شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

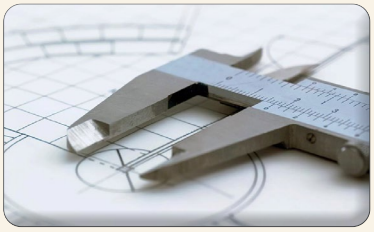
سال یازدهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۲

ISSN 2538-3450

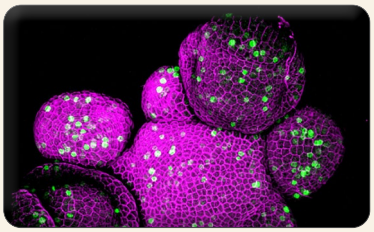
کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری در زمینه توسعه، تحلیل و تشخیص نقایص دستگاه‌ها و قطعات صنعت نیمه‌هادی

توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها

تعیین خلوص مواد با استفاده از دستگاه گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)



تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون ضربه شارپی



انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم‌کانون (بخش دوم)

عدم قطعیت در فرآیند نمونه‌برداری

اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کانابینوئیدها به روش کروماتوگرافی لایه نازک

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کانابینوئیدها به روش کروماتوگرافی لایه نازک

نویسندگان

اصغر افتخاری[1*]
ابراهیم قربانی[2]، رضا ساقی[3]

۱. دکتری شیمی، رئیس گروه مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا
۲. کارشناسی ارشد شیمی، مدرس و عضو گروه علمی مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا

*dr.ef.2003@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸

واژه‌های کلیدی

اعتباربخشی، کانابینوئیدها، ترا هیدرو کانابینول، کروماتوگرافی لایه نازک، آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر.

چکیده

کروماتوگرافی لایه نازک، روشی رایج برای جداسازی و شناسایی مواد مخدر است. چندین روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تجزیه و تحلیل کیفی و نیمه کمّی کانابیس‌ها، با استفاده از انواع مختلفی از فاز ثابت و متحرک، روش‌های آماده‌سازی نمونه و روش‌های تصویرسازی/آشکارسازی لکه‌ها وجود دارد. با این حال، هر روشی که به تازگی در آزمایشگاه استفاده می‌شود، باید قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شود.

مقدمه

اعتباربخشی به نتایج آزمایش، فرآیندی است که به‌منظور اطمینان از معتبر، دقیق و قاطع بودن داده‌ها و نتایج آزمایشگاه، اتخاذ می‌شود [۱]. این فرآیند، الزامی و مهم در عملیات آنالیز شیمیایی است. بیشتر شیمیدان‌های تجزیه، از اهمیت آن آگاه هستند، اما این که چرا و چه زمانی باید انجام و به‌طور دقیق، چه نیازهایی در آن برآورده شوند، همیشه برای آنها روشن نیست [۲]. انواع روش‌های آزمایشگاهی باید از نظر کیفیت بررسی شوند، به طوری که میزان صحت و درستی کار و قابل اعتماد بودن روش برای فعالیت‌های بعدی، به‌طور کامل مشخص شود؛ به این ترتیب، براساس میزان صحت و اعتبار به‌دست آمده، در زمان الگوگیری، تصمیم بر استفاده از این روش‌ها و یا عدم استفاده از آنها اتخاذ می‌شود. شاخص‌های مختلفی در این زمینه معرفی شده‌اند که هر کدام می‌توانند میزانی از اعتبار را مشخص کند [۳]. تمام

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۲

مراحل، از دریافت مواد مخدر در آزمایشگاه تا صدور نتیجه آزمایشگاهی توسط کارشناسان مربوطه، در اعتباربخشی نتایج تاثیرگذار است. دریافت و توصیف مشخصات نمونه، توزین مواد، محلول‌سازی، استفاده از محلول‌های استاندارد، به کارگیری روش‌های تشخیصی، جمع‌آوری مستندات و حتی نوع و سبک گزارش‌نویسی در اعتباربخشی نتیجه آزمایشگاهی موثر است [۴].

آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر منبع کلیدی اطلاعات و داده‌های علمی معتبر و قابل اعتماد در زمینه آنالیز مواد مخدر هستند. همچنین این آزمایشگاه‌ها، در سیستم قضایی، برای رسیدگی به جرایم مرتبط با مواد مخدر و اقدامات کاهش عرضه مواد مخدر، نقش بسزایی دارند. با این حال، سطح علمی کارشناسان آنالیز مواد مخدر به‌طور روز افزون به مخاطبان زیادی مرتبط و برای آنها مهم شده‌است. علم کشف جرایم، به‌منظور ارائه مدارک و شواهد دقیقی که در طراحی مداخلات موثر سیاسی، ضروری است، نیاز به تکامل و انطباق با بازار بسیار پویای مواد مخدر امروزه دارد که اهمیت آن، با ظهور جهانی مواد روانگردان جدید[۱] و تعدد بی‌سابقه‌ای از مواد موجود در این بازارها، بیش از پیش مشخص می‌شود. در چنین وضعیتی، اطلاعات تولید شده توسط آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر برای حمایت از سیاست‌ها و تصمیم‌گیری‌های بر پایه اسناد و حفاظت از سلامت عمومی، مهم‌تر از همیشه است [۵].

