damgalamada, kalıp molekülün fonksiyonel monomer stokiyometrik oranına etkileri esas değildir çünkü kalıp molekül, kovalent bağ oluşumu için gereken fonksiyonel monomerlerin sayısını yönlendirir.(11) Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında uygun etkileşimin sağlanabilmesi için ortama fonksiyonel monomerin fazlası eklenir. Bu oran genellikle 1:4 (kalıp molekül:fonksiyonel monomer) şeklindedir.(12) MIP sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

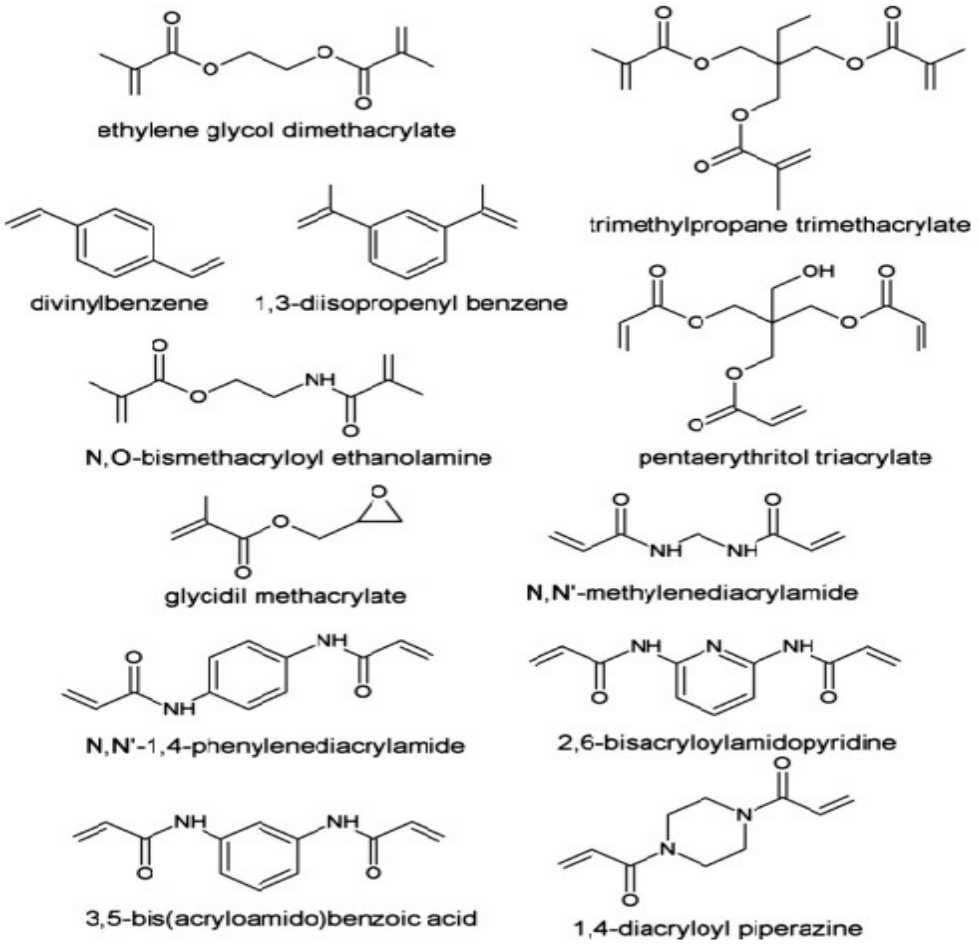


Şekil 2.2 Modellemede ve polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin yapısı

MIP sentezlenme işlemi sırasında, kalıp moleküllerin etrafına fonksiyonel monomerleri sabitlemek için bir çapraz bağlayıcı kullanılır. Böylece kalıp moleküllerin MIP'den uzaklaştırılmasından sonra bile oldukça sert bir çapraz bağlı polimer elde edilmiş olur. Bir damgalama işlemi sırasında, çapraz bağlayıcı 3 temel görevi yerine getirmekten sorumludur. Bu görevler ister makro gözenekli ister bir mikrojel tozu veya jel tipi olsun, polimer ağının morfolojisini belirlemektir. Bağlanma bölgesini stabilize etmek ve polimer ağına mekanik stabilite kazandırmaktır.(11,12)

Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, MIP'in seçiciliği ve bağlama kapasitesi üzerinde etkilere sahiptir. Daha az miktarda çapraz bağlayıcı, düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle kararsız mekanik özelliklerle sonuçlanacaktır ve çok yüksek miktarda çapraz bağlayıcı ise MIP'in birim

kütlesi başına tanıma alanlarının sayısını azaltacaktır.(8) MIP sentezinde kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 MIP sentezinde kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar.

Moleküler damgalı polimerler genellikle serbest radikal polimerizasyon, elektropolimerizasyon ve fotopolimerizasyon ile üretilir. Çeşitli fonksiyonel monomerler ve kalıp moleküller için serbest radikal polimerizasyon, fotokimyasal veya termal olarak başlatılabilir. Peroksi bileşiklerinin yanı sıra, azobisdimetilvaleronitril (ADVN), azobisizobütironitril (AIBN) ve 4,4′-azo(4-siyanovalerik asit) (ACID) gibi azo türevleri kapsamlı bir şekilde insiyatör (başlatıcı) olarak kullanılır.(11,12,13)

Polimerizasyon işleminin mükemmel bir şekilde gerçekleşmesi için polimerizasyon çözeltilerinde çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması çok önemlidir. Çözünmüş oksijen, ultrasonikasyon kullanarak veya çözelti azot, argon gazı gibi soy gazlarla işlemden geçirilerek uzaklaştırılabilir.(11)

Porojenler, polimerizasyon sürecinde dispersiyon ortamı oluşturan yani tüm MIP bileşenlerinin homojen olarak çözünmesini sağlayan ve gözenek oluşumunda rol oynayan ajanlar olarak işlev görür. MIP'in makro gözenekli yapısının oluşumunda çok önemli bir rol oynar. Ayrıca ön polimerize kompleks oluşumu sırasında etkileşimleri azaltmak için porojenik çözücünün düşük polariteye sahip olması gerekmektedir.

Kovalent olmayan damgalama işlemleri polimerlerin morfolojisi ve adsorpsiyon özellikleri kullanılan çözücü türlerine bağlı olduğundan porojen olarak toluen, kloroform, asetonitril gibi genellikle polar olmayan ve daha az polar organik çözücüler kullanılmaktadır.(11,12) Ancak hidrofobik etkileşimler aracılığıyla bir MIP sentezlenmek istenirse bunun için su en uygun porojen olarak kullanılabilir.(12)

2.1.1 Moleküler Damgalı Polimerler Sentezleme Stratejileri

MIP üretimine yönelik temel yaklaşımlar, ön polimerizasyon aşamasında kalıp molekül ile monomerlerin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimlerin türüne göre kovalent ve kovalent olmayan olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bu yaklaşımların dışında yarı-kovalent damgalama, metal aracılı damgalama gibi farklı stratejiler de bulunmaktadır.(11,12)

2.1.1.1. Kovalent damgalama stratejisi

Kovalent damgalama yaklaşımında kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında ön polimerizasyon sırasında etkileşimlerin kovalent bağlarla gerçekleşmesi hedeflenir. Bu stratejide kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılabilmesi için kovalent bağların parçalanması

gerekmektedir. Kovalent damgalamanın avantajı fonksiyonel monomer ve kalıp molekül kompleksinin stokiyometrik olması ve bağların stabil olmasıdır. Dolayısıyla spesifik olmayan etkileşimlerin olasılığını azaltarak daha homojen bağlanma bölgeleri elde edilir. Seçicilik konusunda avantajlı olsa da kalıp molekülü polimerden uzaklaştırırken bağlanma bölgelerinin zarar görmemesi için çaba sarf edilmesi, geri bağlanmada kovalent bağların tekrar oluşmasının bağlanma kinetiğini yavaşlatması gibi durumlar da bu stratejinin dezavantajlarıdır. Bu sebeple kovalent damgalama için kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında oluşturulacak bağın seçimi oldukça önem kazanmaktadır.(11,12,14,15) Bu bağlar boronik asit esterleri, asetaller, ketaller, schiff bazları, disülfit bağları gibi kovalent bağlardır.(12)

2.1.1.2. Kovalent olmayan damgalama stratejisi

Kovalent olmayan damgalama yaklaşımı, Mosbach ve çalışma arkadaşları tarafından kurulan kalıp ve polimer ağı arasındaki kovalent olmayan bağa dayanmaktadır. Burada kalıp ve fonksiyonel monomer kompleksi, van der Waals kuvveti, hidrojen bağı, π-π etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimi, iyon-dipol etkileşimleri vb. gibi kovalent olmayan zayıf etkileşimlerin yardımıyla oluşturulur. Çok az sentetik çaba gerektirir. Kalıp moleküller, basit ekstraksiyon teknikleri ile polimer matrisinden kolayca uzaklaştırılabilir.(16) En önemli ve yaygın olarak kullanılan kovalent olmayan damgalama sistemlerinden biri, fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) ve çapraz bağlama maddesi olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kombinasyonudur. Burada MAA, kalıp molekül çeşitleri arasında hidrojen bağı oluşturma yeteneğine sahiptir.(15) Bu damgalama metodolojisi, bilim ve teknolojinin farklı alanlarında yaygın olarak uygulanmaktadır. Kovalent olmayan damgalamanın öne çıkan avantajları, kovalent damgalamanın aksine oluşum ve parçalanma aşamaları sırasında kovalent olmayan zayıf bağlantının dahil olması nedeniyle kalıp molekülün polimer matrisinden kolay bağlanması, çıkarılması ve basit bir prosedürle ilerlemesidir.

