# آشنایی با دستگاه های آزمایشگاه سم‌شناسی در بخش حشره‌شناسی

دریافت: ۱۲ بهمن ۱۴۰۴ ■ بازنگری: ۲۹ بهمن ۱۴۰۴ ■ پذیرش: ۳۰ بهمن ۱۴۰۴ ■ انتشار آنلاین: ۲۷ اردیبهشت ۱۴۰۵

https://doi.org/10.22059/giahpzshsj.2026.410322.1049

نگار ناظمی، دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تهران

Negar.Nazemi1378@gmail.com

مشاهده فیلم معرفی دستگاه

## ۱. دستگاه کروماتوگرافی مایع

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) یک روش جداسازی و شناسایی دقیق ترکیبات موجود در نمونه‌های پیچیده است که در آن مخلوطِ واردشونده در یک فاز متحرکِ مایع (مثل مخلوط آب و حلال‌های آلی) به کمک یک فاز ساکنِ داخل ستون (معمولاً ذرات ریز سیلیکا یا مواد پلیمری با اندازه منافذ مشخص) از ستون عبور می‌کند و در نتیجه به دلیل تفاوت در برهم‌کنش هر جزء با فاز ساکن و فاز متحرک، اجزای مختلف با زمان‌های نگهداشت متفاوت از هم جدا می‌شوند. تاریخچه این فناوری به‌طور کلی با تحول کروماتوگرافی و سپس پیشرفت‌های مهندسی و شیمی تحلیلی در اواخر قرن بیستم مرتبط است؛ اما HPLC به‌ویژه در دهه‌های

۱۹۶۰ تـــا ۱۹۷۰ با ایده اســـتفاده از ســـتون‌های پر از ذرات ریز و نیز پمپ‌های با فشـــار بالا شـــکل جدی‌تری گرفت و به‌تدریج به ابزاری اســـتاندارد در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و صنعتی تبدیل شـــد. اهمیـــت HPLC از آنجاســـت که می‌تواند بـــا دقت و حساســـیت بالا، هم کیفی (شناســـایی) و هم کمی (اندازه‌گیـــری مقدار) مـــواد را در نمونه‌هـــای واقعی مثـــل داروهـــا، خون و ادرار، عصاره‌هـــای گیاهی، نوشـــیدنی‌ها، خوراکی‌ها و حتی نمونه‌هـــای محیطی انجام دهـــد؛ به‌خصوص وقتی ترکیبات هـــدف در کنار مـــواد فراوان و مشـــابه دیگر وجـــود دارند. از نظـــر کاربـــرد، HPLC در کنترل کیفیت دارو و پیگیـــری ناخالصی‌ها، تعیین مقدار مواد مؤثره، آزمون‌های صنایع غذایـــی (ویتامین‌ها، قندها و افزودنی‌ها)، آنالیز آلاینده‌های محیط‌زیســـت (مثل ترکیبات آلـــی پایـــدار)، و همچنیـــن در آزمایش‌های فارماکوکینتیک و بیوشیمی بســـیار رایج است. از نظر روش کار، HPLC معمـــولاً با چنـــد بخش اصلی پیش مـــی‌رود: ابتـــدا آماده‌ســـازی نمونه انجام می‌شـــود (گاهی شـــامل رقیق‌ســـازی، فیلتر کردن برای حذف ذرات معلق، و در صورت نیاز اســـتخراج یا پیش‌تصاف)، ســـپس نمونه توســـط وســـیله تزریق یا اتوســـمپلر به جریان فاز متحـــرک تزریق می‌شـــود. در ادامه پمپ فاز متحرک را با فشـــار بالا و دبی کنترل‌شـــده به ســـمت ســـتون می‌راند. فـــاز متحـــرک می‌تواند بـــه صورت ایزوکراتیـــک (ترکیب ثابـــت در طول زمان) یـــا گرادیان (تغییر تدریجی نســـبت حلال‌ها در طول جداســـازی) تنظیم شود؛ حالت گرادیان برای نمونه‌های چندجزئی و ترکیبات با قطبیت‌های متفاوت بســـیار مفید اســـت. ســـپس اجزای نمونـــه داخل ســـتون بر اســـاس نوع برهم‌کنش‌شـــان جدا می‌شـــوند: در روش‌هـــای رایج مثل HPLC فـــاز معکـــوس (RP-HPLC) که معمولاً پرکاربردترین اســـت، فاز ســـاکن نســـبتاً آب‌گریز بوده و ترکیبات بر اســـاس آب‌گریزی/دوســـتی به حلال‌ها جدا می‌شـــوند؛ در حالی که روش‌هـــای دیگری مانند HPLC فاز نرمـــال یا تعویض یونی هم وجـــود دارند که برای اهداف خاص انتخاب می‌شـــوند. پـــس از خروج از ستون، آشکارساز (Detector) سیگنال خروجی را بر اساس ویژگی شیمیایی/فیزیکی ترکیب ثبت می‌کند؛ برای مثال آشکارســـاز UV-Vis بـــرای ترکیباتی که در طول موج‌های مشـــخص جذب دارند رایج اســـت، در حالی که آشکارســـاز فلورســـانس برای مواد فلورسنت حساسیت بســـیار بالایی دارد و آشکارســـازهای دیگر مانند ELSD/RI برای ترکیباتی کـــه جذب UV ندارند کاربرد پیـــدا می‌کنند. در نهایت دیتا سیســـتم با ایجاد پیک‌های کروماتوگرام (نمودار پاســـخ آشکارساز در برابر زمان) زمان‌های نگهداشت و ســـطح پیک را استخراج می‌کند و بـــا کالیبراســـیون (اســـتانداردهای معلوم) مقدارهای کمی را محاســـبه می‌کند. از نظر ویژگی‌ها، HPLC معمـــولاً توانایی جداســـازی ترکیبات نزدیک به هـــم را دارد، بـــرای غلظت‌های پایین هـــم می‌تواند حســـاس باشـــد، قابلیت کنترل دقیـــق پارامترهایی مثل فشـــار، دبی، دمـــا و ترکیب فاز متحـــرک را فراهم

