نکات قابل‌توجه در انجام آزمایش

❋ اگر رزین دارای فضای خالی است:

ایجاد فضای خالی در قسمت رزین ستون، در استخراج اثر منفی دارد. قبل از عمل استخراج توسط پمپ خلاء، فضا را از بین ببرید و پنبه را با میله همزن روی رزین به ملایمت فشار دهید.

❋ اگر نمونه ادرار مورد آزمایش رسوب دارد:

در مواردی که نمونه مورد آزمایش دارای رسـوب زیادی باشـد، بهتر است از نکان دادن و مخلوط کردن آن خودداری کنید و نمونه را سانتریفیوژ کرده و قسمت رویی و شفاف آن را به‌کار ببرید. در مورد نمونه‌های شفاف به‌طور معمولی عمل کنید. رسـوب زیاد باعث تغییر زمان در استخراج شده و گاهی اثر نامطلوب بجا می‌گذارد.

❋ خشک بودن ستون مهم است:

در مرحله خشک شدن ستون دقت کافی بخرج دهید.

❋ لکه ظاهر نمی‌شود:

در اسـتخراج الکلی عمل تبخیر تا مرحله خشک شدن مهم است زیرا وجود آب در نمونه از ظهور لکه جلوگیری می‌کند.

❋ نقش درجه خلوص الکل در لکه‌گذاری:

الکلی که جهت لکه‌گذاری به باقی‌مانده خشـک شده اضافه می‌شود، باید الکل خالص و بدون آلودگی با آب باشد.

❋ اهمیت حرارت دادن پلیت پیش از لکه‌گذاری و روش‌های آن:

پلیت را قبل از لکه‌گذاری حتماً روی حرارت ۸۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه فعال کنید. هات‌پلیت بهوسـیله درجه تنظیم می‌شـود. اگر بخواهید از حرارت مشـوار استفاده کنید سشوار را در ۲۵ سانتی‌متری پلیت و روی حرارت کم و ضعیف آن به مدت ۴ تا ۵ دقیقه تنظیم کنید. اگر پلیت خوب حرارت داده نشود، لکه‌های دیرتر ظاهر می‌شوند و پلیت سیاه می‌شود.

❋ نقش ظرافت و حرارت در لکه‌گذاری:

عمل لکه‌گذاری متمرکز و با دقت انجام گیرد. دما به‌هنگام لکه‌گذاری

حدوداً ۸۰ درجه سـانتی‌گراد باشـد. سـعی کنید به هنگام لکه‌گذاری پلیت سوراخ نشود.

❋ اهمیت آماده بودن فاز در تانک:

فـاز را حتمـاً ۳۰ تا ۴۵ دقیقه زودتر از اینکه پلیت را در آن قرار دهید، تهیه نمایید تا به‌طور کامل اشباع شود.

❋ نقش مخرب آب در حلال‌ها:

حلال‌هایی که در فاز به‌کار می‌رود، باید عاری از آب باشد. در صورت وجود آب در فاز بالا رونده، لکه‌ها از مسیر خود منحرف می‌شوند.

❋ از حرارت دادن فاز خودداری کنید:

زیرا حرارت فاز سـبب جابجایی لکه روی پلیت می‌شـود ضمناً درب تانـک را هنگامی کـه فاز داخل آن قرار دارد باز نکنید. زیرا فضای اشـباع تانک از بین می‌رود، بنابراین فقط هنگام داخل کردن و خارج کردن پلیت‌ها از تانک درب آن را باز کنید.

❋ فقط پس از خشک شدن کامل پلیت آن را اسپری کنید:

پس از بیرون آوردن، خشک شدن، حرارت دادن و سپس خنک شدن پلیت، عمل اسپری کردن را انجام دهید.

❋ نقش بقایای آمونیاک در رنگ‌آمیزی لکه:

اگر بقایای آمونیاک بر روی پلیت جامانده باشد. پس از پاشیدن معرف روی پلیت، رنگ سفید آن مایل به زرد می‌شود.