در این مقاله سعی شده‌است تا روش کروماتوگرافی لایه نازک، برای شناسایی کانابینوئیدها به‌عنوان روشی معتبر و تایید شده معرفی شود. آنالیز و تعیین ماهیت گیاه شاهدانه و مشتقات آن برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پلیس مبارزه با مواد مخدر کشورهای جهان اهمیت دارد؛ زیرا برخلاف سایر مواد مخدر گیاه پایه که کشت و تولید آن تنها در چند کشور متمرکز است، شاهدانه به‌طور تقریبی در همه کشورهای جهان تولید می‌شود و محصولات شاهدانه بیشترین قاچاق را دارند. همه کشورهای جهان تحت تأثیر قاچاق کانابیس‌ها[۲] هستند. در سال ۲۰۱۹، بیش از ۵۰۰۰ تن کانابیس (گیاه و رزین) کشف و ضبط شد. همچنین گیاه شاهدانه، پر مصرف‌ترین ماده مخدر در سراسر جهان است، به طوری که تخمین زده می‌شود ۲۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۱۹، کانابیس‌ها را مصرف کرده‌اند که به‌طور تقریبی ۱۸ درصد افزایش نسبت به دهه گذشته و معادل حدود ۴ درصد از جمعیت جهانی ۱۵ تا ۶۴ ساله است.

از پایان قرن گذشته، پیشرفت‌های سریعی در روش‌های کشت گیاه شاهدانه صورت گرفته است و روش‌های تولید به‌طور فزاینده‌ای پیچیده شده‌اند. تحولات قوانین در برخی کشورها منجر به تغییراتی در پویایی کشت، تولید و بازارهای شاهدانه و محصولات شاهدانه شده‌است. این عوامل، منجر به در دسترس بودن طیف گسترده‌ای از شاهدانه در بازارهای غیرقانونی با افزایش مقدار تترا هیدرو کانابینول[۳] شده که به اجزای روانگردان حشیش اشاره دارد و شامل تعدادی ایزومر[۴] و انواع استریوشیمیایی[۵] (شیمی فضایی) آنها است که در کنوانسیون‌های کنترل بین‌المللی مواد مخدر نیز گنجانده شده‌است. همچنین افزایش تنوع محصولات حاوی تترا هیدرو کانابینول و وسایل استعمال آن، از جمله خوراکی‌ها، سیگار و قلیان‌های الکترونیکی و همچنین افزایش در دسترس بودن محصولات شاهدانه که به‌طور عمده، حاوی کانابیدیول[۶] هستند، وجود دارد.

در نتیجه، آنالیز حشیش و محصولات شاهدانه، با نیاز به انجام اقداماتی از جمله شناسایی و در بیشتر مواقع، کمّی کردن سطوح پایین تترا هیدرو کانابینول، تمایز ایزومرهای آن به ویژه دلتا-۹- تترا هیدرو کانابینول[۷] و دلتا-۸- تترا هیدرو کانابینول[۸] و شناسایی سایر کانابینوئیدهای موجود، برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پیچیده‌تر شده‌است. این موضوع، چالش‌های تجزیه‌ای متنوعی را ایجاد می‌کند که نیازمند روش‌های تجزیه‌ای قابل اعتماد، تکرارپذیر و حساس است. علاوه‌بر این، عدم در دسترس بودن مواد مرجع دلتا-۹- تترا هیدرو کانابینول، ایزومرهای آن و سایر کانابینوئیدها، نگرانی فزاینده‌ای برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر است [۶].

توصیف گیاه شاهدانه و مشتقات آن

- **نام: کانابیس ساتیوا ال(لینائوس)**[9]
- **اسامی معادل:** اسامی محلی و خیابانی زیادی برای آن وجود دارد، برخی از این اسامی عبارتند از شاهدانه، ماریجوانا، کنف، دیگ، گاندیا، سبزه، کانور و غیره.

سرده کانابیس و هومولوس (رازک)[10] متعلق به یک خانواده هستند (تیره شاهدانگان[11]). به‌طور کلی، کانابیس به‌عنوان تک گونه‌ای در نظر گرفته می‌شود که به چندین زیرگونه تقسیم می‌شود که عبارتند از:

کانابیس ساتیوا زیرگونه ساتیوا[12]، کانابیس ساتیوا زیرگونه ایندیکا[13]، کانابیس ساتیوا زیرگونه رودرالیس[14]، کانابیس ساتیوا زیرگونه اسپونتینیا[15]، کانابیس ساتیوا زیرگونه کافریستانکا[16].

با این وجود، از لحاظ ساختاری و شیمیایی، کانابیس به زیر شاخه‌هایی تقسیم می‌شود که به راحتی قابل تشخیص نیستند و چنان به نظر می‌رسند که گویی به واسطه محیط، بهینه‌سازی شده‌اند و از لحاظ شکل ظاهری با هم متفاوت هستند [۷].

گیاه شاهدانه معمولی دارای نوع نر و ماده است. نوع نر، سه درصد و نوع ماده، هشت درصد ماده موثر توهم‌زایی و اعتیادآوری تترا هیدرو کانابینول دارد. اما با تغییرات ژنتیکی که در گیاه شاهدانه ایجاد شد، گیاه جدیدی به‌دست آمد که دو جنسیتی بوده و برخلاف شاهدانه معمولی که گل‌های کمی دارد، بسیار پرگل است. در این گل‌ها هفت برابر بیشتر از شاهدانه معمولی، ماده موثر تترا هیدرو کانابینول و مواد شیمیایی دارای اثرات اعتیادآور وجود دارد [۸].

این گیاه، قرن‌ها به‌عنوان یک محصول کشاورزی برای الیاف نساجی، مورد استفاده قرار گرفته است. محصولات قانونی شاهدانه شامل دانه شاهدانه، روغن دانه شاهدانه و اسانس گیاه شاهدانه است. محصولات غیرقانونی شاهدانه به سه دسته اصلی گیاه شاهدانه، صمغ حشیش و روغن حشیش تقسیم می‌شوند. محصولات غیرقانونی شاهدانه از مواد طبیعی بسیار متغیر و با تنوع گسترده که به‌منظور قاچاق، مورد فرآوری و تبدیل قرار می‌گیرند، استخراج می‌شوند [۶]. همین تنوع و فراوانی باعث می‌شود که آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر، برای شناسایی کانابینوئیدها، به دنبال روش‌های به روز، سریع و در عین حال معتبر باشند.

