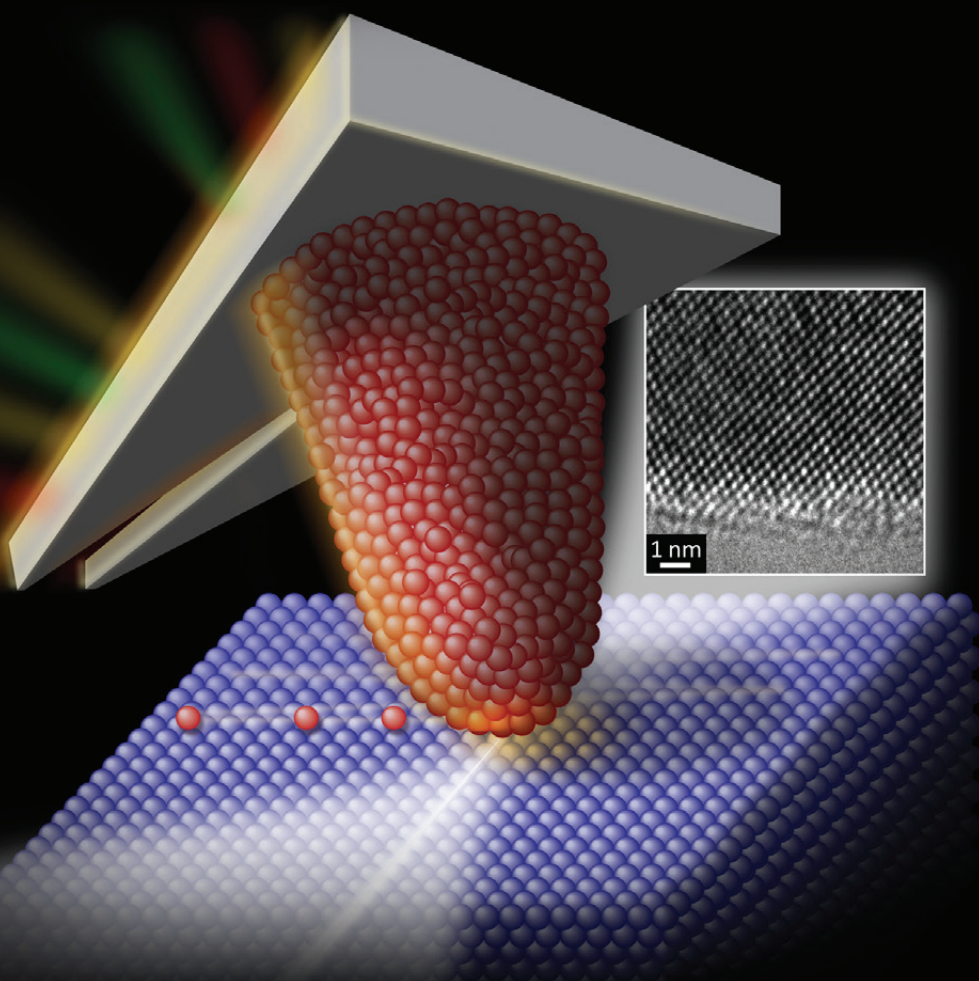
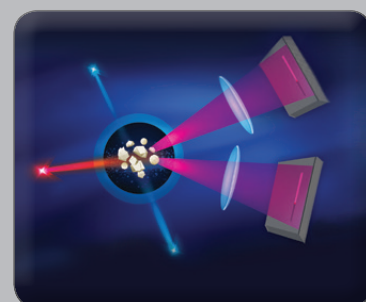


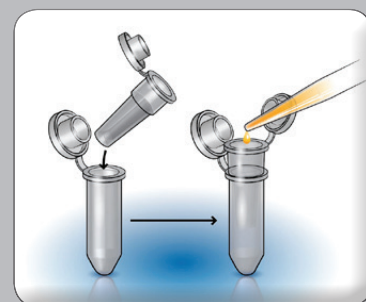
## میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی و بررسی مورفولوژی و خواص الکتریکی سطح



مراحل ضروری در فراهم آوردن نتایج قابل اعتماد با استفاده از چرخه تضمین کیفیت تحلیلی



تئوری پتانسیل زتا و چگونگی کارکرد دستگاه تفرق نور پویا در اندازه‌گیری پتانسیل زتا



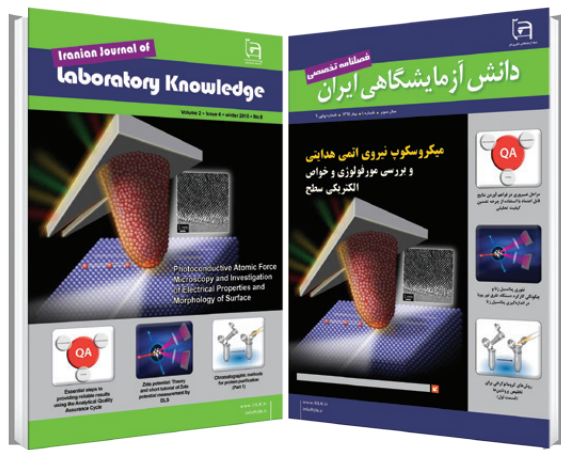
روش‌های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌ها (قسمت اول)





و این ماه رمضان است همان ماهی که قرآن در آن نازل شده است  
آن قرآنی که راهنمای مردم و نشانه روشنی از هدایت و جدا ساختن  
(حق از باطل) است.





فصلنامه تخصصی

# دانش آزمایشگاهی ایران

سال سوم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۴ ■ شماره پیاپی ۹

## فهرست مطالب

اخبار

سومین نمایشگاه تجهیزات و مواد آزمایشگاهی ساخت ایران برگزار شد

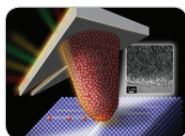
۲ <

استاندارد



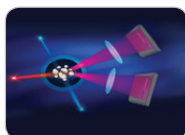
اندازه‌گیری ضخامت پوشش با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی

۴ <



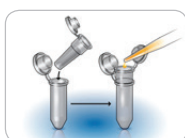
میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی و بررسی مورفولوژی و خواص الکتریکی سطح

۵ <



تئوری پتانسیل زتا و چگونگی کارکرد دستگاه تفرق نور پویا در اندازه‌گیری پتانسیل زتا

۱۴ <



روش‌های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌ها (قسمت اول)

۲۱ <



مراحل ضروری در فراهم آوردن نتایج قابل اعتماد با استفاده از چرخه تضمین کیفیت تحلیلی

۲۷ <

صاحب امتیاز: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

سرمدبیر: رضا اسدی فرد

مدیرمسئول: مجتبی نسب

مدیریت اجرایی: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

دبیر مقالات: داود قرایلو

همکاران این شماره: بیتا فریدنیا، عبدالحمید هاتفی، مهرجردی، سحر طیب‌طاهر، صدیقه صادق حسنی، داود قرایلو، ساسان مرادده، مریم یوسفی، مهدی محمدی، محمود نادری، بی‌بی سمیه میرجلیلی، سمیه جلیل‌زاده، علی حمزه‌بیگی، معصومه معدنی پور

طراحی و صفحه آرایی: سیمین رفیع پور لنگرودی

ویراستاران: زینب زرینچه، محمود نادری

نشانی: تهران . صندوق پستی ۳۴۴-۱۴۵۶۵

تلفن: ۰۲۱ ۶۳۱۰۳۴۵۱

پایگاه اینترنتی: [www.IJLK.ir](http://www.IJLK.ir)

پست الکترونیکی: [info@ijlk.ir](mailto:info@ijlk.ir)



شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

مقالات



## سومین نمایشگاه تجهیزات و مواد آزمایشگاهی ساخت ایران برگزار شد

دائمی نمایشگاه‌های بین‌المللی تهران برگزار شد. این نمایشگاه به عنوان یکی از شاخص‌ترین رویدادها در حوزه تجاری‌سازی فناوری، از چهار جنبه فرهنگی، اقتصادی، آموزشی و پژوهشی و بهره‌وری و کیفی در حوزه علم و فناوری کشور تأثیرگذار است. از جمله فعالیت‌های جانبی این نمایشگاه نیز، می‌توان به برگزاری کارگاه‌های آموزشی تخصصی دستگاهی به منظور ارتقای میزان آگاهی و دانش کارشناسان آزمایشگاه‌ها و همچنین محققین علاقه‌مند به علوم آزمایشگاهی، اشاره کرد.

همچنین امسال به منظور تسهیل در جستجو بین شرکت‌ها و محصولات و اطلاعات آنها، نرم‌افزار ویژه تلفن همراه نیز طراحی و رایج شد. از مشخصات این نرم‌افزار می‌توان به بانک اطلاعات شرکت‌های تولیدکننده تجهیزات، بانک اطلاعات تجهیزات و مواد آزمایشگاهی، امکان رویت نقشه نمایشگاه و جانمایی غرفه‌ها در سالن‌ها، امکان مشاهده آخرین اخبار و برنامه کارگاه‌ها و رویت اطلاعیه‌های مهم نمایشگاه و غیره اشاره کرد.

از دیگر فعالیت‌های جنبی، حضور کریدور صادرات محصولات دانش‌بنیان اشاره کرد که می‌توان به در استانداردسازی محصولات و فراهم کردن بسترهای مناسب حضور در عرصه‌های بین‌المللی به شرکت‌های حاضر در نمایشگاه کمک کند.

از موارد قابل توجه دیگر در این نمایشگاه، حضور نمایندگان برخی از کشورهای همسایه مانند عراق، به ویژه دکتر عادل کثیر، معاون اول و مشاور وزیر علوم و تکنولوژی عراق بود که از نزدیک در جریان آخرین دستاوردهای دانش‌بنیان ایران قرار گرفتند.

با توجه به افزایش چشمگیر تولید تجهیزات و مواد آزمایشگاهی در کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری «نمایشگاه تجهیزات و مواد آزمایشگاهی ساخت ایران» را با هدف معرفی توانمندی‌های کشور در این زمینه، فراهم‌سازی بستری برای تبادل فناوری و هم‌افزایی سازندگان با یکدیگر، بازاریابی، حمایت از ایجاد زیرساخت‌های توسعه فناوری در دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی کشور و همچنین جذب حمایت‌های دولتی به سمت تولیدات داخلی و شرکت‌های دانش‌بنیان، برگزار می‌نماید.

هدف از این نمایشگاه، حمایت از اشتغال پایدار در شرکت‌های دانش‌بنیان، توسعه فناوری از طریق ایجاد کشش بازار برای توانمندسازی شرکت‌های تولیدکننده ایرانی از طریق حمایت از خرید تجهیزات، ترغیب دانشگاه‌ها و مراکز علمی و پژوهشی به استفاده از محصول ایرانی، کاهش وابستگی آزمایشگاه‌های داخلی به تجهیزات و مواد مصرفی وارداتی، تقویت شرکت‌های دانش‌بنیان در پاسخگویی به نیازهای کشور و ظرفیت‌سازی برای صادرات محصولات دانش‌بنیان در کشور است.

نمایشگاه تجهیزات و مواد آزمایشگاهی ساخت ایران در ده بخش موضوعی نفت و پتروشیمی، برق - الکترونیک - نرم‌افزار، عمران و ساختمان، مکانیک، شیمی و متالوژی، کشاورزی و محیط زیست، فیزیک پایه، تجهیزات عمومی آزمایشگاهی، مواد آزمایشگاهی، مهندسی پزشکی و زیست مواد و تجهیزات و ماشین‌آلات در حوزه فناوری‌های راهبردی برگزار می‌شود. پس از برگزاری دو دوره موفق این نمایشگاه، سومین دوره آن، از چهارم تا هفتم اردیبهشت ماه سال جاری در محل



تعلق می‌گیرد که در مجموع افزایش سقف تسهیلات نسبت به سال گذشته را نشان می‌دهد. سطح اول شامل ۲۳۰ محصول (۳٪) است و سطح دوم شامل ۱۰۶۰ محصول است (۱۵٪)، سطح سوم شامل ۴۹٪ محصولات است که بیشترین تراکم محصول را دارد و فناوری متوسط است. مابقی محصولات سطح چهارم را تشکیل می‌دهند.

این یارانه برای تمام دانشگاه‌ها، پژوهشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی وابسته به وزارتخانه‌های دولتی و سازمان‌های دولتی و همچنین آموزش و پرورش و پژوهش‌سراهای دانش‌آموزی بلاعوض است. برای دانشگاه‌های آزاد، پیام‌نور، جامع علمی و کاربردی و جهاد دانشگاهی هم ۲۰ درصد یارانه در نظر گرفته شده‌است. همچنین برای خریداران و مراکز تحقیق و توسعه خصوصی هم تا سقف ۷۰ درصد خریدشان، از طریق صندوق نوآوری و شکوفایی، تسهیلات با کارمزد پایین (۸٪) پرداخت می‌شود تا آن‌ها هم بتوانند از محصولات این نمایشگاه خرید کنند. خریداران تجهیزات و مواد آزمایشگاهی ساخت ایران تا سقف ۵۰۰ میلیون تومان تسهیلات لیزینگ دریافت خواهند کرد که این میزان معادل ۷۰٪ از قیمت نهایی محصول خواهد بود.

شایان ذکر است که امسال بیش از ۷۴۰۰ محصول شامل ۶۶۴۲ مدل دستگاه و ۷۵۹ مدل ماده آزمایشگاهی توسط ۳۱۱ شرکت در این نمایشگاه عرضه شد. در نتیجه‌ی استقبال بسیار خوب محققین و مراکز آزمایشگاهی از این نمایشگاه، در مجموع، بیش از ۲۶۶۰۰ فقره پیش فاکتور به مبلغی بیش از ۱,۶۳۰ میلیارد تومان سفارش از محصولات نمایشگاه ثبت شد.



از دیگر بازدیدکنندگان این نمایشگاه می‌توان دکتر اسحاق جهانگیری معاون اول رئیس جمهور، دکتر سورنا ستاری، معاون علمی و فناوری رئیس جمهور، دکتر محمد فرهادی، وزیر علوم تحقیقات و فناوری، حجت‌السلام والمسلمین سیدمحمدحسن ابوترابی‌فرد، نایب رئیس اول مجلس شورای اسلامی و دکتر بهزاد سلطانی، رئیس صندوق نوآوری و شکوفایی را نام برد.

در این دوره، حمایت‌ها و یارانه‌های اعطایی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری بر مبنای سطوح فناوری تجهیزات که توسط یک کمیته تخصصی مورد ارزیابی قرار گرفت، صورت می‌پذیرد. معیارهای ارزیابی هر محصول، ارتباط تجهیز یا ماده با کاربردهای آزمایشگاهی، الزام وجود مرجع فروش برای آن، داشتن حداکثر قیمت ۶۰ درصد قیمت نمونه خارجی، بررسی تأییدیه‌ها و مجوزهای دریافت شده برای تجهیز یا ماده مورد نظر در صورت وجود، است.

سطح‌بندی محصولات در چهار سطح و بر اساس سطح ذاتی فناوری و میزان بومی سازی محصول انجام شده است. منظور از فناوری مورد ارزیابی در بررسی محصولات، مجموعه دانش، مهارت، فرآیندها، سامانه‌ها، ابزارآلات و پژوهش‌ها برای طراحی، ساخت، استفاده، نگهداری و تحقیق و توسعه محصول است. هرچه میزان سطح فناوری محصول بالاتر باشد، تسهیلات بالاتری از سوی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری دریافت می‌کند؛ یعنی به خریداران دولتی محصولات سطح یک، ۵۰ درصد، محصولات سطح دو ۳۵ درصد، محصولات سطح سه ۲۰ درصد و محصولات سطح چهار ۱۰ درصد تخفیف



## اندازه‌گیری ضخامت پوشش با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی



نویسندگان

معصومه معدنی‌پور

mmadanipoor@gmail.com

۱. مرکز تحقیقات فرآوری مواد و معدنی ایران  
 عضو کارگروه تخصصی دستگاه‌های SEM  
 شبکه آزمایشگاهی

(ISO 9220:1988)

برای مشخص نمودن متوسط فاصله، باید اندازه‌گیری روی تصویر، حداقل در سه موضع که ۳mm از هم فاصله داشته باشند، تکرار شود.

### روش کار

تجهیزات عنوان شده بنا به کاربرد، مورد نیاز هستند. با همان شرایط تنظیمات دستگاه که برای کالیبراسیون استفاده شده و تصویربرداری شده، تهیه میکروگراف از نمونه آزمایشی باید انجام شود. مراحل (۱) و (۲) باید به ترتیب انجام شود:

(۱) زمانی که مرزهای پوشش‌ها به صورت واضح مشخص هستند، میکروگراف‌های متداول از استیج میکرومتری SEM و نمونه مورد آزمایش تهیه شود. اندازه‌گیری میکروگراف‌ها در طی تهیه تصویر با فاصله‌های ۰/۱ میلی‌متری با استفاده از یک آشکارساز صفحه پراش یا سایر وسایل، برای دستیابی به اندازه‌گیری‌های دقیق خطی، روی فیلم یا کاغذ انجام شود. چنانچه آماده‌سازی نمونه مناسب نباشد، ممکن است این کار عملی نشود.

(۲) برای اندازه‌گیری ضخامت پوشش، باید فاصله افقی بین نقطه عطف بخش‌های عمودی اسکن در مرزهای پوشش، اندازه‌گیری شود.

ضخامت با استفاده از معادله زیر محاسبه می‌شود:

$$d = l_m / y \times 1000$$

که در آن:

**d:** ضخامت پوشش به میکرومتر؛

**$l_m$ :** فاصله خطی به میلی‌متر روی میکروگراف؛

**y:** بزرگنمایی است.

در این استاندارد، روشی معرفی شده‌است که با استفاده از آن ضخامت موضعی پوشش‌های فلزی با تهیه مقطع عرضی، قابل بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی خواهد بود. این روش، مخرب بوده و عدم قطعیت کمتر از ۱۰ درصد یا ۰/۱  $\mu\text{m}$  را داراست. از این روش می‌توان برای اندازه‌گیری ضخامت‌های پوشش تا چند میلی‌متر استفاده نمود. البته در چنین ضخامت‌هایی استفاده از یک میکروسکوپ نوری (ISO1463) کاربردی‌تر است. براساس این استاندارد، تجهیزات مورد استفاده برای اندازه‌گیری ضخامت عبارتند از:

### ۱. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

دستگاه SEM باید دارای قدرت تفکیک در حد ۵۰ nm یا بهتر باشد.

### ۲. استیج میکرومتری

یک استیج میکرومتری یا چهارخانه، برای کالیبره کردن بزرگنمایی SEM مورد نیاز است. استیج میکرومتری یا چهارخانه مورد نظر، برای بزرگنمایی‌های مورد استفاده باید عدم قطعیت کمتر از ۵ درصد داشته باشد. استیج‌های مناسب موجود هستند. عملکرد دستگاه باید با استفاده از یک استیج میکرومتری یا چهارخانه و با تصویربرداری در شرایط یکسان، کالیبره شود. همچنین پایداری کالیبراسیون نیز باید در بازه‌های زمانی متناوب بررسی شود.

### روش اندازه‌گیری

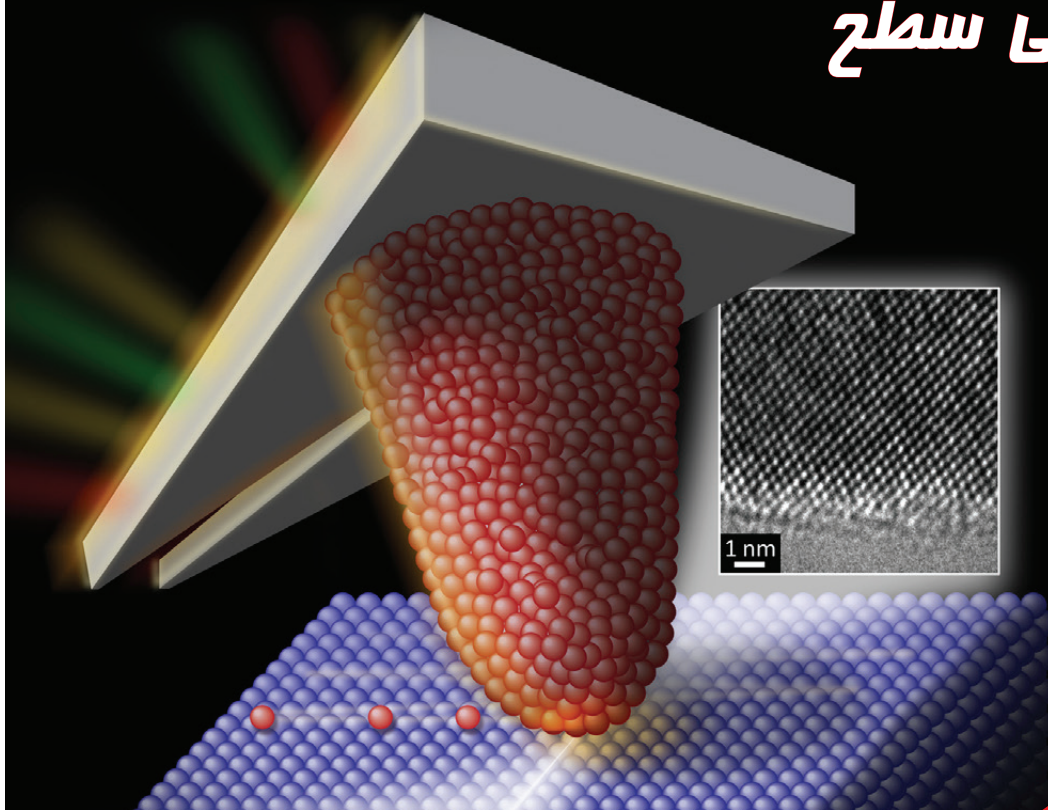
فاصله عمودی مرکز تا مرکز بین خطوط در تصویر باید هنگام تهیه تصویر با فاصله ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شود. می‌توان از یک آشکارساز صفحه پراش یا مانند آن استفاده نمود.

## نویسندگان

بینا فریدنیا<sup>۱</sup>، عبدالحمید هاتفیمهر جردی<sup>۲</sup>، سحر طیب طاهر<sup>۳</sup>صدیقه صادق حسنی<sup>۴</sup> \*

sadeghs@ripi.ir

# میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی و بررسی مورفولوژی و خواص الکتریکی سطح



## واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری، سلول‌های فتوولتاییک، سلول‌های خورشیدی آلی، میکروسکوپ نوری وارونه معکوس شده.

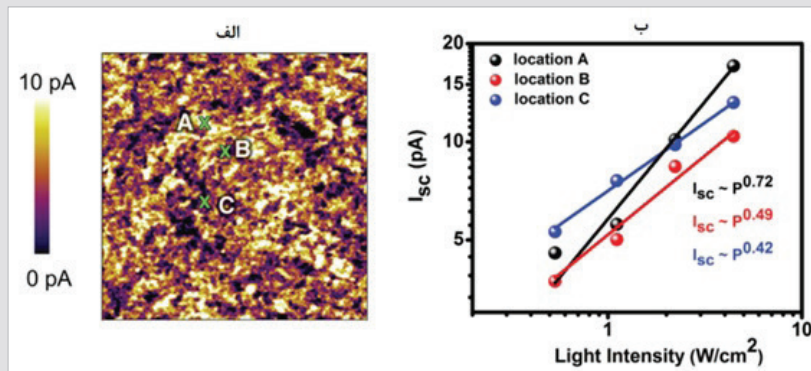
## چکیده

امروزه روش میکروسکوپ نیروی اتمی هدایت نوری (PC-AFM) <sup>۶</sup>، روشی شناخته شده، مؤثر و کاربردی برای مطالعه هم‌زمان مورفولوژی مواد در مقیاس نانو، بررسی خواص سطح و ابزاری مناسب برای به تصویر کشیدن ارتباط بین چگونگی عملکرد، خواص و ساختار است. این روش همانند دیگر روش‌های میکروسکوپی نیروی اتمی <sup>۷</sup> دستگاموری ویژه‌ای دارد. استفاده از یک منبع تابش و یک میکروسکوپ معکوس شده، این روش را از سایر روش‌های میکروسکوپی پروبی روبشی متمایز نموده است. روش میکروسکوپی نیروی اتمی هدایت نوری در بررسی نقل و انتقالات حفره - الکترون در سلول‌های فتوولتاییک و سلول‌های خورشیدی آلی استفاده می‌شود. البته این روش، نو و نیازمند تحقیق و توسعه بیشتر است.

هنری بکرل<sup>۸</sup> در سال ۱۸۳۹، نتایج تحقیقات خود را درباره اثر فتوولتاییک منتشر ساخت. بکرل زمانی که الکترودهای پلاتین در محلول آبی نقره کلرید و یا نقره برمید، غوطه‌ور بودند، تولید جریان فوتونی<sup>۹</sup> را بررسی نمود. در اوایل قرن بیستم، پوچتینو<sup>۱۰</sup> و ولمر<sup>۱۱</sup> ترکیب آبی آنتراسن که دارای خاصیت هدایت نوری است را مطالعه کردند و در اوایل سال‌های ۱۹۶۰، مطالعه رنگ‌های آلی مانند متیلن بلو زمانی آغاز شد که خاصیت فتوولتاییک در این رنگ‌ها مشاهده شد. با افزایش تقاضا برای استفاده از سلول‌های خورشیدی، مطالعات روی این منابع ارزان و پاک انرژی افزایش یافت. به همین منظور، مطالعه سلول‌های خورشیدی، با هدف کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی و گازهای گلخانه‌ای SO<sub>x</sub> و NO<sub>x</sub>، افزایش یافت [۱].

برای درک بهتر سازوکار اثر مورفولوژی بر انتقال و تولید بار در مقیاس نانو، به دستگاه‌ها و ابزارهای قدرتمند با قابلیت تصویربرداری مناسب نیاز است. پژوهشگران از روش‌های متعددی از جمله روش میکروسکوپی نیروی اتمی هدایتی<sup>۱۲</sup> برای این منظور استفاده کرده‌اند اما این روش قادر به ارائه اطلاعات، در مورد توزیع جریان‌های فوتونی در لایه‌های نازک آلی نیست. روش میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری، قادر به نشان دادن نقشه توزیع جریان فوتونی با توان تفکیک تقریبی ۲۰ nm است [۳ و ۲].

از دیگر ویژگی‌های برتر روش PC-AFM، جمع‌آوری اطلاعات از مقایسه جریان بین سوزن و نمونه با عوامل متفاوتی نظیر طول موج لیزر، ولتاژ اعمال شده و شدت نور است. همچنین این روش به‌عنوان روشی مناسب برای تشخیص اکسیداسیون سطحی موضعی با توان تفکیک عمودی ۸۰ nm است [۴]. با استفاده از روش PC-AFM، امکان مطالعه "مشخصات فیزیک نوری ماده" در مقیاس نانو با تغییر شدت نور لیزر نیز (شکل ۱) فراهم می‌شود [۲].



شکل ۱: تصویر جریان فوتونی مدار کوتاه. (الف) لایه نازک تهیه شده با استفاده از پروب سیلیکونی پوشش داده شده با طلا (ب) وابستگی شدت جریان ISC در سه نقطه A، B و C.

