

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

Mohammad Ahmadian Khosrowshahi¹, Parvin Gharbani²

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 concentrations 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

مقایسه روش‌های ایمنوکروماتوگرافی، کروماتوگرافی با لایه نازک 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 لایه نازک 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 لایه نازک 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 انجام یافته است. نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده 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 به راحتی 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 این که اعتیاد یک امر ناپسند و طرد شده در جامعه می باشد مصرف کنندگان مواد مخدر به هنگام آزمایش از روش هایی استفاده می کنند تا اعتیاد آن ها مشخص نشود (۱). مصرف کنندگان مواد مخدر برای گریز از نتایج مثبت آزمایش ادرار از سه روش کلی رقیق سازی نمونه ادرار، افزایش مواد مداخله گر و جابه جایی نمونه استفاده می نمایند. در جابه جایی نمونه، ادرار فرد معتاد با نمونه فرد سالم و یا ادرارهای مصنوعی جابه جا می شود (۴-۲). استفاده از مواد مداخله گر، به افزودن مستقیم مواد شیمیایی خانگی و یا قابل دسترس به ادرار، جهت تقلب در نتیجه آزمایش اطلاق می گردد. افزایش مواد شیمیایی قوی، سبب تخریب دارو و متابولیت های آن شده، به اجزای شناساگر نیز آسیب زده و نتایج منفی کاذب به بار می آورد (۲). معتادان از طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی خانگی و در دسترس برای انحراف نتایج آزمایش استفاده می کنند (۳). مواد غذایی مختلف و ویتامین ها باعث تغییر رنگ ادرار می شوند، ولی نمی توانند سبب ایجاد نتایج منفی کاذب در آزمایش تشخیص اعتیاد گردند و اغلب این رنگ ها در روش هایی مانند کروماتوگرافی جدا می شوند (۵). گروهی از مواد مداخله گر، خاصیت اکسیدکنندگی دارند و باعث تغییر ساختمان دارو و متابولیت های آن می شوند (۶). نیتريت ها نیز از جمله مواد رایج برای تداخل در آزمایش تعیین اعتیاد محسوب می شوند (۶). نمک های کرومات در تداخل، مشابه نیتريت عمل می کنند و خاصیت اکسیدکنندگی دارند. پراکسید هیدروژن و آنزیم های اکسیداز هم از عوامل مداخله گری هستند که به فاکتورهای نهان معروف هستند، چرا که در ابتدا این عوامل مداخله گر به راحتی تشخیص داده نمی شوند (۷). صابون ها و دترژنت ها نیز با تشکیل میسل ها، داروهای هیدروفوب را در خود پنهان کرده و با تغییر ساختار فضایی

آنتی بادی ها و آنزیم ها، باعث تداخل و کسب نتایج منفی کاذب می شوند (۸). یکی از مهم ترین و اساسی ترین مسائلی که امروز در آزمایشگاه های تشخیص طبی مطرح است، شناسایی و تعیین مقدار صحیح داروها در نمونه خون و ادرار می باشد (۹). روش های شیمیایی و دستگاهی مورد استفاده در این روند، بسیار متنوع و گسترده بوده و برحسب نوع دارو متفاوت است. از آنجائی که در بسیاری از روش های شیمیایی حد تشخیص میزان دارو پایین بوده و مقادیر کم دارو در خون یا ادرار قابل شناسایی نیست؛ لذا درصد خطا در برخی از آزمایش های تشخیص طبی بسیار زیاد است (۹). در اکثر آزمایشگاه ها، شناسایی مواد مخدر در ادرار با استفاده از TLC صورت می گیرد که این روش معایبی دارد. از جمله این که روشی با مراحل آزمایش متعدد بوده و آهسته انجام می شود؛ بنابراین برای نمونه های زیاد، روش مناسبی نیست (۱۰) و بهتر است از روش های دیگر برای شناسایی استفاده شود. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به مطالعه دقت سه روش ایمنوکروماتوگرافی (غربالگری)، کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی در شناسایی مورفین، آمفتامین و مت آمفتامین در نمونه ادرار پرداخته شده است. تشخیص داروهای اعتیاد آور و غیرمجاز در نمونه ادرار در دو مرحله اجرا می شود. اولین مرحله شامل آزمایش غربالی است که برای تشخیص و تفکیک نمونه های منفی از نمونه های مثبت احتمالی انجام می گردد. دومین مرحله، آزمایش های تأییدی برای اثبات شناسایی دارو یا متابولیت های آن است که احتمال وجود آن ها در مرحله غربالی مشخص شده است. روش های متنوعی جهت غربالگری اولیه وجود دارد که دو روش متداول در آزمایشگاه های مراکز بهداشتی - درمانی جهت غربالگری اولیه انجام می پذیرد که شامل روش ایمنوکروماتوگرافی (غربالگری سریع) و روش کروماتوگرافی لایه نازک TLC (روش تأییدی) می باشد (۱۰).