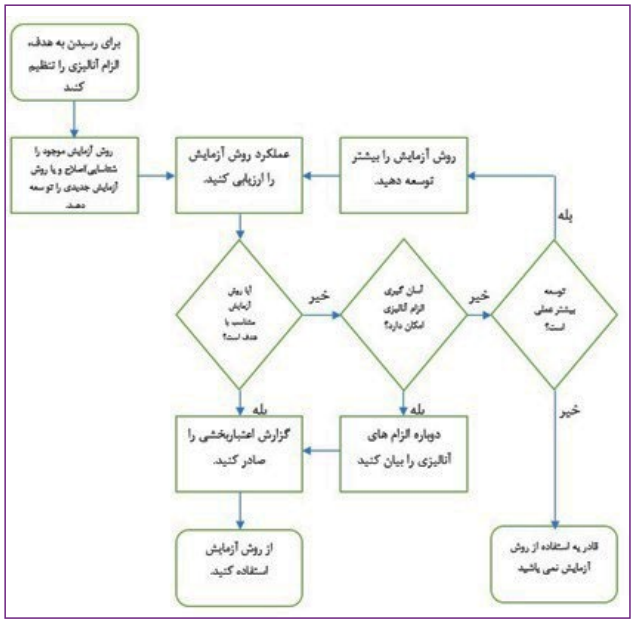
راستی‌آزمایی و اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر

به‌طور کلی، تمام فعالیت‌هایی که در مراحل مختلف آزمایشگاهی انجام می‌شود، در اعتبار نتایج آزمایشگاهی تاثیر بسزایی دارد؛ این فعالیت‌ها شامل موارد ذیل است:

- دریافت نمونه و ثبت مشخصات آن؛
- توزین نمونه و نگهداری آن؛
- تهیه نمونه استاندارد و حلال‌های مناسب؛
- تهیه محلول استاندارد، ماده مشکوک، استاندارد داخلی و غیره؛
- روش‌های غربالگری و دستگاهی آنالیز مواد؛
- مستندسازی؛
- استفاده از نمونه‌های استاندارد با گواهی‌نامه مشخص؛
- استفاده از روش‌های مرجع آنالیز مواد مخدر؛
- رفع آلودگی‌ها؛
- گزارش‌نویسی؛
- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه ضریب همبستگی؛
- محاسبه غلظت ماده موثر موجود در نمونه تحویل داده شده به آزمایشگاه.

چنانچه هر یک از مراحل مذکور با رعایت نکات مورد نظر اجرایی شود، آنچه که مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد، گزارشی است که باید مستند به مدارک بوده و اصول مستندسازی در آن رعایت شده باشد به‌طوری که در تمام مراجع رسیدگی کننده، کامل و قانع کننده باشد و امکان سوء استفاده را کاهش دهد [۴].

در شکل (۱) مدل مفهومی از چگونگی اعتباربخشی به روش آزمایش آورده شده‌است.



شکل (۱): فرآیند اعتباربخشی به روش آزمایش [۲].

روش‌های آنالیز مواد مخدر و روانگردان

در آنالیز نمونه‌های مخدر باید از چند روش معتبر استفاده نمود به‌طوری که از ترکیب این روش‌ها با گروه‌های سه گانه موجود در جدول (۱) در صحت و دقت نتایج موثر باشد. گروه (الف) روش‌هایی هستند که بالاترین قدرت تشخیص را دارند. گروه (ب) شامل روش‌هایی است که قدرت تشخیص متوسطی دارند و گروه (ج) روش‌هایی هستند که پایین‌ترین قدرت تشخیص را دارند.

با توجه به روش‌های پیشنهادی سازمان‌های بین‌المللی مبارزه با مواد مخدر، برای آنالیز مواد مخدر باید از روش‌هایی

فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۲

که بالاترین قدرت تشخیص را دارند، استفاده نمود. به‌عنوان مثال، اگر از روش گروه (الف) استفاده می‌شود، باید حداقل یکی از سه روش دیگر را نیز به‌منظور تایید به کار برد تا بتوان نتایج را با اطمینان بیشتری برای ارائه آماده کرد [۴ و ۹]؛ به‌عنوان مثال اگر در شناسایی کانابینوئیدها، از گروه (الف)، یکی از روش‌ها انتخاب شد، به‌منظور اعتباربخشی به نتایج و اطمینان از آن، می‌توان از روش کروماتوگرافی لایه نازک (از گروه (ب)) به‌عنوان یک روش معتبر، بهره برد.

جدول (۱): روش‌های آنالیز مواد مخدر و روانگردان [۴ و ۹].

نام گروه	روش‌های آنالیز
(الف)	طیف‌سنجی مادون قرمز، طیف‌سنجی جرمی، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای، طیف‌سنجی رامان.
(ب)	الکتروفورزهای مویین، کروماتوگرافی گازی[۱۷]، طیف‌سنجی تحرک یونی، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[۱۸]، کروماتوگرافی لایه نازک، آزمون میکروسکوپی.
(ج)	آزمون‌های رنگی، آزمون‌های ایمنی‌سنجی، نقطه ذوب.

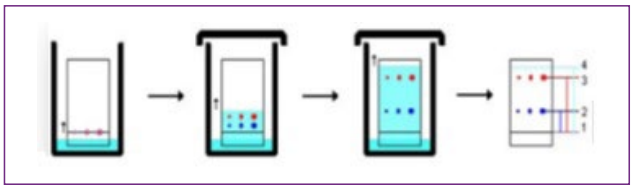
بسیاری از این روش‌ها نتایج قابل قبولی را ارائه می‌دهند. با این حال، هر روشی که به تازگی در آزمایشگاه استفاده می‌شود، باید قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شود [۲ و ۴].

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 و یا آلومین) استفاده می‌شود.

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، به‌صورت یک لایه نازک روی یک قطعه شیشه، پلاستیک و یا فلز پخش می‌شود. یک قطره از محلول نمونه معلوم و 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 به‌گونه‌ای 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. شکل (۲) چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک را نشان می‌دهد.



