

بسم الله الرحمن الرحيم

روشهای آزمایشگاهی مورد استفاده در تشخیص ترکیبات روان گردانها
ومخدرها در پزشکی قانونی و صحنه های جرم

دکترعلیرضا تیمچه حریری

(PhD) متخصص سم شناسی دکتری علوم آزمایشگاهی

مقدمه

- اعتیاد به مواد مخدر در ایران:
- احتمالاً بیش از ۵۰۰ هزار نفر فروشنده و دلال خرده پا وجود دارد. سالانه ۱۰۰۰ تن مواد مخدر در ایران مصرف می‌گردد. سالانه ۳۶۰ تن مواد مخدر توسط نیروی انتظامی کشف می‌گردد.
- تولید افغانستان سالانه بیش از ۸۰۰۰ تن تریاک (معادل ۸۰۰ میلیون دلار در مزرعه و پیش از تبدیل به کریستال و کراک ایرانی) تخمین زده می‌شود. سالانه ۱۰۰۰۰۰ میلیارد تومان (۵ میلیارد دلار) هزینه دارد!
- مواد افیونی
- مواد افیونی طبیعی:
- ترکیبات طبیعی یا نیمه طبیعی حاصل از گیاه خشخاش مانند تریاک، هروئین، شیره، مورفین، بوپرنورفین
-
- مواد افیونی صناعی ترکیبات صناعی با خواص افیونی مانند متادون و هروئین
- در برخی مواقع به غلط آنرا کراک نیز نامیده اند. کراک در اصل یک محرک است. اما غالباً کراک در ایران مخلوطی از کراک واقعی و هروئین است.



موارد استفاده تستهای تشخیص اعتیاد جهت

- آزمون قبل از استخدام و حین استخدام
- بررسی علل جرائم و تصادفات
- صدور گواهی صلاحیت
- تمدید پروانه اشتغال و کسب
- ازدواج
- سایر موارد مورد درخواست مراجع قضایی و انتظامی

اهمیت روشهای آزمایشگاهی

- به طور کلی روشهای آزمایشگاهی درسم شناسی و خصوصاً سم شناسی قانونی بسیار متنوع، پرهزینه و گاه گمراه کننده است. لذا بایستی نوع روش آزمایشگاهی برای هر پرونده موردی تعیین و اجرا شود. و قبل از شروع پروسه آنالیز پرونده بالینی وقضایی کاملاً مطالعه شود
- در بررسی بعضی متابولیت‌های دارویی در ادرار و یا خون در بحث سم شناسی گاه استفاده از تستهای رنگی کم هزینه، سریع و روش اجرای آن ساده است. در عین حال نتایج آن بسیار حائز اهمیت است
- رفتن به سراغ روشهای پر درد سروقت گیر و پرهزینه دستگاہی و آنالیتیکال نه تنها موجب نتیجه گیری صحیح نمیشود که باعث گیج شدن و سردرگمی میگردد.

روشهای آزمایشگاهی در تشخیص سموم

- تستهای غربالگری شامل
 - color tests
 - TLC
 - GC,
- Immunoassay (شامل روشهای ELISA, EMIT)

تستهای تاییدی شامل

- کروماتوگرافی لایه نازک TLC
- کروماتوگرافی گازی GC
- کروماتوگرافی مایع با فشار بالا HPLC
- جذب اتمی
- GC_MASS
- LC-Mass
- الکتروفورز وایمنو الکتروفورز
- NMR

خصوصیات تستهای غربالگری

- معایب

اختصاصیت کم، موارد مثبت کاذب فراوان، نیاز به تستهای تکمیلی دارند

- مزایا

ساده، سریع، ارزان، حساسیت نسبتاً خوب و تا حدودی مسیر تشخیص را مشخص می کند.

تستهای تأییدی

- معایب
گران است. نمونه نیاز به استخراج و تخلیص دارد، کار با آنها نیازمند تجربه و تکنیک خاص است، همه جا در دسترس نیست .
- مزایا
اختصاصیت بالایی دارند و نتایج آنها قطعی است .
هیچ تست تشخیصی عاری از خطا نیست.
به این معنی که می تواند مواردی را به اشتباه مثبت تشخیص دهد و مواردی را نیز گزارش نکند.
- توجه در مورد تست های مواد مخدر نیز چنین تداخلاتی وجود دارد.

