



جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

معاونت سلامت

تهیه و تنظیم:

آزمایشگاه مرجع سلامت

اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی

دستورالعمل فرآیندهای

آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر

مهر ۱۳۸۷

## فهرست مطالب

| صفحه | عنوان                                                                                 |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| ۴    | ۱ - مقدمه.....                                                                        |
| ۴    | ۲- پذیرش.....                                                                         |
| ۴    | ۳- مشخصات برگه در خواست آزمایش.....                                                   |
| ۵    | ۴- آمادگی مراجعه کننده برای آزمایش.....                                               |
| ۶    | ۵- مکان نمونه گیری.....                                                               |
| ۶    | ۶- نمونه گیری.....                                                                    |
| ۶    | ۷- مراحل بعد از نمونه گیری.....                                                       |
| ۷    | ۸- نگهداری نمونه ها.....                                                              |
| ۸    | ۹- مشخصات برگه نتیجه آزمایشگاه.....                                                   |
| ۸    | ۱۰- روشهای تشخیص مواد مخدر.....                                                       |
| ۸    | ○ روشهای شیمیایی.....                                                                 |
| ۹    | ○ روشهای کروماتوگرافی.....                                                            |
| ۹    | ○ کروماتوگرافی روی کاغذ (PC) Paper Chromatography.....                                |
| ۹    | ○ کروماتوگرافی روی لایه نازک ( TLC ) Thin Layer Chromatography.....                   |
| ۱۰   | ○ کروماتوگرافی گازی (GC) Gas Chromatography.....                                      |
| ۱۱   | ○ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) High Performance Liquid Chromatography..... |
| ۱۱   | ○ روشهای ایمونولوژیک.....                                                             |
| ۱۲   | ۱۱- روش ایمونو کروماتوگرافی Immunochromatography.....                                 |
| ۱۲   | ۱۲- نحوه آزمایش تشخیص مواد مخدر در ادارات.....                                        |
| ۱۳   | ۱۳ - کنترل کیفیت.....                                                                 |

## فهرست مطالب

| صفحه | عنوان                                                  |
|------|--------------------------------------------------------|
| ۱۴   | ۱۴- مواردی از منابع خطا.....                           |
| ۱۴   | ۱۵- رعایت اصول ایمنی در آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر..... |
| ۱۵   | ۱۶- فضای فیزیکی.....                                   |
| ۱۶   | ۱۷- تجهیزات بخش تشخیص مواد مخدر.....                   |
| ۱۶   | ۱۸- کنترل و نگهداری تجهیزات.....                       |
| ۱۶   | ۱۹- نیروی فنی مورد نیاز.....                           |
| ۱۷   | ۲۰- منابع.....                                         |

## دستورالعمل فرآیندهای آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر

### مقدمه

با توجه به رسالت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در امر تشخیص، درمان و پیشگیری از اعتیاد قانونگذار به استناد ماده ۳۳ لایحه تشدید مجازات مرتکبین جرائم مواد مخدر مصوب ۱۳۵۹/۳/۱۹، صدور گواهی عدم اعتیاد در تمام موارد اعم از افراد ارجاعی نیروی انتظامی، دادگاههای انقلاب اسلامی، ازدواج و استخدام را به عهده وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی قرار داده است. از این رو آزمایشگاههای تشخیص مواد مخدر از جایگاه ویژه‌ای در نظام سلامت و مراجع قضایی کشور برخوردار بوده و با توجه به اینکه نتایج ارائه شده، مورد استناد مراجع قضایی و حقوقی قرار گرفته و بر حقوق شهروندی افراد تأثیر مستقیم دارد، تدوین دستورالعمل و رعایت آن در این آزمایشگاهها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد.

آزمایش تشخیص اعتیاد به مواد مخدر و جستجوی مرفین در نمونه‌های بیولوژیک سه هدف عمده ذیل را دنبال می‌کند:

- ۱- ارزیابی مقادیر درمانی در بیماران (TDM) و بررسی غلظت مرفین در مطالعات فارماکوکینتیک حیوانی و انسانی.
- ۲- بررسی اعتیاد به مواد مخدر نظیر مرفین، هروئین و تریاک برای اهداف تشخیصی، اپیدمیولوژیک و کنترل اعتیاد.
- ۳- تحقیق در مورد علل مسمومیت یا مرگ در موارد بالینی، پاتولوژیک یا جنایی.

### فرآیندهای آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر

#### مشخصات برگه درخواست آزمایش

برگه درخواست آزمایش باید شامل موارد زیر باشد:

- ✓ سربرگ رسمی سازمان، ارگان، اتحادیه صنفی، شرکتها، ادارات دولتی، دفتر اسناد رسمی، قوه قضائیه و نیروی انتظامی و غیره.
- ✓ نشانی سازمان درخواست کننده آزمایش و شماره تلفن تماس.
- ✓ نام و نام خانوادگی، سمت، امضاء مسئول و مهر سازمان درخواست کننده.
- ✓ الصاق عکس فرد آزمایش شونده به برگه درخواست و ممهور بودن آنها با مهر سازمان درخواست کننده.