شکل (۲): چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک [۱۰].

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

در کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان از همان مواد جامدی که در کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود، به‌عنوان فاز ساکن استفاده کرد که در این میان، سیلیکا و آلومینا بیشترین کاربرد را دارند. 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 [۱۰].

مزایای کروماتوگرافی لایه نازک

- کاربرد ساده داشته و نیاز به تجهیزات اندک دارد؛
- قابلیت جداسازی و شناسایی مقادیر ناچیز مواد را داراست؛
- زمان انجام آزمایش کوتاه است؛
- می‌توان چندین نمونه را همزمان آزمایش کرد؛
- از فازهای ثابت و متحرک متنوع می‌توان استفاده کرد؛
- از معرف‌های ظاهر کننده متنوع می‌توان استفاده کرد.

معایب کروماتوگرافی لایه نازک

- حساسیت آن کمتر از روش‌های HPLC، GC و طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی (GC-MS)؛
- دقت و صحت آن کمتر از روش‌های ذکر شده است [۹].

کاربرد کروماتوگرافی لایه نازک در شناسایی کانابینوئیدها

کروماتوگرافی لایه نازک، روشی رایج برای جداسازی و شناسایی مواد مخدر است. این روش در انتخاب هر دو فاز ثابت و متحرک، ارزان، سریع و منعطف است و در برابر طیف گسترده‌ای از مواد، از قطبی‌ترین تا غیرقطبی‌ترین مواد، قابل استفاده است. در این نوع کروماتوگرافی، پلاریته[۲۰] اهمیت

زیادی دارد [۹ و ۱۰]. کروماتوگرافی لایه نازک، شناسایی اجزای تشکیل دهنده یک ماده مخدر را در کنار استفاده از ماده مخدر استاندارد مرجع، فراهم می‌کند. از این روش، برای تعیین ماهیت ماده مخدر، در ترکیب با سایر روش‌های آنالیز، استفاده می‌شود.

چندین روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تجزیه و تحلیل کیفی و نیمه کمّی کانابیس‌ها، با استفاده از انواع مختلفی از فاز ثابت (صفحات کروماتوگرافی لایه نازک[۲۱])، روش‌های آماده‌سازی نمونه، فاز متحرک (سیستم‌های حلال) و روش‌های تصویرسازی و یا آشکارسازی لکه‌ها وجود دارد [۱۰].

موادی که به هنگام لکه‌گذاری روی صفحه قرار داده می‌شوند، پس از تفکیک شدن روی آن باقی‌مانده و در نهایت، درصورت به کارگیری آشکارسازهای مناسب، قابل شناسایی و مشاهده خواهند بود [۹].

▣ صفحات TLC (فاز ثابت)

◆ **پوشش:** سیلیکاژل جی[۲۲]، با ضخامت لایه ۰/۲۵ میلی‌متر و حاوی نشانگر بی‌اثر که در زیر نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر فلورسانس می‌کند (سیلیکاژل جی با نشانگر فلورسانس ۲۵۴ نانومتر[۲۳]).

◆ **اندازه صفحات:** ۲۰ در ۲۰ سانتی‌متر (با قابلیت دو نیم شدن)، ۱۰ در ۲۰ سانتی‌متر، ۵ در ۱۰ سانتی‌متر (مورد دوم باید از سمت ضلع ۱۰ سانتی‌متری عمود بر مخزن TLC استفاده شود).

☑ **نکته:** صفحات کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا[۲۴] نیز می‌توانند استفاده شوند. این صفحات، یک جاذب سیلیکاژل ۶۰ بهینه شده با اندازه ذرات ۵ تا ۶ میکرومتر در مقایسه با ذرات ۱۰ تا ۱۲ میکرومتری مورد استفاده در کاغذهای TLC معمولی دارند و آنالیز سریع و با حساسیت بالاتری را ارائه می‌دهند.

صفحات آماده شده به‌منظور فعال‌سازی، باید قبل از استفاده، توسط کارشناس آزمایشگاه، به مدت حداقل ۱۰ تا ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شوند (لازم به ذکر است، فعال‌سازی حرارتی برای صفحات بسته‌بندی شده تجاری، مورد نیاز نیست). سپس صفحات در یک دسیکاتور روی سیلیکاژل نارنجی نگهداری شوند. از سیلیکاژل آبی نیز می‌توان استفاده نمود.

◆ هشدار ایمنی: هنگام استفاده از سیلیکاژل آبی حاوی کلرید کبالت (II) به دلیل سرطان‌زا بودن، مسایل ایمنی مورد توجه قرار گیرد.

▣ فاز متحرک TLC

با استفاده از پیپت‌ها، دیسپنسرها و سیلندرهای اندازه‌گیری، فاز متحرک را مطابق با دستورالعمل‌های زیر، تا حد امکان به‌صورت دقیق آماده کنید. فاز متحرک باید به مدت کافی در مخزن TLC بماند تا اشباع فاز بخار قبل از آنالیز به‌دست آید (با مخازن با استفاده از پوشش کاغذ جاذب، به‌طور تقریبی ۵ دقیقه طول می‌کشد).

■ روش‌ها

روش‌های شرح داده شده در زیر به‌صورت میدانی در آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر، آزمایش شده و برای هدف مناسب هستند.

روش اول:

در روش اول، از فاز ثابت صفحه سیلیکاژل HPTLC ۱۰ در ۱۰ سانتی‌متری، استفاده شده‌است و سه نوع فاز متحرک مختلف به شرح جدول (۲) پیشنهاد شده‌است. به‌عنوان مثال برای تهیه فاز متحرک (۱) به میزان ۲۰ میلی‌لیتر (با توجه به ظرفیت تانک) باید ۱۶ میلی‌لیتر پترولیوم اتر ۹۰/۶۰ و ۴ میلی‌لیتر از دی اتیل اتر درون تانک اضافه شود.

