

Cobas - Bio® Santrifügal Analizleme Geceri ile İdrarda Tetrahydrocannabinol Türevlerinin Belirtilmesi

SEVİL ATASOY^{a)}, NAZMİ ÖZER^{b)}

^{a)} İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı ve Adli Tıp Kurumu
Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi,
İstanbul, Türkiye

^{b)} Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,
Ankara, Türkiye

DETERMINATION OF URINARY TETRAHYDROCANNABINOL DERIVATIVES BY USE OF A COBAS - BIO® CENTRIFUGAL ANALYZER

Summary

Data on reproducibility, recovery, linearity and precision are given for the quantitative determination of cannabinoids in urine samples by an homogenous enzyme immunoassay (EMIT®) as adapted to the Cobas - Bio® centrifugal analyzer. The instrument was operated according to the usual protocol. The differences in absorbance (ΔA) were used to calculate the concentrations of cannabinoids by use of a five - parameter exponential curve model proposed by Cook and Wellington.

Optimum conditions for the assay were determined with the analyzer by changing the amount of the antibody - substrate and enzyme - drug used while keeping all other conditions constant. Increasing the antibody - substrate concentration decreased the sensitivity. If the concentration was decreased, nearly identical ΔA values for the 45.0, 50.0 and 60.0 ng/mL standarts were obtained. By increasing the enzyme - drug concentration, the sensitivity of the assay was increased, while a decrease in the sensitivity was observed, when diluted enzyme - drug solutions were used.

It is recommended to work with 1:12 diluted antibody - substrate and undiluted enzyme - drug throughout the assays. The diluted antibody - substrate reagent has to be prepared just before use.

Analytical recoveries ranged between 62 and 98% (average 79.9%, CV 14.3%), when 11-nor- Δ^8 -THC-9-carboxylic acid (THC-COOH) (ranging from 10.0 to 37.5 ng/mL) was added to urine samples containing 20.0, 30.0 or 50.0 ng/mL of the drug.

The standard curve could be extended from 20.0 to 100.0 ng/mL THC-COOH. Poor precision was obtained at concentrations higher than 75.0 ng/mL.

The within - run precision of the adaptation was determined for 14 replicate determinations of three samples. The between - run precision was evaluated during 5 days. The precisions (CV) ranged from 4.8 to 12.3% for 50.0 and 75.0 ng/mL THC-COOH concentrations.

The adaptation provided an inexpensive, quick and relatively effortless method with no false - positive results, which can be used for screening purposes, though the precision is somewhat poorer than the manual application.

Key words : *Cannabinoids - Enzyme immunoassay - Centrifugal analyzer*

Özet

İdrarda cannabinoid türevlerinin aranması için kullanılan EMIT® Cannabinoid Urine Assay kitinin tüm deney basamakları Cobas-Bio® santrifügal analizleme gerecine programlandı. Deneylerde kullanılması gereken antikor-substrat ve enzim derişimleri belirlendi. Standart eğrinin tekrarlanabilirliği ve doğrusal olduğu bölüm incelendi.

20.0, 30.0 ve 50.0 ng/mL derişimlerinde 11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid (THC-COOH) içeren idrar örneklerine belirli miktarlarda THC-COOH katılarak deneyin gerielde analizi yapıldı. Elde edilen bulgulara dayanarak, duyarlılık alt sınırının 20.0 ng/mL THC-COOH olduğu, 100 ng/mL'den fazla THC-COOH içeren idrarların seyretildikten sonra yeniden çalışılması gerektiği, yanlış pozitif sonuç alınmadığı ve deneyin, kısa zaman içerisinde fazla sayıda idrarda tarama (*screening*) amacıyla kullanılmaya elverişli olduğu sonucuna varıldı.

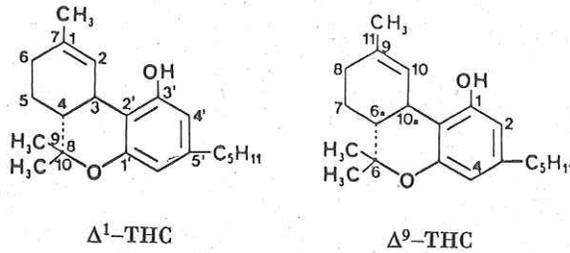
Esrar kullanımının yasaklandığı ülkelerde, şüpheli kişilerin adı geçen uyuşturucu maddeyi kullanıp kullanmadıklarının duyarlı ve güvenilir bir yöntemle belirlenmesi gerekir. Esrar, *cannabis sativa* bitkisinden elde edilir. Bitki, 400'ü aşkın kimyasal bileşigi içerir. Bunlardan 60 kadarı cannabinoid türevidir (1). Bitkinin başlıca psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC = Δ^1 -THC = 1, 3, 4a (10b), 9-hempantetraen-1-ol) (Şekil 1), solunum yolu ile alındığında, akciğerlerden emilime uğrar, dolaşıma geçtiğinde, plazma ve doku proteinlerine bağlanır.

Alınan cannabinoid'ler, akciğerde genellikle yan zincir hidroksillenmesine, karaciğerde ise siklohekzen halkasında hidroksillenmeye uğrarlar. İncelenen canlının türüne bağlı olarak, Δ^9 -THC'nin 35 kadar, cannabidiol ve cannabinol'ün ise 22 değişik ürüne dönüştüğü bilinmektedir (1, 3 - 7).