#### پذیرش

نکاتی که در مرحله پذیرش مراجعین جهت انجام آزمایش تشخیص اعتیاد به مواد مخدر می‌بایع مورد نظر قرار گیرد به شرح ذیل می‌باشد.

- ✓ ارائه معرفی نامه عکس دار و ممهور به مهر دفترخانه ازدواج، دادگاهها، نیروی انتظامی، کارگزینی ادارات، شرکتها و اتحادیه‌های صنفی که به نحوی دارای مجوز قانونی جهت فعالیت می‌باشند.



- ✓ ثبت مشخصات مراجعین ، شماره نامه ، تاریخ معرفی نامه و ارگان ارجاع دهنده در سیستم نرم افزاری رایانه‌ای و ارائه قبض جوابدهی با تاریخ مشخص.
- ✓ تأیید هویت افراد توسط مسئول نمونه گیری با معرفی نامه ارائه شده.
- ✓ ثبت شماره پذیرش و یا کد بر روی ظرف نمونه گیری.
- ✓ معرفی نامه ها، دفتر ثبت مشخصات مراجعین، جوابهای ثبت شده در کامپیوتر حد اقل تا دو سال نگهداری شوند.

### آمادگی مراجعه کننده برای آزمایش

باید فرد نمونه دهنده در حد اقل سه روز قبل از آزمایش از مصرف قرصهای کدئین دار خود داری نماید در صورت امکان (در صورتی که برای سلامتی وی خطری ایجاد نکند) از مصرف داروهای سایمتیدین، رانیتیدین و ... خود داری کرده و یا مصرف آنها را به آزمایشگاه اطلاع دهد.

### مکان نمونه گیری

- محل نمونه گیری از مهمترین قسمت‌های آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر می باشد و در صورت رعایت استانداردها می تواند موجب منزلت ارباب رجوع ، سهولت و دقت در نمونه گیری را فراهم آورد و باعث جلوگیری از بروز بسیاری از مداخلات (تقلبها) در هنگام نمونه گیری شود. در نتیجه محل نمونه گیری بایستی دارای خصوصیات ذیل می باشد:
- ✓ بخش نمونه گیری ادرار از نور و تهویه کافی برخوردار باشد.
- ✓ محلی مجزا از سرویسهای بهداشتی عمومی و فقط مختص نمونه گیری آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به مواد مخدر باشد.
- ✓ کف و دیوارهای محل نمونه گیری قابل شستشو و بهداشتی باشد.
- ✓ ترجیها جهت جلوگیری از آلودگی ناشی از ترشحات ادرار در هنگام نمونه گیری آقایان از سرویسهای بهداشتی دیواری استفاده شود.
- ✓ استفاده از سیستم مدار بسته جهت نظارت بر نمونه گیری به منظور حفظ بیشتر شئون اخلاقی و اسلامی در اولویت قرار دارد.
- ✓ دوربینها باید در محل نمونه گیری به گونه ای نصب شوند که بهترین دید را داشته و نقطه کور نداشته باشد.
- ✓ ترجیها از ظروف در پیچ دار جهت نمونه گیری استفاده شود تا امکان اضافه نمودن مواد به آن به حد اقل برسد. (در فاصله زمانی ماندن نمونه در محل نمونه گیری و انتقال آن).
- ✓ امکان دسترسی افراد متفرقه در محل نمونه گیری به نمونه های گرفته شده وجود نداشته باشد.
- ✓ ترجیها مکان نمونه گیری در نزدیکترین فاصله به محل انجام آزمایش باشد.

## نمونه گیری

نمونه گیری ادرار جهت آزمایش مواد مخدر از اهمیت زیادی برخوردار بوده و باید در حضور ناظر مستقیم معتمد و یا تحت نظارت دوربین های مدار بسته صورت گیرد، مانیتور باید در محلی محفوظ قرار داده شود که بجز پرسنل مسئول از ورود و رویت افراد غیرمسئول جلوگیری شود تا منزلت مراجعین حفظ گردد.

- ✓ یک ظرف در پیچدار پلاستیکی یکبار مصرف که با کد و شماره مشخص گردیده به فرد مورد آزمایش داده شود.
- ✓ نمونه گیر باید مشخصات فرد را با برگه معرفی نامه مطابقت نماید. (صلاحیت اخلاقی و امین بودن نمونه گیر باید توسط مسئول آزمایشگاه به اثبات رسیده باشد).
- ✓ در صورت هرگونه شک به فرد نمونه دهنده استفاده از روشهای پیشگیری از تقلب مانند بازرسی بدنی، شستشوی دستها پیش از نمونه گیری، و غیره نیز توصیه می شود.
- ✓ در محل نمونه گیری حتماً جالباسی نصب باشد تا نمونه دهنده وسایل اضافی مانند پالتو، کت و کیف خود را در آن قرار دهد و با خود به محل نمونه گیری نبرد.
- ✓ مایع صابون و آب در محلی باشد که امکان افزودن آن به نمونه وجود نداشته باشد.
- ✓ نمونه گرفته شده بلافاصله باید توسط ناظر از نمونه دهنده تحویل گرفته و به مکان مناسب و مطمئن انتقال داده شود. تا امکان جا بجایی و یا افزودن مواد خارجی به نمونه وجود نداشته باشد.
- ✓ نمونه گیر باطن مطمئن شود که نمونه مستقیماً از فرد نمونه دهنده، به داخل ظرف نمونه گیری ریخته شود.
- ✓ نمونه ها تا قبل از انجام آزمایش و تحویل به آزمایشگاه می بایز زیر نظر نمونه گیر بوده و امکان دسترسی افراد متفرقه به آن وجود نداشته باشد. بدیهی است ناظر نمونه گیری باید در تمام مراحل مراقب هر گونه تقلب احتمالی اعم از افزودن مواد به نمونه، جاسازی نمونه و ... باشد.