◆ فاز متحرک پیشنهادی(۳) فقط برای شناسایی کانابینوئید اسیدها مناسب است.

جدول (۲): فازهای متحرک پیشنهادی برای روش اول [۶ و ۱۱].

نوع صفحه TLC: صفحه سیلیکاژل HPTLC ۱۰ در ۱۰ سانتی‌متری آنالیز		
فاز متحرک پیشنهادی (۱)	پترولیوم اتر ۹۰/۶۰	۸۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل اتر	۲۰ درصد حجمی/حجمی
فاز متحرک پیشنهادی (۲)	سیکلوهگزان	۵۲ درصد حجمی/حجمی
	دی ایزوپروپیل اتر	۴۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل آمین	۸ درصد حجمی/حجمی
فاز متحرک پیشنهادی (۳) (برای کانابینوئید اسیدها)	ان هگزان	۷۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اکسان	۲۰ درصد حجمی/حجمی
	متانول	۱۰ درصد حجمی/حجمی

روش دوم:

در روش دوم، فاز ثابت صفحه پلاستیکی TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254)، ۱۰ در ۲۰ سانتی‌متری، با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر استفاده شده‌است. با توجه به جدول (۳)، یک نوع فاز متحرک برای این نوع فاز ثابت، مناسب تشخیص داده شده‌است.

جدول (۳): فاز متحرک پیشنهادی برای روش دوم [۶].

نوع صفحه TLC: صفحه پلاستیکی TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254)، ۱۰ در ۲۰ سانتی‌متری، با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر.		
فاز متحرک پیشنهادی (۴)	تولوئن	۹۷ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل آمین	۳ درصد حجمی/حجمی
مدت زمان توسعه فاز: به‌طور تقریبی، ۱۰ دقیقه.		

در واقع تفاوت اصلی روش اول و دوم در فاز ثابت است که سه فاز متحرک برای روش اول و یک فاز متحرک برای روش دوم، در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر مورد آزمایش قرار گرفته و بهینه تشخیص داده شده‌است.

آماده‌سازی نمونه

اگر هدف از انجام آزمایش، کیفی باشد (برای تایید شواهد میکروسکوپی یا ماکروسکوپی مبنی بر وجود کانابینوئیدها در ماده مشکوک)، همگن کردن مواد گیاهی لازم نیست و فقط آن قسمت‌هایی از گیاه شاهدانه که دارای بالاترین میزان کانابینوئید هستند، باید برای استخراج انتخاب شوند (قسمت‌های گل دهنده و سرشاخه‌های گیاه).

مقادیر مناسب نمونه برای استخراج، به‌طور تقریبی به شرح زیر است:

- اگر نمونه از گیاه شاهدانه باشد، حدود ۵۰۰ میلی‌گرم؛
- اگر نمونه صمغ حشیش باشد، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم؛
- اگر نمونه از روغن گیاه شاهدانه باشد، حدود ۵۰ میلی گرم.

استخراج باید به صورتی انجام شود که غلظت تترا هیدرو کانابینول موجود در محلول نهایی، حدود ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باشد.

نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر حلال، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای اتاق با استفاده از همزن یا در دستگاه اولتراسونیک استخراج و ماده استخراج شده قبل از کروماتوگرافی فیلتر شود. استخراج غیرفعال، با مخلوط نمونه/حلال در حالت ایستاده نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. فیلتراسیون می‌تواند انجام شود اما ضروری نیست؛ استفاده از مایع رویی نیز می‌تواند نتایج معتبری را به ما ارائه دهد. به‌منظور تعیین ماهیت ماده مخدر، مقادیر کمتر حلال و نمونه، کافی هستند. با این حال، هر گونه اصلاح در روش توصیف شده، باید توسط کارشناس آزمایشگاه، اعتباربخشی و تایید شود.

از آنجا که کانابینوئیدها به راحتی در بیشتر حلال‌های آلی همچون متانول، پترولیوم اتر، ان-هگزان، تولوئن، کلروفرم و حلال‌های ترکیبی همچون متانول:کلروفرم (۹: ۱ حجمی/حجمی) حل می‌شوند؛ بنابراین، برای استخراج آن‌ها مناسب هستند. با این حال، حلال‌های غیر قطبی مانند ان-هگزان و پترولیوم اتر، استخراج بهتری را صورت می‌دهند؛ اما از لحاظ کمّی، فقط کانابینوئیدهای خنثی (آزاد) را استخراج می‌کنند، در حالی که دیگر حلال‌ها و حلال‌های ترکیبی، استخراج کانابینوئید اسیدها را به‌صورت کمّی، بهتر انجام می‌دهند.

به‌منظور تحلیل کیفی، استفاده از پترولیوم اتر برای استخراج کانابینوئیدهای اصلی کافی است، در حالی که برای اهداف کمّی و تعیین میزان تترا هیدرو کانابینول، دیگر حلال‌ها یا حلال‌های ترکیبی باید استفاده شوند.

محلول‌های استاندارد

محلول‌های استاندارد باید با غلظت به‌طور تقریبی ۰/۵ میلی‌گرم کانابینوئید در هر میلی‌لیتر، در متانول تهیه و در یک مکان خنک و تاریک نگهداری شوند.

لکه‌گذاری و توسعه فاز متحرک

۱ تا ۵ میکرولیتر از محلول نمونه، ۲ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و ۲ میکرولیتر حلال خالی (برای انجام کنترل منفی) به‌عنوان نقاط جداگانه روی صفحه TLC لکه‌گذاری کنید. توصیه می‌شود که حلال خالی را هم‌زمان اجرا کنید تا نشان دهید که حلال مورد استفاده برای استخراج نمونه، حاوی کانابینوئید نیست. لکه‌گذاری نیز باید به دقت انجام شود تا از آسیب رساندن به سطح صفحه TLC جلوگیری شود.