روش غربالی (ایمنو کروماتوگرافی):

در آزمایش غربالی، نمونه‌هایی که از نظر وجود داروی مورد نظر یا متابولیت آن منفی هستند، از نمونه‌هایی که در آن‌ها دارو و یا متابولیت آن وجود دارد، جدا می‌شوند. ایمنو کروماتوگرافی یک روش ایمنونواسی 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 وجود 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 مورد نظر 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 با توجه به 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 کروموزنیک صورت می‌گیرد، می‌توان وجود یک ماده به‌خصوص را نشان داد. از آنجایی که بیش از یک ماده ممکن است در سیستم آزمایشی، مشخصات مشابهی از خود نشان دهد، بدین جهت، این روش نمی‌تواند به طور کامل و جامع یک دارو یا مواد متابولیت حاصل از آن را در یک مخلوط شناسایی کند. در هر صورت از آنجایی که داشتن مشخصات مشابه در یک سیستم آزمایشی نسبتاً کم است و تعداد موادی که در مخلوط وجود دارند محدود هستند، اغلب روش TLC شواهد کافی برای شناسایی وجود یک آنالیت (ماده مورد آزمایش) به‌خصوص را در اختیار قرار می‌دهد. از آنجایی که تشخیص ماده مورد آزمایش به تجربه فرد آزمایشگر بستگی دارد، مرز تشخیصی از یک فرد به فرد 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 منفی ۸۹/۶۸٪ و کارایی تست ۹۱٪ به دست آمد. در واقع مصرف داروها یا مواد غیر افیونی نیز به طور قابل توجهی، 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 قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های

شناسایی مورفین و کدئین 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 آذربایجان شرقی در خرداد ماه ۱۳۹۷ بود. از این تعداد، ۵ نمونه ادرار افراد معتاد تست شدند.

مواد مورد استفاده:

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 مورفین، آمفتامین و مت‌آمفتامین از شرکت حنان طب پارس ایران فراهم شدند. دستگاه‌های مورد استفاده:

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 استیل 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 قابل شناسایی 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 تأیید 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٪ در هر دو مقدار ۳۰ ng/ml و ۱۵۰ ng/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

کروماتوگرافی گازی:

ماده مورد آنالیز تحت فشار گاز در طول ستون کروماتوگرافی حرکت کرده و در نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و شناسایی می شود. در این آزمایش برای آنالیز با GC، ۲ میلی لیتر از نمونه ادرار به داخل یک کارتریج SPE ریخته شده و pH آن با NaOH به ۱۰ رسانده شد. سپس کارتریج با ۰/۵ ml متانول شستشو داده شد. بعد محلول خارج شده از کارتریج در هوای آزاد خشک شده و دوباره در ۵۰ μl متانول حل شد. سپس ۱ μl از محلول حاصل به GC تزریق گردید. از دستگاه گاز کروماتوگرافی (J&w Scientific USA) HP-5MS با مشخصات زیر استفاده شد: مشخصات ستون: طول (۳۰ cm)، قطر داخلی (۰/۲۵ mm)، ضخامت فاز ساکن (۰/۲۵ μm)، برنامه دمایی: ابتدا دمای ۸۰ °C با سرعت ۱۰ °C/min تا ۲۰۰ شروع شده و سپس با سرعت ۵ °C/min تا ۲۷۰ به مدت ۴ دقیقه ادامه یافت. دکتور مورد استفاده FID بود.

