نویسندگان
وحید حسین‌زاده اقدم[۱و۳]*
نرگس محمدی[۲و۳]
*Aghdam@sbmu.ac.ir

# کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

چکیده

کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، فرم بهبود یافته کروماتوگرافی لایه نازک[۴] است که با انجام خودکار مراحل کروماتوگرافی باعث افزایش تفکیک‌پذیری و اندازه‌گیری کیفی و کمی با دقت و صحت بالاتری می‌شود. این روش، جایگزین دیگر روش‌های کروماتوگرافی نیست. در مقایسه با سایر روش‌های کروماتوگرافی، زمان و هزینه آنالیز با این روش بسیار پایین است و در جای خود توانایی‌های منحصر به فردی را نیز دارا است.

واژه‌های کلیدی

کروماتوگرافی، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، طیف‌سنجی جرمی[۵].

## مقدمه

در میان روش‌های جداسازی، روش کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا توانایی و کاربرد گسترده‌ای دارد زیرا روشی حساس و به نسبت ساده برای شناسایی و تعیین مقدار بیشتر مواد حتی با مقادیر کم است. همچنین در این روش، آنالیز در زمان کوتاهی انجام‌پذیر است و با کاربرد و نگهداری مناسب از آن، می‌توان نتایجی با دقت و صحت خوب بدست آورد.

اصول فرآیند کروماتوگرافی لایه نازک در طول ۵۰ سال گذشته بدون تغییر باقی مانده است و شامل استفاده از یک لایه نازک از ماده‌ای جاذب به ضخامت ۰/۱ تا ۰/۲۵ میلی‌متر است که روی صفحاتی از جنس پلاستیک، آلومینیوم و یا شیشه به‌عنوان نگهدارنده این لایه جاذب استفاده می‌شود.

نمونه در یک حلال مناسب حل شده و به‌صورت لکه یا باند در فاصله یک سانتی‌متری لبه پایینی جاذب روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک گذاشته می‌شود. حلال شوینده[۶] (یک حلال یا مخلوطی از حلال‌ها) با ویژگی مویینگی[۷] از طریق جاذب و پایین‌تر از محل نمونه‌گذاری روی لایه جاذب حرکت می‌کند. این کار با استفاده از تانک شیشه‌ای مستطیل شکل انجام می‌گیردکه حلال شوینده به عمق ۵ میلی‌متر درون آن ریخته می‌شود و پس از قرار گرفتن صفحه در آن، درب تانک گذاشته می‌شود. زمانی که حلال شوینده رو به بالا و از میان جاذب عبور می‌کند، اجزای نمونه نیز با سرعت‌های متفاوت مهاجرت می‌کنند و در نتیجه از یکدیگر جدا می‌شوند. هنگامی که حلال شوینده به نقطه‌ای نزدیک انتهای صفحه جاذب رسید، صفحه از درون تانک خارج و خشک می‌شود.

از ویژگی‌های این روش که آن را از سایر روش‌های جداسازی فیزیکی و شیمیایی متمایز نموده این است که دو فاز غیرقابل اختلاط، یکی ثابت و دیگری متحرک در تماس با یکدیگر قرار دارند. هنگامی که نمونه روی فاز ساکن قرار می‌گیرد با عبور فاز متحرک از میان نمونه و در طول فاز ثابت، اجزا نمونه، پیوسته تحت تعامل فیزیکی و شیمیایی

گذرا با فاز ثابت و متحرک هستند و به تدریج در طول فاز ثابت از یکدیگر فاصله گرفته و به‌صورت باند یا مناطقی مشخص جداسازی می‌شوند.
لکه‌ها یا نوارهای جداسازی شده، با استفاده از نور فرابنفش و درصورت لزوم با معرف‌های شیمیایی مشتق‌سازی شده قابل رویت می‌شوند. برای اندازه‌گیری کمی، می‌توان ناحیه حاوی لکه را از روی صفحه جدا نمود و یا شستشو داد و یا با طول موج از پیش تعیین شده، بدون تخریب صفحه آن را اسکن نمود. روش‌های جدید کروماتوگرافی لایه نازک، حرکت رو به رشدی را در جهت اسکن و تصویربرداری از صفحات، به‌منظور حساسیت بیشتر و ثبت دقیق‌تر و ماندگارتر کروماتوگرام[۸]، آغاز نموده است که در آن علاوه‌بر کاهش نیروی کار، کاهش مواد شیمیایی (کاهش آلایندگی) نیز مورد توجه است [۶].

## تعریف کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یکی از روش‌های جداسازی اجزای مخلوط است که در آن از اختلاف توزیع اجزا، بین فاز ساکن و متحرک (فاز ساکن به‌طور معمول، سیلیس یا آلومین) استفاده می‌شود. تصویر (۱) قیاسی ساده برای کروماتوگرافی است بدین ترتیب که زنبورها مانند اجزاء نمونه، جذب گل‌ها می‌شوند و در نتیجه با سرعت و در زمان‌های متفاوت عبور می‌کنند [۲].

شکل ۱: قیاسی ساده برای کروماتوگرافی [۲].

