پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
سال ۲۷، شماره ۱، صفحات ۲۳تا ۲۷، (بهار ۱۳۸۲)

Original Article

استخراج مرفین از ادرار انسان به کمک روشهای مایع-مایع و فاز جامد و مقایسه آنها توسط دانسیتومتراسکنرلیزری

دکتر سید عباس تقوی[۱]، سید علی ناظری[۲]، دکتر امید سبزواری[۳]، دکتر منیر فکری[۴]، دکتر مهشید افشار[۳]

۱- استادیار، آزمایشگاههای رفرانس، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۲- کارشناس ارشد، آزمایشگاههای رفرانس، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۳- دانشیار، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- دانشیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف : *کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) روش مناسبی برای آنالیز مواد مخدر در آزمایشگاههایی است که به سهولت به تجهیزات دستگاهی پیشرفته دسترسی ندارند. برای بررسی کمی صفحات TLC تکنیکهای آزمایشگاهی متعددی بکار گرفته می‌شود که در این میان دانسیتومتراسکنرلیزری (Slit-scanning densitometre) بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه کارآئی سیستم استخراج فاز جامد (SPE)، با یک سیستم استخراج فاز مایع-مایع (LLE) در استخراج مرفین از ادرار انسان، شناسایی توسط TLC و اندازه‌گیری کمی آن به کمک دانسیتومتراسکنرلیزری می‌باشد.*

مواد و روش‌ها : *برای این منظور ده نمونه ادرار از معتادین به مشتقات اوپیوئیدی جمع آوری گردید و سپس هر نمونه به چهار بخش تقسیم شد: دو بخش به منظور بررسی توسط استخراج فاز جامد و دو بخش توسط استخراج مایع ـ مایع (کلروفرم،۲ـ پروپانول شیکر و سانتریفوژ) تفکیک شد و روی یک قسمت از هر دو روش عمل هیدرولیز انجام شد. حاصل استخراج هر چهار بخش پس از جداسازی و آشکارسازی توسط TLC ، بکمک دستگاه TLC-Scanner بصورت کمی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها : *نتایج آماری نشان داد که هر دو روش در نمونه‌های هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده به خوبی کارا هستند و سطح زیر منحنی مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود.*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: *درهردو روش، نتایج حالت هیدرولیز شده بهتر بود. همچنین بازیافت روشهای SPE و LLE به ترتیب ۹۴و ۸۰ درصد بود.*

واژگان کلیدی: *استخراج، مرفین، روش مایع ـ مایع، فاز جامد.*

مقدمه

تریاک از گیاه خشخاش با نام علمی papaver somniferum تهیه می‌شود. از شیره خشخاش حدود ۲۰ نوع آلکالوئید بدست می‌آید که مرفین آلکالوئید اصلی تریاک می‌باشد و حدود ۱۰٪ در تریاک یافت می‌شود(۱).در مقاله‌ها و منابع مختلف روشهای متعددی برای تشخیص مرفین ارائه شده است. از جمله روش کروماتوگرافی کاغذی (Paper Chromatography) که حساسیت حدود ۳۰۰۰-۲۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر را دارا می‌باشد. روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography) از حساسیت بیشتری نسبت به کروماتوگرافی کاغذی برخوردار است، همچنین روشهای گاز کروماتوگرافی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

(Gas Chromatography,GC) و کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (High Performance Liquid Chromatography,HPLC) که از حساسیت بسیار بالایی برخوردار هستند (۷،۵-۲). روشهای تجارتی مختلفی بصورت تستهای سریع (rapid test) نیز ساخته شده است، این روشها گرچه سریع هستند ولی بعلت تداخل دارویی پاسخهای مثبت کاذب تولید می‌کنند و به همین دلیل باید پاسخ مثبت حاصل از این روشها با روشهای کروماتوگرافی تأیید شوند(۲و۳). از آنجائیکه روشهای دستگاهی مثلHPLC,GC و GC/MS بسیار گران هستند، بیشتر از روشهای کروماتوگرافی ساده‌تر مثلTLC و کروماتوگرافی کاغذی استفاده می‌شود.

انستیتو بین‌المللی سوءاستفاده دارویی (NIDA) سطح مرزی تشخیص را برای مرفین ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ادرار دانسته است(۲). از این رو در این تحقیق روشهایی استفاده شد که حساسیت مورد نظر را داشته باشد.

