

## ارزیابی نتایج آزمایش ۹۰۰ نمونه کنترل ادرار لیوفیلیزه مجهول در ۳۰۰ آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر کشور برای شناسایی مرفین (کنترل کیفی خارجی)

دکتر عباسی، محمد<sup>۱</sup> - ناظری، علی<sup>۲</sup>

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** اعتیاد به تریاک و مشتقات آن مثل مرفین، از جنبه‌های مختلف فردی، اجتماعی، جسمی، روانی و ... بررسی می‌شود. بخش مهمی از موارد مورد بحث در اعتیاد صحت و درستی آزمایشهای تشخیص مرفین می‌باشد زیرا ارائه هر گونه پاسخ اشتباه موجب بروز مشکلات فراوان برای شخص آزمایش شونده و خانواده وی خواهد بود. هدف از این تحقیق، بررسی عملکرد آزمایشگاهها و کیفیت روش‌های تشخیص مرفین در آزمایشگاههای تشخیص مرفین ادرار در سراسر کشور می‌باشد.

**مواد و روش:** در اولین دوره (بهمن ۱۳۸۰) کنترل کیفی خارجی روش های تشخیص مواد مخدر (مرفین) که توسط مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس اجرا شد، بیش از ۹۰۰ نمونه ادرار لیوفیلیزه مجهول از نظر مواد مخدر تهیه و برای بیش از ۳۰۰ آزمایشگاه تشخیص مرفین در سراسر ایران (برای هر مرکز سه نمونه شامل نمونه منفی، مثبت و مثبت کاذب) ارسال شد. روش انجام آزمایش به گونه‌ای تنظیم شد که فرد آزمایشگر برای ارائه پاسخ صحیح آزمایش، نمونه‌ها را در دو مرحله مورد آزمایش قرار دهد. روش صحیح مورد انتظار این بود که آزمایشگر با روش‌های غربالی متداول، نمونه منفی را شناسایی و گزارش نموده، آن گاه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، موارد مثبت شده را مورد آزمایش قرار دهد به این منظور که پاسخ مثبت واقعی و کاذب مشخص شده و نتیجه قابل قبول گزارش شود.

**یافته‌ها:** بررسی نتایج اولین دوره کنترل کیفی آزمایشگاههای تشخیص مواد مخدر نشان می‌دهد که حدود ۳۶٪ این آزمایشگاهها بدون انجام آزمایش تاییدی و فقط با توجه به نتیجه آزمایش غربالی، پاسخ آزمایش را اعلام می‌نمایند. حدود ۲۹٪ از آزمایشگاهها پاسخ‌های کروماتوگرافی را اشتباه گزارش نموده‌اند و ضمناً ۸٪ آزمایش‌های غربالی، نیز نادرست گزارش شده است.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به نتایج اولیه مشاهده می‌شود تعداد زیادی از آزمایشگاهها نیاز به کنترل و نظارت داشته، به علاوه از صحت و دقت روش‌های مورد استفاده این آزمایشگاهها نیز باید اطمینان حاصل نمود. از آنجایی که ارائه هر گونه پاسخ اشتباه ممکن است برای فرد آزمایش شونده (داوطلب ازدواج و استخدام، مشکوک ...) و خانواده وی مشکلات فراوانی را به وجود آورد، نظارت و کنترل بی در پی صحت و درستی روش‌های تشخیص مرفین که در سراسر کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد و ارائه روش‌های تشخیصی استاندارد، ضروری می‌باشد.

**کل واژگان:** ادرار، آزمایش مرفین، کنترل کیفی

مجله پزشکی ارومیه، سال پانزدهم، شماره دوم، ص ۱۵۳ - ۱۴۸، تابستان ۱۳۸۳

آدرس مکاتبه: تهران، خیابان دماوند، بیمارستان بوعلی، مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس ایران، آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر - دکتر محمد عباسی - تلفن: ۳۷۹۸۶۷۰-۱

۳۳۳۳۵۱-

- ۱- استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس - وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، عضو هیئت علمی مرکز مطالعات اعتیاد.
- ۲- کارشناس ارشد سم شناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس - وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی.

