



## İdrarda 11-Nor-Delta-9-Tetrahidrokannabinol-9-Karboksilik Asit'in (Thc-CooH) GC-MS ile Analizinde Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

### Comparison of Extraction Methods for 11-Nor-Delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (Thc-CooH) in Urine Samples Prior to GC-MS Analysis

Ash Erdem Yayayürük<sup>1,2</sup>, Selim Girgin<sup>1,2</sup>, Serkan Vuruk<sup>1,2</sup>, Ülkü Güler<sup>1,2</sup>, Melike Güngör<sup>1</sup>, Halil İbrahim Bostancı<sup>1</sup>, Serap Annette Akgür<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü (BATI), Bornova-İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Bornova-İzmir

#### Özet

**Amaç:** Günümüzde kötüye kullanılan yasadışı maddeler arasında en yaygın kullanılan madde esrardır. Esrarın saptanmasına yönelik yapılan çalışmalarda, idrarda ana metaboliti olan THC-COOH'un kat-faz (SPE) ve sıvı-faz (LLE) ekstraksiyon teknikleri ile analizi yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, sentetik idrar örneklerinde THC-COOH analizi için GC-MS ile tayini öncesinde SPE ve LLE metodlarını kullanarak örnekleri analize hazırlamak ve bu yöntemlerin örnek hazırlamadaki verimleri ve etkinlikleri karşılaştırmaktır. Aynı zamanda bu yöntemlerin tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve doğrusallık gibi validasyon parametreleri inceleyerek yöntem geçerliliğini değerlendirmektedir.

**Gereç ve Yöntem:** Ana standart olarak ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC ve iç standart olarak ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC-D<sub>3</sub> kullanılmıştır. LLE için Toxi-tube B, SPE için Clean Screen THC kartuşları kullanılmıştır. Türevlendirme için BSTFA+%1 TMCS kullanılmıştır. Analizler Thermo Finnigan Trace Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) cihazı ile yapılmıştır. SPE ve LLE metodlarının karşılaştırılması Minitab11 istatistik paket programı ile yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmamızda en düşük tayin sınırı olarak (LOD) 2  $\mu$ g/L elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda geri kazanım değerleri %90'nun üzerinde ve %RSD değerleri %10'nun altında bulunmuştur. 25-500  $\mu$ g/L arasındaki konsantrasyonlarda kantitatif tayin yapılabilmesi için gerekli olan doğrusallığın var olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan Anderson-Darling testi ile LLE ve SPE sonuçlarının normal bir dağılıma uymadığı görüldüğünden non-parametrik test olan Wilcoxon signed-rank testi uygulanmıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızda bulunan doğrusallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanılabilirlik değerleri, biyoanalitik validasyon kriterleri doğrultusunda kabul edilebilir düzeyde bulunmuştur. Elde edilen istatistiksel sonuçlara göre, LLE ve SPE metodları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.005$ ). Yapılan çalışma ile analiz öncesinde örnek hazırlama basamağının önemi gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** TCH-COOH, Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon, Katı Faz Ekstraksiyon, İdrar, Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi.

#### Abstract

**Objective:** Marijuana is the most widely used illegal substance in the world. The target analyte for cannabinoids analysis in urine is THC-COOH. The most widely used sample preparation methods for THC-COOH are liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE). The aim of this work is to compare the extraction methods (LLE and SPE) for ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC (THC-COOH) for synthetic urine samples (n=80) prior to Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) analysis. In addition, a method validation was conducted in terms of reproducibility, selectivity, accuracy, precision and linearity.

**Materials and Methods:** ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC and ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC-D<sub>3</sub> (as the internal standard) were used in the studies. Toxi tube B and Clean Screen THC cartridges were used for LLE and SPE, respectively. BSTFA with 1% TMCS were used in the derivatization step. The analysis is performed with Thermo Finnigan Trace GC-MS. Minitab11 was used in statistical evaluations.

**Results:** The limit of detection (LOD) was found to be 2  $\mu$ g/L. All recovery values were >90% with RSD values <10%. A calibration curve for the standard stock solutions of 25-500  $\mu$ g/L was obtained with a coefficient of variation ( $R^2$ ) of 0.9968 which indicates a good linearity. The Anderson-Darling test applied indicated that, LLE and SPE results do not follow a normal distribution, therefore, a non-parametric test, Wilcoxon signed-rank test was used in statistical evaluations.

**Conclusions:** The linearity, repeatability and recovery values obtained in the study were found to be in accordance with bioanalytical validation criteria. According to the statistical results obtained, a significant difference between LLE and SPE was found ( $p < 0.005$ ). By means of this study, the importance of sample preparation steps prior to analysis has been shown.