تفسیر

- در تفسیر نتایج و آزمایشات مربوط به اعتیاد خصوصا تستهای غربالگری باید به خطاهای احتمالی و چالشهای آن توجه نمود
- ممکن است نمونه برداری صحیح انجام نشده باشد.
- ممکن است نگهداری و انتقال نمونه ها به درستی انجام نشده باشد .
- ممکن است متد بکار رفته جهت آزمایش مورد نظر کفایت لازم را نداشته باشد .
- ممکن است ماده مورد نظر در پروسه آماده سازی نمونه از بین برود. یا به ماده دیگر تبدیل شود. ترکیبات سودوافدرین به مشتقات آمفتامین ها
- ممکن است تفسیر نتایج به درستی انجام نشده باشد. و از عوامل مداخله گر آگاهی نداشته باشیم.

- امروزه در بیشتر کشورهای جهت **Screening** داروهای غیرقانونی از روشهای شیمیایی وخصوصاً روشهای ایمونواسی استفاده می شود.
- مزایای این روش :
 - 1- سرعت بالا
 - 2- ارزان
 - 3- ساده و راحت
 - 4- حساسیت بالا

مکانیسم روشهای ایمنواسی

روش این کیت ها بر اساس ایمنوکروماتوگرافی بر روی کاغذ نیترات سلولز می باشد

- عوامل موثر در واکنش های اتصال آنتی ژن - آنتی بادی

1- قدرت اتصال آنتی ژن به آنتی بادی (affinity)

هر چه قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن محکمتر باشد و آنتی ژن دقیقاً از لحاظ ساختمانی مکمل آنتی بادی باشد کمپلکس **Ag-Ab** مشکل تر از یکدیگر جدا می شوند.

لذا نوع کیت و کارخانه سازنده مهم است.

۲- **PH** محیط: مناسب ترین **PH** برای واکنش های سرولوژی 7/2 می باشد. در **PH** پایین تر از 7/2 اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ضعیف می شود بطوریکه در **PH=2/2** کمپلکس **Ag-Ab** کاملاً از یکدیگر جدا می شوند.

از طرف دیگر اتصال آنتی ژن به آنتی بادی در **PH** های بالا ($PH > 9$) ضعیف می شود

مکانیسم روشهای ایمنواسی

3- قدرت یونی محیط (ionic strength) :

- عکس العمل های سرولوژی در محیطی که فاقد الکترولیت باشد صورت نمی گیرد.
- قدرت یونی محیط در حقیقت مولاریته نمک های محلولی است که آنی ژن و آنی بادی در آن محلول قرار می گیرد.
- چنانچه غلظت نمک زیاد باشد باعث رسوب آنی بادی و آنی ژن پروتئینی می باشد.
- معمولاً سرم فیزیولوژی و یا تامپون فسفات نمکی با قدرت یونی (M) 0.02 مولارد در PH 7/2 مناسب ترین محیط را ایجاد می کند.

4- زمان:

- اتصال مولکولهای آنی ژن به آنی بادی معمولاً به سرعت و در عرض چند ثانیه صورت می گیرد که با توجه به نوع کلاس ایمونوگلوبولین متفاوت می باشد.

5- درجه حرارت :

- بهترین درجه حرارت 37° می باشد ولی معمولاً تغییرات درجه حرارت تأثیر چندانی در واکنش های سرولوژی ندارد.

استراتژی های تقلب

- کاربرد وسیع تستهای Screening ادرازی جهت داروهای ممنوع افراد مظنون را بر آن داشته است که جهت منفی کردن قسمت خود يك سري استراتژیهای را بکار ببرند.
- خیلی از سایتیهای اینترنتی مخصوص منفی کردن تستها بوجود آمده که محصولات را به بازار عرضه می کنند که با استفاده از این مواد افراد می توانند در تستهای Screening تقلب کنند.

