Comparison of immunochromatography, thin layer chromatography and gas chromatography techniques for drug detection in urine

Mohammad Ahmadian Khosrowshahi[1], Parvin Gharbani[2]

1. MSc Student, Department of Toxicology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3578-949X

2. Associate Professor, Department of Chemistry, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran., (Corresponding Author), Tel: 041-44228211, E-mail: p-gharbani@iau-ahar.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-1763-4993.

ABSTRACT

Background and Aim: Nowadays, drug abuse is a major problem in societies and, detection of drugs in urine is very important. In general, immunochromatography (ICG) and thin- layer chromatography (TLC) are routine methods for the detection of drugs in urine. These methods are rapid and economical, but their accuracy rates for detection of drugs at lower concenterations are low (< cut off). Morphine, amphetamine and methamphetamine, are conventional drugs that are widely used. The purpose of this study was to compare immunochromatography, thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) methods for detection of morphine, amphetamine and methamphetamine in the spiked healthy human urine samples and urine of addicted people. We also compared their detection limits with one another.

Materials and Methods: This was an experimental study and included urine samples obtained from healthy and addicted people referring to the laboratory of the 7th of Tir marriage counseling center in East Azerbaijan Province, in June 2016. After collection of urine samples, samples obtained from healthy people were spiked with various concentrations of morphine, amphetamine and methamphetamine. Then, all samples were tested by immunochromatography, TLC and GC methods for the detection of morphine, amphetamine and methamphetamine.

Results: Results showed that ICG and TLC methods can not detect lower concentrations (< cut off) of morphine, amphetamine and methamphetamine. While, GC can easily detect them in urine samples, even in lower concentrations (< cut off) and has a high detection limit and accuracy rate.

Conclusion: It can be concluded GC method is a powerful and accurate technique for detection of drugs in urine samples.

Keywords: Amphetamine, GC, ICG, Methamphetamine, Morphine, TLC

Received: Nov 30, 2018 **Accepted:** Oct 3, 2020

How to cite the article: Mohammad Ahmadian Khosrowshahi, Parvin Gharbani. Comparison of immunochromatography, thin layer chromatography and gas chromatography techniques for drug detection in urine. SJKU 2021;26(3):37-51.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / مرداد و شهریور ۱۴۰۰/۵۱-۳۷

مقایسه روش‌های ایمنوکروماتوگرافی، کروماتوگرافی با لایه‌نازک و کروماتوگرافی گازی در شناسایی مواد مخدر در نمونه ادرار

محمد احمدیان خسروشاهی[۱]، پروین غربانی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.کد ارکید: ۹۴۹X- ۳۵۷۸ -۰۰۰۲- ۰۰۰۰

۲. دانشیار، گروه شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۴۱-۴۴۲۲۸۲۱۱، پست الکترونیک: p-gharbani@iau-ahar.ac.ir، کد ارکید: ۴۹۹۳-۱۷۶۳-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، مصرف مواد مخدر یک مشکل جدی در جوامع بوده و تشخیص آن در نمونه ادرار خیلی مهم است. عموماً، برای تشخیص مواد مخدر در ادرار از روش‌های متداول ایمنوکروماتوگرافی (Immunochromatography, ICG) و کروماتوگرافی لایه‌نازک Thin Layer Chromatography, TLC استفاده می‌شود. این روش‌ها اقتصادی و سریع هستند، اما دقت آن‌ها در شناسایی مقادیر کم از مواد مخدر (Cut off>) بسیار کم است. مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین مواد مخدر متداولی هستند که به طور وسیعی استفاده می‌شوند. هدف این تحقیق، مقایسه روش‌های ایمنوکروماتوگرافی، کروماتوگرافی لایه‌نازک و کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography, GC) در تشخیص مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در نمونه‌های ادرار افراد سالم اسپایک شده با مواد مخدر و افراد معتاد و مقایسه حد تشخیص آن‌ها با هم است.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر به روش تجربی بر روی نمونه‌های ادرار افراد سالم و معتاد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکز مشاوره ازدواج هفتم تیر استان آذربایجان شرقی در خردادماه ۱۳۹۷ انجام‌یافته است. نمونه‌های ادرار جمع‌آوری‌شده و به نمونه‌های افراد سالم به طور دستی غلظت‌های مختلفی از مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین اضافه شد. سپس مقادیر مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین نمونه‌ها، با سه روش ICG، TLC و GC اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تکنیک‌های ICG و TLC قادر به تشخیص مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در مقادیر کمتر (Cut> off) نیستند. درحالی‌که، GC می‌تواند به‌راحتی وجود آن‌ها را در نمونه‌های حتی کمتر از Cut off آن‌ها تشخیص دهد و حد تشخیص و دقت بالایی دارد.

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که روش GC یک تکنیک قوی و دقیق در تعیین مواد مخدر در نمونه ادرار است.