## مقدمه

اعتیاد اختصاص به جوامع معینی نداشته و نزد بسیاری از ملل جهان مشاهده می‌شود. هر ساله تعداد بیشتری از جوانان به جمع معتادان می‌پیوندند. اعتیاد مشکلات بسیاری از نظر فردی و اجتماعی به وجود می‌آورد. علاوه بر این که نیروی وسیعی از افراد کارآمد و فعال جوامع را به سمت خود می‌کشاند، موجب افزایش روز افزون فساد اجتماعی و اعمال ضد اخلاقی و خلاف قانون، جرم و جنایت در بسیاری از کشورهای جهان می‌شود. اعتیاد جنبه‌های مختلف فردی، اجتماعی، جسمی و روانی دارد و لازم است که در زمینه‌های گوناگون بررسی شود. یک بخش مهم از مسائل مورد بحث در اعتیاد صحت و درستی آزمایش‌های مربوط به تشخیص مرفین می‌باشد. ارائه هر گونه پاسخ اشتباه ممکن است سبب بروز مشکلات فراوان برای فرد آزمایش‌شونده و خانواده وی شود.

روش‌های مورد استفاده در آزمایش مواد مخدر دو دسته عمده غربالی و تاییدی می‌باشد. روش‌های غربالی دارای نتایج مثبت کاذب<sup>۱</sup> بوده و این نتایج مثبت، احتمال وجود مرفین در نمونه را نشان می‌دهد. این گونه پاسخ‌ها می‌باید با روش‌های تاییدی (کروماتوگرافی) آزمایش شوند تا مثبت‌های حقیقی و کاذب از یکدیگر تشخیص داده شوند. هدف از این تحقیق بررسی عملکرد آزمایشگاه‌های تشخیص مرفین در ادرار و نیز بررسی صحت روش‌های تشخیص مرفین مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص مرفین در ادرار در سراسر کشور می‌باشد.

## مواد و روش

روش صحیح آزمایش تشخیص مواد مخدر در ادرار به این صورت است که ابتدا نمونه‌های مورد نظر با روش‌های غربالی<sup>۲</sup> آزمایش می‌شوند. پاسخ‌های مثبت حاصل از این روش‌ها به علت احتمال تداخل دارویی<sup>۳</sup> قابل اطمینان نبوده و با آزمونهای

تاییدی<sup>۴</sup> باید مجدداً آزمایش شوند (پاسخ‌های منفی حاصل از روش‌های غربالی که از حساسیت و دقت لازم برخوردارند، در صورت رعایت شرایط مربوط به نمونه‌گیری مناسب و اجرای روش صحیح آزمایش قابل قبول می‌باشند). روش‌های کروماتوگرافی (تاییدی) شامل: کروماتوگرافی کاغذی<sup>۵</sup> کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۶</sup> و گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی<sup>۷</sup> می‌باشند که روش اخیر از حساسیت، و قدرت تفکیک و دقت بسیار مناسب برخوردار بوده و بهترین روش استاندارد برای تایید آزمایش‌های تشخیص مواد مخدر می‌باشد. (۴) از آنجایی که این روش وابسته به دستگاه گران قیمت و نیاز به تخصص ویژه‌ای دارد، لذا استفاده از آن در تمام آزمایشگاه‌های تشخیص مواد مخدر امکان‌پذیر نمی‌باشد. روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی کاغذی روش‌هایی هستند که در غیاب روش گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در بین این دو روش کروماتوگرافی لایه نازک از حساسیت و قدرت بیشتری نسبت به کروماتوگرافی کاغذی برخوردار است و به زمان کمتری نیز برای انجام آزمایش نیاز دارد.

با توجه به این موارد در اولین دوره کنترل کیفی خارجی آزمایشگاه‌های تشخیص مواد مخدر در سراسر کشور که توسط مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس اجرا گردید، نمونه‌های ارسالی مجهول به گونه‌ای آماده شد که آزمایشگاه‌ها بتوانند با هریک از روش‌های کروماتوگرافی (کاغذی، لایه نازک، گاز کروماتوگرافی و...)، به تایید نتایج مثبت حاصل از روش‌های غربالی پرداخته و در صورت انجام صحیح آزمایش به پاسخ مناسب دست یابند.

