

## استخراج کدئین از ادرار انسان بكمک فاز مایع-مایع با بازیافت بالا و بررسی کمی آن توسط گاز کروماتوگرافی

دکتر سید عباس حسینی تقیوی<sup>۱</sup>، سید علی ناظری<sup>۲</sup>، دکتر امید سبزواری<sup>۳</sup>، دکتر منیره فکری<sup>۴</sup>، دکتر مهشید افشار<sup>۵</sup>

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفاهی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
- ۲- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفاهی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
- ۳- دانشیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- کارشناس رسمی دادگستری

### خلاصه

**سابقه و هدف:** روش‌های متعددی برای استخراج و تشخیص مشتقات تریاک ارائه شده است. روش گاز کروماتوگرافی (GC) روشی حساس و اختصاصی است که برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتیکه استخراج داروی مورد نظر از بازیافت بیشتری برخوردار باشد، صحت و دقت پاسخهای حاصل بالاتر خواهد بود. بنابراین باید از روش‌های استخراجی با بازیافت مناسب برای این منظور استفاده کرد. هدف از انجام این تحقیق تنظیم روشی برای استخراج و تشخیص کلرین (او مرفین) با بازیافت بالا می‌باشد. بطوریکه حساسیت روش بیشتر بوده و پاسخها از دقت و صحبت بیشتری برخوردار باشند.

**مواد و روشها:** ده نمونه ادرار معتادین به تریاک جمع آوری شده و هر کدام به دو بخش تقسیم شد. یک بخش بطور مستقیم و بدون عمل هیدرولیز و در بخش دیگر عمل هیدرولیز انجام شد (اسید کلریدریک به نسبت ۱۰٪ به نمونه اضافه شد و به مدت یک ساعت در بنمایی جوش قرار گرفت). عمل استخراج روی هر بخش توسط فاز مایع-مایع انجام شد. حاصل استخراج پس از مجاورت با BSTFA در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه مشتق سازی شد و به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق و نتایج به صورت کمی بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که در روش استخراج فاز مایع-مایع مذکور، سطح زیر منحنی (AUC) مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده بطور قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود. بازیافت روش فرق ۱۹٪ محاسبه شد.

**نتیجه‌گیری‌ها و توصیه‌ها:** با توجه به بازیافت بالا و حساسیت قابل قبول، می‌توان از این روش برای استخراج کلرین (او مرفین) سود جست.

**واژگان کلیدی:** کدئین، مرفین، استخراج مایع-مایع، کروماتوگرافی گاز.

### مقدمه

حساسیت حدود ۲۰۰۰-۳۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر دارد و روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography) که از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است (۱)، روش‌های تجاری مختلفی بصورت تست‌های سریع (rapid test) نیز ابداع شده است که این روشها گرچه سریع هستند ولی به علت تداخل دارویی پاسخهای

تریاک از گیاه خشخاش با نام علمی *Papaver somniferum* بدست می‌آید. از شیره خشخاش حدود ۲۰ نوع آکالالونید تهیه می‌شود که مرفین، آکالالونید اصلی آن می‌باشد. در مقالات و منابع مختلف روش‌های متعددی برای تشخیص مرفین ارائه شده است نظیر روش کروماتوگرافی کاغذی (Paper Chromatography) که

آرگون به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۷۵ درجه سانتی گراد مشتق سازی شد (۳،۴). به این ترتیب که حاصل استخراج در یک شیشه کوچک جمع آوری شده و کاملاً خشک شد، سپس مقدار  $\text{L}\mu\text{m}$  از BSTFA به آن افزوده شد و توسط گاز آرگون هواش شیشه تخلیه شد. آنگاه در شیشه محکم بسته و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد نگهدارشده شد تا عمل مشتق سازی انجام شود. حاصل استخراج بعد از عملیات مشتق سازی به دستگاه گاز کروماتوگرافی با شرایط زیر تزریق شد.