## روش‌های کروماتوگرافی

روش‌های کروماتوگرافی را می‌توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه‌بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد. اگر فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذب سطحی و اگر فاز ساکن، مایع باشد آن را کروماتوگرافی تقسیمی می‌نامند [۵].

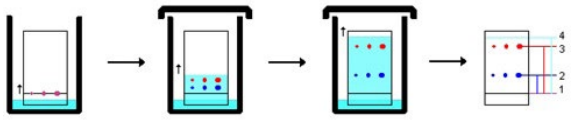
## تعریف کروماتوگرافی

جدول ۱: طبقه‌بندی روش‌های کروماتوگرافی ( بر حسب ماهیت فازها) [۵].

| براساس ماهیت فاز متحرک | | | براساس شکل یا جنس فاز ساکن | |
|---|---|---|---|---|
| کروماتوگرافی ستونی [۱۳] | کروماتوگرافی لایه نازک | کروماتوگرافی کاغذی[۱۱] | کروماتوگرافی مایع [۱۰] | کروماتوگرافی گازی[۹] |

## کروماتوگرافی لایه نازک

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذبی جامد - مایع بوده که اصول آن همانند کروماتوگرافی ستونی است. اما در این مورد، جسم جاذب جامد را به‌صورت یک لایه نازک روی یک قطعه شیشه، پلاستیک یا فلز پخش می‌کنند. یک قطره از محلول نمونه یا مجهول را در نزدیکی لبه صفحه می‌گذارند و صفحه را به همراه مقدار کافی از حلال استخراج کننده در ظرفی قرار می‌دهند. سطح حلال باید آنقدر باشد که فقط به زیر لکه برسد. حلال براساس ویژگی مویینگی به سمت بالای صفحه حرکت می‌کند و اجزاء مخلوط را با سرعت‌های متفاوت با خود می‌برد. تصویر (۲) چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک را نشان می‌دهد [۶].



شکل ۲: چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک [۴].

کروماتوگرافی لایه نازک بسیار آسان است و به سرعت هم انجام می‌شود. این روش برای تفکیک اجزاء مخلوط بسیار کارآمد بوده و همچنین می‌توان از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج کننده به‌منظورکروماتوگرافی ستونی استفاده کرد.

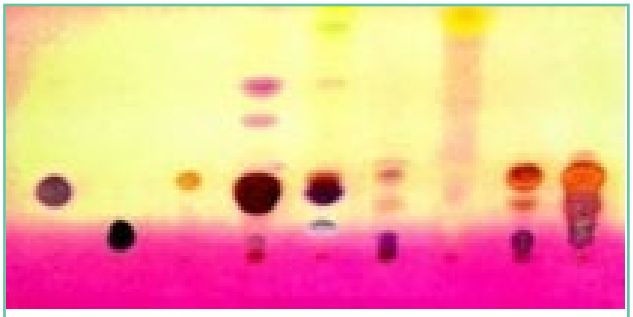
در کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان از همان مواد جامدی که در کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود، به‌عنوان فاز ساکن استفاده کرد و در این میان سیلیکا و آلومینا بیشتر به کار می‌رود. به‌طور معمول، جسم جاذب را با مقدار کمی از ماده چسباننده مانند گچ، کلسیم سولفات و یا نشاسته مخلوط می‌کنند تا جسم جاذب چسبندگی لازم را پیدا کند و به صفحه بچسبد. صفحه‌ها را می‌توان قبل از مصرف تهیه کرد و یا از ورقه‌های پلاستیکی آماده که در بازار موجود است، استفاده نمود [۶].

## کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

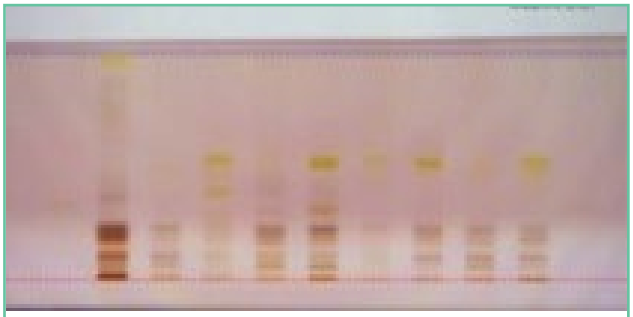
دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، برتری‌هایی بر کروماتوگرافی لایه نازک دارد که شامل موارد زیر است [۷]:

- انجام خودکار؛
- قابلیت اسکن؛
- بهینه‌سازی شرایط کروماتوگرافی؛
- تشخیص انتخابی؛
- حداقل آماده‌سازی؛
- قابلیت اتصال به دیگر دستگاه‌های آنالیز.

همچنین این دستگاه قادر به بررسی و تحقیق در مورد اطلاعات حاصل از ترکیبات پیچیده آلی، معدنی و مولکول‌های زیستی است. در تصاویر (۳) و (۴) کیفیت نتایج حاصل از جداسازی نمونه‌ها به دو روش کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، در مورد نمونه‌های یکسان، قابل مشاهده است.



شکل ۳: نمونه‌گذاری به‌صورت لکه روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک [۳].