❋ تخلیه ستون‌ها همزمان باشد:

در صورت دیر تخلیه شدن ستونی نسبت به سایر ستون‌ها، ستون مذکور را کنار گذاشته و کار بقیه ستون‌ها را به اتمام رسانده و سپس عملیات مربوط به ستون فوق را جداگانه انجام دهید.

نکات قابل‌توجه در نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از موارد بسیار مهم در آزمایشگاه‌های تشخیص موادمخدر می‌باشد که نکات زیر در مورد آن قابل‌توجه است.

❋ تقلب در نمونه‌گیری که باعث ایجاد پاسخ منفی کاذب می‌شود:

◁ تعویض نمونه با نمونه دیگر (Substitution):
جایه‌جا کـردن نمونه با نمونه بدون آلکالوئیدهای تریاک موجب ارائه نتیجه آزمایش نادرست می‌شود.

◁ افزودن مواد خارجی (Adultreration) :
افزودن مواد خارجی، صابـون، پاک‌کننده‌های خانگی، جوهرلیمو و... موجب ارائه پاسخ نادرست می‌شود.

◁ رقیق کردن نمونه (Dilution) :
رقیق کردن نمونه باعث کاهش غلظت دارو به حدی می‌شـود که قابل تشخیص نباشد.

◁ خوردن آب‌لیمو، سرکه، ویتامین C :
این عمل به‌منظور افزایش سـرعت دفـع آلکالوئیدهای تریاک از بدن انجام می‌شود.

❋ روش‌های جلوگیری از تقلب:

◁ نمونه‌گیری به‌صورت حضوری انجام شود.
◁ کارت شناسایی عکس‌دار و یا معرفی‌نامه عکس‌دار برای جایگزینی فردی با فرد دیگر.
◁ شسـتن دست‌ها قبل از نمونه‌گیری به‌منظور آلودگی احتمالی است به موادی که موجب اختلال در نتیجه آزمایش می‌شود.
◁ اندازه‌گیری دمای نمونه تا ۴ دقیقه بعد از نمونه‌گیری.
این دما باید بین ۳۳ تا ۳۷ درجه سـانتی‌گراد باشد. در غیر این‌صورت می‌تواند دلیلی بر رقیق‌سازی نمونه باشد.
◁ تا زمان انجام آزمایش، نمونه در محلی امن که قابل دسترسی برای همگان نباشد، نگهداری شود. (نمونه مهر و موم شود).

❋ بعد از نمونه‌گیری:

◁ رنگ، شـفافیت، وزن مخصوص و PH نمونه بررسـی شـود. اگر مشکوک به تقلب است دوباره نمونه‌گیری شود.
◁ وزن مخصوص نمونه ادرار gr/ml ۱/۰۰۴ – ۱/۰۰۲ باشد.
◁ PH نمونه در محدوده ۸/۵ – ۴/۵ باشد.
◁ مواد نگهدارنده به نمونه اضافه نشود.

◁ نمونه مُهر و موم شود. (قابل دسترسی برای همگان نباشد).

❋ نگهداری نمونه:

◁ دمای (۲۰-) درجه سانتی‌گراد در ظروف پلاستیکی.

خطر آلودگی

نمونه‌های ادرار و کلیه ابزار و موادی که با آن در تماس قرار می‌گیرند را باید به‌مثابه عامل عفونی قدرتمند در نظر داشت. با پوشیدن دستکش و رعایت موارد ایمنی در آزمایشگاه از تماس پوست با ادرار جلوگیری کنید.