Δ^9 -THC'nin girdiği metabolik yolların başlıcaları : a) allilik ve alifatik hidroksillenme, b) metil gruplarının aldehid, keton ve asidlere yükseltgenmesi, c) yağ asidleri ve β -glukuronik asidle kenetlenme, d) çift bağların epoksidasyonudur. İnsan organizmasında, Δ^9 -THC'nin karaciğer tarafından

11-OH- Δ^9 -THC, 8,11-dihidroksi- Δ^9 -THC, 11-karboksilli ürünlere ve niteliği henüz belirlenmemiş bir dizi polar maddeye çevrildiği bilinmektedir. Gerek Δ^9 -THC, gerekse dönüşüm ürünleri, büyük ölçüde dışkıyla, daha az oranda idrarla organizmadan atılırlar (4-9).

Adli amaçlarla bir kişinin esrar kullanıp kullanmadığının kanıtlanmasında karşılaşılan iki sorun vardır: 1 - Şüpheli kişilerden kolaylıkla elde edilen materyal idrar olduğu hâlde, idrarla atılan cannabinoid'lerin az olması nedeniyle, duyarlılığı yüksek analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanımı gerekir. 2 - Yanlış pozitif değerlendirmeye yol açmayacak bir yöntem kullanılmalıdır.



Şekil 1. Tetrahydrocannabinol'ün kimyasal yapısı. Cannabinoid çekirdeği hempan olarak adlandırılırsa, IUPAC kuralları uygulandığında, Δ^9 -THC'nin adı 1,3,4a (10b), 9-hempantetraen-1-ol olur (2).

Biyolojik sıvılarda (kan, idrar, tükürük), tırnakda ve dişlerin arasından alınan örneklerde Δ^9 -THC ve dönüşüm ürünlerinin aranmasında başvurulan pek çok kimyasal yöntem bulunur. Başlıcaları :

- 1) Elektron yakalayıcı detektörlü gaz kromatografisi (ECD-GC) (10-14),
- 2) Alev iyonizasyon detektörlü gaz kromatografisi (FID-GC) (15, 16),
- 3) Gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) (17-20), 4) Likid kromatografisi (HPLC) (21-24), 5) HPLC-radioimmunoassay (25), 6) Radioimmunoassay (26-28), 7) Enzim immunoassay (28-30), 8) Fluorometri (31), 9) Dansilleme ve çift işaretleme (32) ile 10) İnce tabaka kromatografisidir (33-35).

Adı geçen yöntemler arasında, GC, HPLC, MS ve radioimmunoassay uygulamaları, cannabinoid'lere özgü, duyarlı ve güvenilirdir. Bununla birlikte,

ölçüme örnek hazırlaması uzun süren, teknik beceri ve deneyim gerektiren yöntemlerdir. Bu nedenle adli mercilere kısa zamanda rapor vermekle yükümlü, ayrıca şüpheli kişilerden alınan materyalde cannabinoid'lerin yanısıra kullanımı yasaklanan veya reçete ile satılan tüm uyutucu ve uyuşturucu maddeleri arayan lâboratuvarlar tarafından bir tarama (*screening*) yöntemi olarak kullanılmaya henüz elverişli değildir.

Enzim immunoassay prensibine dayanan EMIT® deneylerinin duyarlılık alt sınırı oldukça düşüktür. Ayrıca hızlı, güvenilir ve kolay bir şekilde idrarda cannabinoid türevlerinin belirlenmesine yararlar. Deneylerde, malat dehidrogenaz enzimi ile işaretli bir THC-türevi (11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid) kullanılır. Enzim işaretli türev, kendisine karşı oluşturulan antikörlere bağlandığında, malat dehidrogenaz etkinliğinde bir azalma görülür. Bu azalma NAD^+ 'nin NADH 'ya indirgenme hızıyla ölçülür.

İncelenen idrar örneğinde, serbest (endojen) THC-türevleri bulunduğu da, bu moleküllerle tepkime ortamına katılan enzim işaretli THC-türevleri antikora bağlanmak için yarışır. İdrardaki serbest (endojen) THC-türevleri ne kadar fazla ise, antikora bağlanmadan kalan enzim işaretli THC-türevi de o oranda fazladır. Buna bağlı olarak, malat dehidrogenaz etkinliğinde kontrollere göre artış izlenir. EMIT® Cannabinoid Urine Assay deneylerinin, Δ^9 -THC, 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilli asid ve 11-hidroksi Δ^9 -THC-9-karboksilli aside duyar olduğu (36); cannabinoid dışındaki herhangi bir kimyasal yapının, antikör ile etkileşim göstermediği, böylelikle girişim (*enterferans*) vermediği bildirilmektedir.

Deneyin başlıca sakıncası yarı kantitatif oluşudur. Kullanılan sarf malzemesinin fazlalığı nedeniyle, birim maliyeti diğer yöntemlerden yüksektir. 340 nm dalga boyunda ölçüm yapan ve küvetleri 30°C sıcaklıkta tutulan bir spektrofotometre ile buna bağlı bir yazıcı kullanılır. Bu yazıcının istenen zaman aralıklarındaki emilim değişimini kaydetmesi ve standart çözeltilerle karşılaştırmasını yapması gerekir.