شکل ۴: نمونه‌گذاری به‌صورت باند روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا [۳].

## مزایا و قابلیت‌های دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا دارای مزایایی است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود [۷]:

- آموزش و کاربری آسان؛
- استفاده همزمان چندین کاربر از دستگاه؛
- کاهش زمان آنالیز و کمترین هزینه برای هر آنالیز؛
- کمترین هزینه نگهداری؛
- امکان شناسایی با چشم (در یک سیستم باز)؛
- قابلیت کاربرد گستره وسیعی از فاز ساکن با انتخاب پذیری اختصاصی؛
- توانایی انتخاب حلال برای فاز متحرک بدون محدودیت UV و خلوص بالای حلال؛
- کاربرد حلال بدون نیاز به فیلترکردن و گاز زدایی؛
- عدم امکان تداخل با نمونه آنالیز قبلی؛
- امکان تکرار آنالیز در شرایط گوناگون روی نمونه‌های آنالیز شده؛
- عدم نیاز به تصفیه و خالص‌سازی نمونه‌ها در بیشترموارد؛
- آنالیز همزمان تعداد زیاد نمونه؛
- کمترین هزینه خرید حلال و مصرف کم فاز متحرک برای آنالیز هر نمونه؛
- دقت و صحت کمی بالا (نمونه‌ها و استانداردها در شرایط یکسان و همزمان آنالیز می‌شوند.)؛
- حساسیت در حد نانو و پیکوگرم؛
- قابلیت کاربرد روش‌های شناسایی عمومی و اختصاصی.

## مقایسه روش‌های کروماتوگرافی

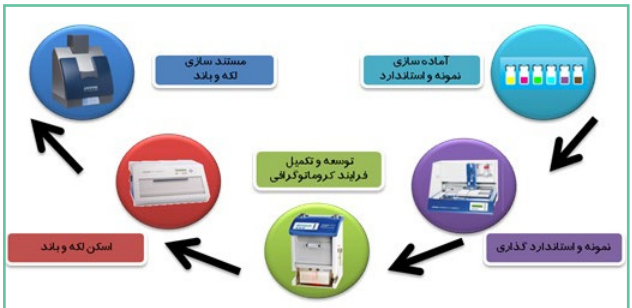
بین سه روش کروماتوگرافی HPTLC[۱۳]، HPLC[۱۴] و GC[۱۵] مقایسه‌ای صورت گرفته است که مزایا و معایب هر کدام از آنها در جدول ذیل آمده است:

جدول ۲: مقایسه روش‌های کروماتوگرافی [۷]

| عوامل | روش‌های کروماتوگرافی | | |
|---|---|---|---|
| | HPTLC | HPLC | GC |
| دما و فشار | دما و فشار اتاق | فشار بالا | دمای بالا |
| آماده‌سازی نمونه | عادی | ویژه | ویژه |
| آنالیز روزانه (تعداد نمونه) | >۱۰۰ | ۵-۲۵ | ۵-۲۵ |
| زمان آنالیز (برای هر نمونه) | ۱-۵ دقیقه | ۵-۹۰ دقیقه | ۵-۹۰ دقیقه |
| فاز ساکن کروماتوگرافی | یکبار مصرف | قابل استفاده مجدد | قابل استفاده مجدد |
| ارزیابی توسط چندین آشکارساز | خوب | متوسط | ضعیف |
| جداسازی ترکیبات برای آنالیز بعدی | خوب | متوسط | ضعیف |
| طیف جذبی نمونه | ✓ | آشکارساز PDA[۱۶] | × |
| هزینه تعمیر و نگهداری | کم | بالا | متوسط |
| هزینه هر آزمون | کم | بالا | متوسط |
| مشتق‌سازی بعد از جداسازی | آسان | سخت | سخت |
| آنالیز همزمان (نمونه و استاندارد) | همزمان | متوالی | متوالی |
| حد تشخیص کمی | متوسط | خوب | خوب |
| محدودیت | نمونه فرار | تداخل طیفی فاز متحرک | نمونه تجزیه‌پذیر |

## فرآیند کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، فرم بهبود یافته کروماتوگرافی لایه نازک است که با انجام خودکار مراحل کروماتوگرافی باعث افزایش تفکیک‌پذیری و اندازه‌گیری کیفی و کمی با دقت و صحت بالاتری می‌شود. تصویر (۵) نمایی از مراحل انجام فرایند کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا را نشان می‌دهد [۱].