Kovalent damgalamada gereken polimerizasyondan önce kalıp molekülün kimyasal türevlendirilmesi gerekliliği kovalent olmayan damgalamada gerekli görülmeyebilir. Kalıp molekül-fonksiyonel monomer eklentisi kararsızdır ve stokiyometrik oranı korumaz ve kalıp moleküllerini tamamen bağlamak için fazla miktarda fonksiyonel monomer gereklidir. Bu da MIP'lerde çok sayıda spesifik olmayan bağlanma bölgesinin oluşmasına neden olur. Bu durum ise kovalent olmayan damgalama stratejisinin en büyük dezavantajlarıdır.(11,12)

2.1.1.3. Yarı kovalent damgalama stratejisi

Kovalent olmayan damgalama, sentez sürecinin göreceli basitliği ve çok çeşitli kimyasal işlevsellikleri nedeniyle MIP araştırmalarında açık ara en yaygın olanıdır. Bununla birlikte, yöntem bir dereceye kadar bağlanma yeri dağılımının heterojenliği ile tehlikeye girebilmektedir. Kovalent damgalama, spesifik olmayan etkileşimleri önemli ölçüde azaltır ancak yeniden bağlama işleminin karmaşık olması sebebiyle, uygulamaların büyük çoğunluğunda fazla vakit kaybına sebep olur. Bu noktada yarı kovalent damgalama yaklaşımı çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Kovalent ve kovalent olmayan damgalama stratejilerinin avantajlarından yola çıkılarak oluşturulan bu stratejide kalıp ile fonksiyonel molekül arasında kalıp molekülün uzaklaştırılması sırasında kaybolan bir bağlayıcı grup kullanılır. Bu bağlayıcı grup, polimer oluşumu sırasında kalıp molekülü fonksiyonel monomere bağlama ve kovalent olmayan yeniden bağlama adımında sterik kalabalıklaşmayı önlemek için kalıp molekül ile polimere bağlı işlevsellik arasında aralayıcı olarak hareket etme gibi rollere sahiptir.(11,15,17) İlk gerçek yarı-kovalent yaklaşım 1990 yılında Sellergren ve Anderson tarafından rapor edilmiştir.(18)

2.1.1.4. Metal iyonu aracılı etkileşime dayalı damgalama stratejisi

Bu damgalama yaklaşımında, metal iyonları kalıp olarak veya kalıp-fonksiyonel monomer etkileşiminin bir parçası olarak prosese dahil edilebilir. Metal iyon baskılı polimerlerin sentezi için

çeşitli stratejiler uygulanmıştır. Bu stratejiler; metal bağlayıcı ligandlar taşıyan doğrusal zincirli polimerlerin iki işlevli bir reaktifi ile çapraz bağlama, polimerize olabilen ligandları içeren metal komplekslerinin bir çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyonu ve amfifilik fonksiyonel monomerlerle birleştirme yoluyla yağ içerisinde bulunan su emülsiyonlarının ara yüzeyinde yüzey damgalaması şeklindedir. Burada metal iyonu genellikle bir geçiş metali, polimerize olabilen ligandlar ve nötr veya yüklü bir tür olabilen hedef molekül ile kompleks oluşturur. Metal iyonunun oksidasyon durumu ve ligandın özellikleri bir kovalent bağ kadar güçlü olan etkileşimin gücünü etkileyebilir.(11)

2.2. Moleküler Damgalı Polimerlerin Adli Bilimler'de Kullanımı

Adli Bilimler; tıp, fen ve sosyal bilimler alanlarındaki bilgilerin adaletin hizmetine sunulmasıyla ilgilenen bir daldır. Adli Bilimler, suçların araştırılması ve kanıtlanabilmesi için bilimsel tekniklere ihtiyaç duyulması nedeniyle ortaya çıkmıştır. Adli Bilimler; kimya, biyoloji, toksikoloji, jeoloji, arkeoloji, antropoloji, astronomi, mühendislik vb. gibi birçok alt bölümü olan bir çalışma alanıdır. Tüm bu alt bölümlerin problem çözme için farklı yöntemleri vardır ve bir dizi özel araç kullanır. Genel olarak adli analiz alanındaki "problem çözmenin" iki anlamı vardır: Birincisi, fiziksel kanıtın veya sorgulanan bir numunenin belirlenmesi; ikincisi, sorgulanan numunenin kökenini bulmak için sonuçları bilinen bir materyalle karşılaştırılmasıdır. Moleküler damgalama teknikleri, bu gereksinimlerin her ikisi için de çözümler sunmaktadır. Çok yönlü kullanım, kararlılık ve tanıma yetenekleri, onları Adli Bilimler'de kullanım için mükemmel bir aday haline getirmektedir.

Suçların aydınlatılması için toplanan fiziksel delillerin analizinde ilgilenilen fiziksel delilin ne olduğunu tanımlayabilmek ve kaynağına ulaşabilmek oldukça önemlidir. Moleküler olarak damgalanmış polimerler analizlenmesi hedeflenen maddeye yüksek seçicilik ve afinite göstermesi sebebiyle Adli Bilimler'de özellikle de Adli toksikolojide kullanışlı bir analiz seçeneği olabilir.

Yasa dışı ilaçların ve metabolitlerinin analizi, toksik madde analizi, ateşli silah atış artıklarının analizi gibi alanlarda kullanışlı olabilmektedir.(2)

Moleküler damgalı polimerlerin istenilen maddeyi spesifik olarak tayin edebilme yeteneğinden dolayı adli alanda uyuşturucu maddeler ve metabolitlerinin analizinde kullanılabilir. Kannabis etken maddesi olan THC analizine yönelik moleküler damgalı polimer çalışması ilk olarak Nestic M. ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada idrar örneklerinden Δ9-tetrahydrokannabinol ve diğer ana metabolitleri ekstraksiyonu için kalıp molekül olarak THC-OH kullanıldığı yığın polimerizasyon yöntemiyle moleküler damgalı polimer sentezlenmiş ve eş zamanlı olarak tayin edebilmek amacıyla GC-MS kullanılmıştır. Bu çalışmada sentezlenen THC-OH damgalı polimerler tek fonksiyonel monomer kullanılarak sentezlenmiştir. Çalışmada $50 ngmL^{-1}$ konsantrasyon hedef molekül içeren örnekte THC-OH damgalı polimerin ekstraksiyon geri kazanımı THC-OH hedef molekülü için en fazla %80 olarak belirlenmiştir. Damgalanmamış polimerin yine aynı örnekte ekstraksiyon geri kazanımı ise %63.6 olarak belirlenmiştir. THC-OH damgalı polimerin ortalama %23.2 geri kazanıma etki ettiği görülmektedir.(19) Fakat geri kazanım oranlarına bakıldığında damgalı olmayan polimer ile damgalı polimerin geri kazanım yüzdelerinin yakın olması durumu hedef molekülün oyuk veya yüzey fark etmeksizin polimer ile etkileştiğini göstermektedir. Bu durum damgalı polimerin oyuklarının tam olarak istenen miktarda ve boyutta olmadığını gösterebilir. Bunun için THC-OH damgalı polimeri sentezlerken daha fazla konsantrasyonda kalıp molekül ile sentezlenerek oyuklar artırılabilir veya farklı porojenler denenebilir. Bunun dışında farklı monomerler veya monomer kombinasyonları kullanılarak da geri kazanım daha da verimli hale getirilebilir. Lendoiro E. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada katı faz ekstraksiyonu yönteminde kullanılması için bir MIP sentezlenmiştir (MISPE: *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*). Sentezlenen MIP'de kalıp molekül olarak kateşin (*catechin)*

kullanılmıştır. Bu çalışmada yapılan analizler LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda kalıp molekül olarak THC kullanılmamasına rağmen MISPE yöntemiyle gerçek örneklerden ekstrakte edilen THC miktarı geleneksel yöntemlerle ekstrakte edilen THC miktarından bir miktar daha fazla olduğu görülmektedir.(20) Kalıp molekül olarak THC veya THC-OH kullanılmasıyla daha belirgin bir miktar farkı gözlenebilir.

2.3. Kannabinoidler

Kannabis (esrar, marijuana) ekiminin en eski kanıtı, MÖ 4000'e tarihlenen Pan-p'o köy alanında bulunan polen birikintileri şeklinde Çin'den gelmektedir. O dönemlerde kannabis; tekstil, ip, kağıt ve yağ üretimindeki ana rolüne ek olarak önemli bir gıda ürünü olarak da yetiştirilmekteydi. Tıpta kullanımına ilişkin ilk kayıt, dünyanın en eski farmakopesi olan Pen-ts'ao ching'den gelmektedir. MS 0-100 arasında derlenmiş olmasına rağmen, Pen-ts'ao, MÖ 2700'de hüküm süren İmparator Shen-nung'a atfedilmiştir. Kannabis romatizmal ağrı, gut ve sıtma dahil olmak üzere 100'den fazla rahatsızlık için faydalı olduğunu kabul eder. Pen-ts'ao ching, ayrıca “uzun süreli alındığında ruhlarla iletişim kurar ve bedeni aydınlatır” şeklinde ifadeyle esrarın psikoaktif etkilerinden de bahsetmiştir. MS 117 ile 207 yılları arasında, zamanın doktoru ve Çin cerrahisinin kurucusu olan Hua T'o, esrarı bir analjezik olarak tanımlamıştır. Ameliyat öncesi hastalarını uyuşturmak için kenevir ve şarap karışımı kullandığı bildirilmektedir.(21,22)

19. yüzyılın başlarında Cambridge'te bulunan bir grup esrar bitkisinden bir eterik özütün damıtılmasıyla esrarın önemli ölçüde saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri yakut kırmızı renkte viskoz yağın tek bir madde olduğunu varsaymışlardır. Wood ve çalışma arkadaşları yayınladıkları makalede bu durumu, “Kırmızı yağ, son derece aktiftir ve 0,05 g dozlarında alındığında, kararlaştırılmış zehirlenmeyi ve ardından uykuyu indükler. Ürettiği semptomlar Kannabis Indica’ya özgüdür ve diğer ürünlerin hiçbiri bu etkiye sahip görünmediğinden, bu madde

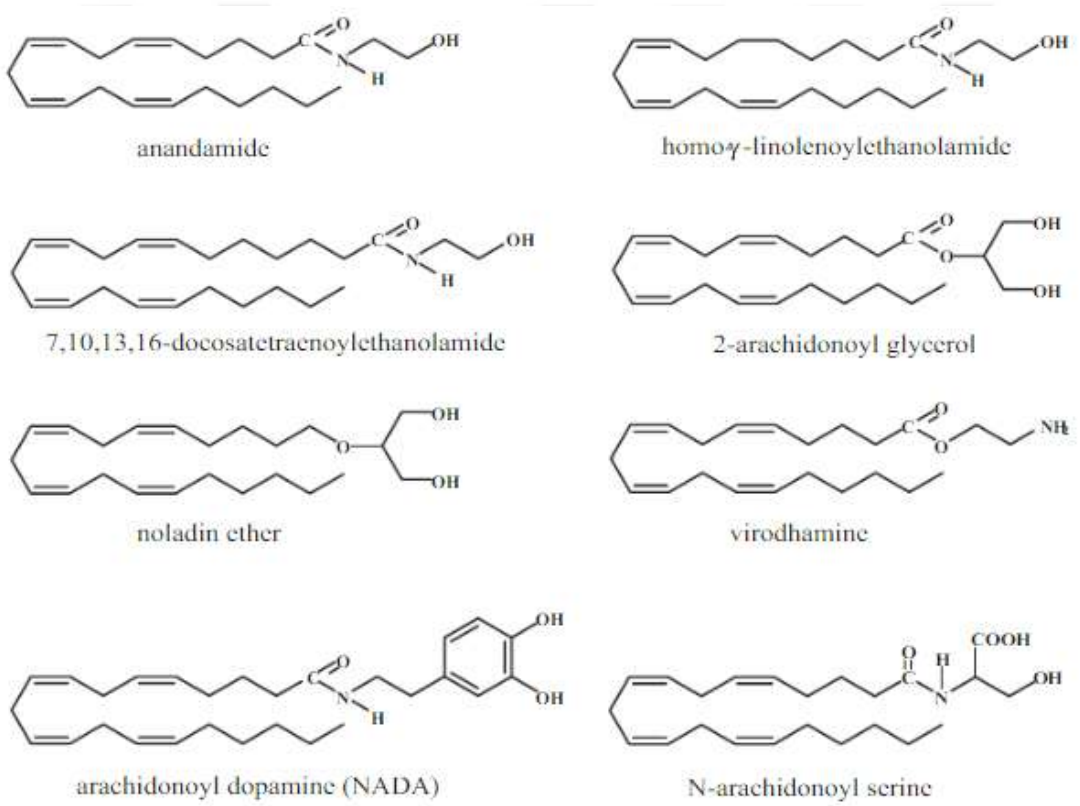
bitkinin aktif bileşeni olarak kabul edilmelidir.” şeklinde aktarmışlardır. Daha sonra Dunstan ve Henry (1898), Wood (1899); yağın homojen olmadığını ve ondan izole edildiğini, asetilasyondan sonra, C_{21} H_{26} O_2 için analiz edilen reçineli bir fenole hidrolize edilebilen kristalli bir asetat olduğunu buldu. Bu bileşene kannabinol adını verdiler.(23) İzolasyonun gerçekleştirilmesi ardından kannabis üzerine yapılan çalışmalar da hızlanmaya başlamıştır. 1988 yılında Howlett ve arkadaşları tarafından günümüzde CB1 reseptörü olarak bilinen kannabinoid reseptörü keşfedilmiştir ve 1993 yılında klonlanmıştır. Diğer kannabinoid reseptörü olan CB2 ise 1993 yılında rat dalağından klonlanmıştır.(21-24)