Bulguları sunulan bu çalışma, EMIT® deneyinin yarı kantitatif şekilden kantitatif şekle dönüştürülmesi, kullanılan sarf maddelerinin azaltılarak birim maliyetin düşürülmesi ve kısa zamanda fazla sayıda idrar örneğinin çalışılabilmesi amacıyla yapıldı.

EMIT® uygulamasının tüm basamakları bir santrifügal analizleme gerecine programlandı. Kullanılması gereken antikör-substrat-enzim oranları belirlendi. Sonuçların tekrarlanabilirliği incelendi.

MATERYAL VE METOD

Deneylerin yapılşında *F. Hoffman - La Roche Co.* (Basel, İsviçre) tarafından üretilen Cobas Bio® santrifügal analizör'ün Version 8326 modeli kullanıldı.

Ayıracılar

EMIT® Cannabinoid Urine Assay ve Cannabinoid Calibrators kitleri *Syva Co., Palo Alto, CA 94303, A.B.D.* firmasından sağlandı. Kitlerde A ve B olarak tanımlanan 2 ayıracı, tampon çözelti ve kalibrasyonda kullanılacak standart çözeltiler bulunur.

A ayıracı, 0.15 mol/L glisin tamponu içinde (pH 5.0), THC-türevine karşı oluşturulan antikorları ve NAD⁺'yi içerir.

B ayıracında ise, 0.01 mol/L Tris-HCl tamponu içinde (pH 7.4), malat dehidrogenaza kimyasal olarak kenetli THC-türevi yer alır.

Liyofilize şekilde pazarlanan A ve B ayıracılarının birincisi 6 mL ikincisi 8 mL destile su ile çözüldü.

Bu çözeltiler 4 saat oda sıcaklığında tutulduktan sonra deneylerde kullanıldı.

Kitlerde bulunan 1.5 mol/L malat-Tris tamponu (pH 8.9) 120 mL destile su ile seyreltildi.

Cannabinoid Calibrators kitinde, *negativ, low* ve *medium* olarak tanımlanan üç örnek bulunmaktadır. Liyofilize şekilde pazarlanan örnekler 3 mL destile su ile çözüldü. Böylelikle idrar içerisinde hazırlanmış 20.0 ng/mL derişiminde 11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid standartları elde edildi. Üçüncü örnek kontrol idrarı olarak kullanıldı. Bu standart çözeltiler uygun oranda birbiriyle karıştırılarak, 45.0, 50.0 ve 60 ng/mL derişiminde örnekler hazırlandı.

Deneylerin Yapılışı

Cobas Bio® santrifügal analizörü Tablo 1'de bildirildiği şekilde programlandı. Standart çözeltiler ve kontrol idrarları, gerecin taşıyıcı bölümündeki plâstik tüplere dağıtıldı. 30 plâstik küveti içeren rotor halkası yerine takıldı. İstenen oranda tamponla seyreltilen A ayıracı *Reagent* bölümüne, B ayıracı ise *Start Reagent* bölümüne aktarıldı. *Start* düğmesine basıldı.

Pipetleme, inkübasyon, 340 nm dalga boyunda emilimin okunması ve elde edilen verilerin bir formüle göre hesaplanarak yazılış gereç tarafından mekanize bir şekilde sağlanmaktadır.

Analiz tipinin 7.3 olarak programlanması ile (Tablo 1, parametre 8), 20 μ L idrar örneği üzerine 260 μ L A ayıracı-tampon çözelti karışımının katılması sağladı.

Bu ortama 20 μ L B ayıracının pipetlenmesinden sonra 10 saniye aralıklarla 5 kez 340 nm dalga boyunda okunarak elde edilen $\Delta A/dak$ değerleri *Cook-Wellington* bağıntısına göre hesaplatıldı.

Bu hesaplamalarda kullanılan denklem, lineer olmayan enzim kinetik modelleri için geliştirilmiştir (37).

Tablo 1. Cobas - Bio® santrifügal analizleme gereci ile idrarda cannabinoid türlerinin aranmasında kullanılan program.

1 UNITS	ng/mL
2 CALCULATION FACTOR	2667
3 STANDART 1 CONC	.0
3 STANDART 2 CONC	20
3 STANDART 3 CONC	45
3 STANDART 4 CONC	50
3 STANDART 5 CONC	60
3 STANDART 6 CONC	75
6 LIMIT	0
7 TEMPERATURE (DEG. C)	37.0
8 TYPE OF ANALYSIS	7.3
9 WAVELENGTH (NM)	340
10 SAMPLE VOLUME (µL)	20
11 DILUENT VOLUME (µL)	20
12 REAGENT VOLUME (µL)	260
13 INCUBATION TIME (SEC)	10
14 START REAGENT VOLUME (µL)	20
15 TIME OF FIRST READING (SEC)	5.0
16 TIME INTERVAL (SEC)	10
17 NUMBER OF READINGS	5
18 BLANKING MODE	0
19 PRINTOUT MODE	1

EMIT® deneylerinde elde edilen emilim değerlerinin düzeltilmesi için önerilen bu denklem

$$R = R_0 + K \exp \{ a \ln C + b (\ln C)^2 + c (\ln C)^3 \}$$

şeklindedir. Buna göre :