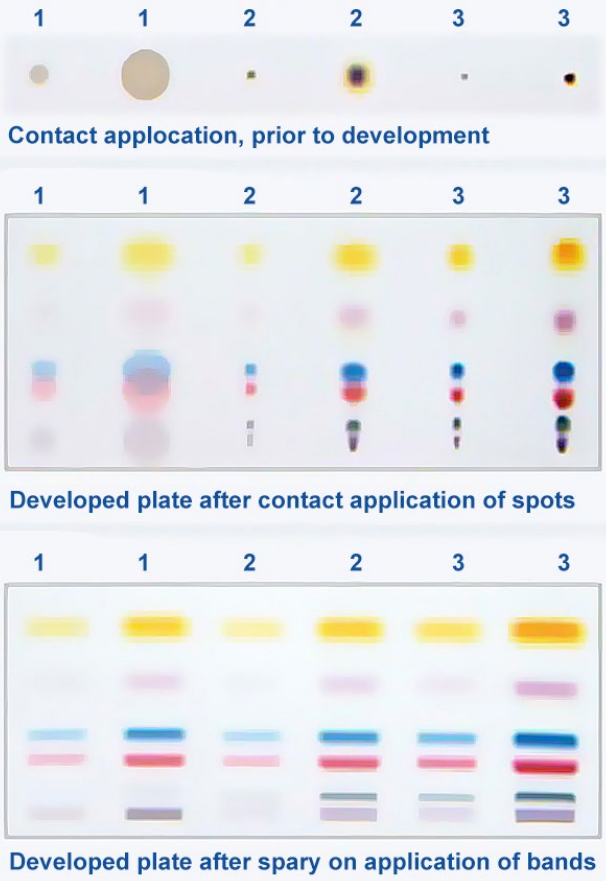

تصویر ۵: نمایی از مراحل فرایند کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

## فرآیند نمونه‌گذاری

نمونه‌گذاری اولین گام در فرآیند کروماتوگرافی لایه نازک است و تأثیر قابل توجهی بر کیفیت نتایج پایانی دارد. در کروماتوگرافی لایه نازک، نمونه‌گذاری به‌صورت دستی و توسط لوله موئین برای آنالیزهای ساده انجام می‌شود. به‌وسیله لوله موئین می‌توان حجمی بین ۵ تا ۰/۵ میکرولیتر را روی صفحات معمولی به‌صورت لکه، نمونه‌گذاری کرد.

در آنالیزهای کیفی و کمی به‌منظور افزایش قدرت تفکیک و تکرارپذیری، نمونه‌گذاری به‌صورت باند با استفاده از دستگاه نمونه‌گذار خودکار انجام می‌پذیرد [۱].

نمونه‌گذاری در حالت اسپری کردن، به‌صورت نوار باریک، این امکان را فراهم می‌سازد تا بتوان حجم بیشتری را در گستره وسیع‌تر روی صفحات قرار داد؛ به ویژه هنگامی که به‌منظور ردیابی آنالیت، باید حجم بیشتری نمونه‌گذاری شود و یا هنگامی که ماتریکس نمونه پیچیده است، برای قدرت تفکیک بهتر، باید در وسعت زیادتری نمونه‌گذاری نمود. در تصویر (۶) نمونه‌گذاری به‌صورت لکه و باند روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک و نتایج جداسازی حاصل از چگونگی نمونه‌گذاری به خوبی نشان داده شده‌است [۱].

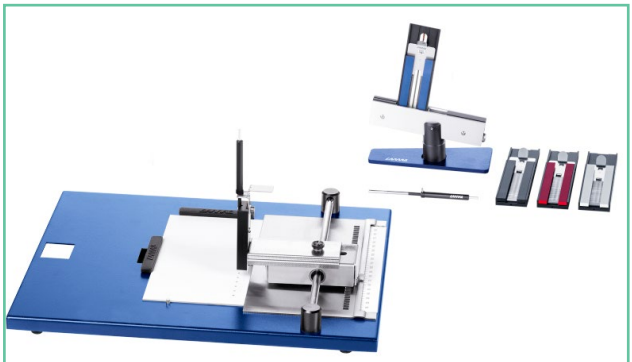



شکل ۶: نمونه‌گذاری به‌صورت لکه و باند [۱].

## انواع دستگاه‌های نمونه‌گذاری در کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

### نمونه‌گذار دستی:

با استفاده از نمونه‌گذار دستی (تصویر ۷)، نمونه‌گذاری به آسانی و با دقت بالا و بدون صدمه به لایه به‌وسیله این دستگاه به‌صورت لکه روی صفحات HPTLC و TLC انجام می‌شود. همچنین حجم نمونه‌گذاری نیز به مقدار یکسان مطابق ظرفیت لوله موئین استاندارد، با استفاده از نگهدارنده لوله موئین، انجام می‌شود [۱].



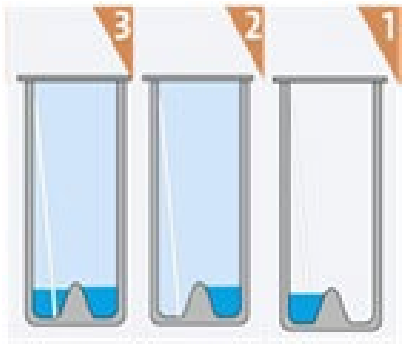
شکل ۷: نمونه‌گذار دستی [۱].

### نمونه‌گذار نیمه خودکار

این دستگاه نمونه‌گذاری، نیمه خودکار بوده و برای آنالیز کیفی و کمی و نیز در جداسازی تهیه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد و ابزار مناسبی برای کاربردهای عمومی در نمونه‌گذاری است و در مقایسه با نمونه‌گذاری خودکار نیاز به حضور کاربر دارد [۱].

شکل ۸: نمونه‌گذار نیمه خودکار [۱].