**Keywords:** TCH-COOH, Liquid-Liquid Extraction, Solid Phase Extraction, Urine, Gas Chromatography Mass Spectrometry.

## 1. Giriş

Uyuşturucu, uyarıcı ve keyif verici maddelerin kullanımı özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren tüm dünyada

Sorumlu Yazar: Dr. Ash Erdem Yayayürük

Ege Üniversitesi, Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü

(BATI), Bornova-İzmir Tel/Faks: +90 232 311 17 80 / 388 82 64

aslierdem30@hotmail.com

Geliş: 16.02.2016

Düzeltilme: 08.03.2016

Kabul: 14.03.2016

hızla artarak önemli bir toplumsal sorun niteliği kazanmıştır. Yoğun bir transit bölge konumunda olan ülkemizde de kötüye kullanımı olan bu madde trafiği, sosyal, ekonomik, kültürel birçok faktörün de katılımı artırmıştır. Uyuşturucu, uyarıcı ve keyif verici maddeler ile mücadele, Avrupa Birliği (AB)'nin de öncelikleri arasındadır (1). Bu mücadele kapsamında önemli

bir yer tutan madde analizleri, tarama testleri ve doğrulayıcı testler olmak üzere iki aşamada yapılmaktadır.. Tarama testleri ekonomik, pratik ve hızlıdır. Bu tarama testleriyle yöntemin duyarlılık sınırları içinde aranan maddenin bulunup bulunmadığı ortaya çıkarılır. Ancak bu yöntemler “duyarlılık” ve ‘en düşük saptanabilecek miktarla” sınırlıdır. Tarama testlerinin ardından, hedeflenen madde için mutlaka yeterince duyarlı ve tarama testlerinden daha seçici olan doğrulama testlerine geçilir. Bu doğrulayıcı yöntemlerde ise aranacak maddenin analize hazırlanması çok önemli bir parametredir (2).

Bilindiği üzere toksikolojik analizi yapılacak biyolojik sıvılarda; aranan madde dışında farklı birçok bileşenin yer aldığı karışık bir matris yapıya sahip olması nedeniyle analiz öncesi bir ön ayırma ve temizleme işlemine gereksinim vardır. Dolayısıyla örnek hazırlama; yapılacak analizler öncesinde dikkat edilmesi gereken çok önemli basamaktır (3).

Klasik toksikolojik analiz yöntemlerinde örnek hazırlama birkaç basamaktan oluşmaktadır. İlk olarak aranan madde uygun koşullarda organik çözücü ile ekstrakte edilir ve organik çözücü kuruluğa kadar uçurulur. Elde edilen bu kalıtıda, aranan madde ve metabolitleri dışında başka maddelerin varlığı analizde girişimlere yol açabilmektedir. Bu nedenle; analizi hedeflenen maddelerin niteliği göz önünde bulundurularak seçilecek bir ekstraksiyon yöntemi analitik yöntemin doğruluğu, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı açısından çok önemlidir (4). Karmaşık yapı biyolojik materyallerin analize hazırlanmasında ise sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) ve katı faza ekstraksiyon (SPE) en fazla kullanılan yöntemler arasındadır. LLE yönteminde analizi yapılan maddenin bir organik çözücüyle ayrılması gerekmektedir. Çözünürlüğü artırmak amacıyla analizi yapılacak maddenin pKa değerine uygun olarak iyonize olmayacağı pH’da ekstraksiyon işleminin yapılması gerekir. Bu yöntemin büyük avantajı, ekstraksiyon şeması doğru uygulandığı takdirde, seçiciliğidir. Bu şekilde asidik, nötral ve bazik maddeler kolaylıkla ayrılabilir (5). SPE yöntemi ise uzun süredir bilinmekle birlikte toksikolojik analizlerde kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır. Bu yöntemde; uygun adsorban taşıyan kartuşlardan geçirilen biyolojik sıvıda bulunan toksik madde, adsorban tarafından tutulur, daha sonra uygun çözücü ile kartuştan elüe edilir. SPE yöntemi; sulu fazla organik faz arasında emülsiyon oluşmaması, yüksek verim göstermesi ve elde edilen son ürünün saflığı nedenlerinden ötürü tercih edilmektedir. Ancak yöntemin yüksek maliyetli oluşu önemli bir kısıtlayıcı özelliğidir (6).

İdrar numunesinde esrar tayini için en fazla kullanılan yöntemler arasında da LLE ve SPE yer almaktadır. Esrar

günümüzde kötüye kullanılan yasadışı maddeler arasında ilk sırada yer almaktadır. Esrarın metabolizması incelendiğinde en önemli metabolitlerinin THC-OH ve THC-COOH olduğu görülmektedir. THC-OH esrarın aktif metabolitidir ve hızlıca THC-COOH’a dönüşür, THC-COOH glukuronit konjugatı olarak vücuttan atılır. Bu nedenle THC-OH biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. THC-COOH ise maruziyetten sonra saatler içinde biyolojik sıvılarda saptanabilmektedir. THC-COOH glukuronit konjugat formunun analiz edilebilmesi için ekstraksiyon öncesinde hidroliz işlemi yapılmaktadır (7,8).

