فلوسایتومتری

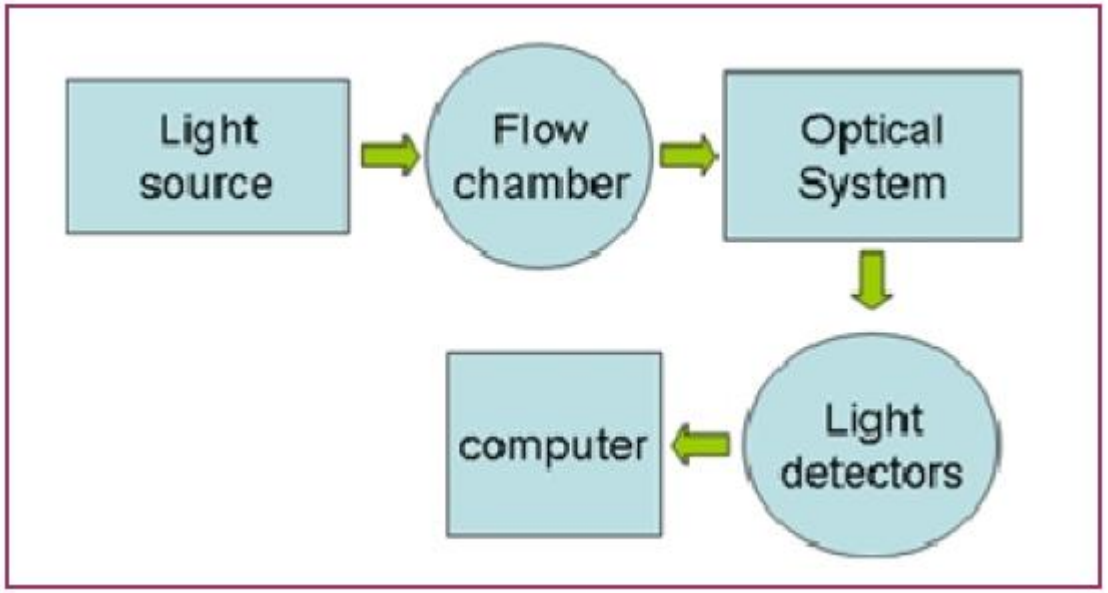
فلوسايتومتري روش دستگاهي بسيار سريع و قدرتمندي است كه براي شناسايي ذرات (سلول‌ها) و ارزيابي خصوصيّات آنها به كار مي‌رود. ذرات مورد آزمايش به صورت معلق در مايع با سرعتي حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانيه از ميان منفذي باريك و از مقابل پرتوي باريك از نور ليزر عبور مي‌كنند بدين ترتيب امكان جمع‌آوري اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانيه فراهم مي‌شود. غالباً حجم مورد نياز از نمونه مورد آزمايش نيز خيلي كم و حدود ۱۰۰ ميكروليتر مي‌باشد.

در مورد دقت آن نيز بايد گفت كه قادر است تعداد ۱ سلول سرطاني در ميان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادي موجود در نمونة مغز استخوان را شناسايي كند. فلوسايتومتري در بخش‌هاي تحقيقاتي و در آزمايشگاه‌هاي تشخيصي كاربرد وسيعي دارد و براي تشخيص بيماري‌ها ، تعيين پيش آگهي و هم براي ارزيابي درمان بدخيمي‌ها كاربرد دارد.

اصول

تکنولوژی فلوسایتومتری بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سلول‌ها یا دیگر ذرات می‌باشد، هنگامی که این سلول‌ها یا ذرات از مقابل یک سیستم آشکارسازی نوری Photo Detector عبور می‌کنند، ارزیابی می‌گردند. از آن جایی که هر سلول وقتی از جلو سیستم گذر می‌نماید، به تنهایی اندازه‌گیری و آنالیز می‌شود و همچنین به سبب این که اندازه‌گیری‌های متعدد و مختلف در زمان واحد انجام می‌شود، بنابراین پارامترهای مختلف چند هزار سلول در طول مدت زمانی بسیار کوتاهی محاسبه می‌گردد. به‌طور کلی اینکه، دستگاه فلوسایتومتری به نحوی طراحی شده است که قادر است تعداد زیادی سلول و ذرات بیولوژیکی مانند هسته‌های جدا شدهٔ سلولی، کروموزوم‌ها و میکروارگانیسم‌ها را در محیط مایع با استفاده از اشعهٔ لیزر، آنالیز نموده و خواص فیزیکی آنها مانند اندازه نسبی و میزان گرانولیتی سیتوپلاسم را مشخص نماید. باید دانست که فلوسایتومتری قادر است تعداد ۱ سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادی موجود در نمونهٔ مغز استخوان را شناسایی کند.

در اثر تابش اشعهٔ لیزر به سلول‌ها و برحسب اندازه و ساختمان داخلی آنها، سیگنال‌های نوری حاصل می‌شود که بوسیلهٔ تقویت‌کننده‌های نوری PMT = Photo Multiplier Tube دستگاه به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌گردد و پس از آنالیز بوسیلهٔ کامپیوتر به شکل نمودار نمایش داده می‌شود. چنانچه سلول‌ها به وسیلهٔ رنگ‌های اختصاصی DNA و RNA، پروتئین، شاخص‌های سطح سلول‌ها و اجزای درون سلولی رنگ‌آمیزی شده باشند، در اثر تابش اشعهٔ لیزر، فلوروکروم متصل به آنها تحریک شده و در برگشت به حالت پایدار اولیه، سیگنال‌های فلوئورسنت خاص با طول موج جذبی مخصوص خود ایجاد می‌نماید. این سیگنال فوتون نوری، دارای طول موج بالایی بوده و انرژی تابشی دارد که مختص رنگ آن است. سیگنال‌های فوق نیز به سیگنال‌های الکتریکی تبدیل گردیده و در نتیجه کلیهٔ مشخصات سلولی، اعم از گرانولیتی، ساختمان درون سیتوپلاسم و شاخص‌های مورد نظر سطحی سلول به طور همزمان بصورت نمودار گزارش می‌شوند.