کنترل کیفی

پیشـنهاد بـرای انجام کار آزمایشـگاهی خـوب، (GLP) به‌کارگیری نمونه‌های کنترل برای ارزیابی کیت اسـت. نمونه‌های کنترل کیفی (مثبت و منفی و مثبت کاذب) از «بهارافشان» قابل تهیه است هنگامی‌که از نمونه‌های کنترل کیفی مثبت و یا منفی و مثبت کاذب استفاده می‌کنید، همان روش را به‌کار بگیرید که برای نمونه ادرار به‌کار برده‌اید.

کنترل کیفی آزمایش‌های تشخیص موادمخدر
Quality Control

◁ کیت کنترل موادمخدر
(حاوی سه ویال لیوفیلیزه، کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل مثبت کاذب)
◁ استاندارد مرفین
◁ استاندارد کدئین
◁ استاندارد مرفین – کدئین

❋ سایر اقلام مورد نیاز:

◁ معرف شناسایی (کلرور پلاتینات)
◁ صفحه TLC (لایه نازک) سیلیکاژل ۵×۱۰ سانتی‌متری
◁ صفحه TLC (لایه نازک) سیلیکاژل ۱۰×۱۰ سانتی‌متری
◁ صفحه TLC (لایه نازک) سیلیکاژل UV ۳۰۰mm ۲۴۵
◁ پلیت اکسید آلومینیوم ۳۰۰mm

محصولات جدید بهارافشان

نوار سریع مرفین در ادرار انسان

Morphine Drug Screen Test
Human Urine

این آزمون کیفی و سریع، با چشم قابل بررسی بوده که به‌روش ایمونواسی رقابتی است و می‌توان آن را برای بررسی کیفی مرفین تا سقف غلظت ۳۰۰ ng/ml (نانوگرم در هر میلی‌لیتر) در ادرار انسان به‌کار گرفت.

One Step Drugs – of Abuse Test
(RAPID Immunochromatographic Assay)

- Amphetamine Test
- Barbiturates Test
- Benzodiazepines Test
- Cannabinoids (THC) Test
- Cocaine Test
- Methamphetamine Test
- Methadone Test
- Opiates (Morphine) Test
- Phencyclidine Test
- Ecstasy (MDMA) Test

بهارافشان
علمو انجین تخصصی برای تحقیق و توسعه
صنعت، معدن و تجارت

جداسازی و شناسایی
مرفین (Morphine)
و کدئین (Codeine)
در نمونه‌های بیولوژیک

www.bird-bahar.com
E-mail:bahar@bird-bahar.com

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۱۴۱۸۵-۷۶۸
تلفن: ۸۸۹۶۶۴۳۶-۸۸۹۶۱۸۹۰، نمابر: ۸۸۹۶۰۴۴۵
کارخانه: کرج، شهرک صنعتی بهارستان، خیابان گلستان چهارم، پلاک ۵۷

امروزه یکی از بهترین روش‌های سم‌شناسی و تشخیص موادمخدر که از کمند نتایج مثبت کاذب گریخته است، روش کروماتوگرافی در اشکال گوناگون خود است. این روش کلاسیک و توانمند می‌تواند بین آنالیت هدف و مشابه‌های آن تشخیص قائل شده و پیامدهای ناشی از نتایج کاذب را حل نماید. یکی از مشکلات اساسی در سم‌شناسی و تشخیص موادمخدر حساسیت روش و حجم نمونه نهایی سایر کیت‌های موجود در کشور است و این درحالی است که حساسیت کیت دو برابر روش‌های موجود است.

پژوهشی و تولیدی بهارافشان

پیشگفتار

این روش برای شناسایی مرفین در نمونه‌های بیولوژیک در آزمایشگاه است. کیت کنونی برای تشخیص مرفین در ادرار انسانی طراحی شده است. روش کنونی تلفیقی از کروماتوگرافی لایه نازک و سنتونی برای شناسایی نهایی مواد سمی و اعتیادآور می‌باشد.