Detector Temperature: 300°C

Detector: NPD

Column: 5% SE-30

Carrier Gas: Nitrogen

برای تعیین بازیافت استخراج روش LLE، غلظتهای مختلف از جمله ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ نانوگرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس مراحل کار با GC مطابق آنچه ذکر شد در مورد حاصل استخراج ۳۰۰، ۱۵۰ و ۴۵۰ نانوگرم در میلی لیتر انجام پذیرفت. در مرحله بعد غلظتهای ذکر شده و بدون عمل استخراج، عملیات مربوط به GC در مورد آنها انجام شد. با توجه به فرمول زیر بازیافت روش محاسبه شد.

$$\frac{\text{AUC}(\text{codeine})}{\text{AUC}(\text{Int.st})} / \frac{\text{AUC}(\text{codeine})}{\text{AUC}(\text{Int.st})} \times 100 = R$$

در این فرمول کسر اول مربوط به حالت استخراج شده، کسر دوم مربوط به حالت استخراج نشده و R بازده روش است. بمنظور اطمینان از حساسیت روشها، همچنین تکرار پذیری و تعیین کمترین حد قابل تشخیص، ابتدا آزمایش‌های بر روی نمونه‌های استاندارد انجام شد و منحنی کالیبراسیون رسم شد. در این خصوص غلظتهای مختلف از جمله ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ نانوگرم در میلی لیتر مرفین در ادرار تهیه شد (حجم نمونه ۱۰ ml) ۱۰ انتخاب شد و هر کدام از این غلظتها سه بار آزمایش شده و سطح زیر منحنی (AUC) هر کدام بوسیله دستگاه TLC-Scanner محاسبه شد، آنگاه نتایج کمی آن از نظر آماری بررسی شد. ضمناً استاندارد داخلی مورد استفاده در این آزمایشات ایمی پرامین با غلظت ۱۰  $\mu\text{g}/\text{ml}$  بود که به تمام نمونه‌ها بطور یکسان اضافه شد. این آزمایشها بطور یکسان در هر دو روش LLE، SPE انجام شد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون از سه غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ نانوگرم در میلی لیتر و سطح زیر منحنی هر کدام (AUC) استفاده شد. میانگین نتیجه سه بار آزمایش هر کدام از این غلظتها محاسبه شده و هر کدام از این میانگین‌ها به عنوان یک نقطه روی منحنی

مشتبه کاذب تولید می‌کنند و به همین دلیل باید باسخ مشتبه حاصل از این روشها با روش‌های کروماتوگرافی تأیید شوند. از آنجاییکه روش‌های دستگاهی نظریه GC، HPLC و کروماتوگرافی GC/MS هستند از روش‌های کروماتوگرافی ساده‌تر مثل TLC و کروماتوگرافی کاغذی استفاده می‌شود که این روشها ساده، قابل دسترس برای همگان و ارزان هستند. استیتوی بین‌المللی سوءاستفاده دارویی (NIDA)، در مورد سوءاستفاده از تریاک، حد مرزی (cut off) تشخیص را برای مرفین و کدئین ۳۰۰ ng/ml ادرار دانسته است. از این‌رو در این تحقیق روشی استفاده شد که حساسیت مورد نظر را داشته باشد. هدف از این تحقیق طراحی استخراج مایع-مایع (LLE=Liquid-Liquid Extraction) با کمک روش TLC برای تشخیص کدئین (و مرفین) و مقایسه پاسخهای بدست آمده در دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده بصورت کمی با روش گاز کروماتوگرافی (GC) است. لازم به ذکر است هرچه روش استخراج از بازیافت بیشتری برخوردار باشد، پاسخهای بدست آمده از حساسیت، دقت و صحت بیشتری برخوردار خواهد بود.