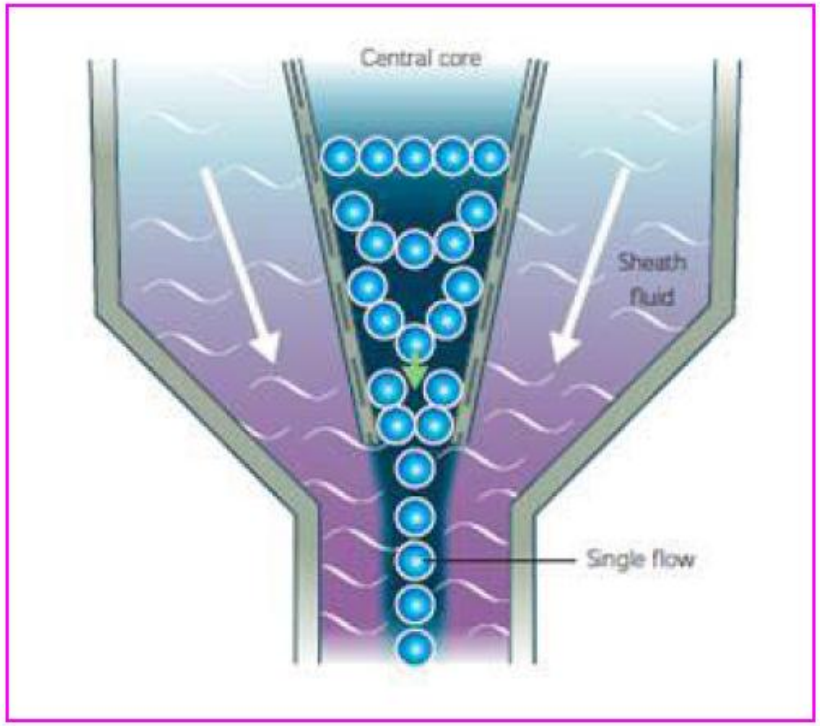


آماده سازی نمونه

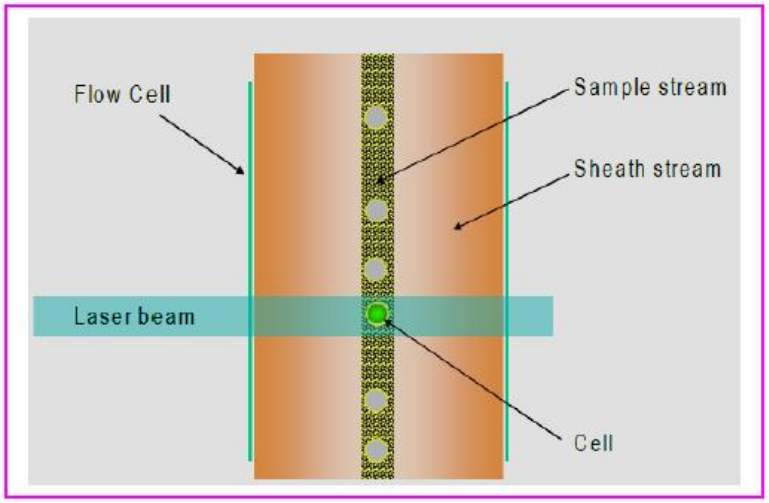
برای انجام هر نوع فلوسایتومتری ابتدا باید سلول‌ها را آماده کرد، به طوری که سلول‌ها به صورت تکی درآمده و در محیط مناسبی معلق شده باشند. بعضا یک مرحله تخلیص برای بالا بردن غلظت سلول‌های مورد نظر در نمونه ضرورت پیدا می‌کند. روش‌های مختلفی برای تهیه، تخلیص وآماده سازی سلول وجود دارند و روش انتخاب شده به نوع سلول مورد ارزیابی بستگی دارد. پس از تهیه سوسپانسیون مناسب، سلول‌ها باید با مواد فلورسانس رنگ شوند و یا با آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلوروکروم نشاندار شوند. روش نشاندارکردن تحت تاثیر فاکتورهای زیادی مانند میزان اختصاصی بودن آنتی‌بادی و غلظت آنتی‌ژن در سطح یا داخل سلول، مناسب بودن غلظت آنتی بادی مورد استفاده و بکار بردن کنترل‌های مثبت و منفی مناسب در آنالیز سلول‌ها قرار می‌گیرد.

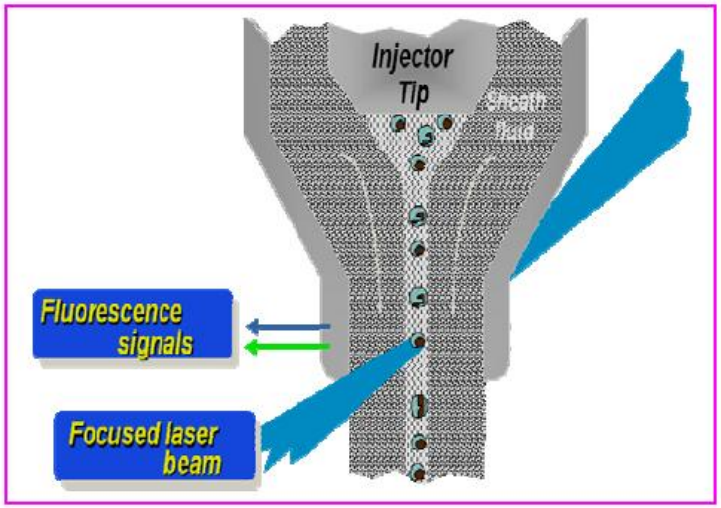
تمرکز هیدرودینامیک Hydrodinamic Focousing

خصوصیت اصلی یک سیستم فلوسایتومتری این است که اندازه گیری ها بر روی نمونه های سلولی که در دستگاه جریان می یابند، انجام می شود. اگر از یک لوله جهت انتقال نمونه استفاده شود، سلول ها نمی توانند به طور مکرر به نقطه اندازه گیری (محل برخورد لیزر به سلول) بروند. اگر از لوله های باریک جهت اطمینان از انتقال تکرار پذیر سلول ها استفاده شود، احتمال دارد با عبور سلول های بزرگتر مسیر بسته شود. برای حل این مشکل از روش " تمرکز هیدرودینامیک Hydrodinamic Focousing " کمک گرفته می شود. در این روش جریان آرامی از سلول ها را به درون جریان حامل سریع (Sheath fluid) وارد می کنند. مایع حامل، سلول ها را در مرکز لوله متمرکز می کند، بنابراین سلول ها به طور منظم و در یک مسیر مجازی به نقطه اندازه گیری منتقل می شوند.



هدف از آماده‌سازی نمونه، تهیهٔ یک سوسپانسیون از پارتیکل‌های منفرد است که به روش خاصی رنگ‌آمیزی شده‌اند تا در سیستم، بدون ایجاد اختلال در جریان یکنواخت مایع (سیال) و یا انسداد لوله و منافذ دستگاه عبور کنند. در سیستم فلوسایتومتری، سلول‌های معلق در مایع ایزوتونیک از طریق سیستم حسی با فشار هوا از ظرف حاوی نمونه به لولهٔ مخصوصی منتقل شده و به یک محفظهٔ خاصی به نام «حفرهٔ جریان» Flow chamber وارد می‌شوند. مایع پوششی Sheath fluid در حفرهٔ نمونه، یک اثر تمرکز هیدرو دینامیکی ایجاد کرده و نمونه را به داخل جریان می‌کشاند که زیادتر بودن سرعت جریان مایع پوششی نسبت به مایع حاوی نمونه، سبب هدایت سلول‌ها به صورت منفرد (تک‌تک) جهت عبور از سوراخ انتهایی می‌شود تا در نقطهٔ خاصی در مقابل اشعهٔ لیزر قرار بگیرد. سلول از لوله شیشه ای با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه از میان منفذی باریک و از مقابل پرتوی یک یا چند منبع نوری که غالبا لیزر است، عبور می‌کنند. بدین ترتیب امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه فراهم می‌شود.





فلورسانس

فلوسایتومتری بر خصوصیات پراکنده سازی نور توسط سلول‌ها و نیز بر نشر فلورسانس از آنها استوار است. نشر فلورسانس می‌تواند با استفاده مستقیم از مواد رنگ‌کننده فلورسنت حاصل می‌شود (در این روش که مستقل از آنتی بادی است، غالبا از فلوکروم های متصل شونده به DNA ، RNA و یا دیگر اجزای سلولی استفاده می شود) یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که تحت نام عمومی کونژوگه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این حالت انتخاب محل اتصال به سلول، توسط جزء آنتی‌بادی موجود در کونژوگه صورت می‌گیرد و این آنتی‌بادی است که به صورت کاملا اختصاصی، آنتی‌ژن هدف را بر روی سلول یا در داخل آن شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود و جزء فلورسنت موجود در کونژوگه ابزاری برای ردیابی محل و میزان آنتی‌بادی‌های متصل شده به هدف می‌باشد.