R = Emilim değişim hızı

C = Kullanılan standart çözeltinin derişimi

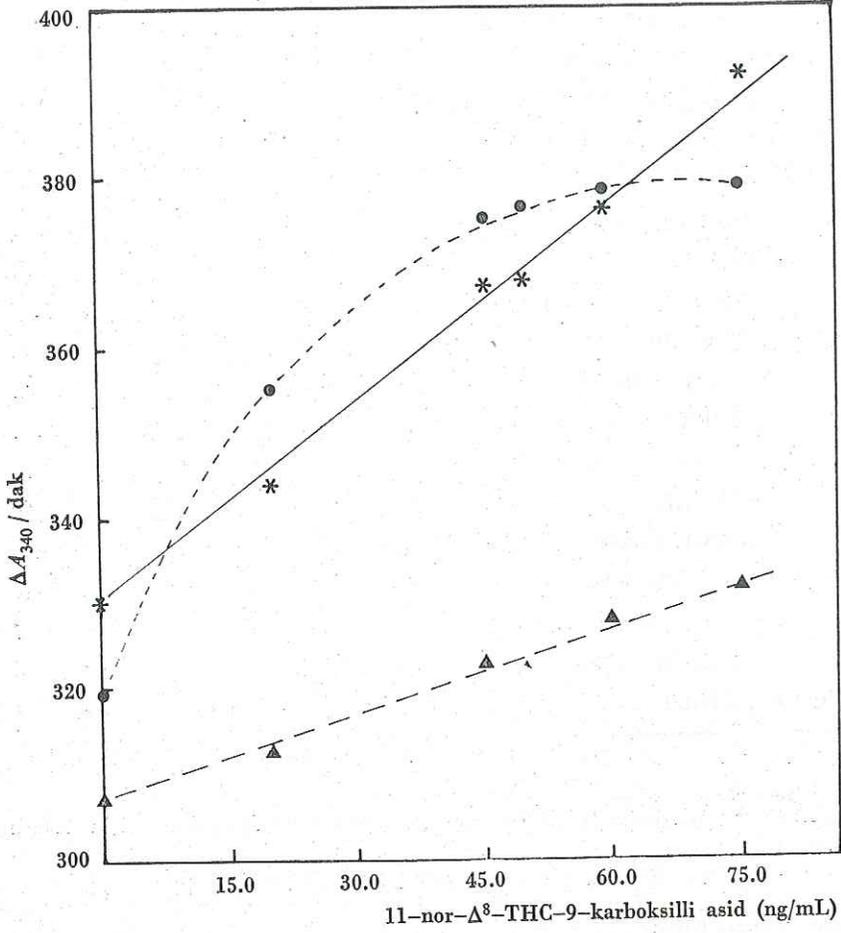
R₀ = 0.0 ng/mL derişimindeki standart çözeltinin emilim derişimi

K, a, b, c = Eğrinin *doğrusal* şekle dönüştürülmesi için belirlenen katsayılarıdır.

BULGULAR VE SONUÇ

Standart Eğri Çiziminde Kullanılacak Antikor - Substrat / Enzim Oranlarının Belirlenmesi

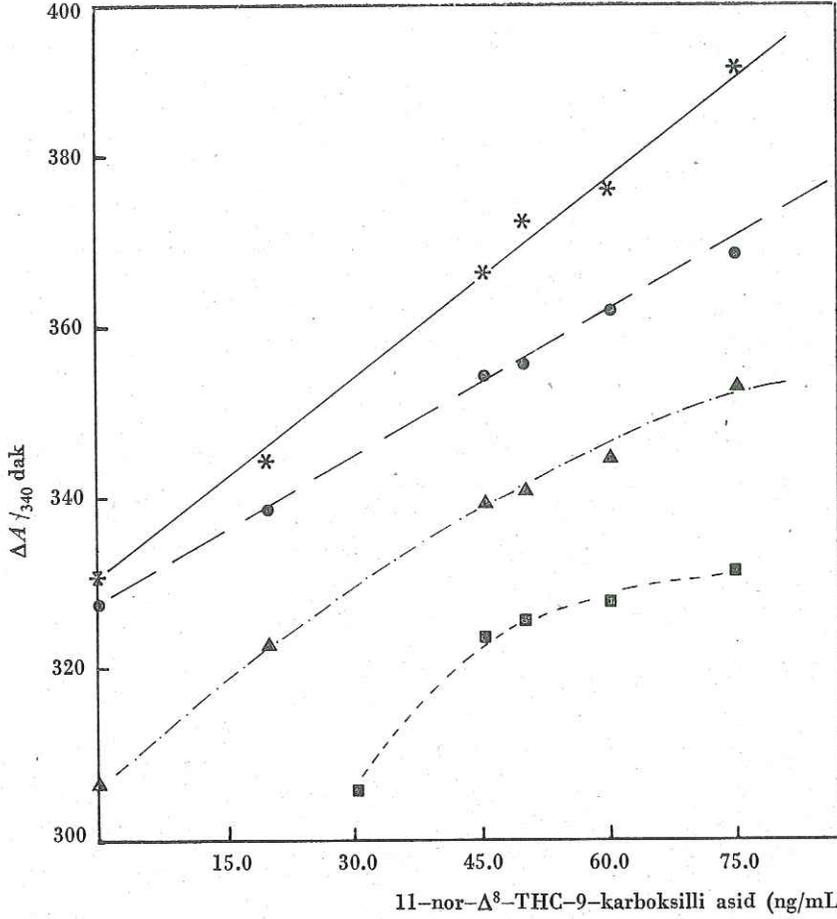
A ayracı 0.4 mol/L malat-Tris tamponu ile 1 : 2.5, 1 : 12 ve 1 : 20 oranlarında seyreltildi. Böylelikle üç ayrı derişimde antikor-substrat çözeltisi elde