İdrarda esrar tayini için literatürde LLE ve SPE ile yapılan birçok çalışma mevcuttur. Huq ve arkadaşları 2005 yılında THC’nin ana metaboliti olan 11-nor-9-THC- $\Delta^9$ -karboksilik asidin (THC-COOH) idrar örneklerinde saflandırılması için yeni bir katı faza özütlenme metodu geliştirilmiş ve polimerik yapı katyonik Strata-X-C sorbenti kullanmıştır. Katı faz kartuşuna tutunan metaboliti geri almak için MS sistemleri ile uyumluluk gösteren asetronitril kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler %1 (TMCS) içeren (BSTFA) reaktifi ile türevlendirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemle THC-COOH iyi bir doğrusalılık ve kesinlik ile tayin edilmiştir (9). Robandt ve arkadaşları (2009) idrar örneklerinde 9-THC tayini yapmak için anyon değiştirici polimer kullanarak katı faz ekstraksiyonu yapmış ve elde ettikleri örnekleri LC-MS-MS ile analiz etmişlerdir. Aynı örnekler ayrıca pentafloropropionik anhidrit/pentafloropropanol (PFPA/PFPOH) kullanılarak türevlendirilmiş ve Gaz Kromatografi Kütle Spektrometri (GC-MS) ile de analiz edilmiştir (10). 2011 yılında Rossi ve çalışma arkadaşları THC, kokain, kodein ve ana metabolitlerini idrar örneklerinde eş zamanlı olarak GC-MS ile tayin etmek için yeni bir metod geliştirilmiştir. Analitler bazik ortam koşullarında sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ayrıldıktan sonra, %1 (TMCS) içeren (BSTFA) reaktifi ile türevlendirilerek GC-MS ile analiz edilmiş ve kromatografik ayırma için kısa GC kolonu kullanılarak toplam analizi 6 dakika içinde gerçekleştirmişlerdir (11). Bahsedilen tüm çalışmalarda tayini yapılan tüm maddelerin belirtme sınırı ve tekrarlanabilirliği oldukça iyi düzeydedir.

Bu çalışmanın amacı, sentetik idrar örneklerinde (n=80) GC-MS ile THC-COOH’u tayin aşamasında; örnek hazırlama yöntemlerinden katı faza ekstraksiyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyon teknikleri kullanarak analize hazırlamak ve bu yöntemlerin verimleri ve etkinlikleri tartışmaktır. Aynı zamanda önerilen yöntemin geçerliliğini değerlendirmek amacıyla biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmış ve tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık gibi validasyon parametreleri incelenmiştir.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1 Kullanılan Kimyasallar

Ana standart olarak ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC (Cerilliant) ve iç standart olarak ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC- $D_3$  (Cerilliant) kullanılmıştır. Ultra saf su ihtiyacı Millipore (18.2 M) saf su sisteminden karşılanmıştır. LLE için metilen klorür, heptan ve çinko klorürden oluşan Toxi-tube B (Agilent) ekstraksiyon kartuşu kullanılmıştır. SPE yöntemi için hidrofobik ve anyon değiştirici özellikte olan Clean Screen THC (UCT) katı faz kartuşu kullanılmıştır. Türevlendirme aşamasında, %1 oranında trimetilklorosilam (TMCS) içeren N,O bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) reaktifi (Sigma) kullanılmıştır. GC-MS analizlerinde yüksek saflıkta (>%99.9) He gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır.

### 2.2 Cihaz ve Gereçler

Analiz edilen örneklerde immunokimyasal yöntemler kullanılarak, THC-COOH varlığı ön tarama testleri ile tayin edilmiştir. Bu aşamada, Homogeneous Enzyme Immunoassay Yöntemi (DRI ETHYL ALCOHOL-Application On HITACHI 902™ SYSTEM) kullanılmıştır. Kapiler kolonlu (Silika dolgu; 15 m uzunluğunda, 0.25  $\mu$ m film kalınlığı ve 0.25 mm iç çapında olan), uygun bir enjektörü (otomatik besleme sistemi ve bir akış spit/splitless enjektörlü) ve MS dedektörü olan Thermo Finnigan Trace Gaz Kromatografisi-Kütle spektrometrisi (GC-MS) cihazı ile yapılmıştır. GC-MS analiz parametreleri şu şekildedir: Fırın sıcaklık programı: 150°C (1 dak), sonra 30 °C/dk ile 270 °C çıkar ve bu sıcaklıkta 5 dakika bekleme şeklindedir. Taşıyıcı gaz ve akış: Helyum, 1 mL/min, Enjeksiyon bloğu Sıcaklığı: 260 °C, Dedektör sıcaklığı: 230 °C, Enjeksiyon hacmi:1  $\mu$ L, splitless. Örnek değerlendirme aşamasında  $\Delta^9$ -THC-COOH'un varlığı 371, 473 ve 488 m/z oranları ile tayin edilmiş ve kantitasyon için 371 m/z iyonu baz alınmıştır.

### 2.3 Hidroliz

THC-COOH analitinin metabolizmada glukuronid proteinleri ile olan bağlarının parçalanması ve GC-MS sonuçlarına etkisinin giderilmesi amacıyla analiz işlemi öncesi hidroliz işlemi gerçekleştirilir. Hidroliz işlemi asidik, bazik veya enzimatik olmak üzere üç şekilde yapılabilir [12,13]. Çalışmamızda asidik ve bazik hidroliz işlemi yapılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır.