سیستم نوری

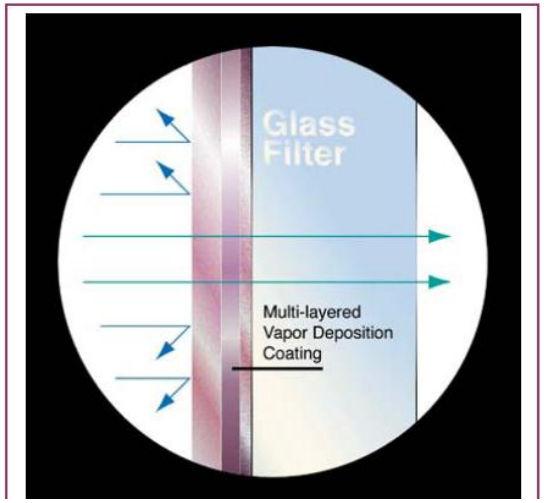
سیستم نوری فلوسایتومتر متشکل از یک یا چند منبع نوری به همراه یک سری از عدسی ها، فیلترها و آشکار سازها است. عدسی ها و فیلترها جهت انتقال نور منبع به نقطه اندازه گیری و نیز برای انتقال نور پراکنده و فلورسانس از نقطه اندازه گیری به آشکارسازها به کار می روند.

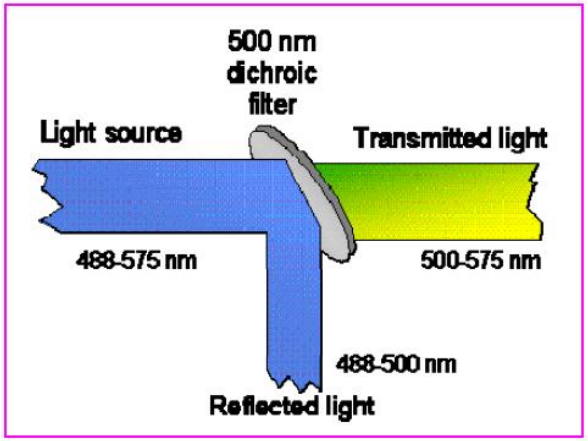
الف) منبع نور:

انواع مختلفی از منابع نوری برای فلوسایتومتر وجود دارند. در فلوسایتومترهای مدرن، نور لیزر به عنوان منبع نوری بکار می‌رود، لیزر نسبت به جیوه یا لامپ‌های دیگر مزایایی دارد که از آن جمله می‌توان به تولید نور منوکروم (تک‌رنگ) و با اندازهٔ نقطه‌ای بسیار کوچک آن اشاره کرد، این اندازهٔ نقطه‌ای بسیار مهم است، زیرا هرچه نور در فضای کوچک‌تری محدود شود، میزان تهییج سلول به حد ماکزیمم نزدیکتر می‌شود، علاوه بر این باعث اطمینان از قرار گرفتن تنها یک سلول در برابر نور در هر لحظه می‌گردد. بیشترین لیزر مصرفی نیز، لیزر آرگون با طول موج ۴۸۸ نانومتر می‌باشد که با هوا سرد می‌شود، ارزانتر هم بوده و قابل دسترس‌تر است. لیزرهای دیودی نیز به دلیل پایداری و قیمت ارزان مورد استفاده قرار می گیرند و معمولا طول موج ۶۳۵ نانومتر آن مورد استفاده است.

ب) فیلترها:

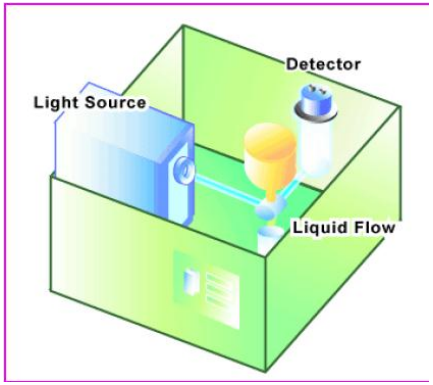
سیستم نوری فلوسایتومتر، سیگنال‌های فلوئورسانس ساطع شده از سلول‌ها را به یک سیستم الکترونیکی هدایت می‌کند، این سیستم از یک سری فیلترهای مخصوص جذب نور و آینه‌های Dichoric یا دو رنگ نما تشکیل شده است. فیلترهای نوری، فقط طول موج خاصی را عبور داده و مانع عبور سایر طول موج ها می شوند. فیلترهای دو رنگ نما، آینه های انتخابی هستند که اجازه عبور طول موج های بلند را می دهند و طول موج های کوتاه را منعکس می کنند. فیلتر باند عبوری جهت عبور باند باریکی از طول موج بین ۶۲۰-۶۴۰ نانومتر طراحی شده است. فیلترهای جذب نور در زاویهٔ 90° نسبت به مسیر تابش اشعهٔ لیزر قرار گرفته‌اند و آینه‌های Dichoric نسبت به فیلترها در زاویهٔ 45° قرار دارند. علاوه بر این دتکتورهای خاصی به منظور دریافت سیگنال‌های حاصل از اندازهٔ سلول و گرانولیتی در این سیستم وجود دارند که اصطلاحاً Fs sensor و SS sensor نامیده می‌شوند. به مجرد عبور یک سلول از مقابل اشعهٔ لیزر، چندین پارامتر فیزیکی و فلوئورسانس آن، بطور همزمان اندازه‌گیری می شود.





ج) آشکارسازها:

با عبور ذرات یا سلول ها از مقابل پرتو لیزری، مولکول های فلورسانس سطح سلول، فوتون هایی با طول موج خاص در همه جهات تابش می کنند. سیستم اپتیکی بخشی از این فوتون ها را به آشکارساز ها (Detector) می رسانند. فوتو دیود ها (PD) و فوتومولتی تیوب ها (PMT) به خاطر حساسیت بالای آن ها به عنوان آشکار ساز استفاده می شوند. ابتدا فوتون های رسیده از نمونه توسط آشکارسازها به فوتوالکترون تبدیل شده و سپس جریان الکتریکی آن به ولتاژ تبدیل می شود. به دلیل اینکه سیستم الکترونیکی، ولتاژ را اندازه گیری و مقایسه می کنند، باید خروجی آشکار ساز به ولتاژ تبدیل گردد. تبدیل جریان به ولتاژ با عبور جریان یا شار الکتریکی از یک مقاومت انجام می گیرد. آن چه اتفاق می افتد بر اساس قانون اهم قابل پیش بینی است. ولتاژ تولید شده برابر حاصل ضرب جریان در مقاومت است و چون مقدار مقاومت ثابت است ولتاژ خروجی مستقیما با متناسب با جریان ورودی است. مدار الکترونیکی که این تبدیل را انجام می دهد،" تقویت کننده Trans-impedence " نام دارد که می تواند در مدار بخش PMT جا سازی شود. این مدار جریان فوتو الکترون ها را به ولتاژ تبدیل کرده و تقویت خطی ولتاژ را فراهم می کند.