استراتژي هاي مورد استفاده

Sample manipulation •

Sample adulteration •

Masking •

Sample manipulation

شامل انجام فعالیتهایی است در جهت تعویض ماهیت ادرار مورد آزمایش که این عمل روی مقدار دارو و متابولیت هایش اثر می گذارد.

- جابجایی نمونه ادرار با نمونه ادرار نرمال
- تست تشخیصی SG و نظارت بر افراد برای چند ساعت قبل از نمونه گیری

چالشها

- ملاحظات اخلاقی حفظ حرمت افراد. ملاحظات شرعی. ملاحظات قانونی و قضایی لذا انجام آزمایش اعتیاد در هر آزمایشگاهی مجاز نیست.
- صرف هزینه و پرسنل نظارتی مطمئن

Sample adulteration

- انجام فعالیت‌هایی در جهت وارد کردن مواد شیمیایی به نمونه ادرار .
- تست تشخیصی : بصورت روتین ندارد. فلیم فوتومتری جهت سدیم
- چالشها
- در همه جا امکان پذیر نیست، از نظر اقتصادی پر هزینه است ، چندان قطعی نیست
- تست تشخیصی : ASR

Tests to Detect Additives Adulteration

- Temperature •
- Color and Appearance •
- Nitrite •
- pH •
- Specific Gravity •

Masking

- عبارتست از بیرون راندن سریع دارو از بدن
- ا بلوك کردن حذف دارو از بدن از طریق ادرار
- افزایش متابولیسم دارو
- مثل Contraceptive ها و فنوباریتال در القاء آنزیم گلوکوزونیل ترانسفراز

سایر مکانیسم ها

- استفاده از موادیکه خصوصیات فارماکولوژیک یکسان دارند ولی مشابهت ساختمانی ندارند. مثل متادون

- داروهای NSAIDs و نورولپتیک ها باعث تداخل در روشهای ایمونواسی می شوند و نتیجه منفی کاذب می دهند.

- عوامل بروز مثبت کاذب

- استفاده از داروهای موادی که خصوصیات فارماکولوژیک یکسان دارند و مشابهت ساختمانی هم دارند مثل ترکیبات کدئین

- داروی رانیتیدین بعلت مشابهت با متابولیت آمفتامین آن را مثبت کاذب می کند.

- - داروی آنتی بیوتیک کینولونی (افلوکسازین) بعلت مشابهت ساختمانی با اپیوئیدها باعث جواب مثبت کاذب می شود.

اهمیت موضوع

- به خاطر حفظ حیثیت افراد مهم است.
- ممکن یک پاسخ مثبت کاذب باعث تغییر سرنوشت و مسیر زندگی فرد شود.
- ممکن است منجر به طرح شکایت و اعاده حیثیت شود.
- هزینه های جبران ناپذیری ایجاد می کند چه نتیجه مثبت کاذب چه نتیجه منفی کاذب
-
-

نتیجه گیری

- امروزه استفاده از کیت‌های تشخیصی ایمنو کروماتوگرافی در همه جا حتی مراکز پلیس و مراجع قضایی روتین شده است.
- متأسفانه نتایج این تست‌های غربالگری گاهی بعنوان نتیجه قطعی عنوان می‌شود که با توجه به خطاها و چالش‌های فوق این نتایج جای بحث و تفسیر دارد. و نباید بعنوان نتیجه قطعی به مراجع ذیربط اعلام گردد.
- با توجه به شرایط و امکانات، هنوز روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با رعایت شرایط استخراج، بهترین تست غربالگری و تاییدی می‌باشد.

روش های کروماتوگرافی

- کروماتوگرافی لایه نازک TLC
- کروماتوگرافی ستونی SPE
- کروماتوگرافی مایع با فشار بالا HPLC
- کروماتوگرافی گازی GC
- ترکیب کروماتوگرافی گازی و MASS Spectrometry با مخفف GC MASS
- ترکیب کروماتوگرافی مایع و MASS Spectrometry با مخفف LC MASS

نکات استفاده از روشهای اختصاصی کروماتوگرافی

- حتما باید نمونه مورد نظر استخراج شده باشد. که روشهای استخراج متفاوت است.
- نمونه حتما تغلیظ شده باشد.
- نمونه قبل از استفاده فیلتر شده باشد.
- استاندارد داخلی و خارجی همراه نمونه استفاده شود.
- برای دتکت کردن حتما دتکتور نیاز داریم.
-
- تفسیر نتایج در کنارکنترل و استاندارد باشد.