Asidik hidroliz için hazırlanan numunelerin/standartların herbirine 0.5 mL derişik HCl eklenir. Sonrasında 1 dakika boyunca vortekslenir ve 75.0°C de 30.0 dakika boyunca ısıtılır. Hazırlanan numuneler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 1.0 mL, 7.0 N NH<sub>4</sub>OH eklenir ve 1 dakika boyunca vortekslenir. Ardından, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> kullanılarak pH 6.0'ya ayarlanır.

Bazik hidroliz işlemi için ise; hazırlanan numunelerin/standartların herbirine 1.0 mL, 1.0 M KOH

eklenir, sonrasında vortekslenir ve 75.0°C'de 30.0 dakika boyunca ısıtılır. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığına kadar soğutulularak analiz edilir.

### 2.4 Ekstraksiyon

#### 2.4.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon (LLE)

Sıvı-sıvı ekstraksiyon için 4.875 mL sentetik idrar örneğine farklı miktarlarda THCCOOH eklenir ve 125  $\mu$ L, 25  $\mu$ g/L iç standart eklenerek Toxi tüp B kartuşuna alınır. Bu kartuş 2-5 dakika boyunca elde çalkalanır. Ardından 2500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenir. Üstte kalan organik kısımdan 1.0 mL alınarak tüplere konular ve azot atmosferi altında 40.0°C'de kuruluğa kadar uçurular. Örneği GC/MS'de analize hazırlamak için türevlendirici ajan olan 100  $\mu$ L %1 (TMCS) içeren (BSTFA) konularak 60.0°C'de 20 dakika boyunca beklenir. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 50  $\mu$ L etil asetat eklenir. Viallere alınan örnek GC/MS ile analiz edilir.

#### 2.4.2 Katı Faza Ekstraksiyon (SPE)

Katı faza ekstraksiyon için 3.900 mL sentetik idrar örneği farklı miktarlarda THCCOOH eklenir ve 100  $\mu$ L, 25  $\mu$ g/L iç standart eklenerek deney tüpüne alınır. Bu karışıma 1.0 mL 1.0 M KOH eklenerek hidroliz basamağı gerçekleştirilir. Ardından örnek vortekslenip 15 dakika 45.0°C de ısıtılır. Örnekler 700.0  $\mu$ l glasiyel asetik asit eklenerek pH değerleri 3.0-3.5 aralığına ayarlanır. Katı faz kartuşunu şartlandırmak için sırasıyla 3.0 mL metanol, 3.0 mL saf su, 0.1 M 1.0 mL HCl eklenir. Ardından hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş olan idrar örneklerinden 2.0 mL alınarak katı faz kartuşuna yüklenir. Örnek yüklemesinden sonra sırasıyla 2.0 mL saf su, 2 mL asetonitril-HCl (30:70), 200  $\mu$ l hekzan maddeleri kartuş temizlenir. Elüsyon işlemi için çözgen olarak 3.0 mL etilasetat-hekzan (50:50) karışımı kullanılır. Elüe edilmiş örneklerden 1.0'er mL alınarak azot atmosferi altında 40 °C'de kuruluğa kadar uçurular. 100  $\mu$ L %1 (TMCS) içeren (BSTFA) ile türevlendirilerek, 60 °C'de 20 dakika boyunca beklenir. Örnekler 50  $\mu$ L etil asetat eklenir ve viallere alınan örneğin 1  $\mu$ L'si GC-MS ile analiz edilir.

## 3. Bulgular

### 3.1 Kalibrasyon

( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC üzerine, 25  $\mu$ g/L ( $\pm$ )-11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -THC- $D_3$  iç standart eklenerek, 50, 100, 250,500  $\mu$ g/L olacak şekilde 3 farklı derişimde  $\Delta^9$ -THC-COOH çözeltileri hekzan:etil asetat (50:50) karışımı içerisinde hazırlanmış ve %1 (TMCS) içeren (BSTFA) kullanılarak türevlendirme işlemi yapıldıktan sonra GC/MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan yola çıkılarak elde edilen alıkonma süreleri (R), standart/internal standart (S/IS) oranı ve derişim verileri yardımıyla kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve bu analizi edilen örneklerdeki  $\Delta^9$ -THC-COOH miktarı bu kalibrasyon

eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır.

### 3.2 Yöntem Validasyonu

Yöntemin geçerliliğini değerlendirmek amacıyla biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmış ve tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık gibi validasyon parametreleri incelenmiştir.

#### 3.2.1 Tekrarlanabilirlik

##### 3.2.1.1 Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Aynı laboratuvarında, aynı kişi tarafından, aynı donanım kullanılarak, özdeş deney numunesi üzerinde, kısa zaman aralığı içinde, aynı cihaz kullanılarak elde edilen 7 enjeksiyona ait alıkonma süreleri ( $R_c$ ) ve pik alanları Tablo 1'de bulunmaktadır.