## تئوری و اصول اولیه روش PC-AFM

روش PC-AFM، براساس اصول اولیه میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM) طراحی شده‌است که با استفاده از روبش سطح نمونه با سوزن فلزی تیز و پردازش اطلاعات حاصل از حرکت پروب روی سطح نمونه و انحراف پرتو لیزر، بررسی کمی و کیفی سطح مواد میسر می‌شود.

در روش PC-AFM، جریان در فضای کوچک بین سوزن و سطح نمونه اندازه‌گیری می‌شود. این اندازه‌گیری کمی، تابع وابستگی جریان موجود در لایه‌های نازک نمونه است (رابطه ۱).

$$I = A_{eff} \left( \frac{q^* m.}{\lambda \pi h m_{eff}} \right) \left( \frac{1}{t(E^*)} \right) \left( \frac{\beta^* V^*}{\phi d^*} \right) e^{\left( \left( \frac{-(\lambda \pi)(\gamma q m_{eff})^*}{\tau h} \right)^* (v(E)) \left( \frac{d}{\beta V} \right) \left( \phi^* \right)^* \right)} \quad \text{رابطه (۱):}$$

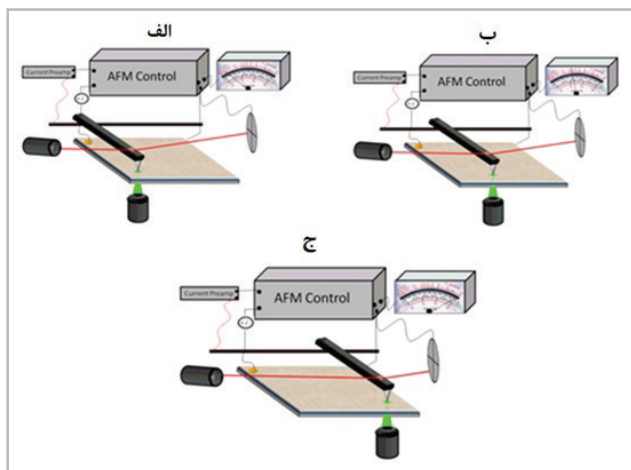


حلقه باز خورد<sup>۱۴</sup>

حلقه بازخورد، یکی از اصلی‌ترین اجزا در تنظیمات AFM است و در روش PC-AFM در حالت غیرتماسی، نقش بسیار با ارزشی را ایفا می‌کند. در حالت غیرتماسی، سوزن هیچ‌گونه تماسی با سطح نمونه پیدا نمی‌کند و تیرک با رزونانس مشخص نوسان می‌کند. عدم یکنواختی توپوگرافی سطح، باعث می‌شود که برای جلوگیری از برخورد سوزن با سطح نمونه، حلقه بازخورد، دامنه فرکانس و جهت حرکت نوسان تیرک را تغییر دهد [۵].

## منبع تابش

یکی از اصلی‌ترین تغییراتی که در روش میکروسکوپی نیروی اتمی هدایت نوری وجود دارد، استفاده از منبع تابش و یک میکروسکوپ معکوس شده است فاصله مجازی که پرتو لیزر را به‌طور مستقیم به قسمت زیرین سوزن متمرکز می‌کند. از یک منبع نوری تک رنگ کوچک و یک فیلتر لیزر استفاده می‌شود تا تصاویری از جریان فوتونی با بزرگنمایی عمودی در محدوده ۱۰۰-۱۰ پیکوآمپر تهیه شود [۶ و ۷]. زمانی که PC-AFM به یک منبع نوری قابل تنظیم تک رنگ مجهز شود، امکان بررسی مورفولوژی‌های پیچیده و ایجاد جریان فوتونی در تصویر را فراهم می‌کند [۸]. شکل (۲) نمایی از اساس کار این روش را نشان می‌دهد.



شکل ۲: مراحل روبش میکروسکوپی روی سطح لایه نازک با استفاده از روش میکروسکوپی PC-AFM به ترتیب (الف، ب و ج).

یکی از پرکاربردترین تنظیمات دستگاهی در روش PC-AFM، استفاده از یک منبع نور نشری در ناحیه مرئی به همراه یک لایه نیمه‌رسانا از جنس ایندیم قلع اکسید به‌عنوان کاتد است. در این روش، از پروب‌های سیلیکونی پوشش داده شده با طلا به‌عنوان آند استفاده می‌شود. این الکتروود که بار به نسبت کوچکی را حمل می‌کند، می‌تواند حفره‌هایی در مقیاس نانو درون نمونه ایجاد کند و به این ترتیب، این دو الکتروود قادر خواهند بود تغییرات کوچک هدایت که به جریان ابتدا تا انتهای الکتروود مربوط است را شناسایی کنند. در این حالت، لیزری با شدت ۱۰ تا ۱۰۸ وات بر متر مربع به‌وجود می‌آید و اندازه نقطه لیزر، زیر میکرون است (شکل ۳).

در این رابطه،  $A_{eff}$  مساحت سطح نشر مؤثر در الکتروود،  $q$  بار الکترون،  $h$  ثابت پلانک<sup>۱۳</sup>،  $m_{eff}/m_0 = 0.5$  که جرم مؤثر یک الکترون در نوار هدایت نمونه است،  $d$  ضخامت نمونه و  $\Phi$  ارتفاع دیواره است. نماد  $B$  نشان‌دهنده عامل افزایش دهنده میدان برای نمونه‌های غیرمسطح و اثر شکل هندسی سوزن مورد استفاده است [۵].

با اعمال ولتاژ به دو سر الکتروود متصل به روبشگر، لوله منبسط و یا منقبض می‌شود و باعث حرکت سوزن می‌گردد. ابتدا لوله پیزو در زاویه  $\theta$  قرار می‌گیرد. زمانی که سوزن در راستای  $X$  و  $Y$  جابجا و ولتاژ به داخل لوله پیزو اعمال شود، جابجایی در راستای  $Z$  نیز امکان‌پذیر می‌گردد. این فرضیه زمانی صادق است که سوزن کاملاً متقارن باشد، هیچ ولتاژی به لوله پیزو اعمال نشده و نمونه و زیرپایه کاملاً متقارن و بدون حرکت قرار گرفته باشند. هنگامی که ولتاژ به دیواره خارجی لوله پیزو (در جهت  $x$  و  $y$ ) اعمال شود، انبساط لوله به‌صورت کمانی در نظر گرفته می‌شود. در روابط (۲) و (۳) که توضیحی برای شکل هندسی خمشی لوله پیزو است، مولفه  $r$  نشان‌دهنده شعاع خارجی لوله پیزو،  $R$  شعاع خمیدگی لوله با ولتاژ اعمال شده،  $\theta$  زاویه خمشی لوله،  $L$  طول اولیه لوله و  $\Delta L$  میزان افزایش طول لوله بعد از اعمال ولتاژ است. تغییر طول لوله پیزو ( $\Delta L$ )، وابسته به شدت میدان الکتریکی اعمال شده به دیواره خارجی لوله، ولتاژ اعمال شده در جهت محور  $X$ ، ( $U_X$ ) و ضخامت دیواره لوله است.

$$\text{رابطه (۲)} \quad L - \Delta L = (R - r)\theta$$

$$\text{رابطه (۳)} \quad L - \Delta L = (R + r)\theta$$

رابطه (۴)، بیانگر وابستگی مولفه‌های جابجایی طولی به میدان الکتریکی خارجی است و رابطه (۵)، نشان‌دهنده جابجایی لوله است.

$$\text{رابطه (۴)} \quad \Delta L = Ed_{r1} = \left(\frac{d_{r1}L}{t}\right) U_X$$

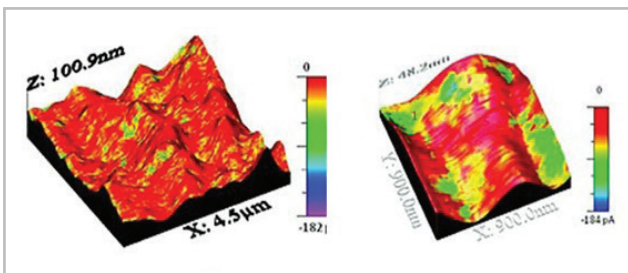
$$\text{رابطه (۵)} \quad \theta = \frac{L}{R} = \left(\frac{d_{r1}L}{t_r}\right) U_X$$

با محاسبه  $\theta$ ، جابجایی پروب در راستای  $X$  و  $Z$  به طریق زیر محاسبه می‌شود (روابط ۶ و ۷):

$$\text{رابطه (۶)} \quad d_x = (R + X)(1 - \cos \theta) + (D_{SS} + D_{SP})U_X$$

$$\text{رابطه (۷)} \quad d_z = (R + X)(\sin \theta - L) + (D_{SS} + D_{SP})(\cos \theta - 1)$$

۵۳۲ نانومتر با توان کم (۲ تا ۵ میلی‌وات) است که پرتو از آینه‌های واقع در زیر سکوی روبش منعکس می‌شود [۱۲ و ۱۳]. از لامپ‌های قوس زنون نیز به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان منابع نورانی استفاده می‌شود. بیشتر روش‌های تصویربرداری اغلب با به‌دست آوردن تصاویر جریان تاریک از نمونه آغاز می‌گردد. جریان تاریک به تولید جریان فوتونی حاصل از وسایل فتوولتایی آلی در غیاب منبع نور برمی‌گردد. تیرک و سوزن به سادگی سراسر نمونه را روبش می‌کنند و هم‌زمان اندازه‌گیری‌های توپوگرافی و جریان انجام می‌شود (شکل ۴). سپس این داده‌ها را می‌توان به‌منظور بررسی تأثیر فرآیند روشنایی ارائه شده بر وسایل فتوولتایی آلی استفاده نمود.



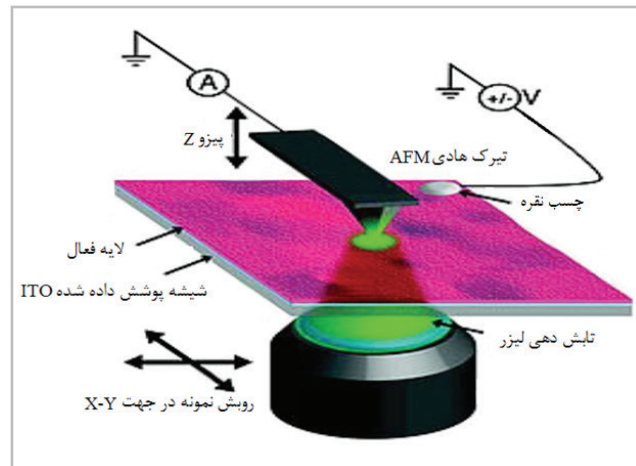
شکل ۴: نقشه‌های چگالی جریان.

نگوین<sup>۱۷</sup> و همکارانش اشاره کردند که وجود جریان فوتونی مثبت مربوط به هدایت، از طرف حفره‌ها است؛ درحالی که وجود جریان منفی مرتبط با هدایت، از سوی الکترون‌ها است. چگالی جریان برای بایاس<sup>۱۸</sup> مستقیم و معکوس به کمک رابطه (۸) محاسبه می‌شود:

$$J = \frac{8}{9} \epsilon_0 \epsilon_r \mu \frac{V}{L^3} \quad \text{رابطه (۸)}$$

که در این رابطه،  $J$  چگالی جریان،  $\epsilon_0$  گذردهی خلاء،  $\epsilon_r$  نفوذپذیری نسبی محیط،  $\mu$  تحرک محیط،  $V$  پتانسیل بایاس اعمال شده و  $L$  ضخامت لایه برحسب نانومتر است [۱۴]. بیشتر مواد آلی، دارای مقادیر نفوذپذیری نسبی در حدود ۳ در حالت‌های آمورف و بلورین خود هستند [۱۵]. دامنه پتانسیل بایاس اعمال شده معمولاً برای بیشتر مطالعات، در محدوده بین ۵ V- تا ۵ V+ قرار می‌گیرد [۱۶]. با دستکاری این پتانسیل بایاس همراه با عبور جریان از طریق تیرک، می‌توان نیروهای دافعه یا جاذبه بین نمونه و سوزن را تنظیم نمود. هنگامی که بایاس معکوس اعمال می‌شود (سوزن نسبت به نمونه منفی است)، بین سوزن و نمونه، نیروهای جاذبه برقرار می‌شود [۱۷]. اندازه‌گیری چگالی جریان با اطلاعات توپوگرافی که از سوزن میکروسکوپ نیروی اتمی و تیرک جمع‌آوری شده، ترکیب می‌شود. تصویر به دست آمده، تغییرات موضعی در مورفولوژی با اندازه‌گیری‌های چگالی جریان سوار شده روی آنها را نشان می‌دهند [۱].

کاربرد اصلی PC-AFM، در شناسایی وسایل فتوولتاییک طرح‌ریزی شده‌است (شکل ۵). اخیراً میکروسکوپ نیروی اتمی هدایت نوری برای بررسی و آنالیز مواد تشکیل‌دهنده سلول‌های خورشیدی نیز به کار می‌رود [۱۸ و ۱۹].



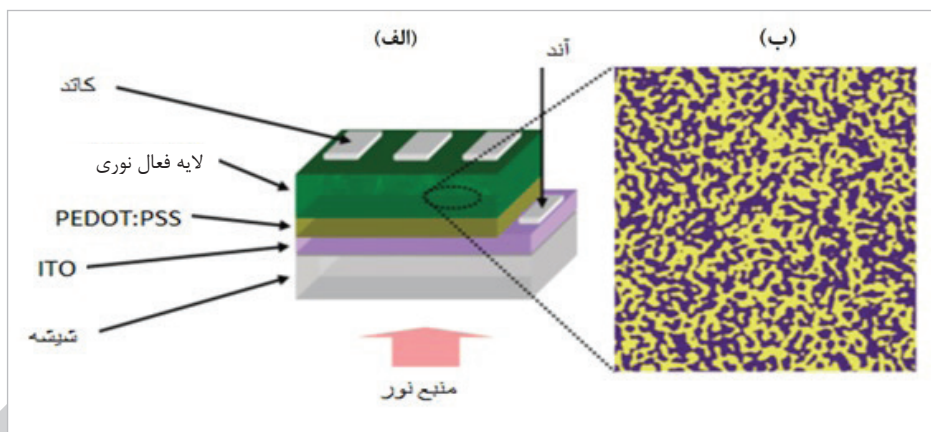
شکل ۳: نمایی از دستگاهوری PC-AFM، کاند، آند و نمونه نشانده شده روی زیرپایه.

## آماده‌سازی نمونه

هنگام انجام مطالعات با میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری، آماده‌سازی نمونه‌های فتوولتایی آلی از اهمیت بالایی برخوردار است. توصیه می‌شود که درآماده‌سازی نمونه، از زیر لایه رسانا و شفاف نسبت به منبع نوری تحت تابش استفاده شود. در مطالعات متعدد، از شیشه پوشش داده شده با ITO<sup>۱۵</sup> به‌عنوان زیرپایه رسانا استفاده شده‌است [۹]. پلی (۴ و ۳- اتیلن‌دی‌اکسی‌تیوفن) پلی (استیرن‌سولفونات)، (PSS:PEDOT)، لایه پلیمری رسانا و شفاف است که معمولاً بین ITO و لایه فعال فتوولتایی آلی قرار داده می‌شود. پلی (۴ و ۳- اتیلن‌دی‌اکسی‌تیوفن) پلی (استیرن‌سولفونات) یک پلیمر رسانا است که با چندین بار شارژ، پایدار شده‌است. در بیشتر مطالعات، بعد از تمیز کردن ITO با پلاسما، این پلیمر به‌طور مستقیم روی زیرپایه شیشه‌ای آغشته شده به ITO به‌وسیله دستگاه لایه‌نشانی پوشش داده می‌شود [۱۰]. پس از آن و پیش از پوشش لایه فتوولتایی آلی، با ITO بازپخت می‌شود. مطالعات انجام شده توسط پینگر<sup>۱۶</sup> و همکاران، ارتباط مستقیم بین زمان بازپخت، بیشترین و متوسط تولید جریان فوتونی را نشان می‌دهد [۱۱]. پس از این که لایه فتوولتایی آلی با لایه‌نشانی روی سطح پلیمری پوشش داده شد، در درجه حرارت بین ۷۰ تا ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد و برای زمان‌های طولانی با توجه به نوع روش، تا یک ساعت بازپخت می‌شود.

## اساس و روش کار

نمونه پس از آماده‌سازی، در محل قرارگیری نمونه در میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری قرار داده می‌شود. با حرکت انتقالی پیزو در راستای x-y، مستقل از مسیر z، می‌توان سطح نمونه را مطالعه کرد. برای بررسی تغییرات در راستای z از یک روبشگر پیزو در این راستا استفاده می‌شود. مواد پیزوالکتریک در داخل این روبشگر، تغییر در پتانسیل اعمال شده را به حرکت مکانیکی نمونه با دقت نانومتری، تبدیل می‌کند. میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری شامل لیزر



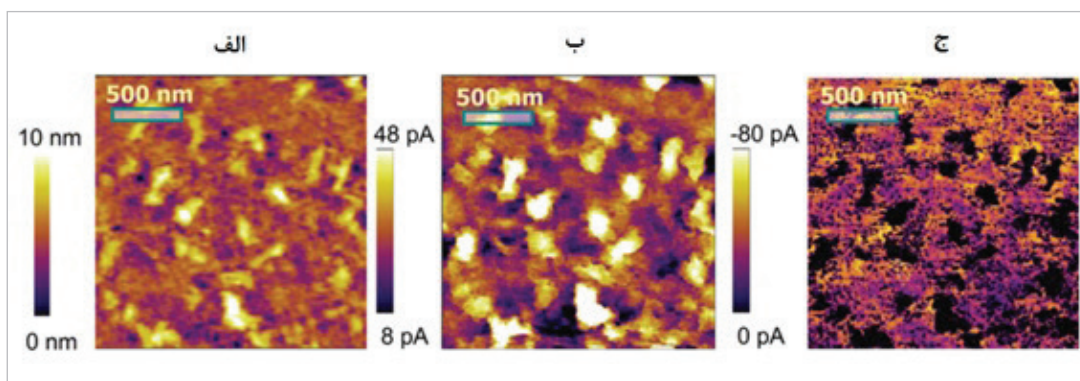
شکل ۵: (الف) سلول خورشیدی شامل پلیمر PSS: PEDOT که روی یک زیرپایه شیشه‌ای ITO نشانده شده است. (ب) لایه فعال نوری در بالای لایه PEDOT: PSS به وسیله تبخیر سطحی با الکتروکاتد آلومینیومی<sup>۱۹</sup> فشرده شده است.

اطلاعات حفره‌های نوری ایجاد شده به وسیله پروب AFM قابل جمع‌آوری هستند و الکترون‌ها زمانی که بایاس بالای ولتاژ مدار باز به کار می‌رود، قابل جمع‌آوری هستند. این فرآیند زمانی که بایاسی زیر ولتاژ مدار باز اعمال شود، معکوس می‌شود. حفره‌های نوری ایجاد شده به سمت کاتد حرکت می‌نماید؛ زمانی که سوزن پروب، الکترون‌ها را جمع‌آوری می‌کند بایاس اعمال شده باید به اندازه‌ای کم باشد که هیچ باری از طرف الکترودها اعمال نشود. بنابراین، ساختار جریان فوتونی جمع‌آوری شده در بایاس‌های منفی و مثبت، شبکه‌های جمع‌آوری الکترون و حفره مربوط به فازهای دهنده و پذیرنده در سطح لایه را نشان می‌دهند. شکل (۶) جداسازی فازهای دهنده و پذیرنده الکترون را نشان می‌دهد. وقتی که بایاسی با ولتاژ  $+1V$  به زیرپایه اعمال می‌شود، دهنده الکترون در سطح لایه باقی می‌ماند و قابل تصویربرداری می‌شود (شکل‌های (۶-ب) و (۶-الف)). در همین موقعیت با بایاس اعمال شده  $-1V$  نیز تصویربرداری شده است (شکل (۶-ج)). بازده پایین وسیله، به دلیل جدایی بزرگ بین مواد دهنده و پذیرنده در ساختار لایه‌های مخلوط است که باعث کاهش مساحت سطح برای تفکیک و متوقف‌سازی جریان جمع‌آوری بار می‌شود [۲].

تصویر توپوگرافی به دست آمده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی، نشان‌دهنده جداسازی فازی در مناطق زرد (فازهای دهنده) و بنفش (فازهای پذیرنده) است. جداسازی فازی در مقیاس نانو برای مواد دهنده و پذیرنده در لایه فعال برای ایجاد انتقال بار و گسستگی اکسایتون<sup>۲۰</sup> ضروری است. در این تصویربرداری، PC-AFM در حالت تماسی و به کمک پروبی از جنس طلا و سوزن سیلیکونی پوشش داده شده با پلاتین به کار گرفته شده است.

نور از میان ITO عبور کرده و با استفاده از یک میکروسکوپ نوری وارونه روی نمونه متمرکز شده است. در این تنظیمات، لایه فشرده شده روی سلول، هواگیری و سپس با گاز نیتروژن خشک شده و به عنوان نمونه استفاده می‌شود. سوزن‌های سیلیکونی پوشش داده شده با فلز، دارای کارایی‌های متفاوتی هستند. از این سوزن‌ها می‌توان به عنوان یک نانوالکترودها برای جمع‌آوری اطلاعات الکترون و حفره استفاده نمود. با توجه به شعاع بسیار کوچک سوزن، امکان تصویربرداری جامع و کامل از جداسازی فازی، ایجاد بار، انتقال بار و جمع‌آوری بار تولید شده وجود دارد [۱۰].

با در نظر گرفتن عملکرد بالای پروب سیلیکونی ( $ev \sim 1/5$ ),

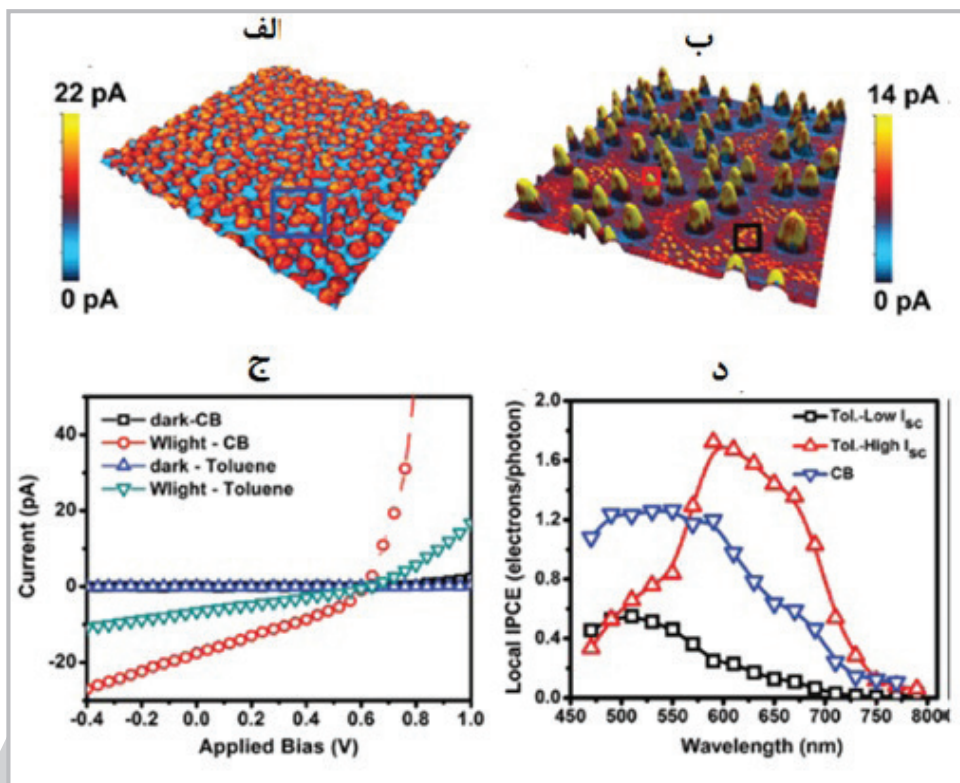


شکل ۶: تصاویر توپوگرافی (الف) جریان گرفته شده در ولتاژ  $+1V$ ، (ب) جریان گرفته شده در ولتاژ  $-1V$ ، (ج) از لایه‌های  $30:70$  DPPBFU:PC<sub>71</sub>BM. لایه‌های فعال نوری روی زیرپایه ITO/PEDOT:PSS نشانده شده است. تصاویر جریان و توپوگرافی با استفاده از پروب پلاتینی و با اعمال بایاس به زیرپایه گرفته شده است. اندازه تصاویر  $2\mu m \times 2\mu m$  است.

منتقل می‌شوند [۲]. میانگین جریان فوتونی مدار کوتاه (ISC)، تحت نور سفید بیشتر از زمانی است که تحت لایه‌های فشرده شده و ساخته شده با محلول تولوئن است. این نتایج با استفاده از میانگین حاصل از موقعیت‌های متفاوت ویژگی‌های ولتاژ - جریان، قابل تأیید است (شکل ۷-ج).

هون<sup>۲۳</sup> و همکارانش [۲۰] از روش PC-AFM برای شناسایی و درک بهتر متغیرهای مؤثر در مقیاس نانو در جریان فوتونی میان لایه‌های فعال پلیمر P1:PC71BM<sup>۲۴</sup> استفاده کردند. آنها از پلیمر P1 (شکل ۸) با گاف نواری<sup>۲۶</sup> کوچک و خاصیت کویلیمری با زنجیره درونی دهنده و پذیرنده، در طراحی و ساخت سلول‌های خورشیدی استفاده کردند [۲۱ تا ۲۳]. بالاترین اربیتال مولکولی اشغال شده<sup>۲۷</sup> و پایین‌ترین اربیتال مولکولی خالی<sup>۲۸</sup> در پلیمر P1 از طریق چرخه ولتامتری به ترتیب ۵/۵ eV - و ۳/۵ eV - تعیین شده‌است؛ این پلیمر دارای وزن مولکولی ۴۱۰۰۰ g/mol است. در این تحقیق، سلول‌های خورشیدی به صورت لایه‌های فعال با استفاده از پلیمر P1 و مولکول پذیرنده PC71BM ساخته شده و به نام قطعه P1:PC71BM شناخته شده‌است. شکل (۸) ساختار مولکولی پلیمر P1 و شکل (۹) نتایج تحقیقات به دست آمده از تصویربرداری PC-AFM را نشان داده است.