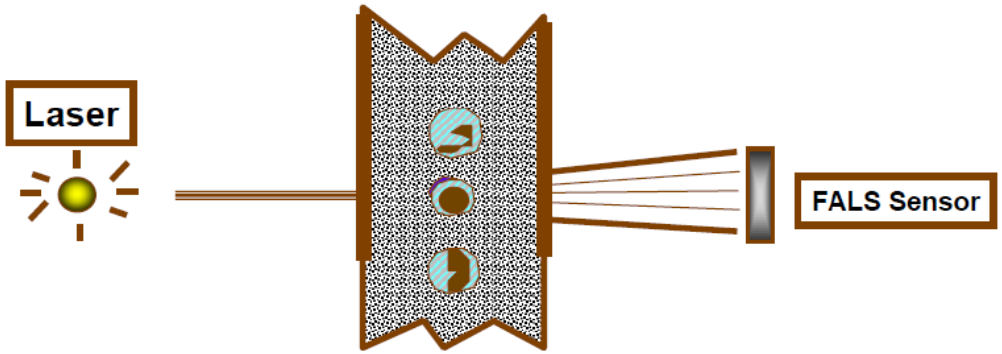


پراکنش

اگر چه سلول‌ها به خودی خود دارای فلورسانس اندکی در برخی طول موج‌ها هستند اما بدون بکارگیری نور تهییج کننده (لیزر) هیچ سیگنالی تولید و به ردیاب‌های دستگاه ارسال نخواهد کرد. پس از برخورد نور لیزر به سلول ها، بازتاب نور لیزر در جهات مختلف پراکنده شده و توسط ردیاب هایی که در زوایای مختلف قرار دارند، برای کسب اطلاعات جمع آوری می شود.

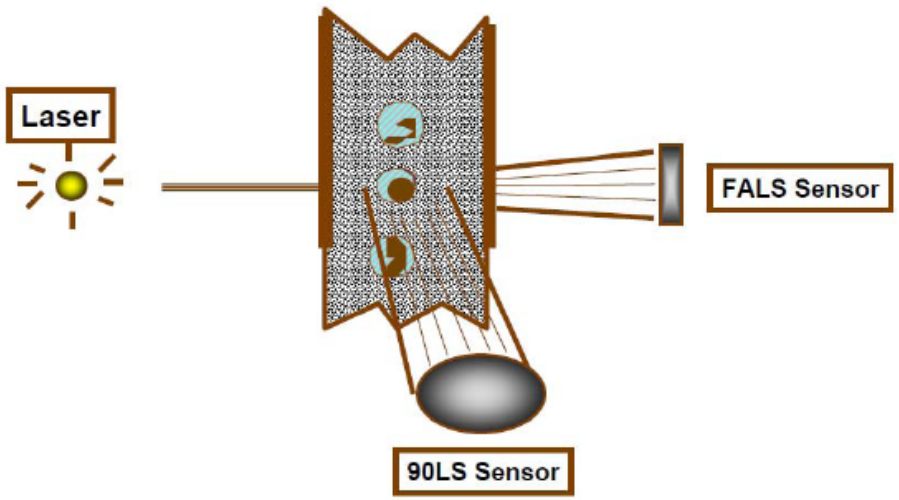
پراکنش نوری در زاویهٔ جلوئی (Forward Angle light Scatter ,FALS)

در صورتی که سلول به صورت یک کرهٔ همگن و یکنواخت باشد، در اثر تابش لیزر، نور تحت زاویهٔ 360° توسط سلول پراکنده و بوسیلهٔ آشکار ساز مستقیم Fs sensor که در زاویهٔ $2\text{-}20^{\circ}$ نسبت به محور تابش لیزر قرار دارد، دریافت و اندازه‌گیری می‌شود، این نور اصطلاحاً FALS نامیده می شود و مقدار آن رابطهٔ مستقیم با اندازهٔ سلول دارد. به عبارت دیگر نوری که در جهت مستقیم پراکنده می شود (Forward) متناسب با سایز سلول یا ذره است.



پراکنش نوری 90° / تفرق جانبی (Ninety-degree /side-light scatter ,SS)

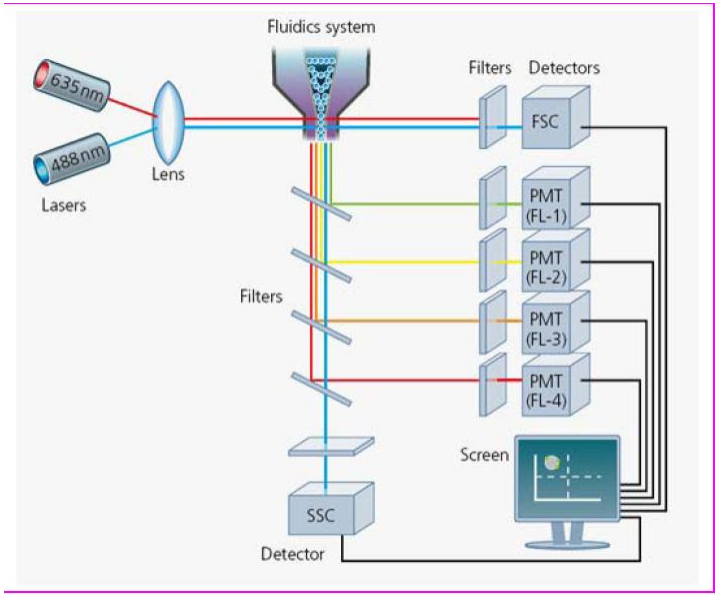
مقدار نوری که تحت زاویهٔ 90° نسبت به محور تابش لیزر از سلول پراکنده می‌شود. اصطلاحاً نور SS نامیده می‌شود و مقدار آن بستگی به خصوصیات شکست نور توسط سلول، اجزای درونی، میزان گرانولیتی سیتوپلاسم، ساختمان هسته و سطح سلول (ناهمواری غشاء) دارد. برای مثال یک گلبول قرمز رسیده با سیتوپلاسم همگن، بدون هسته و اندامک‌های سیتوپلاسمی، نسبت به یک یاخته ائوزینوفیل که حاوی گرانول‌های سیتوپلاسمی زیاد و هستهٔ مرکب از چند قطعه است، تفرق نوری 90° بسیار کمتری دارد. سیگنال پراکنش نوری 90° ، توسط آشکار ساز قائمه دریافت می شود و به سیگنال دیجیتالی تبدیل می گردد.