Şekil 2. Cobas-Bio® santrifügal analizleme gereğinde kullanılacak antikor-substrat derişiminin belirlenmesi. Antikor çözeltisinin Tris-malat tamponu ile 1 : 2.5 (Δ - Δ), 1 : 12 (*-*) ve 1 : 20 (\bullet - \bullet) oranlarında seyreltilmesiyle çizilen standart eğriler. Deney koşulları Materyal ve Metod bölümünde belirtildiği gibidir.

edildi. Malat dehidrogenaz işaretli THC-türevi (B ayıracı) tampon ile seyreltilmeden kullanıldı. 0.0-75.0 ng/mL arasında standart çözeltilerden yararlanılarak deneyler yapıldı.

En uygun antikor-substrat derişiminin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmanın sonuçları Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 3. Cobas-Bio® santrifügal analizleme gerecinde kullanılacak enzim işaretli THC-türevi derişiminin belirlenmesi.

Enzim işaretli THC-türevi (B ayıracı) seyreltilmeden (* - *), 1 : 2.5 (● - ●), 1 : 12 (▲ - ▲) ve 1 : 20 (■ - ■) oranlarında Tris-malat tamponu ile seyreltilerek kullanıldı. Standart eğrilerin çiziminde uygulanan yöntemler Materyal ve Metod bölümünde bildirilmiştir.

Antikor-substrat oranı yükseltildiğinde (1 : 2.5 seyreltme), deney duyarlılığının azaldığı görüldü. Ortamdaki enzim işaretli THC-türevi düzeyinin yeterli olmayışı nedeniyle duyarlılığın azaldığı sonucuna varıldı.

Öte yandan 1 : 20 oranında seyreltme ile hazırlanan antikor-substrat çözeltisi kullanıldığında, standart eğrinin doğrusallığını kaybettiği görüldü. Bu sapmaya, substrat eksikliğinin veya antikor bağlanma bölgelerinin azlığının yol açtığı sonucuna varıldı.

Daha sonra aynı deneyler, 0.4 mol/L malat-Tris tamponu ile 1 : 12 oranında seyreltilen antikor-substrat çözeltisi ve üç ayrı oranda seyreltilen enzim işaretli THC-türevi çözeltisi ile tekrarlandı.

Hangi oranda olursa olsun, seyreltilerek kullanılan enzim işaretli THC -türevi çözeltileri deney duyarlılığında azalmaya neden oldu (Şekil 3). Daha sonra yapılan tüm deneylerde, antikor-substrat çözeltisi tamponla 1 : 12 oranında seyreltilerek, enzim işaretli THC-türevi çözeltisi ise tamponla seyreltilmeden kullanıldı.

Bildirilen koşullarda elde edilen standart eğri ile ilgili tüm parametreler santrifügal analizörün belleğine yazdırıldı. Bu çalışmalar sırasında elde edilen standart eğrilerden biri Şekil 4'te gösterilmiştir. Eğri ile ilgili katsayıları kullanarak iki idrar örneğinde cannabinoid aranmasına ilişkin bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.

Standart Eğrinin Tekrarlanabilirliği

Antikor-substrat çözeltisi her çalışmanın başında tampon ile 1 : 12 oranında seyreltilerek 6 kez standart eğri hazırlandı. Daha sonra tamponla 1 : 12 oranında seyreltilen antikor-substrat çözeltisi oda sıcaklığında 10, 20 ve 30 dakika bekletildikten sonra aynı deneyler tekrarlandı.

Her bir THC-türevi derişimi için bekletilen ve bekletilmeden kullanılan antikor-substrat çözeltisi ile elde edilen değerlerin aritmetik ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayıları (CV) Tablo 3'te birarada sunulmuştur. Bu bulgulara dayanarak, antikor-substrat çözeltisinin her çalışmadan hemen önce tamponla seyreltilmesi ve bekletilmeden çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

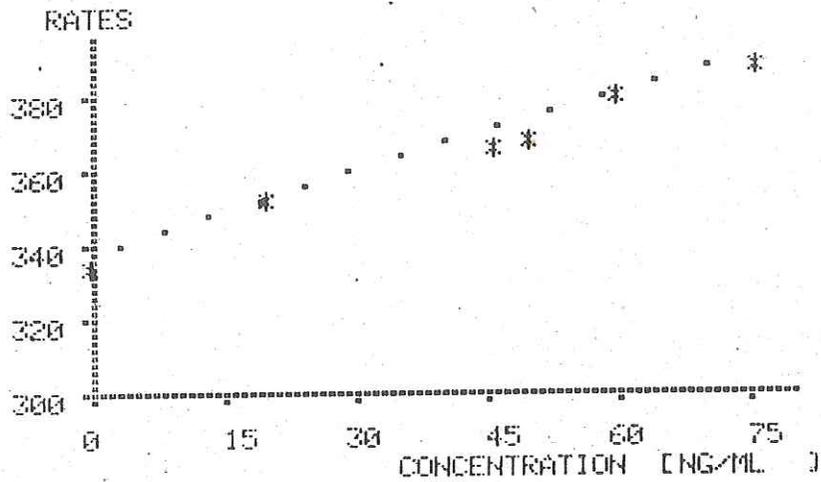
DENS-PLOTTING

DENS MODEL 1

NR.OF STD = 6
STD.DEV. = 3.81

CURVE PARAMETERS

RO 336.6818
KC 438.0091
A -6.2357
B .9913



DATE 840320 TIME 16³⁰ TECH. A7 A807

Şekil 4. Cobas-Bio® santrifügal analizleme gereci ile elde edilen bir standart eğri.

