پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
سال ۲۶، شماره ۴، صفحات ۲۸۷ تا ۲۹۰ (زمستان ۱۳۸۱)

Original Article

استخراج کدئین از ادرار انسان بکمک فاز مایع–مایع با بازیافت بالا و بررسی کمی آن توسط گاز کروماتوگرافی

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

۱- استادیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۲- کارشناس ارشد،مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس،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 می گیرد. 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 کدئین (و مورفین) با بازیافت بالا می باشد بطوریکه حساسیت روش بیشتر بوده و پاسخها از دقت و صحت 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 بنماری 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 سانتی‌گراد 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 ـ مایع مذکور، سطح زیر منحنی (AUC) مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده بطور قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود. بازیافت روش فوق ۸۹٪ محاسبه شد.*

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

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

مقدمه

تریاک از گیاه خشخاش با نام علمی Papaver somniferum بدست می‌آید. از شیره خشخاش حدود ۲۰ نوع آلکالوئیدتهیه می‌شود که مرفین، آلکالوئید اصلی آن می‌باشد. در مقالات و منابع مختلف روشهای متعددی برای تشخیص مرفین ارائه شده است نظیر روش کروماتوگرافی کاغذی (Paper Chromatography) که حساسیت حدود ۳۰۰۰-۲۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر دارد و روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography) که از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است(۱). روشهای تجارتی مختلفی بصورت تستهای سریع (rapid test) نیز ابداع شده است که این روشها گرچه سریع هستند ولی به علت تداخل دارویی پاسخهای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

مثبت کاذب تولید می‌کنند و به همین دلیل باید پاسخ مثبت حاصل از این روشها با روشهای کروماتوگرافی تأیید شوند. از آنجاییکه روشهای دستگاهی نظیر GC ، HPLC و GC/MS بسیار گران هستند از روشهای کروماتوگرافی ساده‌تر مثل TLC و کروماتوگرافی کاغذی استفاده می‌شود که این روشها ساده، قابل دسترس برای همگان و ارزان هستند. انستیتوی بین المللی 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 شیمیایی شامل متانل، ۲-پروپانل، 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 ـ مایع (LLE) در دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده به صورت زیر رفتار شد:

الف) بدون هیدرولیز: ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه ادرار فرد معتاد را با بافرکربنات 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 میلی‌لیتر از نمونه ادرار فرد معتاد با اسید کلریدریک به میزان ۱۰٪ مخلوط 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 آرگون به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد مشتق سازی شد(۳،٤). به این ترتیب که حاصل استخراج در یک شیشه کوچک جمع‌آوری شده و کاملاً خشک شد، سپس مقدار ۱۰۰ μL از BSTFA به آن افزوده شد و توسط گاز آرگون هوای شیشه تخلیه شد. آنگاه در شیشه محکم بسته و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته 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 ٤۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس مراحل کار با GC مطابق آنچه ذکر شد در مورد حاصل استخراج ۱۵۰، ۳۰۰ و ٤۵۰ نانوگرم در میلی لیتر انجام پذیرفت. در مرحله بعد غلظتهای مذکور تهیه و بدون عمل استخراج، عملیات مربوط به GC در مورد آنها انجام شد. با توجه به فرمول زیر بازیافت روش محاسبه شد.

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

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 آزمایشهایی بر روی نمونه‌های استاندارد انجام شد و منحنی کالیبراسیون رسم شد. در این خصوص غلظتهای مختلف از جمله ۱۵۰، ۳۰۰ و 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 (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 μg/ml بود که به تمام نمونه‌ها بطور یکسان اضافه شد. این آزمایشها بطور یکسان در هر دو روش LLE، SPE انجام شد.

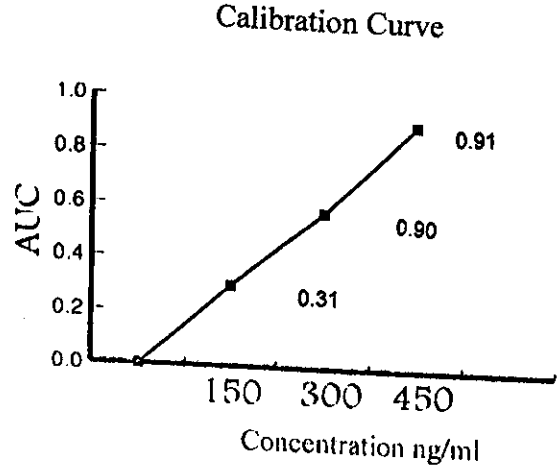
برای رسم منحنی کالیبراسیون از سه غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ٤۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و سطح زیر منحنی هر کدام (AUC) استفاده شد. میانگین نتیجه سه بار آزمایش هر کدام از این غلظتها محاسبه شده و هر کدام از این میانگین‌ها به عنوان یک نقطه روی منحنی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