از پیشرفت‌های ویژه در توسعه PC-AFM، قابلیت استفاده در شناسایی سلول خورشیدی آلی است. لایه فعال نوری از یک محلول حاوی مواد دهنده و پذیرنده الکترون ساخته شده‌است که مورفولوژی آن بسیار پیچیده و حساس به شرایط فرآیند است. با استفاده از روش PC-AFM، تهیه تصویر مورفولوژی‌های پیچیده در مقیاس نانو و جریان فوتونی ممکن می‌شود. برای مثال، لایه فعال نوری<sup>۲۱</sup>: پلی [۲- متوکسی-۵- (۳و۷- دی متیل اکتیل اکسی)]-۴و۱- فینیل وینیلن (MDMO-PPV) و [۶ و ۶ - فیل - CV1 - بوتریک اسید متیل استر (PC71BM)<sup>۲۲</sup> که با محلول کلروبنزن فشرده شده‌است، جدایی فازی کمتری از لایه‌های تهیه شده با محلول تولوئن نشان می‌دهد (شکل‌های (الف) و (ب-۷)). با استفاده از نورهای تک رنگ و تنظیم‌پذیر، مشخص شد که مناطق بزرگ فازی بین لایه‌ها در شکل (ب-۷)، مربوط به مناطق غنی از PC71BM است و ذرات کوچک برجسته، توزیعی از پلیمر MDMO-PPV است. آنالیز جزئیات طیف‌های بازده کوانتومی خارجی برای دو سازوکار انتقال بار موجود در سلول‌های خورشیدی پلیمری در شکل (د-۷) نشان داده شده‌است. به عنوان مثال، حفره‌ها از پذیرنده‌های برانگیخته شده به دهنده‌ها منتقل می‌شوند و الکترون‌ها از دهنده‌های برانگیخته شده به پذیرنده‌ها

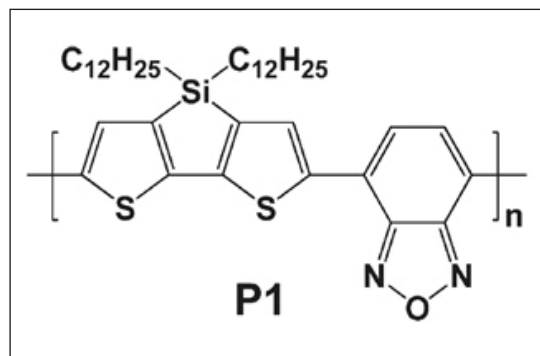


شکل ۷: (الف) مورفولوژی لایه‌های MDMO-PPV:PC71BM فشرده شده با کلروبنزن (CB) و توپوگرافی در مقیاس ۳۰ nm و (ب) مورفولوژی لایه فوق در تولوئن با توپوگرافی ۲۰۰ nm. برای تصویربرداری جریان فوتونی، بایاس به زیرپایه اعمال شده‌است. (ج) ویژگی‌های جریان - ولتاژ تاریک و نورانی زمانی که بایاس به سوزن AFM اعمال شده، ثبت شده‌است. بازده تبدیل فوتون موضعی (IPCE = تعداد الکترون بر تعداد فوتون‌ها) مربوط به لایه‌های تولوئن و CB در شکل (د) نشان داده شده‌است. طیف‌های IPCE که به صورت رنگی در شکل (د) نشان داده شده‌است، به ترتیب مربوط به مناطق رنگی در شکل‌های (الف) و (ب) است.

پذیرنده الکترون را کاهش می‌دهد [۲۰].

### کاربردها

از عمده‌ترین کاربردهای PC-AFM، بررسی سازوکار، در درون وسایل فتولتاییک آلی<sup>۲۹</sup> در مقیاس نانو است. با استفاده از این روش، اطلاعاتی نظیر نقشه‌برداری از جریان فتونی، تفاوت در مورفولوژی، تعیین مناطق دهنده - پذیرنده الکترون، تولید نقشه‌های جریان - ولتاژ - چگالی، بازده کوانتومی و جنبش تقریبی حامل‌های بار حاصل می‌شود [۱ و ۲۴-۳۲]. یکی دیگر از ویژگی‌های قابل توجه PC-AFM، توانایی تهیه اطلاعات همزمان با تهیه اطلاعات در مورد توپولوژی و خواص جریان فتونی از وسایل فتولتاییک آلی در مقیاس نانو است. اخیراً از روش PC-AFM برای جمع‌آوری اطلاعات، در مورد مناطق فعال نوری در نمونه با استفاده از نقاط کوانتومی نیز استفاده شده است. با استفاده از این روش، ثبت اطلاعات درباره اندازه نقاط کوانتومی و پراکندگی آنها در قطعه با کمترین آسیب به مورفولوژی انجام می‌شود. با استفاده از این اطلاعات می‌توان متغیرهای موضعی<sup>۳۰</sup> در فعالیت نوری مربوط به ناهماهنگی مورفولوژی لایه را تشخیص داد [۳۲].



شکل ۸: ساختار مولکولی پلیمر P1

شکل (۹-الف) توپوگرافی سطحی لایه‌ای را که با کلروبنزن (به‌عنوان حلال) تهیه شده‌است، نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است این لایه دارای شبکه‌های جریانی کمتری است و جریان فتونی ناهماهنگی نسبت به لایه فعال تهیه شده با CN/chlorobenzene دارد (شکل ۹-ب).

با استفاده از این روش، مشخص شده‌است که با انتخاب افزودنی‌های متفاوت، مورفولوژی‌های متفاوت به‌دست می‌آید. برای مثال، نتایج نشان داده‌اند که افزودن سیانید باعث مسطح شدن سطح لایه فعال می‌شود و میزان گیرکنوختی دهنده و



شکل ۹: تصاویر PC-AFM برای لایه‌های فشرده PEDOT:PSS/P1:ITO/PCy1BM از محلول بدون CN (الف) و با CN در ولتاژ صفر با استفاده از سوزن سیلیکونی پوشش داده شده با طلا تهیه شده‌است. محدوده روبش در تصاویر  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  است.

با توجه به ماهیت تولید بار، نقل و انتقال در مقیاس نانو، بدون روش PC-AFM تهیه اطلاعات و اندازه‌گیری‌ها بسیار مشکل خواهد بود. میکروسکوپ نیروی اتمی هدایتی نوری در توصیف الکتریکی موضعی به ویژه در مورد لایه‌های نازک فتولتاییک بسیار کاربردی است. با استفاده از این روش می‌توان تغییرات ظرفیت خازنی و پتانسیل سطحی لایه‌های نازک را بررسی نمود. در نهایت می‌توان گفت، این روش میکروسکوپی به‌عنوان روشی مناسب برای بررسی لایه‌های نازک و وسایل فتولتاییک آلی در مقیاس نانو و همچنین جمع‌آوری اطلاعات در مورد نواحی نوری در نمونه‌ها قابل استفاده است.

نتیجه‌گیری

### پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد شیمی معدنی، پژوهشگاه صنعت نفت، پژوهشکده کاتالیست و نانوفناوری
۲. دکترای شیمی تجزیه، دانشگاه پیام نور، گروه شیمی
۳. کارشناس ارشد فیزیک حالت جامد، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده نیمه‌هادی‌ها، آزمایشگاه شناخت مواد
۴. کارشناس ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت، پژوهشکده کاتالیست و نانوفناوری
۵. عضو کارگروه تخصصی دستگاه‌های SPM شبکه آزمایشگاهی



6. Photoconductive atomic force microscopy (PC-AFM)
7. Atomic force microscopy (AFM)
8. Henri Becquerel
9. Photocurrent
10. Pochettino
11. Volmer
12. Conductive -AFM
13. Plancks Constant
14. Feedback Loop
15. Indium Tin Oxide
16. Pingree
17. Nguyen
18. Bias
19. The Aluminum Cathode Electrode Evaporation
20. Exciton: a mobile concentration of energy in crystal formed by an excited electron
21. poly[2-methoxy-5-(3,7-dimethyloctyloxy)]-1,4-phenylenevinylene (MDMO-PPV)
22. [6,6]Phenyl-C71-butyric acid methy ester (PC71BM)
23. Hoven et al
24. Phenyl-C71-batric acid methyl ester
25. Poly[(4,4-didodecyl dithieno[3,2-b:2,3-d]silole)-2,6-diyl-alt-(2,1,3-benzoxadiazole)-4,7-diyl]
26. Band gap
27. Highest unoccupied molecular orbital (HOMO)
28. lowest unoccupied molecular orbital (LUMO)
29. Organic Photovoltaic Devices (OPV)
30. Local Variances

## مراجع

- [1] Pingree L.S.C., Reid O.G., Ginger D.S. "Electrical scanning probe microscopy on active organic electronic devices" *Adv. Mater.* (2010), 21 (1): 19-28.
- [2] Dang X., Nguye T.Q. "Photoconductive atomic force microscopy for understanding nanostructures and device physics of organic solar cells" <https://www.asylumresearch.com>.
- [3] Kemerink M., Timpanaro S., DeKok M.M., Meulenkaamp E.A., Touwslager F.J. "Three-dimensional inhomogeneities in PEDOT:PSS films" *J. Phys. Chem. B* (2004), 108 (49): 18820-5.
- [4] Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. "Principle of instrumental analysis" (2007), (6th Ed.), pp. 616-8.
- [5] Olbrich A., Ebersberger B., Boit C. "Conducting atomic force microscopy for nanoscale electrical characterization of thin SiO<sub>2</sub>" *Appl. Phys. Lett.* (1998), 73 (21): 3114-6.
- [6] Coffey D.C., Reid O.G., Rodovsky D.B., Bartholomew G.P., Ginger D.S. "Mapping local photocurrents in polymer/fullerene solar cells with photoconductive atomic force microscopy" *Nano Lett.* (2007), 7 (3): 738-44.
- [7] Mayer A.C., Scully S.R., Hardin B.E., Rowell M.W., McGehee M.D. "Polymer-based solar cells" *Mater. Today* (2007), 10 (11): 28-33.
- [8] Musumeci C., Liscio A., Palermo V., Samori P. "Electronic characterization of supramolecular materials at the nanoscale by conductive atomic force and kelvin probe force microscopies" *Mater. Today* (2014), 17 (10): 504-17.
- [9] Bull T.A., Pingree L.S.C., Jenekhe S.A., Ginger D.S., Luscombe C.K. "The role of mesoscopic PCBM Crystallinities in Solvent Vapor Annealed Copolymer Solar Cells" *ACS Nano* (2010), 3 (3): 627-36.
- [10] Pingree L.S.C., MacLeod B.A., Ginger D.S. "The changing face of PEDOT:PSS films: substrate, bias, and processing effects on vertical charge transport" *J. Phys. Chem. C* (2008), 112 (21): 7922-7.
- [11] Pingree L.S.C., Reid O.G., Ginger D.S. "Imaging the evolution of nanoscale photocurrent collection and transport networks during annealing of polythiophene/fullerene solar cells" *Nano Lett.* (2009), 9 (8): 2946-52.
- [12] Lee J., Choi I., Hong S., Lee S., Yang Y.I., Kim Y. "Construction of pc-AFM module to measure photoconductance with a nanoscale spatial resolution" *Ultramicroscopy* (2008), 108 (10): 1090-3.
- [13] Mathieson A.M., Robertson J.M., Sinclair V.C. "The crystal and molecular structure of anthracene. I. X ray mea-

surements" Acta. Crystallogr. (1950), 3 (4): 245-50.

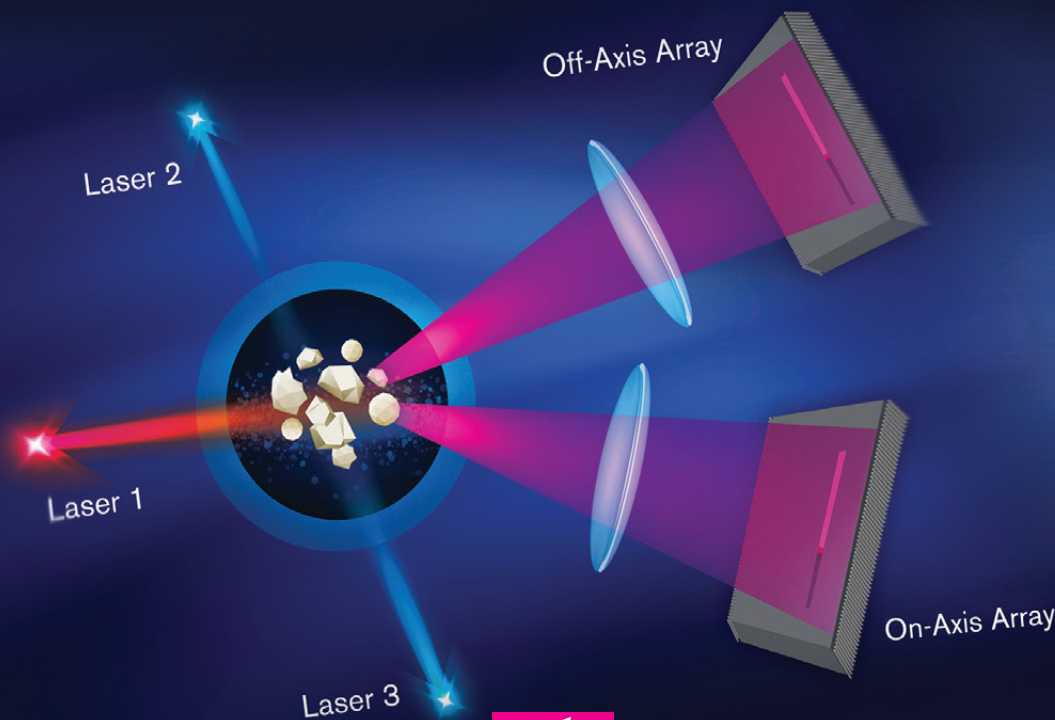
- [14] Dante M., Peet J., Nguyen T.Q. "Nanoscale charge transport and internal structure of bulk heterojunction conjugated polymer/fullerene solar cells by scanning probe microscopy" J. Phys. Chem. C (2008), 112 (18): 7241-9.
- [15] Hoppe H., Sariciftci N.S. "Morphology of polymer/fullerene bulk heterojunction solar cells" J. Mater. Chem. (2006), 16: 45-61.
- [16] Hoppe H., Sariciftci N.S. "Organic solar cells: An overview" (<http://www.lios.at/Publications/2004/2004-021.pdf>). J. Mater. Res. (2004), 19 (7): 1924-45.
- [17] Cornil J., Beljonne D., Calbert J.P., Bredas J.L. "Interchain Interactions in Organic  $\pi$ -Conjugated Materials: Impact on Electronic Structure, Optical Response, and Charge Transport." Adv. Mater. (2001), 13: 1053-67.
- [18] Benanti T.L., Venkataraman D. "Organic solar cells: an overview focusing on active layer morphology" Photosynth. Res. (2006), 87 (1): 73-81.
- [19] Dang X.D., Tamayo A.B., Seo J.H., Hoven C., Walker B., Nguyen T.Q. "Nanostructure and optoelectronic characterization of small molecule bulk heterojunction solar cells by photoconductive atomic force microscopy" Adv. Funct. Mater. (2010), 20: 3314-21.
- [20] Hoven C.V., Dang X.D., Coffin R.C., Peet J., Nguyen T.Q., Bazan G.C. "Improved performance of polymer bulk heterojunction solar cells through the reduction of phase separation via solvent additives" Adv. Mater. (2010), 22 (8): E63-6.
- [21] Bundgaard E., Krebs F.C. "Low band gap polymers for organic photovoltaics" Sol. Energy Mater. Sol. Cells (2007), 91: 954-85.
- [22] Zhu Z., Waller D., Gaudiana R., Morana M., Muhlbacher D., Scharber M., Brabec C. "Panchromatic conjugated polymers containing alternating donor/acceptor units for photovoltaic applications" Macromolecules (2007), 40: 1981-6.
- [23] Wienk M.M., Kroon J.M., Verhees W., Knol J.H., Hummelen J.J.C.P., Hal A., van Janssen R. "Efficient methano[70]fullerene/MDMO-PPV bulk heterojunction photovoltaic cells" Angew. Chem. Int. Ed. (2003), 42: 3371-5.
- [24] Sloan G.J., Thomas J.M., Williams J.O. "Basal dislocations in single crystals of anthracene" Mol. Cryst. Liq. Cryst. (1975), 30: 167-74.
- [25] Groves C., Reid D.G., Ginger D.S. "Heterogeneity in polymer solar cells: local morphology and performance inorganic photovoltaics studied with scanning probe microscopy" Accounts Chem. Res. (2010), 43 (5): 612-20.
- [26] Takacs C.J., Collins S.D., Love J.A., Mikhailovsky A.A., Wynands D., Bazan G.C., Nguyen T.Q., Heeger A.J. "Mapping orientational order in a bulk heterojunction solar cell with polarization-dependent photoconductive atomic force microscopy" ACS Nano (2014), 8 (8): 8141-51.
- [27] Dante M., Garcia A., Nguyen T.Q. "Three-dimensional nanoscale organization of highly efficient low band-gap conjugated polymer bulk heterojunction solar cells" J. Phys. Chem. C, (2010), 113 (4): 1596-600.
- [28] Geisse N.A. "AFM and combined optical techniques" Mater. Today (2009), 12 (7-8): 40-5.
- [29] Dang X.D., Mikhailovsky A., Nguyen T.Q. "Measurement of nanoscale external quantum efficiency of conjugated polymer:fullerene solar cells by photoconductive atomic force microscopy" Appl. Phys. Lett. (2010), 97 (11): 113303.
- [30] Reid O.G., Munechika K., Ginger D.S. "Space charge limited current measurements on conjugated polymer films using conductive atomic force microscopy" Nano Lett. (2008), 8 (6): 1602-9.
- [31] Douheret O., Lutsen L., Swinnen A., Bresselge M., Vandewal K., Goris L., Manca J. "Nanoscale electrical characterization of organic photovoltaic blends by conductive atomic force microscopy" Appl. Phys. Lett. (2006), 89 (3): 032107.
- [32] Madl M., Brezna W., Strasser G., Klang P., Andrews A.M., Bodnarchuk M.I., Kovalenko M.V., Yarema M., Heiss W., Smoliner J. "AFM-based photocurrent imaging of epitaxial and colloidal QDs" Phys. Status Solidi C, (2011), 8 (2): 426-8.

نویسندگان

داود قرایلو<sup>۱\*</sup>، ساسان مرادده<sup>۲</sup>

davoud.gharailou@gmail.com

# تئوری پتانسیل زتا و چگونگی کارکرد دستگاه تفرق نور پویا در اندازه‌گیری این پتانسیل



## چکیده

پتانسیل زتا به بار سطح ذرات موجود در یک سیال گفته می‌شود. اندازه‌گیری پتانسیل زتا یکی از عوامل مهم در پایداری مواد کلوئیدی است. این پتانسیل می‌تواند شرایط نمونه را در حالت‌های مهم نشان دهد. روش‌های محدودی برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا وجود دارد. در این مقاله، تئوری پتانسیل زتا و چگونگی اندازه‌گیری آن با دستگاه DLS مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## واژه‌های کلیدی

پتانسیل زتا، DLS، تفرق نور پویا، پایداری محلول.

مقدمه

یکی از دستگاه‌هایی که امروزه در مراکز تحقیقاتی و واحدهای آزمایشگاهی استفاده قرار می‌شود، دستگاه تفرق نور پویا<sup>۱</sup> است. اندازه‌گیری پتانسیل زتا<sup>۲</sup>، تعیین توزیع اندازه ذرات در ابعاد نانو و اندازه‌گیری وزن مولکولی، آزمون‌هایی هستند که با استفاده از دستگاه DLS می‌توان روی نمونه‌های آزمایشی انجام داد. البته لازم به ذکر است نمونه‌هایی که این دستگاه قادر به انجام آزمون روی آنها است، باید به حالت کلوئیدی سوسپانسیون و امولسیون باشند. دستگاه DLS از جمله دستگاه‌هایی است که کاربرد آن در علوم و صنایع مختلف، روز به روز در حال افزایش است که دلایل این افزایش کاربرد، به شرح زیر است:

- ▶ کوتاه بودن مدت زمان انجام آزمون؛
- ▶ انجام سه آزمون با یک دستگاه؛
- ▶ عدم وجود مراحل آماده‌سازی پیچیده؛



- عدم نیاز به شرایط محیطی خاص در محل نصب دستگاه؛
- هزینه پایین انجام آزمون.

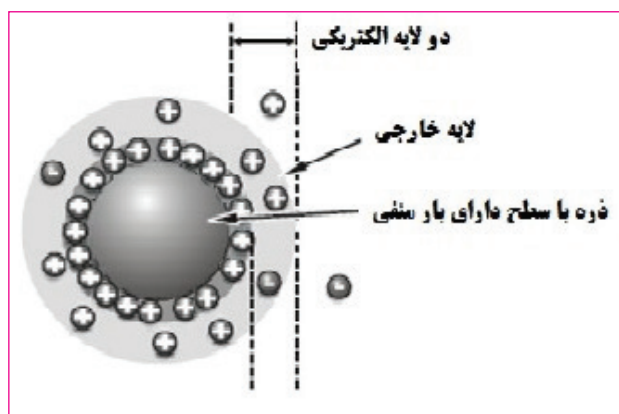
همان‌طور که گفته شد، یکی از موارد قابل اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه DLS، پتانسیل زتا است که از جمله آزمون‌های پرکاربرد در حوزه‌های مختلف علمی و صنعتی به شمار می‌رود. هدف از نگارش این مقاله، بیان مفاهیم اصلی پتانسیل زتا و همچنین چگونگی کارکرد دستگاه برای اندازه‌گیری عامل پتانسیل زتا است. با توجه به توضیحات داده شده، این مقاله به سه بخش تقسیم می‌شود:

۱. تئوری و محاسبه پتانسیل زتا؛
  ۲. تحرک الکتروفورتیکی؛
  ۳. چگونگی کارکرد دستگاه برای تعیین پتانسیل زتا.
- در ادامه مقاله به توضیح سه بخش فوق پرداخته می‌شود.

## تئوری و محاسبه پتانسیل زتا

### ----- پتانسیل زتا و لایه مضاعف الکتریکی<sup>۵</sup> -----

ذره در داخل سیال دارای بار سطحی است و همواره در اطراف سطح ذره‌ای که درون سیال قرار گرفته است، افزایش غلظت یون‌های با بار مخالف سطح ذره، دیده می‌شود. بنابراین، یک لایه اضافی از این یون‌ها سطح ذره را احاطه می‌کند و لایه اضافی دیگری در دور ذره به وجود می‌آورد. همان‌طور که در شکل (۱) دیده می‌شود، این لایه به وجود آمده دور ذره را می‌توان به دو قسمت تقسیم نمود:



شکل ۱: نمایی از لایه‌های درونی و بیرونی.

در لایه درونی که به آن لایه استرن<sup>۶</sup> نیز گفته می‌شود، یون‌ها به شدت محدود هستند و به صورت کاملاً متراکم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند.

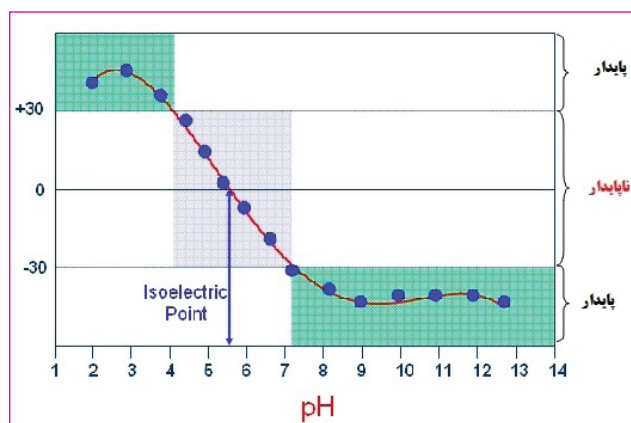
لایه بیرونی که یون‌ها تا حدودی از لایه قبلی آزادی بیشتری دارند و توانایی جابجایی آنها بیشتر است.

وقتی ذره درون سیال حرکت می‌کند، لایه‌های درونی و بیرونی اطراف آن نیز به همراه ذره جابجا می‌شوند و با ذره حرکت می‌کنند. بنابراین، می‌توان یک فاصله فرضی بین ذره و محیط سیال تصور نمود که این فاصله فرضی همان لایه مضاعفی است که ذره را احاطه کرده است. این فاصله را در اصطلاح، فاصله هیدرودینامیکی<sup>۷</sup> می‌نامند و پتانسیلی را که در این فاصله وجود دارد به نام پتانسیل

زتا می‌شناسند. در واقع پتانسیل زتا عاملی برای ثبات بالقوه سامانه کلوئیدی است. سامانه‌های کلوئیدی که دستگاه DLS می‌تواند پتانسیل زتای آنها را محاسبه کند، سوسپانسیون و امولسیون هستند.

اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار منفی و یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند و تمایلی به هم‌انباشتگی از خود نشان نمی‌دهند. تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد. به‌طور کلی مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین نمود. ذراتی که پتانسیل زتای آنها از ۳۰ میلی‌ولت بیشتر و یا از ۳۰- میلی‌ولت کمتر باشد، پایداری دارند.

pH عاملی است که بیشترین اهمیت را در تعیین اندازه پتانسیل زتا دارد. در واقع، اندازه پتانسیل زتا بدون اینکه اعلام شود در چه pH به دست آمده، کاملاً بی‌معنی است. تصور کنید یک ذره با پتانسیل زتای منفی در یک سوسپانسیون قرار دارد. اگر با اضافه کردن افزودنی، محیط سوسپانسیون قلیایی‌تر شود، ذره میل کمتری برای هم‌انباشتگی خواهد داشت و در نتیجه پتانسیل زتای آن منفی‌تر می‌شود. همان‌طور که در شکل (۲) دیده می‌شود پتانسیل زتا در نقطه‌ای از نمودار به صفر می‌رسد که اصطلاحاً به این نقطه، نقطه ایزوالکتریک<sup>۸</sup> گفته می‌شود. نقطه ایزوالکتریک، نقطه‌ای است که در آن سامانه کلوئیدی کمترین پایداری را دارد.



شکل ۲: نمودار پایداری و ناپایداری سامانه کلوئیدی بر حسب اندازه پتانسیل زتا.

## ----- اثرات الکتروستاتیک<sup>۱</sup> -----

با این پیش فرض می‌توان پتانسیل زتای ذرات معلق درون دیسپرسانت را با محاسبه تحرک الکتروفوریتیکی، با استفاده از معادله هنری به‌دست آورد.

### ----- معادله هنری -----

معادله هنری به شکل زیر است:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

که در آن،  $Z$ : پتانسیل زتا،  $U_E$ : تحرک الکتروفوریتیکی،  $\varepsilon$ : ثابت دی الکتریک،  $\eta$ : ویسکوزیته و  $f(ka)$ : تابع هنری است که بر حسب نمونه مورد آزمایش، می‌تواند ۱ یا ۱/۵ باشد. اگر ذرات مورد آزمون حدود ۲۰۰ نانومتر، غلظت ۳ تا ۱۰ مولار و دیسپرسانت آبی باشد از تقریب اسملوچوفسکی<sup>۱۵</sup> استفاده می‌شود و تابع هنری را برابر ۱/۵ قرار می‌دهند. ولی برای ذرات ریزتر و دیسپرسانت‌های غیرآبی از تقریب هوکل<sup>۱۶</sup> استفاده شده و تابع هنری برابر ۱ قرار داده می‌شود.

همان‌طور که در رابطه بالا مشاهده می‌شود، برای به‌دست آوردن پتانسیل زتای نمونه مورد آزمایش، عوامل تحرک الکتروفوریتیکی، ثابت دی‌الکتریک، ویسکوزیته و تابع هنری، مورد نیاز است. این‌ها مقادیری هستند که به دستگاه DLS داده می‌شود و در اصل، کار دستگاه برای به‌دست آوردن پتانسیل زتا، محاسبه مقدار تحرک الکتروفوریتیکی است.