Tablo 2. Cobas - Bio® santrifügal analizleme gereci ile idrarda cannabinoid aranması.

TEST NR	23	+CANNABIS #	COBAS BIO
1	UNITS		NG/ML
2	CALCULATION FACTOR		2667
3	STANDARD 1 CONC		0
3	STANDARD 2 CONC		20
3	STANDARD 3 CONC		45
3	STANDARD 4 CONC		50
3	STANDARD 5 CONC		60
3	STANDARD 6 CONC		75
6	LIMIT		0
7	TEMPERATURE [DEG.C]		37.0
8	TYPE OF ANALYSIS		7.3
19	PRINTOUT MODE		1
DENS MODEL 1		NR. OF STD =	6
		STD. DEV =	3.81
CURVE PARAMETERS			
RO	336.6818		
KC	438.0091		
A	-6.2357		
B	.9913		
MAX. NO. OF ITERATIONS			
STD	RATES	DEVIATIONS	
ST-1	336.03	-.65	
ST-2	355.60	2.82	
ST-3	368.89	-2.19	
ST-4	371.43	-3.12	
ST-5	383.54	2.26	
ST-6	391.89	.93	
SAMPLE	VALUES	REMARKS	
03-06	37.02		
03-07	51.00		
DATE:..... TIME:..... TECH:.....			

Tablo 3. EMIT® yönteminin Cobas-Bio® santrifügal analizleme gereci ile uygulanmasının tekrarlanabilirliği.

Antikor-substrat çözeltisi tampon ile seyreltikten *hemen sonra* kullanıldı. Deney koşulları Materyal ve Metod bölümünde bildirildiği gibidir.

11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid (ng/mL)					
(n = 6)					
	0.0	20.0	45.0	50.0	75.0
Ortalama, ng/mL	2.8	23.9	40.3	48.6	75.0
SD, ng/mL	1.5	4.3	3.9	4.3	4.4
CV, %	53.5	18.0	12.7	0.9	5.9

Antikor-substrat çözeltisi tampon ile seyreltikten ve oda sıcaklığında *10 dakika bekletildikten sonra* kullanıldı.

Ortalama, ng/mL	3.02	19.9	44.7	50.9	74.6
SD, ng/mL	2.03	1.09	2.2	1.5	3.3
CV, %	67.2	5.4	4.8	3.0	4.5

Antikor-substrat çözeltisi tampon ile seyreltikten ve oda sıcaklığında *20 dakika bekletildikten sonra* kullanıldı.

Ortalama, ng/mL	4.47	18.9	47.0	52.5	75.1
SD, ng/mL	2.3	5.7	5.6	3.4	5.6
CV, %	51.45	29.8	22.8	6.1	7.4

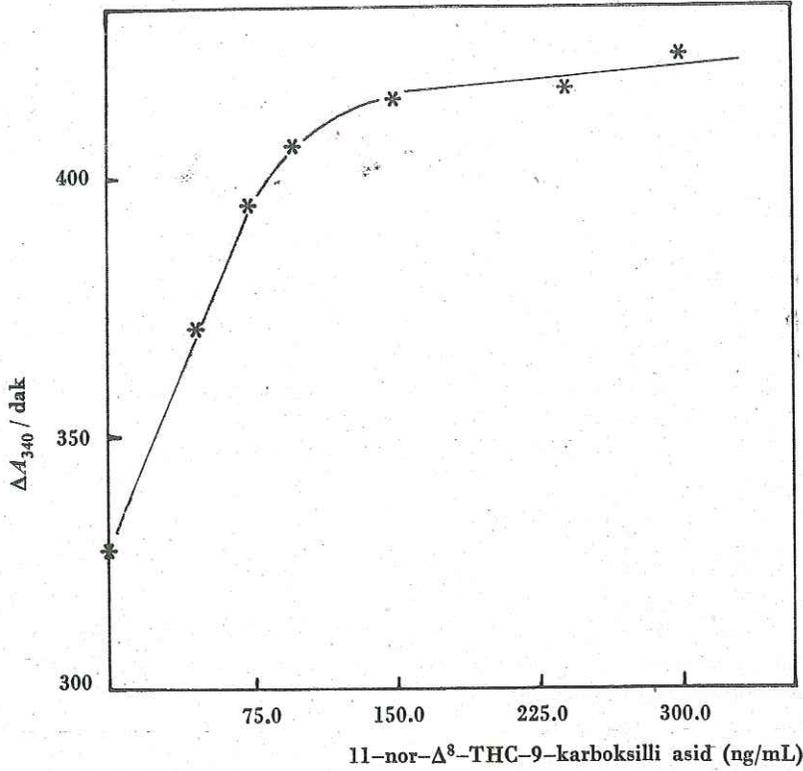
Antikor-substrat çözeltisi tampon ile seyreltikten ve oda sıcaklığında *30 dakika bekletildikten sonra* kullanıldı.