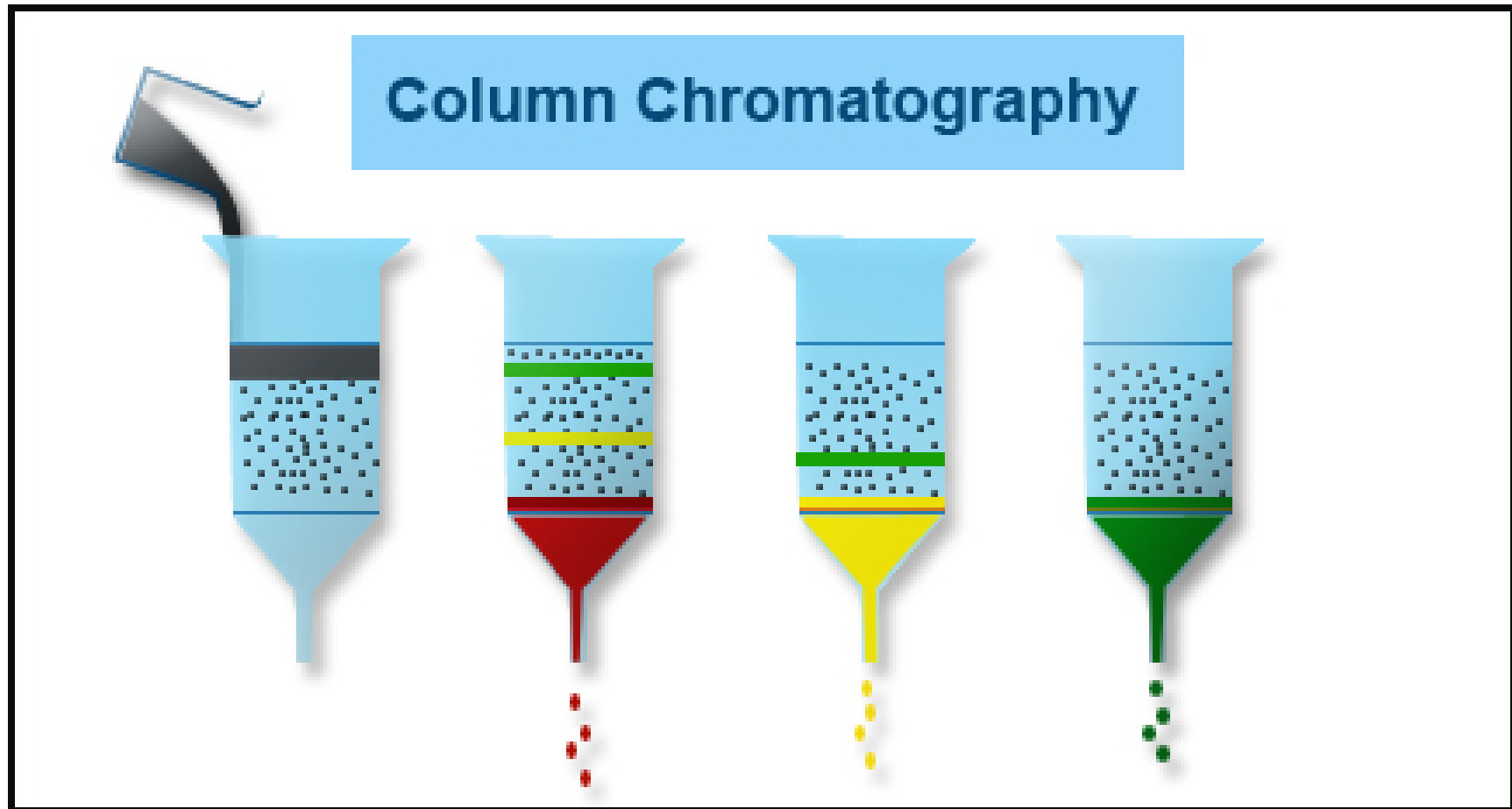
TLC

- استفاده از سیلیکاژل باگرید خاص و UV به عنوان فاز ثابت
- استفاده از صفحات شیشه ای ویاپلیمری خاص استفاده از ترکیب چند حلال آلی به عنوان فاز متحرک
- استفاده از چند نمونه و استاندارد همزمان
- دتکت کردن با استفاده از اسپری یدوپلاتینات
- امکان تخلیص نمونه و دتکت کردن آن باروشهای دیگر و یا کمی کردن نتیجه با استفاده از نمونه تخلیص شده
- روش نسبتا ارزان و اختصاصی به شرطی که کارشناس مجرب آن را تفسیر کند.

کروماتوگرافی ستونی SPE

- استفاده از ستون یالوله های خاص به عنوان پایه
- تلفیق استفاده از سیلیکاژل و جاذب های یونی (ION EXCHANG) به عنوان فاز ثابت