## مراحل بعد از نمونه گیری

- نمونه گیر باید مطمئن شود حجم نمونه ادرار جهت انجام آزمایش غربالی و تائیدی (جهت انجام آزمایش کروماتو گرافی) کافی باشد و حجم آن دو برابر مقدار مورد نیاز برای آزمایش کروماتو گرافی باشد تا در صورت نیاز به تکرار آزمایش، امکان تکرار با آن نمونه وجود داشته باشد.
- ✓ در صورت شک به نحوه نمونه گیری، بهتر است دمای نمونه توسط دماسنج دیجیتالی اندازه گیری و ثبت شود، این عمل باید حداکثر تا ۴ دقیقه پس از نمونه گیری انجام شده و دمای نمونه باید بین ۳۳ تا ۳۷ درجه باشد. در غیر این صورت باید نمونه گیری تکرار شود.



✓ رنگ، شفافیت، pH و وزن مخصوص نمونه بررسی شود و اگر نمونه‌ای مشکوک به تقلب است نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

در مورد نمونه های خیلی رقیق باید وزن مخصوص نمونه اندازه گیری شود و در صورتی که وزن مخصوص آن کمتر از ۱.۰۰۴ باشد، نمونه گیری تکرار گردد.

✓ نمونه هایی که غلظت کراتینین آنها کمتر از ۲۰mg/dl باشند، باید مجدداً نمونه گیری شوند.

✓ pH مورد انتظار نمونه ادرار در حد ۴/۵ - ۸/۵ قابل قبول می‌باشد (در صورتیکه pH نمونه کمتر یا بیشتر از مقدار مذکور باشد باخی توسط سود نرمال و یا اسید کلریدریک نرمال به محدوده مورد انتظار رسیده و به منظور جلوگیری از تداخل موادی که باعث تغییر pH می گردند باید نمونه فقط **باروش کروماتوگرافی** مورد آزمایش قرار گرفته و نتیجه تایید گردد.

✓ نباید مواد اضافی مانند مواد نگهدارنده به نمونه اضافه شود.

✓ نمونه‌های دریافتی از مراکز قضائی و انتظامی می‌بایست بصورت مهر و موم شده باشد. بطوریکه دسترسی به نمونه ادرار تا مرحله آزمایش امکان‌پذیر نباشد و نمونه‌گیر وفرد تحویل دهنده نمونه باید برگه درخواست را امضاء نمایند و این نمونه‌ها باید قبل از تحویل توسط آزمایشگاه از نظر رنگ، pH و وزن مخصوص و ... کنترل و پس از تایید از مأمور تحویل گرفته شود.

✓ بر روی نمونه‌ها برچسب چسبانیده شود و برچسب باید دارای نام و یا کد مشخص کننده فرد آزمایش شونده و همچنین تاریخ، زمان نمونه‌گیری و حجم تقریبی نمونه باشد.

✓ در صورت مثبت شدن نتیجه آزمایش غربالی، می‌بایست نمونه ادرار مشکوک بصورت محفوظ (غیرقابل دسترسی برای افراد متفرقه) در یخچال و یا فریزر جهت انجام آزمایش تاییدی نگهداری شود.

### نگهداری نمونه‌ها

برای نگهداری نمونه‌ها تا ۵ روز، فریزر با دمای ۵- درجه سانتی‌گراد مناسب می‌باشد ولی برای مدت طولانی‌تر از دمای ۲۰- درجه استفاده می‌شود و باید از یخ زدن و ذوب شدن‌های متوالی نمونه‌ها پرهیز نمود زیرا باعث تغییر مواد موجود در نمونه‌ها می‌شود. ظروف نگهداری نمونه بسته به نوع ماده مورد آزمایش متفاوت می‌باشد. همچنین نمونه‌ها باید دور از نور و حرارت نگهداری شود. در مورد نگهداری طولانی مدت نمونه‌های ادرار حاوی مرفین و کدئین ظرف پلاستیکی و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد مناسب است.

### مشخصات برگه نتیجه آزمایشگاه

✓ ترجیحاً باید نتایج بصورت پرینت کامپیوتری ارائه گردد.