Δ9-THC’nin in vivo etki mekanizmasını açıklamak için iki hipotez öne sürülmüştür. Birinci hipoteze göre; bir glukuronid olarak salgılanan Δ9-THC, beyindeki hücresel ve organel membranlarla spesifik olmayan etkileşimler yoluyla etki ederek bir membran pertürbasyon mekanizmasını destekler. İkinci hipotez, Δ9-THC beyin ve periferde bulunan spesifik CB1 ve CB2 reseptörleri ile etkileşime girerek çeşitli fizyolojik etkiler gösterirler. Beyindeki CB1 reseptörleri bilhassa biliş, hafıza, ödül, kaygı, ağrı duyusu algısı, motor koordinasyon ve endokrin fonksiyonla ilişkili anatomik bölgelerde yoğunlaşmıştır. CB2 reseptörleri dalak ve diğer periferik dokularda lokalizedir. Bu reseptörler, kannabinoidlerin immün baskılayıcı etkilerinde rol oynayabilir.

Tek bir etki mekanizmasını tanımlamak çok zordur çünkü moleküler analiz, Δ9-THC'nin opioid ve benzodiazepin reseptörleri, prostaglandin sentetik yolu, protein ve nükleik asit metabolizması dahil olmak üzere çeşitli hücre içi hedefler üzerinde etki ettiğini göstermiştir. Ayrıca, kannabinoidler makromoleküler metabolizmayı doza bağımlı bir şekilde inhibe eder ve enzim sistemleri, hormon salgılanması ve nörotransmiterler üzerinde geniş bir etkiye sahiptir.(25)

Kannabinoidler, üretim kaynaklarına göre endokannabinoidler, fitokanabinoidler ve sentetik kannabinoidler olarak üç gruba ayrılabilir. Endojen kannabinoidler veya endokannabinoidler, insan

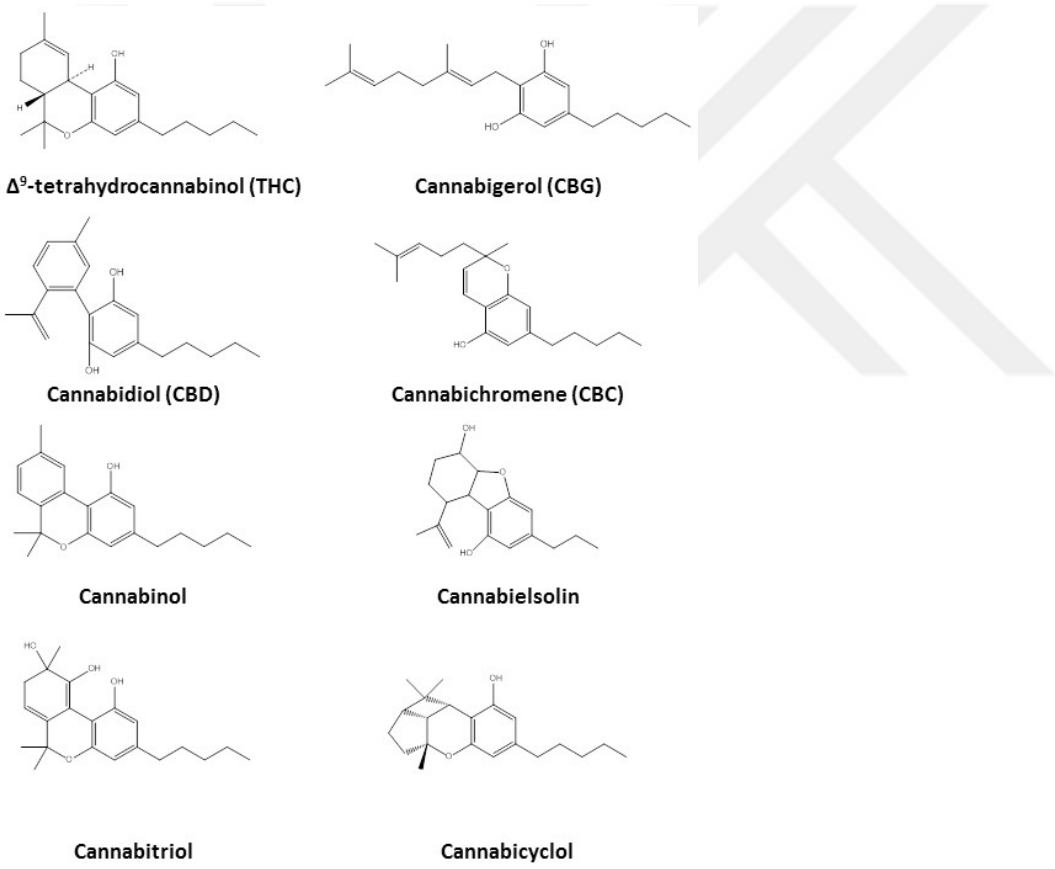
endokannabinoid sistemi için ligandlar olarak hareket eden ve nöromodülatör işlevi olan eikosanoid nörotransmiterlerdir. Bu bileşikler ancak reseptörlerin bitkiler veya ilaçlardan ziyade endojen bileşiklerle etkileşime girmek için var olduğu mantıksal varsayımına dayanarak insan vücudundaki kannabinoid reseptörlerinin keşfinden sonra tanımlandı.(26) Şekil 2.4'te bilinen endokannabinoidlerin moleküler yapıları ve isimleri verilmiştir. Bu endokannabinoidlerden en iyi bilineni anandamid 1992 yılında Mechoulam'ın grubu tarafından domuzun beyninden izole edilmiştir ve izole edilen ilk endokannabinoid olarak bilinmektedir.(27,28)



Şekil 2.4 Bilinen endokannabinoidlerin moleküler yapıları

Fitokannabinoidler, kenevir bitkisinde bulunan doğal olarak oluşan kannabinoidlerdir. Bu bileşikler, aromatik halkaya bağlı yan zincirlerinin (C1-C5) uzunluğundaki değişikliklerle birlikte bir C21 yapısal özelliğinden oluştukları için kimyasal yapılarında benzerlik gösterirler.(29)

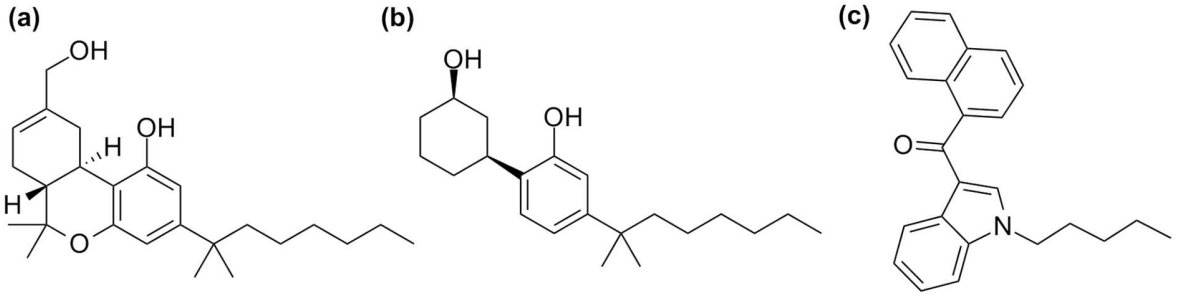
Fitokanabinoidlerin başlangıçta sadece kenevir bitkisinde bulunduğu düşünülüyordu ancak Toyota M. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bazı kannabinoid tipi bibenziller, ciğer otunda bulunmuştur ve ciğer otunda bulunan perrottetinenik asidin kimyasal yapısının esrarda bulunan temel psikoaktif madde olan Δ9-tetrahydrokannabinol'ünkine (Δ9-THC) benzer yapıda olduğu belirlenmiştir.(30,31) Çoğu hiçbir zaman izole edilmemiş veya karakterize edilmemiş olmasına rağmen, kenevir bitkisinde yaklaşık 150 fitokanabinoid tespit edilmiştir.(29) Şekil 2.5'te bazı fitokannabinoidlerin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5 Bazı fitokannabinoidlerin moleküler yapılar

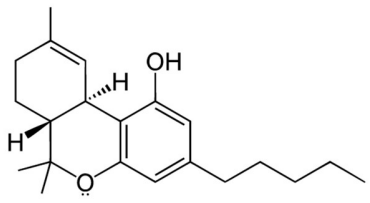
Sentetik kanabinoidler (SCB'ler) ilk olarak 1960'ların başında Δ9-THC yapısının keşfinin ardından sentezlendi. Bu bileşikler, olası terapötik etkileri araştırmak ve kannabinoid reseptör farmakolojisini incelemek için kullanıldı. Ancak 2000'li yılların başında sentetik kanabinoidlerin

varyasyonları ticari olarak üretilmeye ve kötüye kullanılmaya başlandı.(29,32) Bu ilaçlar, "Spice", "K2", "bitkisel tütsü", "Cloud 9", "Mojo" ve daha birçok marka adı altında pazarlanmaktadır. Psikoaktif etkilerine ek olarak sentetik esrar, ucuz olması ve rutin uyuşturucu taramalarında tespit edilememesi ve yakın zamana kadar doğal ve yasal olduğu düşünüldüğü için popülerdir. Sentetik kanabinoidler, doğal kanabinoid olan Δ9-THC'ye benzer kullanıma ve psikoaktif etkilere sahiptir. İkisi de CB1 ve CB2 reseptörlerini uyarır. Sentetik kannabinoidler tam CB1 reseptör agonistleridir oysa THC kısmi bir CB1 reseptör agonistidir. Bu nedenle, sentetik kanabinoidler kanabinoid reseptörlerine THC'den daha yüksek bir afinite ile bağlanır.(32) Şekil 2.6'da bazı sentetik kanabinoidlerin moleküler yapısı gösterilmiştir.