یافته ها

نتایج نمونه های استاندارد:

برای بررسی دقیق تر و اطمینان از شناسایی مورفین و کدئین، آمفتامین و مت آمفتامین، نمونه استاندارد این ترکیبات با استفاده از روش های TLC و GC شناسایی شد. شکل ۱ تصاویر نتایج TLC و GC نمونه استاندارد مورفین - کدئین، آمفتامین و مت آمفتامین را نشان می دهد. مطابق طیف های GC، زمان بازداری مورفین، کدئین، آمفتامین و مت آمفتامین به ترتیب ۲۰/۵۶، ۱۹/۶۳، ۹/۳۶ و ۱۰/۲۱ دقیقه است.

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 رنگ زا ساخت ایران، هیتز Artheamd ساخت ایتالیا، گاز کروماتوگرافی (GC) مدل Clarus500 ساخت شرکت (USA) PerkinElmerS و کارتریج SPE (Supelcol, Bellefonte, PA) استفاده شد.

روش آزمایش:

ابتدا نمونه گیری ادرار به شکل صحیح و تحت نظارت انجام شد. سپس با روش ایمنو کروماتوگرافی (ICG) به وسیله نوار تست سه تایی (مورفین، آمفتامین و مت آمفتامین)، نمونه های ادرار از نظر وجود مواد فوق بررسی شدند. در صورت مثبت بودن نتایج آزمایش با این روش، pH نمونه های ادرار اندازه گیری شده و به وسیله سود ۴ نرمال، pH آن ها در محدوده ۸/۵-۹ تنظیم شد. سپس نمونه ها با استفاده از روش TLC و همچنین GC شناسایی شدند. نمونه های مورد نیاز برای نگهداری جهت آزمایش GC در دمای ۲۰- درجه سلسیوس فریز شدند.

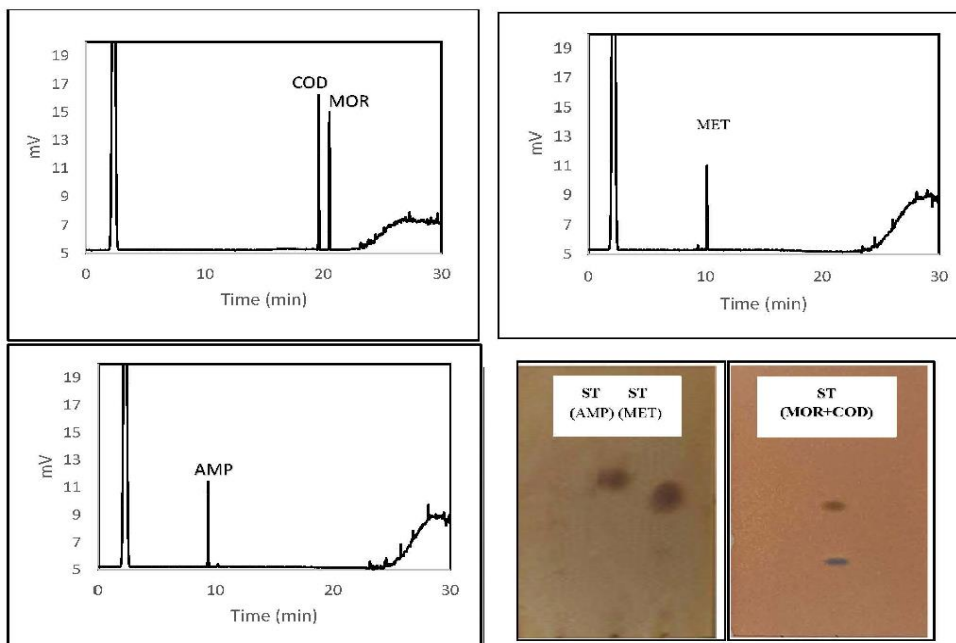
روش آنالیز مواد مخدر در نمونه های ادرار:

ایمنو کروماتوگرافی (نوار تست غربالگری سه تایی تشخیص مورفین، آمفتامین و مت آمفتامین در ادرار)

این تست جهت تشخیص مورفین، آمفتامین و مت آمفتامین در ادرار مورد استفاده قرار می گیرد. حساسیت این تست برای مورفین در حدود ۳۰۰ ng/ml و برای آمفتامین و مت آمفتامین در حدود ۵۰۰ ng/ml می باشد.