شکل ۹: نمونه‌گذار خودکار [۱].




تصویر ۱۰: تانک شیشه‌ای دوقلو [۱].

شکل ۱۱: تانک شیشه‌ای افقی [۱].

نمونه‌گذاری به‌صورت باندهای باریک است و برای نمونه‌گذاری با حجم بیشتر و تفکیک‌پذیری بهتر، از روش اسپری کردن استفاده می‌شود. این دستگاه تحت کنترل نرم‌افزار است. تصویر (۸) نمایی از نمونه‌گذار نیمه خودکار را نشان می‌دهد [۱].

### نمونه‌گذار خودکار:

استفاده از دستگاه نمونه‌گذار خودکار (تصویر ۹)، عاملی کلیدی در افزایش بهره‌وری در آزمایشگاه HPTLC است. مزایایی مانند دقت و توانایی انجام کار در استفاده طولانی مدت را می‌توان در دستگاه نمونه‌گذاری خودکار مشاهده نمود [۱].

از توانایی‌های این دستگاه می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

- نمونه‌گذاری کاملاً خودکار؛
- نمونه‌گذاری به هر دو صورت لکه و باند؛
- ورود داده‌ها و نظارت به‌وسیله سیستم نرم‌افزاری؛
- حجم نمونه‌گذاری لکه بین µl ۵-۱/۰ به‌صورت تماسی؛
- حجم نمونه‌گذاری باند بین µl ۵۰-۵/۰ به‌صورت اسپری.

## سیستم‌های توسعه فرآیند کروماتوگرافی

درکروماتوگرافی لایه نازک بر خلاف روش‌های کروماتوگرافی، علاوه بر فاز ساکن و متحرک، فاز گازی هم می‌تواند به میزان قابل توجهی جداسازی را تحت تأثیر قرار دهد، که این فاز گازی همان بخار حلال درون تانک است [۱].

### انواع تانک‌های کروماتوگرافی:

#### تانک شیشه‌ای دوقلو

تانک شیشه‌ای دوقلو (تصویر ۱۰) با توجه به دلایل زیر اثری ویژه بر بهبود جداسازی در HPTLC دارد [۱]:

- مصرف کم حلال: صفحات (۲۰×۲۰) ۲۰ میلی‌لیتر، صفحه‌ها (۱۰×۲۰) ۱۰ میلی‌لیتر و صفحات (۱۰×۱۰) ۵ میلی‌لیتر؛
- تکرارپذیری از طریق پیش تعادل با فاز بخار؛
- توسعه سریع فرآیند کروماتوگرافی هم‌زمان با عبور حلال از روی فاز ساکن.

#### تانک توسعه کروماتوگرافی افقی

انجام فرآیند کروماتوگرافی در تانک افقی (تصویر ۱۱) مقرون به صرفه، انعطاف‌پذیر و مناسب برای نمونه‌گذاری از هر دو طرف صفحات لایه نازک است.

در تانک‌های افقی با امکان نمونه‌گذاری روی دو سمت صفحات کروماتوگرافی، ظرفیت نمونه‌گذاری نسبت به جداسازی در تانک‌های عمودی دو برابر می‌شود [۱].

### دستگاه توسعه کروماتوگرافی خودکار[۱۷]

دستگاه توسعه کروماتوگرافی خودکار، دستگاهی بی‌نظیر در تکرارپذیری فرآیند توسعه کروماتوگرافی لایه نازک است. این

دستگاه علاوه‌بر بی‌اثر کردن خطای اپراتور، با تنظیم محیط اشباع و فعال‌سازی صفحات، فرآیند را قبل از شروع کروماتوگرافی درکنترل خود دارد و با کنترل خروجی حلال، از آلودگی محیط آزمایشگاه جلوگیری می‌کند [۱].

دستگاه خودکار توسعه فرآیند کروماتوگرافی با ایمنی و تکرارپذیری بالا برای توسعه ایزوکراتیک صفحات TLC/HPTLC در ابعاد ۱۰×۱۰ و ۲۰×۱۰ مناسب است.

ADC2 (تصویر ۱۲) قلب دستگاه HPTLC است و قابلیت انجام مرحله توسعه به‌طور کاملاً خودکار (مستقل از اثرات محیطی)، فعال کردن لایه (خشک کردن)، پیش آماده‌سازی لایه (اشباع) و در نهایت، خشک کردن نهایی، کنترل عوامل محیطی رطوبت و دما (امکان تجدیدپذیری و تنظیم فعالیت لایه)، ثبت اطلاعات و گزارش‌گیری لحظه به لحظه فرآیند را دارا است [۱].

از ویژگی‌های کلیدی این دستگاه می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- توسعه فرآیند کاملا خودکار؛
- کنترل و ثبت اطلاعات نرم‌افزاری؛
- کنترل عوامل محیطی رطوبت و دما؛
- قابلیت نظارت و ردیابی لحظه به لحظه عملیات کاربر؛
- دارای سیستم کنترل رطوبت، امکان تجدیدپذیر بودن و تنظیم فعالیت لایه را می‌دهد.