- ✓ نام و نشانی آزمایشگاه و شماره تلفن آن بر روی برگه جواب درج شود.
  - ✓ نام سازمان درخواست کننده، شماره معرفی نامه و تاریخ آن بر روی برگه جواب درج شود.
  - ✓ تاریخ انجام آزمایش و شماره پذیرش کامپیوتری و یا شماره سریال بر روی برگه جواب درج شود.
  - ✓ در زیر نویس برگه نتایج آزمایش تاکید شود که چه داروها و مواد مخدري مورد آزمایش قرار گرفته است.
  - ✓ مدت اعتبار نتیجه آزمایش (یک ماه از تاریخ صدور) بر روی برگه جواب درج شود.
  - ✓ امضاء مسئول آزمایشگاه بر روی برگه جواب موجود باشد.
  - ✓ مهرور بودن نتایج آزمایشها با مهر برجسته و ذکر اینکه نتایج آزمایشها بدون مهر برجسته فاقد اعتبار می باشد.
- مهر برجسته باید دارای مشخصات کامل آزمایشگاه شامل: آرم دانشگاه، نام کامل دانشگاه مربوطه، نام کامل آزمایشگاه و نیز عنوان بخش تشخیص مواد مخدر باشد.
- مهرهای آزمایشگاه انحصاراً باید در اختیار مسئول آزمایشگاه مواد مخدر و یا فرد مورد اطمینان وی بوده و تحت نظارت فرد مذکور نتایج مهر شده و سپس در محل امن (کمد یا کسوهای قفل دار) نگهداری شود.

### روشهای تشخیص مواد مخدر

روشهای رایج برای تشخیص مواد مخدر عبارتند از:

۱. روشهای شیمیایی

۲. روشهای کروماتوگرافی

۳. روشهای ایمونولوژیک

#### ۱- روشهای شیمیایی

روشهای شیمیایی از قدیمی ترین روشهای شناسائی آلکالوئیدها بخصوص مرفین می باشند. اساس این روشها بر مبنای انجام واکنش شیمیائی یک معرف با مرفین است که به صورت آزاد در حاصل استخراج وجود دارد. برای انجام آزمایش ابتدا باید مرفین را از مایع بیولوژیک استخراج نمود. دو معرف مورد استفاده معرف های فرود و مارکی است .

#### ۲- روشهای کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یکی از معمول ترین روشهای اندازه گیری کیفی و کمی داروها در مایعات بیولوژیک است. همه انواع کروماتوگرافی دارای اجزای زیر هستند.

فاز متحرک (Mobile phase) که مایع و یا گاز می باشد.

فاز ثابت (Stationary phase) که می تواند مایع و یا جامد باشد.



به طور کلی فاز متحرک به دلیل جریانی که دارد از کنار یا درون فاز ثابت عبور می کند و بر اساس تمایل اجزای مختلف نمونه مورد نظر با سرعت‌های مختلف توسط فاز متحرک شسته می شوند. اگر ماده مورد آنالیز تمایل کمتری به فاز ثابت داشته باشد در نتیجه سریعتر توسط فاز متحرک شسته می شود و اگر بیشتر به فاز ثابت تمایل داشته باشند با سرعت کمتر شسته می شوند و به این ترتیب مواد از هم تفکیک می شوند. به عبارت دیگر اجزاء مختلف نمونه بر اساس اینکه با چه شدتی توسط فاز ثابت نگهداشته می شوند از هم جدا می گردند.

از انواع کروماتوگرافی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- کروماتوگرافی روی کاغذ (Paper Chromatography (PC)
- کروماتوگرافی روی لایه نازک (Thin Layer Chromatography (TLC)
- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography (GC)

## ۲-۱- کروماتوگرافی روی کاغذ (Paper Chromatography (PC

در این نوع کروماتوگرافی پس از استخراج ماده مورد آنالیز آن را در حلال مناسب حل کرده و روی کاغذ لکه گذاری می کنیم. سپس آن را داخل تانک قرار می دهیم که در آن فاز متحرک قرار دارد. به دلیل کشش سطحی حلال روی سطح کاغذ بالا آمده و اجزاء مختلف بر اساس حلالیت و تمایل شان به فاز ثابت در محلهای مختلف باقی می ماند. هرچه اجزاء مخلوط بیشتر در حلال حل شوند روی سطح کاغذ بیشتر بالا می روند. و به این ترتیب از هم جدا می گردند. در مرحله بعد باید سپس بایستی با معرف مناسب لکه هارا ظاهر و قابل دید نمود.

## ۲-۲- کروماتوگرافی بر روی لایه نازک TLC

این روش ساده ترین و مفید ترین روش تشخیص اولیه و خلوص مواد است. در این روش فاز ثابت روی یک صفحه از جنس پلیمر یا آلومینیوم کشیده می شود. که جنس فاز ثابت ترکیباتی نظیر سیلیکاژل ویا آلومینا می باشد. در این نوع کروماتوگرافی پلاریته اهمیت زیادی دارد. روش کار مانند کروماتوگرافی کاغذ می باشد و بطور خلاصه شامل مراحل ذیل است:

استخراج دارو ویا ماده مورد آنالیز از ادرار بوسیله حلال آلی، تغلیظ حاصل استخراج و حل کردن آن در یک حلال آلی، لکه گذاری روی صفحه TLC، جداسازی ترکیبات بوسیله فاز متحرک، ظهور و شناسایی داروهای تفکیک شده توسط معرفهای شیمیایی شناخته شد، استفاده از RF (نسبت حرکت نمونه مورد آنالیز روی صفحه TLC به حرکت جبهه فاز متحرک)، استفاده از جذب UV یا فلورسانس. توجه به نکاتی مثل خصوصیات فاز متحرک، فاز ثابت، اشباع بودن یا نبودن تانک کروماتوگرافی در جداسازی و شناسایی دارو مؤثر است.