## تحرک الکتروفوریتیکی

برای به‌دست آوردن اندازه پتانسیل زتا، باید تحرک الکتروفوریتیکی ذرات درون سوسپانسیون محاسبه شود. در واقع یکی از روش‌های تعیین اندازه پتانسیل زتا، روش محاسبه تحرک الکتروفوریتیکی است. تعیین اندازه دقیق تحرک الکتروفوریتیکی یک ذره، خود، کار مشکلی است که روش‌های مختلفی برای محاسبه آن وجود دارد. در این بخش، سه روشی که با استفاده از آن‌ها می‌توان به اندازه تحرک الکتروفوریتیکی رسید، آورده شده‌است که عبارتند از:

- ▶ سرعت‌سنجی داپلر لیزر<sup>۱۷</sup>؛
- ▶ M3؛
- ▶ M3-PALS.

### ----- سرعت‌سنجی داپلر لیزر -----

برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا در دستگاه DLS، یک سل الکتروشیمیایی وجود دارد که شامل یک کیبوت با دو الکتروود است (شکل ۳). زمانی که ولتاژ اعمال می‌شود، ذرات که دارای بار الکتریکی منفی هستند به سمت الکتروود مثبت حرکت می‌کنند و سرعت حرکت ذرات اندازه‌گیری می‌شود.

هنگامی که ذرات، درون الکتروولت قرار بگیرند و جریان الکتریکی از الکتروولت عبور کند، شارژ الکتریکی روی سطح ذرات ایجاد می‌شود. در چنین شرایطی، سطح ذرات، اثرات خاصی از خود نشان می‌دهند که ناشی از اعمال میدان الکتریکی خارجی است. اثرات به‌وجود آمده در شرایط فوق، اثرات الکتروستاتیک هستند که می‌توان آن را به چهار قسمت مجزا تقسیم نمود:

#### ۱. اثر الکتروفوریتیکی<sup>۱۰</sup>

به حرکت ذره باردار درون سیال نسبت به مایعی که در آن معلق است، در شرایط اعمال یک میدان الکتریکی خارجی، اثر الکتروفوریتیکی گفته می‌شود.

#### ۲. اثر الکترواسمزی<sup>۱۱</sup>

هنگامی که به یک سیال دارای ذرات، در درون آن است، میدان الکتریکی اعمال شود، سیال متأثر از میدان الکتریکی اعمال شده نسبت به سطح باردار ذره، جابجایی دارد که این جابجایی ناشی از اثر الکترواسمزی است.

#### ۳. پتانسیل جریانی<sup>۱۲</sup>

جریان نشات گرفته از عبور سیال از کانال یا حفره ای که دارای دیواره باردار است.

#### ۴. پتانسیل ترسیب<sup>۱۳</sup>

این میدان الکتریکی زمانی تولید می‌شود که ذرات باردار درون مایعی ثابت در حرکت باشند.

لازم به ذکر است که برای تعیین پتانسیل زتا در نمونه‌ها، دستگاه DLS از پدیده تفرق نور الکتروفورزی<sup>۱۴</sup> استفاده می‌کند. در این پدیده، اثرات الکتروفوریتیکی و الکترواسمزی که روی تحرک ذره و سیال سامانه کلئیدی نقش به‌سزایی دارند، مورد استفاده قرار گرفته است.

## ----- اثرات الکتروستاتیک -----

زمانی که میدان الکتریکی در سراسر یک الکتروولت اعمال می‌شود، ذرات باردار معلق درون الکتروولت، جذب الکتروود با بار مخالف می‌شوند. در این زمان، نیروهایی در برابر این جابجایی مقاومت نموده و با حرکت ذرات باردار مخالفت می‌کنند. وقتی بین نیروی جابجایی ذرات و نیروی مخالف حرکت ذرات با هم در حال رقابت باشند، ذرات با سرعت ثابتی درون الکتروولت حرکت می‌کنند. به سرعت حرکت ذرات در یک میدان الکتریکی، اصطلاحاً تحرک الکتروفوریتیکی گفته می‌شود.

این حرکت ذرات درون الکتروولت به عواملی وابسته است که عبارتند از:

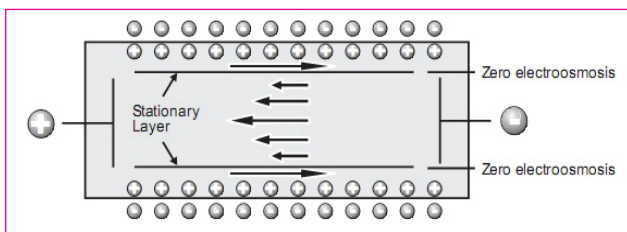
- ▶ میدان الکتریکی اعمال شده؛
- ▶ ثابت دی‌الکتریک الکتروولت؛
- ▶ ویسکوزیته الکتروولت؛
- ▶ پتانسیل زتای ذرات.

جابجایی هستند. تلفیق کننده نوری می تواند سیگنال مناسبی دریافت کند تا بتوان اندازه گیری پتانسیل زتای این گونه ذرات را تعیین نمود. حال به یک نکته بسیار مهم باید اشاره کرد که اندازه حرکتی که با این روش ثبت می شود، اندازه حرکت ذره بر اثر تحرک الکتروفورتیکی به تنهایی نیست و اثر الکترواسمزی نیز در این جابجایی نقش دارد.

#### ----- اثر الکترواسمز -----

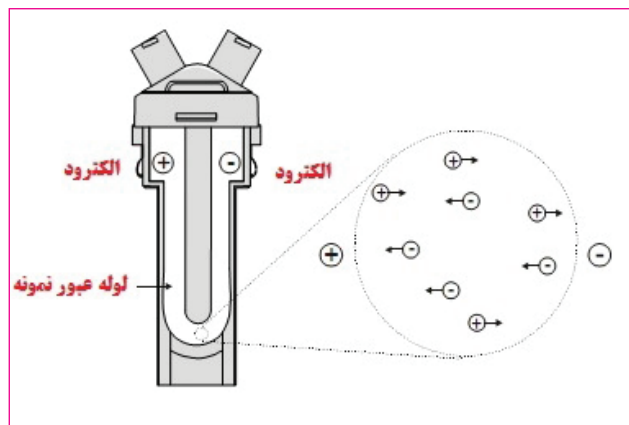
اطراف دیواره های باریک کیووت که دارای بار سطحی هستند، متناسب با میدان الکتریکی اعمال شده و در اثر الکتروفورتیکی، حرکت الکتروفورتیکی انجام می شود و بارهای سطحی درون کیووت در مجاورت دیواره جابجا می شوند. همچنین مایع قرار گرفته در این مکان نیز که دارای اثرات الکتروسینتیک است، تحت تاثیر الکترواسمز قرار گرفته و به این ترتیب، مایع اطراف این دیواره ها نیز حرکت می کند. ذرات کلئیدی که در معرض این جریان قرار می گیرند، به تحرک الکتروفورتیکی اضافه می شوند و حال باید اندازه این تحرک الکتروفورتیکی ذرات محاسبه شود. در این شرایط، برای محاسبه تحرک الکتروفورتیکی ذره مشکلی بوجود می آید که عبارت است از، این تحرکی که اندازه گیری می شود، متأثر از اثر الکتروفورتیکی و اثر الکترواسمز هر دو با هم است.

اما همان طور که در شکل (۵) نیز دیده می شود، زمانی که در یک سیستم بسته، جریانی در مجاورت دیواره های باریک بوجود می آید، برای جبران این جریان، جریان معکوسی که مقدار آن با افزایش فاصله از مجاورت دیواره بیشتر می شود، وجود دارد.



شکل ۵: حرکت ذرات درون کیووت و نقاط لایه ساکن.

در این شرایط، در نقطه ای در دیواره کیووت، جریان الکترواسمز در اثر خنثی شدن دو جریان به وسیله یکدیگر صفر می شود. پس اگر در این نقطه، اندازه گیری تحرک الکتروفورتیکی انجام شود، اندازه سرعت ذرات به دست آمده، سرعت الکتروفورتیکی واقعی ذرات است؛ به این نقطه، به اصطلاح نقطه لایه ساکن<sup>۱۹</sup> گفته می شود. این نقطه محلی است که دو پرتو لیزر متقاطع اندازه گیری، پتانسیل زتا را بدون اشتباهات اثر الکترواسمز محاسبه می کند. بنابراین، همان طور که دیده می شود روش سرعت سنجی داپلر لیزر دارای مشکل است، زیرا اندازه تحرک الکتروفورتیکی را می تواند فقط در نقاط لایه ساکن، به درستی محاسبه کند و اندازه تحرک الکتروفورتیکی نقاط دیگر کیووت را به همراه تحرک متأثر از اثر الکترواسمز به دست می آورد. البته روش دیگری وجود دارد که به روش M3 معروف است که با استفاده از آن می توان تعیین اندازه تحرک الکتروفورتیکی در هر نقطه از کیووت را به دست آورد.

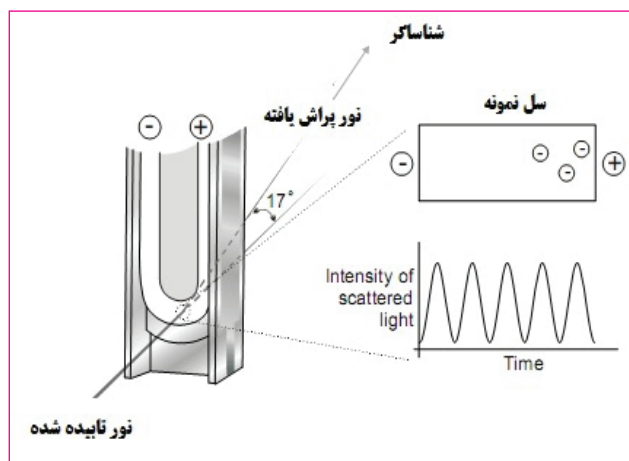


شکل ۳: سامانه ژل الکتروشیمیایی، شامل کیووت الکتروودار.

سرعت سنجی داپلر لیزر، روش مناسبی در شاخه مهندسی برای مطالعه گردش مایع در بازه های متنوع، از گردش تیغه های توربین های موتورهای جت مافوق صوت تا سرعت حرکت شیره در ساقه گیاه است.

با توجه به دو مثال فوق، در حقیقت با این روش می توان سرعت ذرات کوچک را داخل سیال در حال حرکت به دست آورد. بنابراین، سرعت سنجی داپلر لیزر، برای اندازه گیری سرعت حرکت ذرات در داخل یک سیال، بسیار مناسب است.

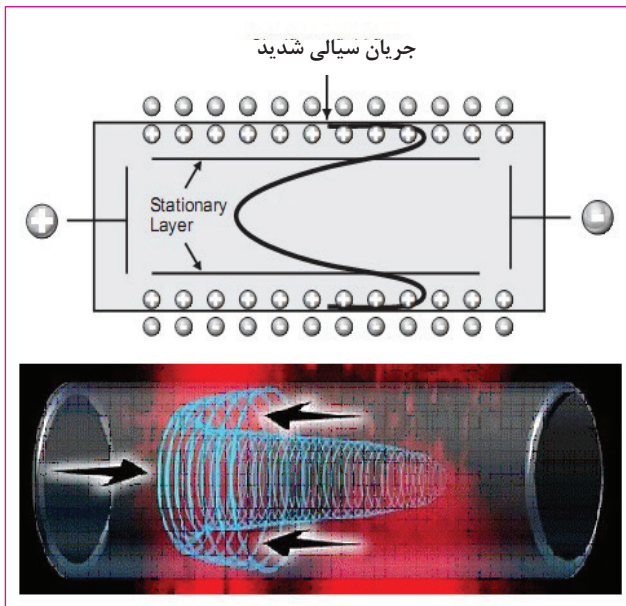
با توجه به شکل (۴)، پرتوهای مورد بررسی در روش ذکر شده، پرتوهایی هستند که با زاویه ۱۷ درجه از پرتو مرجع متفرق شده اند و این پرتوها با استفاده از شناساگر دریافت می شوند. نمودار شدت-بسامد به دست آمده از این تفرق پرتو، متناسب با سرعت ذرات است. در این مکانیزم یک پردازنده سیگنال های دیجیتال برای استخراج بسامدهای مشخص از این تفرق نور مورد استفاده قرار می گیرد.



شکل ۴: تهیه نمودار شدت-بسامد به دست آمده از پرتوهای متفرق شده.

#### ----- تلفیق کننده نوری<sup>۱۸</sup> -----

تلفیق کننده نوری به این صورت عمل می کند که با تلفیق پرتوهای موجود در دستگاه و نمونه، که شامل پرتوهای لیزر با یک بازتاب نوسانی است، می توان اندازه روشنی از پتانسیل زتا را به دست آورد. مزیت دیگری که استفاده از تلفیق کننده نوری دارد، برای ذراتی است که جابجایی خیلی کمی دارند و یا بدون



شکل ۶: معکوس شدن کند میدان الکتریکی در کیبوت.

### ----- معکوس شدن میدان الکتریکی اعمال شده تند -----

زمانی که میدان الکتریکی با سرعت بالا معکوس می‌شود، به دلیل اینکه در این شرایط حرکت الکترولیت متأثر از اثر الکترواستاز بسیار ناچیز و قابل چشم‌پوشی است، تحرک الکتروفوریتیکی ذرات به دست آمده به تحرک الکتروفوریتیکی واقعی ذره بسیار نزدیک است. اما مشکلی که وجود دارد این است که این تحرک الکتروفوریتیکی ذرات ثبت شده، تحرک الکتروفوریتیکی ذرات در یک بازه زمانی بسیار کوچک است که نمی‌تواند به جای میانگین تحرک الکتروفوریتیکی ذره و یا میانگین سرعت توزیع ذرات مورد استفاده قرار بگیرد. پس از اندازه‌گیری پتانسیل زتا به وسیله دو روش فوق، میانگین اندازه پتانسیل زتا از دو روش انجام گرفته، محاسبه می‌شود.

اندازه‌گیری پتانسیل زتا به روش M3 شامل بخش‌های زیر است:

- ▶ اندازه‌گیری پتانسیل زتا در حالت معکوس شدن آهسته که اندازه‌گیری دقیق‌تری نسبت به حالت معکوس شدن سریع است، اما اثر الکترواستاز روی حرکت ذرات در این حالت زیاد است.
- ▶ اندازه‌گیری پتانسیل زتا در حالت معکوس شدن سریع که اندازه دقیق‌تری از سرعت حرکت ذرات در یک بازه زمانی خیلی کوتاه می‌دهد.

▶ محاسبه پتانسیل زتای متوسط از اندازه‌گیری‌های دو روش بالا، با به دست آوردن مقدار اثر الکترواستاز از تفریق پتانسیل‌های زتا به دست آمده.

▶ استفاده از مقدار اثر الکترواستاز به دست آمده برای تعیین توزیع سرعت در حالت معکوس شدن آهسته و همچنین محاسبه اندازه پتانسیل زتا در مجاورت دیواره‌ها.

### ----- مزایای روش M3 -----

- ▶ روش M3 در کل برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا، روش ساده‌ای محسوب می‌شود.

### ----- روش M3 -----

یکی دیگر از روش‌های تعیین تحرک الکتروفوریتیکی، روش M3 است که برای محاسبه پتانسیل زتا به کار می‌رود. تعیین اندازه تحرک الکتروفوریتیکی به وسیله ذرات در روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر در منطقه لایه ساکن انجام می‌شود. موقعیت دقیق این حالت، در نزدیکی دیواره کیبوت است و این مقدار، مقدار متوسط تحرک الکتروفوریتیکی نیست. با استفاده از روش M3 می‌توان تعیین اندازه تحرک الکتروفوریتیکی را در هر نقطه از کیبوت انجام داد. روش M3 شامل دو بخش می‌شود:

- ▶ معکوس شدن کند میدان الکتریکی اعمال شده<sup>۲۰</sup>

- ▶ معکوس شدن تند میدان الکتریکی اعمال شده<sup>۲۱</sup>

در روش اندازه‌گیری M3، اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی در مرکز کیبوت انجام می‌شود که سریعتر از اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی به روش قبلی در منطقه لایه ساکن است. در واقع اندازه‌گیری به روش M3 می‌تواند در هر نقطه‌ای از کیبوت انجام شود، اما با توجه به دلایلی، اندازه پتانسیل زتا در مرکز کیبوت مورد تایید است و اندازه تحرک الکتروفوریتیکی در مرکز کیبوت می‌تواند حکم تحرک الکتروفوریتیکی متوسط نمونه آزمایشی را داشته باشد. این دلایل عبارتند از:

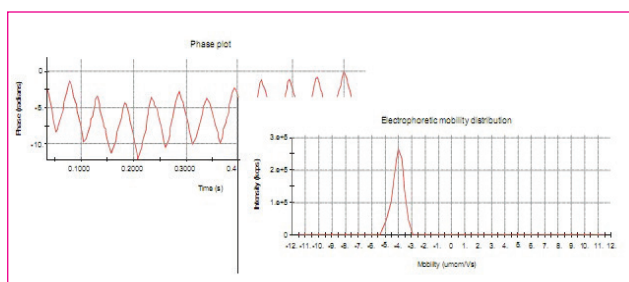
۱. منطقه مرکزی بزرگتر از منطقه مجاور دیواره‌ها است، بنابراین احتمال وقوع خطا کمتر بوده و اندازه به دست آمده به اندازه واقعی نزدیکتر است.
۲. هم‌ترازی در این منطقه بحرانی نیست.
۳. با اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی در مرکز کیبوت، بار موجود در دیواره‌ها را نیز می‌توان اندازه‌گیری نمود.

در تمام دستگاه‌هایی که تحرک الکتروفوریتیکی با استفاده از روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر به دست می‌آید، با معکوس شدن میدان الکتریکی اعمال شده، این کار انجام می‌شود. لازم به ذکر است که در اغلب این موارد، معکوس شدن میدان الکتریکی آهسته به کار می‌رود. این معکوس شدن میدان، به منظور کاهش قطبش الکترودها از محلول رسانا است. در روش M3، نیز معکوس شدن میدان الکتریکی اعمال شده صورت می‌گیرد. برای تعیین تحرک الکتروفوریتیکی به روش M3، این روش به دو قسمت تقسیم می‌شود. ابتدا تحرک الکتروفوریتیکی با معکوس شدن کند میدان الکتریکی اعمال شده محاسبه می‌شود و در مرحله دوم اندازه تحرک الکتروفوریتیکی با معکوس شدن تند میدان الکتریکی اعمال شده به دست می‌آید.

### ----- معکوس شدن کند میدان الکتریکی اعمال شده -----

این مرحله به خاطر کاهش قطبش اجتناب‌ناپذیر الکترودها در محلول رسانا انجام می‌شود. معمولاً معکوس شدن میدان الکتریکی یا در واقع جهت جریان میدان اعمال شده در این شرایط، در هر ثانیه یک بار معکوس می‌شود که این زمان به مایع درون دیواره‌ها اجازه می‌دهد تا در هر بار معکوس شدن میدان، اندازه جریان را به ثبات برساند (شکل ۶). در این اندازه‌گیری، سرعت واقعی ذرات به دست نمی‌آید، چون اثر الکترواستاز که باعث حرکت مایع درون دیواره‌های کیبوت می‌شود، مقدار قابل توجهی است و نمی‌توان از مقدار آن صرف نظر نمود.

شده مشخص، می‌تواند اثرات مختلف را از هم تفکیک نماید. در روش M3، در حالتی که سرعت معکوس شدن میدان اعمالی تند باشد، اثر الکترواسمز ناچیز است و به همین دلیل، اختلاف بین دو فاز در یک ذره ساکن، ثابت می‌ماند. سپس با کوچکترین حرکت ذره نمودار فاز تغییر خواهد نمود. تغییرات فاز شدت نسبت به تغییرات بسامد که در روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر مورد استفاده قرار می‌گیرد، بسیار حساس‌تر است و به این ترتیب میزان تحرک الکتروفوریتیکی به‌دست آمده از روش M3-PALS که مخلوطی از دو روش قبلی است، دقیق‌تر است. در شکل (۷) نیز تحرک الکتروفوریتیکی و در نتیجه پتانسیل زتا که از مجموع اندازه‌گیری تغییرات فاز در طول معکوس شدن تند میدان الکتریکی اعمال شده به‌دست آمده، مشاهده می‌شود.



شکل ۷: تغییرات فاز در معکوس شدن میدان اعمال شده تند و پتانسیل زتا

عملکرد دستگاه DLS سری نانو برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا همان‌طور که در شکل (۸) دیده می‌شود، سیستم اندازه‌گیری پتانسیل زتا نیز مانند سیستم اندازه‌گیری تعیین توزیع اندازه ذرات شامل (۷) بخش اصلی است که عبارتند از:

۱. لیزر
۲. سل ۲۳ یا کیووت ۲۴
۳. شناساگر ۲۵
۴. پردازنده دیجیتال سیگنال ۲۶
۵. رایانه
۶. تضعیف کننده ۲۷ لیزر
۷. قطعات اصلاح کننده ۲۸

نخستین بخش دستگاه DLS، لیزر است. پرتویی که از این منبع تابیده می‌شود به دو قسمت پرتوی مرجع و پرتوی پراشیده ۲۹ تقسیم می‌شود. همان‌طور که در شکل (۸) دیده می‌شود، پرتوی لیزری که از قسمت پرتوی ساطع تابانده شده از وسط نمونه‌ای که درون کیووت قرار گرفته است، عبور می‌کند و آن قسمت از پرتویی که با زاویه ۱۷ درجه متفرق شده است، توسط شناساگر دریافت می‌شود. زمانی که یک میدان الکتریکی خارجی به نمونه اعمال می‌شود، ذرات درون دیسپرسانت حرکت می‌کنند و در نتیجه نوسانات شدت پرتو با یک بسامد مشخص با استفاده از شناساگر ثبت می‌شود که این بسامد متناسب با سرعت حرکت ذرات است. سپس شناساگر این اطلاعات را به پردازنده دیجیتال سیگنال برای تبدیل به زبان دیجیتال ارسال می‌کند.

برخلاف روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر که فقط از نقاط لایه ساکن قادر به اندازه‌گیری پتانسیل زتا است، در این روش می‌توان از تمام نقاط کیووت اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی را انجام داد.

با کاهش تعداد متغیرهای اندازه‌گیری، قابلیت تکرار و در نتیجه دقت اندازه‌گیری بهبود می‌یابد.

در این روش نیاز نیست که اپراتور برای هر سامانه کلونیدی مورد آزمایش، دستگاه را متناسب با عوامل مناسب آن سامانه تنظیم کند.

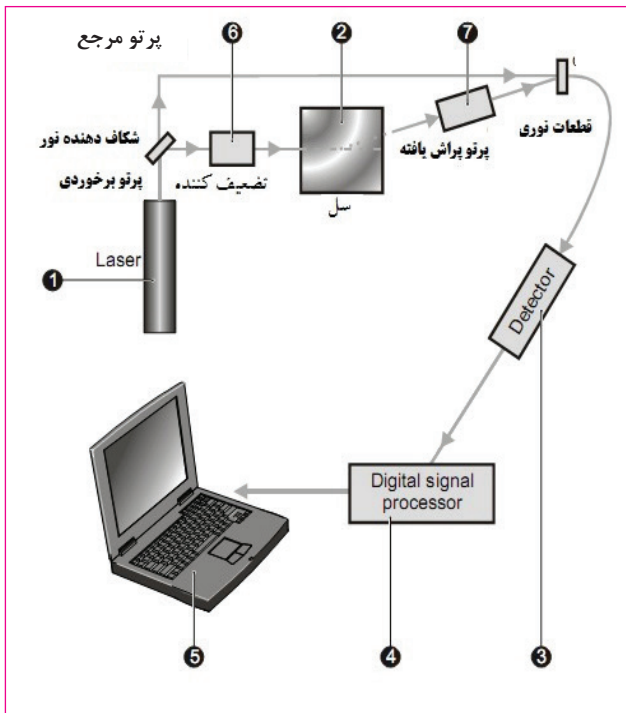
همان‌طور که بیان شد، روش‌های قبلی سرعت‌سنجی داپلر لیزر و M3، نتوانستند تحرک الکتروفوریتیکی متوسط نمونه‌های آزمایشی را با دقت بالا به‌دست آورند. بعضی از سازندگان دستگاه DLS از روشی استفاده کرده‌اند که می‌تواند اندازه تحرک الکتروفوریتیکی را در هر نقطه از کیووت، با دقتی بالاتر از دو روش قبل به‌دست آورد. این روش در واقع ترکیبی از دو روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر و تفرق نور تحلیلی فاز ۲۲ است که به آن روش M3-PALS گفته می‌شود که برای بهبود نتایج آزمایش روش M3 با PALS ترکیب می‌شود.

#### ---- روش PALS ----

روش PALS می‌تواند سبب بهبود نتایج آزمایش اندازه‌گیری پتانسیل زتا به روش سرعت‌سنجی داپلر لیزر و M3 شود که بالا بردن دقت اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی ذرات سبب بهبود این عامل می‌شود. همچنین استفاده از روش PALS، به کاربر این امکان را می‌دهد تا بتواند از ذراتی که سرعت حرکت آنها خیلی کم است و یا ذراتی که دارای خاصیت رسانایی الکتریکی بالایی هستند نیز آزمایش اندازه‌گیری پتانسیل زتا را انجام دهد. همچنین با استفاده از اعمال ولتاژ کم در این روش می‌توان از بروز هرگونه خطر در هنگام انجام آزمون روی ذراتی که دارای مقاومت الکتریکی بالا هستند، جلوگیری نمود.

#### ---- ساز و کار روش PALS ----

در روش ولوسیمتری داپلر لیزر برای اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی ذرات از تغییرات شدت-بسامد، ناشی از حرکت ذرات استفاده می‌شود، اما در روش PALS، همان‌طور که از اسمش هم پیداست، تغییرات فاز برای اندازه‌گیری تحرک الکتروفوریتیکی ذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار و اندازه فاز در تفرق نور برای جابجایی ذره ثابت است و مقدار آن حفظ می‌شود، اما مقدار و اندازه فاز نسبت به سرعت ذره متغیر است. تغییرات فازی بر اثر سرعت ذره به‌دست می‌آید و با فاز پرتو مرجع مقایسه می‌شود. از این مقایسه، پرتوی که نسبت کوچکی از پرتو لیزر اصلی که به عنوان مرجع استفاده شده است، بدست می‌آید. از روی تجزیه و تحلیل سیگنالی فاز، دستگاه قادر خواهد بود که اثر الکتروفوریتیکی و حتی حضور اثرات دیگری نظیر رانش‌های حرارتی را که در نمونه‌های با مقاومت الکتریکی بالا به چشم می‌خورد، محاسبه کند. توانایی انجام این قابلیت به این خاطر است که نمودار تغییرات فاز با به کارگیری میدان الکتریکی اعمال



شکل ۸: نمایی از قسمت‌های دستگاه DLS.

این اطلاعات به رایانه داده می‌شود تا با نرم‌افزار دستگاه DLS یک طیف بسامد از تحرک الکتروفورتیکی به دست آید که از روی این اطلاعات، پتانسیل زتا محاسبه می‌شود.