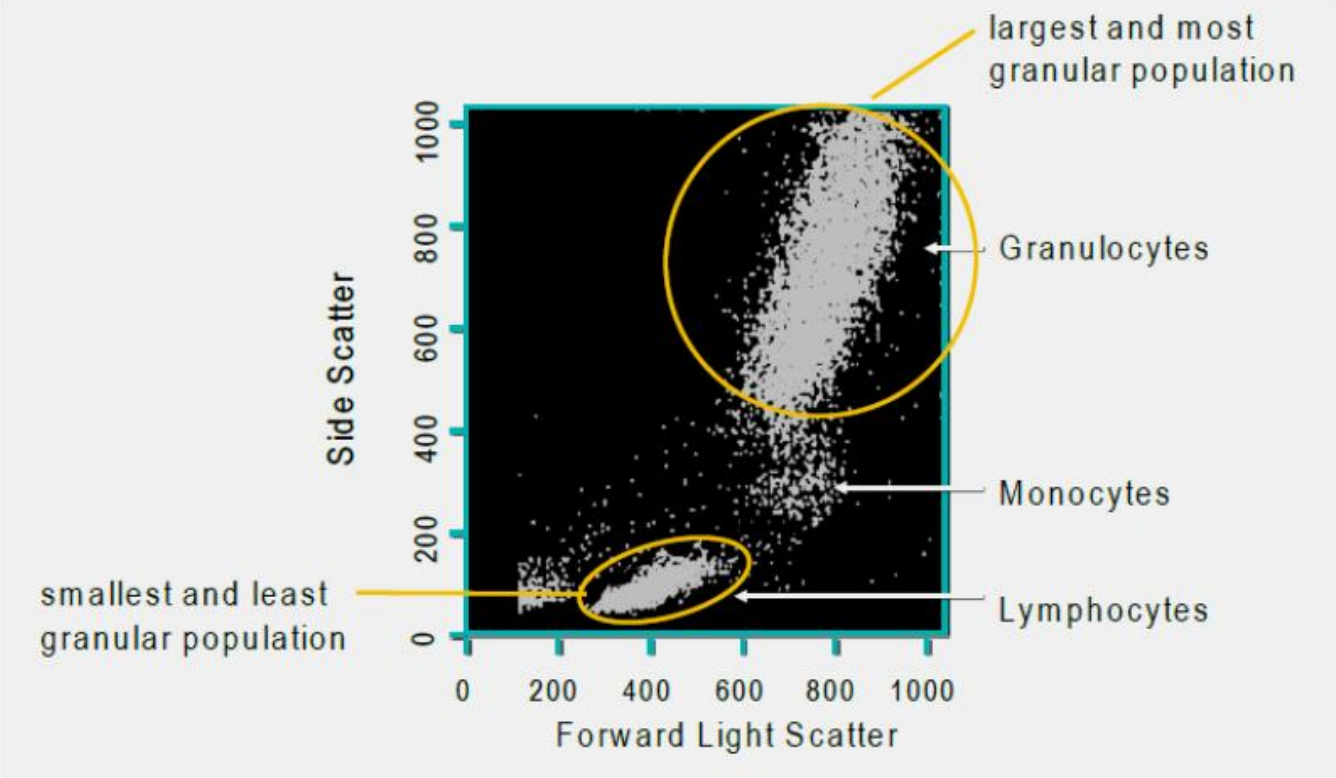
انتشار فلوئورسانس

علاوه بر این اگر مولکول های فلورسنت و یا فلوروکروم ها به سلول ها متصل شده باشند، توسط نور تابیده تهییج شده و بازتابی حاصل می شود که سایر ردیاب ها و فیلترهای نوری آن را جذب می کنند. مولکول های فلورسنت می توانند متصل شده به آنتی بادی ها، رنگ های حساس به Ca^{++} و متصل شده به اجزای سلولی، مولکول های

آشکار ساز فلورسانس، امواج فلورسانس منتشره از برخورد نور لیزر به فلوروکروم های متصل به سلول را دریافت می کند. این آشکار ساز در زاویه 90° نسبت به منبع نوری یعنی روبروی آشکار ساز قائمه قرار می گیرد. در صورت مطالعه هم زمان چند فلوروکروم که به اجزاء مختلف سلولی متصل شده اند، می توانیم از چندین آشکار ساز فلورسانس استفاده کنیم.

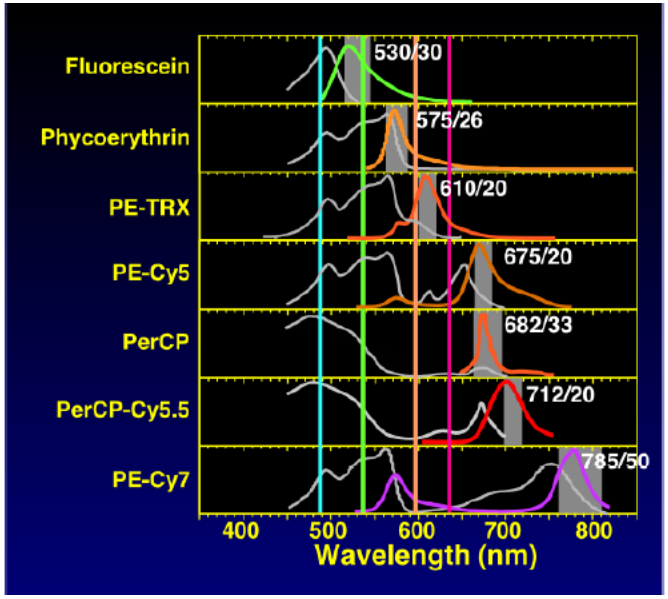


بر اساس پارامترهای تفرق نوری (FALS و SS) می‌توان gate های الکترونیکی (محدوده‌ها) بدور دسته جات سلولی مورد نظر برای تجزیه با فلورسنت کشید. آنگاه فلوئورسانس سلول‌ها در نمونه می‌تواند بطور انتخابی تعیین شود و بصورت توزیع کثرت ترسیم گردد. کلیه اطلاعات توسط یک کامپیوتر که در یک سیستم گنجانیده شده است، جمع‌آوری، محاسبه و ذخیره می‌گردد.