## مواد و روش‌ها

حلالها و مواد شیمیابی شامل متانول، ۲-پروپانول، آمونیاک، کلروفرم، اسید کلریدریک، کربنات و بی‌کربنات سدیم، اسید هگزاکلروپلاتینات و BSTFA با خلوص مناسب از کمپانی Merck تهیه شد. دستگاه کروماتوگرافی Varian 3600 بود. برای استخراج کدئین با استفاده از روش مایع-مایع (LLE) در دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده به صورت زیر رفتار شد:

(الف) بدرن هیدرولیز: ۱۰ میلی لیتر از نمونه ادرار فرد معتاد را با بافر کربنات سدیم و با استفاده از محلول کلروفرم و ۲ پروپانول (۱:۹) و همچنین ورتکس، شیکر ۲۰ دقیقه و سانتریفیوژ ۵ دقیقه، عمل استخراج انجام شد.

(ب) همراه با هیدرولیز: برای این منظور ۱۰ میلی لیتر از نمونه ادرار فرد معتاد با اسید کلریدریک به میزان ۱۰٪ محلوت شده و به مدت ۶۰ دقیقه در بنماری جوش قرار گرفت. پس از عمل هیدرولیز و خنک شدن حاصل هیدرولیز، محلول حاصل توسط ۱۰ میلی لیتر محلول کلروفرم و ۲ پروپانول (۱:۹) و با استفاده از ورتکس، ۲۰ دقیقه شیکر و ۵ دقیقه سانتریفیوژ عمل استخراج انجام شد (۲).

از دستگاه گاز کروماتوگرافی Varian 3600 برای مقایسه کمی نتایج آزمایش استفاده شد. حاصل استخراج در نمونه‌های هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده هر کدام جداگانه در مجاورت BSTFA و گاز

جدول ۱: مقایسه سطح زیر منحنی کدئین به استاندارد داخلی در حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده در روش LLE بهمراه غلظتها مربوطه

غلظت (mg/ml)	AUC(codein) AUC(Int.St.)	LLE	روش نمونه	شماره نمونه
۱۸/۹	۲/۸	D		۱
۱۷۳/۲	۲۴	H		
۱/۶	۲/۸	D		۲
۷/۴	۱۵	H		
۱/۲	۲۳	D		۳
۱۲/۵	۲۴	H		
۲/۶	۰/۹	D		۴
۱۴/۴	۲۸/۳	H		
۰/۷	۱/۴	D		۵
۴/۲	۸/۱	H		
۱/۲	۲/۶	D		۶
۴/۲	۸/۱	H		
۰/۶	۱/۲	D		۷
۳/۸	۸/۲	H		
۱/۰	۲/۱	D		۸
۲/۶	۷/۱	H		
۱/۲	۱/۷	D		۹
۸/۸	۱۶/۷	H		
۱/۳	۲/۷	D		
۲/۹	۸/۵	H		۱۰

\* مستقیم بدون هیدرولیز

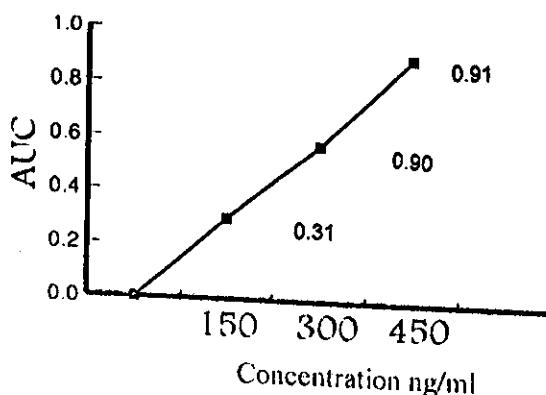
\*\* هیدرولیز شده

کالیبراسیون مشخص شد. ضریب همبستگی (r) برای این غلظتها محاسبه شد که برای روش LLE  $r_{LLE} = 0.9992$  بدلست آمد. به منظور تعیین ارتباط بین سطح زیر منحنی هر یک از نمونه ها و غلظت کدئین معادله ارتباط این دو پارامتر که معادله رگرسیون نامیده می شود، به صورت زیر تعریف شد:

$$Y_{LLE} = 0.1 + 0.00019 X_{LLE}$$

که در آن X غلظت کدئین در نمونه ادرار و Y سطح زیر منحنی (AUC) مربوطه است. (نمودار شماره ۱)