کیت کروماتوگرافی لایه نازک (TLC):

کیت طراحی شده، جهت تشخیص مواد مخدر و روان گردان های صنعتی کاربرد دارد. ساختار این کیت بر اساس دو مرحله اصلی استخراج مایع - مایع و جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک می باشد.



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

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

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

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

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

شناسایی مورفین - کدئین:

نتایج نمونه‌های ادرار اسپایک شده با مقدار ۴۰۰ ng/ml، 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 ۱۰۰ ng/ml، هر دو منفی، در غلظت ۲۰۰ ng/ml، کدئین مثبت و مورفین منفی و در غلظت ۴۰۰ ng/ml نیز، نتایج کدئین و مورفین مثبت بود. در گاز کروماتوگرافی، کدئین در غلظت ۱۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۴۶۳ mv/s و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۹۶۱ mv/s نشان داده شد. کدئین در غلظت ۲۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۲۷۸۹ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۹۲۳ mv/s آشکار شد. در غلظت ۴۰۰ ng/ml نیز، کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۵۴۶۹ و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۳۷۶۵ mv/s آشکار شد (جدول ۱).

شناسایی آمفتامین:

نتایج TLC, ICG و GC برای آمفتامین با غلظت ng/ml ۶۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ در ادرار اسپایک شده انجام شد. نتیجه آزمایش به روش نواری در غلظت ۱۰۰ ng/ml منفی، در غلظت ۲۰۰ ng/ml منفی و در غلظت ۶۰۰ ng/ml مثبت بود. در پلیت TLC نیز هیچ لکه‌ای در مقابل لکه استاندارد مربوط به آمفتامین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ ng/ml مشاهده نشد؛ لذا نتیجه منفی بود، درحالی که در غلظت ۶۰۰ ng/ml نتیجه مثبت بود. در گاز کروماتوگرافی، آمفتامین در غلظت ۱۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۹/۳۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۵۹۳ mv/s، در غلظت ۲۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۹/۳۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۱۳۴ mv/s و در غلظت ۶۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۹/ دقیقه و سطح زیر پیک ۳۴۷۲ mv/s ظاهر شد (جدول ۲).

شناسایی مت‌آمفتامین:

نتایج حاصل از شناسایی مت‌آمفتامین با غلظت ۶۰۰ ng/ml، ۲۰۰، ۱۰۰ در نمونه ادرار اسپایک شده به سه روش ICG، TLC و GC انجام شد. نتیجه آزمایش به روش نواری در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ ng/ml منفی و در غلظت ۶۰۰ ng/ml مثبت بود. در پلیت TLC نیز هیچ لکه‌ای در مقابل لکه استاندارد مربوط به مت‌آمفتامین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ ng/ml مشاهده نشد، پس نتیجه منفی بود. درحالی که در غلظت ۶۰۰ ng/ml، نتیجه مت‌آمفتامین مثبت بود. در

کروماتوگرام GC، مت‌آمفتامین در غلظت ۱۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۱۰/۲۱ دقیقه و سطح زیر پیک ۷۲۳ mv/s، در غلظت ۲۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۱۰/۲۱ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۴۲۵ mv/s و در غلظت ۶۰۰ ng/ml با زمان بازداری ۱۰/۲۱ و سطح زیر پیک ۴۲۴۹ mv/s 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 در صورتی که تست TLC برای نمونه‌های با غلظت مورفین ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/L درست تشخیص داده نشده است.