در این تحقیق یک روش استخراج مایع ـ مایع (Liquid – Liquid Extraction,LLE) طراحی شده که با کمک روش TLC حساسیت ۳۰۰ ng/ml را دارا بود. این روش با روش استخراج فاز جامد(Solid Phase Extraction, SPE) با نام تجارتی سم کروم که از حساسیت ۳۰۰ ng/ml برخوردار بود، مقایسه شد. نتایج بدست آمده از هر دو روش توسط دستگاه TLC-Scanner بصورت نیمه کمی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی:

حلالها و مواد شیمیایی مورد نیاز شامل متانل، ۲ـ پروپانل، آمونیاک، کلروفرم، اسیدکلریدریک، کربنات سدیم، بی‌کربنات سدیم و اسید هگزاکلروپلاتینات بود که از کمپانی Merck تهیه شد. کیت سم کروم (ستونهای کروماتوگرافی) نیز از شرکت سم فن‌آور تهیه شد. دستگاه TLC-Scanner مدل Shimadzu بود. نمونه‌های ادرار معتادین به تریاک از آزمایشگاههای تشخیص مرفین از جمله آزمایشگاه رفرانس تهیه شد.

روشها: *الف: استخراج مرفین با استفاده از روش مایع-مایع*

۱- استخراج مرفین بدون عمل هیدرولیز: از نمونه ادرار فرد معتاد ۱۰ میلی‌لیتر برداشته شد و توسط بافر کربنات pH نمونه به حدود ۸/۵ رسانیده شد. با استفاده از محلول کلروفرم و ۲ـ پروپانول (۱:۹) و ورتکس و سانتریفیوژ عمل استخراج انجام شد.

۲- استخراج مرفین همراه با هیدرولیز: ۱۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار فرد معتاد توسط اسید کلریدریک به میزان حدودا ۱۰٪ اسیدی شد و مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفت. سپس با محلول اتر شستشو داده شد. آنگاه به کمک NaOH نمونه قلیایی شد بطوریکه pH به عدد ۸/۵ برسد. در نهایت با محلول کلروفرم و ۲ـ پروپانل (۱:۹) و با استفاده از ورتکس، شیکر و سانتریفیوژ عمل استخراج انجام شد.

ب: استخراج مرفین با استفاده از روش فاز جامد

۱- استخراج مرفین بدون هیدرولیز: برای ۱۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار فرد معتاد، با استفاده از ستونهای استخراج تحت عنوان " سم کروم" مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل استخراج انجام شد.

۲- استخراج مرفین همراه با هیدرولیز: ابتدا عمل هیدرولیز همانند روش استخراج مایع ـ مایع انجام شد و سپس مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل استخراج مرفین انجام شد.

برای جداسازی وظاهر کردن لکه‌ها، به حاصل استخراج (در هر دو روش)، ایمی‌پرامین به مقدار یکسان (۱۰ µ l/ml) اضافه شد و بعد از فعال کردن صفحات TLC لکه‌گذاری در هر دو روش انجام شد. فاز متحرکی که به منظور تفکیک لکه‌ها مورد استفاده قرار گرفت شامل کلروفرم: متانل: آمونیاک ۱۲ml: ۱/٤ml: ۰/۳ml بود. از معرف یدوپلاتینات نیز برای ظاهر کردن لکه‌ها استفاده شد.

روش کار با دانسیتومتر اسکنر لیزری

برای بررسی کمی لکه‌های مرفین ظاهر شده روی صفحات TLC از دستگاه TLC-Scanner با طول موج ۵۵۰ نانومتر و حالت photomod:reflection استفاده شد. ابتدا صفحه‌های TLC با محلول ظاهرکننده یدوپلاتینات اسپری شد و پس از ظهور لکه‌های مرفین این لکه‌ها توسط دستگاه TLC-Scanner بصورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که سطح زیر منحنی بند مربوط به مرفین نسبت به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی (ایمی‌پرامین در همه نمونه‌ها) اندازه‌گیری شد. به منظور اطمینان از حساسیت روشها، همچنین تکرارپذیری و تعیین کمترین حد قابل تشخیص، ابتدا آزمایشاتی بر روی نمونه‌های استاندارد انجام شد ومنحنی کالیبراسیون رسم شد. غلظتهای مختلف از جمله ۱۵۰،۳۰۰و ٤۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مرفین در ادرار تهیه شد (حجم نمونه ۱۰ ml انتخاب شد) و هر کدام از این غلظتها سه بار آزمایش شده و سطح زیر منحنی هر کدام بوسیله دستگاه TLC-Scanner محاسبه شد و نتایج کمی آن از نظر آماری بررسی شد. ضمنا استاندارد داخلی مورد استفاده در این آزمایشات ایمی‌پرامین با غلظت ۱۰ µ l/ml بود که به تمام نمونه‌ها بطور یکسان اضافه شد. این آزمایشها بطور یکسان در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