Ortalama, ng/mL	7.22	22.1	51.6	55.2	80.9
SD, ng/mL	2.57	4.2	6.7	2.0	3.3
CV, %	35.5	19.1	13.0	3.6	4.0

Doğrusallık

Deneyin doğrusallığını belirlemek amacıyla 50.0–300.0 ng/mL derişimleri arasında 11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid içeren idrar örnekleri hazırlandı. Bu amaçla cannabinoid kalibratörlerinden *medium* olarak pazarlanan örnek 1.0 mL destile suda çözüldü ve 300.0 ng/mL derişimli standart elde edildi. Bu stok çözeltilinin uygun oranda seyreltilmesiyle diğer örnekler hazırlandı.

Şekil 5'te görüldüğü gibi, 100 ng/mL'den sonra doğrusallıktan sapma izlendi. Bu verilere dayanarak 75 ng/mL'den yüksek derişimlerde THC-türevi içerdüğü belirlenen idrar örneklerinin, seyreltikten sonra yeniden çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.



Şekil 5. 11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid standart eğrisinin doğrusallık analizi. Antikor-substrat çözeltilisi tampon ile 1 : 12 oranında seyreltilerek, enzim işaretli THC-türevi çözeltilisi seyreltilmeden kullanıldı. 340 nm dalga boyundaki $\Delta A/\text{dak}$ değerleri Cook-Wellington bağıntısına göre düzeltildi.

Geri-elde

20.0, 30.0 ve 50.0 ng/mL derişiminde THC-türevi içeren idrar örnekleri üzerine bilinen miktarlarda aynı türevden eklendi. Tablo 4'te gösterildiği gibi gerielde yüzdesi ortalama 79.9 olup, bu değer 62 ile 98 arasında değişmektedir.

Tablo 4. Cobas-Bio® santrifügal analizleme gereci ile uygulanan EMIT® yönteminin gerielde analizi.

Ortamda bulunan	11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid		
	Ortamda katılan	Gerielde edilen	Gerielde %
	<i>ng/mL</i>		
20.0	10.0	6.5	65
20.0	15.0	10.4	69
20.0	20.7	14.4	72
20.0	24.8	21.8	87
30.0	15.0	9.3	62
30.0	22.5	19.1	85
30.0	30.2	27.9	93
30.0	37.5	36.7	98
50.0	12.5	9.4	75
50.0	16.7	13.0	78
50.0	20.8	17.5	84
50.0	22.7	20.7	91
		Ortalama, %	79.9
		SD, %	11.5
		CV, %	14.3

Bu verilere göre, 20.0 ng/mL ile 30 ng/mL arasında THC-türevi içeren idrarların yanlış negatif olarak değerlendirilmesi mümkündür. Öte yandan yanlış pozitif değerlendirme söz konusu değildir.

Örneklerin Gün-içi ve Günler-arası Tekrarlanabilirliği

a) 20.0, 50.0 ve 75.0 ng/mL derişiminde 11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid içeren idrar örnekleri aynı gün ardarda 14 kez çalışıldı. Bu amaçla gercin örnek tüplerinden ilk 14'üne aynı standart çözelti dağıtıldı ve daha önce belirtilen program uygulandı.

b) Aynı derişimdeki standart çözeltiler birer gün ara ile 5 kez çalışıldı. Bu amaçla her deney uygulanışında gercin 1. tüpüne 20.0 ng/mL, 2. tüpüne 50.0 ng/ml ve 3. tüpüne 75.0 ng/mL madde içeren standart çözeltiler dağıtıldı.

20.0 ng/mL derişimindeki standartla gerek aynı gün, gerekse farklı günlerde elde edilen değerlerin standart sapması oldukça fazladır (Tablo 5).

Tablo 5. Cobas-Bio® santrifügal analizleme gerci ile uygulanan EMIT® yönteminin gün-içi (*within-run*) ve günler-arası (*between-run*) tekrarlanabilirlik analizi.

Gün-içi tekrarlanabilirlik (n = 14)			
11-nor- Δ^8 -THC-9-karboksilli asid (ng/mL)			
	20.0	50.0	75.0
Ortalama, ng/mL	17.8	48.4	72.05
SD, ng/mL	6.5	4.1	3.5
CV, %	36.5	8.4	4.8
Günler-arası tekrarlanabilirlik (n = 5)			
Ortalama, ng/mL	17.6	46.4	72.5
SD, ng/mL	3.3	5.7	4.2
CV, %	18.6	12.3	5.8

Bu nedenle 20.0-50.0 ng/mL arasındaki değerlerle karşılaşıldığında, aynı idrar örneğinin ardarda en az 3 kez çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