این روش کاملاً اختصاصی بوده به‌طوری که می‌توان نتایج آزمایشگاهی آن را از نظر دقت با روش‌هایی چون کروماتوگرافی گازی یا GC مقایسه کرد. همچنین این روش، نسبت به روش‌های معمول از برتری بارزی به‌لحاظ هزینه، آلودگی محیط، صحت، دقت و حساسیت آزمایش برخوردار است.

تداخلات دارویی در روش بهارافشان

در طی بررسی‌های مکرری که صورت گرفته نشان داده است که هیچ‌یک از داروهای یادشده در جدول زیر تداخلی در جداسازی و تشخیص مرفین با این روش ندارند.

این داروها نقش تداخلی در این روش ندارند

Acetaminophen Codeine*	Cimetidine**	Fluoxetine	Phenylbulazone
Adult Cold	Cocaine	Imipramine	Ranitidine
Amitrypitiline	Coffeine	Methadone	Spironol.acton
Anti-histamine Decongestant	Diazepam	Pentazocine	THC
Atenolol	Diclofenac Na	Perphenazin	Theophylline
Chlordiazepoxide	Diphenoxylate	Phenobarbital	

* روش نوین «بهارافشان» هماهنگ با کروماتوگرافی گازی یا GC بوده و برخلاف تست‌های سریع تشخیص مرفین (تریاک)، تداخل دارویی در آن مؤثر نبوده و قادر است که مرفین و کدئین را در دو RF کاملاً مجزا و در حد حساسیت ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تشخیص دهد.

** جایگاه سایمتیدین (Cimetidine) در غلظت‌های زیاد (حدود 20mg/ml) در بالاتر از مرفین لکه‌ای ایجاد می‌کند که ممکن است روی مرفین را نیز بپوشاند. نکته افتراقی و تشخیصی آنکه رنگ این لکه‌ها کاملاً زرد بوده و با رنگ لکه مرفین متفاوت است. در صورت مشاهده چنین لکه‌هایی برای اطمینان از صحت جواب‌ها بهتر است آزمایش تکمیلی دیگری با استفاده از فاز «تیل استات» مثال: آمونیاک» (۸۵ : ۱۰ : ۵) نیز استفاده شود.

محتویات کیت

ردیف	محتوی	مشخصات	تعداد
۱	صفحه TLC (لایه نازک)	۱۰ × ۵ سانتی‌متر	۵
۲	ستون کروماتوگرافی	۱۳ سانتی‌متری	۲۰
۳	بافر فعال‌کننده *Activator Buffer*	هر ویال بودر برای ۱۰۰ml	۱
۴	بافر تثبیت‌کننده *Fixative Buffer*	هر ویال بودر برای ۱۵۰ml	۱

معرف شناسایی «کلرور پلاتینات» می‌باشد که جزو محتویات کیت نیست و درصورت نیاز جداگانه خریداری شود.

روش آماده‌سازی محلول‌ها

الف) آماده‌سازی بافر Activator برای مصرف:
محتویات یک ویال Activator را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته کاملاً مخلوط کرده تا حل شود.

ب) آماده‌سازی بافر Fixative برای مصرف:
محتویات یک ویال Fixative را در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. کاملاً مخلوط کرده تا حل شود.

یادآوری ۱: محلول بافرها را در ظروف شیشه‌ای دردار آماده و نگهداری کنید.

یادآوری ۲: محلول بافرهای مورد نیاز را حدود یک ساعت قبل از شروع آزمایش تهیه فرمایید. محلول بافر Activator در گرمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۲ هفته پایدار است. محلول آماده مصرف بافر Fixative در گرمای اتاق ۳ هفته پایدار است. پیشنهاد می‌شود محلول بافرها را در یخچال ۲ تا ۸ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شوند، ولی قبل از انجام آزمایش آنها را به دمای اتاق برسانید.

شرایط فیزیکی محیط برای انجام آزمایش

گرما: برای دریافت نتایج بهتر، حتی‌الامکان در چهار فصل سال، گرمای محل انجام آزمایش را در حد استاندارد آزمایشگاهی یعنی حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه دارید.