4- Confirmation

5- Paper chromatography

6- Thin layer chromatography (TLC)

7- Gas chromatography Mass spectrometry (GC/MS)

1- False Positive

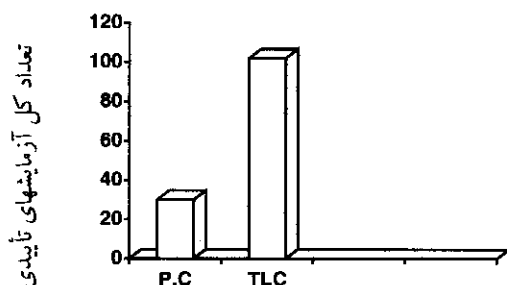
2- Screening Test

3- Cross reaction

کروماتوگرافی لایه نازک در معادل ۲۰ میلی لیتر نمونه ادرار توسط محلول کلروفورم-ایزوپروپانول (۱:۹) در  $\text{pH}=8.5$  و با استفاده از قیف دکانتور مرفین، کدئین و سایر مشتقات تریاک استخراج شده، پس از لکه گذاری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک توسط فاز متحرک در تانک کروماتوگرافی و با استفاده از استاندارد مربوط (مرفین و کدئین) آزمایش شده و تشخیص داده می شود (۶ و ۵). برای اطمینان از نمونه های تهیه شده حدود ۵۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب شده و در فواصل زمانی مختلف یک هفته ای به مدت ۲ ماه مورد آزمایش قرار گرفت و از مناسب بودن آنها از نظر تکرار پذیری و غلظت حد مرزی برابر  $300 \text{ ng/ml}$  اطمینان حاصل شد. در ضمن نمونه های کنترلی نیز بعد از یکسال نیز مورد آزمایش قرار گرفت و پاسخ مطلوب حاصل شد.

### نتایج

در این تحقیق بیش از ۹۰۰ نمونه مجهول از نظر مواد مخدر برای آزمایشگاه های تشخیص مرفین در ادرار سراسر کشور ارسال شد. از این تعداد حدود ۲۰۸ پاسخ از آزمایشگاه ها دریافت گردید. از کل پاسخ های دریافت شده تعداد ۳۰ مورد با روش کروماتوگرافی بر روی کاغذ جهت تایید نمونه های مثبت حاصل از آزمایش غربالی آزمایش شده است که از این تعداد، ۱۴ عدد از آنها پاسخ صحیح و ۱۶ مورد پاسخ اشتباه را ارائه نموده اند. (نمودار شماره ۱)



P.C: کروماتوگرافی کاغذی

TLC: کروماتوگرافی با روش لایه نازک

نمودار شماره (۱): مقایسه تعداد آزمایش های تاییدی انجام شده با دو روش کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی لایه نازک.

انستیتوی بین المللی سوء مصرف داروهای اعتیاد آور<sup>۱</sup> مرفین و کدئین را به عنوان داروهای هدف برای تشخیص و ارزیابی کمی سوء استفاده از تریاک تعیین کرده است. به علاوه غلظت حد مرزی<sup>۲</sup> لازم برای مرفین و کدئین را  $300 \text{ ng/ml}$  اعلام نموده است (۵). از این رو مناسب تر است که روش های غربالی تاییدی مورد استفاده، چنین خصوصیتی داشته باشند. در این میان روش گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی بهترین است.

در اولین دوره کنترل کیفی آزمایشگاه های تشخیص مواد مخدر، برای هر آزمایشگاه سه نمونه مجهول ادرار از نظر مواد مخدر، به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. این عمل توسط دستگاه لیوفیلیزاتور انجام گرفت. نمونه در حالت لیوفیلیزه نیاز به مکان کمتری برای حمل و نقل و نگهداری داشته به علاوه پایدارتر می گردد (۱). نمونه های مذکور شامل نمونه مثبت واقعی، مثبت کاذب و نمونه منفی انتخاب شد، تا همه موارد نمونه های معمول و همچنین انواع نتایج آزمایش را در بر داشته و بتوان یک آزمایش صحیح را پیگیری نمود. مرفین به عنوان مثبت واقعی، کدئین و متادون به عنوان مثبت کاذب در نظر گرفته شد. روش صحیح و مورد استفاده بدین گونه بوده است، که ابتدا نمونه ها را با یکی از روش های غربالی آزمایش نموده و نمونه های دارای نتایج مثبت را به روش کروماتوگرافی کاغذ یا کروماتوگرافی لایه نازک و در صورت دارا بودن امکانات، با روش های کاملتر مثل کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی مجدد آزمایش نموده و نتایج مثبت واقعی و کاذب را از هم تفکیک نمایند.