شدت نور متفرق شده درون کیووت باید در یک محدوده خاص باشد تا شناساگر بتواند مقدار آن را دقیق اندازه‌گیری کند. اگر نور دریافتی توسط شناساگر زیاد باشد، از تضعیف کننده لیزر استفاده می‌شود تا شدت نور تابانده شده را کاهش دهد، از این رو کاهش شدت نور متفرق شده به دست می‌آید.

اما برای ذراتی که نور را خیلی کم متفرق می‌کنند یا ذراتی که خیلی کوچک هستند و یا ذراتی که غلظت کمی دارند، باید مقدار نور متفرق شده افزایش پیدا کند. تضعیف کننده به صورت خودکار اجازه دارد که مقدار نور تابانده شده به نمونه را در این موارد افزایش دهد. برای نمونه‌هایی که نور زیادی متفرق می‌کنند، ذرات درشت و ذراتی که غلظت بالایی دارند، مقدار نور متفرق شده را باید کاهش داد. تضعیف کننده به‌طور خودکار قادر است که مقدار نور تابانده شده به نمونه را کاهش دهد. برای هر اختلاف در ضخامت دیواره کیووت و ضریب شکست‌های مختلف دیسپرسانت نیز، قطعات اصلاح کننده نوری در مسیر پرتوهای متفرق شده برای هم‌تراز قرار دادن این پرتوها نصب شده‌است.

## نتیجه‌گیری

یکی از آزمون‌هایی که دستگاه DLS انجام می‌دهد، آزمون اندازه‌گیری پتانسیل زتا است. پتانسیل زتا در حوزه‌های مختلفی کاربرد دارد. در حوزه‌هایی که معلق ماندن فاز جامد در مایع و فاز مایع در مایع دارای اهمیت باشد، مانند داروسازی، سرامیک، مواد غذایی و غیره، اندازه‌گیری پتانسیل زتا می‌تواند سبب بهبود کیفیت این محصولات شود و زمینه پیشرفت تحقیقات را در این زمینه‌ها فراهم سازد. دستگاه DLS با ابداع یک روش برای انجام آزمون اندازه‌گیری پتانسیل زتا که ترکیبی از دو روشی است که پیش از این مورد استفاده قرار می‌گرفته، توانسته با کاهش زمان انجام آزمون، بالا بردن دقت آزمون و کاهش خطای اندازه‌گیری، کیفیت نتایج به دست آمده از آزمون را ارتقا بخشد و انجام آزمون را برای نمونه‌هایی مانند، نمونه‌هایی که رسانایی خیلی بالا دارند و یا نمونه‌هایی که دارای مقاومت الکتریکی زیادی هستند و اندازه‌گیری پتانسیل زتا در آنها کار دشواری محسوب می‌شود را آسان سازد.

## پی‌نوشت

- |                              |                                     |  |
|------------------------------|-------------------------------------|--|
| 24. Cuvette                  | 12. Streaming potential             | ۱. کارشناس ارشد فناوری‌نانو، آزمایشگاه فناوری‌نانو کفا |
| 25. Detector                 | 13. sedimentation potential         |  |
| 26. Digital signal processor | 14. electroforesis                  | ۲. کارشناس ارشد مهندسی مواد، آزمایشگاه فناوری‌نانو کفا |
| 27. Attenuator               | 15. Smoluchowski                    |  |
| 28. Compensation optics      | 16. Huckel                          | 3. Dynamic light scattering(DLS)                       |
| 29. Incident Beam            | 17. Laser Doppler Velocimetry       | 4. Zeta potential                                      |
|                              | 18. Optical Modulator               | 5. Electrical double layer                             |
|                              | 19. Stationary layer                | 6. Stern layer   |
|                              | 20. Slow Field Reversal(SFR)        | 7. Hydrodynamic shear                                  |
|                              | 21. Fast Field Reversal(FFR)        | 8. Isoelectric point                                   |
|                              | 22. Phase Analysis Light Scattering | 9. Electrokinetic                                      |
|                              | 23. Cell                            | 10. Electrophoretic                                    |
|                              |                                     | 11. Electroosmosis                                     |

## مراجع

- [1] Zetasizer Nano User Manual May 2008  
[3] www.wikipedia.com

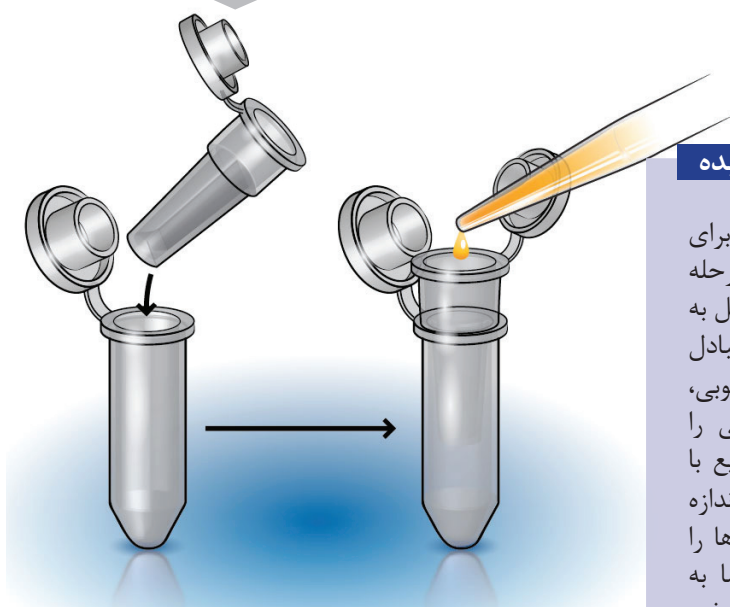
## نویسندگان

مریم یوسفی<sup>۱\*</sup>، مهدی محمدی<sup>۲</sup>،محمود نادری<sup>۳</sup>

m.yousefi@avicenna.ac.ir

روش‌های کروماتوگرافی برای  
تخلیص پروتئین‌ها

(قسمت اول)



## چکیده

به منظور دستیابی به خلوص بالایی از پروتئین، چه برای مقاصد تجزیه‌ای و چه درمانی، استفاده از چندین مرحله کروماتوگرافی نیاز است. چندین روش کروماتوگرافی برای نیل به این هدف وجود دارد که از میان آن‌ها می‌توان، روش‌های تبادل یونی در pHهای مختلف، کروماتوگرافی برهم‌کنش هیدروفوبی، کروماتوگرافی اندازه‌طردی و کروماتوگرافی میل ترکیبی را نام برد. جداسازی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا<sup>۵</sup> در روش‌های فاز معکوس، تبادل یونی و اندازه‌طردی انجام می‌شود. کروماتوگرافی فاز معکوس، پروتئین‌ها را براساس هیدروفوبیسیته نسبی آنها جداسازی می‌کند، اما به دلیل استفاده از حلال‌های آلی و احتمال از بین رفتن برخی ترکیبات، این روش به‌طور عام برای همه پروتئین‌ها قابل انجام نیست. در کروماتوگرافی تبادل یونی، جداسازی براساس بار پروتئین‌ها صورت می‌گیرد ولی در کروماتوگرافی اندازه‌طردی، براساس اندازه خلل و فرج فاز ساکن، پروتئین‌های بزرگ‌تر از پروتئین‌های کوچک‌تر جدا می‌شوند. کروماتوگرافی میل ترکیبی، مکمل فرآیندهای تخلیص پروتئین است و در آن مواد پرکننده ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاندی است که آن لیگاند، به‌صورت ویژه به پروتئین هدف، متصل می‌شود.

## واژه‌های کلیدی

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، پروتئین، کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی براساس برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک.

به‌طور کلی می‌توان گفت هیچ روش منحصر به فردی برای جداسازی همه انواع پروتئین‌ها وجود ندارد. یک روش خالص‌سازی پروتئین می‌تواند منجر به غیرفعال شدن بقیه پروتئین‌ها شود و میزان درجه خلوص نیز به هدف مورد نظر (تجزیه‌ای و یا درمانی) بستگی دارد. برای پروتئینی که برای اهداف درمانی مورد نظر است، هدف خالص‌سازی تنها جداسازی نیست؛ بلکه رسیدن به غلظت مورد نظر و انتقال پروتئین به محیطی که پایدار باشد نیز اهمیت دارد.

در آغاز دوران شیمی پروتئین، تنها روش جداسازی پروتئین‌ها، استفاده از تفاوت حلالیت نسبی آن‌ها با هم بود. بخشی از مخلوط، از طریق تغییر خواص حلال با افزودن نمک‌ها، حلال‌های آلی، پلیمرها، تغییر pH یا تغییر دما، رسوب‌دهی می‌شد. رسوب‌دهی جزء به جزء، امروزه برای جداسازی پروتئین‌های غشایی و نوکلئیک اسیدها به کار می‌رود. از اصول جذب سطحی در کروماتوگرافی ستونی استفاده وسیعی می‌شود. در شرایط خاصی، پروتئین‌ها می‌توانند روی فازهای جامد، به روش اختصاصی جذب شوند. در گذشته ژل‌های کلسیم فسفات غالباً برای جذب پروتئین‌ها به‌صورت اختصاصی از مخلوط‌های هتروژن حاوی چندین پروتئین استفاده شده‌اند. به علت قدرت جداسازی بالای روش‌های کروماتوگرافی، سازوکارهای مختلفی برای جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از آن ابداع شده‌است.

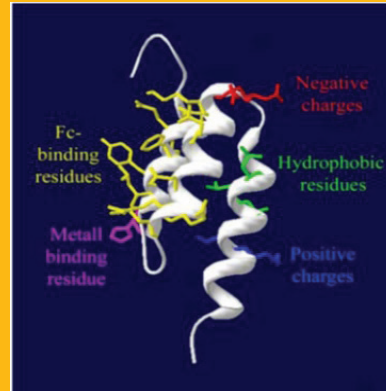
از ویژگی‌های عمومی پروتئین‌ها، می‌توان برای جداسازی آنها از همدیگر و همچنین جداسازی ناخالصی‌های غیرپروتئینی استفاده نمود. تفاوت‌های کوچک میان پروتئین‌ها، مانند اندازه، بار، هیدروفوبیسیته و برهم‌کنش‌های ویژه‌ی زیستی<sup>۶</sup> از جمله این ویژگی‌ها هستند (شکل ۱).

در یک فرآیند معمول کروماتوگرافی، اولین مرحله، مرحله به دام اندازی<sup>۷</sup> است که ماده مورد نظر به سطح جاذب متصل می‌شود در حالی که ناخالصی‌ها اتصال نمی‌یابند. پس از آن، پروتئین‌هایی که به میزان ضعیفی اتصال یافته‌اند قبل از تغییر شرایط به منظور شویش پروتئین مورد نظر، خارج می‌شوند [۶-۱].

انواع روش‌های کروماتوگرافی مایع (که عمدتاً در نوع فاز ساکن متفاوت هستند) برای خالص‌سازی پروتئین استفاده می‌شوند. تنها، فرآیند کروماتوگرافی اندازه‌طردي تا حدی متفاوت است؛ زیرا جداسازی در آن براساس تفاوت اندازه پروتئین‌ها و اندازه حفره‌های فاز ساکن است و نه براساس جذب سطحی. مقایسه دو روش کروماتوگرافی تبادل یونی و اندازه‌طردي در شکل (۲) نشان داده شده‌است.



شکل ۲: دو روش کروماتوگرافی کلاسیک الف- کروماتوگرافی تبادل یونی، تفاوت در بار پروتئین‌ها باعث جداسازی است. ب- کروماتوگرافی اندازه‌طردي، اندازه پروتئین‌ها باعث جداسازی است.



شکل ۱: تصویری از ویژگی‌های خاص پروتئین‌ها که به‌عنوان مبنایی برای جداسازی آنها از یکدیگر به‌کار می‌رود.

به‌طور کلی، روش‌های تخلیص پروتئین‌ها با استفاده از کروماتوگرافی را می‌توان به چهار دسته عمده کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی بر پایه هیدروفوبیسیته، کروماتوگرافی میل ترکیبی و کروماتوگرافی اندازه‌طردي تقسیم‌بندی نمود. در قسمت اول این مقاله، به دو روش نخست پرداخته خواهد شد و دو روش دیگر در قسمت دوم مقاله مورد بحث قرار خواهند گرفت.

## کروماتوگرافی تبادل یونی

برهم‌کنش‌های یونی، اساس خالص‌سازی پروتئین‌ها با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی<sup>۸</sup> است. جداسازی در این روش، در اثر رقابت میان پروتئین‌ها با بارهای سطحی مختلف برای گروه‌های دارای بار مخالف روی سطح بستر تبادل یونی انجام می‌شود. اولین ستون‌های تبادل یونی سنتزی، ماتریس‌های پلیمری هیدروفوبی هستند که با گروه‌های یونی استخلاف‌دار شده بودند؛ اما به‌دلیل نفوذپذیری پایین آن‌ها، این ماتریس‌ها ظرفیت پایینی برای مولکول‌های بزرگی چون پروتئین‌ها داشتند. به علاوه، ماهیت هیدروفوب ماتریس، باعث تخریب پروتئین‌ها می‌شد. در اواخر دهه ۱۹۵۰ که ترکیبات ماکروپوروس<sup>۹</sup> با ماهیت هیدروفیلی ساخته شدند، کروماتوگرافی ماکرومولکول‌های بیولوژیکی به ابزاری متداول برای جداسازی تبدیل شد.

### ◆ بار پروتئین‌ها

پروتئین‌ها، ترکیبات آمفولیتی دارای بار مثبت و منفی هستند. نقطه ایزو الکتریک یک پروتئین (pI) (pH) که در آن، بار کل پروتئین صفر است) به میزان دنباله‌های آمینو اسیدی قابل یونیزه

شدن در ساختار آن بستگی دارد. بارهای مثبت، بیشتر به‌وسیله آمینو اسیدهای آرژینین، لیزین و هیستیدین بسته به pH بافر، ایجاد می‌شوند. هر آمین N-ترمینالی در pH پایین‌تر از ۸ دارای بار مثبت است. بارهای منفی نیز بیشتر در نتیجه آمینو اسیدهای آسپارات، گلوتمات و گروه‌های کربوکسیل C-ترمینال ایجاد می‌شوند. تقریباً همگی این دنباله‌های آمینو اسیدی در pH بالاتر از ۶ یونیزه می‌شوند. گروه‌های باردار، تقریباً همگی روی سطح پروتئین قرار دارند. تلفیقی از اثرات همه زنجیره‌های جانبی باردار، به پروتئین بار خالصی می‌بخشد که به pH نیز بستگی دارد. [۷].

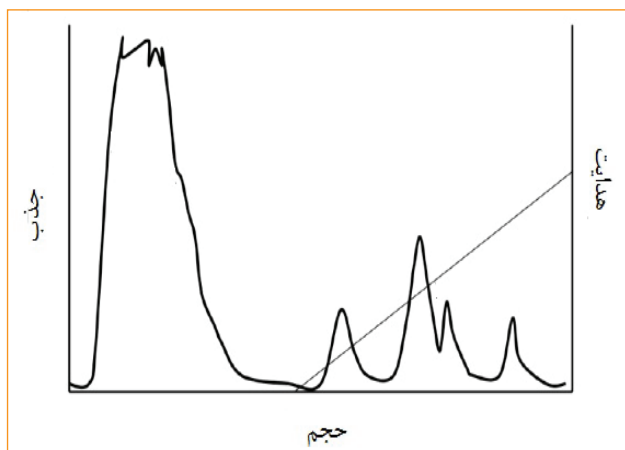
با توجه به موارد گفته شده، پروتئین‌ها را می‌توان با استفاده از بارهای مثبت آنها روی فاز ساکن آنیونی و یا با استفاده از بارهای منفی آنها روی فاز ساکن کاتیونی جداسازی نمود. به‌طور کلی، کروماتوگرافی تبادل آنیونی در مقادیر pH بالاتر از نقطه ایزو الکتریک پروتئین مورد نظر انجام می‌شود در حالی که کروماتوگرافی تبادل کاتیونی در پایین‌تر از نقطه ایزو الکتریک پروتئین انجام می‌شود با توجه به محدوده pH که پروتئین در آن پایدار است، محدود می‌شود. برای دستیابی به نتایج مناسب، pH بافر مورد نظر باید حداقل یک واحد بیشتر یا پایین‌تر از نقطه ایزو الکتریک آنالیتی که جداسازی می‌شود، باشد [۸].



فاز ساکن متصل می شوند. اگر اجزای نمونه به صورت متفاوتی جذب ستون شوند و با یک نسبت حلال ثابت جداسازی شوند، نیازی به تغییر ترکیب بافر نیست و این نوع شستشو، شستشوی ایزوکراتیک نام دارد. اما اغلب، با تغییر بافر، برخی پروتئین ها از ستون به طور ویژه جدا می شوند.

از دو روش کلی برای این منظور استفاده می شود: تغییر pH بافر شستشو دهنده و یا افزایش قدرت یونی محیط با افزودن NaCl. اگر روش اول، تغییر pH استفاده شود، یک ستون تبادل آنیونی باید با کاهش pH شسته شود تا بار منفی پروتئین هایی که به ستون متصل شده اند را کم تر کند؛ در حالی که ستون تبادل کاتیونی باید با افزایش pH شسته شود تا بار مثبت پروتئین هایی که به ستون متصل شده اند را کاهش دهد. گر چه در عمل، روش تغییر pH چندان موفق نیست؛ زیرا بسیاری از پروتئین ها در محدوده نزدیک به نقطه ایزو الکتریک خود حلالیت اندکی نشان می دهند و باید مراقب رسوب دهی آن ها در ستون بود.

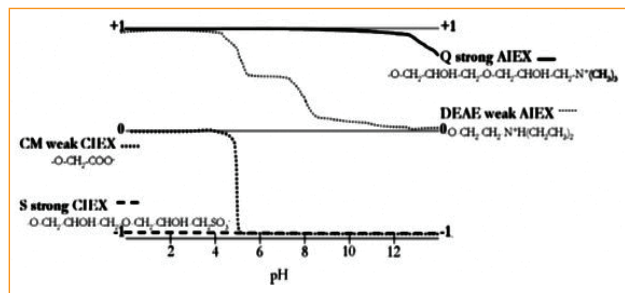
راهبرد متداول تر، افزایش غلظت یک نمک غیربافری مانند NaCl است. این یون ها با پروتئین، برای اتصال به رزین رقابت می کنند، پروتئین هایی که بار کم تری دارند در غلظت های پایین تر نمک، از ستون خارج می شوند در حالی که پروتئین هایی که بار بیشتری دارند در غلظت های بالاتر نمک، از ستون خارج می شوند. در شستشوی گرادایانی (شکل ۴) غلظت بافر به طور متناوب تغییر داده می شود. در ابتدا پروتئینی که ضعیف تر متصل شده بود از ستون خارج شده و در غلظت های کمی بالاتر بافر پروتئین دوم خارج می شود و به همین ترتیب جداسازی انجام می شود. شستشوی گرادایانی منجر به جداسازی بهتری می شود، زیرا در این روش به دلیل افزایش تدریجی قدرت شویندگی، پیک ها خیلی پهن نمی شوند. کاهش شیب گرادایانی منجر به جداسازی بهتر می شود؛ اگر شیب بیشتر کاهش یابد، پروتئین ها هم رقیق تر می شوند. اما به دلیل نیاز به تجهیزات بیشتر، شستشوی گرادایانی در فرآیندهای صنعتی مناسب نیست. بهترین شرایطی که در شستشوی گرادایانی می توان به آن دست یافت، این است که در مرحله اول، ناخالصی ها را خارج ساخته و پس از آن، پروتئین مورد نظر و در نهایت تمامی نمونه هایی که محکم به ستون متصل شده اند را از ستون خارج ساخت.



شکل ۴: کروماتوگرام تبادل یونی، کروماتوگرام حاصل از تخلیص با ستون تبادل یونی با استفاده از شستشو با گرادایان غلظت نمک.

## ◆ فاز ساکن

خواص بستر تبادل یون، تأثیر مهمی بر جداسازی دارد. ستون های تبادل یون به دو دسته ضعیف و قوی تقسیم می شوند (شکل ۳). این نامگذاری به میزان pKa گروه های باردار روی بستر (اسید یا باز قوی و ضعیف) بستگی دارد و رابطه ای با قدرت برهم کنش آن با نمونه مورد آنالیز ندارد.



شکل ۳: منحنی های یونیزاسیون متداول ترین تبادلگرهای یونی. تبادلگرهای قوی Q و S در تمامی pH های قابل استفاده برای جداسازی پروتئین، باردار هستند.

تبادلگرهای یونی قوی، گروه های عاملی چون سولفونات و آمونیوم نوع چهارم دارند که pKa آنها خارج از محدوده ای است که برای اغلب پروتئین ها استفاده می شود (یعنی در pH ۴ تا ۱۰). بنابراین، تغییرات pH اثری بر بار تبادلگر یونی ندارد. اما تبادلگرهای یونی ضعیف، گروه های عاملی چون کربوکسیلات و دی اتیل آمونیوم با دامنه pH قابلیت استفاده محدود دارند. بنابراین، پروتئین هایی که خصلت یونیزه شدن ضعیفی دارند و برای یونیزه شدن به pH خیلی بالا یا خیلی پایینی نیز نیاز دارند را تنها با تبادلگرهای یونی قوی می توان جداسازی نمود. از طرف دیگر، برای پروتئین هایی که بار بالایی دارند، تبادلگرهای یونی ضعیف به چند دلیل مناسب هستند که از جمله آن ها می توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱. کاهش تمایل به تخریب نمونه؛
۲. عدم توانایی آن ها برای اتصال به ناخالصی هایی که بار ضعیف دارند؛
۳. افزایش قدرت تفکیک ستون.

## ◆ فاز متحرک

هدایت و pH بافر، اهمیت بسیار زیادی دارند، زیرا میزان جذب سطحی با این عوامل تعیین می شود. برای جداسازی، باید هدایت پایین و pH که به پروتئین بار مناسبی ببخشد، انتخاب شود. نوع یون های بافر هم بر جداسازی اثر می گذارند. برای مثال، جاذبه الکتروستاتیک میان دو بار مخالف در یک محیط آب گریز بیشتر است. در بسیاری از موارد، بافر آمونیوم استات میزان جداسازی را افزایش می دهد. این بافر همچنین فرار است و به آسانی با لیوفیلیزه شدن از محیط حذف می شود.

## ◆ راهبرد شویش

به طور کلی، پروتئین هایی که بار مشابه با رزین دارند بدون جذب شدن از آن رد می شوند، در صورتی که پروتئین های با بار مخالف به

جذب سطحی پروتئین‌ها یک فرآیند مساعد ترمودینامیکی است که نیروی محرکه آن انتروپی و کاهش مساحت سطح است.

#### ◆ کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز

کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز (HIC)، براساس برهم‌کنش برگشت‌پذیر میان سطح پروتئین و یک فاز ساکن کروماتوگرافی با ماهیت آب‌گریزی است. پروتئین‌ها براساس تفاوت در میزان آمینو اسیدهای آب‌گریز در دست‌رسان جداسازی می‌شوند. برای تسهیل برهم‌کنش‌های آب‌گریز، مخلوط پروتئین در حضور بافری با غلظت بالای نمک روی سطوح بارگذاری می‌شود.

مفهوم جداسازی پروتئین‌ها براساس HIC در سال ۱۹۴۸ توسط تیسلیوس<sup>۱۲</sup> پایه‌گذاری شد، و این در زمانی بود که وی برای اولین بار گزارش نمود که پروتئین‌ها در بافری که حاوی نمک است بازدار می‌شوند و این پدیده‌ای است که کروماتوگرافی نمک زنی<sup>۱۳</sup> نامیده می‌شود. وی گزارش نمود که پروتئین‌ها و دیگر موادی که در غلظت‌های بالای نمک‌های خنثی، رسوب داده می‌شوند اغلب در غلظت‌های پایین‌تر از حدی که برای رسوب‌دهی آن‌ها مورد نیاز است با شدت بالایی جذب سطحی می‌شوند و جاذب‌هایی که در محلول‌های عاری از نمک، کشش بسیار اندکی به پروتئین‌ها نشان می‌دهند در غلظت‌های نسبتاً بالاتر، جاذب‌های بسیار ایده‌آلی هستند که از آن زمان تاکنون پیشرفت‌های زیادی در توسعه این روش حاصل شده‌است. اولین ماتریس مورد استفاده، ماتریسی با خواص آب‌گریزی - یونی بود. پس از آن جاذب‌های آب‌گریز بدون بار سنتز شده و در نتیجه آن خصلت آب‌گریزی پدیده جذب سطحی ثابت گردید. این پیشینه موجب پیشنهاد نامی در سال ۱۹۷۳ شد، نامی که اکنون پذیرفته شده‌است: کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز. همچنین اثبات گردید که اتصال پروتئین‌ها با افزایش غلظت نمک‌های خنثی افزایش می‌یابد و شویس پروتئین‌های اتصال یافته به بستر، به آسانی از طریق شستشوی ستون با بافرهای عاری از نمک و یا کاهش قطبیت شوینده انجام می‌شود [۹-۱۳].

#### ◆ فاز ساکن

بسیاری از انواع ماتریس‌ها برای استفاده به‌عنوان جاذب در HIC مناسب هستند اما عمده‌ترین جاذب مورد استفاده آگاروز بوده است. زمانی که این روش در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا هم استفاده شد، سیلیکا و رزین پلیمرهای آلی هم مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجا که شویس، در قدرت یونی پایین انجام می‌شود، جاذب حتی‌الامکان باید بدون بار باشد تا برهم‌کنش یونی میان پروتئین و ماتریس رخ ندهد. لیگندهایی که بیشترین استفاده را در HIC داشته‌اند، آلکان‌های با زنجیر خطی یا بدون گروه آمین انتهایی بوده‌اند. به‌طور کلی، لیگندهای آلکیل (به‌عنوان نمونه، بوتیل یا اکتیل) خصلت آب‌گریزی مطلق دارند. گاهی اوقات بهتر است که از لیگندهای آریل (به‌عنوان نمونه، فنیل) استفاده نمود که برهم‌کنش‌های آروماتیک ( $\pi-\pi$ ) را هم فراهم می‌آورند. یک گروه فنیل، همان آب‌گریزی گروه پنتیل را دارد در حالی که گزینش‌گری کاملاً متفاوتی با یک لیگاند پنتیل دارد؛ زیرا گروه‌های آروماتیک روی پروتئین، تنها به‌طور ویژه با لیگندهای آروماتیک برهم‌کنش می‌کنند.

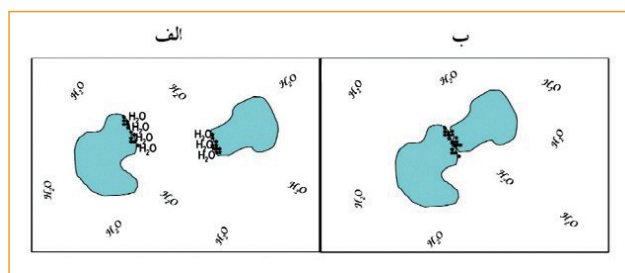
#### روش‌های کروماتوگرافی بر پایه آب‌گریزی

پروتئین‌ها را می‌توان براساس تفاوت آب‌گریزی آنها با دو روش مختلف کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز<sup>۱۰</sup> و کروماتوگرافی فاز معکوس<sup>۱۱</sup> جداسازی نمود. در هر دو روش، پروتئین‌ها با درجه‌های متفاوتی بر حسب میزان آب‌گریزی آنها به یک بستر آب‌گریز متصل می‌شوند. ماهیت برهم‌کنش آب‌گریز هنوز مورد بحث است ولی می‌توان آن را ناشی از اثر انتروپی دانست.