آزمایشگاه مروری سلامت

## ۲-۲-۱- مزایای TLC

- ساده ترین و مفید ترین روش تشخیص اولیه و خلوص مواد است. موادی که به هنگام لکه گذاری بر روی صفحه قرار داده می شوند، پس از تفکیک شدن بر روی آن باقی مانده و در نهایت در صورت بکارگیری آشکار سازهای مناسب، قابل شناسایی و مشاهده خواهند بود.
- کاربرد ساده داشته و نیاز به تجهیزات اندک دارد.
- قابلیت جداسازی و شناسایی مقادیر ناچیز مواد را دارا می باشد.
- زمان انجام آزمایش کوتاه است.
- می توان چندین نمونه را هم زمان آزمایش کرد.
- از فازهای ثابت و متحرک متنوع می توان استفاده نمود.
- از معرفهای ظاهر کننده متنوع می توان استفاده نمود.

## ۲-۲-۲- معایب TLC

- حساسیت آن کمتر از روشهای GC, GC/MS, HPLC می باشد.
- دقت و صحت آن کمتر از روشهای فوق می باشد.

## ۲-۳- گاز کروماتوگرافی (GC)

در روش گاز کروماتوگرافی فاز متحرک گاز است. ماده مورد آنالیز تحت فشار گاز در طول ستون کروماتوگرافی که توسط ذرات فاز ثابت پر شده است، حرکت کرده و بر اساس پلاریته با سرعتهای متفاوتی در طول ستون حرکت می کنند و در نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و توسط آشکار ساز (Detector) شناسایی می شود.

این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. روش کلی کار عبارتست از استخراج دارو با یک حلال مناسب، تغلیظ حاصل استخراج و تبدیل آن به یک مشتق فرار (مشتق سازی)، تزریق به دستگاه گاز کروماتوگراف، عبور فاز متحرک گازی به همراه نمونه مورد آنالیز از ستون و بالاخره، شناسایی و ثبت توسط آشکار ساز.

معمولاً به منظور افزایش حساسیت، دقت و صحت دستگاه گاز کروماتوگراف، آن را به طیف سنج جرمی متصل می کنند که به آن (GC/MS) می گویند. این روش، روش مرجع برای تشخیص بسیاری از دارو ها، مواد مخدر و مواد مورد آنالیز می باشد.

با توجه به اینکه این روشها گران بوده و استفاده از آنها نیاز به تخصص دارد. بعلاوه نیازمند خدمات مناسب بعد از فروش می باشد، لذا مواردی از این قبیل استفاده از این سیستمها رادچار محدودیت میکنند. از اینرو از روشهای ساده تر و کاربردی دیگری که در عین حال از حساسیت و دقت مناسب برخوردار باشند (TLC) استفاده می شود.

## ۲-۴- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز متحرک مایع است. ماده مورد آنالیز تحت فشار پمپ در طول ستون کروماتوگرافی که توسط ذرات فاز ثابت پر شده است حرکت کرده و بر اساس پلاریته با سرعت‌های متفاوتی در طول ستون حرکت می‌کنند در نتیجه با فواصل زمانی مختلفی از انتهای ستون خارج شده و توسط آشکار ساز (Detector) شناسایی می‌شود. این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردار می‌باشد. روش کلی کار در HPLC شامل مراحل زیر است:

استخراج با یک حلال مناسب، تزریق حاصل استخراج به دستگاه و حرکت آن به همراه فاز متحرک مناسب با فشار بالا به داخل ستون، تفکیک آن و بالاخره تشخیص بوسیله آشکار ساز و اندازه‌گیری ترکیبات مورد نظر براساس سطح زیر منحنی پیک‌های بدست آمده می‌باشد. امروز توسعه و تجهیز HPLC منجر به ساخت دستگاه‌های کاملاً خودکار و منعطف برای سیستم‌های مختلف شده است. این روش از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است.

## ۳- روش‌های ایمنولوژیک

همه این روشها براساس اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی می‌باشد. از آنجاییکه در حال حاضر به منظور آزمایش‌های غربالی تشخیص مواد مخدر در ادرار فقط از روش ایمنوکروماتوگرافی استفاده می‌شود، فقط به شرح آن می‌پردازیم و به ذکر نام تعدادی از سایر روشها اکتفا می‌کنیم:

RIA- رادیوایمونواسی (Radioimmunoassay)

FIA- فلوروسانس ایمونواسی (Fluorescentimmunoassay)

EIA- (Enzymeimmunoassay) که این سیستم خود شامل EMIT و ELISA می‌باشد.

- ممانعت از آگلوتیناسیون (Agglutination Inhibition)

- روش ایمنوکروماتوگرافی (Immunochromatography)

## روش ایمنوکروماتوگرافی (Immunochromatography)

روشی که در حال حاضر در کشور به طور وسیعی برای آزمایش‌های غربالگری تشخیص اعتیاد به مواد مخدر مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش ایمنوکروماتوگرافی می‌باشد. این روش یک روش ایمونواسی رقابتی بر روی نوارهای غشایی است. در این روش با قرار دادن ادرار بر روی نوارهای غشایی که دارای آنتی‌بادی ضد مرفین است نمونه را مورد بررسی قرار می‌دهند. رقابت میان مرفین و مرفین کونژوگه صورت می‌گیرد که تشکیل خط رنگی نشانگر اتصال کونژوگه مرفین و عدم حضور مرفین در ادرار است. این روش نیز با وجود حساسیت زیاد، با برخی داروها مانند کدئین نتایج مثبت کاذب ایجاد می‌کند.