رطوبت: برای انجام‌آزمایش در مناطق مرطوب و آزمایشگاه‌هایی که رطوبت محیط افزایش داشته و غیرقابل کنترل است، به بخش مربوط به «رعایت نکات مربوط به انجام آزمایش در هوای مرطوب» مراجعه کنید.

روش آماده‌سازی نمونه

مطالعه و بررسی داروها نشان داده است مصرف برخی از داروها به‌طور طبیعی سبب کاهش pH ادرار بیمار (به‌سمت اسیدی) می‌گردد مانند داروی اسپیرونولاکتون. کاهش pH موجب تأخیر در ظهور لکه بر روی پلیت TLC (صفحه نازک) می‌شود. لذا می‌بایستی پیش از شروع آزمایش pH نمونه را با نوار pH تعیین نموده و در صورت pH کمتر از ۷ به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار ۱۰ میکرولیتر آمونیاک اضافه کرده و pH را به میزان ۸-۷ رسانید.

روش انجام آزمایش

۱. ستون‌های استخراج را در حفره‌های دریچه و محفظه خلاء قرار دهید.
۲. سه میلی‌لیتر بافر Activator با ۹ – ۸/۵ PH را به هر ستون اضافه کنید، پس از حدود ۲دقیقه دوباره پمپ را روشن کرده و فشار پمپ را حدود bar ۰/۱ تنظیم نمایید.
۳. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه ادرار مورد آزمایش را به هر ستون اضافه کنید. فشار پمپ خلاء تا تخلیه کامل ادرار برای مقدار قبلی ثابت باشد.
۴. پس از تخلیه، پنبه درون هر ستون را بردارید. به هر ستون استخراج مقدار ۵ میلی‌لیتر بافر Fixative ۸/۵ – ۸/۲ PH اضافه کنید تا تخلیه کامل انجام گیرد. (فشار پمپ تا تخلیه کامل روی مقدار قبلی ثابت است).
۵. پس از تخلیه بافرها، فشار پمپ خلاء را تا bar ۰/۳ افزایش داده و ۱۵ دقیقه صبر کنید تا عمل تخلیه و خشک شدن کامل صورت پذیرد.
۶. در هر بار آزمایش، یک ستون نیز به‌عنوان شاهد از نمونه ادرار منفی همراه با ۳۰۰ نانوگرم استاندارد مورفین – کدئین به‌ازای هر یک میلی‌لیتر نمونه استفاده کنید.
۷. ستون‌ها را روی جا لوله‌ای مخصوص قرار دهید و نوک آنها را در بشرهای انگشتانه‌ای که روی بن‌ماری یا صفحه داغ چیده شده‌اند، قرار دهید.
۸. به هر یک از ستون‌های استخراج مقدار ۳ میلی‌لیتر الکل متیلیک مرغوب اضافه کنید تا عمل استخراج انجام گیرد.
۹. عمل استخراج که همراه با تبخیر انجام می‌گیرد، معمولاً حدود ۱۵ دقیقه به‌طول می‌انجامد.
۱۰. پس از انجام عمل استخراج و تبخیر، بشرها را از روی بن‌ماری یا صفحه داغ بردارید.
۱۱. صفحه‌های کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) را آماده کنید. (از پایین پلیت حدود یک سانتی‌متر با خط‌کش و مداد یک خط به‌آرامی بکشید و روی خط را با فاصله ۸ میلی‌متر از هم، جهت گذاشتن لکه نشانه‌گذاری کنید).
صفحه‌های شیشه‌ای TLC را قبل از لکه‌گیری به‌مدت ۲۰ دقیقه روی حرارت ۸۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.

یادآوری: بهتر است برای اطمینان بیشتر پلیت‌ها را از ابتدای آزمایش در همین حرارت قرار دهید.