TEŞEKKÜR

Cobas-Bio® santrifügal analizleme gercinin deneylerde kullanılmasını sağlayan Teka Teknik Cihazlar Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1 — Turner, C.E. (1980) *Marihuana Research Findings: National Institute on Drug Abuse, Rockville, MD*, pp. 81 - 97.
- 2 — Schoenfeld, R. (1980) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **20**, 65 - 68.
- 3 — Lemberger, L., Rubin, A. (1976) *Life Sci.*, **17**, 1637 - 1642.
- 4 — Lemberger, L. (1978) *Adv. Pharmacol. Chemotherap.*, **10**, 221 - 225.
- 5 — Harvey, D.J., Martin, P.R., Paton, W.D.M. (1978) *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 495-497.
- 6 — Harvey, D.J., Paton, W.D.M. (1978) *Res. Commun. Chem., Pathol. Pharmacol.*, **21**, 435 - 436.
- 7 — Yisak, W.S., Agurell, S., Lindgren, J.E., Widman, M. (1978) *J. Pharm. Pharmacol.*, **30**, 462 - 463.
- 8 — Lemberger, L., Crabtree, R.E., Rowe, H.M. (1972) *Science*, **177**, 62 - 64.
- 9 — Lemberger, L., Martz, R., Rodda, B., Forney, K., Rowe, H. (1973) *J. Clin. Invest.*, **52**, 2411 - 2417.
- 10 — Fenimore, D.C., Freeman, R.R., Loy, P.R. (1973) *Anal. Chem.*, **45**, 2331 - 2335.
- 11 — Garrett, E.R., Hunt, C.A. (1973) *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1211 - 1214.
- 12 — Garrett, E.R., Hunt, C.A. (1977) *J. Pharm. Sci.*, **66**, 20.
- 13 — Backmann, E.W., Hofmann, A.A., Waser, P.G. (1979) *J. Chromatogr.* **178**, 30 - 32.
- 14 — Schou, J., Steentoft, A., Worm, K., Anderson, J.M., Nielsen, E. (1971) *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 480 - 486.
- 15 — Whiting, J.D., Manders, W.M. (1982) *J. Anal. Toxicol.*, **6**, 49 - 52.
- 16 — McCallum, N.K., Cairns, E.R., Ferry, D.G., Wong, R.J. (1978) *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 89 - 93.
- 17 — Harvey, D.J., Leuschner, J.T.A., Paton, W.D.M. (1980) *J. Chromatogr.* **202**, 83 - 92.
- 18 — Foltz, R.L., Clarke, P.A., Hidy, B.J., Lin, D.C.K., Graffeo, A.P., Petersen, B.A. (1979) *Cannabinoid Analysis, American Chemical Society Series*, **98**, 39 - 57.
- 19 — Bergman, R.A., Lukaszewski, T., Wang, S.Y.S. (1981) *J. Anal. Toxicol.* **5**, 85 - 89.
- 20 — Rosenthal, S., Harvey, T.M., Bussey, J.T., Brine, D.R., Wall, M.E. (1978) *Biomed. Mass Spectr.*, **5**, 312 - 317.
- 21 — Schermann, J.M., Hoellinger, H., Sonnier, M., Hoffelt, J., Nam, N.H. (1980) *J. Chromatogr.*, **196**, 324 - 346.
- 22 — Borys, H.K., Karler, R. (1981) *J. Chromatogr.*, **205**, 303 - 323.
- 23 — Elshohly, M.A. (1983) *J. Anal. Toxicol.*, **7**, 262 - 264.
- 24 — Valentine, J.L., Bryant, P.J., Gutshall, P.L., Gan, O.H.M., Niu, H.C. (1979) *Anal. Letters*, **12(B8)**, 867 - 880.
- 25 — Williams, P.L., Moffat, A.C., King, L.J. (1978) *J. Chromatogr.*, **155**, 273 - 283.

- 26 — Gross, S.J., Soares, J.R. (1978) *J. Anal. Toxicol.*, 2, 98 - 100.
- 27 — Law, B. (1984) *J. Forensic Sci. Soc.* 24, 152.
- 28 — Rodgers, S., Crowl, C.P., Eimstad, W.H., Hu, M.W., Kam, J.K., Ronald, R.C., Rowley, G.L., Ullman, E.F. (1978) *Clin. Chem.*, 24, 95 - 100.
- 29 — Rowley, G.L., Armstrong, T.A., Crowl, C.P. (1976) *Cannabinoid Assays in Humans* (R.E. Willette ed.) NIDA Research Monograph 7, pp. 28 - 32.
- 30 — Bastiani, R.J. (1979) *Antibiot. Chemother.*, 26, 89 - 97.
- 31 — Just, W.W., Werner, G., Weichmann, M. (1972) *Arch. Pharmacol.*, 274, R60.
- 32 — Scherrman, J.M., Hoellinger, H., Nam, N.H., Bourdon, R., Fournier, E. (1977) *Clin. Chim. Acta*, 79, 401 - 409.
- 33 — Vivison, J.A., Patel, D.D., Patel, A.H. (1977) *Anal. Chem.*, 49, 163 - 165.
- 34 — Kanter, S.L., Holloster, L.E., Moore, F., Green, D.E. (1974) *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 7, 79 - 84.
- 35 — Machata, G. (1984) Kişisel görüşme.
- 36 — Cannabinoid Urine Assay, EMIT-d.a.u. (1983) Syva Co. Palo Alto. CA.
- 37 — Cook, R., Wellington, D. (1980) Data Handling for EMIT Assays, Syva Co. Palo Plato, CA.