**Tablo 1.**  $\Delta^9$ -THC-COOH enjeksiyonuna ait tekrarlanabilirlik verileri.

Matriks	Hekzan:Etil Asetat (50:50)		
Analit	$\Delta^9$ -THC-COOH		
Derişim	100 $\mu$ g/L		
Ölçüm Sayısı	Zaman Aralığı (dk)	Standart	
		Alan	Rt
1. Ölçüm	2-10	368894	6.19
2. Ölçüm	2-10	403560	6.19
3. Ölçüm	2-10	354265	6.19
4. Ölçüm	2-10	376214	6.18
5. Ölçüm	2-10	352777	6.19
6. Ölçüm	2-10	368894	6.19
7. Ölçüm	2-10	297822	6.19
Ort		360346	6.19
Std. Sapma (SD)		32324	0.00
% RSD		9	0.06

### 3.2.1.2 Ekstraksiyon Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanım

Aynı laboratuvarında, aynı kişi tarafından, aynı donanım kullanılarak, özdeş deney numunesi üzerinde, kısa zaman aralığı içinde aynı ekstraksiyon metodu kullanılarak elde edilen ve aynı cihaz ile analiz edilmiş  $\Delta^9$ -THC-COOH'ye ait veriler Tablo 2'de bulunmaktadır. Bulunan değerler iç standart (25  $\mu$ g/L) sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır.

#### 3.2.2 Seçicilik

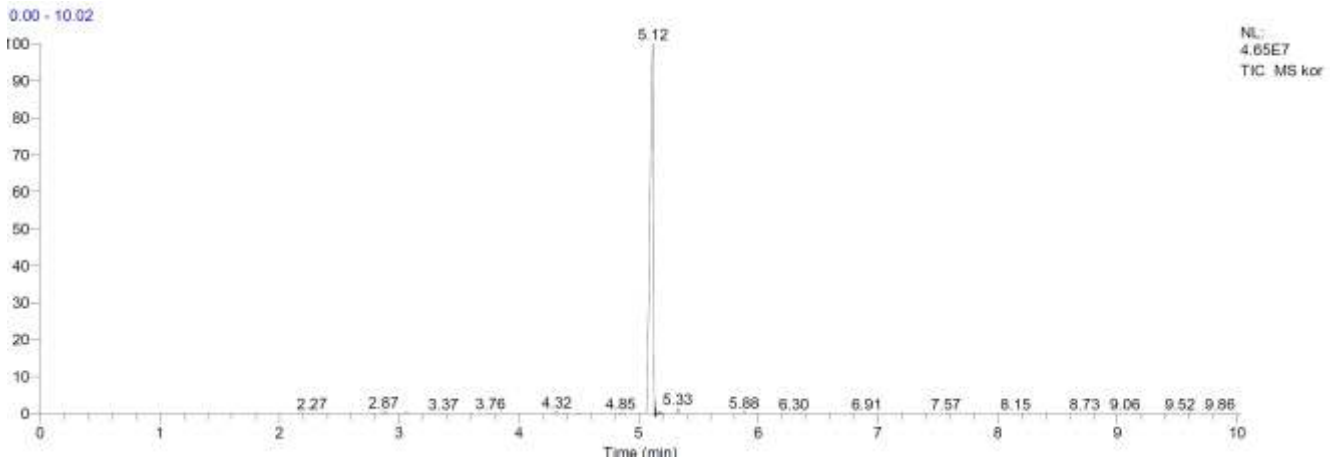
Örnek matriksinde bulunan bileşenlerin yanında  $\Delta^9$ -THC-COOH analitinin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemin seçiciliğini belirler. Elde edilen kromatogramlar doğrultusunda önerilen yöntem ile seçimli ve seçici şekilde analiz yapılabildiği gözlenmiştir (Şekil 1ve Şekil 2).

**Tablo 2.**  $\Delta^9$ -THC-COOH ekstraksiyonuna ait tekrarlanabilirlik verileri.

	Düşük Derişim (25 $\mu$ g/L)	Orta Derişim (50 $\mu$ g/L)	Yüksek Derişim (100 $\mu$ g/L)
	% Geri Kazanım		
1. Paralel Ekstraksiyon	100.40	99.13	92.67
2. Paralel Ekstraksiyon	89.36	97.09	102.73
3. Paralel Ekstraksiyon	94.76	109.22	103.65
Ortalama	94.84	101.81	99.68
SD	5.52	6.49	6.09
Ekst. Tekrarlanabilirliği (% RSD)	5.82	6.38	6.11