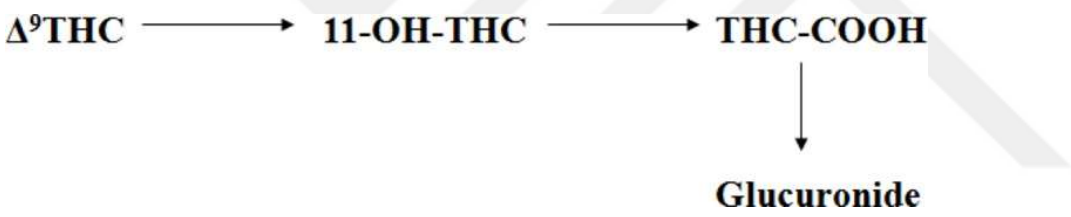
Şekil 2.6 Bazı sentetik kanabinoidlerin moleküler yapısı a) HU-210 sentetik THC analoğu b) CP-47,497 CB1 agonisti c) JWH-018 aminoalkilindol

Δ9-THC, nitrojen içermeyen ve trans-konfigürasyonda iki kiral merkezi olan bir tri-siklik 21-karbon yapısına sahiptir.(Şekil 2.7)



Şekil 2.7 Δ9-Tetrahidrokannabinol'ün moleküler yapısı

Δ9-THC; yüksek lipid çözünürlüğüne, düşük suda çözünürlüğe ve 10.6'lık bir pKa'ya sahip; uçucu, yapışkan bir yağdır. Δ9-THC; kenevirde ısıtıldığında kolayca ve verimli bir şekilde de-karboksile olan mono-karboksilik asitlerin bir karışımı olarak bulunur. Havaya, ısıya veya ışığa maruz kaldığında ayrışır ve kolayca cam ve plastiğe bağlanır. Bu nedenle, Δ9-THC, analitik prosedürler sırasında kaybı önlemek için genellikle amber silikat cam kaplarda bazik veya organik çözücülerde saklanır. Δ9-THC esas olarak karaciğerde sitokrom P450 (CYP) kompleksinin enzimleri tarafından katalize edilen mikrozomal hidroksilasyon ve oksidasyon ile metabolize edilir.(25,32) Δ9-THC metabolizması Şekil 2.8'de gösterilmektedir. Ortalama plazma klirens oranları, kadınlar için saatte 11,8 ± 3 L ve erkekler için saatte 14,9 ± 3,7 L olarak bildirilmiştir. Ayrıca düzenli esrar kullanıcıları için ise saatte yaklaşık 60 L olarak ortalama klirens oranı belirlenmiştir.(33)



Şekil 2.8 Δ9-THC'nin, birincil aktif metaboliti 11-OH-THC ve birincil aktif olmayan THC-COOH'ın metabolik yolu(25)

Kannabis dünyada en fazla kullanılan psikoaktif maddelerden biridir. Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisine (United Nations Office on Drugs and Crime) göre 2018 yılında dünyada 192 milyon kişinin kannabis kullandığı belirlenirken 2021 yılı haziran ayında açıklanan verilere göre bu rakam 225 milyon kişiye yükselmiştir. Bu sebeple kannabis varlığının analizi Adli Bilimler alanında oldukça ilgi çekici hale gelmektedir. Analiz kannabisin etken maddelerinden olan ve kişide psikoaktif etkiler gösteren THC-OH ve THC tayiniyle veya diğer metabolitleri olan fakat psikoaktif etki göstermeyen THC-COOH ve idrarda karşılaşılan THC-glucronide konjugatı tayiniyle gerçekleştirilebilir.(1) Bu metabolitlerin kantitatif analizleri birden çok yöntemle

gerçekleştirilebilir. Bu yöntemler genellikle GC, GC/MS, LC/MS cihazları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu cihazların kullanıldığı analiz yöntemleri dışında Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR), Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI/MS), thin layer chromatography (TLC) cihazlarının kullanıldığı analiz yöntemleri de bildirilmiştir.(34)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada öncelikle ppm konsantrasyonlarda monomerler kullanılarak ardından konsantrasyon miktarları artırılarak damgalı olmayan polimer (NIP) sentezi denemeleri gerçekleştirildi. Ayrıca farklı monomer kombinasyonları, farklı porojenler ve farklı insiyatörler de kullanılarak yapılan değişimleri polimerizasyona ve bağlanma verimine etkileri gözlendi. Polimerizasyon işleminin başarılı olduğu NIP'ler için kullanılan sentez metodu hedeflenen molekül yani kalıp molekül olan THC-OH damgalı polimerlerin (MIP) sentezlenmesinde kullanıldı. Başarılı bir polimerizasyonun görüldüğü THC-OH damgalı polimerlerden kalıp molekülün uzaklaştırılması işleminden sonra damgalama işleminin veriminin ölçülebilmesi adına MIP'lere örnek uygulaması gerçekleştirildi ve Ege Üniversitesi EGE MİKAL'de analizi gerçekleştirildi. Son olarak yüksek verim elde edilen damgalı polimerin karakterizasyonu çalışması için FT-IR analizi gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Ekipman

Yapılan çalışmada kullanılan tüm ekipmanlar ve sarf malzemeler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo I. Cihaz ve sarf malzeme listesi

EKİPMAN ADI	**MARKASI VE MODELİ**
Ultrasonik Banyo	Elmasonic E 120 H 220-240 V, 950W, 50-60Hz
FT-IR	Agilent Technologies Cary 630
Santrifüj Cihazı	HETTICH Universal 320R
ETÜV	W.C. HERAEUS HANAU RT500
Vorteks	İsolab
Hassas Terazi	Presica XB220A
Orbital Karıştırıcı	Stuart Rotator
Buzdolabı	Arçelik -20 Cº Freezer
Ultra Safsu Sistemleri	MilliQ Synthesis A10
Mikropipet	Eppendorf (20 µL,100 µL, 200 µL, 1000 µL)
Falkon Tüp	Isolab (50mL, 15mL, 1,5mL)
Nitril Eldiven	Isolab
Cam Vial	Isolab
Cam Beher	Isolab
Parafilm	Isolab

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılmış olan kimyasallar markaları ve kullanım amaçlarıyla birlikte Tablo2'de verilmiştir.

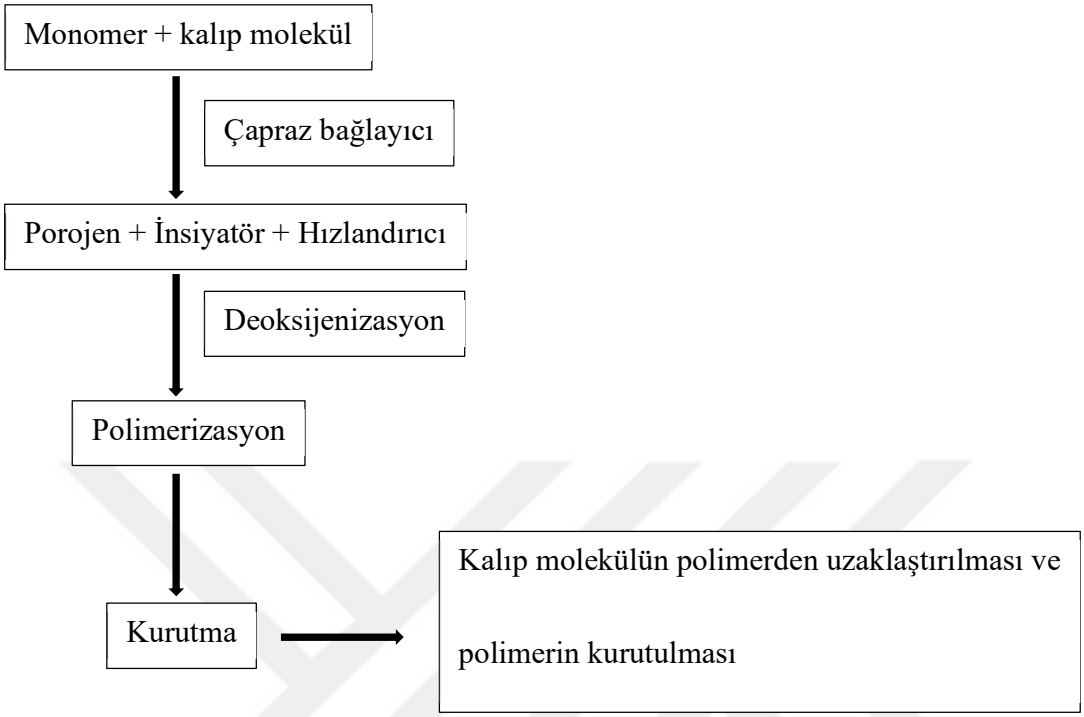
Tablo II. Kimyasallar ve kullanım amaçları listesi

KULLANIM AMACI	**MARKA**	**STANDART/ÇÖZELTİ**
Kalıp Molekül	SIGMA	11-hydroxy-Δ^9–Tetrahydrocannabinol (THC-OH) 1.0 mg/mL in methanol
Monomer	SIGMA	Methacrylic acid (MAA)
Monomer	SIGMA	Methacrylamide (MetACM)
Monomer	SIGMA	Acrylamid (ACM)
Monomer	SIGMA	2-hydroxsyethyl methacrylate (HEMA)
Monomer	SIGMA	4-vinylpyridin (4-VPy)
Çapraz bağlayıcı	MERCK	N,N'-Methylenebisacrylamide
Kolon yıkama, mobil faz	SIGMA	Formic Acid
Porojen	SIGMA	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Porojen	SIGMA	Acetonitrile (ACN)
Porojen	SIGMA	Methanol (MeOH)
Porojen	SIGMA	Acetic Acid (AcA)
Porojen	SIGMA	Acetone (ACE)
Çapraz Bağlayıcı	SIGMA	Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)
İnsiyatör	SIGMA	Ammonium persulfate (APS)
İnsiyatör	SIGMA	Azobisisobutyronitrile (AIBN)

3.3. Çalışma Basamakları

Çalışmada kullanılacak olan yığın polimerizasyon yöntemiyle moleküler damgalı polimerlerin genel olarak sentezlenmesinin şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Moleküler damgalı polimerlerin genel hazırlanma şeması

3.3.2. Damgalı Olmayan Polimerlerin (NIP) Hazırlanması

Başarılı olması halinde THC-OH damgala işleminin gerçekleştirilmesi için damgalı olmayan polimerlerin (NIP) sentez denemelerinin listesi Tablo III'te verilmiştir. Tablo III'te verilen polimer sentezi denemelerinde toplam hacim 1ml olacak şekilde porojenle ayarlanmaktadır. Tüm denemelerde polimerleşme reaksiyonunu hızlandırmak amaçlı 10µL TEMED kullanılmıştır. Yalnız kalıp molekül kullanılmadan Şekil 3.1'de verilen genel moleküler damgalı polimer hazırlama şeması dikkate alındı.