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

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

جدول ۱. نتایج تست مورفین

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

جدول ۲. نتایج تست آمفتامین

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

جدول ۳. نتایج تست مت آمفتامین

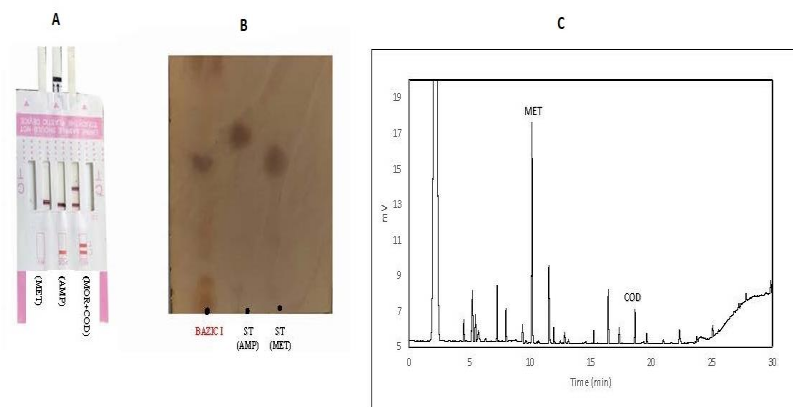
غلظت (ng/mL)	تست ICG	تست TLC	تست GC
۱۰۰	منفی	منفی	مثبت
۲۰۰	منفی	منفی	مثبت
۶۰۰	مثبت	مثبت	مثبت
درصد تشخیص صحیح	۳۳/۳ درصد	۳۳/۳ درصد	۱۰۰ درصد

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

نتایج ICG، TLC و کروماتوگرام GC برای نمونه های حقیقی:

برای مقایسه حد تشخیص روش های ICG، TLC و GC در تشخیص مواد مخدر در نمونه ادرار انسان، از نمونه های حقیقی استفاده شده است. نمونه های حاصل پس از جمع آوری با سه روش فوق تست شده و نتایج آن ها در شکل های ۲ تا ۶ آورده شده است.

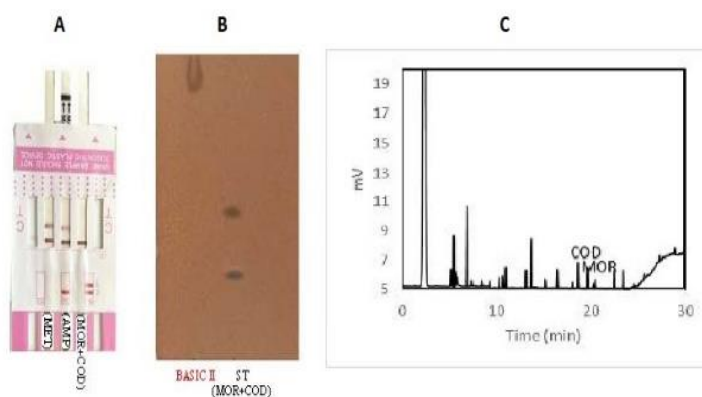
در شکل ۲، در ICG، نتایج نمونه حقیقی I قلیایی از نظر کدئین - مورفین منفی و از نظر آمفتامین و مت آمفتامین مثبت نشان داده شدند. در پلیت TLC، نمونه حقیقی I قلیایی به دلیل ظاهر نشدن لکه مقابل لکه استاندارد آمفتامین، از نظر آمفتامین منفی بود؛ اما از لحاظ مت آمفتامین نتیجه آن مثبت بود. برای بررسی دقیق تر، نمونه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



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

بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۰۵۲ mv/s ظاهر شدند. بر اساس نمودار کالیبراسیون، غلظت محاسبه شده برای کدئین و مورفین به ترتیب ۱۳۷ ng/ml و ۱۰۸ ng/ml به دست آمد. مطابق با نتایج حاصل، کدئین با غلظت ۱۳۷ ng/ml و مورفین با غلظت ۱۰۸ ng/ml (<cut off) در ICG مشکوک بوده و TLC قادر به شناسایی آنها نبوده است درحالی که روش GC به خوبی وجود هر دو را تأیید کرده است.