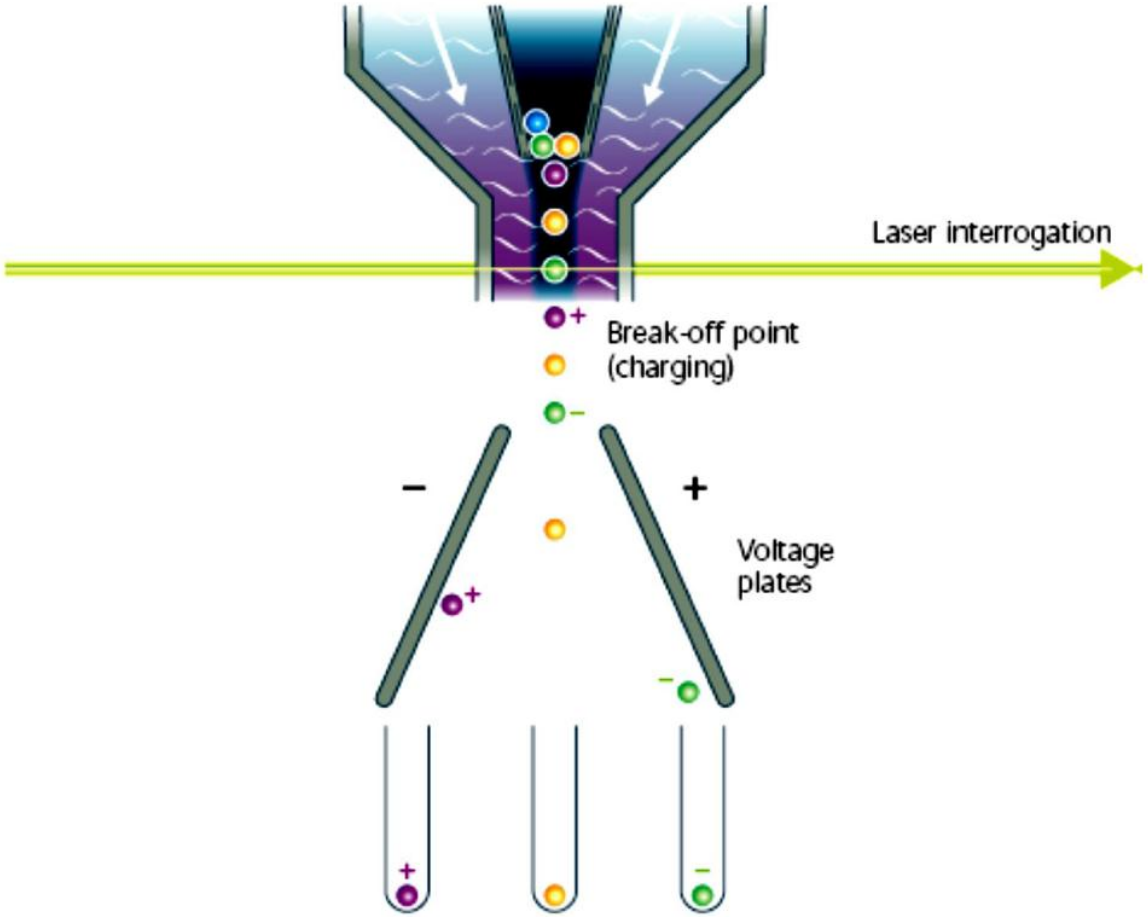


فلوروکروم ها

برای انجام فلوسایتومتری لازم‌است که ابتدا سلول‌ها با فلوروکروم‌ها نشاندار شوند. از طرفی برای نشاندار کردن‌اجزاء داخلی سلول باید اقدامات خاصی را انجام داد تا آنها در دسترس آنتی‌بادی یا ماده فلورسنت قرار گیرند. تعداد فلوروکروم‌های مورد استفاده برای فلوسایتومتری‌در طی سالیان متمادی مرتبا افزایش یافته است و این احتمال وجود دارد که در آینده،تعداد فلوروکروم‌های مورد استفاده برای آنالیز سلول‌ها بیش از این نیز افزایش یابدشّناخت انواع فلوروکروم‌ها و آگاهی از مزیت‌ها و معایب هر کدام تنها راه استفاده‌بهینه از آنها برای دستیابی به مقاصد علمی تحقیقاتی است. امروزه پرمصرف‌ترین رنگ‌های فلوئورسان متصل به آنتی‌بادی‌ها در فلوسایتومتری بالینی، فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و فیکواریترین (PE) می‌باشند. تمامی این رنگ‌های فلوئورسان در محدودهٔ 488nm طیف‌های جذبی دارند. بنابراین، یک، تک طول موج تحریکی لیزری، می‌تواند تمامی این دو رنگ را تحریک کند.



جداسازی سلولی



کروماتوگرافی

(Choromatography)

روش کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یک سری روش هایی است که برای جداکردن موادی که به صورت مخلوط هستند به کار برده می شوند. تمام روش های کروماتوگرافی شامل استفاده از دو فاز هستند : فاز ثابت و فاز متحرک فاز ثابت مایع و یا جامد و فاز متحرک گاز و مایع می باشد.

نیروهای جاذبه مختلف از جمله نیروی اتصال هیدروژنی و اتصال یونی بین فاز ثابت و مواد مختلف نسبت به خواص اجسام مورد نظر متغیر بوده و موجب می شود که این مواد همراه با فاز متحرک با سرعت های متفاوت حرکت نمایند و بنابراین مواد مختلف بخش متحرک با سرعت متفاوتی در بخش ثابت جابه جا شده و در نهایت به حسب درشتی و جرم مولکولیشان در جایگاههای خاصی از بخش ثابت جایگزین می شوند.

روش کروماتوگرافی

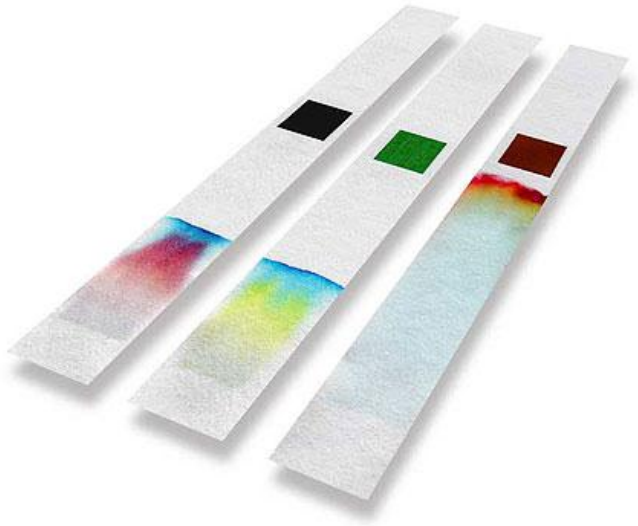
هم اکنون انواع مختلفی از روش های کروماتوگرافی برای جداسازی و شناسایی ترکیبات مختلف سلولی به کار گرفته می شود که مهمترین آن ها عبارتند از :

- کروماتوگرافی کاغذی
- کروماتوگرافی لایه نازک
- کروماتوگرافی تبادل یونی
- صاف کردن بوسیله ژل
- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا HPLC
- گاز کروماتوگرافی

کروماتوگرافی کاغذی (paper chromatoghraphy)

خصوصیت ویژه

یک خصوصیت ویژه روش کروماتوگرافی کاغذی این است که چیزی مربوط به محلول یا گاز خارج شده از ستون که در سیستم‌های معمول مایع یا گاز با آن برخورد می‌کنیم وجود ندارد. ترکیبات جدا شده روی کاغذ مکان‌یابی و شناسایی می‌شوند در نتیجه ، جداسازی به طور نسبتا دائم در روی کاغذ ثبت می‌شود. در این روش اجزای جدا شده جمع آوری نمی‌شوند و احتیاجی به وسایل پیچیده کنترل پیوسته نیست. اندازه گیری کمی ترکیبات جدا شده را می‌توان روی کاغذ انجام داد ولی اگر بخواهند اجرای را از کاغذ خارج کنند. تنها کار لازم این است که قسمت مربوط به هر یک از اجسام را از کاغذ ببرند و هر یک را به طور جداگانه بشویند.



کروماتوگرافی کاغذی (paper chromatoghraphy)

قطره‌ای از محلول حاوی مخلوطی که باید جدا شود را روی یک صفحه یا نوار کاغذ صافی در محل علامت گذاری شده قرار می‌دهند. در این محل ، قطره به صورت یک لکه حلقوی پخش می‌شود. وقتی که لکه خشک شده کاغذ را در یک ظرف مناسب سربسته طوری قرار دهند که یک سر آن در حلال انتخاب شده به عنوان فاز متحرک فرو رود. حلال از طریق الیاف کاغذ در نتیجه عمل موئینگی نفوذ می‌کند و نکته مهم این است که سطح کاغذ نباید کاملا به وسیله حلال پوشانده شود. زیرا در این صورت ، اصلا جدا سازی صورت نمی‌گیرد یا نواحی خیلی پخش می‌شوند.