Tablo III. NIP sentezi denemeleri

	ACM	MAA	HEMA	MBA	EGDMA	MeOH	ACN	DMSO	SU	APS	AIBN
NIP1	0,04mg				0,2mg			650µL		%10 100µL	
NIP2	0,04mg				0,2mg			650µL			%10 100µL
NIP3	0,04mg				0,2mg	650µL				%10 100µL	
NIP4	0,04mg			0,2mg		650µL				%10 100µL	
NIP5	0,04mg			0,2mg				650µL		%10 100µL	
NIP6	0,04mg			0,2mg			650µL				%10 100µL
NIP7	0,02mg	0,02mg			0,2mg			650µL			%10 100µL
NIP8			0,04mg		0,2mg	650µL					%10 100µL
NIP9			0,04mg		0,2mg			650µL			%10 100µL
NIP10	100mg			50mg		990µL				10mg	
NIP11	100mg			50mg		990µL					10mg
NIP12	100mg			50mg				990µL		10mg	

Tablo III. *(Devamı)* NIP sentezi denemeleri

	ACM	MAA	HEMA	MBA	EGDMA	MeOH	ACN	DMSO	SU	APS	AIBN
NIP13	100mg			50mg					990µL	10mg	
NIP14	100mg				20µL			990µL		10mg	
NIP15	100mg			50mg		495µL	495µL				10mg
NIP16	100mg			50mg		660µL	330µL				10mg
NIP17	100mg			50mg		330µL	660µL				10mg
NIP18			100µL		20µL			870µL			10mg
NIP19	50mg	50µL		50mg		470µL	470µL				10mg

3.3.3. THC-OH Damgalı Polimerlerin (MIP) Hazırlanması

THC-OH damgalı polimer sentezi denemeleri Tablo IV'te verilmiştir.

Tablo IV. THC-OH damgalı polimer sentezi denemeleri

	AA	**MAA**	**HEMA**	**MBA**	**EGDMA**	**MeOH**	**ACN**	**DMSO**	**AIBN**
MIP1	100mg			50mg		655µL	325µL		10mg
MIP2	100mg			50mg		490µL	490µL		10mg
MIP3	50mg	50µL		50mg		465µL	465µL		10mg
MIP4	50mg	50µL		50mg		620µL	310µL		10mg
MIP6			100µL		20µL			860µL	10mg

Tablo IV'te verilmiş olan MIP denemelerinde kalıp molekül olarak 10µL THC-OH kullanıldı. Ayrıca polimerizasyon reaskiyonunu hızlandırıcı olarak 10µL TEMED kullanıldı. Başarılı olarak sentezlenen polimere damgalama işleminin tamamlanması için kalıp molekülü polimerden uzaklaştırılmak amacıyla 1ml 1:1 (v/v) oranda AcA:MeOH çözeltisi uygulandı. Yıkama işlemi her bir MIP için 2 defa ikişer saat orbital karıştırıcı yardımıyla yapıldı. Her yıkama işlemi ardından MIP'ler 9000rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve THC-OH polimerden uzaklaştırıldı.

3.3.4. THC-OH Damgalı Polimerlere THC-OH'ın Geri Bağlanması

Başarılı olarak sentezlenen her bir MIP'in yıkama işlemlerinin tamamlanması ardından 10ppm olarak 1ml methanol içerisinde hazırlanmış THC-OH çözeltileri MIP'ler ve NIP'ler üzerine uygulandı. 15 ve 30 dakikalık uygulamalar orbital karıştırıcı yardımıyla yapıldı. MIP'de oluşan kavitelere ne kadar THC-OH tutunduğunu ölçmek amacıyla belirtilen süreler sonunda 9000rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi ardından alınan süpernatantlar hizmet alımı yapılan Ege Üniversitesi EGE MİKAL'de in-house method ile analiz edildi.

3.3.4.1 THC-OH Standart Grafiğinin Oluşturulması

0,1-10 ppm konsantrasyonlarda hazırlanan THC-OH çözeltileri Standart grafiğin oluşturulması için EGE MİKAL'de analiz edildi.

3.3.5. FTIR Analizi

Sentezlenen THC-OH damgalı polimer, yıkama işlemi görmemiş hali ve aynı polimerin damgalı olmayan hali şeklinde üç farklı polimer kurutularak FT-IR analizi gerçekleştirildi.

4.BULGULAR

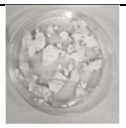
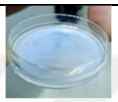
4.1. Damgalı Olmayan Polimerler Denemeleri Sonuçları

Tablo V'te NIP'lerin sonuçlarıyla beraber polimerleşmenin gerçekleştiği NIP'lerin polimer formları ve görsellerine yer verilmiştir.

Tablo V. NIP denemeleri sonuçları

	SONUÇ	GÖRSEL
NIP1	**Polimerleşme yok**	
NIP2	**Polimerleşme yok**	
NIP3	**Polimerleşme yok**	
NIP4	**Polimerleşme yok**	
NIP5	**Polimerleşme yok**	
NIP6	**Polimerleşme yok**	
NIP7	**Polimerleşme yok**	
NIP8	**Polimerleşme yok**	
NIP9	**Polimerleşme yok**	

Tablo V. *(Devamı) NIP denemeleri sonuçları*

	SONUÇ	**GÖRSEL**
NIP10	Polimerleşme var / toz formda	
NIP11	Polimerleşme var / toz formda	
NIP12	Polimerleşme var / jel formda	
NIP13	Polimerleşme var / kristal formda	
NIP14	Polimerleşme var / jel formda (renk değişimi gözlendi)	
NIP15	Polimerleşme var / toz formda	
NIP16	Polimerleşme var / toz formda	
NIP17	Polimerleşme yok	
NIP18	Polimerleşme var / jel formda	
NIP19	Polimerleşme var / toz formda	

4.2. THC-OH Damgalı Polimer Denemeleri Sonuçları

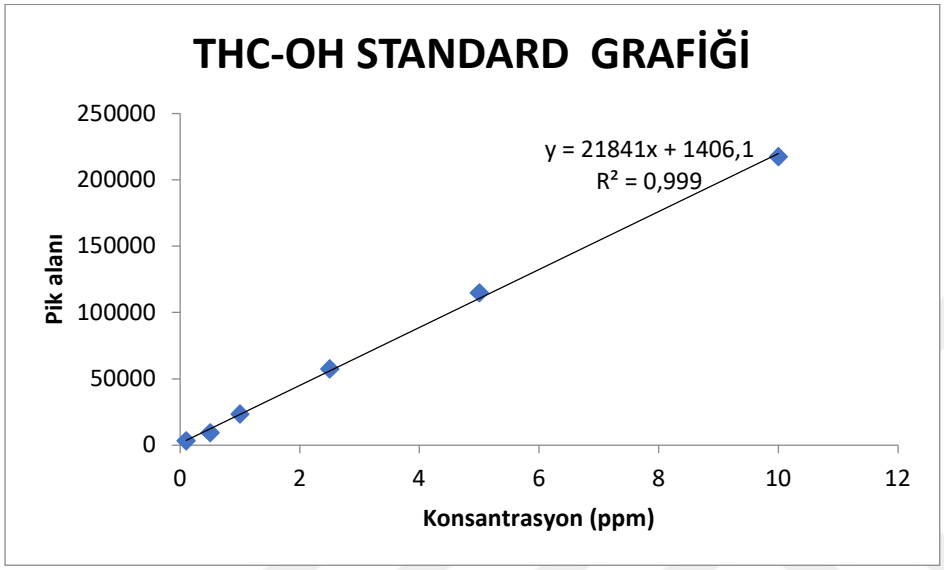
Tablo VI'da MIP denemeleri sonuçları ve polimerleşmenin başarılı olduğu denemelerin görselleri verilmiştir.

Tablo VI. MIP denemeleri sonuçları

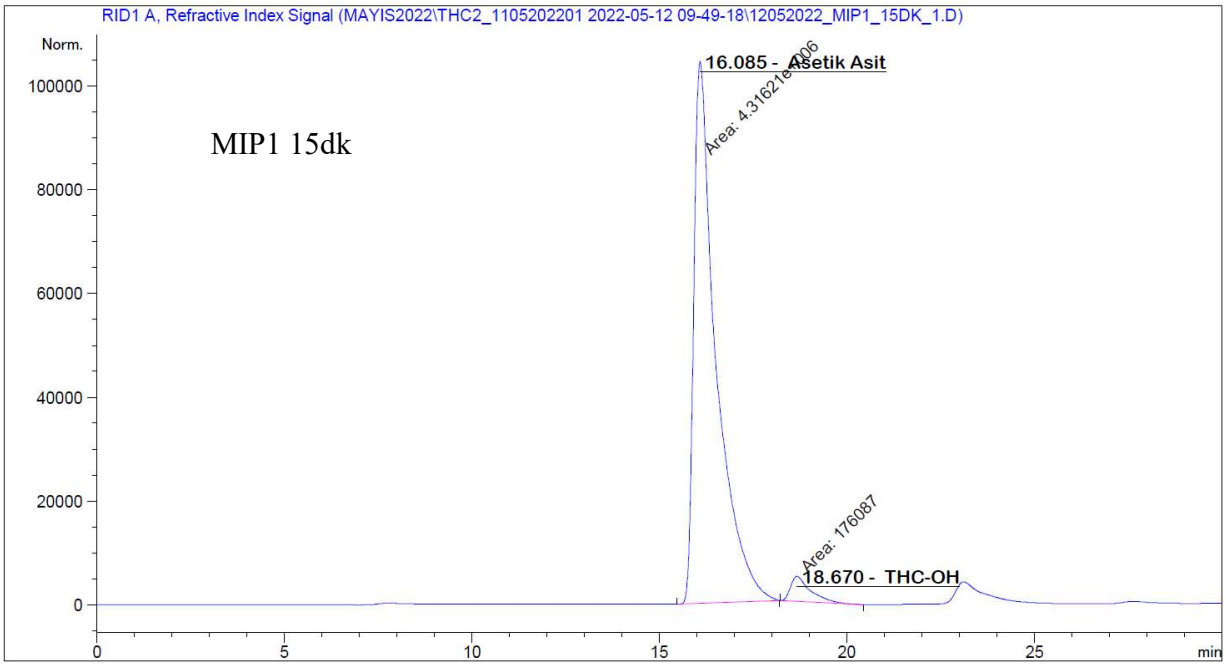
	SONUÇ	**GÖRSEL**
MIP1	Polimerleşme var	
MIP2	Polimerleşme yok	
MIP3	Polimerleşme var	
MIP4	Polimerleşme yok	
MIP6	Polimerleşme var	

4.3. THC-OH Damgalı Polimerlere THC-OH'ın Geri Bağlanması Sonuçları

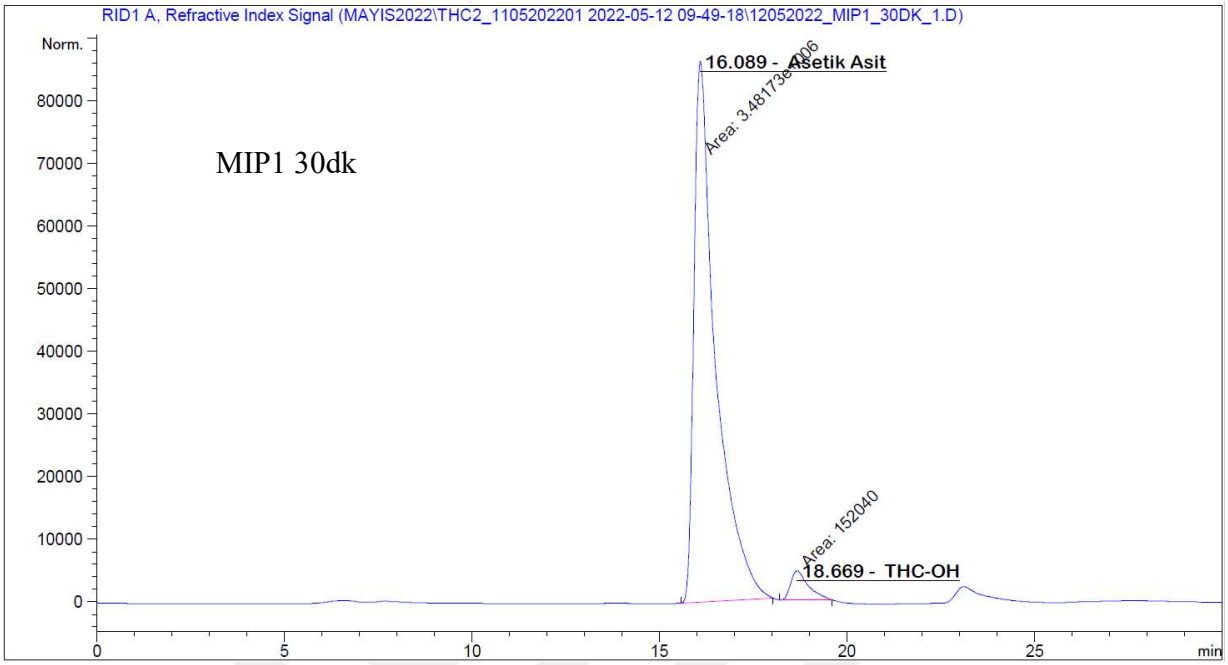
MIP'lere ve NIP'lere örnek uygulanması ardından süpernatantlarda kalan THC-OH miktarı EGE MİKAL'de analiz edildi.