می‌کند، و همچنین امکان اتوماسیون و تکرارپذیری خوب در آزمایش‌های روتین را دارد. همچنین چون انتخاب ستون، نوع فاز ساکن و ترکیب حلال‌ها نقش تعیین‌کننده دارند، HPLC می‌تواند متناسب با نوع ماده هدف (قطبیت، فرّار نبودن، وجود گروه‌های یونی، رفتار اکسیداسیون/کاهش، و...) بهینه‌سازی شود؛ به همین دلیل است که در عمل، HPLC[1] فقط یک دستگاه نیست، بلکه یک خانواده روش تحلیلی است که با تغییر شرایط می‌توان به نتایج دقیق برای اهداف مختلف رسید.

دستگاه کروماتوگرافی مایع یا HPLC در آزمایشگاه سم‌شناسی بخش حشره‌شناسی طبقه‌ی سوم قرار دارد و عمدتا در این بخش برای اندازه‌گیری باقی مانده‌ی آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی، خاک و آب از این دستگاه استفاده می‌شود.

از لحاظ ساختاری این دستگاه دارای Detecture است. شناساگر UV که ترکیباتی که در امواج UV جذب دارند را شناسایی می‌کند. شناساگر RID نیز برای اندازه‌گیری قندها استفاده می‌شود. در حال حاضر این شناساگر کاربرد کمتری در این آزمایشگاه دارد. دستگاه دارای دو عدد پمپ است که وظیفه‌ی برقراری جریان فاز متحرک را دارند. در آون دستگاه انواع مختلف ستون‌ها وجود دارد که برای آفت‌کش‌های مختلف عمدتا ستون‌های C۱۸ مورد استفاده قرار می‌گیرد. دستگاه دارای یک اتوسمپلر است که برای نمونه‌گیری خودکار و اندازه‌گیری نمونه‌ها به صورت خودکار استفاده می‌شود. این دستگاه دارای یک قسمت ثبت داده هست که خروجی آن کروماتوگرام‌هایی است که جهت اندازه‌گیری باقی مانده آفت‌کش‌ها کاربرد دارد. فازهای متحرکی مورد استفاده شامل آب و استونیتریل است که معمولا باید دارای حلال‌های با خلوص بسیار بالا باشند که هزینه بالایی نیز دارند.