وقتی که جبهه حلال مسافت مناسبی را طی کرد یا بعد از یک زمان از قبل تعیین شده ، کاغذ را از ظرف بیرون آورده ، و می‌گذارند تا صفحه خشک شود. وقتی که محل‌های مناطق جدا شده آشکار شدند لازم است که هر یک از اجسام به طور جداگانه شناسایی شوند. ساده‌ترین روش شناسایی بر اساس مقدار RF است:

$$RF = \frac{\text{مسافتی که جزء مورد نظر از مبداء طی کرده است}}{\text{مسافتی که حلال از مبداء پیموده است}}$$

موارد استعمال کروماتوگرافی کاغذی

منابع علمی مربوط به روش‌های تجزیه‌ای و بررسی ترکیبات طبیعی نشان می‌دهد که کروماتوگرافی کاغذی در هر رشته‌ای کاربرد دارد. با این همه ، این روش هنوز هم در جداسازی‌های مواد با ماهیت زیستی وسیعترین کاربرد را دارد.

کروماتوگرافی کاغذی اکثرا به عنوان یک وسیله تحقیقاتی به کار می‌رود ، و به طور گسترده‌ای در تجزیه‌های روزمره مخصوصا در جداسازی‌های جدیدی که هیچ روش کلاسیک برای آنها وجود ندارد ، نیز مورد استفاده قرار می گیرد. روش اخیر در مسائل کلینیکی و زیست شیمیایی ، جداسازی اسیدهای آمینه و پپتیدها در بررسی ساختار پروتئین کاربد دارد.

آزمایش روزمره ادرار و سایر مایعات بدن برای اسید آمینه و قند ، جداسازی بازهای پورین و نوکلئوتیدها در آزمایش اسیدهای نوکلئیک ، جداسازی استرئیدها ، تجزیه عمومی ، تجزیه بسپارها ، تشخیص و ارزیابی فلزات در خاک ها و نمونه های زمین شناسی ، بررسی ترکیبات فنلی در عصاره های گیاهی ، جداسازی آلکالوئیدها ، جداسازی ترکیبات علامت دار به وسیله رادیو ایزوتوپ‌ها ، کروماتوگرافی کاغذی برای جداسازی مواد فرار غیر فعال مانند هیدروکربن‌ها و دیگری جداسازی اسیدهای چرب با فراریت بیشتر مناسب نمی باشد.

کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography)

- کروماتوگرافی با لایه نازک نوعی از کروماتوگرافی جذب سطحی است که در این روش از صفحات با ضخامت نازک استفاده می‌شود و موقعیت اجزای جدا شده روی صفحه مشخص می‌گردد. ذرات روی لایه باید تراکم زیادی داشته باشند و همسان و کوچک باشند. قائم ساکن اغلب از جنس سلولز است که برای جدا سازی مولکول‌های هیدروفیلی مثل هیدرات های کربن ، اسیدهای آمینه ، مشتقات اسید نوکلئیک و مواد معدنی استفاده می‌شود.

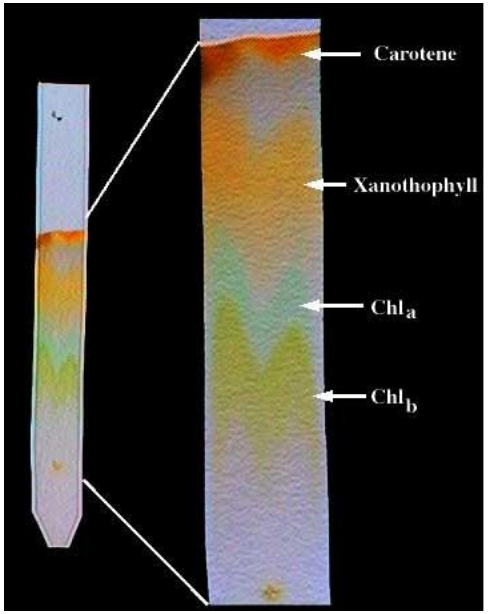
- کروماتوگرافی لایه نازک پر کاربردترین روش در صنایع داروسازی برای تمام اندازه‌گیری‌های مهم و تعیین درجه خلوص محصولات است. هم‌چنین ، کاربرد گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های بالینی پیدا کرده است و ستون فقرات مطالعات متعدد زیست شناسی و زیست شیمیایی شده است. بالاخره ، کاربرد گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های صنایع شیمیایی پیدا کرده است.

مکانیزم کار کروماتوگرافی لایه نازک

در ابتدا لازم است که صفحات کروماتوگرافی تهیه شوند ، یعنی جاذبه به صورت لایه نازکی با ضخامت یکنواخت روی یک تکیه‌گاه سفت بی‌اثر پخش شود. معمولا از صفحات شیشه‌ای استفاده می‌شود ، البته روش‌های دیگری نیز وجود دارد. جاذب جامد بصورت پودر ریز را با آب و گاهی با یک مایع فرار ، به صورت خمیر در می‌آورند ، و آن را به وسیله دستگاه‌های پخش کننده تجارتی یا یک پخش کننده خانگی ساده یا حتی تنها با استفاده از دست روی صفحه پخش می‌کنند. تهیه لایه با استفاده از روش پاشیدن یا فرو بردن نیز امکان‌پذیر است.

صفحه پوشیده از خمیر را خشک و با گرم کردن در حدود ۱۰۰ ، به مدت از قبل تعیین شده ، آن را فعال می‌کنند. محلولی از نمونه در یک حلال فرار را به وسیله یک پیپت یا سرنگ روی صفحه قرار می‌دهند. وقتی که لکه خشک شده صفحه را بطور عمود در مخزن مناسب طوری قرار می‌دهند که لبه پایینی آن در فاز متحرک انتخاب شده فرو رود ، بدین ترتیب جداسازی مواد با استفاده از روش کروماتوگرافی صعودی انجام می‌شود.

. در پایان عمل ، حلال را از صفحه تبخیر می‌کنند و لکه‌های جدا شده را به وسیله روش‌های فیزیکی یا شیمیایی ، به ترتیبی که در کروماتوگراف‌های کاغذی به کار می‌روند ، آشکار و شناسایی می‌کنند. شیوه عملی لازم در این روش ، بجز تهیه صفحات ، بسیار شبیه روش کروماتوگرافی کاغذی است.