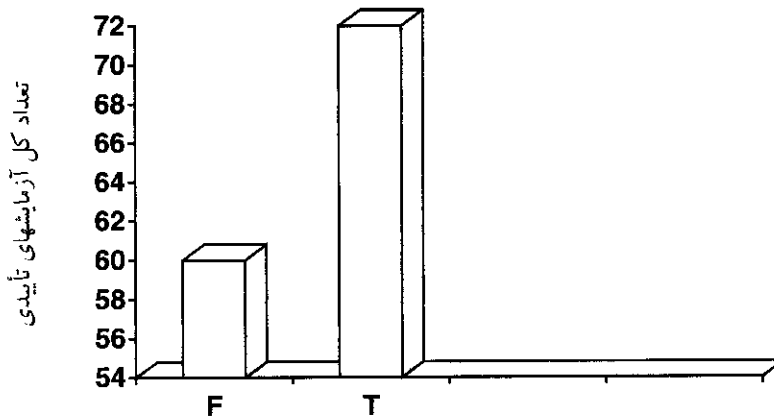
در روش کروماتوگرافی کاغذ در معادل پنجاه میلی لیتر نمونه ادرار توسط محلول کلروفورم-ایزوپروپانول (۱:۹) در  $\text{pH}=8.5$  و  $\text{pH}=12$  با استفاده از قیف دکانتور، مرفین، کدئین و سایر مشتقات را در صورت وجود استخراج کرده و پس از لکه گذاری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک توسط فاز متحرک در تانک کروماتوگرافی و با استفاده از استاندارد مربوطه (مرفین- کدئین) تشخیص داده می شود. در روش

1- National Institute on Drug Abuse (NIDA)

2 - Cut off

کاغذی و کروماتوگرافی لایه نازک) به منظور تایید نهایی مجدداً آزمایش نموده‌اند، که در مجموع تعداد ۶۰ مورد پاسخ نادرست و تعداد ۷۲ مورد پاسخ صحیح دریافت شد (نمودار شماره ۲). به عبارت دیگر حدود ۲۹٪ کل آزمایشگاه‌ها پاسخ غلط گزارش کرده‌اند.

از کل پاسخ‌های دریافت شده ۱۰۲ مورد با روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تایید نمونه‌های مثبت حاصل از روش‌های غربالی آزمایش شده است که از این تعداد ۵۸ مورد پاسخ صحیح و ۴۴ مورد پاسخ اشتباه ارائه نموده‌اند. در مجموع تعداد ۱۳۲ آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر، نتایج حاصل از روش‌های غربالی را با روش‌های تاییدی (کروماتوگرافی



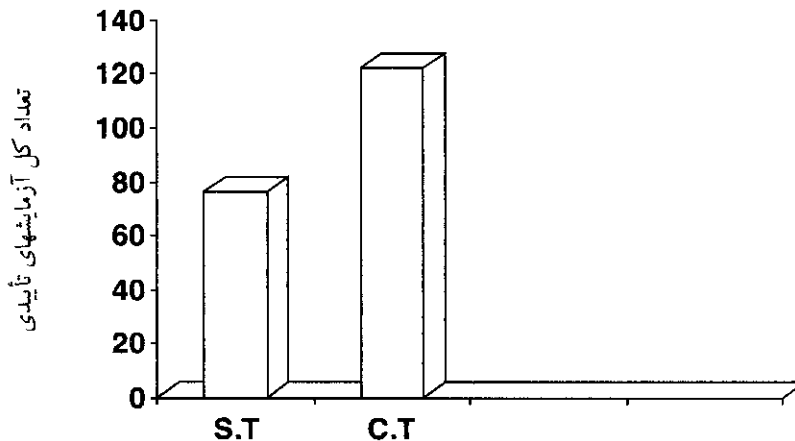
T: پاسخهای درست

F: پاسخهای نادرست

نمودار شماره (۲): مقایسه تعداد کل آزمایش‌های تاییدی درست (T) و نادرست (F).

پاسخ‌های دریافت شده تعداد ۷۶ آزمایشگاه فقط با انجام آزمایش غربالی نتیجه را گزارش کرده‌اند و آزمایش تاییدی را انجام نداده‌اند. به عبارت دیگر ۳۶٪ کل آزمایشگاه‌ها بدون انجام آزمایش تاییدی پاسخ نهایی را ارائه داده‌اند. (نمودار شماره ۳).