واژه‌های کلیدی: آمفتامین، GC، ICG، مت‌آمفتامین، مورفین، TLC

وصول مقاله:۹۷/۹/۹ اصلاحیه نهایی:۹۹/۵/۱۶ پذیرش:۹۹/۷/۱۲

مقدمه

معضلات فردی و اجتماعی ناشی از اعتیاد به مواد مخدر، سبب درخواست آزمایش عدم اعتیاد در مواردی مانند ازدواج و استخدام شده است. به دلیل این‌که اعتیاد یک امر ناپسند و طرد شده در جامعه می‌باشد مصرف‌کنندگان مواد مخدر به هنگام آزمایش از روش‌هایی استفاده می‌کنند تا اعتیاد آن‌ها مشخص نشود(۱). مصرف‌کنندگان مواد مخدر برای گریز از نتایج مثبت آزمایش ادرار از سه روش کلی رقیق‌سازی نمونه ادرار، افزایش مواد مداخله‌گر و جابه‌جایی نمونه استفاده می‌نمایند. در جابه‌جایی نمونه، ادرار فرد معتاد با نمونه فرد سالم و یا ادرارهای مصنوعی جابه‌جا می‌شود(۴-۲). استفاده از مواد مداخله‌گر، به افزودن مستقیم مواد شیمیایی خانگی و یا قابل‌دسترس به ادرار، جهت تقلب در نتیجه آزمایش اطلاق می‌گردد. افزایش مواد شیمیایی قوی، سبب تخریب دارو و متابولیت‌های آن شده، به اجزای شناساگر نیز آسیب‌زده و نتایج منفی کاذب به بار می‌آورد(۲). معتادان از طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی خانگی و در دسترس برای انحراف نتایج آزمایش استفاده می‌کنند(۳). مواد غذایی مختلف و ویتامین‌ها باعث تغییر رنگ ادرار می‌شوند، ولی نمی‌توانند سبب ایجاد نتایج منفی کاذب در آزمایش تشخیص اعتیاد گردند و اغلب این رنگ‌ها در روش‌هایی مانند کروماتوگرافی جدا می‌شوند(۵). گروهی از مواد مداخله‌گر، خاصیت اکسیدکنندگی دارند و باعث تغییر ساختمان دارو و متابولیت‌های آن می‌شوند(۶). نیتریت‌ها نیز از جمله مواد رایج برای تداخل در آزمایش تعیین اعتیاد محسوب می‌شوند(۶). نمک‌های کرومات در تداخل، مشابه نیتریت عمل می‌کنند و خاصیت اکسیدکنندگی دارند. پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های اکسیداز هم از عوامل مداخله‌گری هستند که به فاکتورهای نهان معروف هستند، چراکه در ابتدا این عوامل مداخله‌گر به‌راحتی تشخیص داده نمی‌شوند(۷). صابون‌ها و دترژنت‌ها نیز با تشکیل میسل‌ها، داروهای هیدروفوب را در خود پنهان کرده و با تغییر ساختار فضایی آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌ها، باعث تداخل و کسب نتایج منفی کاذب می‌شوند(۸). یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین مسائلی که امروز در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مطرح است، شناسایی و تعیین مقدار صحیح داروها در نمونه خون و ادرار می‌باشد(۹). روش‌های شیمیایی و دستگاهی مورداستفاده در این روند، بسیار متنوع و گسترده بوده و برحسب نوع دارو متفاوت است. ازآنجائی‌که در بسیاری از روش‌های شیمیایی حد تشخیص میزان دارو پایین بوده و مقادیر کم دارو در خون یا ادرار قابل شناسایی نیست؛ لذا درصد خطا در برخی از آزمایش‌های تشخیص طبی بسیار زیاد است(۹). در اکثر آزمایشگاه‌ها، شناسایی مواد مخدر در ادرار با استفاده از TLCصورت می‌گیرد که این روش معایبی دارد. از جمله این‌که روشی با مراحل آزمایش متعدد بوده و آهسته انجام می‌شود؛ بنابراین برای نمونه‌های زیاد، روش مناسبی نیست(۱۰) و بهتر است از روش‌های دیگر برای شناسایی استفاده شود. باتوجه‌به اهمیت موضوع، در این تحقیق به مطالعه دقت سه روش ایمنوکروماتوگرافی (غربالگری)، کروماتوگرافی لایه‌نازک و کروماتوگرافی گازی در شناسایی مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در نمونه ادرار پرداخته شده است. تشخیص داروهای اعتیادآور و غیرمجاز در نمونه ادرار در دو مرحله اجرا می‌شود. اولین مرحله شامل آزمایش غربالی است که برای تشخیص و تفکیک نمونه‌های منفی از نمونه‌های مثبت احتمالی انجام می‌گردد. دومین مرحله، آزمایش‌های تأییدی برای اثبات شناسایی دارو یا متابولیت‌های آن است که احتمال وجود آن‌ها در مرحله غربالی مشخص شده است. روش‌های متنوعی جهت غربالگری اولیه وجود دارد که دو روش متداول در آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی - درمانی جهت غربالگری اولیه انجام می‌پذیرد که شامل روش ایمنوکروماتوگرافی (غربالگری سریع) و روش کروماتوگرافی لایه‌نازک TLC (روش تأییدی) می‌باشد(۱۰).

روش غربالی (ایمنوکروماتوگرافی):

در آزمایش غربالی، نمونه‌هایی که از نظر وجود داروی موردنظر یا متابولیت آن منفی هستند، از نمونه‌هایی که در آن‌ها دارو و یا متابولیت آن وجود دارد، جدا می‌شوند. ایمنوکروماتوگرافی یک روش ایمونواسی رقابتی بر روی نوارهای غشایی است. در این روش با قراردادن نمونه ادرار بر روی نوارهای غشایی دارای آنتی‌بادی ضد مورفین تهیه شده از سرم موش، نمونه بررسی می‌شود. چنانچه در نمونه ادرار، مورفین یا متابولیت‌های آن و جود داشته باشد با روش مهاجرت مویرگی به سمت بالا حرکت می‌کند و با آنتی‌بادی موجود پیوند (باند) می‌شود. در این صورت خط رنگی در نوار دیده نخواهد شد و نتیجه تست مثبت گزارش می‌گردد. البته خط دیگری به‌عنوان شاهد وجود دارد که باید در تمام حالات دیده شود. تشکیل خط رنگی تست، نشانگر اتصال کونژوگه مورفین و عدم حضور مورفین در ادرار است. این روش نیز با وجود حساسیت زیاد، با برخی داروها مانند کدئین نتایج مثبت کاذب ایجاد می‌کند. در تفسیر نتایج، اغلب از یک غلظت حد مرزی (Cut off) برای تصمیم‌گیری استفاده می‌شود. برای مثبت شدن تست باید میزان حداقل (Cut off) آن در نمونه موجود باشد. اگر نتیجه‌ی آزمایش نشانگر غلظت، هم‌سطح یا بیشتر از حد مرزی باشد، نتیجه آزمایش مثبت تلقی گردیده و نمونه برای آزمایش مرحله‌ی تأییدی، نگهداری می‌شود. چنانچه غلظت داروی مربوطه کمتر از حد مرزی باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می‌شود، حتی اگر مقداری از دارو یا متابولیت موردنظر در آن وجود داشته باشد. این مقدار برای مورفین در حدود ۳۰۰ ng/ml و برای آمفتامین و مت‌آمفتامین در حدود ۵۰۰ ng/ml می‌باشد.

غلظت حد مرزی (Cut off Concentration):

غلظت حد مرزی آستانه‌ای است که نمونه‌های مثبت را از منفی جدا می‌کند. چنانچه غلظت ماده شیمیایی بیشتر از حد مرزی باشد، مثبت و اگر کمتر از آن باشد منفی در نظر گرفته می‌شود. برای اطمینان در قابلیت تکرار نتایج حاصله، غلظت حد مرزی بیشتر از محدوده قابل تشخیص ماده مورد آزمایش، در نظر گرفته می‌شود.

روش تأییدی (کروماتوگرافی لایه‌نازک):

کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) یک روش نسبتاً عمومی است. در TLC باتوجه‌به RF (نسبت فاصله‌ای که لکه از محل نمونه‌گذاری طی می‌کند تا متوقف شود به فاصله‌ای که فاز متحرک طی می‌کند) و واکنش رنگی که بین دارو (ماده مورد آزمایش) و معرف‌های کروموژنیک صورت می‌گیرد، می‌توان وجود یک ماده به‌خصوص را نشان داد. ازآنجایی‌که بیش از یک ماده ممکن است در سیستم آزمایشی، مشخصات مشابهی از خود نشان دهد، بدین‌جهت، این روش نمی‌تواند به طور کامل و جامع یک دارو یا مواد متابولیت حاصل از آن را در یک مخلوط شناسایی کند. درهرصورت ازآنجایی‌که داشتن مشخصات مشابه در یک سیستم آزمایشی نسبتاً کم است و تعداد موادی که در مخلوط وجود دارند محدود هستند، اغلب روشTLC شواهد کافی برای شناسایی وجود یک آنالیت (ماده مورد آزمایش) به‌خصوص را در اختیار قرار می‌دهد. ازآنجائی‌که تشخیص ماده مورد آزمایش به تجربه فرد آزمایشگر بستگی دارد، مرز تشخیصی از یک فردبه‌فرد دیگر متفاوت است؛ بنابراین آموزش صحیح و منسجم و شرکت در برنامه‌های آموزشی بسیار مهم است.