نکات مراقبتی: HPLC یک دستگاه نسبتا حساس بوده و نگهداری این دستگاه یک سری نکات مشخصی دارد:

۱- دستگاه بایستی توسط کارشناسی آموزش دیده مورد استفاده قرار گیرد.

۲- دستگاه بایستی به صورت دوره‌ای سرویس شود که توسط کارشناس شرکت بررسی شده و کارهای فنی روی آن انجام می‌شود.

۳- دستگاه بایتسی به‌طور صحیحی کالیبره شود.

شکل۱. دستگاه کروماتوگرافی مایع

1. High Performance Liquid Chromatography

مشاهده فیلم
معرفی دستگاه

## ۲. دستگاه الایزا ریدر

الایزا ریدر (ELISA Reader) یا «خوانشگر الایزا» دستگاهی است که برای اندازه‌گیری جذب نوری (اپتیکی) چاهک‌های میکروپلیت در آزمون‌های ELISA به کار می‌رود و نقش کلیدی در تبدیل یک واکنش ایمنی-آنزیمی به داده‌های کمی و قابل تحلیل دارد. آزمون ELISA از دهه ۱۹۷۰ به‌عنوان روشی حساس و اختصاصی برای شناسایی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها در نمونه‌های سرم، پلاسما، ادرار و سایر مایعات زیستی توسعه یافت و با جایگزین شدن الایزا ریدر به‌جای خواندن دستی رنگ‌ها، دقت، سرعت و تکرارپذیری نتایج به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرد. اهمیت الایزا ریدر در این است که امکان اندازه‌گیری کمی نتایج الایزا را فراهم می‌کند؛ یعنی به‌جای قضاوت چشمی رنگ چاهک‌ها، شدت رنگ هر چاهک را در طول موج مشخص اندازه‌گیری کرده و آن را به صورت عدد جذب نوری (OD) گزارش می‌کند، سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت ماده هدف (مثلاً یک هورمون، آنتی‌بادی، آنتی‌ژن ویروسی، سیتوکین و ...) محاسبه می‌شود. از نظر کاربرد، الایزا ریدر در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، در تحقیقات ایمونولوژی و سلولی، در صنایع داروسازی و واکسن‌سازی، و همچنین در کنترل کیفیت مواد غذایی و دامپزشکی نیز به‌طور گسترده استفاده می‌شود. از نظر ویژگی‌ها، الایزا ریدرها معمولاً قابلیت خوانش چند طول موجی را دارند (مولتی‌مود)، امکان ذخیره و انتقال داده‌ها به رایانه یا شبکه آزمایشگاه را فراهم می‌کنند، و در برخی مدل‌ها با واشر پلیت (Plate Washer) و انکوباتور ادغام شده‌اند تا روند آزمون نیمه‌خودکار یا تمام‌خودکار شود. دقت و تکرارپذیری بالا، سرعت خوانش (اندازه‌گیری ده‌ها یا صدها نمونه در یک پلیت)، نیاز به حجم کم نمونه و معرف، و قابلیت استانداردسازی روش، از مزایای مهم این دستگاه است. در مجموع، الایزا ریدر پلی است میان واکنش بیوشیمیاییِ ایمنی ــ آنزیمی و نتایج عددیِ قابل تفسیر، و بدون آن، انجام بسیاری از آزمایش‌های تشخیصی و تحقیقاتی با سرعت و دقت امروزی عملاً ممکن نبود.