### Calibration Curve



نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون در روش LLE در غلظتها ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر کدئین

### یافته ها

نتایج نشان داد غلظتها حاصل در روش هیدرولیز شده بیشتر از حالت هیدرولیز نشده بود. چنین نتیجه های دور از انتظار نبیست زیرا کدئین (و مرفین) از ادرار به دو صورت آزاد و کنثروگه شده با گلوكورونید دفع می شود (۵، ۲). طی عمل هیدرولیز، کدئین (و مرفین) مزدوج شده با گلوكورونید بصورت آزاد درآمده و به مقدار آزاد اضافه می شود. بنابراین بین دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده اختلاف قابل توجهی در غلظت کدئین ادرار مشاهده خواهد شد. با توجه به این یافته ها در حالت هیدرولیز شده و در روش LLE نتایج قابل اطمینان تری مشاهده می شود. مطالعه نشان داد ارتباط بین غلظت کدئین و AUC در نمونه های استاندارد در روش LLE مستقیم است. بنابراین با افزایش غلظت AUC نیز افزایش می یابد. در مطالعه غلظتها ای استاندارد

پس از استخراج کدئین با دو روش SPE و LLE و بررسی کمی صفحه های TLC مربوط به هر کدام، مشاهده شد که نتایج حاصل از حالت هیدرولیز شده بهتر از حالت هیدرولیز نشده است (جدول ۱). از طرف دیگر با توجه به توصیه انتیتو تحقیقات سوءاستفاده دارویی (NIDA)، حساسیت قابل قبول برای تشخیص کدئین (و مرفین)  $300 \text{ ng/ml}$  در نظر گرفته شد. مطالعه ما نشان داد که غلظت  $300 \text{ ng/ml}$  قابل شناسایی و تکرارپذیری است و انحراف از استاندارد (SE) برای روش LLE عبارتست از  $\pm 0.08$ ، لذا دقت آزمایشات در غلظتها مورد بررسی قابل قبول است. در ضمن بازیافت روش فوق  $89\%$  محاسبه شد.

که دقیق آزمایشها در حد قابل قبولی می‌باشد. با توجه به بازیافت بسیار بالای این روش استخراج (٪۸۹) و در ضمن حساسیت قابل قبول آن می‌توان برای استخراج کدئین (و مرفین) از این روش سود جست.

مشاهده شد که کمترین غلظت قابل تشخیص  $10^0$  ng/ml (حجم نمونه ادرار  $10\text{ ml}$ ) می‌باشد. این آزمایشات سه مرتبه تکرار شد و بررسی آماری نیز نشان می‌دهد که آزمایشات تکراری‌دیر می‌باشند. انحراف از استاندارد در مورد این غلظت نشان می‌دهد

## REFERENCES

- ۱- ناجی ش. بررسی اثر داروها در تستهای تشخیص اعتیاد. پایان نامه دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی، سال ۱۳۷۰.
- 2- Moffat AC, Jackson JV, Moss MS, et al. Clarks Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Postmortem Maternal. 2<sup>nd</sup> ed. Pharmaceutical Press, London, 1986:160-77.
- 3- Chen BH, Tayor EH, Pappas AA. Comparison of derivatives for determination of codein and morphine by gas chromatography/mass spectrometry. J Anal Toxicol 1990;19:17.
- 4- Schuberth J. Gas chromatographic- mass spectrometric determination of morphine, codein and 6-monoacetyl morphine in blood extracted by solid phase. J. Chromatography 1989; 490: 444-90.
5. Matthew J(ed). Ellenhorns Medical Toxicology; Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. Wiliams and Wilkins. New york, 1997: 405-47.