#### ◆ آب‌گریزی

آب‌گریزی به خاصیت فیزیکی مولکولی که آب را دفع می‌کند، بر می‌گردد. در حال حاضر، هیچ روش اندازه‌گیری منحصر به فرد مورد پذیرشی برای آب‌گریزی پروتئین‌ها وجود ندارد. مقیاس‌های متفاوت آب‌گریزی براساس انرژی آزاد انتقال آمینو اسیدها از حلال آلی به آب به وجود آمده است. به‌طور کلی، آمینو اسیدهای آب‌گریز آن‌هایی هستند که زنجیره جانبی آن‌ها فاقد گروه‌های عاملی است که قادر به تشکیل پیوندهای هیدروژنی باشند (به‌عنوان نمونه، ایزولوسین، والین، لوسین و فنیل آلانین) بنابراین، تمایلی به حضور در آب ندارند. به همین دلیل، اغلب این آمینو اسیدها درون حفره هیدروفوبی پروتئین‌ها و یا درون بخش لیپیدی غشا وجود دارند. از آنجایی که تنها بخش کوچکی از آمینو اسیدها درون حفره‌ها پوشانده می‌شوند، برخی از آمینو اسیدهای آب‌گریز همچنان روی سطح باقی می‌مانند. بنابراین، آب‌گریزی کل پروتئین، مجموع آب‌گریزی زنجیره‌های جانبی و اسکلت اصلی پروتئین است.

در یک محلول آبی، مناطق هیدروفوب روی پروتئین با یک فیلم منظم از مولکول‌های آب پوشانده می‌شوند (شکل ۵-الف). این درجه نظم بالای مولکول‌های آب، منجر به کاهش انتروپی ( $\Delta S < 0$ ) می‌شود. در نتیجه، ترکیبات هیدروفوب به‌صورت خود به خود، به‌منظور به حداقل رساندن مناطق آب‌گریز در معرض حلال، مجتمع می‌شوند (شکل ۵-ب).



شکل ۵: برهم‌کنش هیدروفوبیک. الف) مولکول‌های آب در اطراف سطح هیدروفوب آرایش منظمی دارند. ب) زمانی که دو سطح هیدروفوب به هم نزدیک می‌شوند با هم برهم‌کنش داده و همدیگر را می‌پوشانند و مولکول‌های آب را به درون توده محلول می‌رانند.

این پدیده از لحاظ انرژی هم بسیار مساعد است زیرا مولکول‌های آب که به شیوه‌ای منظم اطراف گروه‌های آب‌گریز قرار گرفته بودند به توده حلال که حاوی مولکول‌های آب است بر می‌گردند. این امر منجر به افزایش انتروپی سیستم شده که به نوبه خود باعث کاهش انرژی آزاد سیستم ( $G = \Delta H - T\Delta S$ ) می‌شود. بنابراین،

کاهنده قطبیت مانند اتیلن گلیکول نیز می‌تواند پس از حذف نمک از ستون و یا هم‌زمان با کاهش غلظت نمک انجام شود. گاهی برای خالص‌سازی پروتئین‌های غشایی، افزودن زداینده (معمولاً ۱ درصد) به‌عنوان جایگزینی برای پروتئین لازم است. در برخی موارد نیز اتصال به حدی قوی است که فرآیند کروماتوگرافی برای آن عملی نیست و عملاً اتصال، برگشت‌ناپذیر است. اگر برای شکست اتصال چنین پروتئین‌هایی نیاز به افزودن حلال‌های آلی، زداینده و یا عوامل کی‌لیت‌ساز باشد، امکان تخریب ساختار پروتئین نیز وجود دارد. شستشوی گرادانی خطی ساده، اولین انتخاب در آزمایش‌های اولیه است، اما برای جداسازی بهتر در مناطقی که جداسازی به خوبی انجام نمی‌شود باید این گرادیان آهسته‌تر تغییر کند. در کاربردهای صنعتی تخلیص پروتئین، شستشوی مرحله‌ای مناسب‌تر از گرادیان است زیرا ساده‌تر و تکرار پذیرتر است.

کروماتوگرافی تبادل یونی یکی از قوی‌ترین روش‌های خالص‌سازی پروتئین، در حال حاضر است و احتمالاً متداول‌ترین روش برای جداسازی پروتئین‌ها، پلی‌پپتیدها، نوکلئیک اسیدها، پلی‌نوکلئوتیدها و دیگر بیومولکول‌های باردار است. از جمله مزایای این روش آن است که شویش، معمولاً در شرایط ملایم انجام می‌شود و به همین دلیل پروتئین کنفورماسیون اصلی خود را در طی فرآیند کروماتوگرافی حفظ می‌کند. به‌طور کلی، تبادلهای یونی بیشتر از بقیه جاذب‌های مورد استفاده در تخلیص پروتئین استخلاف‌دار شده‌اند و ظرفیت اتصال پروتئین آن‌ها بسیار بالاست. گزینش‌پذیری گسترده آن‌ها باعث حذف ناخالصی‌های مهم مانند اندوتوکسین‌ها می‌شود. از دیگر دلایل موفقیت تبادل یونی، اصول جداسازی آسان و سهولت کنترل روش است. علاوه بر آن، رزین‌های تبادل یونی بسیار پایدار بوده، به راحتی سنتز می‌شوند و صدها بار قابل استفاده هستند. عیب عمده آن‌ها گزینش‌گری محدودشان است.

کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز در شرایطی تقریباً کاملاً متضاد با کروماتوگرافی تبدالی یونی انجام می‌شود. نمونه در بافری با غلظت بالای نمک، در ستون بارگذاری می‌شود؛ به همین دلیل، این روش را می‌توان پس از خالص‌سازی اولیه نمونه در یک ستون کروماتوگرافی تبادل یونی که پروتئین در غلظت بالای نمک از ستون خارج می‌شود به کار برد. گزینش‌گری، در کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز کاملاً متفاوت با کروماتوگرافی تبادل یونی است زیرا در این روش از اصول کاملاً متفاوتی برای جداسازی استفاده می‌شود. در روش نخست، پروتئین‌ها براساس مناطق آب‌گریز در ساختارشان جدا می‌شوند در حالی که تفاوت در بار، تأثیری بر انتخاب‌گری پروتئین‌ها ندارد. کروماتوگرافی برهم‌کنش آب‌گریز به‌طور کلی، روشی ملایم است. آسیب به ساختار بیومولکول‌ها در حداقل میزان است که احتمالاً به دلیل اثر پایدار کننده نمک و برهم‌کنش ضعیف با ماتریس ستون است. بازیافت نمونه از ستون در حد بالایی انجام می‌شود.

### نتیجه‌گیری

قدرت برهم‌کنش میان یک پروتئین و لیگاند آب‌گریز با افزایش طول زنجیر افزایش می‌یابد. لیگاندهای دارای ۴ تا ۱۰ اتم کربن برای اغلب مقاصد جداسازی مناسب هستند. اگر چه برای پروتئین‌هایی با حلالیت پایین در بافرهای با غلظت بالای نمک (مانند پروتئین‌های غشایی)، جاذب‌های HIC با لیگاندهای با طول زنجیر بلندتر مناسب‌تر هستند.

### ◆ فاز متحرک

در روش HIC، نیاز به حضور یون‌های نمک ویژه‌ای است که به‌طور ترجیحی، مولکول‌های آب را جابجا نموده و برهم‌کنش آب‌گریز را تقویت می‌کند. هر دوی آنیون‌ها و کاتیون‌ها را می‌توان در یک لیست، که سری هوفمیستر (لیوتروپیک) نام دارد طبقه‌بندی نمود. یون‌هایی که برهم‌کنش مساعدتری دارند در ابتدای سری هستند و سری، براساس کاهش نیروی آب‌گریزی مرتب شده‌است.

سری آنیونی:  $PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > ClO_4^- > I^- > SCN^-$   
سری کاتیونی:  $NH_4^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$

آمونیم سولفات ( $(NH_4)_2SO_4$ ) و سدیم سولفات ( $Na_2SO_4$ ) متداول‌ترین نمک‌های مورد استفاده هستند. این نمک‌ها اثر پایدار کننده بر ساختار پروتئین دارند. آمونیم سولفات در شرایط بازی، گاز آمونیاک را تشکیل می‌دهد؛ بنابراین، باید در pH‌های پایین‌تر از ۸ از آن استفاده نمود. سدیم سولفات به‌عنوان یک عامل نمک زنی مناسب است اما اغلب باعث مشکلات حلالیت در غلظت‌های بالا می‌شود. از آنجا که HIC در قدرت یونی‌های بالا انجام می‌شود، باید خطر رسوبدهی پروتئین در سیستم یا ستون را مورد نظر قرار داد. غلظت نمک مورد استفاده باید کم‌تر از حد غلظت رسوبدهی پروتئین در نمونه باشد. اغلب، آمونیم سولفات یک مولار نقطه خوبی برای شروع است. اگر نمونه مورد نظر متصل نشود، لازم است از محیط با آب‌گریزی بیشتر استفاده شود. همچنین باید این نکته را در نظر داشت که پروتئین متصل شده در بافر عاری از نمک، با درجه بازیایی بالایی از ستون جدا می‌شود. pH بافر در HIC تأثیر بسیار مهمی در جذب سطحی پروتئین روی بستر دارد. اغلب، افزایش pH تا حدود ۹ یا ۱۰، برهم‌کنش آب‌گریزی میان پروتئین و لیگاند آب‌گریز را به علت تغییر در بار پروتئین، کاهش می‌دهد. با این وجود، برخی پروتئین‌های با pI بالا در pH‌های بالا، اتصال محکمی با ماتریس HIC برقرار می‌کنند. به همین دلیل، آزمایش pH‌های مختلف برای پیدا کردن بهترین شرایط توصیه می‌شود. تنها محدودیت، پایداری پروتئین مورد نظر برای خالص‌سازی و ماتریس کروماتوگرافی است (سیلیکا در pH‌های بالا پایدار نیست).

### ◆ راهبرد شویش

در صورت کاهش غلظت نمک، برهم‌کنش آب‌گریز ضعیف شده و بنابراین، پروتئین از ستون خارج می‌شود. عمل واجذب سطحی به دنبال افزایش آب‌گریزی سطح رخ می‌دهد. بسیاری از پروتئین‌ها تنها زمانی که غلظت نمک بسیار پایین باشد، شسته می‌شوند. برخی مواقع نیز لازم است که قطبیت حلال را کاهش داد. افزودن ترکیبات

## پی‌نوشت

- |  |   |
|--|---|
| 6. biospecific interaction                       | ۱. دکتری شیمی آلی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد       |
| 7. Capturing Step                                | دانشگاهی- ابن سینا پژوهشکده فناوری های نوین، مرکز تحقیقات ریز     |
| 8. Ion Exchange Chromatography (IEXC)            | فناوری زیستی  |
| 9. Macroporous                                   | ۲. دکتری شیمی آلی، گروه مهندسی فرآیند، پژوهشکده زیست‌فن‌آوری صنعت |
| 10. Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) | و محیط‌زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران       |
| 11. Reversed Phase                               | ۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه        |
| 12. Tiselius                                     | تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور                                      |
| 13. Salting out chromatography                   | ۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی                 |
|  | 5. High-performance liquid chromatography (HPLC)                  |

## مراجع

- [1] Glatz, C. E., Separation processes in biotechnology. Precipitation, Bioprocess Technol, 9, 329 (1990).
- [2] Sofer, G., Hagel, L., Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-up and Validation, Academic Press, San Diego (1997).
- [3] Wilson, K., Walker, J, Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Cambridge University Press.
- [4] Janson, J. C., Rydén, L., Protein purification, Principles, high resolution methods and applications, Wiley-Liss, New York (1998).
- [5] Roe, S., Protein Purification Techniques, Oxford University Press, Oxford (2001).
- [6] Scopes, R., Protein Purification, Principle and Practice, Springer-Verlag, New York (1994).
- [7] Righetti, P. G., and Caravaggio, T., Isoelectric points and molecular weights of proteins, J Chromatogr, 127, 1 (1976).
- [8] Karlsson, E., Ryden, L, Ion-Exchange Chromatography, in Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications, Janson, J. C., Ryden, L, Ed., Wiley-VCH (1998).
- [9] Hahn, R., Deinhofer, K., Machold, C., and Jungbauer, A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. II. Binding capacity, recovery and mass transfer properties, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 790, 99 (2003).
- [10] Jungbauer, A., Machold, C., and Hahn, R., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. III. Unfolding of proteins upon adsorption, J Chromatogr A, 1079, 221 (2005).
- [11] Machold, C., Deinhofer, K., Hahn, R., and Jungbauer, A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. I. Comparison of selectivity, J Chromatogr A, 972, 3 (2002).
- [12] Mahn, A., and Asenjo, J. A., Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography, Biotechnol Adv, 23, 359 (2005).
- [13] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., and Cabral, J. M., Hydrophobic interaction chromatography of proteins, J Biotechnol, 87, 143 (2001).

## نویسندگان

بی بی سمیه میرجلیلی<sup>۱\*</sup>سمیه جلیل زاده<sup>۲</sup>علی حمزه بیگی<sup>۳</sup>

dsmirjalili@gmail.com



## چکیده

با توجه به رشد تقاضا برای تضمین کیفیت<sup>۵</sup> در آزمایشگاه‌های تحلیلی، ما روند در علوم تحلیلی را از طریق استاندارد بین‌المللی ISO/IEC17025، اعتبارسنجی، اندازه‌گیری عدم قطعیت و اندازه‌گیری کنترل کیفیت<sup>۶</sup> نشان داده‌ایم. بررسی دقیق بر تاریخچه شیمی تحلیلی نشان می‌دهد که این مفاهیم تحلیلی به‌طور مداوم در آزمایشگاه‌ها برای نشان دادن قابلیت ردیابی و اثبات صلاحیت خود در ارائه نتایج قابل اعتماد، استفاده می‌شود. در این مقاله، رویکردی جدید، برای آزمایشگاه کنترل کیفیت و همچنین طرحی را برای حمایت از آزمایشگاه‌های معمولی (که عموماً سیستم مدیریت کیفیتی مانند ISO/IEC17025 را به کار می‌برند) و یا آزمایشگاه‌های تحقیقاتی (که پیاده‌سازی استانداردهای بین‌المللی در این سازمان‌ها با مشکلاتی مواجه است) پیشنهاد می‌کنیم. این رویکرد، چرخه تضمین کیفیت تحلیلی<sup>۷</sup> نامیده می‌شود که مفاهیم اصلی تضمین کیفیت (QA) و ارتباط بین این مفاهیم را به‌منظور ایجاد نتایج قابل ردیابی و مورد اعتماد ارائه می‌دهد. AQAC یک ابزار عملی برای حمایت از فرآیند تضمین کیفیت در آزمایشگاه‌های تحلیلی است.

## واژه‌های کلیدی

تضمین کیفیت، کنترل کیفیت، عدم قطعیت، قابلیت ردیابی، صحت‌گذاری، چرخه تضمین کیفیت تحلیلی، آزمون مهارت، تجزیه و تحلیل نمونه.

## مراحل ضروری در فراهم آوردن نتایج قابل اعتماد با استفاده از چرخه تضمین کیفیت تحلیلی

## مقدمه

تضمین کیفیت، به‌عنوان یک پدیده انقلابی برای آزمایشگاه‌ها از سال‌ها پیش مورد توجه قرار گرفته است [۱]. QC همچنین به‌عنوان یک اصل اساسی برای اعتباربخشی به آزمایشگاه به کار می‌رود که موجب اثبات قابلیت اطمینان در نتایج می‌شود [۲]. پشت‌واژه «QA» می‌توان چندین عملیات مختلف مورد نیاز برای اطمینان از کنترل کیفیت اندازه‌گیری‌های تحلیلی را مشخص نمود که در چارچوبی گسترده‌تر از علم اوزان و ردیابی مواد شیمیایی تعبیه شده‌است [۳].

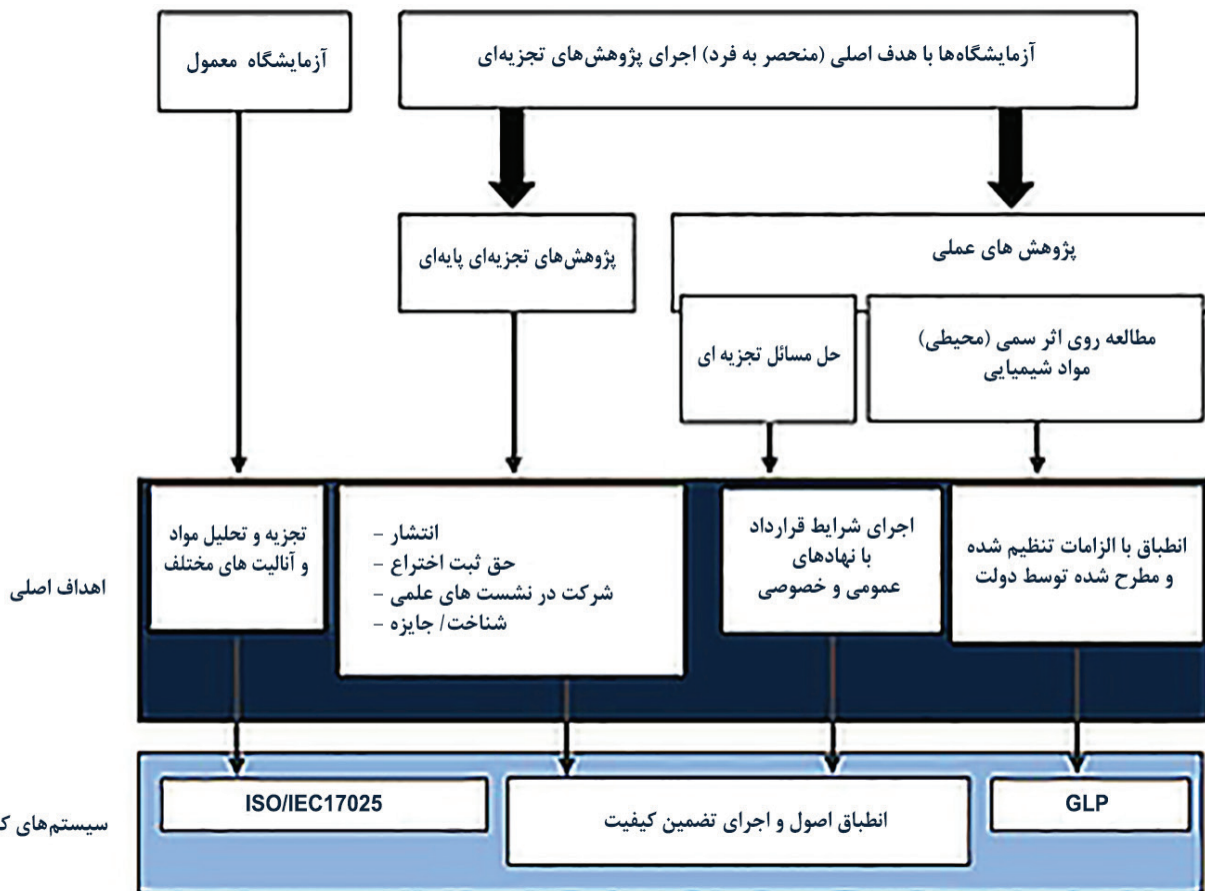
QA، به‌عنوان بخشی از مدیریت کیفیت، نیاز به ارائه نتایج قابل اعتماد که پیش نیازهای کیفی را تامین می‌کند، مورد توجه قرار می‌دهد. به‌طور خاص، در استاندارد بین‌المللی ISO/IEC17025 نشان داده می‌شود که هر آزمایشگاه باید با ایجاد، پیاده‌سازی و نگهداری یک سیستم، که مناسب با دامنه فعالیت خودش است، عمل کند [۵]. این استاندارد در آزمایشگاه‌های مختلف، به‌عنوان ابزار تضمین کیفیت و همچنین به‌عنوان ابزاری برای کمک به آزمایشگاه‌های پزشکی قانونی به‌منظور اخذ گواهینامه استفاده می‌شود و نه فقط در اروپا بلکه در سایر پزشک قانونی‌های دنیا نیز به کار می‌رود [۶]. آزمایشگاه‌ها، به‌منظور نظارت بر آلاینده‌های شیمیایی در آب‌های سطحی و

برای اینکه در سطح بین‌المللی فعالیت داشته باشند، نیاز به پذیرفتن مدل‌های QA دارند. در اصل، آزمایشگاه‌ها موظف به نشان دادن توانایی‌ها و ظرفیت‌های خود در تحلیل هر یک از عوامل خاص هستند. (به‌عنوان نمونه، با استفاده از سیستم مدیریت کیفیت براساس ISO/IEC17025، یا از طریق گواهینامه‌های رسمی و غیررسمی و یا از طریق اطلاعیه به مقامات ملی مسئول [۷]). با توجه به دستورالعمل 90CE/2009، از ۳۱ جولای ۲۰۰۹، استاندارد بین‌المللی ISO/IEC 17025 را می‌توان به‌عنوان ابزاری برای بیان نتایج تضمین کیفیت مورد استفاده قرار داد [۸].

نمونه دیگر در بیان این ضرورت، نظارت بر باقی‌مانده‌های بعضی مواد خاص مورد استفاده در تولید مواد غذایی است که بخش مهمی از هر برنامه ایمنی مواد غذایی را تشکیل می‌دهد. مقررات بین‌المللی، نیاز به اقدامات و بررسی‌های بیشتر (برای نمونه، دستورالعمل EEC/93/99 از ۲۹ اکتبر ۱۹۹۳ و بخش Ec/98/179 [۹]) در رابطه با کنترل رسمی مواد غذایی و آزمایشگاه‌ها با توجه به بخش (۴) استاندارد ISO/IEC17025 که از ژانویه سال ۲۰۰۲ به بعد معتبر است، دارد.

تضمین کیفیت کنترل دوپینگ در طول بازی‌های المپیک از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا حضور ورزشکاران مختلف معمولاً نتیجه بازی‌ها را تغییر می‌دهد. به همین دلیل، آزمایشگاه کنترل دوپینگ آنن از طرف (تشکیلات اعتباربخشی یونان) شرکت اعتباردهنده یونان برای انجام مطالعات دوپینگ براساس استاندارد ISO/IEC17025، کمیته بین‌المللی المپیک یا آژانس جهانی مبارزه با دوپینگ و استاندارد بین‌المللی آزمایشگاه‌ها به رسمیت شناخته شد [۱۰].

آزمایشگاه‌های آنالیز هسته‌ای از انواع آزمایشگاه‌های دیگری هستند که به واسطه مطالبات مشتریان، تعهدات قانونی (حقوقی) تعیین شده توسط سازمان نظارتی هسته‌ای و نیاز به افزایش اعتماد عمومی، پیاده‌سازی استاندارد ISO/IEC17025 در آن‌ها اهمیت دارد. این استاندارد بین‌المللی در کشورهای مختلف پیاده‌سازی و اجرا شده است (مانند کره [۱۱]، آرژانتین [۱۲] و غیره) [۱۳].



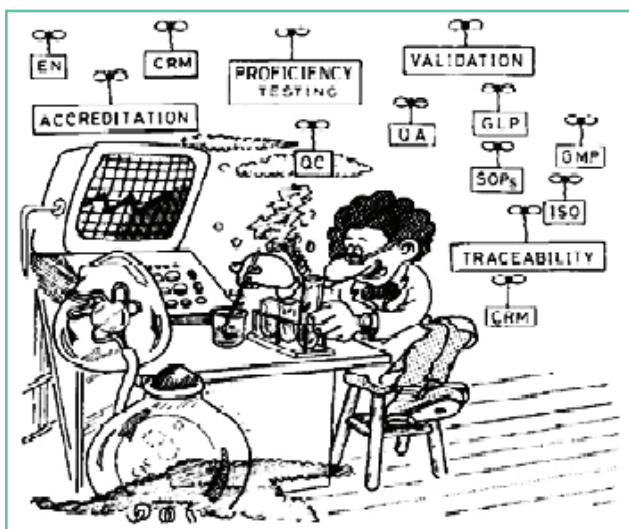
شکل ۱: اهداف اصلی و سیستم‌های کیفیت آزمایشگاه‌های مختلف، طبقه‌بندی شده با اهداف آنها [۱۴].

از کیفیت کار استفاده می‌شود و چرخه تضمین کیفیت تحلیلی، به‌عنوان ابزاری برای کمک به تضمین کیفیت در آزمایشگاه‌های تحلیلی معرفی می‌شود.

همان‌طور که در شکل (۱) نشان داده شده‌است، AQAC را می‌توان به‌عنوان ابزاری با کیفیت و قدرتمند در آزمایشگاه‌های مختلف استفاده نمود. در مورد آن دسته از آزمایشگاه‌هایی که یک سیستم کیفیت رسمی دارند برای نمونه ISO/IEC17025 یا GLP (که برخی الزامات مرتبط با AQAC را دارد) بهره‌گیری از AQAC منجر به بهبود مستمر در کیفیت نتایج خواهد شد. با این حال، همچنین AQAC در آزمایشگاه‌هایی که هنوز سیستم کیفیتی رسمی ندارند، به‌عنوان ابزار کیفیتی استاندارد برای آزمایشگاه‌های تحقیقاتی عمل می‌کند (شاید در آینده مجوزهای رسمی و نظام‌مند اخذ شود). در اینجا با توجه به الزامات ضروری ISO/IEC17025 و الزاماتی که برای آزمایشگاه‌های تضمین کیفیت مورد نیاز است (به‌طور کامل مستقل یا وابسته به الزامات ISO/IEC17025) و همچنین با توجه به نمودارهای رویکردی که معمولاً در زمینه مدیریت کیفیت استفاده می‌شود، AQAC را می‌توان به‌عنوان یک ابزار عملی برای کمک به (QA) در آزمایشگاه‌های تحلیلی معرفی نمود.

### بررسی

کیفیت نتایج آزمون‌ها برای کارشناسان شیمی تحلیلی، همیشه به‌عنوان یک نگرانی بوده‌است، به‌طوری که در نشریه‌ای که در سال ۱۹۹۴ منتشر و در شکل (۲) [۱۷] نشان داده شده‌است، یک ابر را به تصویر می‌کشد که این ابر، شامل مفاهیمی است که یک شیمی‌دان در طول آزمون با آن سروکار دارد. امروزه، تخصص‌های مرتبط با این مفاهیم تا حد زیادی تکامل یافته و نشان داده شده‌است که بسیاری از آنها به هم مرتبط هستند.



شکل ۲: مفاهیمی که یک شیمی‌دان در طول آزمون با آن سروکار دارد.

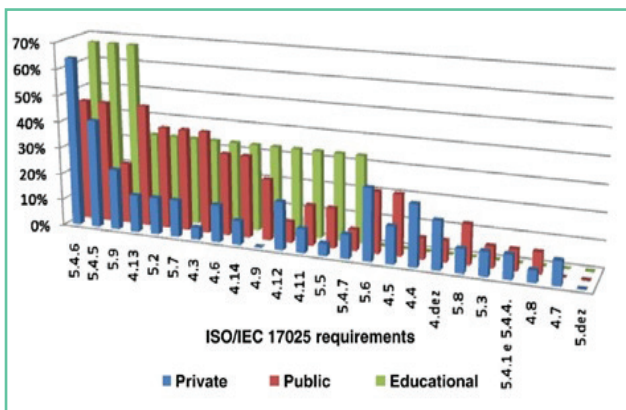
تکامل و تحولی که در تصویر سه به آن اشاره شده مجموعه‌ای

با توجه به موارد ذکر شده، مشخص است که ISO/IEC17025 برای تحلیل تضمین کیفیت<sup>۸</sup>، ایجاد و به‌عنوان یک نیاز بین‌المللی در سراسر جهان به رسمیت شناخته شده‌است که به‌وسیله آزمایشگاه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این امر مهم، زمانی برجسته‌تر می‌شود که آزمایشگاه‌های تحقیقاتی سعی در ارائه نتایج قابل اطمینانی دارند که تضمین کیفیت را به همراه داشته باشد. همان‌طور که والکارسل<sup>۹</sup> [۱۴] تأکید نمود، مجوز رسمی براساس استاندارد ISO/IEC17025 به‌وسیله آزمایشگاه‌های معمولی دریافت می‌شود؛ ولی مشکلات، معمولاً ناشی از تلاش برای ایجاد سیستم‌های مدیریت کیفیت در آزمایشگاه‌های تحلیلی درگیر در زمینه تحقیق و توسعه است. شکل (۱) اهداف اصلی برای تحقیق و توسعه آزمایشگاه‌ها و سیستم‌های کیفیت آنها را نشان می‌دهد. شکل (۱) دو سیستم مدیریت کیفیت را که توسط آزمایشگاه‌ها به‌طور خاص و مشخصی اجرا شده‌اند، نشان می‌دهد: ابتدا (GLP)<sup>۱۰</sup> و سپس ISO/IEC 17025 (GLP)<sup>۱۵</sup> به معنای آزمایشگاه با روال و روش کاری خوب، یک سیستم مدیریت کیفیت است که با تمرکز بر فرآیندهای سازمان، شرایط غیربالیبی سلامت و مطالعات ایمنی بهداشت و محیط‌زیست، طراحی، برنامه‌ریزی، کنترل، ثبت و بایگانی شده‌است و گزارش می‌شود. با این وجود، همان‌طور که نشان داده شده‌است، استاندارد ISO/IEC17025 به‌عنوان یک سیستم مدیریت کیفیت به‌وسیله انواع مختلف آزمایشگاه‌ها استفاده شده‌است. براساس این دو نوع سیستم و شکل (۱) مشخص می‌شود که آزمایشگاه‌های تحقیقاتی از اصول و روش‌های با کیفیت به‌عنوان روشی برای اطمینان از فعالیت خود استفاده می‌کنند.

در نگاه بیشتر به ISO/IEC17025، این استاندارد به بخش‌های الزامات مدیریت (مربوط به عملکرد و اثربخشی سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه) و الزامات فنی (مربوط به توانایی‌ها و ظرفیت‌های کارکنان، شناسایی روش‌ها و کالیبراسیون تجهیزات) تقسیم شده‌است. با توجه به بندهای زیاد استاندارد ISO/IEC17025، این امکان وجود دارد که به‌منظور افزایش قابلیت ردیابی، الزامات فنی ضروری را بیشتر مورد توجه قرار داد؛ بنابراین، هر آزمایشگاهی می‌تواند برای تضمین کیفیت نتایج تحلیلی از آن استفاده کند. این الزامات عبارتند از: صحت‌گذاری (که باید متناسب با اهداف موردنظر باشد)، محاسبه عدم قطعیت (ابزاری ضروری برای ارزیابی روش توسعه یافته) و کنترل کیفیت (که در تجزیه و تحلیل و نظارت بر کیفیت نتایج استفاده می‌شود). با این حال، برای چگونگی پیاده‌سازی این الزامات در حالی که هنوز ایجاد نشده‌اند به شرح و تفسیر کافی از این الزامات نیاز داریم.

خوشبختانه بین صحت‌گذاری، عدم قطعیت و کنترل کیفیت رابطه‌ای نزدیک وجود دارد و این امکان را فراهم می‌کند که نموداری تفسیری، برای تسهیل و کاربرد آن ایجاد نمود که معمولاً در مدیریت کیفیت به کار برده می‌شود (برای نمونه، چرخه PDCA)<sup>۱۱</sup> شامل طراحی، اجرا و بازرسی، و اجرا و چرخه (PDSA)<sup>۱۲</sup> شامل طراحی، اجرا، مطالعه و اجرا و همچنین نمودار استخوان ماهی ایشیگاوا [۱۶]. با توجه به این نمودار، این روش معمولاً در مدیریت کیفیت برای تعیین قابلیت ردیابی مورد نیاز آزمایشگاهی و حصول اطمینان

و دانستن نسبت بین آنها نیز لازم است. از سوی دیگر، کاربرد نامناسب یک روش کیفی که در (AQAC) نشان داده شده است، می تواند به روش های کاربردی دیگر نیز آسیب برساند.



شکل ۵: سطح دشواری کاربرد الزامات ISO/IEC 17025 برای آزمون آزمایشگاه های شیمیایی در برزیل. پژوهشی در سال ۲۰۱۱ در شبکه ای از آزمایشگاه های موسسه ملی علم اوزان و مقادیر و تعدادی از شرکت های بازرسی و گواهی دهنده به نمایندگی برزیل در قراردادهای دوطرفه با همکاری بین المللی اعتباربخشی آزمایشگاه ها. هر قلم به صورت مشخص توسط آزمایشگاه ها با امتیاز ۰، ۱، ۲ و ۳، با توجه به این که به عنوان پایین ترین و ۳ به عنوان بالاترین امتیاز ارزیابی شده است. محور Y در نمودار درصد پاسخ به الزامات را در سه سطح مورد نیاز نشان می دهد. محور X در نمودار الزامات ISO/IEC 17025 را نشان می دهد.

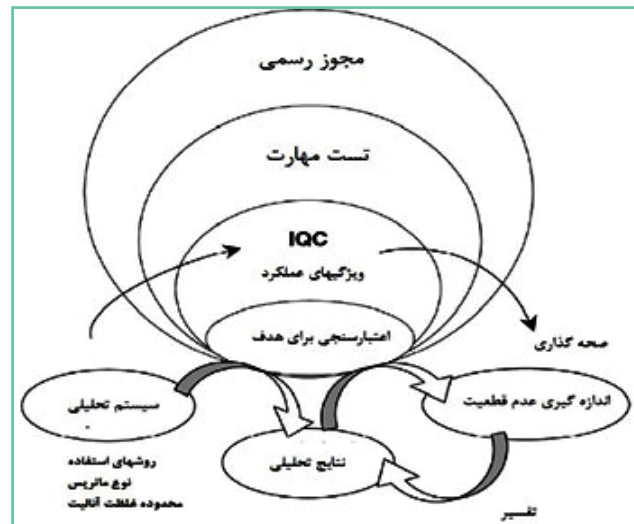
(AQAC) سه مرحله اصلی را برای (QA) مشخص می کند: صحنه گذاری، ارزیابی عدم قطعیت و (QC) معمول. این موارد، تقویت کننده یکدیگر هستند، اما یک نمودار می تواند ارتباط متقابل بین آنها ایجاد کند که کاربرد آن را آسان می سازد. اهمیت این موارد همچنین به وسیله ISO/IEC 17025 به عنوان بخشی از الزامات ۵،۴،۵ (صحنه گذاری روش ها)، ۵،۴،۶ (تخمین عدم قطعیت غیر قابل اطمینان) و ۵،۹ (اطمینان از کیفیت آزمایش و نتایج کالیبراسیون) نشان داده شده است. با وجود شهرت سختی این سه مورد، مطالعه اخیر که شامل بیش از ۲۴۰ آزمایشگاه شیمی دارنده گواهی نامه ISO 17025 است، نشان داده است که در مقایسه با دیگر موارد بیان شده در استاندارد، سه مورد فوق بهترین موارد اجرایی هستند. هر مورد پیشنهاد شده در (AQAC)، عامل اصلی برای کیفیت نتایج آنالیز است که به طور مفصل مورد بحث قرار گرفته است.

### ○ صحنه گذاری

با توجه به واژگان بین المللی موسسه اوزان و مقادیر [۱۹]، صحنه گذاری، تایید الزامات برای استفاده ای خاص است. به طور مشابه، ISO/IEC 17025 نشان می دهد (الزام ۵،۴،۵،۱) که صحنه گذاری عبارت است از تأیید با آزمایش و ارائه شواهد عینی برای برآورده ساختن الزامات خاص مورد نیاز برای یک درخواست، به منظور کاربردهای خاص. با توجه به الزام ۵،۴،۵،۲، صحنه گذاری باید برای همه روش های توسعه یافته، روش های تغییر یافته و یا روش های خارج از حیطه کاربرد استفاده شود. با توجه به این الزامات، واضح است که صحنه گذاری، ابزاری لازم با یک تنوع کاربردی وسیع در

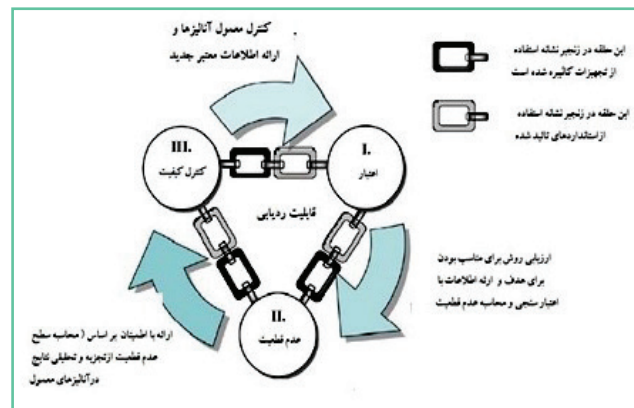
از مفاهیم حیاتی برای (QA) را که بسیاری از آنها با هم مرتبط هستند، شامل می شود.

این استاندارد همچنین برای (QA) در آزمایشگاه های تحلیلی، سیستمی کیفی را پیشنهاد نموده است، زیرا (QC) یک بخش حیاتی از (QA) و نشان دهنده این است که روش تحلیلی کمی قادر به اندازه گیری مطمئن خواهد بود. بنابراین، ISO/IEC 17025 برای (QC) الزامات ویژه ای را مشخص نموده که در شکل (۳) آمده است:



شکل ۳: تفاوت سطوح از اندازه گیری های (QA) برای شیمی تجزیه و آزمایشگاه مواد غذایی [۱۸].

مانند آنچه که در شکل (۳) نشان داده شده است، نمودارها تفسیر آسان تر و راحت تری از مفهوم (QA) و کاربرد آنها را در آزمایشگاه های تحلیلی ممکن می سازد. بنابراین، برای ارائه روشی جدید برای مهم ترین مفاهیم (QA) به صورت عملی و موثر، شکل (۴) نشان می دهد که چگونه (AQAC) ابزاری موثر برای آزمایشگاه های تحلیلی است. عموماً نمودارهای ساده و موثری در اداره کیفیت استفاده می شوند (برای نمونه نمودارهای (PDCA) و استخوان ماهی ایشیگاوا).



شکل ۴: چرخه تضمین کیفیت تحلیلی.

یک نمودار (برای نمونه AQAC) روشی از ارتباط مفاهیم است که می تواند برای پیاده سازی مفاهیم اصلی کیفیت در آزمایشگاه شیمی تحلیلی استفاده شود. این روش ها وابسته به هم هستند



متوسط (به‌عنوان معیاری از درستی اندازه‌گیری و یا سمت‌گیری)، دقت و حد کمیت<sup>۱۸</sup> آزمایش شود. این بدان معنی است که آزمایش‌های بهبود مستمر باید برای بررسی دقت این روش انجام شود. پس از تایید دقت و صحت، حداقل پنج تکرار (برای بررسی دقت) در هر دو گزارش حد کمیت (برای بررسی حساسیت روش) و در دیگر سطوح عملی بالاتر، (برای نمونه MRL) مورد نیاز است. (LOQ) به‌عنوان حداقل غلظت یا جرم آنالیز مشخص شده‌است که می‌تواند کمیت را با صحت و دقت قابل قبول تعیین کند. تعدادی از مولفین، تخمین قابل قبول را در محاسبه (LOQ) بررسی کردند که با نسبت سیگنال به نویز به‌دست آمده از یک نمونه شاهد برابر است و این مقدار با در نظر گرفتن مقدار نسبی استاندارد ۱:۱۰ و یا با محاسبه انحراف استاندارد از جواب‌های به‌دست آمده [۲۵] محاسبه می‌شود. متأسفانه، برخی از استانداردهای اعتبارسنجی فقط محدودیت‌ها را بیان می‌کنند و نمی‌گویند چگونه آنها را تعیین کردند، حتی اگر چندین روش مختلف برای تعیین آنها وجود داشته باشد. برای اصلاح این مساله، روشی عملی و واقع‌گرایانه در نظر گرفته شده‌است که از کمترین مقدار سطح میله‌ای که به حدود قابل قبول در بازدهی روش رسیده باشد (بهبود متوسط در محدوده ۱۲۰-۷۰ درصد با ۲۰ درصد  $RSDr \leq$  استفاده می‌کند [۲۱]). به هر حال، روش‌های (LOQ) تحلیلی و تحلیل هدف، به دلیل گستردگی و محدوده روش‌ها باید به الزامات تحلیلی موارد در نظر گرفته شده توجه کنند [۲۳].

این مشخصات می‌تواند با استفاده از اطلاعات فردی درباره کیفیت مورد نیاز روش‌ها و یا با استفاده از اطلاعات ذکر شده در قراردادهای بین‌المللی که از روش‌های مختلف، عوامل مختلف و دامنه تغییرات توسعه یافته‌اند، انتخاب شود. روشی که آزمایشگاه تعیین می‌کند، روش (LOQ) است که بستگی دارد چه هدفی را دنبال می‌کند و چه کاربردهایی دارد، اما روش (SANCOs) یک راه عملی برای به‌دست آوردن غلظت مورد استفاده برای (LOQ) است. به‌طور کلی، بهتر است که روش مناسبی برای ارزیابی کفایت روش توسعه یافته انتخاب شود. جدول (۱) نمونه‌هایی از مقدار هدف به کار رفته در انواع مختلف آنالیز را نشان می‌دهد.

ارزیابی، ابتدا روش را مقایسه و بررسی می‌کند که آیا برای آن هدف مناسب است. بعد از این ارزیابی، موضوع مهم، دانستن سطح اطمینان از نتیجه تحلیلی به‌دست آمده با محاسبه میزان عدم قطعیت است، که باید در مرحله بعدی (AQAC) بررسی شود.

### ○ عدم قطعیت

در دانشنامه‌ی بین‌المللی اندازه‌شناسی [۱۹] عدم قطعیت را به‌عنوان «عامل غیرمنفی مختص مقدار پراکندگی نسبت داده شده به اندازه‌گیری، بر پایه اطلاعات استفاده شده» تعیین می‌کند. به عبارت دیگر، محاسبه عدم قطعیت، سطح اطمینان از تحلیل نتیجه را نشان می‌دهد. فرآیند واحدی برای محاسبه عدم قطعیت وجود ندارد، اما ISO/IEC 17025 (الزامات ۵،۴،۶،۲)، تصریح نموده که در موارد خاص، ماهیت روش آزمایش ممکن است مانع از دقت و تعیین مقدار سنجشی و آماری در محاسبه عدم قطعیت اندازه‌گیری شده

همه آزمایشگاه‌های ISO/IEC 17025 است، به خصوص زمانی که تصمیم‌گیری‌های مهم براساس نتایج گرفته می‌شوند.

با این وجود، ISO/IEC 17025 مشخص نمی‌کند که چگونه یک روش را صحت‌گذاری کنیم (فقط توضیح می‌دهد روشی که برای آن در نظر گرفته شده‌است و برای استفاده خاصی که از آن می‌شود، مناسب است). بنابراین، استانداردهای صحت‌گذاری مختلفی برای کمک به آزمایشگاه‌ها در صحت‌گذاری فرآیندهای آنها، توسعه و انتشار یافته‌اند [۲۰].

علاوه بر این، SANCO 10684 [۲۱] تصریح نموده است که «صحت‌گذاری روش‌های داخلی آزمایشگاه‌ها باید با ارائه شواهد، نشان دهد روش موردنظر برای هدفی که استفاده شده مناسب است».

روش صحت‌گذاری نیازی مهم در تحلیل شیمیایی است. به هر حال، به نظر می‌رسد شیمی‌دان‌های تحلیلی، به اطلاع از اهمیت آن (اینکه چرا باید انجام شود، چه زمان باید انجام شود، و دقیقاً چیزی برای انجام دادن آن مورد نیاز است) کمتر توجه می‌کنند. در حال حاضر، توصیه‌های زیادی برای صحت‌گذاری در نوشته‌ها، به خصوص در رابطه با روش‌های خاص وجود دارد؛ اما، بیشتر اوقات غیرقابل استفاده هستند [۲۲]. خوشبختانه در میان شیمی‌دان‌های تحلیلی دو مفهوم بخوبی جا افتاده است و آن اینکه فرآیند صحت‌گذاری، علی‌رغم هزینه‌ها، فرصت خوبی برای بهینه‌سازی روش است و در عین حال، نقاط قوت و ضعف روش نیز شناسایی می‌شود. زمانی که صحت‌گذاری انجام می‌شود باید بسیاری از عوامل نظیر حداکثر سطح مانده<sup>۱۴</sup>، سمی بودن، درجه از اتوماسیون (تجهیزات و زمان در دسترس)، هزینه‌ها و اندازه (نیازهای آنالیت‌ها و ماتریس‌ها) بررسی کند. صحت‌گذاری روش‌های تحلیلی، اولین قدم از (QA) در آزمایشگاه است و (QA) تحلیلی، مجموعه کاملی از اقداماتی است که یک آزمایشگاه باید متعهد شود که قادر به دستیابی به اطلاعات، به‌صورت مداوم است. به‌علاوه، استفاده از صحت‌گذاری و یا روش‌های استاندارد، معمولاً از روش‌های کنترل کیفی داخلی<sup>۱۵</sup> - مواد مرجع<sup>۱۶</sup> و نمودارهای کنترل که در آزمون مهارت<sup>۱۷</sup> استفاده شده‌است، طرح‌ها و اعتبار‌گذاری از یک استاندارد بین‌المللی که معمولاً ISO/IEC 17025 است، تاثیر می‌پذیرد [۱۸].

بعد از بررسی این موارد، اولین مرحله برای آزمایشگاه در شروع صحت‌گذاری، مشخص کردن عوامل و معیارهایی است که ارزیابی خواهند شد. در مورد روش‌های باقی‌مانده، SANCO 10684/2009 پیشنهاد می‌کند که فرآیند با گزینش، انتخاب و بررسی واسطه‌ها (تداخل‌ها) شروع شود (به‌عنوان نمونه، در بازه زمان یکسان در کروماتوگرافی). بعد از این مرحله، خطی بودن را می‌توان با شمارش و سنجیدن ترکیبات موجود، از طریق محاسبه باقی‌مانده‌ها تعیین نمود، این در حالی امکان‌پذیر است که ضریب همبستگی رضایت‌بخش و مناسبی میان ضرائب و باقی‌مانده‌ها، تشخیص داده شود. اگر باقی‌مانده‌های منحصربه‌فرد با بیش از  $\pm 20\%$  درصد ( $\pm 10\%$ ) درصد در مواردی که (MRL) نزدیک یا بیشتر شده‌است) از نمودار کالیبراسیون در ناحیه مربوط منحرف شود، یک تابع کالیبراسیون دیگر باید استفاده شود [۲۱]. در بیشتر موارد، روش خطی کردن، برای اطمینان کمیت و اثبات کاربردی بودن این روش کافی است. به هر حال، هر روشی باید به‌منظور ارزیابی حساسیت، بهبود

جدول ۱: نمونه‌هایی از ارزیابی قرارداد به کار رفته در انواع مختلف آنالیز

کاربرد	عنوان	موافقت‌نامه
EPA/USA (آژانس حفاظت از محیط‌زیست ایالات متحده آمریکا) SW846 راهنمای اعتبار [۲۳] SANCO/10684/2009 [۲۱]	راهنما برای توسعه روش‌ها و اعتبارسازی روش‌ها برای برنامه RCRA (حفاظت از منابع و عمل بازیافت). اعتبارسنجی روش و روندهای کنترل کیفیت برای آنالیز باقی‌مانده‌های آفت‌کش‌ها در غذا و تغذیه.	قابل استفاده برای روش‌های ارائه شده برای گنجایش پتانسیل در SW-846 (روش‌های آزمایش برای ارزیابی مواد جامد زائد، روش‌های فیزیکی/شیمیایی) این مدرک برای کنترل آزمایشگاه‌ها یا در نظارت بر باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در مواد غذایی در نظر گرفته شده است. مدرک، دقت روش و کنترل کیفی تحلیلی <sup>۱۹</sup> مورد نیاز برای پشتیبانی از اعتبار داده استفاده شده برای بررسی انطباق با ماکسیمم باقی‌مانده محدودیت <sup>۲۰</sup> را توضیح می‌دهد.
دستورالعمل کمیسیون ۱۲ آگوست ۲۰۰۲ (CE/2002/657) (۹)	دستورالعمل اجرایی شورای ۲۳/۹۶/EC در خصوص اجرای روش‌های تحلیلی و تفسیر نتایج.	این دستورالعمل قوانینی را برای روش‌های تحلیل که در آزمایش نمونه‌های رسمی در اتحادیه اروپا استفاده می‌شوند فراهم می‌کند (عمدتاً مربوط به حضور باقی‌مانده داروهای دامپزشکی در محصولات با منشأ حیوانی)
مقررات کمیسیون (EC) شماره 333/2007 (۲۴)	تنظیم روش‌هایی از نمونه و تحلیل برای کنترل رسمی میزان سرب، کادمیوم، جیوه، قلع معدنی، 3-MCPD و بنزوپیرن در مواد غذایی	از آنجائی که روش‌های مشخصی برای تعیین آلودگی‌های مواد غذایی در سطح اتحادیه اروپا وجود ندارد، آزمایشگاه‌ها ممکن است هر روش معتبر تحلیلی را انتخاب کنند که روش انتخاب شده نیازمند حدود اجرایی خاصی است.
ICH - کنفرانس بین‌المللی هماهنگی الزامات فنی (R1) (۲۵)	اعتبارسنجی راهنمای سه جانبه هماهنگ شده ICH از روش‌های تحلیل: متن و دستورالعمل (R1) Q2	کنفرانس بین‌المللی یکسان‌سازی الزامات روش‌های ثبت دارویی که برای انسان استفاده شده است. (ICH) یک پروژه واحد است که مراجع منظم از اروپا، ژاپن و ایالت متحده و کارشناسان از صنعت دارویی را در سه ناحیه برای بحث علمی و جنبه‌های تکنیکی از ثبت محصولات گرد هم آورده است. ICH Q2 (R1) مبحثی است راجع به عواملی که در اعتبار روش‌های تحلیلی به‌عنوان بخشی از کاربردهای ثبت شده درون جامعه اروپا، ژاپن و ایالات متحده آمریکا در نظر گرفته شده‌اند.

### مرحله ۲: شناسایی منابع عدم قطعیت

برای شناسایی منابع عدم قطعیت، دانستن همه مراحل مهم روش الزامیست (این عوامل اهمیت اندازه‌گیری در مرحله پیش را مشخص می‌کند). معادلات ریاضی که برای محاسبه مقادیر اندازه‌گیری استفاده می‌شوند، یک منبع مشترک از ترکیب عدم قطعیت هستند.

به علاوه، مطالب نوشته شده نشان‌دهنده به‌کار بردن روش‌های مختلف برای انتخاب منابع عدم قطعیت و محاسبه عدم قطعیت است (برای نمونه، «پایین به بالا»، «مناسب برای هدف» و «بالا به پایین»، «اعتبار محور» و «سلامت محور» است) [۱۸ و ۲۷]. اصول اساسی و مثال‌های ساده از هر کاربرد در زیر نشان داده است:

(۱) پایین به بالا

براساس شناسایی کمیت، مقدار و ترکیب همه منابع خاص عدم قطعیت در اندازه‌گیری است. عموماً، روش بسیار پیچیده‌ای است، به دلیل اینکه همه منابع عدم قطعیت را از روش تحلیلی بررسی می‌کند. برای محاسبات در این روش با استفاده از اصول عدم قطعیت، از تجهیزات حجمی انجام می‌شود (برای نمونه، گیره‌های حجمی و میکروپیپت‌ها، ترازوها و دیگر تجهیزات که مورد نیاز کالیبراسیون است که افزایش عدم قطعیت خاصی را در گواهی

شود. در این موارد، آزمایشگاه باید تا جای ممکن برای شناسایی همه عوامل عدم قطعیت تلاش نموده و برآورد مناسب صورت پذیرد و باید اطمینان حاصل شود که مبدا چگونگی گزارش نتایج، موجب برداشت اشتباه از عدم قطعیت شود. در نهایت، برآورد منطقی باید براساس اطلاعات و آگاهی از چگونگی اجرای روش و در دامنه و گستره اندازه‌گیری باشد و باید به‌عنوان نمونه، از تجارب گذشته و اعتبارسنجی داده‌ها استفاده نمود.

با توجه به روش‌های مختلف محاسبه عدم قطعیت، راهنمای EURACHEM/CITAC [۲۶] به‌عنوان یک مرجع کاربردی عمومی مشخص شده است. با توجه به این راهنما، محاسبه عدم قطعیت شامل چهار مرحله اساسی است:

### مرحله ۱: اندازه‌گیری فضا

یک گزارش واضح از چیزی که اندازه‌گیری می‌شود، شامل رابطه بین مقادیر اندازه‌گیری شده و مقادیر ورودی که به آن بستگی دارد، (برای نمونه، مقادیر اندازه‌گیری شده، ثابت‌ها، و مقادیر استاندارد - کالیبراسیون) است. اطلاعات خاص باید از روش اجرایی استانداردهای مناسب (SOP) یا دیگر روش‌های توصیف شده گرفته شود.

خیر و همچنین برای مطمئن بودن از اینکه همه منابع عدم قطعیت به طور کامل محاسبه شده‌اند، بررسی با دقت انجام می‌شود [۲۶].

#### مرحله ۴: محاسبه ترکیبی عدم قطعیت

اطلاعات به‌دست آمده در مرحله (۳)، از یک سری اعداد که از ترکیب کمیت‌ها برای محاسبه عدم قطعیت کل است تشکیل می‌شود، اگر چه مربوط به منابع خاص و یا ترکیبی از اثرات چندین منبع باشد. برای کمک به‌عنوان انحراف استاندارد، قوانین مناسبی برای استاندارد ترکیبی عدم قطعیت بیان خواهد شد. روی هم رفته، یک عامل عددی مناسب (عامل عددی استفاده شده به‌عنوان ضریب عدم قطعیت استاندارد به‌منظور به‌دست آوردن عدم قطعیت گسترده، به‌صورت معمول در گستره ۲ تا ۳ است) باید برای گسترش عدم قطعیت به کار رود [۲۶].