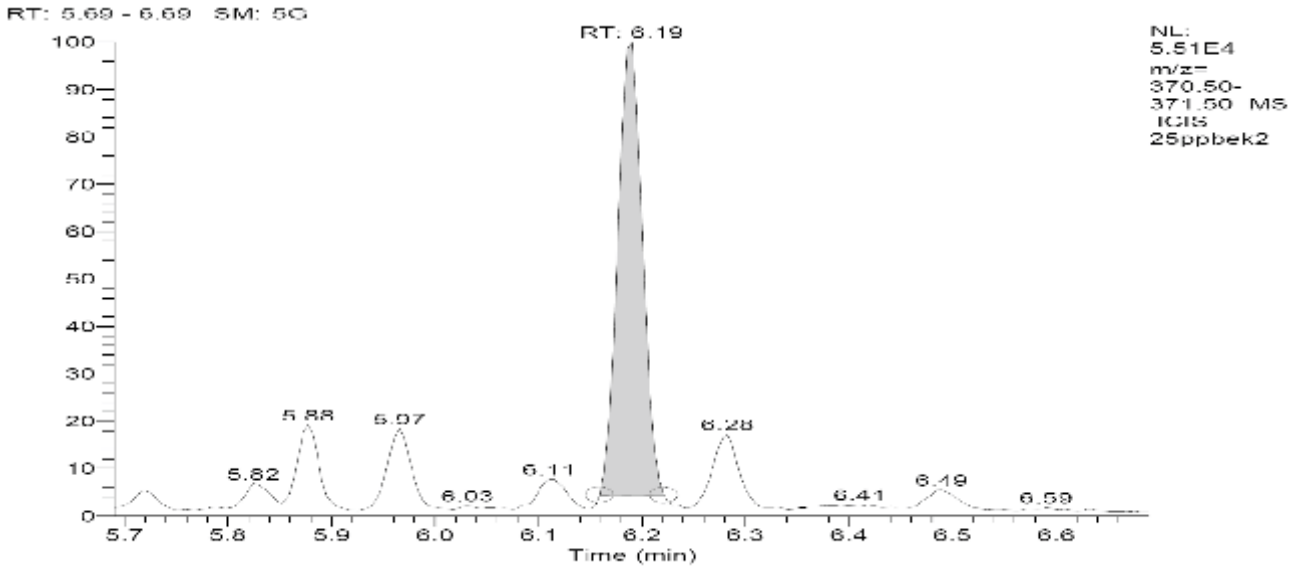
#### 3.2.4 Doğrusallık

Standart/internal standart (S/IS) alanlarına bakılarak elde edilen ortalama değerlere karşı derişim için elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3'de görülmektedir. Elde edilen veriler ışığında, 25  $\mu$ g/L ile 500  $\mu$ g/L arasındaki konsantrasyonlarda doğrusallık da araştırılmış bu konsantrasyonlar arasında kantitatif tayin yapılabilmesi için gerekli olan doğrusallığın var olduğu tespit edilmiştir ( $y=0.2026x+1.8245$ ,  $R^2=0.9968$ ).

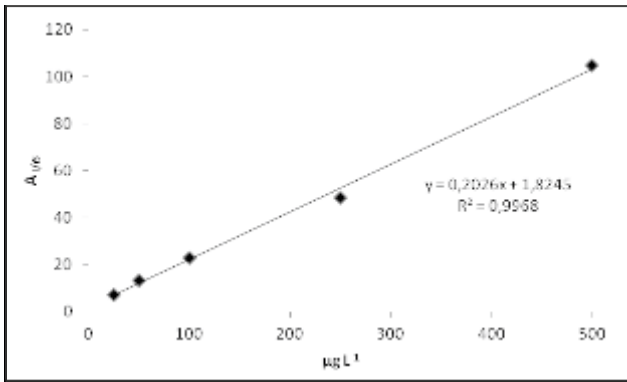


**Şekil 1.** Kör sentetik idrar örneğine ait kromatogram.





Şekil 2: 25 µg L<sup>-1</sup> olacak şekilde Δ<sup>9</sup>-THC-COOH standardı katılmış sentetik idrar örneğine ait kromatogram.



Şekil 3. Δ<sup>9</sup>-THC-COOH kalibrasyon eğrisi.

### 3.2.5 Tayin Alt Sınırı (LOD)

Yöntemin belirtme alt sınırı, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 3 katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 25 µg/L örneğin sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırılmış ve  $LOD = \frac{Std_c \cdot 3 \cdot B_n}{Std_s}$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Kör

Sinyal Gürültü Yüksekliği (2-3 dk aralık) ( $B_n$ ), en düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği ( $Std_s$ ), Standardın derişimi ( $Std_c$ )). Buna göre belirtme alt sınırı 2 µg/L olarak hesaplanmıştır. Buna ek olarak, Δ<sup>9</sup>-THC için elde edilen kromatogramlarda sinyal/gürültü (S/N) oranı 60 olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.6 Saptama Alt Sınırı (LOQ)

Yöntemin saptama alt sınırı, köre ait sinyallerin yüksekliklerinin 10 katının, ekim yapılmış en küçük derişim olan 25 µg/L örneğin sinyalinin yüksekliği ile karşılaştırılmış ve  $LOQ = \frac{Std_c \cdot 10 \cdot B_n}{Std_s}$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır

Kör Sinyal Gürültü Yüksekliği ( $B_n$ ), en düşük derişimdeki standardın sinyal yüksekliği ( $Std_s$ ), Standardın derişimi ( $Std_c$ )). Buna göre belirtme alt sınırı 5 µg/L olarak hesaplanmıştır.