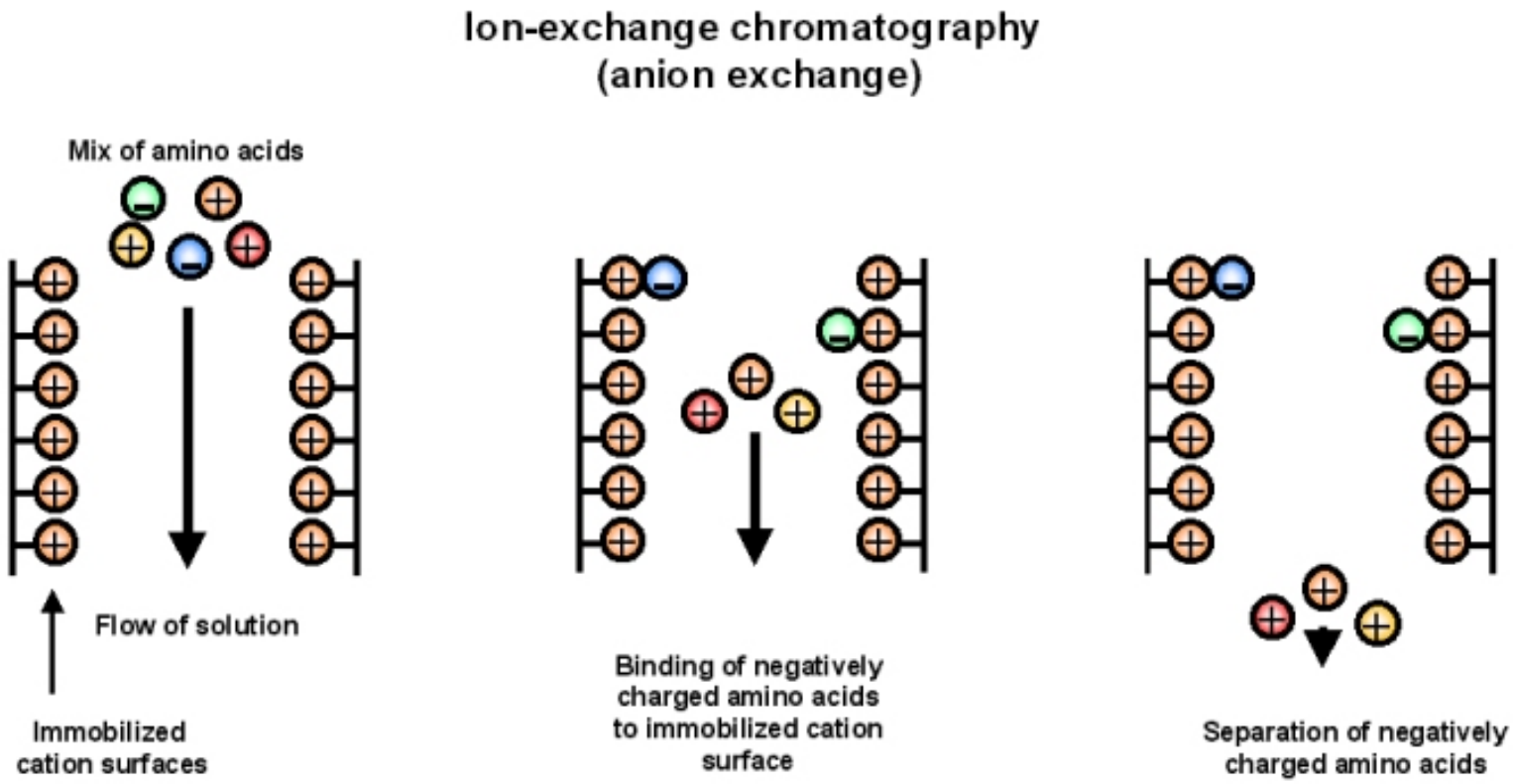
مقایسه با کروماتوگرافی کاغذی:

روش لایه نازک دارای مزیت عمده سرعت بیشتر ، در اکثر موارد ، جداسازی مواد بهتر می‌باشد. زمان متوسط برای حرکت حلال به مقدار ۱۰ در کروماتوگرافی لایه نازک روی سیلیکاژل ۳۰ – ۲۰ دقیقه است ، در صورتی که همان جداسازی مواد بر روی یک کاغذ سریع ممکن است ۲ ساعت طول بکشد. دیگر این که به خاطر آزادی عمل در انتخاب لایه جاذب تفکیک به نحو بهتر و موثرتری انجام می پذیرد.

کروماتوگرافی تبادل یونی

- پروتئین ها و دیگر مولکول های باردار را می توان توسط کروماتوگرافی تبادل یونی تفکیک و جدا نمود . برای این منظور از استوانه های شیشه ای که توسط دانه های رزین پر شده اند استفاده می گردد. رزین های مورد استفاده پلی مرهایی هستند که یونی شونده زیادی به آن ها اضافه شده است. انواع رزین هایی که بار منفی دارند را تبادل کنندگان کاتیونی و انواع بار مثبت را تبادل کنندگان آنیونی می نامند. زمانی که محلولی از یون ها از درون این ستون عبور نماید یون ها برای محل های باردار رزین با یکدیگر رقابت می نمایند و در نتیجه سرعت عبور هر یونی از داخل ستون به میل ترکیبی آن با محل های باردار رزیین ، درجه یونی شدن آن و ماهیت و غلظت های رقابت کننده در محلول بستگی دارد. اختلافی که در سرعت عبور یون ها از داخل ستون وجود دارد مبنای اصلی جداسازی پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک توسط این روش می باشد زیرا این مولکول ها دارای گروه های مثبت و منفی گوناگونی می باشند.

کروماتوگرافی تبادل یونی



کروماتوگرافی میل ترکیبی

کروماتوگرافی میل ترکیبی نوعی از کروماتوگرافی ستونی است که در آن اجزای موجود در نمونه بواسطه واکنش بیولوژیکی با موادی که ستونی را با آن پر نموده ایم، عبورشان کند شده و به تعویق می افتد.

واکنش بیولوژیکی که اساس کار این نوع کروماتوگرافی را تشکیل می دهد ممکن است به صورتهای مختلفی در نظر گرفته می شود: واکنش آنتی ژن – آنتی بادی ، واکنش آنزیم – سوبسترا و .....

ستونی را از ماده متخلخل مانند ژل که به آن لیگاندهای بخصوصی به صورت کووالانس متصل نموده، پر می سازند.

زمانی که نمونه از ستون عبور می نماید فقط اجزایی از آن که میل ترکیبی بالایی دارند با آن ترکیب شده و بقیه اجزا به سرعت از ستون خارج می گردند.

نهایتا اجزای باند شده با لیگاند را با تغییرات شدید pH یا غلظت یونی از لیگاند مجزا کرده و به پایین ستون هدایت می نماید

صاف کردن به وسیله ژل

جداسازي‌هايي مبتني بر الک کردن مولکولي بر روي اجسام بي‌بار در جريان مهاجرت الکترو اسمزي از داخل ژل‌ها انجام مي‌شود . بدين ترتيب که جداسازي بر مبناي اندازه‌هاي نسبي مولکول ها انجام شده و از اصطلاح صاف کردن به وسيله ژل استفاده مي‌شود . ژل استفاده شده در اين روش بايد بي اثر و پايدار باشد . فاز ساکن از يک قالب متخلخل تشکيل شده که منفذهاي آن به وسيله حلالي که فاز متحرک را تشکيل داده پر شده است . از آنجا که اساس جداسازي بر اين است که مولکول‌هاي بزرگ تر از حد وارد سوراخ‌ها نشده و به ترتيب جرم مولکولي از ستون خارج شوند و مولکول‌هاي کوچک تر بر حسب شدت نفوذشان سوراخ ها را پر کنند پس اندازه سوراخ بسيار مهم است .

صاف کردن به وسیله ژل

- بنابراين اجزاي مخلوط به ترتيب جرم مولكولي از ستون خارج مي‌شوند يعني ابتدا بزرگترين مولكول خارج مي‌شود. تركيباتي كه اصلا وارد ژل نمي‌شوند و نيز مولكول‌هاي كوچكي كه كاملا در ژل نفوذ مي‌كنند از يكديگر جدا نمي‌شوند. مولكول‌هاي با اندازه متوسط بر حسب درجه نفوذ آنها در قالب نگه داشته مي‌شوند. اگر مواد تركيب مشابه داشته باشند ، به ترتيب جرم مولكولي نسبي از ستون شسته مي‌شوند.