آزمایشگاه مرکز بهداشت
شهرستان تبریز

Standard Operating Procedure (SOP)

روش انجام تست تشخیص اپیوئیدها

به نام خدا

مقدمه:

این روش جهت تشخیص مواد مخدر و روانگردان سنتی و صناعی کاربرد دارد. این روش شامل ۲ مرحله اصلی استخراج Liquid-Liquid Extraction و جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- پلیت TLC

۲- لوله استخراج

۳- محلول استخراج (E)

۴- فاز متحرک (F1)

۵- فاز متحرک (F2)

روش آزمایش:

ابتدا نمونه های ادرار انسانی که در شرایط کنترل شده و حضوری تهیه شده است را با تست های نواری به روش غربالگری آزمایش نموده و موارد مثبت را با توجه به نوع موارد مثبت اولیه به روش Le-Multi TLC و طبق دستورالعمل حاضر مورد آزمایش قرار دهید.

نکته: اگر نمونه ای در همان روز آزمایش نمی شود در دمای **۲۰- درجه سانتیگراد** نگهداری شود.

روش کار:

الف- مراحل استخراج مایع-مایع

۱- ابتدا درپوش ویال استخراج را بردارید. ml ۵ ادرار به لوله استخراج افزوده و به خوبی هک بزنید. به این ترتیب که ویال استخراج را چند بار سر و ته کنید.

۲- سپس ml ۴ از محلول استخراج را به نمونه اضافه کرده و ۳۰-۲۰ ثانیه بدقت هم بزنید. ۳۰ ثانیه ورتکس نموده و یا ۱۰-۵ دقیقه شیک نمایید و سپس ۵ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰-۳۰۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۳- محلول شفاف رویی را با سمپلر برداشته و درون بشر انگشتانه ای (بشر ml ۱۰-۵) ریخته و در دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتیگراد به آرامی تبخیر نمایید.

نکته ۱: هنگام برداشتن قسمت شفاف بالایی دقت نمایید که از محلول کدر پایینی برداشت نشود.

نکته ۲: زمان تبخیر مدت ۱۵ دقیقه به طول انجامد.

نکته ۳: قبل از تبخیر کامل محلول داخل بشر (۶-۵ قطره در داخل بشر بماند) آنرا از روی هات پلیت برداشته تا حرارت بالا به آنالیت های مورد بررسی آسیب نرساند.

ب- آماده سازی صفحه TLC و لکه گذاری (Blotting):

۱- صفحه TLC را برداشته و در فاصله حدود ۱ سانتیمتری از پایین با مداد مسیر لکه گذاری را به آرامی خط کشی کنید. مواظب باشید سیلیکاژل سطح صفحه خراشیده نشود.

۲- قبل از انجام لکه گذاری باید صفحه TLC به مدت حدود ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰-۸۰ درجه سانتیگراد فعال شود. برای این منظور از هات پلیت استفاده نمایید و سپس دمای آنرا در محدوده ۸۰-۷۰ درجه سانتیگراد تنظیم نمایید.

۳- هنگام لکه گذاری در صورت نیاز و در صورت تبخیر شدن کامل محتوی بشر، ۳-۲ قطره متانول به آن اضافه نموده و به خوبی تکان دهید تا محتوای بشر کاملا در متانول حل شود.

۴- محلول بدست آمده را با پیپت پاستور و به دقت در مسیر خط کشی شده لکه گذاری کنید. توجه نمایید که لکه ها کوچک باشد و صفحه TLC خراشیده نشود.

۵- از محلول استاندارد آنالیت مورد نظر نیز در یک طرف صفحه TLC با دقت لکه گذاری نمایید.

ج- تهیه فاز متحرک

برای بررسی موارد مثبت اپیوئیدها ml ۹ محلول F1 را با µl ۳۰۰ محلول F2 داخل تانک ریخته و به آرامی هم بزنید. سپس ۲۰-۱۵ دقیقه صبر کنید تا فضای تانک اشباع شود. توجه نمایید که تانک کاملا تمیز باشد و درب آن کاملا بسته بماند. پس از اشباع شدن تانک، صفحه TLC لکه گذاری شده و خنک شده را درون تانک قرار دهید. پس از حرکت فاز متحرک تا نزدیک به انتهای پلیت TLC آنرا خارج نموده و چند دقیقه به آن فرصت دهید تا در دمای آزمایشگاه تبخیر سطحی شده و سپس در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸-۵ دقیقه کاملا خشک شود.

د- آشکارسازی و تفسیر باندهای ظاهر شده:

پس از خشک شدن کامل پلیت، آنرا با معرف هگزاکلروپلاتینات اسپری نموده و سپس باندهای ایجاد شده را با بند ایجاد شده در استاندار مقایسه نمایید.

نکته: در فاصله کوتاهی پس از اسپری کردن پلیت، باندهای مربوط به آنالیت های مورد نظر ظاهر می شوند ولی تا خشک شدن کامل پلیت صبر کنید تا باندهای مربو به غلظت های کم به خوبی ظاهر شوند.

منابع:

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (5th edn), 2012.