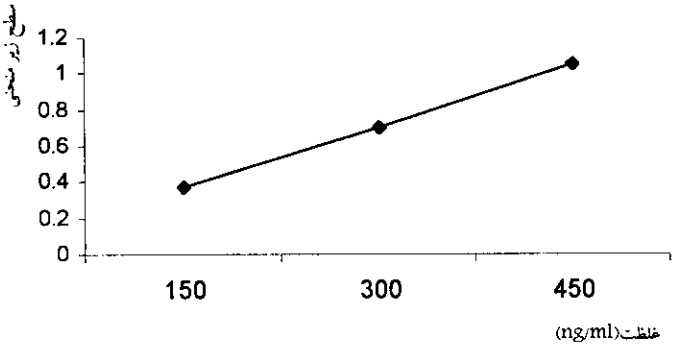
هر دو روش LLE و SPE انجام شد(جدول شماره ۱).

جدول۱- میانگین سطح زیر منحنی مرفین به استاندارد داخلی، توسط دستگاه TLC-Scanner در روش استخراجی فاز مایع (LLE) و فاز جامد (SPE)

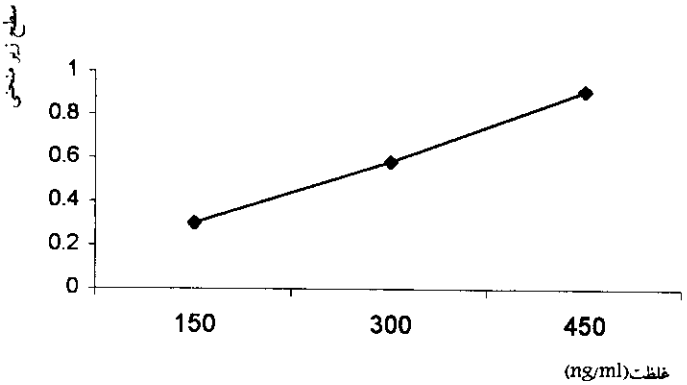
غلظت(ng/ml)	سطح زیر منحنی (مرفین) / سطح زیر منحنی (استاندارد داخلی) SPE	LLE	SPE	LLE
۱۵۰		۰/۲۸	۰/۳۷	
۱۵۰	۰/۳۷±۰/۰۲*	۰/۳۰	۰/۳۹	۰/۳۰±۰/۰۲
۱۵۰		۰/۳۲	۰/۳۵	
۳۰۰		۰/۶۷	۰/۷۰	
۳۰۰	۰/۷۰±۰/۰۱	۰/۶۰	۰/۷۱	۰/۵۸±۰/۰۸
۳۰۰		۰/۶۶	۰/۶۹	
۴۵۰		۰/۹۷	۱/۰۵	
۴۵۰	۱/۰۵±۰/۰۱	۰/۹۸	۱/۰۴	۰/۹۱±۰/۰۷
۴۵۰		۰/۹۹	۱/۰۶	

* اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار آورده شده است

برای رسم منحنی کالیبراسیون نیز از سه غلظت ۱۵۰،۳۰۰،۴۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و سطح زیر منحنی هر کدام استفاده شد. میانگین نتیجه سه بار آزمایش هر یک از این غلظتها محاسبه شد و هر کدام از این میانگینها به عنوان یک نقطه روی منحنی کالیبراسیون مشخص شد. ضریب همبستگی (r) برای این غلظتها محاسبه شد که برای SPE عدد ۰/۰۰۰۱۸ و برای LLE عدد ۰/۰۰۰۲ بدست آمد. برای ارتباط سطح زیر منحنی هر یک از نمونه‌ها و غلظت مرفین نمونه، معادله ارتباط این دو پارامتر که معادله رگرسیون نامیده می‌شود، ترسیم شد(نمودار ۱و۲).