## نحوه آزمایش تشخیص مواد مخدر در ادرار

آزمایشهای داروهای اعتیادآور و غیرمجاز در دو مرحله اجرا می‌شود. اولین مرحله شامل آزمایش غربالی و یا آزمایشهای اولیه 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 و نیز روش‌های تأییدی وجود داشته که با توجه به امکانات و دسترسی و هزینه‌های تجهیزاتی، دو روش متداول در آزمایشگاههای مراکز بهداشتی- درمانی جهت غربالگری اولیه و تأییدی انجام می‌پذیرد که شامل روش ایمونوکروماتوگرافی (غربالگری سریع) و روش کروماتوگرافی روی لایه نازک TLC می‌باشد. کیت‌های تشخیص مرفین به روش الایزا نیز ارائه شده است که در آینده ممکن است مورد استفاده قرار گیرد.

### ۱- کیت تشخیص مرفین در ادرار به روش TLC

این کیت به صورت تجارتي موجود می‌باشد. برای استفاد از این کیت به دستور العمل مربوطه مراجعه شود.

### ۲- استخراج مرفین به روش مایع - مایع (LLE) Liquid-Liquid Extraction

در صورت عدم دسترسی به کیت مذکور می‌توان از روش TLC با استخراج مایع - مایع استفاده نمود که در ذیل به آن اشاره شده است:

۱. ۲۰ میلی لیتر نمونه با ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ مخلوط شده و به مدت یک ساعت در بنماری جوش، و یا ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار می‌دهیم.
۲. توسط سود غلیظ نمونه قلیایی شده و  $PH = 8.5 - 9$  تنظیم شود.
۳. عمل استخراج توسط محلول کلروفرم: ۲- پروپانل به نسبت ۱:۹ انجام شود. با این ترتیب که نمونه ادرار قلیایی شده را داخل قیف دکانتور ریخته و با ۴۰ میلی لیتر محلول استخراج (کلروفرم: ۲- پروپانل به نسبت ۱:۹) مخلوط کرده و به شدت هم می‌زنیم. سپس مدتی صبر می‌کنیم تا دولایه شود. لایه زیری را از کاغذ صافی عبور داده و داخل بشر جمع آوری می‌کنیم و توسط بنماری جوش آن را تبخیر می‌کنیم. پس از خنک شدن بشر، محتوای آن را در ۳-۴ قطره متانل حل کرده و روی صفحه TLC لکه گذاری می‌کنیم.
- ✓ پلیتهای TLC باید در دمای ۸۰-۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه فعال شود.
۴. فاز متحرک شامل کلروفرم (۱۲ml)، متانل (۱.۴ml)، آمونیاک (۰.۲ml) آماده شود. (از فازهای متحرک دیگری هم می‌توان استفاده کرد ولی باید به این نکته توجه نمود که تداخلی بین مرفین، کدئین و سایر داروها وجود نداشته باشد).
۵. پس از ۲۵-۳۰ دقیقه از داخل تانک خارج می‌کنیم. چند دقیقه صبر می‌کنیم تا سطح پلیت خشک شود آنگاه حدود ۸ دقیقه در دمای ۸۰-۱۱۰ درجه سانتی گراد قرار می‌دهیم.

۶. با استفاده از معرف یدو پلاتینات لکه های ایجاد شده را ظاهر می کنیم و پلیت را تفسیر می کنیم.

### نکاتی در مورد کنترل کیفیت کیت های مورد استفاده

کیت های غربالگری و تاییدی باید دارای تاییدیه معتبر مانند تاییدیه آزمایشگاه رفرانس باشد همچنین توجه به نکات ذیل قبل از استفاده آنها ضروری است.

۱. تاریخ مصرف کیت (غربالی و تاییدی) معتبر باشد.
۲. عرض نوار (غربالی) نباید کمتر از ۵ میلی متر باشد.
۳. کیت های غربالی و تاییدی در pH های مختلف (۸/۵ - ۴/۵)، در غلظت ۳۰۰ نانوگرم مرفین آزمایش شوند.
۴. غلظت های مختلف مرفین در ادرار (به عنوان مثال در غلظت های ۲۰۰ و ۳۰۰ و ۴۰۰ نانو گرم در میلی لیتر) آزمایش شوند.
۵. خطوط تست و کنترل (در روش غربالی) پراکندگی و کشیدگی رنگ نداشته باشد.
۶. سرعت حرکت نمونه ادرار بر روی نوار تست مطابق بروشور باشد. (معمولاً ۳۰-۴۵ ثانیه)
۷. در هر سری کاری از نمونه های کنترل مثبت و منفی باید استفاده شود.
۸. نتیجه آزمایش کیت های مورد آزمایش جدید با کیت های قابل قبول و معتبر مقایسه شوند. برای این کار باید از نمونه های مثبت، منفی و استاندارد مرفین استفاده شود.
۹. در روش TLC سرعت حرکت بافرها و تخلیه نمونه ادرار از ستونهای کروماتوگرافی بایستی مطابق دستور العمل کیت های مورد استفاده انجام شود.
۱۰. در روش TLC سرعت حرکت فاز متحرک مطابق دستور العمل کیت (حدود ۳۰-۲۵ دقیقه) باشد.
۱۱. در روش TLC مرفین با فاصله مناسب از کدئین (حدود ۲-۱.۵ سانتی متر) تفکیک شود.
۱۲. در روش TLC مرفین با فاصله مناسب از محل لکه گذاری (حدود یک سانتی متر) ظاهر شود.