نکات مهم آنالیزی:

- نقطه شروع اجرا (خط لکه‌گذاری) باید ۲ سانتی‌متر از کف صفحه باشد.(به‌منظور آسان‌گیری الزامات آنالیزی، فاصله ۱ سانتی‌متر هم کفایت می‌کند و به‌صورت میدانی آزمایش شده و مناسب هدف است).
- فاصله بین نقاط لکه‌گذاری باید حداقل ۱ سانتی‌متر باشد و نقاط نباید به لبه کناری صفحه، نزدیک‌تر از ۱/۵ سانتیمتر قرار گیرند.
- برای اجتناب از لکه‌های پراکنده در طول توسعه فاز متحرک، اندازه لکه نمونه باید تا حد ممکن کوچک باشد (شعاع حدود ۲ میلی‌متر).
- اجازه دهید نقاط، خشک شوند و صفحه را در یک مخزن اشباع از حلال قرار دهید. (اشباع فاز بخار با استفاده از صفحات اشباع شده با حلال یا کاغذ صافی به‌عنوان پوشش مخزن، حاصل می‌شود.)
- حلال موجود در مخزن باید پایین‌تر از خط لکه‌گذاری باشد.
- هنگامی که حلال به خط توسعه (۱۰ سانتی‌متر از خط شروع) که از قبل مشخص شده‌است، رسید؛ به سرعت، صفحه را از تانک TLC خارج کنید. در غیر این صورت، لکه‌های پراکنده ایجاد می‌شود.

تصویرسازی/آشکارسازی

صفحات باید قبل از تصویرسازی خشک شوند. این کار را می‌توان در دمای اتاق و یا با استفاده از خشک کن، آون یا هوای گرم انجام داد. در موارد گفته شده، باید مراقب بود که هیچ یک از اجزاء مورد نظر، در معرض تجزیه حرارتی قرار نگیرند. در این مواقع، استفاده از هود توصیه می‌شود.

روش‌های تصویرسازی/آشکارسازی

■ (الف): نور ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر

لکه‌های تیره در پس‌زمینه سبز، مشاهده می‌شوند. دور لکه‌ها را خط کشیده (با یک مداد) و درصورت لزوم، یک عکس دیجیتال از آن گرفته شود.

■ (ب): اسپری کردن معرف

از فست بلو سالت B[۲۵] یا فست بلو سالت BB و همچنین فست بلو سالت RR برای تهیه اسپری معرف مطابق با جدول (۴)، استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال: برای تهیه معرف (۱) ۵۰ میلی‌گرم از فست بلو سالت B به ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال اضافه نموده و روی کاغذ TLC اسپری می‌نماییم.

جدول (۴): دستورالعمل تهیه اسپری معرف [۶ و ۱۱].

معرف (۱)	فست بلو سالت B	۵۰ میلی‌گرم در ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال
معرف (۲)	فست بلو سالت B	۵۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب و سپس ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شود.
معرف (۳)	فست بلو سالت BB	۲۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر آب و بلافاصله اضافه کردن حدود ۳ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲/۵ مولار
معرف (۴)	فست بلو سالت RR	۵۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول (و یا متانول:آب (۱:۱))

☑ **نکته**: زمانی که از فست بلو سالت BB و فست بلو سالت RR استفاده می‌شود، تهیه روزانه اسپری معرف، لازم نیست .

اگر نیاز است صفحه TLC، با نتایج آنالیز، در پرونده‌ای ثبت و نگهداری شوند، می‌توان از توالی محلول پاشی (به‌صورت اسپری) مانند دی اتیل آمین - محلول فست بلو سالت B - دی اتیل آمین استفاده کرد. سپس با خشک کردن صفحه TLC با هوای داغ یا نگهداری آن به مدت یک شب در دمای اتاق، می‌توان آن را در کیسه‌های پلاستیکی شفاف، مهر و موم نموده و بدون تیره شدن، برای مدت طولانی نگهداری نمود.

نکات مهم آنالیزی

◆ برای ایجاد رنگ مناسب، صفحه TLC باید قلیایی باشد. بنابراین، باید قبل از استفاده از معرف (۲)، دی اتیل آمین روی صفحه اسپری شود.

◆ صفحه TLC نباید با محلول پاشی مرطوب شود؛ زیرا ممکن است موجب پخش شدن لکه‌ها شود.

◆ به دلیل سرطان‌زا بودن فست بلو سالت B، اقدامات ایمنی مناسب در هنگام استفاده، مدنظر قرار گیرد. فست بلو سالت BB و فست بلو سالت RR جایگزین‌های مناسبی برای فست بلو سالت B هستند؛ اگرچه هر دو، واکنش آهسته‌تری دارند. لازم به ذکر است، فست بلو سالت B، لکه‌های پر رنگ و واضح‌تری می‌دهد.

نتایج (تفسیر)

پس از تصویرسازی، دور لکه را خط بکشید (مثلا با مداد) و مقدار R_f هر لکه را با استفاده از رابطه (۱) محاسبه نمایید:

رابطه (۱)

$$Rf = \frac{\text{فاصله مهاجرت: از مبدا تا مرکز لکه}}{\text{فاصله توسعه: از مبدا تا محل پیشروی حلال}}$$

نتایج جدول (۵) (مقادیر $R_f \times ۱۰۰$) برای فازهای پیشنهادی (۱)، (۲) و (۳) به استفاده از روش‌هایی که در آنها از صفحات HPTLC استفاده شده‌است، اشاره می‌کند. صفحات معمولی ۲۰ سانتی‌متر در ۲۰ سانتی‌متر با ضخامت لایه سیلیکاژل ۰/۲۵ میلی‌متر، فاصله قابل قیاس با هم دارند، اما مقادیر R_f مربوطه باید محاسبه شوند. فاز پیشنهادی (۳)، تنها برای جداسازی و شناسایی کانابینوئیک اسیدها توصیه می‌شود. این روش، جداسازی CBN، THC و CBD را به خوبی انجام نمی‌دهد.