نمودار ۱- منحنی کالیبراسیون مربوط به روش SPE و همچنین غلظتهای ۱۵۰،۳۰۰،۴۵۰ نانوگرم مرفین و سطح زیر منحنی هر کدام



نمودار ۲- منحنی کالیبراسیون مربوط به روش LLE و همچنین غلظتهای ۱۵۰،۳۰۰ و ۴۵۰ نانوگرم مرفین و سطح زیر منحنی هر کدام

یافته‌ها

پس از استخراج مرفین با دو روش SPE و LLE و بررسی کمی صفحه‌های TLC مربوط به هر کدام (حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده) مشاهده می‌شودکه نتایج حاصل از حالت هیدرولیز شده بهتر می‌باشند. با مقایسه سطح زیر منحنی مربوط به حالت هیدرولیز نشده و هیدرولیز شده و نیز تعیین غلظت نمونه‌ها با استفاده از معادله رگرسیون که در مورد روش SPE این معادله به صورت $y = -۰/۰۱+۰/۰۰۲۴X$ و در مورد روش LLE به صورت $y = -۰/۱ +۰/۰۱۹X$ می‌باشد، نتایج جدول شماره ۲ حاصل می‌شود.

در این جدول مشاهده می‌شود که در هر دوروش SPE و LLE غلظت بدست آمده در مورد مرفین در حالت هیدرولیز شده بیشتر از حالت هیدرولیز نشده می‌باشد. با توجه به این یافته‌ها در حالت هیدرولیز شده در روش SPE و LLE نتایج قابل اطمینان‌تری مشاهده می‌شود.

حاصل استخراج در روش SPE شفاف‌تر از روش LLE می‌باشد. بطوریکه پس از لکه گذاری روی صفحه TLC مشاهده می‌شود که لکه‌های مزاحم در مورد روش SPE کمتر از روش LLE می‌باشند. از این رو تداخل دارویی کمتر بوده و تفسیر نتایج آزمایشات در روش SPE آسانتر خواهد بود.

بازیافت محاسبه شده برای روش SPE حدود ۹۴٪ و برای روش LLE حدود ۸۰٪ بود.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۲- مقایسه سطح زیر منحنی مرفین با استاندارد داخلی در حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده در هر دو روش $SPE^{۲}$ و $LLE^{۳}$

شماره نمونه	روش	سطح زیر منحنی (مرفین) / سطح زیر منحنی (استاندارد داخلی)		غلظت (µg/ml)
۱	SPE	٤/۲	D[۴]	۱۷/٥٤
		۳۳/۱	H[٤]	۱۳۷/۹٦
	LLE	۳/۷	D	۱۸/۹٥
		۳۳	H	۱۷۳/۱٦
۲	SPE	۳/۲	D	۱۳/۳۷
		۱٥/۹	H	٦۲/۸۷
	LLE	۲/۹	D	۱/٤۷
		۱٦	H	۸/۳۷
۳	SPE	٤/۹	D	۲/۰٤
		۲۳/۱	H	۹/٦۳
	LLE	٤/۳	D	۲/۲۱
		۲٤	H	۱۲/٥۷
٤	SPE	۷/٥	D	۳/۱۳
		۲۹	H	۱۲/۰۹
	LLE	٦/۹	D	۳/٥۸
		۲۹/۳	H	۱٥/۳۷
٥	SPE	۱/۸	D	۱۷/٥٤
		۸/٥	H	۸۲/۸٤
	LLE	۱/٥	D	۰/۷٤
		۸/۹	H	٤/٦۳
٦	SPE	۳/۲	D	۱۳/۳۷
		۹/٤	H	۳۹/۲۰
	LLE	۲/۸	D	۱/٤۲
		۹/٦	H	٥
۷	SPE	۱/۹	D	۷/۹٥
		۹/۱	H	۳۷/۹٥
	LLE	۱/٤	D	۰/٦۸
		۹/۲	H	٤/۷۹
۸	SPE	۲/٥	D	۰/۰۱
		٦/٥	H	۲/۷۱
	LLE	۲/۲	D	۱/۱۰
		۷/۰	H	۳/٦۳
۹	SPE	۳/۱	D	۰/٤٦
		۸/٥	H	۱/۳۰
	LLE	۲/۷	D	۱/۳۷
		۱۸/۷	H	۹/۷۹
۱۰	SPE	۳/۹	D	۱/٦۳
		۹/۱	H	۳/۷۹
	LLE	۳/۸	D	۱/۷٤
		۹/٥	H	٤/۹۹