## دستگاه توسعه کروماتوگرافی خودکار چند حلاله

دستگاه[۱۸] AMD2 (تصویر ۱۳) مخصوص نمونه‌های حاوی اجزای قطبی و غیرقطبی است.

کروماتوگرافی براساس یک شیب حلال از قطبی به غیرقطبی در چندین مرحله با خشک شدن نسبی بین هر مرحله انجام می‌شود. در این دستگاه از حالت گرادیانی با قابلیت تکرارپذیری و سیلیکاژل به‌عنوان فاز ساکن استفاده می‌شود.

در دستگاه کروماتوگرافی مایع، در حالت گرادیانی، از ستون فاز معکوس استفاده می‌شود؛ زیرا ستون سیلیکاژل برای استفاده بعدی تخریب‌پذیر بوده و قابل برگشت نیست در حالی که در HPTLC چون صفحات یکبار مصرفند، این مشکل بی‌اهمیت است [۱].

از ویژگی‌های کلیدی این دستگاه باید به توسعه فرآیند کروماتوگرافی گرادیانی و بهبود توان جداسازی تا ۳ برابر اشاره نمود [۱].

## فرآیندهای بعد از کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا

### سیستم مشتق‌سازی

با توجه به مواردی که در زیر به آن اشاره می‌شود، مشتق‌سازی را باید به‌عنوان یکی از مراحل TLC در نظر گرفت [۱]:

- تغییر مواد غیرجاذب نسبت به (تابش فرابنفش و بازتابش فلورسنت) به مشتقات قابل تشخیص؛
- بهبود شناسایی (کاهش حد تشخیص)؛
- تشخیص تمام اجزاء نمونه؛
- انتخابی کردن شناسایی ترکیب خاص؛
- اتصال ترکیبات فلورسنت به آنالیت.

شکل ۱۲: دستگاه توسعه کروماتوگرافی خودکار [۱].

شکل ۱۳: دستگاه توسعه کروماتوگرافی خودکار چند حلاله [۱].

شکل ۱۴: اسپری پاشش معرف مشتق‌سازی [۱].

### روش‌های انتقال معرف روی سطح صفحات TLC

- تماس سطح صفحات با معرف در حالت گازی؛
- اسپری کردن (تصویر ۱۴) معرف روی سطح صفحات؛
- غوطه‌وری صفحات در محلول معرف [۱].

شکل ۱۵: دستگاه غوطه‌وری در معرف مشتق‌سازی [۱].

شکل ۱۶: اسکنر صفحات کروماتوگرافی لایه نازک [۱]

شکل ۱۷: دستگاه TLC-MS [۱].

### دستگاه غوطه‌وری

برای انجام مناسب روش غوطه‌وری، دستگاه غوطه‌وری (تصویر ۱۵) با کنترل سرعت غوطه‌وری صفحات کروماتوگرافی لایه نازک باعث می‌شود مشتق‌سازی به‌گونه‌ای یکنواخت در تمام سطح صفحه انجام شود [۱].

ویژگی‌های کلیدی:

- زمان غوطه‌وری بین ۸-۱ ثانیه و نامحدود، مناسب برای صفحات با ارتفاع ۲۰ cm و ۱۰ cm؛
- سرعت یکنواخت عمودی بین ۳۰ mm/s و ۵۰ mm/s.

## دستگاه‌های ارزیابی و سنجش

اسکنر صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (تصویر ۱۶)، پیشرفته‌ترین ابزار برای سنجش کمی اجزاء جدا شده نمونه روی صفحات TLC و HPTLC از طریق سنجش تراکم جذب و نشر اجزاء جدا شده روی صفحات است. همچنین این ابزار امکان شناسایی ترکیبات را از روی طیف جذبی آن‌ها فراهم می‌کند [۱].

این دستگاه دارای نرم‌افزاری است که به کمک آن امکان گزارش‌گیری ارزیابی کمی و ترسیم منحنی کالیبراسیون غلظت و محاسبات آماری و نمایش گرافیکی داده‌های اجزای تشخیص داده شده را فراهم می‌سازد [۱].

ویژگی‌ها:

- اندازه‌گیری تابش و بازتابش فرابنفش و فلورسنت؛
- اسکن صفحات تا ابعاد ۲۰×۲۰؛
- گستره طیفی ۹۰۰-۱۹۰ نانومتر؛
- مجهز به لامپ‌های دوتریوم، هالوژن - تنگستن، لامپ بخار جیوه؛
- سرعت اسکن ۱۰۰-۱ mm/s؛
- تشخیص و اندازه‌گیری تا ۱۰۰ ماده روی هر باند نمونه‌گذاری و ۳۶ باند روی هر صفحه؛
- اندازه‌گیری و تصحیح خط پایه به‌صورت خودکار؛
- گزارش و نمایش داده‌های طیفی تمام پیک‌ها به‌صورت داده گرافیکی توسط نرم‌افزار [۱].