جدول (۵): مقادیر $R_f \times ۱۰۰$ کانابینوئیدها اصلی با استفاده از روش‌های بالا [۶].

ماده	فازهای متحرک و مقادیر $R_f \times ۱۰۰$			
	فاز متحرک پیشنهادی (۱)	فاز متحرک پیشنهادی (۲)	فاز متحرک پیشنهادی (۳)	فاز متحرک پیشنهادی (۴)
کانابینول[۲۶] (CBN)	۳۳	۲۶	۴۷	۲۸
تترا هیدرو کانابینول (THC)	۳۷	۳۸	۴۹	۳۵
کانابیدول (CBD)	۴۲	۴۲	۴۷	۴۱
تترا هیدرو کانابینولیک اسید[۲۷] (THCA)	۶	*	۳۶	*

دانش آزمایشگاهی ایران سال یازدهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۲

آنالیز نیمه کمّی گیاه شاهدانه با استفاده از TLC

نکات مهم آنالیزی

- مقادیر R_f همیشه به دلیل تغییرات کوچک در ترکیب صفحه TLC و فعال‌سازی آن، فاز متحرک، اشباع مخزن یا فاصله توسعه فاز متحرک، تکرارپذیر نیستند. این مقادیر، همچنین وابسته به شرایط آزمایشگاهی (دما، رطوبت و غیره) دستخوش تغییرات هستند. بنابراین، مقادیر R_f ارائه شده، نشانه‌هایی از رفتار کروماتوگرافی مواد فهرست شده هستند.
- ضروری است که استانداردهای مرجع به‌طور هم‌زمان در یک صفحه اجرا شوند.
- برای اهداف شناسایی، هم مقدار R_f و هم رنگ لکه‌ها، بعد از اسپری با معرف‌های تصویرساز، باید همیشه در کنار هم بررسی و در نظر گرفته شوند.

در برخی موارد ممکن است برآورد سریع غلظت تترا هیدرو کانابینول نمونه شاهدانه مفید باشد. این کار را می‌توان با استفاده از مقایسه لکه‌های نمونه و محلول استاندارد انجام داد. در ذیل مثالی برای این مورد ذکر شده‌است:

- تهیه نمونه شاهدانه
  - ✓ وزن گیاه شاهدانه نمونه‌برداری شده: ۵۰۰ میلی‌گرم؛
  - ✓ حجم حلال مورد استفاده برای استخراج: ۱۰ میلی‌لیتر؛
  - ✓ حجم نمونه اعمال شده بر صفحه TLC: ۱ میکرولیتر.
- آماده‌سازی محلول استاندارد THC
  - ✓ غلظت استاندارد THC: ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛
  - ✓ حجم محلول استاندارد اعمال شده بر صفحه TLC: سه نقطه مختلف به حجم ۱، ۲ و ۳ میکرولیتر.

شدت لکه نمونه را با لکه‌های غلظت‌های مختلف محلول استاندارد THC مقایسه کنید. اگر لکه نمونه دارای شدت رنگ مشابهی به اندازه لکه استاندارد ۳ میکرولیتری THC باشد، محتوای THC خنثی، در نمونه شاهدانه را می‌توان با استفاده از رابطه‌های (۲) و (۳) برای ۳ میکرولیتر محلول استاندارد THC (به‌عنوان مثال) به‌صورت زیر برآورد نمود:

رابطه (۲)

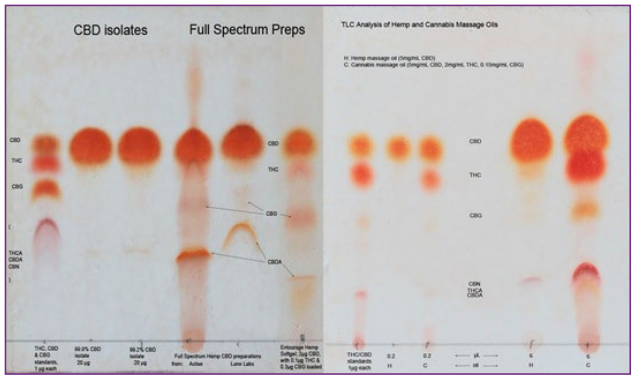
$$\frac{\text{غلظت } THC \text{ در لکه نمونه} \times \text{حجم حلال مورد استفاده برای استخراج} \times 100\%}{\text{وزن گیاه شاهدانه نمونه برداری شده}}$$

رابطه (۳)

$$\frac{\left(0.5 \text{ میلی گرم بر میلی لیتر} \times 3\right) \times 10 \text{ میلی لیتر} \times 100\%}{500 \text{ میلی گرم}} = \%3$$

استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت

کاربرد روش‌های شناسایی اجزای مخدر و روانگردان در مواد مختلف، فقط مختص آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پلیس، پزشکی قانونی و سیستم قضایی کشورهای مختلف نیست، بلکه در صنعت مواد آرایشی و بهداشتی، تولید دارو و غیره نیز کاربرد دارد. در شکل (۳) کاربرد روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت مواد آرایشی و بهداشتی ارائه شده‌است:



شکل (۳): استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت [۱۲].

نتیجه‌گیری

با توجه به الزام پیاده‌سازی فرآیند اعتباربخشی در آزمایشگاه، باید روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک، برای آنالیز کانابیس‌ها، با توجه به هدف انجام آزمایش، قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شوند.

در روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک اعتباربخشی شده در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر و در بین فازهای متحرک پیشنهادی، فاز متحرک پیشنهادی شماره (۳)، فقط برای شناسایی کانابینوئیک اسیدها مناسب است و از سه روش پیشنهادی دیگر می‌توان برای جداسازی کانابینول، تترا هیدرو کانابینول و کانابیدول بهره برد. برای جداسازی مطلوب آنها، استفاده از صفحات TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254) نتیجه بهتری را در پی دارد.