### مواردی از منابع خطا

- ✓ در صورت غلظت کم دارو و در محدوده cutoff (۳۰۰ ng/ml) ممکن است نتیجه تست نواری مشکوک تلقی گردد که در این گونه موارد باید نمونه با روش تاییدی کنترل شود.
- ✓ از مخلوط نمودن نمونه ها برای انجام آزمایش بعنوان یک نمونه جداً پرهیز گردد. در غیر اینصورت با رقیق شدن نمونه مثبت، مقدار دارو از غلظت حد مرزی کمتر گردیده و نتیجه به غلط منفی گزارش می گردد.
- ✓ در روش TLC از آنجائیکه به تجربه و مهارت فرد آزمایش کننده بسیار وابسته است، توصیه می گردد از افراد باتجربه و آموزش دیده استفاده گردد.

- ✓ در روش TLC باجی کلیه مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام گیرد و زمانهای ذکر شده برای هر مرحله رعایت گردد.
- ✓ کنترل میزان خلا پمپ (در محدوده ۰.۳-۰.۵ Bar) مورد استفاده در مرحله استخراج TLC باید در هر سری کاری تنظیم شود.
- ✓ سرعت حرکت بافرها و تخلیه نمونه ادرار از ستونهای کروماتو گرافی بایستی مطابق دستور العمل کیتهای مورد استفاده باشد.

- ✓ دمای هات پلیت در محدوده ۸۰-۱۱۰ درجه سانتی گراد تنظیم شود.
- ✓ زمان اشباع شدن تانک کروماتو گرافی حدود ۴۵-۶۰ دقیقه رعایت شود.
- ✓ زمان لازم برای خواندن نتایج پلیت TLC (حدود یک ساعت) رعایت شود. و سپس به منظور نگهداری طولانی مدت سطح آنها با یک صفحه شیشه ای پوشانیده شود.
- ✓ بشرهای استفاده شده بعد از اتمام آزمایش باید اسید واش شوند.
- ✓ برای انجام آزمایش TLC باید مشخصات نمونه با ذکر تاریخ در دفتر جداگانه‌ای ثبت گردیده سپس روی پلیت TLC کد گذاری و آزمایش گردد. همچنین پس از انجام آزمایش روی پلیت‌ها تاریخ آزمایش ثبت گردیده و مدت یکسال نگهداری شود.

#### رعایت اصول ایمنی در آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر

- در آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر باید کلیه اصول ایمنی جزوه " اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان " رعایت گردد. در ذیل به نکاتی چند اشاره می شود:
- ✓ هنگام کار از روپوش ، دستکش، ماسک و عینک استفاده شود.
  - ✓ پس از انجام آزمایش با مواد ضد عفونی کننده مناسب (هیپوکلریت سدیم) سطوح کار ضد عفونی شود.
  - ✓ از پوار و پیت فیلر برای برداشتن محلولها توسط پی پت استفاده شود.
  - ✓ مواد ضد عفونی کننده مناسب وظروف Safety box در دسترس باشد.
  - ✓ با توجه به بخارات شیمیایی حاصل از مواد شیمیایی استفاده شده در روش TLC ، لازم است کلیه مراحل آزمایش در زیر هودقوی انجام گردیده و به منظور حفاظت و ایمنی پرسنل از دستکش و ماسک استفاده نمایند.
  - ✓ ستونهای کروماتو گرافی ، نوار و یا کاست کیتهای غربالی استفاده شده بعد از اتمام آزمایش به روش بهداشتی دفع گردد.
  - ✓ کلیه وسایلی که به هنگام آزمایش با ادرار آغشته شده است با ماده ضد عفونی کننده مناسب (محلول سفید کننده خانگی با کلر فعال ۵ % که به نسبت یک به ده رقیق گردیده) ، ضد عفونی و سپس شسته شود.
  - ✓ درون محفظه خلا در هنگام آزمایش TLC مقداری محلول ضد عفونی کننده اضافه شود. برای جلوگیری از پخش آئروسل در فضا بایستی آزمایش زیر هود انجام شود.



✓ بخش نمونه گیری ادرار کاملاً تمیز و ضد عفونی شود.

✓ نمونه گیر از دستکش استفاده کند.

### فضای فیزیکی

با توجه به تعداد قابل توجه مراجعین به آزمایشگاههای تشخیص اعتیاد به موادمخدر در مراکز بهداشتی- درمانی که عمدتاً از مراجعین ازدواجی و استخدامی و غیره می‌باشند، حتی المقدور باید فضای مناسب و امکانات رفاهی مناسب جهت مراجعین فراهم گردد.

✓ سالن انتظار به ازاء هر مراجعه کننده حداقل نیم مترمربع باشد.

✓ سرویس بهداشتی مخصوص نمونه‌گیری آقایان (متناسب با تعداد مراجعین) وجود داشته باشد.

✓ سرویس بهداشتی مخصوص نمونه‌گیری خانم‌ها (متناسب با تعداد مراجعین) وجود داشته باشد.

✓ فضای فیزیکی آزمایشگاه تشخیص اعتیاد به موادمخدر (غربالگری و TLC) حد اقل ۲۰ مترمربع باشد.

✓ فضای فیزیکی مربوط به سیستم مانیتور مدار بسته و کنترل هویت مراجعین حد اقل ۳ مترمربع باشد.

✓ ترجیحاً فضاهای مربوط به نمونه‌گیری و انجام آزمایش تشخیص اعتیاد به موادمخدر جهت انتقال آسان نمونه‌ها و

حفاظت و ایمنی بیشتر در مجاورت همدیگر باشد و به هم ارتباط داشته باشد.

### تجهیزات بخش تشخیص موادمخدر

○ سیستم سخت‌افزاری و نرم‌افزاری آزمایشگاه تشخیص موادمخدر

○ سیستم مدار بسته جهت نظارت بر نمونه‌گیری

○ دماسنج دیجیتالی

○ pH متر

○ رفراکتومتر

○ سانتریفوژ

○ هات پلیت

○ پمپ خلا

○ هود معمولی با قدرت تهویه مناسب

○ یخچال و فریزر



○ سینک بزرگ

○ کابینت آزمایشگاهی با عرض حداقل ۶۰ سانتیمتر به مترای حداقل ۷ مترمربع

### کنترل و نگهداری تجهیزات

کنترل کیفی ابزار پایه مورد استفاده در بخش تشخیص موادمخدر باینی بصورت دوره‌ای انجام گردیده و مستندات آن در آزمایشگاه موجود باشد. (برای اطلاع بیشتر به جزوه کنترل کیفی ابزار پایه تدوین شده توسط آزمایشگاه مرجع سلامت مراجعه شود).

✓ پمپ خلا (در محدوده ۰.۳-۰.۰۵ Bar) هر شش ماه یک بار کالیبره شود.

✓ دمای هات پلیت در محدوده ۸۰-۱۱۰ درجه سانتی گراد تنظیم شود و در فواصل زمانی شش ماه کالیبره گردد.

### حد اقل نیروی فنی مورد نیاز جهت ۳۴۰ واحد کاری

• مسئول فنی آزمایشگاه ۱ نفر دکترای علوم آزمایشگاهی، متخصص علوم آزمایشگاهی و یا متخصص آسیب شناسی بالینی.

در صورتی که آزمایشگاه مواد مخدر به صورت آزمایشگاه مجزایی فعالیت نماید باید دارای مسئول فنی جداگانه باشد. در غیر این صورت با بخشهای دیگر دارای مسئول فنی مشترک می باشد.

• کاردان و یا کارشناس علوم آزمایشگاهی ۱ نفر به ازاء هر ۳۴۰ واحد کاری.

• ناظر نمونه‌گیر آقایان ۱ نفر پرسنل آموزش دیده ، ترجیحاً ثابت.

• ناظر نمونه‌گیر خانمها ۱ نفر پرسنل آموزش دیده ، ترجیحاً ثابت.

متصدی پذیرش حد اقل ۱ نفر متناسب با تعداد مراجعین که پرسنل آموزش دیده و ترجیحاً ثابت می باشد. به

نسبت افزایش واحدهای کاری، پرسنل آزمایشگاه نیز متناسب آن باید افزایش داده شود.





آزمایشگاه مرجع سلامت

**منابع مورد استفاده:**

- ۱ - شفیع ع. کروماتوگرافی و طیف سنجی. دانشگاه تهران، ص: ۴۸-۱، ۱۳۷۳.
- ۲- جزوه آموزشی " راهنمای آزمایش ادرار از نظر وجود دارو در آزمایشگاههای تشخیص طبی ". ناظری ع. ، زیر نظر دکتر محمد عباسی . مرکز تحقیقات آزمایشگاههای رفرانس ایران، آزمایشگاه تشخیص مواد مخدر، ۱۳۸۰
- ۳- "Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC/MS) Confirmatory of Drug"; Approved Guideline , NCCLS, Vol.22No.22, November 2002.
- 4 -"Urine Drug Testing in the Clinical laboratory. Approved Guideline, NCCLS, Vol:19, No: NewYork,February.1999.
- 5- "Guidance for prescription use drug of abuse premarket notification." US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Clinical Chemistry and Toxicology Branch , (2000), CDRH, November.
- 6-Moffat A C, David Osselton M D, etal., "Clarke's Analysis of Drug in Pharmaceuticals ,Body fluids, and postmortem maternal" .Third Edition, 2004.
- 7-"The Effect of Urine Manipulation on Substance Abuse Testing", Clinical Toxicology/Drugs of Abuse The International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDM-CT), Edited by the committee chair Hans H. Maurer University Hospital Basel, Chemical Laboratory, Central Laboratory Department ,2007.