### 3.3. SPE ve LLE Metodlarının Karşılaştırılması

SPE ve LLE metodlarının karşılaştırılması Minitab11 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Çalışmada, ekim yapılan seksen adet sentetik idrar örneğine iki farklı metod ile ekstraksiyon işlemi (LLE ve SPE) uygulanmıştır. Örneklem bağımlı olduğu için iki yöntemi karşılaştırmak için Paired-Samples t-test uygulanması planlanmıştır. Fakat bu testi uygulanabilmesi için örneklemelerin seçildiği kitlenin normal dağılması gerekmektedir. Bu nedenle SPE ve LLE verilerinin tanımlayıcı istatistikleri incelenmiş ve verilerin normal dağılıp dağılmadığını anlamak için Anderson-Darling Normallik testi uygulanmıştır. Anderson-Darling testinin sonucunda verilerin normal dağılmadığı gözlenmiştir. Kitlenin dağılımı normallik koşulunu sağlamadığı için iki yöntemin karşılaştırılmasında Paired-Samples t-test yerine bu testin non-parametrik karşılığı olan Wilcoxon signed-rank testi uygulanmasına karar verilmiştir. Wilcoxon signed-rank testi kitleden çekilen birbirine bağımlı iki örneklemin aynı dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için kullanılan parametrik olmayan testtir. Bu test ile bağımlı iki örneklem medyanı karşılaştırılır. Bu çalışmada hipotezler  $H_0: LLE = SPE$  ve  $H_1: LLE > SPE$  olarak belirlenmiştir. Wilcoxon signed-rank test sonuçlarına göre sıfır hipotezi ( $H_0$ ) red edilmiş (p value < 0.005), LLE yönteminin medyanının, SPE yönteminden daha büyük olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, LLE ve SPE yöntemleri arasında

=0.05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon olmak üzere iki farklı metod ile çalışılmış ve hazırlanan ekstraktlar %1 (TMCS) içeren (BSTFA) ile türevlendirilmiştir. Ölçümlerin tamamı GC/MS'de SIM modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yöntem geçerliliğin ispat etmek için tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık gibi validasyon parametreleri incelenmiş ve biyoanalitik yöntem validasyonu tamamlanmıştır. Validasyon çalışmalarında, kalibrasyon grafiklerinin üç veya daha fazla konsantrasyonda ikişer tekrarlı veya beş ya da daha fazla konsantrasyonda bir tekrarlı olarak hazırlanması ve bu grafiklerden elde edilen korelasyon katsayılarının ( $R^2$ ), 0.99'dan büyük olması istenmektedir (14). Denemelerimizde, bu amaçla 5 farklı konsantrasyonda üç tekrarlı olarak hem hazırlanan kalibrasyon grafiklerine ait denklemler ve korelasyon katsayıları, 0.99'dan büyük çıkmıştır. Böylece yöntemin kesinliği yani aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan tekrarlanabilirliği, analitik yöntem validasyonu için belirlenen kriterler dahilindedir. Aynı zamanda yöntem validasyonunda önerilen %RSD sınır değerleri düşük derişimler için  $\pm$  % 20, orta ve yüksek derişimler için ise 9 % 15 olarak bildirilmiştir [15,16]. Çalışmamızda gerçekleştirilen tüm aşamalarda %RSD değeri %10'nun altında bulunmuştur. Yöntemin seçiciliği;  $\Delta^9$ -THC-COOH'nin varlığının örnekte girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçülebilmesi ile belirlenmiştir. Seçicilik için kör kromatogramı ile  $\Delta^9$ -THC-COOH standart çözeltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogramlar kıyaslanmış ve  $\Delta^9$ -THC-COOH pikinin geldiği alıkonma zamanında çözücüden kaynaklanan bir girişim olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde idrar özütlерinden elde edilen  $\Delta^9$ -THC-COOH kromatogramında, idrarın kendisinden ve ekstraksiyon işlemlerinden gelen herhangi bir pik girişimi olmadığı da örneklerle aynı şekilde ekstrakte edilmiş kör idrar kromatogramı ile kıyaslanarak anlaşılmıştır (Şekil 1 ve 2). Doğruluk için kabul edilebilir kriter, nominal değerden  $\pm$  % 15'den fazla sapmanın olmamasıdır [15,16]. Çalışmamızda elde edilen geri kazanım değerlerinin % 90'nın üzerinde bulunmasıyla yöntemin doğruluğu ispatlanmıştır. Çalışmamızda en düşük tayin sınırı olarak (LOD) ve saptama alt sınırı (LOQ) sırasıyla 2  $\mu$ g/L ve 5  $\mu$ g/L olarak bulunmuştur. 25  $\mu$ g/L ile 500  $\mu$ g/L arasındaki konsantrasyonlarda doğrusalılık da araştırılmış bu konsantrasyonlar arasında kantitatif tayin yapılabilmesi için gerekli olan doğrusalığın var

olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Sonuçlar, yöntemin geniş bir aralıkta doğrusal cevap verdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada bulunan doğrusalılık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanılabilirlik değerleri, biyoanalitik validasyon kriterleri doğrultusunda kabul edilebilir düzeydedir.