- استفاده توام از حلال آلی و بافرهای نمکی یونی به عنوان فاز متحرک
- استفاده از پمپهای خلا جهت تسریع
- نیاز به دتکتورهای دیگر جهت تشخیص
- کاربرد کمی پیچیده تر، پرهزینه تر، وقت گیر از TLC
- کاربرد برای ترکیبات متنوع تر دارو و انواع مخدرها و پاسخ اختصاصی تر است.

کروماتوگرافی ستونی SPE

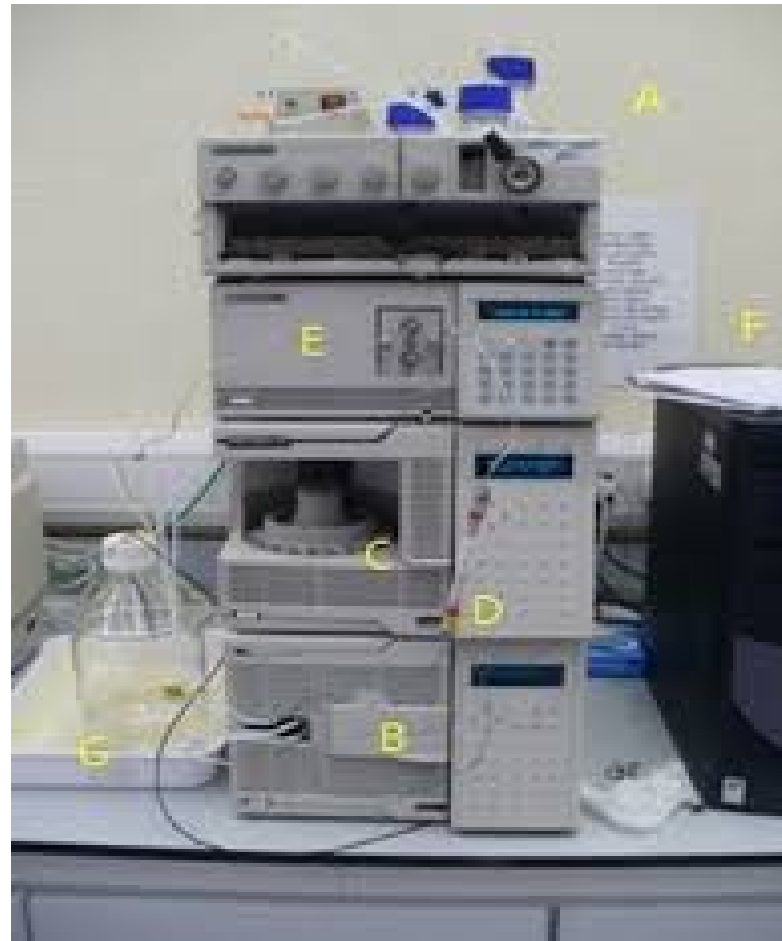


HPLC

- استفاده از ستونهای کروماتوگرافی به عنوان فاز ثابت
- استفاده از چند پمپ و چند حلال ثابت و متغیر
- استفاده از حلالهای باگرید hplc
- نمونه حتما نیاز به استخراج خاص و تخلیص و فیلتر کردن دارد
- بسیار پرهزینه و گران تمام می شود
- نتایج اختصاصی و برای تعیین مقدار می توان ار آن استفاده کرد