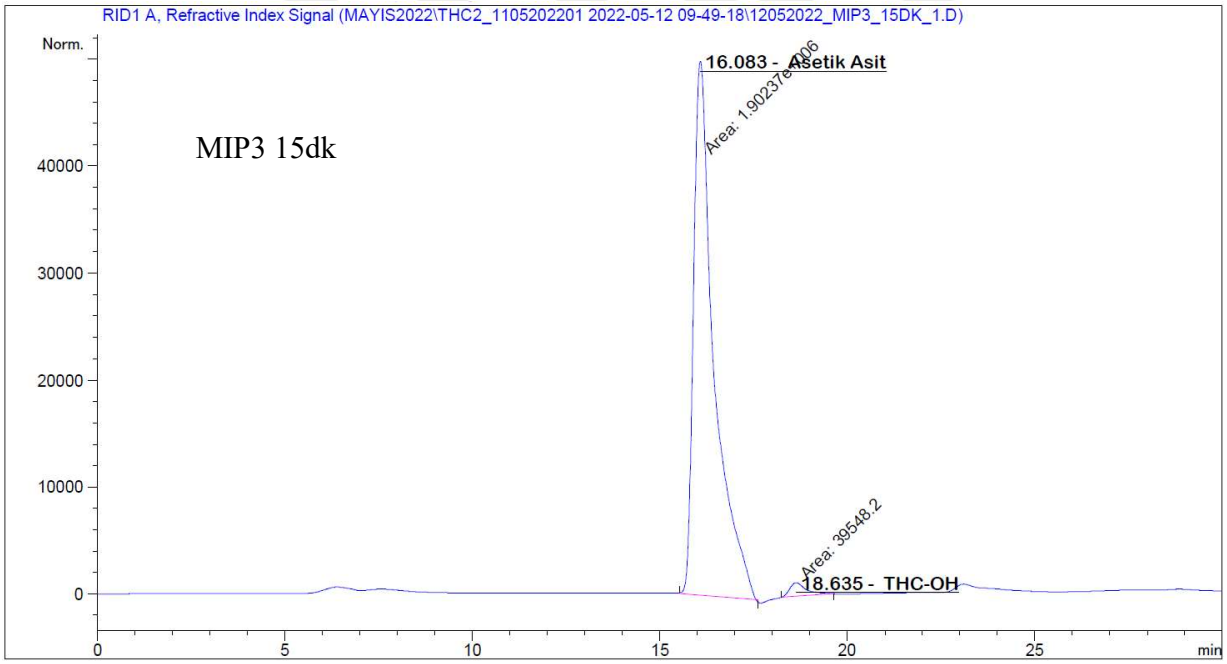
Şekil 4.9 THC-OH HPLC Standart Grafiği



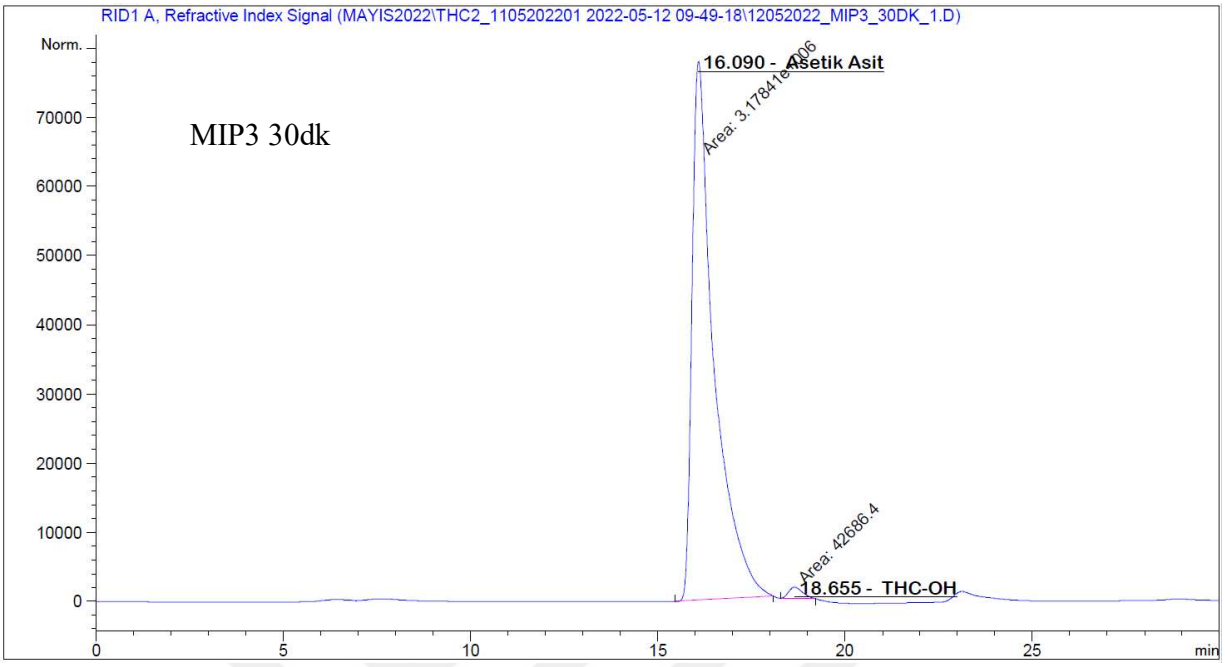
Şekil 4.2 MIP1'e uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı



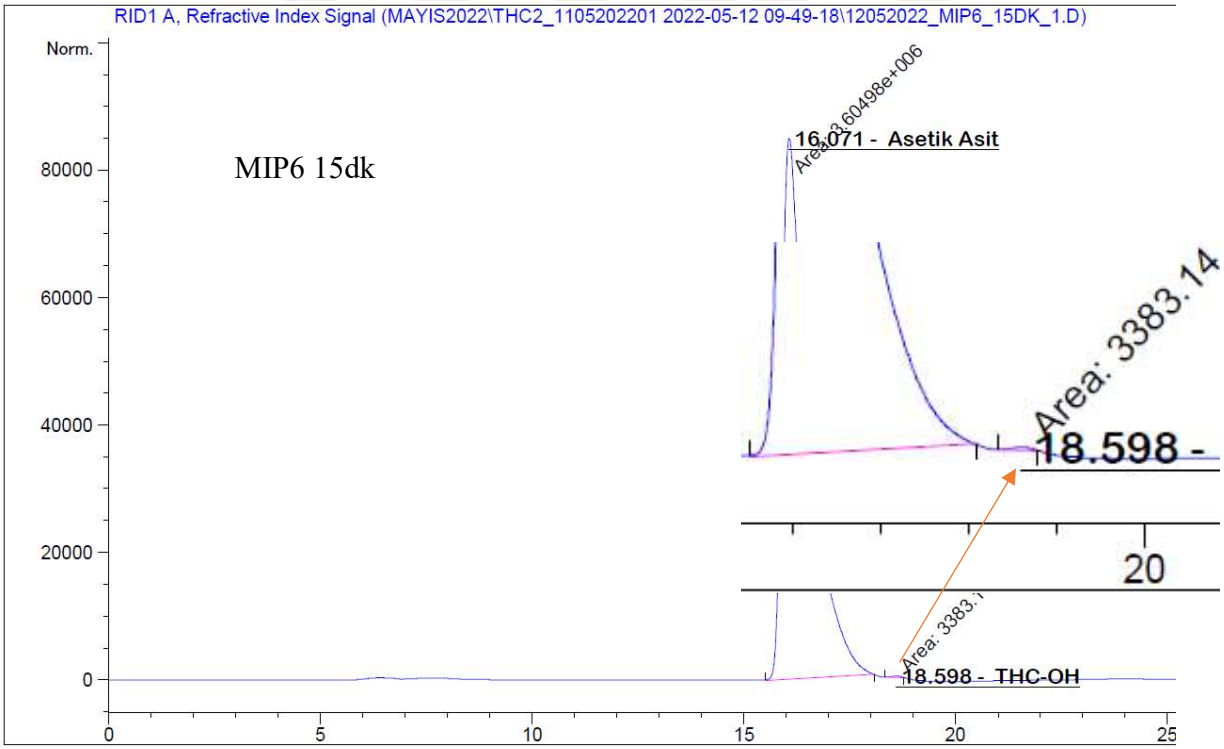
Şekil 10 MIP1'e uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı