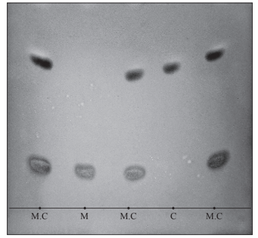
۱۲. برای عمل لکه‌گذاری، حاصل استخراج داخل هر بشر را با ۳ الی ۴ قطره متانول حل کرده و روی نشانه‌ها لکه‌گذاری کنید.

۱۳. فاز متحرک را تهیه و داخل تانک بریزید.
[۷۰ میلی‌لیتر الکل متیلیک، ۶ میلی‌لیتر کلروفرم و ۳ قطره آمونیاک (یا پی‌پست ۱ میلی‌لیتری) ایسن فاز برای یک صفحه TLC ۱۰×۱۰ یا دو صفحه ۵×۱۰ سانتی‌متری کافی است.

توجه: جهت اشباع سریع‌تر تانک کروماتوگرافی، بهتر است فاز بالارونده ۲ برابر تهیه گردد.

۱۴. صفحه لکه‌گذاری شده را به‌آرامی داخل تانک قرار دهید و درب تانک را کاملاً ببندید.
۱۵. هنگامی که فاز متحرک ۸ سانتی‌متر بالا رفت (یعنی یک سانتی‌متر به لبه بالایی صفحه مانده) صفحه را از تانک بیرون آورید (این مرحله حدود ۲۰ دقیقه به‌طول می‌انجامد).
۱۶. صفحه TLC را حدود یک دقیقه در فضای آزمایشگاه نگاه دارید تا خشک شود و سپس آن را به‌آرامی روی صفحه گرم با دمای ۸۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه قرار دهید.
۱۷. صفحه TLC را در فضای آزمایشگاه خنک کنید (این عمل ۲ تا ۳ دقیقه به طول می‌انجامد).
۱۸. برای آشکارسازی نمونه‌های مشکوک، از اسپری مخصوص کلرو پلاتینات استفاده کنید.
۱۹. پس از اسپری کردن به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه (گاهی تا ۱ ساعت) صبر کنید تا صفحه به‌طور کامل خشک شود. پلیت باید در محل تاریک نگهداری شود و تا یک ساعت پس از اسپری هر ۱۰ تا ۱۵ دقیقه یکبار بررسی شود، آنگاه لکه‌های ظاهر شده را با لکه‌های استاندارد مقایسه کنید و نتایج به‌دست آمده را تفسیر و گزارش نمایید.

هشدار: فاصله ستون تا کف بشر در حد یک‌سانتی‌متر تنظیم شود و از تماس انتهای ستون (نوک ستون) با کف بشر که در تماس با هات‌پلیت است جلوگیری شود. (از نظر فیزیکی، نقطه‌جوش الکل پایین بوده و حرارت سبب نفوذ آن به داخل ستون شده و وضعیت جاذب را بهم می‌ریزد).



M: MORPHINE C: CODEINE M.C: MORPHINE & CODEINE (MIX)

رعایت نکات مربوط به انجام آزمایش در هوای مرطوب

۱. پلیت‌ها را در گرمخانه (oven) با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲. در مرحله لکه‌گذاری، کوچکترین قطره آب سبب غیرفعال شدن پلیت و بلوکه شدن لکه و در نهایت ظاهر نشدن لکه می‌شود. بنابراین توجه کنید در مرحله استخراج با الکل، عمل تبخیر به‌طور کامل صورت گیرد و سپس روی بقایای خشک‌شده، چند قطره الکل بدون آب (حدوداً سه قطره) اضافه نموده، لکه‌گذاری کنید.
۳. پس از لکه‌گذاری، جهت خنک‌شدن، پلیت را در دمای محیط (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید.
۴. پلیت را پس از بیرون آوردن از تانک به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در دمای محیط (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید.
۵. پلیت‌ها را به‌مدت ۸ دقیقه روی هات‌پلیت با حرارت ۸۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.