به صورت روتین به علت هزینه بالا و وقت گیر بودن استفاده نمی شود. مگر در موارد خاص مثلا تعیین مقدار متادون در بعضی از فوتهای مشکوک.

HPLC



GC-MASS

- ترکیب توام دو تکنیک کروماتوگرافی گازی GC و اسپکترومتری بمباران یونی MASS
- نمونه پس از تفکیک در کروماتوگرافی گازی برای شناسایی مولکولها در قسمت MASS در اثر بمباران شکسته و در میدان مغناطیسی بر اساس نسبت بار به جرم مورد شناسایی قرار میگیرند.
- حساسیت در حد نانو گرم و پیکو گرم است.
- دارای کتابخانه جداگانه برای داروها و سموم و حلالهای آلی است
- گاهی دویست تا هشتصد هزار ترکیب رامی تواند شناسایی کند
- اختصاصیت در حد ۸۰ تا ۹۹٪ بسته به متد استخراج و نوع کتابخانه مورد استفاده است.

GC-Mass



GC-Mass

- خرید و نگهداری دستگاه بسیار پرهزینه است.
- نمونه حتما قبل از تزریق باید استخراج، تخلیص و فیلتر شود. و هر گونه آلودگی در نمونه منجر به اختلال در دستگاه و نتیجه می شود.
- تفسیر نتایج باید توسط کارشناس و متخصص سم شناسی انجام شود.
- درصد احتمال و نوع متد و کتابخانه مورد استفاده قید شود.
- تقریباً روش اختصاصی و پاسخ با رعایت شرایط قابل اعتماد است.

نکات کلیدی

- قبل از شروع مرجع درخواست کننده آزمایش مشخص شود.
- در صورت جمع آوری نمونه از صحنه جرم پرونده قضایی و گزارش صحنه مطالعه شود.
- نوع نمونه از جهت ادرار، بزاق، خون، مواد مستفرغه، مو، مایعات بیولوژیک و غیر بیولوژیک و... مشخص شود.
- نوع درخواست بررسی شود؟ مخدر، دارو و یاسایر موادمسمی مورد ظن است.
- در مرحله اول نمونه ارزیابی شود؟ آیا به استخراج نیاز دارد یاخیر
- در صورت عدم نیاز به استخراج تست غربالگری انجام شود. تامسیر روش آزمایش مشخص شود. مثلا روش استخراج حشیش با مخدرها وبامشتقات
- آفتامین ها متفاوت است.
- در غیر اینصورت روش استخراج مناسب باتوجه به نوع پرونده انتخاب شود که بسیار مهم است.

نکاتی در تفسیر

- نتیجه آزمایش بر حسب نوع درخواست باید تنظیم شود. و لزوماً برای حفظ حقوق افراد فقط به موارد درخواستی پاسخ داده شود. مثلاً نیازی به اعلام همه داروهای بدست آمده از فرد نیست.
- نتایج آزمایشات مثبت نباید تنها بر اساس تست غربالگری اعلام شود.
- پاسخ نتایج برای مراجع قضایی و انتظامی باید با دقت و رعایت حقوق افراد تنظیم شود.
- از اعلام نتایج با عجله و بدون توجه به تستهای تاییدی اجتناب شود.
- از هرگونه تفسیر و یا توضیح غیر ضروری اجتناب شود.
- در آزمایشات صحنه های جرم و یا موارد جنایی و فوتی سعی شود نتایج سایر نمونه ها بررسی و سپس نتایج با در نظر گرفتن دید کلی اعلام شود.
- نتایج محرمانه اعلام شود.



نمونه‌های فیلتر سیگار و مو

کشف شده در صحنه‌ی جرم