در این آزمایشگاه، دستگاه الایزا ریدر عمدتا برای سنجش آنزیم‌ها در حشرات استفاده می‌شود. این دستگاه مبتنی بر جذب در طول موجهای مختلف است. پلیت‌های چندخانه مخصوصیدر این دستگاه جهت خوانش قرار می‌گیرد و در طول موج مدنظر که آنزیم‌های حشرات در آن‌ها جذب دارند، این دستگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای آنزیم‌هایی مثل آنزیم‌های سم‌زدا، استیل کولین استراز و کربوکسیل استرازها و ذخایر انرژی

در حشـــرات مثل پروتئیـــن و کربوهیـــدرات می‌توان اســـتفاده کـــرد. همچنین بـــه منظـــور اندازه‌گیری برخـــی از آنزیم‌های آنتی اکســـیدانی در حشـــرات، مثل سوپراکسید دیسموتاز و آســـکوربات پراکسیداز، عمدتا از این دســـتگاه اســـتفاده می‌شود.

نکات مراقبتی:

۱- کالیبراســـیون‌های دوره‌ای که هر چندسال یک بار دســـتگاه باید توسط شرکت ســـازنده انجام شود.

۲- لامپ UV باید هر چندســـال یک بـــار به صورت دوره‌ای بررســـی و در صورت لزوم، تعویض گردد.

شکل۲. محل قرارگیری پلیت در دستگاه خوانش الایزا

## ۳. دستگاه اسپکتروفتومتر

دســـتگاه اســـپکتروفتومتر، ابزاری اســـت کـــه برای اندازه‌گیـــری میـــزان جـــذب یا عبـــور تابـــش نوری (معمـــولاً در طول موج‌های مختلـــف مرئی و فرابنفش) توسط نمونه‌های شـــفاف و محلول‌ها به کار می‌رود و در آزمایشات بیوشیمی، شـــیمی، محیط‌زیست و پزشکی کاربرد فراوان دارد. این دســـتگاه بر اســـاس اصل اینکه هـــر مـــاده شـــیمیایی، در طول موج‌هـــای خاصی، تابش نوری را جـــذب می‌کند یا عبـــور می‌دهد، عمل می‌کند؛ بـــه این صورت کـــه نمونـــه درون لام کوچک (کووت) قرار می‌گیرد و نور با شـــدت مشخص، از میان آن عبـــور می‌کند. بخشـــی از این تابش توســـط نمونه جذب شـــده و بخش دیگر عبور می‌کنـــد، اندازه‌گیری میزان عبور یـــا جذب نـــوری می‌تواند نشـــان‌دهنده غلظت ماده در نمونه باشـــد. تاریخچه اسپکتروفتومتر به اوایل قرن بیســـتم برمی‌گـــردد، زمانی که توســـعه ابزارهـــای نوری و فیبر نـــوری این امـــکان را فراهم کرد که بتـــوان میزان جذب مواد شـــیمیایی را بـــا دقت بالا اندازه‌گیری کـــرد؛ اما مهم‌ترین تحـــولات در دهه‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ رخ داد که با افزایش حساسیت و کاهش حجـــم نمونه، ایـــن دســـتگاه‌ها وارد عرصه‌های جدید شـــدند. اهمیت این دســـتگاه در دقت، حساســـیت و ســـرعت بـــالای اندازه‌گیری مســـتقیم و کمی غلظت مواد، در بســـیاری از آزمایش‌های تشـــخیص، کنترل کیفیت، تحقیقات و توســـعه دارو، مطالعه بیوشیمی، و تحلیـــل مـــواد آلـــی و معدنـــی اســـت. روش کار در اســـپکتروفتومتر بدین صورت اســـت کـــه نمونه درون لام قـــرار می‌گیـــرد و نور منبع بـــا طول مـــوج معین از میان آن عبور می‌کند؛ پس از آن، آشکارســـاز شـــدت نوری کـــه از نمونه عبور کرده اســـت را ثبـــت می‌کند، و در نهایت نرم‌افزار دســـتگاه بر اســـاس مقـــدار عبور (transmittance) یـــا جـــذب نـــوری (absorbance) غلظت مـــاده مورد نظر را محاســـبه می‌کنـــد. معمولا