شکل ۳، نتایج ICG، TLC و GC نمونه ادرار حقیقی II قلیایی را نشان می دهد. مطابق شکل، در ICG، نتایج نمونه حقیقی II قلیایی از نظر آمفتامین و مت آمفتامین 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 با توجه به نمودار کروماتوگرام GC، نتیجه کدئین و مورفین مثبت بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۱۹۴۲ mv/s و مورفین با زمان



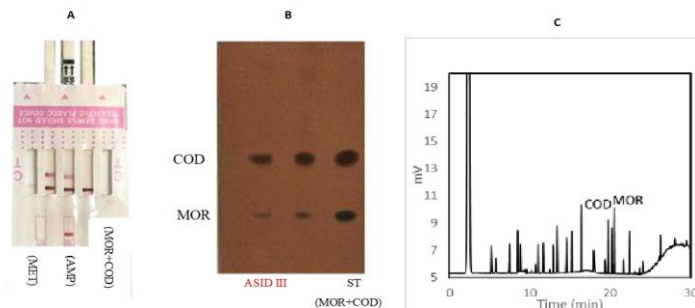
شکل ۳. نتایج مربوط به نمونه حقیقی II قلیایی، A- ICG، B- پلیت TIC، C- نمودار کروماتوگرام GC

در نمودار کروماتوگرام GC نیز نتیجه هر دو کدئین و مورفین مثبت بود. کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک نمونه ۵۷۸۲ mv/s و مورفین با زمان بازداری ۲۰/۵۶ دقیقه و سطح زیر پیک نمونه ۵۱۹۲ mv/s ظاهر شد. غلظت محاسبه شده برای کدئین و مورفین بر اساس نمودار

شکل ۴، نتایج ICG، TLC و کروماتوگرام نمونه ادرار حقیقی اسیدی III را نشان می دهد. مطابق شکل در ICG، نمونه حقیقی اسیدی III از نظر مورفین - کدئین مثبت و از نظر آمفتامین و مت آمفتامین منفی بود. در پلیت TLC نیز، نمونه حقیقی اسیدی III از نظر مورفین و کدئین مثبت بود.

بود، امکان شناسایی آن‌ها در دو روش ICG و TLC وجود داشت.

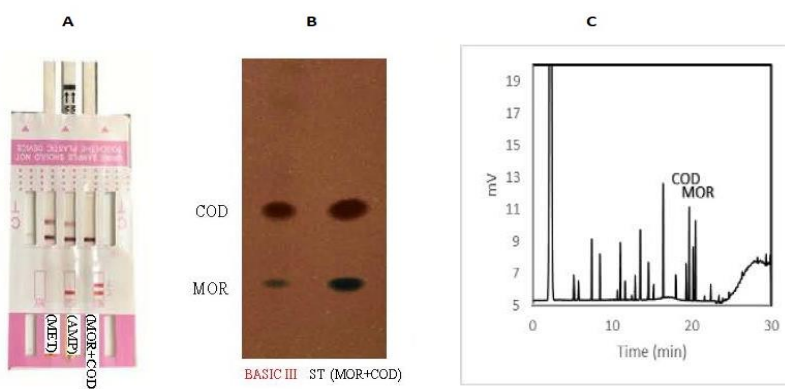
کالیبراسیون به ترتیب برابر ۴۲۳ ng/ml و ۵۵۴ ng/ml به دست آمد. چون غلظت کدئین و مورفین محاسبه شده برای نمونه حقیقی بیش از مقدار Cut off (۴۰۰ ng/ml) آن‌ها



شکل ۴. نتایج مربوط به نمونه حقیقی اسیدی III: A-ICG، B-پلیت TLC، C- نمودار کروماتوگرام GC

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 پیک ۵۲۲۱ 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.