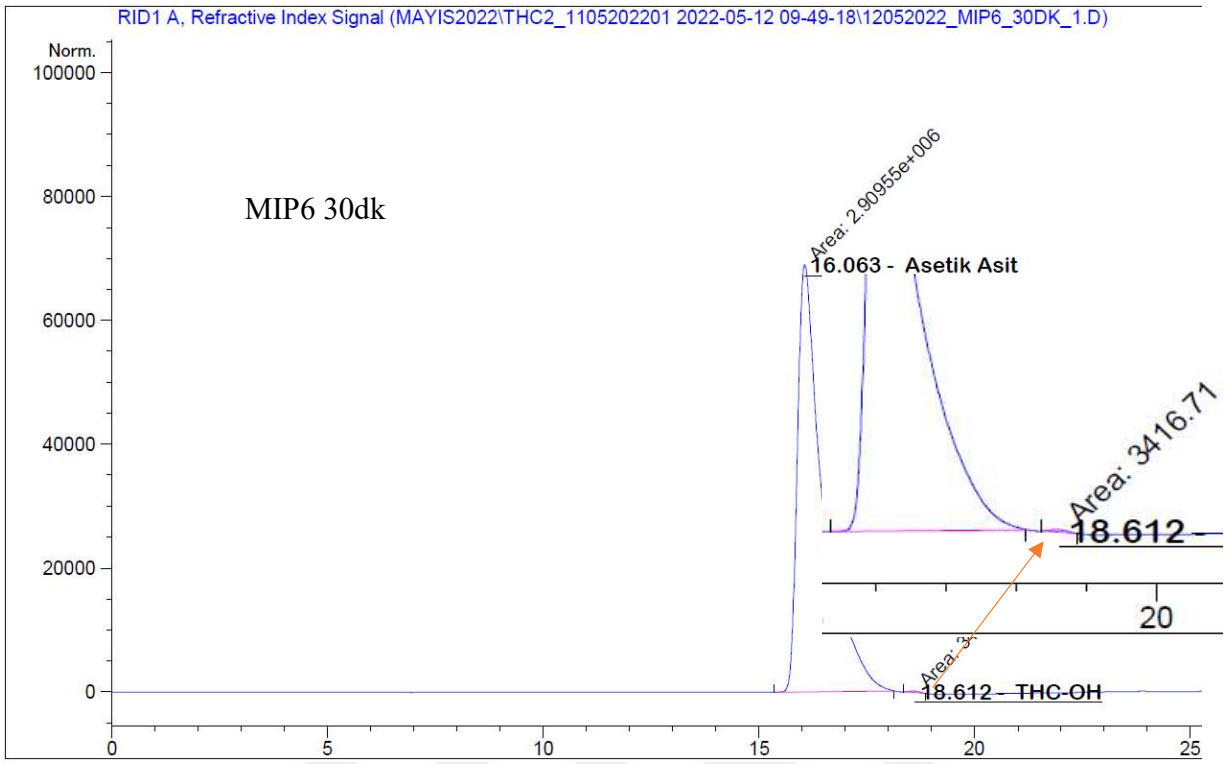
Şekil 4.4 MIP3'e uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı



Şekil 4.5 MIP3'e uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı



Şekil 11 MIP6'ya uygulanan 15 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı



Şekil 4.7 MIP6'ya uygulanan 30 dakikalık THC-OH geri bağlanma çalışması kromatogramı

Kromatogramlarda görülen THC-OH pik alanları ile Şekil 4.1'de verilen standart grafik kullanılarak yapılan hesaplamanın ardından ulaşılan sonuçlar Tablo VII'de gösterilmiştir. Sonuçlar süpernatantta kalan THC-OH miktarını belirtmektedir.

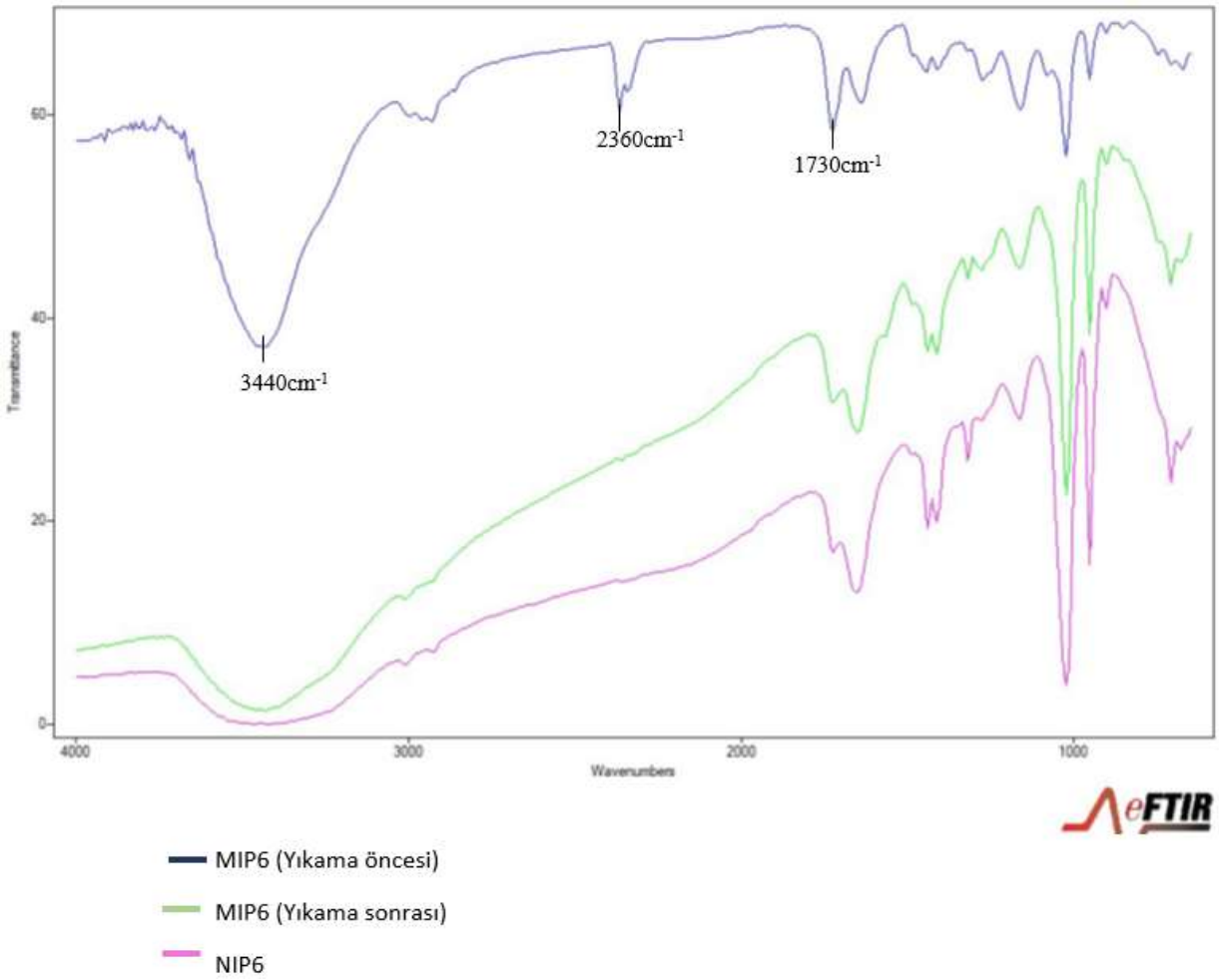
Tablo VII. THC-OH damgalı polimerlerine THC-OH'ın geri bağlanma sonuçları

	15 DAKİKA	**30 DAKİKA**
NIP1	-	8,556ppm
MIP1	7,998ppm	6,897ppm
NIP3	-	1,629ppm
MIP3	0,972ppm	1,896ppm
NIP6	-	7,586ppm
MIP6	1,464ppm	0,092ppm

- MIP1'in 15 dakikalık örnek uygulamasında %20,02'lik, 30 dakikalık örnek uygulamasında %31,03'lük THC-OH geri bağlanma oranı hesaplandı.
- MIP3'ün 15 dakikalık örnek uygulamasında %90,28'lik, 30 dakikalık örnek uygulamasında %81,04'lük THC-OH geri bağlanma oranı hesaplandı.
- MIP6'in 15 dakikalık örnek uygulamasında %85,35'lik, 30 dakikalık örnek uygulamasında %99,08'lik THC-OH geri bağlanma oranı hesaplandı.
- NIP1'e yapılan örnek uygulamasında %14,44'lük bağlanma hesaplandı.
- NIP3'e yapılan örnek uygulamasında %83,71'lik bağlanma hesaplandı.
- NIP6'ya yapılan örnek uygulamasında %24,13'lük bağlanma hesaplandı.

4.4. FTIR Analizi Sonucu

Damgalı polimerde hedeflenen molekül olan THC-OH karakterize edilebilmesi için FTIR analizi yapıldı. THC-OH damgalı polimerin yıkama öncesi ve yıkama sonrası olmak üzere damgalı olmayan polimerle karşılaştırılarak hedef molekülün varlığı ve kalıptan ayrılmış olduğu karakterize edilmiştir. Şekil 4.8'de THC-OH damgalı polimerin yıkama öncesi, yıkama sonrası ve damgalı olmayan polimerin FTIR spektrumları görülmektedir.



Şekil 12 THC-OH Damgalı polimerin yıkama öncesi, yıkama sonrası ve damgalı olmayan polimerin FTIR analizi

Şekil 4.8'de verilen FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler; 3440 cm^{-1} 'de THC-OH'da bulunan -OH bandına, 1730 cm^{-1} 'de karbonil pikine (ester bağı (C=O)), aittir. 2360 cm^{-1} civarında gelen pik ise ortamdan kaynaklı atmosferik CO_2'ye aittir.

5.TARTIŞMA

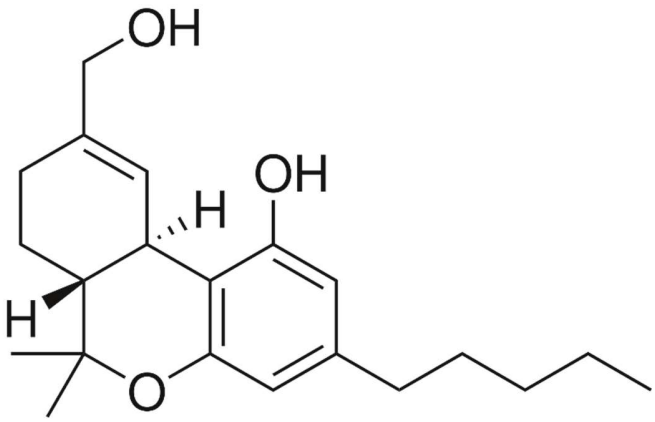
Esrarın psikoaktif özelliğinin insanlar üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Esrar kullanımının neden olduğu akut yan etkiler esas olarak ruh, biliş ve dolaşım ile ilgilidir. Bireysel olarak değişken bir eşiği aşan bir doz alındıktan sonra öfori, kaygı, duyusal algıdaki değişiklikler, hafıza bozukluğu ve psikomotor performans yaygın görülen etkilerdir. Esrar tüketimi kalp hızını artırabilir ve kan basıncını değiştirebilir. Bu da kalp hastalığı olan kişilerde ciddi sonuçlar doğurabilir. Kronik kullanımın etkileri psikozun indüklenmesi ve ilaca bağımlılık gelişimi olabilir. Bu yan etkilerin görülmesine, esrarın vücutta metabolize edildiğinde oluşan metabolitlerinden THC-OH ve Δ9-THC'nin beyin ve periferde bulunan CB1 ve CB2 reseptörlerine spesifik olarak etkileşime girmesi yol açmaktadır.

Psikoaktif metabolitlerden biri olan THC-OH'ın analizlenmesine yönelik yapılan bu çalışmada, THC-OH spesifik damgalı polimerler yığın polimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlendi.

Başlangıçta uygun polimerin seçilmesi için gerçekleştirilen damgalı olmayan polimer denemelerinde başarısız olan NIP1-NIP9 polimer denemelerinde, analizi hedeflenen THC-OH miktarının düşük olması sebebiyle ppm konsantrasyonlarda monomer ve çapraz bağlayıcı kullanılarak polimer sentezlenmesi denenmiştir. Porojen içerisindeki düşük monomer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu sebebiyle polimerizasyon gerçekleşmemiştir. NIP10-NIP19 polimerleri içerisinde ACM monomerinin ve MeOH porojeninin kullanıldığı denemelerde polimerler toz halde elde edilirken HEMA monomeri ve DMSO porojeninin kullanıldığı denemeler jel formda elde edildi. NIP14'te görünen renk değişimi ise polimerin oksitlenmesi kaynaklıdır. Polimere deoksijenizasyon işlemi için uygulanan ultrasonikasyon işleminin süresinin uzatılmasıyla oksidasyon önlenebilir.