### دستگاه پیشرفته TLC-MS [۱۹]

اتصال دو روش دستگاهی TLC و Mass باعث می‌شود تا امکانات جدیدی با توجه به توانایی هر دو دستگاه در دسترس کاربران باشد. محدودیت این دستگاه آنالیز، حد تشخیص پایین و ناخالصی در محدوده فرابنفش و پیچیدگی ماتریکس و عدم سازگاری MS با حلال است. دستگاه HPTLC به سادگی توانایی جداسازی نمونه‌ها را از هم دارد.

در دستگاه‌های قدیمی‌تر، نمونه بعد از جداسازی توسط TLC از روی صفحه خراشیده، در حلال حل شده و به دستگاه MS تزریق می‌شد، اما در دستگاه‌های جدید با استفاده از بخش حد واسط TLC-MS (تصویر ۱۷)، امکان نمونه‌برداری مستقیم از سطح صفحات TLC در کمتر از یک دقیقه و انتقال آن به طیف‌سنج جرمی فراهم شده‌است [۱].

ویژگی‌های TLC-MS:

- سریع و بدون تداخل با نمونه‌های مجاور روی صفحه TLC؛

- انتقال ترکیبات جداسازی شده به طیف‌سنج جرمی؛
- شناسایی موادی را که حد تشخیص پایین در دیگر دستگاه‌های آنالیز دارند؛
- مصرف بسیار کم حلال [۱].

## سازوکار دستگاه TLC-MS

حلال قطبی متانول به‌عنوان شوینده با استفاده از پمپ HPLC وارد دستگاه می‌شود و با هدایت لوله‌های موئین به قسمت پانچ شده صفحه TLC وارد و بعد انحلال ترکیب مورد نظر طی فرایند کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی شده، به قسمت خروجی سیستم هدایت و وارد بخش طیف‌سنج جرمی می‌شود. تصویر (۱۸) نمایی از مراحل عملکرد دستگاه حد واسط TLC-MS را نشان می‌دهد [۱].

## مستندسازی و ارزیابی با دستگاه TLC Visualizer

دستگاه TLC Visualizer (تصویر ۱۹)، از صفحات TLC/ HPTLC تحت تابش نور سفید مستقیم و فرابنفش ۲۵۴ نانومتر و فلورسنت ۳۶۶ نانومتر تصویربرداری می‌کند [۱].

ویژگی‌های دستگاه TLC Visualizer:

- بهینه‌سازی منابع نوری، بهبود و نوردهی همگن؛
- بهینه‌سازی خودکار تصاویر در تمام حالت‌های نوری و اطمینان از تکرارپذیری که مبنای مقایسه تصاویر قرار می‌گیرد؛
- ثبت تصاویر از صفحات تحت تابش طول موج متفاوت و ذخیره آن در یک فایل؛
- امکان تنظیمات روشنایی و تصحیح رنگ به‌صورت دستی با استفاده از نرم‌افزار؛
- امکان مقایسه تصاویر با تصویر دیگر برای ارزیابی کمی نمونه‌ای گیاهی با نرم‌افزار Video Scan؛
- مقایسه تصویری باندهای منتخب از صفحات مختلف با هم.

این دستگاه به‌عنوان یک اسکنر به همراه برنامه نرم‌افزاری، امکان مقایسه تصاویر و گروه‌بندی همه ردیف‌های نمونه از صفحات مختلف را در کنار هم فراهم می‌کند و با مقایسه آن با ردیف استاندارد از روی صفحات مختلف برای اندازه‌گیری کمی در نمونه‌های گیاهی استفاده می‌شود. در تصویر (۲۰)، نمونه‌های جداسازی شده با استفاده از نور سفید، ماورا بنفش و فلورسنت با استفاده از TLC Visualizer نشان داده شده‌است [۱].

## دستگاه تشخیص لومینسانس زیستی[۲۰]

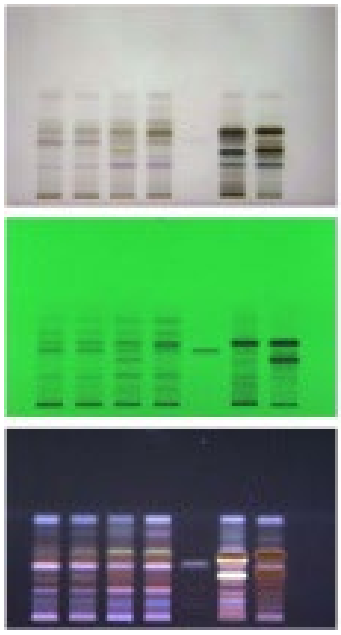
دستگاه تشخیص لومینسانس زیستی (تصویر ۲۱)، دستگاهی نوین به‌منظور تحقیق در زمینه‌های تعیین سریع پروفایل سمیت و آنالیز سریع فاضلاب صنایع غذایی است.

روش کار این دستگاه به این صورت است که مخلوط پیچیده زیستی، ابتدا به اجزاء سازنده با استفاده از دستگاه HPTLC جداسازی می‌شود و سپس در مایع سوسپانسیون لومینسانس باکتریایی غوطه‌ور شده و واکنش در مدت زمان کوتاهی انجام می‌شود. مناطق با اثر مهارکنندگی یا سمیت به‌صورت لکه‌های سیاه نمایان می‌شود که نشان‌دهنده مرگ باکتری و در نتیجه از بین رفتن ویژگی لومینسانس زیستی است (تصویر ۲۲) [۱].