تحقیقی مطالعه حساسیت، ویژگی و کارایی کیت‌های ادراری مورفین چک در تشخیص مصرف مواد افیونی بررسی شد. در مجموع ۹٪ نتیجه کاذب نشان داد و حساسیت مورفین چک ۸۴/۱۵٪، ویژگی آن ۹۵/۷۶٪، ارزش پیش‌بینی مثبت ۹۳/۲۴٪، ارزش پیش‌بینی منفی۸۹/۶۸٪ و کارایی تست ۹۱٪ به دست آمد. در واقع مصرف داروها یا مواد غیر افیونی نیز به طور قابل‌توجهی، احتمال منفی شدن تست را افزایش می‌دهند(۱۱). در تحقیق دیگر در استخراج کدئین از ادرار انسان به کمک فاز مایع – مایع، سطح زیر منحنی مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده در گاز کروماتوگرافی به طور قابل‌توجهی بیشتر از نمونه‌های

هیدرولیز نشده بود و بازیافت روش فوق نیز ۸۹٪ بود(۱۲). در تحقیقی استخراج مورفین از ادرار انسان به کمک روش‌های مایع - مایع و فاز جامد و مقایسه آن‌ها توسط دانسیتومتر، اسکنر لیزری انجام گرفت. هر دو روش در نمونه‌های هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده به‌خوبی کارا بودند و سطح زیر منحنی مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود(۱۳). در تحقیقی تشخیص مورفین و کدئین در ادرار انسان به‌وسیله اسپکترومتری گاز کروماتوگرافی جرمی انجام گرفت. مقادیر دقت زیر ۱۳٪ و صحت آن در رنج ۱۰۸/۵-۷۸/۲٪ بودند(۱۴). در تحقیقی تشخیص مشتقات آمفتامین، مت‌آمفتامین و هیدروکسی آمفتامین در ادرار به‌وسیله اسپکترومتری گاز کروماتوگرافی جرمی و ارتباط آن با فنوتیپ CYP2D6 در استفاده‌کنندگان مواد انجام گرفت(۱۵). در تحقیقی آنالیز کدئین استیله شده و مورفین در ادرار به‌وسیله GC و TLC انجام گرفت. در این روش حداقل مقدار ۰/۵ mg از کدئین و مورفین در هر لیتر به‌صورت آزاد و باهم قابل‌شناسایی بودند(۱۶). در تحقیقی مقایسه ELISA و TLC در تشخیص مورفین در ادرار انجام گرفت. در آنالیز نمونه‌ها به‌وسیله TLC، ۸۱٪/۴ نقاط مورفین آشکار بودند درحالی‌که به‌وسیله روش ELISA تمام نمونه‌ها مثبت بودند. ۱۸/۶٪ موارد مثبت کاذب به علت تداخلات دارویی بود(۱۷). یک روش برای تائید وجود همزمان کدئین، مورفین، ۶- استیل مورفین، هیدروکدون، هیدرومورفون، اکسی کدون و اکسی مورفون در نمونه‌های ادرار به‌وسیله GC-MC ارائه شد. ضریب تغییر برای ۶- استیل مورفین ۱۲٪ درهر دو مقدار ۳۰ng/ml و ۱۵۰ng/ml بدست آمد(۱۸). در مطالعه‌ای استخراج سریع مقدار آنالرژیک‌های مواد مخدر از مواد بیولوژیکی انسان و آنالیز هر ماده جدا شده با اسپکتروفتومتری UV-Vis، TLC و کروماتوگرافی گاز - مایع بررسی شدند. زمانی‌که هیدروکسیل‌های فنلی آزاد داروی آنالرژیک عوض شد، شیفت باتوکرومیک مشاهده نشد(۱۹). در تحقیق که شناسایی مورفین وکدئین در ادرار معتادان با روش آنالیز TLC مورد ارزیابی قرار گرفت، ۱۰۰٪ از نمونه‌های ادرار حاوی مواد قلیایی و ۲۵٪ آن‌ها شامل برهمکنش‌های دارویی بودند(۲۰).

باتوجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به مطالعه دقت سه روش مختلف شناسایی مواد مخدر در نمونه ادرار پرداخته شده است؛ لذا در این تحقیق نمونه‌های ادرار با سه روش ایمنوکروماتوگرافی (غربالگری)، کروماتوگرافی لایه‌نازک و کروماتوگرافی گازی از نظر وجود مواد مخدر بررسی شده و قابلیت آن‌ها در شناسایی مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در نمونه‌های مختلف مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

روش تحقیق:

تحقیق حاضر از نوع کاربردی و از نظر پژوهشی case report است. برای انجام نتایج آماری از آزمون مجذور کای χ^2 (Chi-squared test) استفاده شد. جامعه آماری در مطالعه حاضر، نمونه‌های ادرار افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز مشاوره ازدواج هفتم تیر استان آذربایجانشرقی در خرداد ماه ۱۳۹۷ بود. از این تعداد، ۵ نمونه ادرار افراد معتاد تست شدند.

مواد مورداستفاده:

NaOH و متانول از شرکت مرک آلمان، محلول استاندارد مورفین از شرکت ویرانوین طب زاگرس ایران و معرف رنگ‌زا هگزا کلرو پلاتینات از شرکت بهارافشان ایران خریداری شدند. کیت TLC از شرکت ویرانوین طب زاگرس ایران و نوار تست غربالگری (روش ایمنو کروماتوگرافی) سه‌تایی تشخیص مرفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین از شرکت حنان طب پارس ایران فراهم شدند.

دستگاه‌های مورداستفاده:

از pH متر دیجیتال مدل AZ868، شیکر مدل LS-100 ساخت شرکت لاب ترون ایران، سانتریفیوژ مدل BH-1200 ساخت شرکت بهداد ایران، تانک TLC مدل LLL-130 ساخت آلمان، پوار اسپری معرف رنگ‌زا ساخت ایران، هیتر Artheamd ساخت ایتالیا، گاز کروماتوگرافی (GC) مدل Clarus500 ساخت شرکت (USA) PerkinElmerS و کارتریج SPE (Supelcol, Bellefonte, PA) استفاده شد.

روش آزمایش:

ابتدا نمونه‌گیری ادرار به شکل صحیح و تحت نظارت انجام شد. سپس با روش ایمنوکروماتوگرافی (ICG) به‌وسیله نوار تست سه‌تایی (مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین)، نمونه‌های ادرار از نظر وجود مواد فوق بررسی شدند. در صورت مثبت بودن نتایج آزمایش با این روش، pH نمونه‌های ادرار اندازه‌گیری شده و به‌وسیله سود ۴ نرمال،pH آن‌ها در محدوده ۹-۸/۵ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از روش TLC و همچنین GC شناسایی شدند. نمونه‌های موردنیاز برای نگهداری جهت آزمایش GC در دمای ۲۰- درجه سلسیوس فریز شدند.

روش آنالیز مواد مخدر در نمونه‌های ادرار:

ایمنوکروماتوگرافی (نوار تست غربالگری سه‌تایی تشخیص مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در ادرار)

این تست جهت تشخیص مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در ادرار مورداستفاده قرار می‌گیرد. حساسیت این تست برای مورفین در حدود ng/ml ۳۰۰ و برای آمفتامین و مت‌آمفتامین در حدود ng/ml ۵۰۰ می‌باشد.

کیت کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC):

کیت طراحی شده، جهت تشخیص مواد مخدر و روان‌گردان‌های صناعی کاربرد دارد. ساختار این کیت بر اساس دو مرحله اصلی استخراج مایع - مایع و جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌نازک می‌باشد.

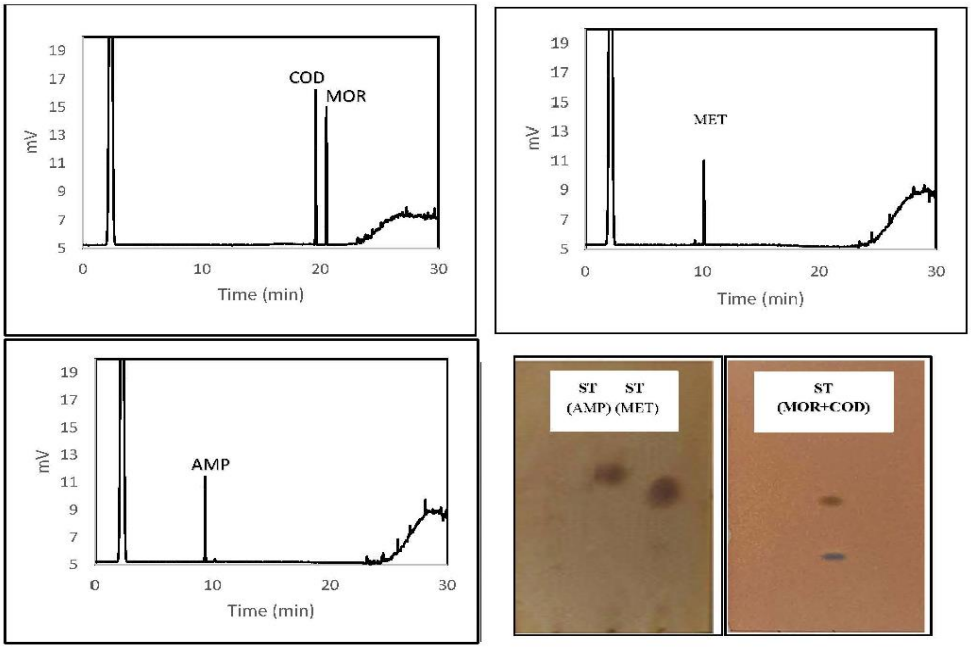
کروماتوگرافی گازی:

ماده مورد آنالیز تحت‌فشار گاز در طول ستون کروماتوگرافی حرکت کرده و در نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و شناسایی می‌شود. در این آزمایش برای آنالیز با GC، ۲ میلی‌لیتر از نمونه ادرار به داخل یک کارتریج SPE ریخته شده و pH آن با NaOH به ۱۰ رسانده شد. سپس کارتریج با ml ۰/۵ متانول شستشو داده شد. بعد محلول خارج شده از کارتریج در هوای آزاد خشک شده و دوباره در۵۰µl متانول حل شد. سپس ۱µl از محلول حاصل به GC تزریق گردید. از دستگاه گاز کروماتوگرافی HP-5MS (J&w ScientificUSA) با مشخصات زیر استفاده شد: مشخصات ستون: طول (۳۰cm)، قطر داخلی (۰/۲۵mm)، ضخامت فاز ساکن (۰/۲۵µm)، برنامه دمایی: ابتدا دمای ℃ ۸۰ با سرعت$℃/min$ ۱۰ تا۲۰۰ شروع شده وسپس با سرعت $℃/min$ ۵ تا ۲۷۰ به مدت ۴ دقیقه ادامه یافت. دتکتور مورداستفاده FID بود.

یافته‌ها

نتایج نمونه‌های استاندارد:

برای بررسی دقیق‌تر و اطمینان از شناسایی مورفین و کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین، نمونه استاندارد این ترکیبات با استفاده از روش‌های TLC وGC شناسایی شد. شکل ۱ تصاویر نتایج TLC و GC نمونه استاندارد مورفین - کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین را نشان می‌دهد. مطابق طیف‌های GC، زمان بازداری مورفین، کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین به ترتیب ۲۰/۵۶، ۱۹/۶۳، ۹/۳۶ و ۱۰/۲۱ دقیقه است.



شکل ۱. نتایج TLC و کروماتوگرام GC نمونه‌های استاندارد مورفین - کدئین، آمفتامین، مت‌آمفتامین

نتایج ICG، TLC و کروماتوگرام GC مربوط به نمونه ادرار فرد سالم:

برای داشتن نمونه شاهد، نمونه ادرار یک فرد سالم با هر سه روشICG، TLC و GC تست شد. مطابق نتایج حاصل، در ICG، نمونه شاهد قلیایی از نظر مورفین - کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی بود. در پلیت TLC نیز نمونه از هر سه لحاظ منفی بود. در نتایج GC نیز باتوجه‌به نمودار کروماتوگرام نمونه‌های استاندارد، نمونه ادرار فرد سالم از نظر کدئین، مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی بود.

نتایج ICG، TLC و GC برای نمونه ادرار اسپایک شده با غلظت‌های مختلف از مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین:

برای بررسی حد تشخیصICG، TLC و GC در شناسایی مورفین، کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین باتوجه به Cut off آن‌ها، به نمونه‌های ادرار افراد سالم، مقادیر بالاتر و پایین‌تر از Cutoff مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین اضافه شده و این نمونه‌ها با روشICG، TLC و GC تست شدند تا قابلیت هر روش در شناسایی مورفین، کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین به دست آید.

شناسایی مورفین - کدئین:

نتایج نمونه‌های ادرار اسپایک شده با مقدار ng/ml ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ از مورفین -کدئین ، با سه روش ICG، TLC و GC آنالیز شدند. در روش نواری برای هر سه غلظت، نتیجه مثبت بدست آمد. در آزمایش تکمیلی به روش TLC در روی پلیت نیز در غلظت ng/ml ۱۰۰، هر دو منفی، در غلظت ng/ml ۲۰۰، کدئین مثبت و مورفین منفی و در غلظت ng/ml۴۰۰ نیز، نتایج کدئین و مورفین مثبت بود. در گاز کروماتوگرافی، کدئین در غلظت ng/ml ۱۰۰ با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۱۴۶۳ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۹۶۱ نشان داده شد. کدئین در غلظت ng/ml ۲۰۰ با زمان باز داری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۲۷۸۹ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۱۹۲۳ آشکار شد. در غلظت ng/ml ۴۰۰ نیز، کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۵۴۶۹ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۳۷۶۵ آشکار شد (جدول ۱).

شناسایی آمفتامین:

نتایج ICG، TLC و GC برای آمفتامین با غلظتng/ml ۶۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ در ادرار اسپایک شده انجام شد. نتیجه آزمایش به روش نواری در غلظت ng/ml ۱۰۰ منفی، در غلظت ng/ml ۲۰۰ منفی و در غلظت ng/ml ۶۰۰ مثبت بود. در پلیت TLC نیز هیچ لکه‌ای در مقابل لکه استاندارد مربوط به آمفتامین با غلظت ng/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ مشاهده نشد؛ لذا نتیجه منفی بود، درحالی‌که در غلظت ng/ml۶۰۰، نتیجه مثبت بود. در گاز کروماتوگرافی، آمفتامین در غلظت ng/ml ۱۰۰ با زمان بازداری ۹/۳۶ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۵۹۳ ، در غلظت ng/ml ۲۰۰ با زمان بازداری ۹/۳۶ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۱۱۳۴ و در غلظت ng/ml ۶۰۰ با زمان بازداری/۹ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s۳۴۷۲ ظاهر شد (جدول ۲).

شناسایی مت‌آمفتامین:

نتایج حاصل از شناسایی مت‌آمفتامین با غلظتng/ml ۶۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ در نمونه ادرار اسپایک شده به سه روش ICG ، GC TLC انجام شد. نتیجه آزمایش به روش نواری در غلظت ng/ml ۱۰۰ و ۲۰۰ منفی و در غلظت ng/ml ۶۰۰ مثبت بود. در پلیت TLC نیز هیچ لکه‌ای در مقابل لکه استاندارد مربوط به مت‌آمفتامین با غلظت ng/ml ۱۰۰ و ng/ml ۲۰۰ مشاهده نشد، پس نتیجه منفی بود. درحالی‌که در غلظت ng/ml ۶۰۰، نتیجه مت‌آمفتامین مثبت بود. در کروماتوگرام GC، مت‌آمفتامین در غلظت ng/ml ۱۰۰ با زمان بازداری ۱۰/۲۱ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۷۲۳، در غلظت ng/ml ۲۰۰ با زمان بازداری ۱۰/۲۱ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۱۴۲۵ و در غلظت ng/ml ۶۰۰ با زمان بازداری ۱۰/۲۱ و سطح زیر پیک mv/s ۴۲۴۹ به دست آمد (جدول ۳).

طبق جدول ۱ ملاحظه می‌شود تست‌های ICG و CG برای غلظت‌های مختلف مورفین تزریق شده به ادرار افراد سالم مثبت بوده و درصورتی‌که تست TLC برای نمونه‌های با غلظت مورفینmg/L ۱۰۰ و ۲۰۰ درست تشخیص داده نشده است.

طبق جدول ۲ ملاحظه می‌شود نتایج تست ICG و TLC نمونه‌ها برای غلظت‌های آمفتامینmg/L ۱۰۰ و ۲۰۰ صحیح تشخیص داده نشده و نتیجه منفی گزارش شده است. درصورتی‌که تست GC برای تمام غلظت‌های آمفتامین تزریق شده به نمونه‌های ادرار به‌صورت صحیح و مثبت تشخیص داده است.

طبق جدول ۳ ملاحظه می‌شود بر اساس تست ICG و TLC برای غلظت‌های ng/mL ۱۰۰ و ۲۰۰ از مت‌آمفتامین، نتایج صحیح تشخیص داده نشده و نتیجه گزارش شده منفی است. درصورتی‌که بر اساس تست GC برای تمام غلظت‌های مت‌آمفتامین تزریق شده به نمونه‌های ادرار به‌صورت صحیح و مثبت تشخیص‌داده‌شده است.

جدول ۱. نتایج تست مورفین

GC	TLC	ICG	**غلظت** (ng/mL)
مثبت	منفی	مثبت	۱۰۰
مثبت	منفی	مثبت	۲۰۰
مثبت	مثبت	مثبت	۴۰۰
۱۰۰ درصد	۳۳/۳ درصد	۱۰۰ درصد	درصد تشخیص صحیح

جدول ۲. نتایج تست آمفتامین

تست GC	**تست** TLC	**تست** ICG	**غلظت** (ng/mL)
مثبت	منفی	منفی	۱۰۰
مثبت	منفی	منفی	۲۰۰
مثبت	مثبت	مثبت	۶۰۰
۱۰۰ درصد	۳۳/۳ درصد	۳۳/۳ درصد	درصد تشخیص صحیح

جدول ۳. نتایج تست مت‌آمفتامین

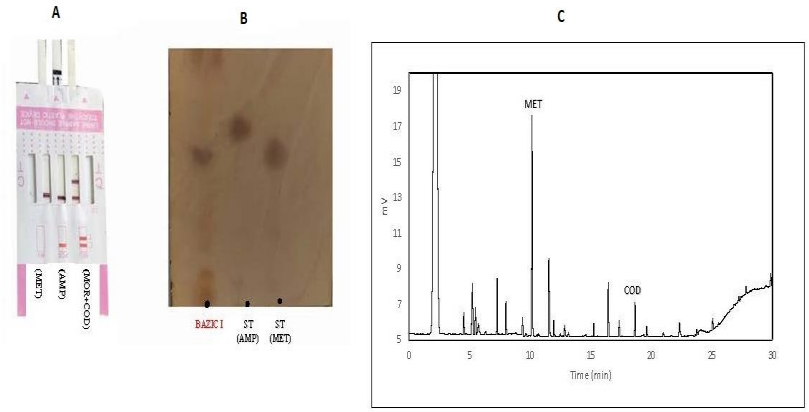
تست GC	**تست** TLC	**تست** ICG	**غلظت** (ng/mL)
مثبت	منفی	منفی	۱۰۰
مثبت	منفی	منفی	۲۰۰
مثبت	مثبت	مثبت	۶۰۰
۱۰۰ درصد	۳۳/۳درصد	۳۳/۳ درصد	درصد تشخیص صحیح

نتایج ICG، TLC و کروماتوگرام GC برای نمونه‌های حقیقی:

برای مقایسه حد تشخیص روش‌های ICG، TLC و GC در تشخیص مواد مخدر در نمونه ادرار انسان، از نمونه‌های حقیقی استفاده شده است. نمونه‌های حاصل پس از جمع‌آوری با سه روش فوق تست شده و نتایج آن‌ها در شکل‌های ۲ تا ۶ آورده شده است.

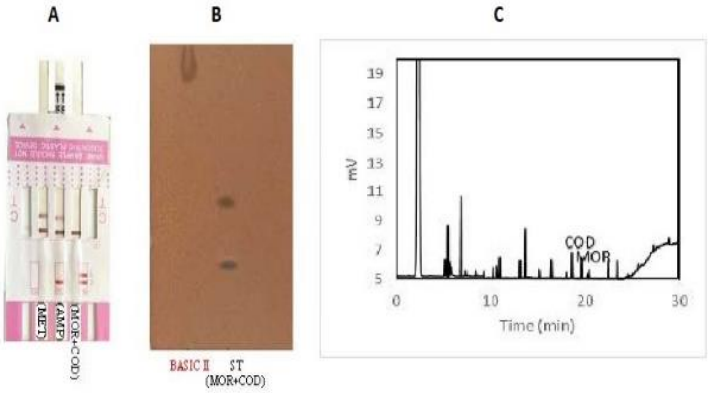
در شکل ۲، در ICG، نتایج نمونه حقیقی I قلیایی از نظر کدئین - مورفین منفی و از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین مثبت نشان داده شدند. در پلیت TLC، نمونه حقیقی I قلیایی به دلیل ظاهر نشدن لکه مقابل لکه استاندارد آمفتامین، از نظر آمفتامین منفی بود؛ اما از لحاظ مت‌آمفتامین نتیجه آن مثبت بود. برای بررسی دقیق‌تر، نمونه بعد از استخراج به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد.

باتوجه به نمودار کروماتوگرام GC، نتیجه کدئین و مت‌آمفتامین مثبت نشان داده شد. درحالی‌که نتیجه کدئین در روش نواری منفی بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۱۲۶۳ و مت‌آمفتامین نیز با زمان بازداری ۱۰/۲۱ دقیقه و سطح زیر پیک mv/s ۹۸۷۲ در نمودار کروماتوگرام ظاهر شدند. غلظت محاسبه شده برای کدئین بر اساس نمودار کالیبراسیون، ng/ml ۸۷ بود که پایین‌تر از مقدار Cut off برایICG و TLC بود؛ اما به علت حد تشخیص بالای GC، امکان شناسایی آن در GC امکان‌پذیر شد. غلظت محاسبه شده برای مت‌آمفتامین نیز بر اساس نمودار کالیبراسیون در حدود ng/ml ۱۳۹۷ بود که بالاتر از Cut off، ICG و TLC در شناسایی مت‌آمفتامین بود؛ لذا هر سه روش نسبت به مت‌آمفتامین مثبت نشان داده شدند.



شکل ۲. نتایج مربوط به نمونه حقیقی I قلیایی، A- ICG، B- پلیت TLC، C- کروماتوگرام GC

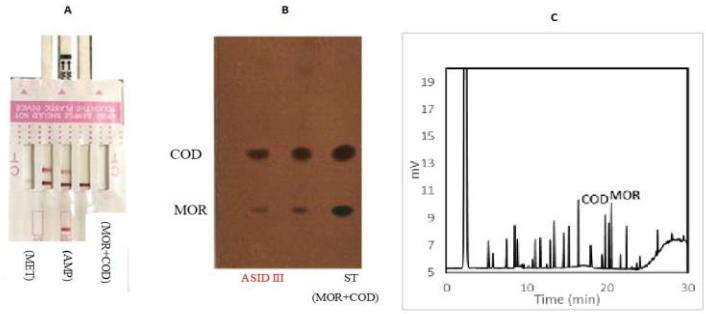
شکل ۳، نتایج ICG، TLC و GC نمونه ادرار حقیقی II قلیایی را نشان می‌دهد. مطابق شکل، در ICG، نتایج نمونه حقیقی II قلیایی از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی و از نظر وجود مورفین - کدئین مثبت بود. در پلیت TLC، نمونه حقیقی II قلیایی از نظر مورفین و کدئین منفی بود که به دلیل عدم ظهور لکه، مقابل لکه استاندارد مورفین - کدئین بود؛ اما باتوجه‌به نمودار کروماتوگرام GC، نتیجه کدئین و مورفین مثبت بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۱۹۴۲ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیکmv/s ۱۰۵۲ ظاهر شدند. بر اساس نمودار کالیبراسیون، غلظت محاسبه شده برای کدئین و مورفین به ترتیب ng/ml ۱۳۷ و ng/ml ۱۰۸ به دست آمد. مطابق با نتایج حاصل، کدئین با غلظت ng/ml ۱۳۷ و مورفین با غلظت ng/ml ۱۰۸ (<cut off) در ICG مشکوک بوده و TLC قادر به شناسایی آن‌ها نبوده است درحالی‌که روش GC به‌خوبی وجود هر دو را تأیید کرده است.



شکل ۳. نتایج مربوط به نمونه حقیقی II قلیایی، A - ICG، B- پلیت TlC ، C- نمودار کروماتوگرام GC

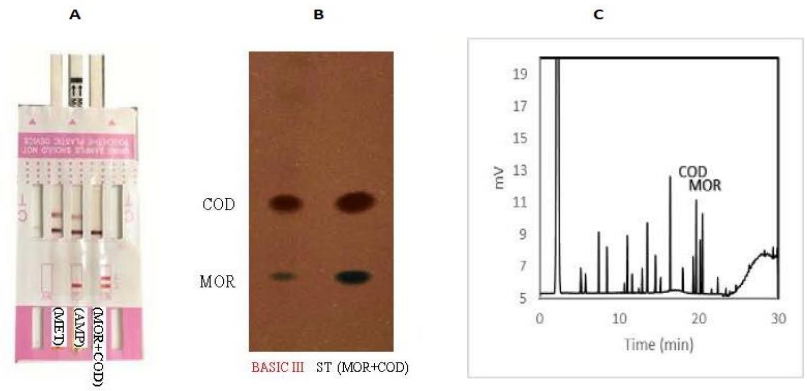
شکل ۴، نتایج ICG، TLC و کروماتوگرام نمونه ادرار حقیقی اسیدی III را نشان می‌دهد. مطابق شکل درICG، نمونه حقیقی اسیدی III از نظر مورفین - کدئین مثبت و از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی بود. در پلیت TLC نیز، نمونه حقیقی اسیدیIII از نظر مورفین و کدئین مثبت بود. در نمودار کروماتوگرام GC نیز نتیجه هر دو کدئین و مورفین مثبت بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک نمونهmv/s ۵۷۸۲ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک نمونهmv/s ۵۱۹۲ ظاهر شد. غلظت محاسبه شده برای کدئین و مورفین بر اساس نمودار

کالیبراسیون به ترتیب برابر ۴۲۳ ng/ml و ۵۵۴ ng/ml به دست آمد. چون غلظت کدئین و مورفین محاسبه شده برای نمونه حقیقی بیش از مقدارCut off (۴۰۰ ng/ml) آن‌ها بود، امکان شناسایی آن‌ها در دو روشICG و TLC وجود داشت.



شکل ٤. نتایج مربوط به نمونه حقیقی اسیدیIII: A -ICG، B- پلیت TLC، C- نمودار کروماتوگرام GC

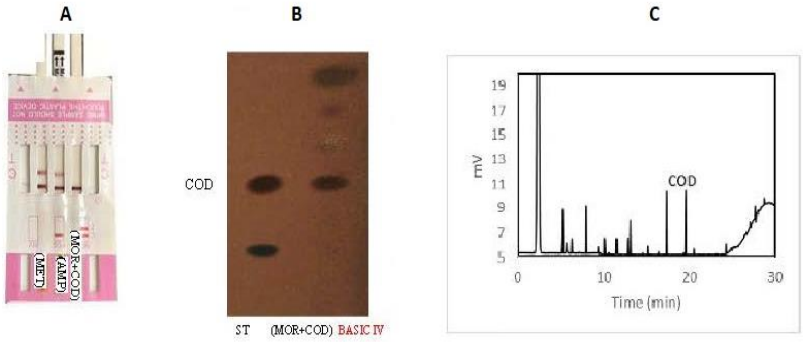
در شکل ۵، نتایج حاصل از شناسایی مورفین و کدئین در نمونه حقیقی قلیایی III با استفاده از سه روش ICG، TLC و GC نشان‌داده‌شده است. مطابق شکل ۵، در ICG، نمونه حقیقی قلیاییIII از نظر مورفین –کدئین مثبت و از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی است. در پلیت TLC نیز، نمونه حقیقی قلیایی III از نظر مورفین و کدئین مثبت بود. باتوجه‌به نمودار کروماتوگرام نتیجه هر دو کدئین و مورفین مثبت بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۶۲۱۱mv/s و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک۵۲۲۱ mv/s ظاهر شدند. بر اساس نمودار کالیبراسیون غلظت محاسبه شده برای مورفین، ۵۵۷ ng/ml و برای کدئین ۴۵۵ ng/ml به دست آمد. چون غلظت‌های حاصل بیش از مقدار Cut off آن‌ها بود؛ لذا در هر سه روش، کدئین و مورفین مثبت نشان داده شدند.



شکل ۵. نتایج مربوط به نمونه حقیقی قلیاییIII: A - ICG، B- پلیت TLC، C- نمودار کروماتوگرام GC

در شکل ۶، نمونه حقیقی IV قلیایی ادرار از لحاظ وجود مورفین و کدئین با سه روش ICG، TLC و GC بررسی شد. باتوجه‌به شکل ۶ در ICG، نمونه حقیقی IV قلیایی از نظر مورفین - کدئین مثبت و از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین منفی است. در پلیت TLC، در نمونه حقیقی IV قلیایی، مورفین منفی و کدئین مثبت بود. باتوجه‌به نمودار کروماتوگرام GC نیز نتیجه کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک۷۱۳۶ mv/s مثبت بود. غلظت

محاسبه شده برای کدئین در حدود ng/ml ۵۲۴ به دست آمد. چون مقدار کدئین موجود در نمونه ادرار IV حقیقی بیش از مقدار Cut off آن بود؛ لذا قابلیت تشخیص با هر سه روش را داشت.



شکل ٦. نتایج مربوط به نمونه حقیقی IV قلیایی: A – ICG، B– **پلت** TLC، C– **نمودار کروماتوگرام** GC

نتایج تست ICG، TLC، GC پنج نمونه ادرار افراد معتاد در جدول‌های ۴ تا ۶ خلاصه شده است. نتایج بررسی مورفین در ادرار افراد معتاد نشان می‌دهد که با این‌که تست ICG وجود مورفین را در نمونه ۵ تأیید کرده است؛ اما باتوجه‌به نتایج GC نمونه ۵ دارای مورفین نبوده و تست ICG با خطا آن را مثبت نشان داده است. همین‌طور نتایج تست TLC، نمونه ۲ را منفی نشان داده است درحالی‌که GC وجود مورفین را در ادرار تأیید کرده است (جدول ۴).

نتایج بررسی آمفتامین در نمونه ادرار افراد معتاد نشان می‌دهد که با این‌که تست ICG وجود آمفتامین را در نمونه ۱ تأیید کرده است، اما باتوجه‌به نتایج TLC وGC نمونه ۱ دارای آمفتامین نبوده وICG با خطا آن را مثبت نشان داده است (جدول ۵).

نتایج بررسی مت‌آمفتامین در ادرار افراد معتاد (جدول ۶) نشان می‌دهد که هر سه تست به طور صحیح وجود یا عدم وجود مت‌آمفتامین را در نمونه ادرار نشان داده‌اند.

برای بررسی مقایسه نتایج تست‌ها از آزمون مقایسه نسبت‌ها استفاده شد و همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود نتایج تست‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (سطوح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵).

جدول ٤. نتایج تست مورفین

تست GC	تست TLC	تست ICG	نمونه
منفی	منفی	منفی	۱
مثبت	منفی	مثبت	۲
مثبت	مثبت	مثبت	۳
مثبت	مثبت	مثبت	۴
منفی	منفی	مثبت	۵
۱۰۰ درصد	۸۰درصد	۸۰ درصد	درصد تشخیص صحیح

جدول ۵. نتایج تست آمفتامین

تست GC	تست TLC	تست ICG	نمونه
منفی	منفی	مثبت	۱
منفی	منفی	منفی	۲
منفی	منفی	منفی	۳
منفی	منفی	منفی	۴
منفی	منفی	منفی	۵
۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	۸۰ درصد	درصد تشخیص صحیح

جدول ٦. نتایج تست مت‌آمفتامین

تست GC	تست TLC	تست ICG	نمونه
مثبت	مثبت	مثبت	۱
منفی	منفی	منفی	۲
منفی	منفی	منفی	۳
منفی	منفی	منفی	۴
منفی	منفی	منفی	۵
۱۰۰درصد	۱۰۰ درصد	۱۰۰ درصد	درصد تشخیص صحیح

جدول ۷. مقایسه نتایج آزمون‌ها

سطح معنی‌داری	آزمون	آزمون
۰/۶۰۰	تست TLC	تست ICG
۰/۳۰۰	تست GC	تست TLC
۰/۴۰۰	تست ICG	تست GC

بحث

تهیه نمونه‌های ادرار اسپایک شده با مورفین – کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در غلظت‌های پائین‌تر و بالاتر از Cut off آن‌ها نشان داد که در مقادیر کمتر از Cut off نتایج TLC منفی بود، درحالی‌که در کروماتوگرام GC مقدار آن‌ها قابل‌تشخیص بود. برای نمونه‌ی ادرار اسپایک شده با مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین با غلظت‌های بیش از Cut off، با هر سه روش ICG، TLC و GC نتایج مثبت نشان داده شدند. بررسی نمونه‌های اسیدی و قلیایی ادرار نشان داد که اسیدی یا قلیایی کردن نمونه‌ها تأثیری در پاسخ تست ندارد و فقط نمونه‌های قلیایی در TLC، سریع‌تر پاسخ می‌دهند. بررسی نمونه ادرارهای حقیقی حاوی مورفین – کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین نشان داد که در غلظت‌های کمتر از Cut off نتایج TLC منفی و در مقادیر بیش از Cut off آن‌ها، به‌آسانی قابل تشخیص بودند. درحالی‌که با روش گاز کروماتوگرافی، مورفین – کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در مقادیر کمتر و بیشتر از cut off به‌راحتی قابل تشخیص بود. برطبق نتایج رضایی و غلامی (۲۰۱۴)، استفاده از کروماتوگرافی گازی می‌تواند به‌عنوان روشی حساس برای تعیین مقادیر بسیار اندک نیکوتین، ترامادول،