۱- استخراج فاز جامد
۲- استخراج مایع به مایع
۳- روش مستقیم (بدون هیدرولیز)
٤- روش هیدرولیز شده

بحث

حساسیت قابل قبول برای تشخیص مرفین در ادرار مطابق توصیه انستیتوی تحقیقات سوءاستفاده دارویی (NIDA) ۳۰۰ ng/ml می‌باشد. از این رو حساسیت روشهای استفاده شده در این تحقیق ۳۰۰ ng/ml انتخاب شد. آزمایشات در غلظتهای مختلف انجام شد و نشان داده شد که غلظت ۳۰۰ ng/ml در روشهایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند قابل شناسایی و تکرار پذیری است. انحراف از استاندارد برای روش SPE, ۰/۰۰۸ ± و برای روش LLE عدد ۰/۰۸± می‌باشدکه نشان می دهد دقت آزمایشات در این غلظت قابل قبول است.

همانطور که اشاره شد ضریب همبستگی برای غلظتهای مختلف و سطح زیر منحنی مربوطه برای روش SPE عدد ۰/۰۰۰۱۸ و برای روش LLE عدد ۰/۰۰۰۲ بدست آمد. بدین ترتیب ارتباط مستقیمی بین غلظت مرفین و سطح زیر منحنی در نمونه‌های استاندارد در هر دو روش وجود دارد. بدیهی است با افزایش غلظت، سطح زیر منحنی هم افزایش خواهد یافت. در هر دو روش غلظت بدست آمده در مورد مرفین در حالت هیدرولیز شده بیشتر از حالت هیدرولیز نشده می‌باشد. چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست زیر مرفین از ادرار به دو صورت آزاد و کنژوگه شده با گلوکورونید با نسبتهای تقریبی ۱۰ و ٦٥ درصد دفع می‌شود (٦). طی عمل هیدرولیز،مرفین مزدوج شده با گلوکورونید به صورت آزاد درآمده و به تعداد آزاد اضافه می‌شود. بنابراین بین دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده اختلاف قابل توجهی در غلظت مرفین ادرار مشاهده خواهد شد. باتوجه به این یافته‌ها در حالت هیدرولیز شده نتایج قابل اطمینان‌تری مشاهده می‌شود. در مقایسه بین حالت هیدرولیز نشده در روش SPE و LLE مشاهده می‌شود که غلظت بدست آمده در مورد روش SPE اندکی بیشتر از روش LLE می‌باشد. این امر به این علت است که بازیافت روش SPE برای مرفین بیشتر از روش LLE می‌باشد.

REFERENCES

1.Delbeke F, Debackere M. Influence of hydrolysis procedures on the urinary concentration of codeine and morphine in ratation doping anantysis. Fram Biomed Anal 1993; 11(4-5): 339-343.

2.Schuberth J. Gas Chromatographic-mass spectrometric determination of morphine, codeine and 6-monoacetyl morphine in blood extracted by solid phase. J Chromatography 1989: 444-49.

۳. ناجی ش. بررسی اثر داروها در تستهای تشخیص اعتیاد. پایان‌نامه، دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی، سال ۱۳۷۰.

4.Bernard F, Joseph S. Thin Layer Chromatography; Techniques and Applications. Third Edition, New York: Dekkerm, Basel, 1994:173-201.

5.Hendriks H, Batterman S. Quantitative analysis of morphine codeine, noscapine and papaverine by means of a direct TLC-Scanner method: Comparison With other methods. Deutsche Apotheker Zeitung 1982; 122: 1800-04.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

6.Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, et al. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutical, Body Fluids, and Postmortem Maternal. 2nd edition, London: Pharmaceutical Press, 1986: 160-77.

7.Vork I, Mirko P. Reproducibility of densitometric and image analyzing quantitative evaluation of thin-layer chromatograms. J Chromatography 1997: 329-36.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]