در جدول (۳) به کاربردهای دستگاه HPTLC اشاره شده‌است [۱].

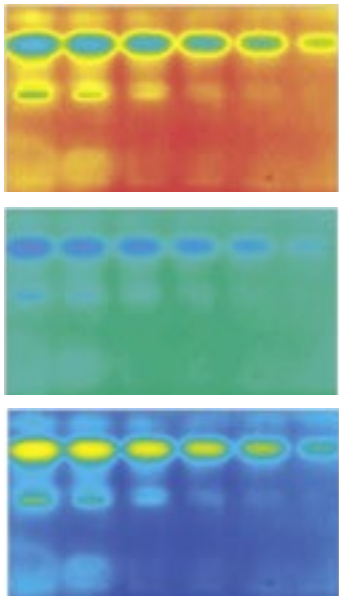
شکل ۱۸: نمایی از چگونگی عملکرد TLC-MS [۱].

شکل ۱۹: دستگاه TLC Visualizer [۱].



شکل ۲۰: تصاویر نمونه‌های جداسازی شده با استفاده از نور سفید، ماورا بن فش و فلورسنت با استفاده از TLC Visualizer [۱].

شکل ۲۱: دستگاه تشخیص لومینسانس زیستی [۱].



شکل ۲۲: بررسی فرآیند تخریب مواد فعال زیستی در نمونه‌های تصفیه فاضلاب با استفاده از دستگاه تشخیص لومینسانس زیستی [۱].

| | | |
|---|---|---|
| گیاهی (فیتوشیمی) | | ◤ شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات گیاهی<br>◤ بررسی پایداری فرآورده‌ای گیاهی<br>◤ کنترل تقلب در فرآورده‌های گیاهی |
| دارویی | | ◤ کنترل کیفی و کمی فرآیند در صنایع دارویی<br>◤ کنترل کیفی و کمی محتویات محصولات دارویی<br>◤ بررسی پایداری محصولات دارویی |
| مواد غذایی | | ◤ کنترل درستی محتویات مواد غذایی<br>◤ کنترل مواد افزودنی در مواد غذایی<br>◤ کنترل سموم در مواد غذایی |
| آرایشی و بهداشتی | | ◤ کنترل مواد اولیه در صنایع آرایشی و بهداشتی<br>◤ کنترل مواد افزودنی در محصولات آرایشی و بهداشتی<br>◤ کنترل تقلب در محصولات آرایشی و بهداشتی |
| بالینی (کلینیکال) | | ◤ مطالعات متابولیسم داروها<br>◤ کنترل و شناسایی مواد مخدر<br>◤ کنترل و شناسایی مواد نیروزا |
| پزشکی قانونی | | ◤ تشخیص اسناد جعلی<br>◤ بررسی مسمومیت‌ها<br>◤ تجزیه و تحلیل مواد غیرمجاز |
| صنایع شیمیایی | | ◤ نظارت بر روند فرآیندهای شیمیایی<br>◤ بهینه‌سازی فرآیندهای شیمیایی<br>◤ کنترل و سنجش تمیز کردن تجهیزات فرآیندهای شیمیایی |

## نتیجه‌گیری

روش کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، با موفقیت به کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، طیف‌سنجی جرمی، طیف‌بینی مادون قرمز انتقال فوریه، فرابنفش و رامان پیوند داده شده‌است تا امکان کسب داده‌های دقیق‌تر، از ترکیبات جدا شده را فراهم سازد. کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا در مقایسه با سایر روش‌های کروماتوگرافی به ویژه در آنالیز اولیه مواد و تعیین پروفایل محتویاتشان قابل دسترس‌تر و ارزان‌تر است.

بی‌شک کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا به‌عنوان یک روش جداسازی مدرن با گستره‌ی کاربرد وسیع، هنوز هم پتانسیل زیادی برای پیشرفت‌های آینده در زمینه پژوهش دارا بوده و این فقط سر آغاز راه است.

## پی‌نوشت

۱. کارشناس شیمی کاربردی، آزمایشگاه‌های جامع تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲. کارشناس ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه الزهرا (س)

۳. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی

4.Thin Layer Chromatography

5. Mass Spectrometry

6. Eluent

7. Capillary Action

8. Chromatogram

9. Gas Chromatography

10. Liquid Chromatography

11. Paper Chromatography

12. Column Chromatography

13. High Performance Thin Layer Chromatography

14. High Performance Liquid Chromatography

15. Gas Chromatography

16. Photo Diode Array (PDA)

17. Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2)

18. Automated Multiple Development 2

19. Thin Layer Chromatography –Mass Spectrometry

20. Bioluminescence

## مراجع

[1] www.camag.com

[2] antoine.frostburg.edu

[3] www.hptlc.com

[4] www.bio-rad.com

[5] HPTLC for the Analysis of Medicinal Plants (Eike Reich, Anne Schibli - Thieme Medical Publishers, Inc 2007)

[6] Thin-layer Chromatography A Modern Practical Approach

[7] High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) (Man Mohan Srivastava - Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011)