روش‌های شناسایی مواد مخدر و روانگردان مختص آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر نیست؛ به دلیل اینکه این آزمایشگاه‌ها، منبع کلیدی اطلاعات و داده‌های علمی معتبر و قابل اعتماد در زمینه آنالیز مواد مخدر هستند، از ظرفیت اطلاعاتی آنها در صنعت نیز می‌توان استفاده نمود.

پی‌نوشت

1. New psychoactive substances (NPS)
2. Cannabis
3. Tetrahydrocannabinol(THC)
4. Isomer
5. Stereochemical
6. Cannabidiol(CBD)
7. Δ9-THC
8. Δ8-THC
9. Cannabis sativa L. (Linnaeus)
10. The genera Cannabis and Humulus (hops)
11. Cannabaceae
12. C. sativa subsp. sativa
13. C. sativa subsp. indica
14. C. sativa subsp. ruderalis
15. C. sativa subsp.spontanea
16. C. sativa subsp. Kafiristanca
17. Gas chromatography (GC)
18. High-performance liquid chromatography (HPLC)
19. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)
20. Polarity
21. Thin Layer Chromatography (TLC)
22. Silica gel G
23. Silica gel GF254
24. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)
25. Fast Blue B
26. Cannabinol (CBN)
27. tetrahydrocannabinolic acid (THCA)

مراجع

[1] Cummings J, Ward TH, Greystoke A, Ranson M, Dive C. Biomarker method validation in anticancer drug development. Br J Pharmacol. 2008;153(4):646–656. Doi: 10.1038/sj.bjp.0707441.

[2] B.Magnusson & U.Ornemark (eds.)Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

[۳] شیرزادی، زهرا (۱۳۹۵)، معرفی انواع پارامترهای اعتبارسنجی روش‌های آزمایشگاهی و داده‌های لازم برای آن، چهارمین همایش ملی شیمی، پتروشیمی و نانو ایران، تهران، httpc://civilica.com/doc/587448

[۴] فیض‌بخش، روح‌اله (۱۳۹۷). گزارش کارگاه آموزشی اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه آنالیز مواد مخدر، تهران: پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا.

[5] Martin Raithelhuber, Sabrina Levissianos, Joao Rodrigues: The role of drug analysis laboratories in Early Warning Systems,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2020

[6] Iphigenia Naidis & Conor Crean:Recommended Methods for the IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANNABIS AND CANNABIS PRODUCTS,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2022

[7] Barbara Remberg:Recommended Methods for the IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANNABIS AND CANNABIS PRODUCTS,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2009

[۸] صفوی، زهرا (۱۳۹۸). آشنایی با ماده اعتیاد آور «گل» و عوارض و اثرات سوء مصرف آن. فصلنامه علمی مطالعات مبارزه با مواد مخدر، ۱۱(۴۳). ۶۶-۴۷.

[۹] قربانی، ابراهیم (۱۳۹۶)، روش‌های نوین کشف و آنالیز قانونی مواد مخدر و روانگردان، فصلنامه مطالعات مبارزه با مواد مخدر، ۹(۳۴). ۴۵-۳۵.

[۱۰] حسین‌زاده اقدم، وحید؛ محمدی، نرگس (۱۳۹۵). کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا. فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران،۴(۱۶). ۱۴-۵.

[۱۱] کارشناسان پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا (۱۳۹۷). دانشنامه تخصصی مواد مخدر(جلد اول)، تهران: پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا.

[12] https://mslavenda.com/tlcanalysis.htm

Validation of the results in the drug detection and analysis laboratories; Identification of cannabinoids by thin layer chromatography

Authors

Asghar Eftekhari[1*]
Ebrahim Ghorbani[2], Reza Saghi[3]

*dr.ef.2003@gmail.com

1. phd. chemistry, chairman of the department of Anti-Narcotics, Amin Police Comrehensive Science University.

2. Master of Chemistry, lecturer and member of the anti-narcotics scientific group, Amin Police Comrehensive Science University.

3.Master's student in the field of the anti-narcotics, Amin Police Comrehensive Science University.

Abstract

Thin layer chromatography is a common technique for the separation and identification of drugs. There are several thin layer chromatography methods for the qualitative and semi-quantitative analysis of cannabis, using a variety of stationary and mobile phases, sample preparation methods, and spot Visualization/detection techniques. However, any method that is newly applied in the laboratory should be tested before routine use; Be validated and approved.

Keywords

Validation, cannabinoids, Tetrahydrocannabinol, Thin layer chromatography, The Drug Detection and Analysis Laboratories.

Iran Nanotechnology Laboratory Network

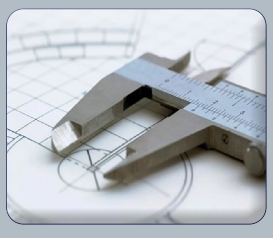
Iranian Journal of laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

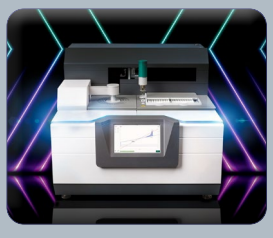
Volume 11 ■ Issue 2 ■ Summer 2023 ■ No.42

Utilization of Transmission Electron Microscopy for development, analysis, and failure detection in semiconductor industry

Uncertainty in the sampling process

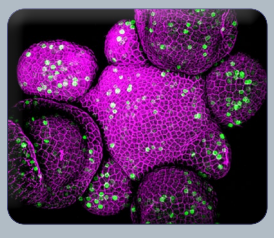


Determining and evaluating sources of uncertainty in the Charpy impact test



Determining the purity of materials using a differential calorimetry device

Determination of modulus of elasticity based on plate load test (PLT) results – case study



Fluorophores for Confocal Microscopy (part 2)

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir