ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2023;12(1):e5

Journal of Police Medicine

ORIGINAL ARTICLE OPEN ACCESS

Rapid Qualitative and Quantitative Analysis of Morphine in the Street and Biological Samples Using Scan Densitometry Thin Layer Chromatography

Asghar Eftekhari[1 PhD], **Akram Ameli**[2 * PhD], **Mohsen Babaei**[3 PhD]

[1] Department of Anti Narcotic, Faculty of Intelligence & Criminal Investigation Science & Technology, Amin Police University, Tehran, Iran.
[2] Technology Management Institute, Police Science & Social Studies Institute, Tehran, Iran.
[3] Department of Identity Recognition & Medical Sciences, Faculty of Intelligence & Criminal Investigation Science & Technology, Amin Police University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

AIMS: In recent years, the field of identifying and quickly determining the number of narcotics, including morphine, has grown significantly. This research aimed to provide a cheap, simple, and fast method for the quantitative identification of morphine in street samples and biological samples.

MATERIALS AND METHODS: This experimental research was conducted in the laboratory of the Narcotics Department of the University of Police Sciences in the spring and summer of 2021. In this study, powder samples and urine samples containing morphine were tested to measure the amount of morphine by scanning the densitometry of TLC plates. Silica thin layer chromatography plates 60G F254 (Merck) and mobile phase including acetonitrile, methanol, and ammonia (1:2:17) for performing TLC tests, chloroform, and -2 propanol with a ratio of 9:1 for extraction, Camag TLC Scanner 3 device with software WinCATS 1.4.2.8121 was used for qualitative and quantitative analysis.

FINDINGS: This method showed a distinct and separated band for morphine at RF equal to 16.2 mm. The calibration curve with a correlation coefficient of 0.9887 showed a favorable linear relationship between the area under the peak of morphine and the concentration of spots in the range of 1-6 µg/spot. This method showed an acceptable detection limit, precision, and accuracy for measuring morphine in street and urine samples.

CONCLUSION: Scanning densitometry thin layer chromatography is a rapid and inexpensive screening method for the qualitative and quantitative analysis of morphine in the street and urine samples.

KEYWORDS: Thin layer chromatography; Morphine; Densitometry

How to cite this article:

Eftekhari A, Ameli A, Babaei M. *Rapid Qualitative and Quantitative Analysis of Morphine in the Street and Biological Samples Using Scan Densitometry Thin Layer Chromatography*. J Police Med. 2023;12(1):e5.

***Correspondence:**

Address: Police Science & Social Studies Institute, Yasemi Street, The end of Kordestan Expressway, Tehran, Iran,
Postal Code: 19395-6516
Mail: **ameliakram90@gmail.com**

Article History:

Received: 01/10/2022
Accepted: 07/01/2023
ePublished: 21/02/2023

Copyright © 2023, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License*

INTRODUCTION

In the past years, simple, cheap, and fast screening methods to identify and measure illegal substances have become very popular, especially the methods that use fewer solvents in terms of less damage to the environment. By reducing the consumption of carcinogenic solvents or replacing them with less dangerous types, green analytical methods are safe for the people involved in the experiment and the environment [1, 2]. Some important areas of green analytical methods include sample preparation, miniaturization of analytical instruments and reduced generated waste, and use of appropriate methods for waste management. Therefore, nowadays, methods that require small amounts of solvents for sample preparation and also allow for their miniaturization are of great interest. Despite their figures of merit for real samples with complex textures, gas or liquid chromatography methods are time-consuming and expensive and require highly skilled users. The thin-layer chromatography (TLC) method can be a suitable alternative when we need a fast, simple, and cheap separation. Thin-layer chromatography plates have good resolution and reproducibility for material identification and by simultaneously analyzing a group of samples on paper can reduce the cost of testing and save time and consumption of chemicals. In thin-layer chromatography analysis, sample preparation is simple, and it is possible to analyze dirty, suspension, and cloudy samples directly. This technique can also be used for the simultaneous measurement of multicomponent samples. Compared to the qualitative application, the quantitative applications of TLC are limited. This is partly due to the difficulties in collecting the analytical signals of standards and samples for calibration curves [3, 4]. However, with the advances in the field of image-based detections [5, 6], the processes of using this technique have increased in recent years. Densitometry can be used to increase sensitivity and quantitative measurements. This way, the chromatogram of a sample and the UV spectrum of each of the revealed peaks will be available. Due to the cheapness and availability of thin-layer chromatography analysis for small laboratories, TLC imaging techniques can be used for quantitative measurements with high accuracy and precision. The general process for quantitative use of the thin-layer chromatography technique involves the separation of analytes on commercial TLC plates, the detection of separated spots by UV light irradiation or chromogenic reagents or digital cameras, and the use of imaging software (usually based on the RGB system) for each spot to obtain an analytical response. [7, 8]. The following examples illustrate the utility of thin-layer chromatography for quantitative measurements. TLC densitometry method and TLC image analysis were studied to measure the amount of sibutramine in slimming herbal products, and the detection limit of 190 ng/band and 634 ng/band for sibutramine was reported, respectively [9]. Measuring the amount of sibutramine in plant samples with both methods has shown that the thin-layer chromatography image analysis method and the thin-layer chromatography scanning method are comparable. TLC densitometry method for measuring remdesivir and favipiravir drugs in pharmaceutical products as well as human serum has been reported with a detection limit of 0.12 µg/band and 0.07 µg/band, respectively, and according to the indicators of solvent consumption, reagents, and energy and the amount of bypass and potential risks has been introduced as a green analytical method [10]. Also, this method for measuring the amount of loratadine in pharmaceutical samples with a detection limit of 61 ng/band has been reported as a sensitive, reproducible, and selective method in the presence of loratadine degradation products [11]. The chemiluminescence reaction of morphine with potassium permanganate reagent after separation from the sample on thin layer chromatography paper and its analysis using a smartphone camera has been used to detect morphine and make a cheap and simple sensor quantitatively. To perform a chemiluminescence reaction, potassium permanganate reagent has been used on morphine stains on thin layer chromatography paper and recorded light emitted by a smartphone camera and the test factors affecting the method's sensitivity have been optimized [12]. The sensitive and selective method of thin layer chromatography along with the digital imaging process has been used for the simultaneous measurement of catecholamines such as dopamine, epinephrine, and norepinephrine in related medicinal products. To study the desired compounds quantitatively, after chromatographic separation, the plates were sprayed with a 0.02% solution of 2, 2- Diphenyl -1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) in ethanol, and then, the scanner tool of thin layer chromatography plates have been used for quantitative detection of chromatogram spots [13]. Thin-layer chromatography combined with paper spray ionization mass spectrometry has been used to analyze cocaine and its additives (caffeine, benzocaine, lidocaine, and phenacetin). Sensitivity and selectivity have been optimized by studying different detergent phases. To improve these

figures of merit, TLC spots have been identified by paper spray ionization mass spectrometry. Due to its high sensitivity, selectivity, and speed, the method can be used in quantitative legal analysis, especially for synthetic substances such as LSD, the dosage of which is very low [3]. For quantitative purposes, using the thin layer chromatography method, the use of plates made by industrial processes is recommended because they show more accuracy in inhibition factors, and the color intensity of the resulting stains is obtained by using them repeatedly. These factors lead to better analytical efficiency. However, ready-made thin-layer chromatography plates can be expensive, depending on the nature of the analysis. On the other hand, laboratory-made chromatographic plates do not meet the requirements for efficient quantitative detection [14]. Morphine, as the main opium alkaloid, has toxic and medicinal properties and affects the central nervous system by acting on opioid receptors, and as it is widely used for treatment, it is also abused. Morphine is also known as one of the metabolites of heroin. Although morphine is widely used as an analgesic drug, on the other hand, it has a high addictive potential, and its use can lead to psychological and physical addiction. Also, consuming too much of it may cause poisoning. According to the findings, the two important principles of the amount of substance remaining in the body and the time of the test are very important for the quick and accurate diagnosis of drug abuse [15]. Morphine consumption usually results in the excretion of morphine (often in conjugated form), possibly with a small amount of codeine, which results from the methylation of morphine in the metabolic process. Street morphine contains some codeine powder; morphine is extracted from opium, which contains 10 percent morphine and half percent codeine. Therefore, the consumption of street morphine can lead to the excretion of morphine and codeine in the urine. In addition, the use of codeine in the form of a medicinal product in addition to codeine (conjugated) can lead to the excretion of morphine in the urine as O-demethylation is one of the proven metabolite pathways of codeine to morphine. Therefore, morphine may also be in the urine of codeine users. Therefore, although morphine and codeine can be in the urine of a person who has consumed medicinal morphine, street morphine, and medicinal codeine, measuring the amount of morphine and codeine in a person's urine sample can determine which substance was consumed [16]. Therefore, it is very important to choose analytical methods that can identify and measure morphine in pharmaceutical and biological samples or illegal substances quickly and with the necessary accuracy and sensitivity.

Radioimmunoassay methods are one of the common methods to identify morphine. Although, these methods can determine the concentration of morphine in the ng/ml range, but they have less selectivity. Modern analytical methods generally include chromatographic and spectrometric techniques. High-performance liquid chromatography [17], electrophoresis-mass spectroscopy, and gas chromatography [18, 19] have been applied to analyze opium alkaloids, including morphine, in biological and non-biological samples. Despite the high sensitivity and resolution, these methods are costly, time-consuming, and require highly skilled users. In addition, various methods have also been presented as rapid tests. Although these methods are fast, they produce false positive results in the case of impurity in street samples or drug interference in biological samples. For this reason, the positive result of these methods should be confirmed by chromatographic methods [20]. As mentioned, the instrumental methods of chromatography and mass spectrometry are costly. Therefore, simpler methods, such as thin-layer chromatography, can be suitable options. Considering that the morphine samples seized by the police have various impurities, a TLC densitometry scan is a simple and cheap method to determine the amount of morphine in them. Also, this method can be used to measure the amount of morphine in biological samples such as urine for a definitive diagnosis of morphine abuse. Therefore, the aim of this study was a rapid quantitative and qualitative analysis of morphine in the street and biological samples using densitometry scan of thin layer chromatography.

MATERIALS & METHODS

The current research, using the experimental study method of laboratory type, dealt with the rapid qualitative and quantitative analysis of morphine in the street and biological samples using densitometry scan of thin layer chromatography*. This research was done in the spring and summer of 2021 in the laboratory of the Narcotics Department of the Police University. Chemicals (methanol, ammonia, acetonitrile) with analytical degree of purity were purchased from Merck Company. Standard morphine, codeine, acetaminophen, and caffeine were obtained from Temad Pharmaceutical Company, and its standard solution was prepared with a concentration of 5 mg/ml in methanol. Solutions with lower concentrations were prepared daily by diluting the standard solution in methanol to draw the

calibration curve. Silica thin layer chromatography plates 60G F254 in dimensions of (10×20) cm were prepared from Merck Company. Sampling of standard solutions and samples was done on paper by NANOMAT4 Camag. Sampling on the screen was done by spotting etude. The distance from the bottom edge of the paper as well as the distance between the spots, was considered 10 mm. In this way, 19 samples were placed on each paper. The paper was placed at room temperature in a glass tank with a metal lid (Camag) containing ammonia, methanol, and acetonitrile in a volume ratio of 17:2:1, which was saturated with the mobile phase for 20 minutes [21]. Investigations showed that this volume ratio is the most appropriate ratio of the mentioned solvents for separating opium alkaloids. After advancing the solvent by 9 cm, the paper was removed from the tank and dried at room temperature for 15 minutes. Under these conditions, the spots related to opium alkaloids, including morphine, codeine, noscapine, and papaverine, and additives such as caffeine and acetaminophen were separated on thin chromatography paper. Densitometry scanning of chromatography papers was done using Camag TLC Scanner 3 with WinCATS 1.4.2.8121 software. The spots were scanned by a scanner with a wavelength of 290 nm. The scanner was used for optimal maximum light with a length of 3.00×0.30 mm, scanning speed of 20 mm/s, and data resolution of 100 µm/step. The spectrum of each peak was recorded in the range of 190-400 nm, with gap dimensions of 6.00×0.30, scanning speed of 100 nm/s, data resolution of 1 nm/step, and a reference spectrum of x=24mm and y=8mm. The UV absorption spectrum of morphine using a TLC scanner is shown in **Figure 1**.

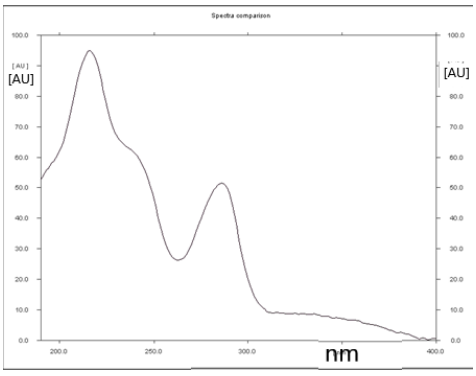


Figure 1) UV absorption spectrum of morphine using a TLC scanner for a concentration of 5 µg/spot

Preparation of urine sample for morphine measurement: The International Institute on Drug Abuse has announced the limit of measuring morphine in urine at 300 ng/ml [22]. Therefore, the method should have a practical detection limit for measuring this concentration in urine. To measure morphine in urine by scanning thin-layer chromatography, an extraction step was performed to prepare and concentrate the sample. For this purpose, the hydrolysis of 40 ml of urine sample was done by adding 4 ml of hydrochloric acid and placing it in a boiling water bath for one hour, and then the pH of the sample was adjusted by adding sodium hydroxide to reach pH=8.5-9, and then extraction was done in the decanter using 40 ml of the combination of chloroform and -2propanol (1:9) solvents. After drying, the extract (organic phase) was dissolved in 0.5 ml of methanol, and then spotting was done from this solution [23]. Four samples were prepared in the concentration range of 400 to 600 ng/L to draw the calibration curve by adding morphine to the urine sample. The sample preparation steps for all standard samples were done similarly. After spotting with a volume of 10 microliters, separation was done on thin-layer chromatography plates and according to the conditions mentioned earlier, the scanning plates and the inner morphine peaks were drawn based on the concentration of morphine in the standard samples.

Ethical Permissions: Ethical permissions were followed at all levels of the research. All the experiments were done in the same standard conditions, and there was no interference from the researchers in the stages of the research.

Statistical Analysis: After separation with thin layer chromatography plates and densitometry scanning, the results were analyzed with WinCATS 1.4.2.8121 and Excel 2013 software.

FINDINGS

RF values were obtained using the morphine standard (16.2 mm). Morphine standard solutions with a concentration of 500 µg/ml were made from the initial standard solution in methanol. For the calibration curve, 500 µg/ml standard solution from 2 to 12 µl was spotted on the chromatography paper to obtain a concentration range of 1-6 µg/spot of morphine. Each standard solution was spotted three times on the paper, and the calibration curve was drawn in terms of the average area with the inner peaks and different concentrations of standard spots (µg/spot). A good correlation was observed between the concentration of morphine and the peak. The regression equation y=4049.21+238.65x with a correlation coefficient of 0.9887 was obtained for the standard spotted sample (**Figures 2** and **3**).

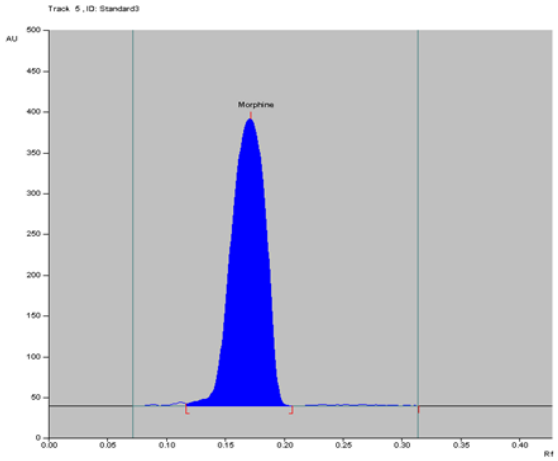


Figure 2) The spectrum of morphine in the RF range of 12 to 19 mm on a thin layer chromatography plate

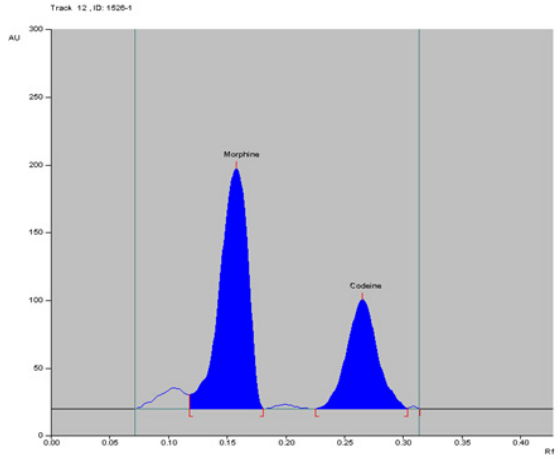


Figure 3) The spectrum related to the separation of morphine in the RF range of 12 to19 mm and codeine in the RF range of 23to 31 mm on the thin layer chromatography plate

The accuracy of the TLC scanning method for the measurement of morphine was investigated by conducting reproducibility studies for three different concentrations in the linear range of the calibration curve and RSD of less than 6% was obtained with three repetitions (Table 1). Also, the accuracy of the TLC scan analysis method was checked by measuring the samples added with morphine in three different concentrations, and the recovery percentage was obtained from 96.9 to 104.5 (Table 2). The method's detection limit was calculated according to the slope of the calibration curve of 0.2 µg/spot. Investigations showed that the presence of codeine, acetaminophen, and caffeine in the samples does not interfere with the measurement of morphine because their bands are well separated from morphine on a thin layer of chromatography paper. A mixture of codeine, acetaminophen, and caffeine powder was used to prepare samples similar to street samples. Then morphine standard was used to add morphine with different concentrations to them. The samples were dissolved in methanol, and after making up to volume, they were again diluted with methanol to fall within the range of the calibration curve and the spotting, separation, and scanning steps were performed similarly to the standards. Finally, the amount of morphine was calculated according to the calibration curve and the dilution rate. The recovery rate of morphine for the added sample similar to the street sample was 95% with a standard deviation of 5.9%.

Morphine measurement in urine sample: To measure morphine in the urine sample, samples were prepared in the concentration range of 400 to 600 ng/ml according to the mentioned method. The findings showed that the calibration curve with a correlation coefficient of 0.9796 shows an acceptable linear relationship between the concentration of morphine in standard samples and of that in the under-peak area related to morphine. The RSD for three replicates of the standard sample with a concentration of 500 ng/ml was less than 7%. The urine sample containing morphine (500 ng/ml) was calculated according to the test method of standard test samples and using the calibration curve based on which the recovery percentage was 94.6%, with a relative standard deviation of 5.8%.

Table 1) Checking the accuracy of the method by determining the amount of morphine in different concentrations with3 repetitions

Sample number	Density (µg/spot)	%RSD n=3
1	1	4.6
2	2	5.0
3	3	4.9

Table 2) Checking the accuracy of the method by measuring morphine in standard samples with specific concentration

Sample number	Density (µg/spot)	Recovery percentage	Average recovery percentage (M±SD)
1	1	96.9	101.4±5.8
2	2	102.8	
3	3	106.7	

DISCUSSION

This study aimed to use the TLC densitometry method for qualitative and quantitative identification of morphine. Compared to chromatographic methods, which have higher sensitivity and are more efficient for measuring morphine in lower concentrations [24, 25], the densitometric thin-layer chromatography method is considered cheap and fast. Because gas chromatography or high-performance liquid chromatography methods, especially when coupled with mass spectrometry, have lower detection limits but are expensive and time-consuming. The densitometry scan of thin

layer chromatography method has been used to quantify morphine in herbal drug containing opium. In this method, the detection limit of 0.498 µg/spot and the recovery percentage of 99% for morphine have been obtained [26], which is comparable to the results obtained for the measurement of morphine in samples similar to street samples in the present research. In another study, high-performance thin-layer chromatography with a diode array detector along with an optical fiber was used to simultaneously identify morphine and other analytes, which is a very suitable method for the rapid screening of samples. However, quantitative measurement of morphine was not done [27]. The findings showed that with this method, it is possible to measure morphine in urine in the concentration range of 300 ng/ml with appropriate reproducibility and an RSD of less than 7%. Although the thin-layer chromatography method is used for qualitatively detecting morphine in some addiction diagnosis laboratories, the amount of morphine in the sample can also be measured using a densitometry scan of thin-layer chromatography. It is also possible to simultaneously analyze morphine and codeine, and also other opium alkaloids. In this method, the amount of RF for codeine is 26.9, and the peaks related to the TLC densitometry scan are not identical to the peak of morphine; therefore, a simultaneous measurement of morphine and codeine is easily possible. Densitometry scan of thin layer chromatography can be used at low cost as a suitable confirmatory method for samples that are positive in strip tests. Also, due to the sensitivity of the study method, it can be used as a simple and quick method to measure the amount of morphine in the samples recorded by the police and urine samples. It is suggested that this method be used to determine the profile and classification of street morphine and opium samples in future research. Due to the illegality of buying and selling morphine, there were limitations on the preparation of morphine street samples and ethical considerations in the preparation of biological samples containing morphine for analysis.

CONCLUSION

Substance analysis using thin-layer chromatography is one of the cheapest and simplest laboratory identification methods that can be used to identify morphine in police samples, biological samples as well as pharmaceutical products, especially in laboratories with low equipment facilities.

Clinical & Practical Tips in POLICE MEDICINE: In this study, an attempt has been made to use the TLC densitometry technique for simple, cost-effective separation, capable of analyzing several samples simultaneously and in parallel that this technique, in addition to quick and simple detection (qualitative), can measure the amount of morphine (quantitative) in biological and police samples.

Acknowledgments: The support of the president of Police University is gratefully acknowledged.

Conflict of Interest: The article's authors stated that there is no conflict of interest regarding the present study.

Authors Contribution: Asghar Eftekhari (idea presentation, data collection); Akram Ameli (study design and data analysis); Mohsen Babaei (data analysis); all the authors participated in the initial writing of the article and its revision, and with the final approval of this article, accept responsibility for the accuracy and correctness of the content contained in it.

Funding Sources: The authors did not receive any financial support from public or private authorities.

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2023;12(1):e5

نشریه طب انتظامی

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

آنالیز کیفی و کمی سریع مرفین در نمونه‌های خیابانی و زیستی با استفاده از اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک

اصغر افتخاری[۱] PhD، اکرم عاملی[۲*] PhD، محسن بابایی[۳] PhD

[۱] گروه مبارزه با مواد مخدر، دانشکده علوم فنون اطلاعات و آگاهی، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران.
[۲] گروه مدیریت فناوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.
[۳] گروه تشخیص هویت و علوم پزشکی، دانشکده علوم فنون اطلاعات و آگاهی، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: در سال‌های اخیر، پژوهش در زمینه شناسایی و تعیین سریع مقدار مواد مخدر ازجمله مرفین رشد چشمگیری یافته است. هدف از این تحقیق، ارائه یک روش ارزان، ساده و سریع برای شناسایی کمی مرفین در نمونه‌های خیابانی و نمونه‌های زیستی بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش تجربی در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه گروه مواد مخدر دانشگاه علوم انتظامی انجام شد. در این مطالعه، نمونه‌های پودری و نمونه‌های ادرار حاوی مرفین برای اندازه‌گیری میزان مرفین با روش اسکن دانسیتومتری صفحات TLC مورد آزمایش قرار گرفت. صفحات کروماتوگرافی لایه نازک سیلیکا ۶۰G F۲۵۴ (مرک) و فاز متحرک شامل استونیتریل، متانول و آمونیاک (۱:۲:۱۷) جهت انجام آزمایشهای TLC، کلروفرم و ۲-پروپانول با نسبت ۹ به ۱ جهت استخراج، دستگاه Camag TLC Scanner3 با نرم‌افزار WinCATS 1.4.2.8121 جهت آنالیز کیفی و کمی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: این روش باند مشخص و تفکیک‌شده‌ای برای مرفین در RF برابر با ۱۶/۲ میلی‌متر نشان داد. منحنی کالیبراسیون با ضریب همبستگی ۰/۹۸۸۷ رابطه خطی مطلوبی را بین مساحت زیر پیک مرفین و غلظت لکه‌ها در محدوده ۶-۱ µg/spot نشان داد. این روش، حد تشخیص، دقت و صحت قابل قبولی برای اندازه‌گیری مرفین در نمونه‌های خیابانی و همچنین نمونه‌های ادرار نشان داد.

نتیجه‌گیری: اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک، یک روش غربالگری سریع و ارزان برای آنالیز کیفی و کمی مرفین در نمونه‌های خیابانی و ادرار است.

کلیدواژه‌ها: کروماتوگرافی لایه نازک، مرفین، دانسیتومتری

نحوه استناد به مقاله:

Eftekhari A, Ameli A, Babaei M. *Rapid Qualitative and Quantitative Analysis of Morphine in the Street and Biological Samples Using Scan Densitometry Thin Layer Chromatography*. J Police Med. 2023;12(1):e5.

نویسنده مسئول*:

آدرس پستی: تهران، انتهای اتوبان کردستان، خیابان شهید یاسمی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی فراجا.
پست الکترونیکی:
ameliakram90@gmail.com

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹
پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷
انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۰۲

Copyright © 2023, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License*

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2023;12(1):e5

مقدمه

در سال‌های اخیر، روش‌های غربالگری ساده، ارزان و سریع شناسایی و اندازه‌گیری مواد غیرقانونی، محبوبیت زیادی پیدا کرده است؛ به ویژه روش‌هایی که به لحاظ آسیب کمتر به محیط زیست از حلال‌های کمتری استفاده می‌کنند. روش‌های تجزیه‌ای سبز با کاهش مصرف حلال‌های سرطان‌زا یا جایگزینی آنها با انواع کم‌خطرتر، ایمنی را برای افراد درگیر در انجام آزمایش و همچنین محیط زیست به ارمغان می‌آورند [۱، ۲]. چند حوزه مهم روش‌های تجزیه‌ای سبز شامل آماده‌سازی نمونه، کوچک‌سازی ابزارهای تجزیه‌ای و کاهش پسماند تولیدشده و استفاده از روش‌های مناسب برای مدیریت پسماند است. بنابراین امروزه روش‌هایی که برای آماده‌سازی نمونه به حلال‌های کمی نیاز داشته باشند و همچنین امکان کوچک‌سازی آنها وجود داشته باشد، بسیار مورد توجه هستند.

روش‌های کروماتوگرافی گازی یا مایع، علیرغم ارقام شایستگی مناسبی که برای نمونه‌های حقیقی با بافت‌های پیچیده فراهم می‌کنند، زمان‌بر و پرهزینه هستند و علاوه بر این، به کاربران بسیار ماهر نیاز دارند. زمانی که به یک جداسازی سریع، ساده و ارزان نیاز داریم، روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. صفحات کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی مواد، قدرت تفکیک و تکرارپذیری مناسبی دارند و با آنالیز همزمان یک گروه از نمونه‌ها بر روی یک کاغذ، امکان کاهش هزینه آزمایش و صرفه‌جویی در زمان و مصرف مواد شیمیایی را فراهم می‌کنند. در آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک، آماده‌سازی نمونه به سادگی صورت می‌گیرد و امکان آنالیز مستقیم نمونه‌های کثیف، سوسپانسیون و کدر وجود دارد. می‌توان از این تکنیک برای اندازه‌گیری همزمان نمونه‌های چندجزیی نیز استفاده کرد. در مقایسه با کاربرد کیفی، کاربردهای کمی TLC محدود شده است. این امر تا حدی به علت مشکلاتی است که در جمع‌آوری سیگنال‌های تجزیه‌ای مربوط به استانداردها برای رسم منحنی کالیبراسیون و نمونه‌ها با آن مواجه می‌شویم [۳، ۴].

به هر حال با پیشرفت‌های حاصل در زمینه آشکارسازی‌ها بر پایه تصویر [۵، ۶]، فرآیندهای استفاده از این تکنیک در سال‌های اخیر افزایش یافته است. برای افزایش حساسیت و همچنین اندازه‌گیری‌های کمی، می‌توان از اندازه‌گیری دانسیتومتری بهره برد. به این ترتیب کروماتوگرام یک نمونه و طیف UV هریک از پیک‌های آشکارشده، قابل دستیابی خواهد بود. با توجه به ارزان و در دسترس بودن آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک برای آزمایشگاه‌های کوچک، تکنیک‌های عکسبرداری TLC می‌توانند برای اندازه‌گیری‌های کمی با دقت و صحت بالا مورد استفاده قرار گیرد. فرآیند کلی برای استفاده کمی از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک شامل جداسازی آنالیت‌ها بر روی صفحات تجاری TLC، آشکارسازی لکه‌های جداشده توسط تابش نور ماوراء بنفش یا واکنشگرهای کروموژنیک یا دوربین‌های دیجیتال و استفاده از نرم‌افزارهای عکسبرداری (معمولاً بر پایه سیستم RGB) برای هر لکه جهت به‌دست‌آوردن پاسخ تجزیه‌ای است [۷، ۸]. مثال‌های زیر قابلیت استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک برای اندازه‌گیری‌های کمی را نشان می‌دهد.

روش دانسیتومتری TLC و همچنین آنالیز تصاویر TLC برای اندازه‌گیری میزان سیبوترامین در فرآورده‌های گیاهی لاغری مورد مطالعه قرار گرفته و به ترتیب حد تشخیص band/ng ۱۹۰ و band/ng ۶۳۴ برای سیبوترامین گزارش شده است [۹]. اندازه‌گیری میزان سیبوترامین در نمونه‌های گیاهی با هر دو روش نشان داده است که روش آنالیز تصاویر کروماتوگرافی لایه نازک و روش اسکن کروماتوگرافی لایه نازک با هم قابل مقایسه هستند. روش دانسیتومتری TLC برای اندازه‌گیری داروهای رمدسیور و فاویپیراویر در فرآورده‌های دارویی و همچنین سرم انسان با حد تشخیص به ترتیب band/µg ۰/۱۲ و band/µg ۰/۰۷ گزارش شده است و با توجه به شاخص‌های میزان مصرف حلال، واکنشگرها و انرژی و میزان دور ریز و خطرات بالقوه به عنوان یک روش تجزیه‌ای سبز معرفی شده است [۱۰]. همچنین این روش برای اندازه‌گیری میزان لوراتادین در نمونه‌های دارویی با حد آشکارسازی band/ng ۶۱ به عنوان یک روش حساس، تکرارپذیر و انتخابگر در حضور محصولات تخریب لوراتادین گزارش شده است [۱۱].

از واکنش نورتابی شیمیایی مرفین با واکنشگر پتاسیم پرمنگنات پس از جداسازی از نمونه بر روی کاغذ کروماتوگرافی لایه نازک و آنالیز آن با استفاده از دوربین تلفن همراه هوشمند برای آشکارسازی کمی مرفین و ساخت یک حسگر ارزان‌قیمت و ساده استفاده شده است. برای انجام واکنش نورتابی شیمیایی از واکنشگر پتاسیم پرمنگنات بر لکه مرفین روی کاغذ کروماتوگرافی لایه نازک و ثبت نور نشرشده توسط دوربین گوشی هوشمند استفاده شده است و عوامل آزمایش مؤثر بر حساسیت روش بهینه شده‌اند [۱۲].

روش حساس و انتخابگر کروماتوگرافی لایه نازک به همراه فرآیند تصویربرداری دیجیتال برای اندازه‌گیری همزمان کاتکول آمین‌هایی چون دوپامین، اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین در فرآورده‌های دارویی مرتبط به کار گرفته شده است. برای مطالعه کمی ترکیبات مورد نظر، به دنبال جداسازی کروماتوگرافی صفحات با محلول ۰/۰۲ درصد ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل رادیکال (DPPH•) در اتانول اسپری شدند و سپس از ابزار اسکنر صفحات کروماتوگرافی لایه نازک برای آشکارسازی کمی لکه‌های کروماتوگرام بهره گرفته شده است [۱۳]. کروماتوگرافی لایه نازک همراه با طیف‌سنجی جرمی یونیزاسیون اسپری کاغذ برای آنالیز کوکائین و افزودنی‌های آن (کافئین، بنزوکائین، لیدوکائین

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2023;12(1):e5

و فناستین) به کار گرفته شده است. حساسیت و انتخابگری با مطالعه فازهای شوینده متفاوت بهینه شده است. برای بهبود این ارقام شایستگی، لکه‌های TLC شناسایی توسط طیف‌سنجی جرمی یونیزاسیون اسپری کاغذی انجام شده است. روش به کارگرفته‌شده با توجه به حساسیت، انتخاب‌پذیری و سرعت بالای آن قابلیت به‌کارگیری در آنالیزهای قانونی کمی، به ویژه برای مواد سنتزی مثل LSD که دوز مصرفی آنها بسیار کم است را دارد [۳].

برای اهداف کمی در استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک، استفاده از صفحات ساخته‌شده توسط فرآیندهای صنعتی توصیه می‌شود، زیرا دقت بیشتری در فاکتورهای بازداری نشان می‌دهند و شدت رنگ‌های لکه‌های حاصل به طور تکرارپذیری در استفاده از آنها به‌دست می‌آید و این عوامل به کارایی تجزیه‌ای بهتری منجر می‌شود. به هرحال بسته به ماهیت آنالیز، صفحات کروماتوگرافی لایه نازک آماده می‌تواند گران‌قیمت باشد. از سوی دیگر، صفحات کروماتوگرافی ساخته‌شده در آزمایشگاه، الزامات لازم برای یک آشکارسازی کمی کارآمد را تأمین نمی‌کند [۱۴].

مرفین به عنوان اصلی‌ترین آلکالوئید تریاک، دارای خواص سمی و دارویی است و با عمل بر روی گیرنده‌های اپیوئیدی بر روی سیستم عصبی مرکزی، اثر می‌گذارد و همان‌گونه که به طور گسترده برای درمان استفاده می‌شود، مورد سوء مصرف نیز قرار می‌گیرد. مرفین به عنوان یکی از متابولیت‌های هروئین نیز شناخته شده است. اگرچه مرفین به عنوان یک داروی ضد درد کاربرد وسیعی دارد، اما از سوی دیگر پتانسیل اعتیادآوری بالایی دارد و مصرف آن می‌تواند به اعتیاد روانی و جسمی منجر شود. همچنین مصرف زیاد آن ممکن است سبب مسمومیت شود. طبق یافته‌ها، برای تشخیص سریع و دقیق سوء مصرف مواد مخدر، دو اصل مهم میزان ماده باقی‌مانده در بدن و زمان انجام آزمایش اهمیت زیادی دارد [۱۵]. مصرف مرفین معمولاً منجر به دفع مرفین (اغلب به صورت جفت‌شده) می‌شود که احتمالاً با مقدار کمی کدئین که نتیجه متیل‌دار شدن مرفین در فرآیند سوخت و ساز است، همراه می‌شود. مرفین غیرقانونی، پودری حاوی مقدار قابل توجهی کدئین است؛ چرا که مرفین از تریاک استخراج می‌شود که حاوی ۱۰ درصد مرفین و نیم درصد کدئین است. بنابراین مصرف مرفین خیابانی می‌تواند منجر به دفع مرفین و کدئین در ادرار شود. علاوه بر این، مصرف کدئین در شکل یک فرآورده دارویی نیز علاوه بر کدئین (جفت‌شده) می‌تواند منجر به دفع مرفین در ادرار گردد؛ چرا که O-demethylation یکی از مسیرهای اثبات‌شده متابولیت تبدیل کدئین به مرفین است. بنابراین ممکن است مرفین در ادرار مصرف‌کنندگان کدئین نیز وجود داشته باشد. بنابراین گرچه مرفین و کدئین می‌تواند در ادرار فردی که مرفین دارویی، مرفین خیابانی و کدئین دارویی مصرف کرده است وجود داشته باشد، ولی اندازه‌گیری میزان مرفین و کدئین موجود در نمونه ادرار فرد می‌تواند مشخص کند که کدام ماده مصرف شده است [۱۶]. بنابراین انتخاب روش‌های تجزیه‌ای که بتواند به سرعت و با دقت و حساسیت لازم مرفین را در نمونه‌های دارویی و نمونه‌های زیستی یا مواد غیرقانونی شناسایی و اندازه‌گیری کند، بسیار مهم است.

روش‌های رادیوایمونواسی یکی از روش‌های رایج برای شناسایی مرفین است. اگرچه این روش‌ها می‌توانند غلظت مرفین را در گستره نانوگرم/میلی‌لیتر مشخص کنند، اما گزینش‌پذیری کمتری دارند. روش‌های تجزیه‌ای مدرن عموماً شامل تکنیک‌های کروماتوگرافی و اسپکترومتری است. برای آنالیز آلکالوئیدهای تریاک ازجمله مرفین در نمونه‌های زیستی و غیرزیستی، روش‌هایی چون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۱۷]، الکتروفورز-اسپکتروسکوپی جرمی و کروماتوگرافی گازی [۱۸، ۱۹] مورد استفاده قرار گرفته است. این روش‌ها علی‌رغم حساسیت و قدرت تفکیک بالا، بسیار پرهزینه و زمان‌بر هستند و به کاربر بسیار ماهر نیاز دارند. علاوه بر این، روش‌های مختلفی به صورت آزمایش‌های سریع نیز ارائه شده است، این روش‌ها گرچه سریع هستند ولی در صورت وجود ناخالصی در نمونه‌های خیابانی یا تداخل دارویی در نمونه‌های زیستی، پاسخ‌های مثبت کاذب تولید می‌کنند و به همین دلیل پاسخ مثبت حاصل از این روش‌ها باید با روش‌های کروماتوگرافی تأیید شوند [۲۰].

همان‌طور که گفته شد، روش‌های دستگاهی کروماتوگرافی و اسپکترومتری جرمی بسیار گران‌قیمت هستند. بنابراین روش‌های ساده‌تر مثل کروماتوگرافی لایه نازک راهگشا هستند. با توجه به اینکه نمونه‌های مرفین کشف و ضبط‌شده توسط پلیس دارای انواع ناخالصی‌ها است، اسکن دانسیتومتری TLC یک روش ساده و ارزان برای تعیین میزان مرفین موجود در آنها به شمار می‌رود. همچنین این روش می‌تواند برای اندازه‌گیری میزان مرفین در نمونه‌های بیولوژیکی مثل ادرار جهت تشخیص قطعی سوء مصرف مرفین به‌کار گرفته شود. بنابراین، هدف این مطالعه آنالیز کیفی و کمی سریع مرفین در نمونه‌های خیابانی و زیستی با استفاده از اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک بود.

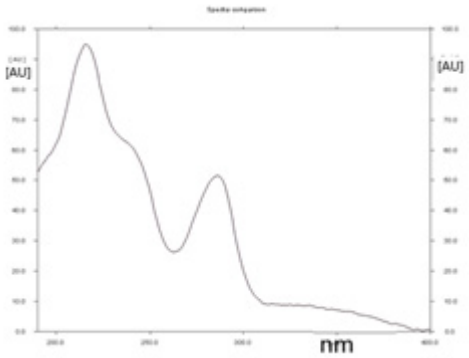
مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر با استفاده از روش مطالعه تجربی از نوع آزمایشگاهی، به آنالیز کیفی و کمی سریع مرفین در نمونه‌های خیابانی و زیستی با استفاده از اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک پرداخت. این پژوهش در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه گروه مواد مخدر دانشگاه علوم انتظامی انجام شد. مواد شیمیایی (متانول، آمونیاک، استونیتریل) با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک خریداری شدند. مرفین، کدئین، استامینوفن، کافئین

استاندارد از شرکت داروسازی تماد تهیه شد و محلول استاندارد آن با غلظت ml/mg ۵ در متانول تهیه گردید. محلول‌های با غلظت کمتر برای رسم منحنی کالیبراسیون با رقیق کردن محلول استاندارد در متانول به صورت روزانه تهیه شدند.

صفحات کروماتوگرافی لایه نازک سیلیکا G ۶۰ F254 در ابعاد (۱۰*۲۰) سانتی‌متر از شرکت مرک تهیه شد. نمونه‌گذاری محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها بر روی کاغذ توسط Camag NANOMAT4 انجام شد. نمونه‌گذاری روی صفحه توسط اتود لکه‌گذاری انجام شد. فاصله از لبه پایین کاغذ و همچنین فاصله بین لکه‌ها ۱۰ میلی‌متر درنظر گرفته شد. به این ترتیب بر روی هر کاغذ، ۱۹ نمونه قرار می‌گیرد. کاغذ در دمای اتاق در تانک شیشه‌ای با درب فلزی (Camag) حاوی آمونیاک، متانول و استونیتریل به نسبت حجمی ۱۷:۲:۱ که برای مدت ۲۰ دقیقه با فاز متحرک اشباع شده بود، قرار داده شد [۲۱]. بررسی‌ها نشان داد این نسبت حجمی مناسب‌ترین نسبت حلال‌های ذکرشده برای جداسازی آلکالوئیدهای تریاک است. پس از پیشروی جبهه حلال به میزان ۹ سانتی‌متر، کاغذ از تانک خارج شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق خشک شد. تحت این شرایط لکه‌های مربوط به آلکالوئیدهای تریاک شامل مرفین، کدئین، نوسکاپین و پاپاورین و افزودنی‌هایی چون کافئین و استامینوفن به طور کامل بر روی کاغذ کروماتوگرافی لایه نازک از یکدیگر جدا شدند.

برای اسکن دانسیتومتری کاغذهای کروماتوگرافی دستگاه Camag TLC Scanner 3 با نرم‌افزار WinCATS 1.4.2.8121 مورد استفاده قرار گرفت. لکه‌ها توسط اسکنر با طول موج ۲۹۰ نانومتر اسکن شدند. اسکنر برای بهینه نور ماکزیمم با طول شکاف ۳/۰۰×۰/۳۰ میلی‌متر، سرعت اسکن ۲۰ میلی‌متر بر ثانیه، قدرت تفکیک داده ۱۰۰ step/µm بکارگیری شد. طیف هر یک از پیک‌ها در گستره ۴۰۰-۱۹۰ نانومتر، با ابعاد شکاف ۶/۰۰×۰/۳۰، سرعت اسکن ۱۰۰ نانومتر بر ثانیه وقدرت تفکیک داده ۱ step/nm و طیف مرجع ۲۴mm=x و ۸mm=y ثبت شد. طیف جذب UV مرفین با استفاده از اسکنر TLC در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱) طیف جذب UV مرفین با استفاده از اسکنر TLC برای غلظت ۵ µg/spot

آماده‌سازی نمونه ادرار برای اندازه‌گیری مرفین: انستیتو بین‌المللی سوء استفاده دارو، حد مرزی اندازه‌گیری مرفین در ادرار را ۳۰۰ ml/ng اعلام کرده است [۲۲]. بنابراین باید روش مورد استفاده، حد تشخیص مناسب برای اندازه‌گیری این غلظت در ادرار را داشته باشد. برای اندازه‌گیری مرفین در ادرار به روش اسکن کروماتوگرافی لایه نازک، یک مرحله استخراج برای آماده‌سازی نمونه و تغلیظ آن صورت گرفت. به این منظور ابتدا هیدرولیز ۴۰ میلی‌لیتر نمونه ادرار با اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک و یک ساعت قرار دادن در حمام آب جوش انجام شد و سپس PH نمونه با افزودن هیدروکسید سدیم تا رسیدن به 8.5-9=PH تنظیم شد و سپس استخراج به کمک ۴۰ میلی‌لیتر ترکیب حلال‌های کلروفرم و ۲-پروپانول (۱:۹) در دکانتور انجام شد. حاصل استخراج (فاز آلی) پس از خشک‌شدن در ۰/۵ میلی‌لیتر متانول حل شد و سپس لکه‌گذاری از این محلول صورت گرفت [۲۳]. برای رسم منحنی کالیبراسیون ۴ نمونه در محدوده غلظتی ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانوگرم بر لیتر با افزودن مرفین به نمونه ادرار تهیه شد. مراحل آماده‌سازی نمونه برای تمام نمونه‌های استاندارد به‌طور یکسان انجام شد و پس از لکه‌گذاری با حجم ۱۰ میکرولیتر، جداسازی بر روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک صورت گرفت و مطابق شرایط قبلی صفحات اسکن و سطح زیر پیک‌های مرفین بر حسب غلظت مرفین در نمونه‌های استاندارد رسم شد.

ملاحظات اخلاقی: در همه مراحل پژوهش موازین اخلاقی رعایت شد. تمامی آزمایش‌ها در شرایط یکسان و استاندارد انجام شد و هیچ‌گونه سوگیری و دخل و تصرفی از جانب محققین در مراحل انجام پژوهش صورت نگرفت.

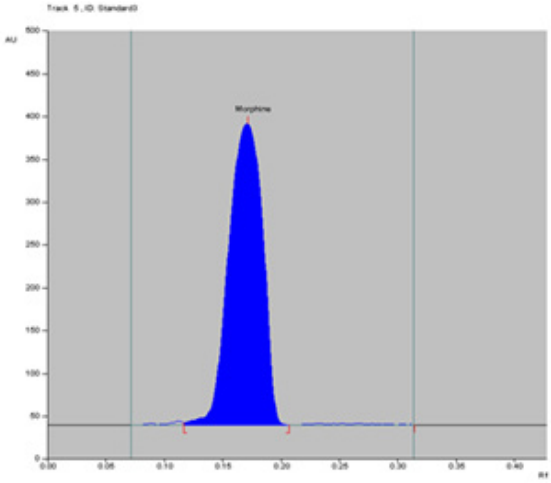
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: نتایج پس از جداسازی با صفحات کروماتوگرافی لایه نازک و اسکن دانسیتومتری با نرم‌افزارهای WinCATS 1.4.2.8121 و Excel 2013 انجام شد.

یافته‌ها

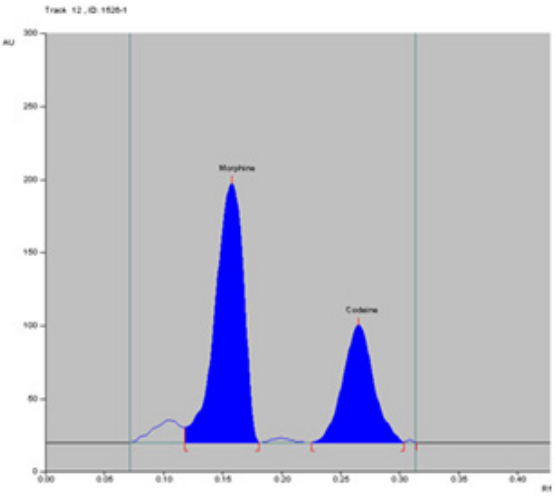
مقادیر RF با استفاده از استاندارد مرفین به‌دست آمد (۱۶/۲ میلی‌متر). محلول‌های استاندارد مرفین به غلظت ۵۰۰ ml/µg از محلول استاندارد اولیه در متانول ساخته شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از محلول استاندارد ۵۰۰ ml/µg از ۲ تا ۱۲ میکرولیتر بر روی کاغذ کروماتوگرافی لکه‌گذاری شد تا گستره غلظتی ۶-۱ spot/µg از مرفین به‌دست آید. از هر یک از محلول‌های استاندارد سه بار بر روی کاغذ لکه‌گذاری صورت گرفت و منحنی کالیبراسیون بر حسب میانگین مساحت زیر پیک‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف لکه‌های استاندارد (spot/µg) رسم شد. همبستگی مناسبی بین غلظت مرفین و مساحت زیر پیک آن مشاهده گردید. معادله رگرسیون 4049.21+238.65x=y با ضریب همبستگی ۰/۹۸۸۷ برای نمونه استاندارد لکه‌گذاری‌شده

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2023;12(1):e5

به‌دست آمد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲) طیف مربوط به مرفین در RF محدوده ۱۲ تا ۱۹ میلی‌متر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک



شکل ۳) طیف مربوط به تفکیک مرفین در RF محدوده ۱۲ تا ۱۹ میلی‌متر و کدئین در RF محدوده ۲۳ تا ۳۱ میلی‌متر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک

دقت روش اسکن TLC برای اندازه‌گیری مرفین با انجام مطالعات تکرارپذیری برای سه غلظت متفاوت در گستره خطی منحنی کالیبراسیون بررسی شد و برای سه بار تکرار RSD کمتر از ۶ درصد به‌دست آمد (جدول ۱).

همچنین صحت روش آنالیز اسکن TLC با انجام مطالعات اندازه‌گیری نمونه‌های افزوده شده با مرفین در سه غلظت متفاوت بررسی شد و درصد بازیابی ۹۶/۹ تا ۱۰۴/۵ به‌دست آمد (جدول ۲). حد تشخیص روش با توجه به شیب منحنی کالیبراسیون ۰/۲ µg/spot محاسبه شد. بررسی‌ها نشان داد وجود کدئین، استامینوفن و کافئین در نمونه‌ها، تداخلی در اندازه‌گیری مرفین ایجاد نمی‌کند، چراکه باند مربوط به آنها به خوبی بر روی کاغذ کروماتوگرافی لایه نازک از مرفین جدا می‌شوند. برای تهیه نمونه‌های مشابه نمونه‌های خیابانی از مخلوط پودر کدئین، استامینوفن و کافئین استفاده شد و سپس از استاندارد مرفین برای افزایش مرفین با غلظت‌های متفاوت به آنها استفاده شد. نمونه‌ها در متانول حل شدند و پس از به حجم رساندن، دوباره برای قرار گرفتن در گستره منحنی کالیبراسیون با متانول رقیق شدند و مراحل لکه‌گذاری، جداسازی و اسکن شبیه استانداردها انجام شد. در نهایت میزان مرفین با توجه به منحنی کالیبراسیون و میزان رقیق‌سازی محاسبه گردید. میزان بازیابی مرفین برای نمونه افزوده‌شده شبیه به نمونه خیابانی، ۹۵ درصد با انحراف استاندارد ۵/۹ درصد به‌دست آمد.

اندازه‌گیری مرفین در نمونه ادرار: برای اندازه‌گیری مرفین در نمونه ادرار، آماده‌سازی نمونه‌ها در محدوده غلظتی ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر طبق روش گفته‌شده انجام شد. یافته‌ها نشان داد، منحنی کالیبراسیون با ضریب همبستگی ۰/۹۷۹۶ رابطه خطی قابل قبولی را بین غلظت مرفین در نمونه‌های استاندارد و سطح زیر پیک مربوط به مرفین نشان می‌دهد. RSD برای سه بار تکرار نمونه استاندارد با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، کمتر از ۷ درصد به‌دست آمد. نمونه ادرار دارای مرفین (۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) مطابق روش آزمایش نمونه‌های استاندارد آزمایش و با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت آن محاسبه شد و درصد بازیابی ۹۴/۶ درصد با انحراف استاندارد نسبی ۵/۸ درصد به‌دست آمد.

جدول ۱) بررسی دقت روش با تعیین میزان مرفین در غلظت‌های متفاوت با سه بار تکرار

شماره نمونه	غلظت (µg/spot)	%RSD n=۳
۱	۱	۴/۶
۲	۲	۵/۰
۳	۳	۴/۹

جدول ۲) بررسی صحت روش با اندازه‌گیری مرفین در نمونه‌های استاندارد با غلظت مشخص

شماره نمونه	غلظت (µg/spot)	درصد بازیابی	متوسط درصد بازیابی (M±SD)
۱	۱	۹۶/۹	۱۰۱/۴±۵/۸
۲	۲	۱۰۲/۸	
۳	۳	۱۰۶/۷	

بحث

هدف از این مطالعه، به‌کارگیری روش دانسیتومتری TLC برای شناسایی کیفی و کمی مرفین بود. در مقایسه با روش‌های کروماتوگرافی که از حساسیت بالاتری برخوردارند و برای اندازه‌گیری مرفین در غلظت‌های کمتر، کارایی بیشتری دارند [۲۴، ۲۵]، روش دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک یک روش ارزان و سریع به شمار می‌رود زیرا روش‌های کروماتوگرافی گازی یا کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به ویژه هنگام جفت‌شدن با اسپکترومتری

جرمی حد تشخیص‌های پایین‌تری دارند، اما پرهزینه و وقت‌گیر هستند. روش اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک برای اندازه‌گیری کمی مرفین در یک داروی گیاهی حاوی تریاک مورد استفاده قرار گرفته است که در این روش حد تشخیص ۰/۴۹۸ spot/µg و درصد بازیابی بالای ۹۹ درصد برای مرفین به‌دست آمده است [۲۶]، که قابل مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده برای اندازه‌گیری مرفین در نمونه‌های مشابه نمونه‌های خیابانی در تحقیق حاضر است. در پژوهش دیگری از کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا با یک آشکارساز آرایه دیودی به همراه یک فیبر نوری برای شناسایی همزمان مرفین و آنالیت‌های دیگر استفاده شده است که روش بسیار مناسبی برای غربالگری سریع نمونه‌ها است ولی اندازه‌گیری کمی مرفین صورت نگرفته است [۲۷]. یافته‌ها نشان داد که با این روش، اندازه‌گیری مرفین در ادرار در محدوده غلظتی ۳۰۰ ml/ng با تکرارپذیری مناسب و با RSD کمتر از ۷ درصد امکان‌پذیر است. گرچه استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تشخیص کیفی مرفین در برخی آزمایشگاه‌های تشخیص اعتیاد به‌کار گرفته می‌شود ولی با بهره‌گیری از اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان میزان مرفین موجود در نمونه را نیز اندازه‌گیری کرد. همچنین امکان آنالیز همزمان مرفین و کدئین و همچنین سایر آلکالوئیدهای تریاک وجود دارد. از آنجا که در این روش میزان RF برای کدئین ۲۶/۹ به‌دست می‌آید و پیک‌های مربوط به اسکن دانسیتومتری TLC آن با پیک مرفین همپوشانی ندارد، بنابراین اندازه‌گیری همزمان مرفین و کدئین به سادگی امکان‌پذیر است. از اسکن دانسیتومتری کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان با صرف هزینه کم، به عنوان یک روش تأییدی مناسب برای نمونه‌هایی که در تست‌های نواری مثبت شده‌اند، استفاده کرد. همچنین با توجه به حساسیت روش مطالعه‌شده، می‌توان به عنوان یک روش ساده و سریع برای اندازه‌گیری میزان مرفین در نمونه‌های ضبط شده توسط پلیس و نمونه‌های ادرار بهره برد. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آتی این روش برای تعیین پروفایل و دسته‌بندی نمونه‌های مرفین و تریاک خیابانی مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل غیرقانونی بودن خرید و فروش مرفین درتهیه نمونه‌های خیابانی مرفین و همچنین به دلیل ملاحظات اخلاقی در تهیه نمونه‌های زیستی حاوی مرفین جهت آنالیز، محدودیت وجود داشت.

نتیجه‌گیری

آنالیز مواد با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک، یکی از ارزان‌ترین و ساده‌ترین روش‌های آزمایشگاهی شناسایی است که می‌تواند برای شناسایی مرفین در نمونه‌های مکشوفه پلیس و نمونه‌های بیولوژیکی و همچنین فرآورده‌های دارویی به ویژه در آزمایشگاه‌هایی با امکانات دستگاهی کم، به‌کار گرفته شود.

نکات بالینی و کاربردی در طب انتظامی: در این مطالعه سعی شده است که از تکنیک دانسیتومتری TLC برای جداسازی ساده، مقرون به صرفه، دارای قابلیت آنالیز چندین نمونه به طور همزمان و موازی استفاده شود که این تکنیک علاوه بر تشخیص سریع و ساده (کیفی)، قابلیت اندازه‌گیری مقدار مرفین (کمی) در نمونه‌های زیستی و محموله‌های مکشوفه پلیس را داراست.

تشکر و قدردانی: از حمایت‌های رئیس دانشگاه علوم انتظامی فراجا تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع: بدین‌وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

سهم نویسندگان: اصغر افتخاری (ارائه ایده، جمع‌آوری داده‌ها)؛ اکرم عاملی (طراحی مطالعه و تحلیل داده)؛ محسن بابایی (تجزیه و تحلیل داده)؛ همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: نویسندگان هیچگونه حمایت مالی از مراجع دولتی یا خصوصی دریافت ننمودند.

References

1. Capello C, Fischer U, Hungerbühler K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chem. 2007;9(9):927–34. https://doi.org/10.1039/B617536H.
2. Arabi M, Ostovan A, Li J, Wang X, Zhang Z, Choo J, Chen L. Molecular imprinting: green perspectives and strategies. Adv. Mater.2021;33(30):2100543. https://doi.org/10.1002/adma.202100543.
3. De Carvalho T.C, Tosato F, Souza L.M, Santos H, Merlo B.B, Ortiz R.S et al. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysi. Forensic Sci. Int. 2016;262:56–65. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.039
4. Yu H, Le H.M, Kaale E, Long K.D, Layloff T, Lumetta S.S et al. Characterization of drug authenticity using thin-layer chromatography imaging with a mobile phone. J. Pharm Biomed Anal. 2016;125:85–93. https://nano.ece.illinois.edu/files/2017/11/154.pdf
5. Bernard-Savary P, Poole C.F. A. Instrument platforms for thin-layer chromatography. J Chromatogr 2015;1421:184–202. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.002
6. Sereshti H, Poursorkh Z, Aliakbarzadeh G, Zarre S, Ataolahi S. An image analysis of TLC patterns for quality control of saffron based on soil salinity effect: A strategy for data (pre)-processing. Food Chem. 2018;239:831–9. https://doi.

org/10.1016/j.foodchem.2017.07.012

7. Stroka J, Spangenberg B, Anklam E. New approaches in TLC-densitometry. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2002;25:1497–1513. https://doi.org/10.1081/JLC-120005700
8. Capitan-Vallvey L.F, Lopez-Ruiz N, Martinez-Olmos A, Erenas M.M, Palma A.J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. Anal Chim Acta. 2015;899:23–56. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009
9. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sukwattanasinit T, Akkarawaranthorn J, Kitchaiya S. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method. Forensic Sci Int. 2012;219(3):96-100. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.12.004
10. Deena A.M, John M, Adel S, Lashien Ahmed F, Abdel Hakiem, Tamer Z. Novel environment friendly TLC-densitometric method for the determination of anti-coronavirus drugs "Remdesivir and Favipiravir": Green assessment with application to pharmaceutical formulations and human plasma. Microchem J. 2022;174:107101. https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.107101
11. Manish L. Chavhan, Atul A. Shirkhedkar, Sanjay J. Suran. Development and validation of a stability indicating RP-TLC/densitometric method for determination of Loratadine in bulk and in tablets. Arabian J Chem. 2017;10:825-30. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.014
12. Shahvar A, Saraji M, Shamsaei D. Smartphone-based chemiluminescence sensing for TLC imaging. Sens Actuators. 2018;255(1):891–4. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.144
13. Ioana S, Dorina C , Costel S. High sensitive and selective HPTLC method assisted by digital image processing for simultaneous determination of catecholamines and related drugs. Talanta. 2013;114:117-23. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.058
14. B. Spangenberg C.F, Poole C. Quantitative Thin-Layer Chromatography .a Practical Survey. Springer. 2011. 119–54. https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-10729-0
15. Heidarzadeh F, Shahrabadi M, Rostami S, Pazoki M, Abbasi H, Hosseiniara S M, et al. Rapid and Accurate Diagnosis of Substance Abuse: A Narrative Review. JPMed 2022; 11 (1) URL: http://jpmed.ir/article-1-1049-fa.html
16. Parise Filho R, Polli M C, Barberato Filho S, Garcia M, Ferreira E I. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. Brazilian Journal of Pharmaceutica Science, 2010, 46. 10.1590/S1984-82502010000300003.
17. Yamini A, Pourali S, Rezazadeh M. Electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography: an efficient method for extraction and determination of morphine, oxymorphone, and methylmorphine from urine samples. Anal Methods. 2014;6:5554–65. https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/ay/c4ay00480a
18. 18-. Isbell T.A, Strickland E.C, Hitchcock J, McIntire G, Capillary electrophoresis-mass spectrometry determination of morphine and its isobaric glucuronide metabolites. J Chromatogr.B Technol Biomed Life Sci. 2015;980:65–71. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.035
19. Fryirs B, M. Dawson, Mather L.E. Highly sensitive gas chromatographicmass spectrometric method for morphine. J Chromatogr. B: Biomed. 1997;693:51–7. https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00049-2
20. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended Methods for Testing Opium, Morphine and Heroin: Manual for Use by National Drug Testing Laboratories 1998 (ST/NAR/29/Rev.1), 29
21. Schuberth J, Schuberth J. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in blood extracted by solid phase. J Chromatogr. 1989;490(2):444-9. doi:10.1016/s0378-4347(00)82804-2
22. Jeffery Shoemaker M. Urine drug testing in the clinical laboratory: approved guideline. NCCLS, New York. 1999,19(6). https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview_TDM8-A.pdf
23. Pascual-Caro S, Borrull F, Calull M, Aguilar C. Homemade Pipette Tip Solid-Phase Extraction for the Simultaneous Determination of 40 Drugs of Abuse in Urine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Separations. 2022;9(9):233. https://doi.org/10.3390/separations9090233
24. Kong TY, Kim JH, Kim JY, et al. Rapid analysis of drugs of abuse and their metabolites in human urine using dilute and shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Arch Pharm Res. 2017;40(2):180-196. doi:10.1007/s12272-016-0862-1
25. 26- Sharma A, Gaurav K, Singh R et al. Development and validation of a high-performance thin-layer chromatography-densitometry method for the quantitative estimation of morphine in the classical ayurvedic formulation kamini vidrawan ras. JPC-J Planar Chromat. 2017;(30):188–92. https://doi.org/10.1556/1006.2017.30.3.6
26. 27- Ahrens B, Blankenhorn D, Spangenberg B. Advanced fibre optical scanning in thin-layer chromatography for drug identification. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002;772(1):11-8. doi:10.1016/s1570-0232(01)00617-1