کالیبراسیون مشخص شد. ضریب همبستگی (r) برای این غلظتها محاسبه شد که برای روش LLE ، r_{LLE}=۰/۰۰۰۲ بدست آمد. به منظور تعیین ارتباط بین سطح زیر منحنی هر یک از نمونه‌ها و غلظت کدئین معادله ارتباط این دو پارامتر که معادله رگرسیون نامیده می شود، به صورت زیر تعریف شد:

$$Y_{LLE}=۰/۱+۰/۰۰۰۱۹\ X_{LLE}$$

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



نمودار۱: منحنی کالیبراسیون در روش LLE در غلظتهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ٤۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر کدئین

یافته‌ها

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 انستیتو تحقیقات سوءاستفاده دارویی(NIDA) ، حساسیت قابل قبول برای تشخیص کدئین (و مرفین)، ۳۰۰ ng/ml در نظر گرفته شد. مطالعه ما نشان داد که غلظت ۳۰۰ ng/ml قابل شناسایی و تکرارپذیری است و انحراف از استاندارد (SE) برای روش LLE عبارتست از (۰/۰۸ ±)، لذا دقت آزمایشات در غلظتهای مورد بررسی قابل قبول است. در ضمن بازیافت روش فوق ۸۹٪ محاسبه شد.

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

شماره نمونه	روش LLE	AUC(codein) / AUC(Int.St.)	غلظت (mg/ml)
۱	D	۳/۸	۱۸/۹
	H	۳٤	۱۷۳/۲
۲	D	۲/۸	۱/٦
	H	۱۵	۷/٤
۳	D	۳/۳	½
	H	۲٤	۱۲/۵
٤	D	۵/۹	۲/٦
	H	۲۸/۳	۱٤/٤
۵	D	۱/٤	۰/۷
	H	۸/۱	٤/۲
٦	D	۲/٦	۱/۲
	H	۸/۱	٤/۲
۷	D	۱/۲	۰/٦
	H	۸/۲	۳/۸
۸	D	۲/۱	۱/۰
	H	٦/۱	۳/٦
۹	D	۱/۷	۱/۲
	H	۱٦/۷	۸/۸
۱۰	D	۳/۷	۱/۳
	H	۸/۵	۳/۹

*Direct (مستقیم بدون هیدرولیز)

**هیدرولیز شده

بحث

نتایج نشان داد غلظتهای حاصل در روش هیدرولیز شده بیشتر از حالت هیدرولیز نشده بود. چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست زیرا کدئین (و مرفین) از ادرار به دو صورت آزاد و کنژوگه شده با گلوکورنید دفع می‌شود(۵،۲). طی عمل هیدرولیز، کدئین (و مرفین) مزدوج شده با گلوکورونید بصورت آزاد درآمده و به مقدار آزاد اضافه می‌شود. بنابراین بین دو حالت هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده اختلاف قابل توجهی در غلظت کدئین ادرار مشاهده خواهد شد. با توجه به این یافته‌ها در حالت هیدرولیز شده و در روش LLE نتایج قابل اطمینان تری مشاهده می‌شود. مطالعه نشان داد ارتباط بین غلظت کدئین و AUC در نمونه‌های استاندارد در روش LLE ، مستقیم است. بنابراین با افزایش غلظت، AUC نیز افزایش می‌یابد.در مطالعه غلظتهای استاندارد

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

مشاهده شد که کمترین غلظت قابل تشخیص ng/ml ۱۵۰ (حجم نمونه ادرار ml ۱۰) می‌باشد. این آزمایشات سه مرتبه تکرار شد و بررسی آماری نیز نشان می‌دهد که آزمایشات تکرارپذیر می‌باشند. انحراف از استاندارد در مورد این غلظت نشان می‌دهد که دقت 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.

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. Clarkes Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Postmortem Maternal.2 nd 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]