در شکل ۵، نتایج حاصل از شناسایی مورفین و کدئین در نمونه حقیقی قلیایی III با استفاده از سه روش ICG، TLC و GC نشان داده شده است. مطابق شکل ۵، در ICG، نمونه حقیقی قلیایی III 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. باتوجه به نمودار کروماتوگرام نتیجه هر دو کدئین و مورفین



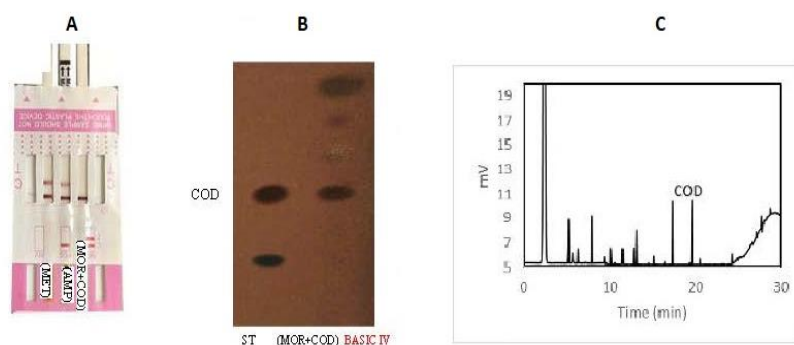
شکل ۵. نتایج مربوط به نمونه حقیقی قلیایی III: A-ICG، B-پلیت TLC، C- نمودار کروماتوگرام GC

منفی است. در پلیت TLC، در نمونه حقیقی IV قلیایی، مورفین منفی و کدئین مثبت بود. باتوجه به نمودار کروماتوگرام GC نیز نتیجه کدئین با زمان بازداری ۱۹/۶۳ دقیقه و سطح زیر پیک ۷۱۳۶ mv/s مثبت بود. غلظت

در شکل ۶، نمونه حقیقی IV قلیایی ادرار از لحاظ وجود مورفین و کدئین با سه روش ICG، TLC و GC بررسی شد. باتوجه به شکل ۶ در ICG، نمونه حقیقی IV قلیایی از نظر مورفین - کدئین مثبت و از نظر آمفتامین و مت‌آمفتامین

بیش از مقدار Cut off آن بود؛ لذا قابلیت تشخیص با هر سه روش را داشت.

محاسبه شده برای کدئین در حدود ۵۲۴ ng/ml به دست آمد. چون مقدار کدئین موجود در نمونه ادرار IV حقیقی



شکل ۶. نتایج مربوط به نمونه حقیقی IV قلیایی: A - ICG، B - پلت TLC، C - نمودار کروماتوگرام GC

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

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 این که تست ICG وجود مورفین را در نمونه ۵ تأیید کرده است؛ اما باتوجه به 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 درحالی که GC وجود مورفین را در ادرار تأیید کرده است (جدول ۴). نتایج بررسی آمفتامین در نمونه ادرار افراد معتاد نشان می‌دهد که با این که تست ICG وجود آمفتامین را در نمونه ۱ تأیید کرده است، اما باتوجه به نتایج TLC و GC نمونه ۱ دارای آمفتامین نبوده و ICG با خطا آن را مثبت نشان داده است (جدول ۵).

جدول ۴. نتایج تست مورفین

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

جدول ۵. نتایج تست آمفتامین

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

جدول ۶. نتایج تست مت آمفتامین

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

جدول ۷. مقایسه نتایج آزمون‌ها

آزمون	آزمون	سطح معنی داری
تست ICG	تست TLC	۰/۶۰۰
تست TLC	تست GC	۰/۳۰۰
تست GC	تست ICG	۰/۴۰۰

بحث

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، به آسانی قابل تشخیص بودند. درحالی‌که با روش گاز کروماتوگرافی، مورفین - کدئین، آمفتامین و مت‌آمفتامین در مقادیر کمتر و بیشتر از cut off به راحتی قابل تشخیص بود. برطبق نتایج رضایی و غلامی (۲۰۱۴)، استفاده از کروماتوگرافی گازی می‌تواند به‌عنوان روشی حساس برای تعیین مقادیر بسیار اندک نیکوتین، ترامادول،

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 قابل تشخیص 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

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.

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 اسید کلریدریک. نتایج نشان داد که سطح زیر منحنی مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده به طور قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز نشده بود (۲۲). درحالی که 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 تر از 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

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, Struempfer 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, Leindecker-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, Faghil 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.