İdrar örnekleri için GC/MS ve immunoassay yöntemleri kullanılarak elde edilen analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler ışığında bazik hidrolizin, asik hidrolize göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Tablo 3) Aynı zamanda, bazik hidrolizin asidik hidrolize göre daha kısa bir sürede gerçekleştirilmesi özellikle rutin analiz gerçekleştiren laboratuvarlarda önemli bir avantajdır.  $\Delta^9$ -THC-COOH asidik karakter göstermesinden ötürü kullanılan Toxi tube B sıvı faz kartuşu ile analitin çözünürlüğü artırılarak maddenin pKa değerine uygun olarak iyonize olmayacağı pH'da ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. SPE ve LLE metotlarının karşılaştırılması Minitab11 istatistik paket programı ile yapılmış ve elde edilen veriler ışığında LLE yönteminin medyanının, SPE yönteminden daha büyük olduğu belirlenmiş (p value<0.005), LLE ve SPE yöntemleri arasında =0.05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. SPE yönteminde solvent tüketimi az ve yöntemin kesinliği daha yüksek olmasına rağmen; az miktarda numune gerektiren, ekstraksiyon basamakları kolay ve kısa süreli olan, kantitatif çalışmalarda tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi de rutin analiz yapan ve örnek sayısı fazla olan laboratuvarlar için daha uygundur. Aynı zamanda SPE amacı ile kullanılan kartuşların maliyetinin çok yüksek olması sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin de tercih edilmesine neden olabilmektedir.

**Tablo 3.**  $\Delta^9$ -THC-COOH için asidik ve bazik hidroliz sonuçlarının karşılaştırılması (n=3).

Hidroliz Şekli	$\Delta^9$ -THC-COOH (Ekim)	$\Delta^9$ -THC-COOH (Buhulan)	% Geri Kazanım
Asidik	25 $\mu$ g/L	17.3 $\pm$ 1.2	69.0 $\pm$ 4.8
	100 $\mu$ g/L	47.4 $\pm$ 1.2	47.4 $\pm$ 1.2
Bazik	25 $\mu$ g/L	24.4 $\pm$ 1.4	97.6 $\pm$ 5.7
	100 $\mu$ g/L	99.5 $\pm$ 2.8	99.5 $\pm$ 2.8

ümüzde gelişen endüstriyel yenilikler doğrultusunda SPE yönteminin popülaritesi arttırmıştır. Ancak ülkemizde bu kartuşların üretiminin olmaması, yüksek maliyetli olması analiti ayırmak için uygun çözücünün seçilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Çalışmamızda elde edilen veriler adli toksikolojik laboratuvarlara sunulan SPE sistemlerine alternatif, düşük maliyetli, hızlı, etkin LLE yönteminin istatistiksel olarak SPE yönteminden başarılı

olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile LLE sistemlerinin de bu şekilde kullanıma hazır kartuşlar olarak üretilmesi konusunda çalışmalara öncelik verilmesi gerekliliği ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan çalışma ile toksikolojik analizlerde örnek hazırlama basamağının önemi gösterilmiştir.

#### Teşekkür

Proje ekibi, Tübitak 2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı desteğiyle yapılan bu çalışmada Tübitak'a verdiği destekten ötürü teşekkürlerini sunar.

#### Kaynaklar

1. Verstraete AG, Legrand SA, Vandam L, Hughes B, Griffiths P. Drug Use, Impaired Driving and Traffic Accidents. 2nd Edition. Lisbon, 2014:50-100.
2. Mule SJ, Casella GA. Confirmation of Marijuana, Cocaine, Morphine, Codeine, Amphetamine, Methamphetamine, Phencyclidine by GC/MS in Urine Following Immunoassay Screening, J. Anal. Toxicol. 1988;12(2):102-107.
3. Saito K, Saito R, Kikuchi Y, Iwasaki Y, Ito R, Nakazawa H. Analysis of drugs of abuse in biological specimens. J. Health Sci. 2011;57:472-487.
4. Akgür SA, Coşkunol H, editors. Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi. İzmir:Ege Üniversitesi Basımevi, 2014:211.
5. Moeller M, Kraemer T. Drugs of Abuse Monitoring in Blood for Control of Driving Under the Influence of Drugs. Ther Drug Monit. 2002;24(2):210-221.
6. Yavuz O, Aksoy A. Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 2006;20(3):259-264.
7. Raharjo TJ, Verpoorte R. Methods for the Analysis of Cannabinoids in Biological Materials: a Review. Phytochem Anal.2004;15:79-83.
8. Yedekci A, Onur E. Bağımlılık yapıcı ilaçlar ve tayin yöntemleri. Türk Klinik Biokimya Derg, 2010;8(3):125-130.
9. Huq S, Dixon A, Kelly K, Kallury KMR. Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy-9-tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis. J. Chrom. A. 2005;1073:355-361.
10. Robandt PV, Klette KL, Sibum M. Automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine specimens: application to a high-throughput urine analysis laboratory. J Anal Toxicol. 2009;33(8):456-460.
11. Strano-Rossi S, Bermejo AM, de la Torre X, Botrè F. Fast GC-MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine. Anal Bioanal Chem. 2011;399(4):1623-30.
12. Abraham TT, Lowe RH, Pirnay SO, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous GC-EI-MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline. J Anal Toxicol. 2007;31(8):477-485.
13. Kintz P, Mangin P, Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Forensic Sci. Int. 1995;73(2):93-100.
14. Tiryaki O. Pestisit kalıntı analizlerinde kalite kontrol (QC) ve kalite güvencesi (QA). Nobel yayın dağıtım, Ankara, 2011:91-107.
15. Causon R, Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. J. Chromatogr. B 1997; 689:175-180.
16. Peters FT, Maurer HH Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review [review]. Accred.Qual.Assur., 2002; 7:441-449.