Uygun polimerler seçildikten sonra hazırlanan MIP denemelerinde, MIP2'de monomer ve THC-OH porojen içerisinde çözüldükten sonra çapraz bağlayıcı eklendi. Ardından deoksijenizasyon işlemi için ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi. Ultrasonik banyo sonrasında çözeltide pellet oluşumu gözlendi. Ultrasonik banyonun fazla ısınmasından kaynaklı polimerizasyon öncesinde bozulma meydana gelmiş olabilir veya THC-OH ACM etkileşimi, MBA'nın fonksiyonel monomerlerle etkileşmemesine sebep olmuş olabilir. MIP1, MIP2, MIP3 ve MIP4'te hidrojen bağlarını artırmak amacıyla AcN çözgeni de eklenerek 1:1 ve 1:2 oranlarda MeOH:AcN çözeltileri kullanıldı. Bunun haricinde MIP3 ve MIP4'te bağlanma bölgelerini artırmak amacıyla ikili monomer sistemi de denendi.

Başarılı bir şekilde sentezi gerçekleştirilen MIP1, MIP3 ve MIP6'ya örnek uygulaması için her birinin damgalı olmayan halleri de kullanılmıştır. Bunun sebebi hedeflenen THC-OH molekülünün MIP'in yüzeyinden çok kendisine spesifik olan kavitelere bağlanmasını test etmektir. Sonuçlara bakıldığında 10 ppm örnek uygulanan polimerlerden alınan süpernatantta kalan miktar, bize polimere bağlanmayan THC-OH miktarını gösterir. Bağlanan THC-OH'ın yüzde hesabı; süpernatantta bulunan, polimere bağlanmamış THC-OH'ın, başta polimere uygulanan serbest THC-OH'dan çıkartılmasıyla hesaplandı. Sonuçlara göre en iyi bağlanma %99,08'lik oranla MIP6'nın 30 dakikalık örnek uygulamasında görülmektedir. NIP6'ya bakıldığı zaman yüzeye de %24'lük bir bağlanmanın gerçekleştiği görülmektedir. Yıkamadan kalan AcA kalıntısı yüzeyde bağlanmaya sebep olmuş olabilir. Bu durum MIP3'de daha net görülmektedir %90,28'lik yüksek bir geri bağlanma oranı varmış gibi görünse de NIP3'te de %83,71'lik bir bağlanma oranı görülmesi, yıkama sonrası fazla AcA kalıntısı olmasından kaynaklıdır. 1:1 AcA:MeOH (v/v) oranla yapılan yıkama işlemi verimli olsa da AcA kalıntılarını minimuma düşürebilmek için MeOH veya su kullanılarak polimer son defa yıkanabilir ya da farklı yıkama çözeltileri denenebilir.



Şekil 5.13 11-hidroksi-Δ^9-Tetrahidrokannabinol'ün moleküler yapısı

En yüksek geri bağlanma elde edilen MIP6 için uygulanan FT-IR analizi sonuçlarına bakıldığında yıkama sonrası ile damgalı olmayan hali karşılaştırıldığında çok benzer kromatogramlara sahip olup aynı karakteristik pikler görülmektedir. Bu sonuç yıkama işleminin verimli olduğunu göstermektedir. MIP6'da 3440 cm^{-1} 'de görünen -OH bandını gösteren pik damgalı olmayan haliyle ve yıkama sonrası haliyle kıyaslandığı zaman THC-OH'da bulunan -OH bağından kaynaklı olduğu belirgin bir şekilde görülmektedir. 1730 cm^{-1} 'de karbonil grubunu (C=O) gösteren pik de görülen belirgin düşüşün sebebi de THC-OH'ın hidroksil grubunun bağlanma bölgelerinde oluşturduğu ester bağından kaynaklıdır. Yıkama sonrası ve damgalı olmayan polimerde bulunan karbonil grupları daha düşük görülmektedir. Bu sonuç THC-OH moleküllerinin polimere yerleşmiş bir şekilde bulunduğunu göstermektedir.

6.SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, dünyada terapötik amaçlar haricinde yasa dışı kullanımı fazla olan esrar bitkisine psikoaktif özellik kazandıran metabolitlerinden biri olan THC-OH'ın analizine yönelik THC-OH damgalı polimer sentezlenerek bu alanda yapılabilecek yeni projelere yol göstermek hedeflendi.

Daha önce yapılan çalışmalarda THC-OH damgalı polimerlerin sentezlendiği görülmüştür. Fakat birçok faklı polimer sisteminin denendiği bu çalışmanın ışığında görünen o ki HEMA monomeri ve DMSO porojeniyle çapraz bağlayıcı olarak EGDMA kullanılarak sentezlemiş olduğumuz THC-OH damgalı polimer bir ilk olarak çalışılmıştır.

Çalışmada sentezlenen HEMA temelli THC-OH damgalı polimer:

- Düşük maliyetli
- Stabilitesi yüksek
- Yeniden kullanılabilir
- Kısa sürede verimli geri bağlama kapasitesine sahiptir

Sentezlenen THC-OH damgalı polimerler Adli Bilimler alanında yapılacak olan esrar kullanımının analizine yönelik MISPE yöntemi için kolon doldurma materyali olarak ayrıca MIP entegreli sensör çalışmalarında ve hızlı tanı kitleri oluşturmak için kullanılabilir.

KAYNAKÇA

1. World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6).
2. Yılmaz, E., Garipcan, B., Patra, H. K., & Uzun, L. (2017). Molecular imprinting applications in forensic science. *Sensors*, *17*(4), 691.
3. Zayats, M., Kanwar, M., Ostermeier, M., & Searson, P. C. (2011). Molecular imprinting of maltose binding protein: tuning protein recognition at the molecular level. *Macromolecules*, *44*(10), 3966-3972.
4. BelBruno, J. J. (2018). Molecularly imprinted polymers. *Chemical reviews*, *119*(1), 94-119.
5. Ou, S. H., Wu, M. C., Chou, T. C., & Liu, C. C. (2004). Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme. *Analytica chimica acta*, *504*(1), 163-166.
6. Nematollahzadeh, A., Lindemann, P., Sun, W., Stute, J., Lütkemeyer, D., & Sellergren, B. (2014). Robust and selective nano cavities for protein separation: an interpenetrating polymer network modified hierarchically protein imprinted hydrogel. *Journal of Chromatography A*, *1345*, 154-163.
7. Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., ... & Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, *19*(2), 106-180.
8. Polyakov, M. V. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur Fiz Khim*, *2*, 799-805.

9. https://worldwide.espacenet.com/patent/search?q=pn%3DUS3338249A (03.03.2022)

10. Turner, N. W., Jeans, C. W., Brain, K. R., Allender, C. J., Hlady, V., & Britt, D. W. (2006). From 3D to 2D: a review of the molecular imprinting of proteins. *Biotechnology progress*, *22*(6), 1474-1489.

11. Sajini, T., & Mathew, B. (2021). A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting. *Talanta Open*, *4*, 100072.

12. Burcu Okutucu. Serotonin'e spesifik moleküler damgalı polimerlerin hazırlanması ve karakterizasyonu [PhD tezi]. Ulusal Tez Merkezi, 202115, 2007.

13. Wloch, M., & Datta, J. (2019). Chapter Two—Synthesis and polymerization techniques of molecularly imprinted polymers. Compr. *Anal. Chem*, *86*, 17-40.

14. Haupt, K., Linares, A. V., Bompart, M., & Bui, B. T. S. (2011). Molecularly imprinted polymers. *Molecular imprinting*, 1-28.

15. Shah, N., Ul-Islam, M., Haneef, M., & Park, J. K. (2012). A brief overview of molecularly imprinted polymers: From basics to applications. *J. Pharm. Res*, *5*(3309), e3317.

16. Arshady, R., & Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, *182*(2), 687-692.

17. Qi, P., Wang, J., Wang, L., Li, Y., Jin, J., Su, F., ... & Chen, J. (2010). Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols. Polymer, 51(23), 5417-5423.

18. Sellergren, B., & Andersson, L. (1990). Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy. The Journal of organic chemistry, 55(10), 3381-3383.

19. Nestić, M., Babić, S., Pavlović, D. M., & Sutlović, D. (2013). Molecularly imprinted solid phase extraction for simultaneous determination of Δ9-tetrahydrocannabinol and its main metabolites by gas chromatography–mass spectrometry in urine samples. *Forensic science international*, *231*(1-3), 317-324.

20. Lendoiro, E., De Castro, A., Fernández-Vega, H., Cela-Pérez, M. C., López-Vilariño, J. M., González-Rodríguez, M. V., ... & López-Rivadulla, M. (2014). Molecularly imprinted polymer for selective determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-Δ 9-tetrahydrocannabinol carboxylic acid using LC-MS/MS in urine and oral fluid. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(15), 3589-3597.

21. Samuel, P. (2016). History of medical cannabis. Journal of Pain Management, 9(4), 387.

22. https://www.sydney.edu.au/lambert/medicinal-cannabis/history-of-cannabis.html (11.05.2022)

23. Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and physics of lipids*, *108*(1-2), 1-13.

24. Grotenhermen, F. (2004). Pharmacology of cannabinoids. *Neuroendocrinology letters*, *25*(1/2), 14-23.

25. Sharma, P., Murthy, P., & Bharath, M. S. (2012). Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iranian Journal of Psychiatry*, *7*(4), 149.

26. Kwasnik, A., Abreu, A., & Chediak, A. (2020). Cannabinoids and Sleep: Helpful or Harmful?. *Current Pulmonology Reports*, *9*(3), 96-101.

27. Hanuš, L. O. (2009). Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo) cannabinoids. *Medicinal research reviews*, *29*(2), 213-271.

28. Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*(5090), 1946-1949.

29. García-Valverde, M. T., de Medina, V. S., Codesido, V., Hidalgo-García, J., & Ferreiro-Vera, C. (2020). Exploring the Mysteries of Cannabis through Gas Chromatography. In *Recent Advances in Gas Chromatography*. IntechOpen.

30. Grotenhermen, F. (2005). Cannabinoids. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, *4*(5), 507-530.

31. Toyota, M., Shimamura, T., Ishii, H., Renner, M., Braggins, J., & Asakawa, Y. (2002). New bibenzyl cannabinoid from the New Zealand liverwort Radula marginata. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, *50*(10), 1390-1392.

32. Mills, B., Yepes, A., & Nugent, K. (2015). Synthetic cannabinoids. *The American journal of the medical sciences*, *350*(1), 59-62.

33. Musshoff, F., & Madea, B. (2006). Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Therapeutic drug monitoring*, *28*(2), 155-163.

34. Lazarjani, M. P., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O., & Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: A narrative review. *Journal of Cannabis Research*, *2*.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Özgür Dayanır

Doğum Yeri ve Tarihi:

E-posta :

Eğitim Bilgileri

2019-2021: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)

2014-2019: EGE Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

İş Tecrübesi

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Kısmi zamanlı öğrenci (Ekim-Aralık) 2020.