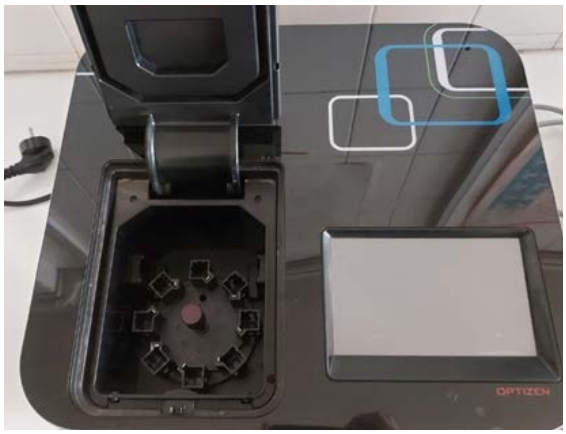
از فیلترهـــای نـــوری یا منشـــورهای گسســـته برای تعیین طول‌مـــوج خاص بهـــره می‌برنـــد؛ در نتیجه، دســـتگاه می‌توانـــد در طول‌موج‌هـــای متفاوتی برای تحلیل‌های مختلف بـــه کار گرفته شـــود. ویژگی‌های مهم اســـپکتروفتومتر شامل حساســـیت بالا، قابلیت اندازه‌گیـــری چندیـــن نمونه هم‌زمـــان، امکان تنظیم طول‌مـــوج، نیاز به حجـــم نمونه کـــم، و قابلیت انتقال داده‌هـــا به نرم‌افزارهـــای تحلیل اســـت. علاوه بر این، اسپکتروفتومترهای مدرن مجهز به نمایشگر دیجیتال، قابلیت ثبت و ذخیره نتایـــج، و ارتباط با کامپیوتر را دارند که کار کردن با آنها را آســـان‌تر و تکرارپذیرتر می‌ســـازد. در مجمـــوع، اســـپکتروفتومتر وســـیله‌ای حیاتی در آزمایش‌های شیمیایی و زیســـتی است، چون بدون آن، اندازه‌گیری دقیق غلظت مـــواد در نمونه‌های مختلف، امکان‌پذیر نبود و تشخیص ســـریع و غیرتخریبیِ مواد در آزمایشـــگاه‌های تحقیقاتی و کاربردهای صنعتی به چالـــش می‌انداخت.

تفاوت این دســـتگاه با دســـتگاه الایزا ریـــدر در نحوه بـــه کارگیـــری نمونه‌هابـــوده کـــه در این دســـتگاه از جایگاه‌های کووت استفاده می‌شـــود. طول موج‌های دســـتگاه به صـــورت پیوســـته بـــوده و از طـــول موج فرابنفش تا نور مرئی را پوشـــش می‌دهد. این دســـتگاه برای اندازه‌گیـــری فعالیت‌های آنزیمـــی قابل کاربرد اســـت. در این آزمایشـــگاه برای اندازه‌گیری و تخمین میزان رشـــد باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر از این دستگاه اســـتفاده می‌شود.

نکات مراقبتی

۱-مشابه دستگاه الایزا ریدر، ســـرویس‌های دوره‌ای باید انجام شـــود و تعویض به موقع لامـــپ انجام گیرد.

۲-جهت کار با دســـتگاه باید از کارشناس متخصص کمک خواست.



شکل ۳. دستگاه اسپکتروفتومتر و محل قرار گیری کووت‌ها در دستگاه

**سپاسگزاری:**

از آقای دکتـــر ترابی، عضـــو محتـــرم هیئت علمی بخش حشره‌شناســـی، پیرو همکاری ایشـــان تشکر می نما ییم .