مت‌آمفتامین و کوکائین در نمونه‌های ادرار بکار رود(۲۱). در تعیین کدئین و مورفین در نمونه ادرار با گاز کروماتوگرافی، پس از استخراج کدئین و مورفین نمونه‌ها با روش استخراج فاز مایع - مایع و هیدرولیز با اسیدکلریدریک. نتایج نشان داد که سطح زیر منحنی مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده به طور قابل‌توجهی بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود(۲۲). درحالی‌که در پژوهش حاضر و بدون انجام هیدرولیز، نمونه‌ها حتی در مقادیر بسیار کم قابل تشخیص بودند.

نتیجه‌گیری

باتوجه‌به نتایج این پژوهش مشخص شد که علی‌رغم وقت‌گیر بودن روش GC، این روش توانست با اطمینان نمونه‌های ادرار اسپایک شده با مورفین – کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین را در غلظت‌های پائین تراز Cut off تشخیص دهد. روش GC از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است به‌طوری‌که قادر به شناسایی مقادیر کمتر از Cut-off مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در نمونه‌های ادرار است. درحالی‌که حساسیت، دقت و صحت روش TLC بسیار کمتر از GC است. بزرگ‌ترین ایراد روش GC، گران بودن و نیاز به متخصص برای اندازه‌گیری است؛ اما می‌توان گفت به علت تقلب‌های مختلف که امروزه برای نشان‌دادن نتایج منفی بر روی نمونه‌های ادرار صورت می‌گیرد، استفاده از این روش می‌تواند جلوی بسیاری از تقلب‌ها را گرفته و جامعه را از غوطه‌ور شدن در دام اعتیاد نجات دهد. باتوجه‌به استفاده از ستون‌های بسیار نازک و بلند (بین ۳۰ تا ۶۰ متر) در کروماتوگرافی گازی، راندمان جداسازی و شناسایی در این روش بالاتر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و آزمایشگاه مرکز مشاوره ازدواج هفتم تیر استان آذربایجان شرقی جهت همکاری در اجرای این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

1. Mikkelsen SL, Ash KO. Adulterants causing false negatives in illicit drug testing. Clin Chem. 1988; 34: 2333-2336.
2. George S, Braithwaite RA. The effect of glutaraldehyde adulteration of urine specimens on Syva EMIT II drugs-of-abuse assays. J Anal Toxicol. 1996 ; 20:195-206.
3. Tsai SC, ElSohly MA, Dubrovsky T, Twarowska B, Towt J, Salamone SJ. Determination of five abused drugs in nitrite-adulterated urine by immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry. J Anal Toxicol. 1998 ; 22:474-480.
4. Dasgupta A, Wahed A, Wells A. Rapid spot tests for detecting the presence of adulterants in urine specimens submitted for drug testing. Am J Clin Pathol. 2002;117:325-329.
5. Wu AH. Integrity of Urine Specimens for Toxicological Analysis-Adulteration, Mechanisms of Action, and Laboratory Detection. Forensic Sci Rev. 1998; 10:47-65.
6. Urry FM, Komaromy-Hiller G, Staley B, Crockett DK, Kushnir M, Nelson G, Struempler RE. Nitrite adulteration of workplace urine drug-testing specimens I. Sources and associated concentrations of nitrite in urine and distinction between natural sources and adulteration. J Anal Toxicol. 1998; 22:89-95.
7. Warner A. Interference of common household chemicals in immunoassay methods for drugs of abuse. Clin chem. 1989 ;35:648-51.
8. Cody JT. Specimen Adulteration in Drug Urinalysis. Forensic Sci Rev. 1990; 2:63-75.

9. Shoemaker MJ, Earley RJ, Gorsky JE, Jenny RW, Leiendecker-Foster C, Markus WR, et al. Urine Drug Testing in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 1999.
10. Henion J, Maylin GA, Thomson BA. Determination of drugs in biological samples by thin-layer chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogra A. 1983 ; 271: 107-124.
11. Sar Golzaei M, Zahravi M. Study of Sensitivity, Properties and Efficiency of Urine Morphine -Check Kits for Detection of Drugs Users. Ir J Forensic Med. 2001; 7 :19-28.
12.Tagavi A, Nazeri A, Sabzvari A, Fekri M, Afshar M. Extraction of Codeine from Human Urine Using High Performance Liquid-Liquid Extraction Phase and Study of Its quantity by Gas Chromatography. Res J Med Sci. 2001; 26 :287-290.
13. Extraction of morphine from human urine using Liquid-Liquid-Extraction method and solid phase and their comparison with Slit scanning densitometry. Res J Med Sci. 2003; 27:23-27
14. Zhang X, Chen M, Cao G, Hu G. Determination of morphine and codeine in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Anal Methods Chem. 2013;2013: 1-6.
15. Miranda-G E, Sordo M, Salazar AM, Contreras C, Bautista L, Rojas Garcia AE, et al. Determination of amphetamine, methamphetamine, and hydroxyamphetamine derivatives in urine by gas chromatography-mass spectrometry and its relation to CYP2D6 phenotype of drug users. J Anal Toxicol. 2007 ;31:31-36.
16. Jain NC, Sneath TC, Budd RD, Leung WJ. Gas chromatographic/thin-layer chromatographic analysis of acetylated codeine and morphine in urine. Clin chem. 1975 ;21:1486-1489.
17. Timcheh-Hariri A, Balali-Mood M, Sadeghi M, Lari N, Riahi-Zanjani B. Comparison of ELISA and TLC Methods for the Morphine Detection in Urine of Drug Abusers. Iran J Toxicol. 2016;10:47-50.
18. Meatherall R. GC-MS confirmation of codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and oxymorphone in urine. J Anal Toxicol 1999; 23:177-186.
19. Mule SJ. Determination of Narcotic Analgesics in Human Biological Materials. Application of Ultraviolet Spectrophotometry, Thin Layer and Gas Liquid Chromatography, Anal chem. 1974; 36: 1907-1914.
20. Rezai-Basiri M, Ghazi-Khansari M, Faghih A, Sadeghi M, Lotfalizadeh N, Eghbal M, et al. Screening of morphine & codeine in urine of opioid abusers by rapid and TLC analysis. Eur J Gen Med. 2010;7:192-196.
21. Rezaei M, Gholami M, The Recognition Chemicals in Fingerprints by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Quarterly Journal of Research on Addiction. 2014; 8, 69-79.
22. Zhang X, Chen M, Cao G, Hu G, Determination of morphine and codeine in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. J Anal Methods Chem. 2013; 3, 1-6.