در ضمن هیچ یک از آزمایشگاه‌های اشاره شده از روش‌های گاز کروماتوگرافی و یا گاز کروماتوگرافی-طیف سنجی جرمی استفاده نکرده‌اند. تمامی آزمایشگاه‌ها از روش غربالی، برای آزمایش‌های اولیه استفاده کرده‌اند و تعداد ۱۳ آزمایشگاه نتیجه آزمایش غربالی را اشتباه گزارش نموده‌اند که در نتیجه آزمایش تاییدی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. از کل



ST: روش غربالی

CT: روش تأییدی

نمودار شماره (۳): مقایسه تعداد پاسخ‌هایی که فقط با روش غربالی (ST) ارسال شده با پاسخ‌های که توسط روش تأییدی (CT) ارائه شده‌اند.

### بحث

می‌شود که تعداد بسیاری (۲۹٪) از این آزمایشگاه‌ها پاسخ آزمایش تأییدی (کروماتوگرافی) و حتی مواردی آزمایش غربالی را نیز اشتباه اعلام کردند. بسیاری از آزمایشگاه‌ها حتی بدون انجام آزمایش تأییدی اقدام به ارائه پاسخ نهایی به مراجعان می‌نمایند (۳۷٪).

از آنجایی که ارائه هر گونه پاسخ اشتباه، مشکلات فراوانی را برای فرد مورد آزمایش و خانواده‌اش به وجود می‌آورد، لذا نظارت و کنترل پی در پی صحت و درستی روش‌های تشخیصی مرفین که در سراسر کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد (غربالی و تأییدی) و ارائه روش‌های استاندارد تشخیص ضروری می‌باشد بخشی از این امر، از وظایف آزمایشگاه‌های رفرانس کشور می‌باشد که با اجرای برنامه‌های آموزشی و کنترلی مطمئن پیگیری و رفع اشکال، در موارد فوق باید انجام گیرد.

تشخیص مرفین در ادرار افراد داوطلب ازدواج، استخدام، معرفی شدگان مشکوک و سایر موارد از نظر اجتماعی مسئله مهمی می‌باشد. با وجود اینکه آزمایشگاه‌ها و روش‌هایی که برای شناسایی مرفین به کار می‌رود تا حد زیادی قابل استناد هستند، ولی مواردی، به دلیل تداخل دارویی مشکلات زیادی برای فرد مورد آزمایش به وجود می‌آورند، هدف از این تحقیق، تفکیک صحیح نتیجه آزمایش مربوط به افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه می‌باشد که گاهی با یک پاسخ مثبت کاذب آبرو و اعتبارشان به خطر افتاده و مشکلات فراوانی دامنگیرشان می‌شود و یا با یک پاسخ منفی کاذب و برخورد ناآگاهانه و غیر منطقی پایه گذار گرفتاری‌های بسیاری برای انسان‌های بی‌گناه می‌شود. به علاوه در موارد قانونی و جنایی این گونه پاسخ‌های نادرست، پیامدهای بسیار ناگواری خواهد داشت. در بررسی نتایج اولیه دوره کنترل کیفی بیش از سیصد آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر در سراسر کشور مشاهده

## References

- 1- David E, Dennis A, et al: Preparation of excipient free recombinant human tissue-type plasminogen activator by lyophilization from ammonium Bicarbonate solution: An investigation of the two-Stage. Sublimation phenomenon. *J pharm sci*, 1999, 86(4):455-458.
- 2- Jeffery M, Eraley J, Gorsky E, et al: Urine drug testing in the clinical laboratory. Approved Guideline, NCCLS, 1999, 19(6):28.
- 3- Matthew JE, Donald GB: Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. 1st ed, Newyork, Elsevier, 1997:709.
- 4- Moffat AC, Jackson JV, et al: Clarkes Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body fluids, and post mortem maternal. 2<sup>nd</sup> ed, London the pharmaceutical press, 1986: 160-177.
- 5- Tai SSC, Christenesen RG, et al: The Certification of Morphine and Codeine in a Human Urine Standard Reference Material. *J Anal Toxicol*, 1994, 18:7-12.
- 6- Zen L, Pierre L, Olof B: Evolution of Analytical Procedures for Urinary Codeine and Morphine Measurements. *J Anal Toxicol*, 1999, 18:129-133.
- 7- Guidance for Prescription Use Drugs of Abuse Assays Remarket Notification, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration-Clinical Chemistry and Toxicology Branch, CDRH, November, 2000:5.