با ارزیابی همه مراحل دخیل در محاسبات عدم قطعیت، می‌توان بهترین روش را برای محاسبه‌های راهبردی مهم به‌منظور انجام محاسبات موثر مشخص نمود. با توجه به بررسی همه روش‌ها در نوشته‌ها، روش صحنه‌گذاری در کمترین زمان می‌تواند یک برآورد خوب را تهیه کند. به هر حال، گاهی اوقات لازم است از دیگر روش‌ها استفاده شود، مانند زمانی که صحت اطلاعات در دسترس نباشد.

اندازه‌گیری عدم قطعیت مهم‌ترین معیار در دو روش صحت<sup>۲۵</sup> و (IQC) است [۱۸]. بررسی عدم قطعیت در (AQAC) به‌عنوان دومین مرحله است؛ به دلیل اینکه، بعد از صحنه‌گذاری روش (که بررسی می‌کند آیا روش، مناسب برای هدف است یا نه)، عدم قطعیت، مکملی قابلیت اطمینان است که پراکندگی مقادیر مشخص شده در اندازه‌گیری را تعیین می‌کند. به هر حال، بعد از همه ارزیابی‌ها (استفاده مقادیر و عدم قطعیت)، کنترل با استفاده از نظارت مستمر نیز لازم است، که می‌تواند با استفاده از ابزار (QC) به‌دست آید.

#### کنترل کیفیت (QC)

ISO/IEC 17025 در الزامات ۹-۵ تصریح می‌کند که آزمایشگاه باید روش (QC) را برای بررسی صحت آزمایش‌ها و کالیبراسیون داشته باشد؛ بنابراین، افزایش آگاهی از نیاز به کیفیت در زمینه آنالیز شیمیایی، اجازه بررسی فرآیند برای ساخته شدن را می‌دهد (برای نمونه، پیاده‌سازی سامانه‌های مدیریت کیفیت درون آزمایشگاه‌ها). اگرچه این روش ممکن است نیاز به تلاش و بودجه بسیار داشته باشد؛ تقریباً ۲۰-۱۰ درصد از منابع تخصیص داده شده برای تحلیل شیمیایی به (QA) و (QC) تخصیص داده می‌شود که برای پیشرفت دانش تحلیلی لازم هستند [۳۲].

در این دیدگاه، (QC) باید ثابت کند که روش تحلیلی کمی، هنوز می‌تواند اندازه‌گیری قابل اطمینان که شامل تحلیل درونی دسته است را بدهد. به هر حال، (QC) می‌تواند همچنین به‌طور معمول برای صحت در بعضی موارد استفاده شود؛ بنابراین، سومین و آخرین مرحله لازم برای صحنه‌گذاری نتایج در آزمایشگاه شیمی تحلیلی، شامل روش (QC) به کار رفته برای کنترل کیفیت عملکرد است. معمولاً برای بررسی

کالیبراسیون شناسایی می‌کنند).

(۲) مناسب برای هدف<sup>۲۱</sup>

اساس آن بر شناسایی یک عامل منفرد که کارکرد مناسب نامیده می‌شود، استوار است. با توجه به مقاله تاورنیه [۱۸]، این روش بیشتر براساس دقت و مطالعات پایه است. همچنین به زمان محاسبه کمتری نسبت به روش پایین به بالا نیاز دارد و وابسته به اطلاعات در دسترس از روش مربوطه خواهد بود (برای نمونه، یک روش مطالعه اجرایی، استفاده از یک (IQC) یا روش اعتبارسازی (که عموماً براساس یک انحراف استاندارد از اطلاعات در دسترس است).

(۳) بالا به پایین

براساس اطلاعات به‌دست آمده از مطالعات داخل آزمایشگاه (عامل دقت) است. این روش، نیاز به داده‌های مطالعات مشترک دارد و محاسبه آن عموماً براساس یک انحراف استاندارد از اطلاعات در دسترس است.

(۴) اعتبار محور<sup>۲۲</sup>

براساس مطالعات داخل آزمایشگاهی یا بین آزمایشگاهی (عوامل دقت، درستی و دشواری) است. محاسبه آن عموماً براساس یک انحراف استاندارد از اطلاعات در دسترس است.

(۵) سلامت محور<sup>۲۳</sup>

اساس آزمایش‌های دشواری، بر مطالعات داخل آزمایشگاهی بوده و این محاسبه عموماً براساس انحراف استاندارد از اطلاعات در دسترس است.

راهنمای EURACHEM/CITAC دو روش را مشخص می‌کند:

۱. پایین به بالا (یک محاسبه سخت که همه مراحل را بررسی می‌کند)؛ و

۲. اعتبار محور (یک روش ساده شده که صحت نتایج، از قبیل خطی بودن، بازیابی و تکرارپذیری را بررسی می‌کند).

در ابتدا، این روش‌ها می‌توانند با دیگر روش‌ها برای ارزیابی، در همه جزئیات منابع عدم قطعیت استفاده شوند و سپس استفاده از آنها برای شناسایی منابع اصلی که می‌تواند برای محاسبه عدم قطعیت در طول تحلیل استفاده شود، امکان‌پذیر است. اگر چه ممکن است این دو روش را استفاده کنیم، اما اعتبارسنجی براساس روش ارزیابی راه آسانتری برای برآورد عدم قطعیت در نظر گرفته شده‌است [۲۸-۳۰]؛ زیرا بیشتر اطلاعات مورد نیاز برای ارزیابی عدم قطعیت می‌تواند در طول ارزیابی از روش به دست آید [۲۲]. شرکت‌های بین‌المللی گواهی‌دهنده آزمایشگاه‌ها<sup>۲۴</sup> برای مواقعی که باید برآوردی واقعی براساس اطلاعات موجود از روش (مثلاً داده ارزیابی) ساخته شود، این روش را پیشنهاد می‌کنند [۳۱].

#### مرحله ۳: کمیت اجزای عدم قطعیت

برای اندازه‌گیری و یا برای برآورد اجزای عدم قطعیت، هر منبع بالقوه مربوط به عدم قطعیت مهم است. اغلب، تخمین و یا تعیین یک عامل در عدم قطعیت، زمانی که همراه با تعدادی دیگر از منابع مجزا باشد، بهتر امکان‌پذیر است. همچنین مهم است در نظر گرفته شود که آیا داده‌های در دسترس برای همه منابع عدم قطعیت محاسبه می‌شود و برای اجرای آزمایش‌های اضافی برنامه‌ریزی شده‌است یا

با متغیرهای کوچک و تناسب روش برای موضوع هدف نیست، بلکه برای استفاده مورد نیاز است [۳۸].

### نمودارهای کنترل

ISO/IEC 17025 نشان می‌دهد که داده نهایی باید به گونه‌ای ثبت شود که روش‌ها قابل شناسایی باشند و در اینجا باید روش‌های آماری عملی برای مرور نتایج استفاده شوند. به عبارت دیگر، استفاده از نمودارهای کنترل در تحلیل کمی، یکی از ابزارهای مهم (IQC) برای مشاهده و کنترل تحلیل‌های معمول، به ویژه در زمان شناسایی مسیرهای منفی در روش به کار رفته است.

نمودارهای کنترل برای سنجش ثبات نتایج تحقیق به دست آمده در آزمایشگاه استفاده می‌شود. در عمل، اغلب نمودارهای استفاده شده، نمودارهای شوهارت<sup>۲۸</sup> هستند. روش‌های کنترل و پردازش منظم، روش‌های نموداری هستند که تعداد عملیات عددی مورد نیاز اجرا شده را کاهش داده و اجازه کنترل منظم موضوع فرآیند را می‌دهند. تشخیص ساده و سریع اختلالات در ترکیب نقاط علامت‌گذاری شده، اصلاح سریع و تایید معتبر تحقیق را ممکن می‌سازد [۲۷].

هدف از نمودارهای کنترل، شناسایی و تعیین اثرات منفی روی نتایج و منابع بالقوه آنها است. اگر چه نمودارهای کنترلی، ممکن است شکل‌های متنوعی داشته باشند، اما در واقع شکل گرافیکی از مقادیر کیفی مشخص تحت بررسی در نمودار کشیده شده را مقایسه می‌کنند. نمودارهای کنترلی در چندین استاندارد ISO مشخص شده‌اند [۴۱ تا ۴۴]. به هر حال، به هنگام استفاده از RMهای داخلی، مقادیر مشخص شده در واقع میانگینی از اندازه‌گیری‌های تکراری هستند. مطابق قرارداد، اخطار و محدودیت اعمال به ترتیب بین  $\pm 2s$  و  $\pm 3s$  (انحراف استاندارد) به وجود می‌آید که مشابه با احتمال ۹۵/۵ درصد و ۹۹/۷ درصد در توزیع نرمال داده‌هاست [۵].

به این ترتیب، نمودار کنترل می‌تواند خط مرکزی و محدودیت کنترل را ایجاد کند که از نقاط معمول میانگین و انحراف استاندارد به جای مقادیر به دست آمده در طول روش صحنه‌گذاری، استفاده می‌کند. علاوه بر این، حالت اندازه‌گیری، بر مقدار نسبت‌های کمی به دست آمده، اثر زیادی دارد. به بیان بهتر، مانند زمانی که با منحنی کالیبراسیون در شرایط مشابه تعیین می‌شود و نیز زمانی که با استفاده از یک استاندارد داخلی برای تعیین نسبت‌های به دست آمده تنوع داده‌ها کاهش می‌یابد، همان‌طور که در شکل (۶) نشان داده شده‌است [۴۴]. همچنین استفاده از نمودارهای کنترل به آزمایشگاه‌ها اجازه می‌دهد که در طول زمان، دقت و صحت را مداوم و درست ارزیابی کنند.

### آزمون مهارت (PT)

(PT) تعیین عملکرد آزمون آزمایشگاه با ابزارهایی برای مقایسه‌های آزمایشگاهی است. این مطالعات برای آزمون پیشرفت و مقایسه بین تحلیل‌گران فردی با رویکردهای تحلیلی یا اندازه‌گیری و رویکردهای تحلیلی خاص به کار می‌روند [۲۷]. بنابراین، هدف (PT)، دستیابی به نشانه‌ای از عملکرد آزمایشگاهی است. تحقق مهارت، چالشی بزرگ برای آزمایشگاه‌هایی است که نیاز به تایید گواهینامه‌های اعتبار خود دارند. این یک پیشرفت

اینکه روش‌های مورد استفاده در شرایط صحنه‌گذاری قرار داشته‌اند، به کنترل‌های خاصی نیاز است. بنابراین، (QC)ها روش اندازه‌گیری خاصی هستند که برای تشریح کیفیت نمونه‌های تکی یا دسته‌ای استفاده می‌شوند. این کنترل‌ها شامل موارد زیر است:

- (۱) تحلیل مواد مرجع (RM) / استانداردهای اندازه‌گیری<sup>۲۶</sup>؛
- (۲) تحلیل نمونه‌های مجهول<sup>۲۷</sup>؛
- (۳) استفاده از نمونه‌های (QC) و نمودارهای کنترل؛
- (۴) تحلیل داده خام؛
- (۵) تحلیل نمونه‌های مشخص شده؛
- (۶) تحلیل‌های تکثیر شده و
- (۷) (PT).

به طور کلی راهبردهای مختلفی در (QC) می‌تواند استفاده شود و احتمال مطرح شدن هزینه‌ها، سود و در دسترس بودن روش وجود دارد. سه نوع از این راهبردها که عموماً کاربردی هستند در پایین توضیح داده شده‌است.

### تحلیل مواد مرجع (RM). (RM)

(RM) به عنوان ماده‌ای به اندازه کافی یکنواخت و ثابت، بر پایه خواص اختصاصی مطالعه شده در نظر گرفته شده و به عنوان ماده مناسب به منظور استفاده در اندازه‌گیری یا آزمایش ویژگی‌های ظاهری به کار می‌رود [۲۷]. همچنین در ارتباط با اجزای سیستم (QA) نقش مهمی را بازی می‌کند که بر نتایج اندازه‌گیری قابل اطمینان تاثیرگذار است. گستره کاربرد این مواد بسیار وسیع است [۳۳ تا ۳۷]؛ اما بعضی از کاربردهای مشترک به شرح زیر است:

- اعتباربخشی روش‌های تحلیلی، که در آن (RM) برای تعیین دقت و صحت استفاده می‌شود؛
- مقایسه‌های بین آزمایشگاهی، که در آن مواد به کار رفته به عنوان ماده فاعل در مطالعات است؛
- برآورد عدم قطعیت از یک اندازه‌گیری؛
- اسناد و مدارک با قابلیت ردیابی.

در این دیدگاه، هنگام انتخاب یک تامین کننده از (RMs)، عوامل زیر باید در نظر گرفته شود [۳۸]:

- هماهنگی تولید (RMs) با استانداردهای کیفیت (به عنوان مثال، ایزو راهنمای ۳۴ [۳۹]، ISO/IEC 17025 یا ملزومات (ILAC) [۴۰]). همچنین این هماهنگی باید در طول سومین قسمت ارزیابی نشان داده شود.

- ثبت کامل نتایج از هر دو تولیدکننده و مواد (به عنوان نمونه، RM باید یک گزارش از استفاده در قیاس داخل آزمایشگاهی با روش‌های مختلف در طول مدت بررسی و یا گزارشی از استفاده در تعدادی از آزمایشگاه‌ها را در دوره زمانی چندین ساله داشته باشد).
- در دسترس بودن یک تائیدیه و گزارش تطابق با راهنمای ایزو.
- اعتبار تائیدیه و عدم قطعیت داده‌ها که شامل هماهنگی روش‌های کلیدی با راهنمای ایزو است.

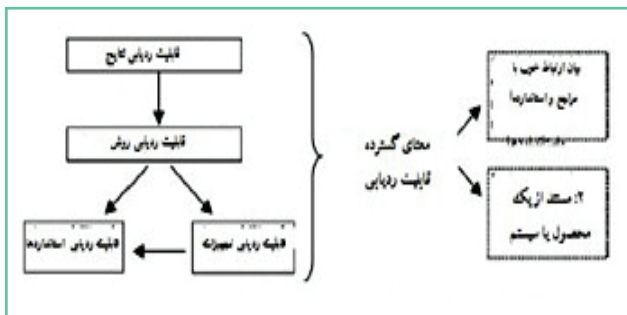
بعضی یا تمام این الزامات ممکن است در ویژگی‌های تحلیلی و یا ویژگی‌های مورد نظر مشتریان مشخص شود، اما در اغلب موارد برای تحلیل‌گران، به منظور استفاده در تصمیم‌گیری‌های حرفه‌ای مورد نیاز است. علاوه بر این، توجه نمایید که کیفیت، لزوماً همسان

رسمیت شناختن متقابل آنها برگزار گردید [۴۷]. آزمایشگاه‌های پسماند آفات در اروپا از (PT) به‌عنوان ابزار مهمی در توسعه نتایج (QC) استفاده می‌کنند [۴۸]. توسعه برنامه (PT) در اروپا، نتایج مهمی را در هماهنگ‌سازی به دنبال داشته است که بیش از ۱۲۰۰۰ قسمت از داده‌های به‌دست آمده ارزیابی شده است [۴۸]. بنابراین، (PT) ابزار قدرتمند دیگری برای اطمینان از نتایج در آزمایشگاه، در زمینه شیمی تحلیلی است.

در این مرحله بعد از تمام QCها که در آزمایشگاه به کار برده شده‌اند، (AQAC) با هدف مطمئن شدن از نتایج تحلیلی به‌دست آمده در طول تحلیل‌های آزمایشگاهی کامل می‌شود. در مرحله سوم و آخر، (QC) به‌صورت تحلیلی، روش و نتایج را مورد ارزیابی قرار می‌دهد، اطلاعات جدید در مورد روش تایید (تایید اعتبار خود برای هدف) و اعتبارسازی سطح اعتبار در نتایج (عدم قطعیت) را ارائه می‌دهد. این سه مرحله، قابلیت پیگیری برای نتایج را داشته و مفهوم کلیدی در شیمی تحلیلی به‌دلیل دستیابی به نتایج مطمئن را داراست.

### ○ قابلیت ردیابی

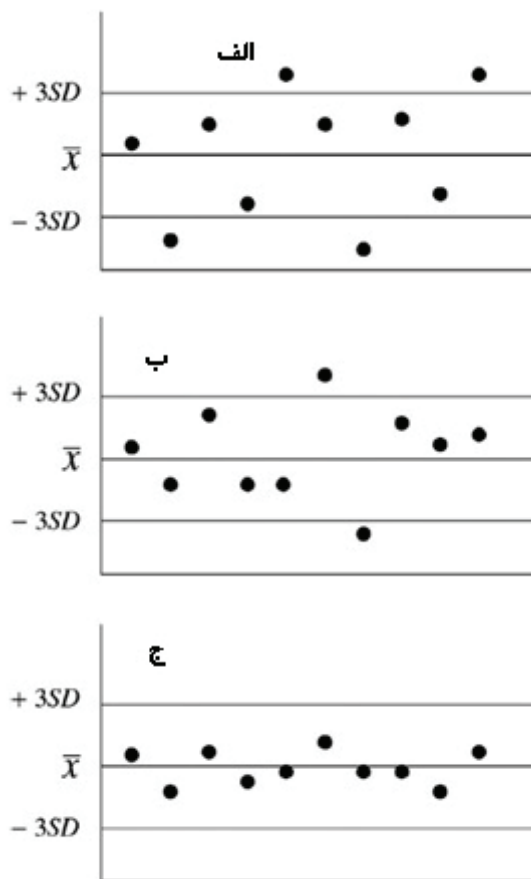
برای ایجاد نتایج مطلوب، وجود قابلیت ردیابی ضروری است، بخصوص در شیمی تحلیلی که دربرگیرنده بقیه مفاهیمی است که لزوماً در اینجا ذکر نشده‌اند. این مفهوم، ادامه و پیامد اندازه‌شناسی و اندازه‌گیری است که بیش از یک قرن برای اندازه‌گیری‌های فیزیکی (برای نمونه، جرم، طول، زمان و درجه حرارت) استفاده می‌شد و در حال حاضر به‌منظور مشخص کردن خصوصیات اندازه‌گیری‌های شیمیایی و بیولوژیکی مطرح می‌شود [۴۹]. بر اساس اعلام دانشنامه‌ی بین‌المللی اندازه‌شناسی [۱۹]، قابلیت ردیابی اندازه‌شناسی و اندازه‌گیری، خاصیتی است که نتیجه اندازه‌گیری شده است که به موجب آن، نتایج می‌تواند مرتبط با یک مرجع در مجموعه زنجیره پیوسته‌ای از کالیبراسیون‌ها و هر اندازه‌گیری در تعیین عدم قطعیت باشد. در آزمایشگاه‌های تحلیلی، قابلیت ردیابی نتایج، مرتبط با قابلیت ردیابی یک روش بوده که متصل به پیگیری استانداردها و ردیابی لوازم استفاده شده در روش تحلیلی است [۱۸ و ۵۰] (شکل ۷).



شکل ۷: مفاهیم مختلف و معنای گسترده قابلیت ردیابی.

(AQAC) شامل قابلیت ردیابی نیز می‌شود و می‌تواند ابزار مفیدی برای افزایش قابلیت اطمینان در آزمایشگاه‌ها باشد و در صورتی که این روش برای منظور مورد استفاده مناسب بوده و به

مهم برای نگهداری کیفیت مناسب نتایج است. در (PT)، مهارت افراد در آزمایشگاه براساس تشخیص و تفسیر آنها از نتایج، برای اجزای خاص در نمونه‌های توزیعی (مواد) بررسی می‌شود [۲۷]. هر آزمایشگاه یک کد شناسایی خاص دارد که بدین ترتیب هر شرکت‌کننده برای دیگران ناشناس باقی می‌ماند.



شکل ۶: تاثیر حالت کالیبراسیون بر کمیت میزان بازیابی (الف): نمودار کنترل x از ۱۰ میزان بازیابی به‌دست آمده با یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از کمیت و تحلیل آن در روز اول. (ب): نمودار کنترل x همان میزان بازیابی به‌دست آمده با یک منحنی کالیبراسیون تزریق روزانه با استفاده از کمیت، در همین دسته. (ج): نمودار کنترل x همان میزان بازیابی به‌دست آمده با منحنی کالیبراسیون تزریق روزانه با استفاده از کمیت در همین دسته و با یک استاندارد داخلی.

دستورالعمل‌هایی در مورد قرار دادن محدودیت برای فراهم‌کننده (PT) (و به همراه ریز اجزای آن) در رسیدن به تشخیص مهارت در انواع به‌خصوص از (PT) وجود دارد. این راهنماها در مدرک ILACG13 [۴۵] و بیشتر در ISO/IEC 17043 [۴۶] پیدا می‌شوند. شرکت در (PT) به‌ترتیبی برای آزمایشگاه‌ها به‌منظور ارزیابی کیفیت نتایج خود تبدیل شده است. تاییدیه آزمایشگاهی آسیا و اقیانوسیه از سال ۱۹۹۴ با همکاری (PT) در این منطقه به‌منظور تقویت توانایی‌ها و ظرفیت‌های فنی آزمایشگاه‌های عضو و به حمایت از توسعه برنامه‌ریزی و به

نمونه، ترازوها، میکروپیپت‌ها و به‌طور کلی دیگر ابزار کالیبره شده) در ISO/IEC17025 آزمایشگاه‌های معتبر قابلیت ردیابی را بیشتر می‌کنند. (به‌عنوان نمونه، باید مورد تأیید راهنمای ایزو شماره ۳۴ [۳۹] باشد). در نهایت، احتمال درک ارتباط تمام بخش‌های نشان داده شده در (AQAC) - اعتبارسنجی، عدم قطعیت و (QC) وجود دارد؛ زیرا همه این جوانب وقتی به کار برده شده‌اند که با استفاده از تجهیزات کالیبره شده و استانداردهای تأیید شده در ترفیع قابلیت ردیابی و تولید نتایج قابل اطمینان باشد.

موجب ارتقا قابلیت ردیابی روش شده باشد، تأیید اعتبار خواهد شد. عدم قطعیت، قابلیت ردیابی یک نتیجه را با ارائه یک سطح اطمینان نشان می‌دهد. در نهایت اگر روش، توانایی فراهم کردن اندازه‌گیری‌های قابل اطمینان در اعتباربخشی و عدم قطعیت را داشته باشد، (QC) تحلیلی معمول برای ارزیابی خواهد بود. این موارد (اعتبار، عدم قطعیت و (QC)) نیاز به ارزیابی با استفاده از تجهیزات کالیبره شده (قابلیت ردیابی از تجهیزات) و استانداردهای گواهی شده (قابلیت ردیابی استاندارد) دارند. تجهیزات (به‌عنوان

## پی‌نوشت

۱. لیسانس صنایع (گرایش تولید)، شرکت تولیدی و تحقیقات صنعتی آیسارکوبیر
۲. لیسانس زیست‌شناسی، شرکت مهار فن‌انبار
۳. لیسانس مهندسی مواد (ساخت و تولید)، دانشگاه تبریز، دانشکده مهندسی مکانیک گروه مهندسی و علم مواد
۴. عضو کارگروه تخصصی استاندارد و کالیبراسیون شبکه آزمایشگاهی فناوری‌نانو

5. quality assurance (QA)
6. quality-control(QC)
7. Analytical Quality Assurance Cycle (AQAC)
8. analytical QA (AQA)
9. Valcarcel
10. Good Laboratory Practice (GLP)
11. Plan, Do, Check, and Act
12. Plan, Do, Study and Act
13. International Vocabulary of Metrology (VIM)
14. Maximum Residue level (MRL)
15. internal QC (IQC)
16. (RMs)reference materials
17. Proficiency testing(PT)
18. limit of quantification (LOQ)
19. analytical quality control (AQC)
20. maximum residue limits (MRLs)
21. Fitness-For-Propose
22. Validation-Based
23. Robustness-Based
24. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC)
25. Validation
26. The analysis of RMs/Measurement standards
27. The analysis of blind samples
28. Shewhart
29. State-of-the-art

## نتیجه‌گیری

(QA) در آزمایشگاه و کاربرد ISO/IEC17025 یک روش مشخص در دنیای تحلیلی را تشکیل می‌دهد. بنابراین، (AQAC) موردنظر ما براساس ایدئولوژی (QA) برای نتایج و تشویق آزمایشگاه‌ها برای رسیدن به بهترین سطوح «درجه هنری»<sup>۲۹</sup> توسعه می‌یابد. برای دستیابی به این ایده، (AQAC) با اعتبارسازی شروع می‌شود، سپس روش اجرایی که مدارک را تهیه می‌کند، نشان می‌دهد که برای این هدف مناسب است و نقاط قوت و ضعف‌های روش استفاده شده را نشان می‌دهد. بعد از ایجاد اعتبار، مرحله دوم ناشی از محاسبه عدم قطعیت و پراکندگی مشخصات مقادیر کیفی نسبت داده شده به اندازه‌گیری با یک سطح اطمینان بالا است. در مرحله سوم و در آخرین مرحله، (QC) نشان می‌دهد که این روش می‌تواند هنوز نتایج قابل اطمینانی را فراهم آورد؛ به‌عبارت دیگر، اعتبار روش در حال پیشرفت بوده و (QC) داده‌های جدید معمول و سازگار با محاسبه عدم قطعیت را تولید می‌کند. بنابراین، (AQAC) چرخه‌ای بی‌انتهاست و تحلیل‌ها می‌توانند در آزمایشگاه با اطمینان از نتایج اجرا شوند. این (AQAC) می‌تواند به‌عنوان وسیله کیفی قدرتمند در همه انواع آزمایشگاه‌ها به کار گرفته شود. برای آزمایشگاه‌هایی که سیستم مدیریت کیفیت رسمی دارند (به‌عنوان مثال، ISO/IEC17025 یا (GLP) که بعضی از الزامات چرخه را نشان می‌دهد) (به معنای آزمایشگاه‌های معمولی، آزمایشگاه‌های درگیر در کنترل رسمی و غیره) (AQAC) به‌صورت ترکیبی با این استانداردهای بین‌المللی برای تولید بهبودهای مستمر در کیفیت نتایج کار می‌کند. همچنین، این (AQAC) برای آزمایشگاهی که سامانه کیفی رسمی ندارد (به‌عنوان نمونه، آزمایشگاه‌های تحقیقاتی اصلی و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی آنالیزی)، قابلیت پیگیری نتایج را فراهم نموده و ابزار استاندارد شده کیفی دیگری برای آزمایشگاه‌های تحقیقاتی (شاید با امکان مجوز رسمی در آینده) است.

- [1] A. Townshend, Trends Anal. Chem. 3 (1984) II.
- [2] F.M. Garfield, Trends Anal. Chem. 4 (1985) 162.
- [3] Ph. Quevauviller, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 52.
- [4] International Standards Organization (ISO), ISO/IEC 17025: General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO, Geneva, Switzerland, 2005.
- [5] B.M. Simonet, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 525.
- [6] E. Malkoc, W. Neuteboom, Forensic Sci. Int. 167 (2007) 121.
- [7] P. Lepom, B. Brown, G. Hanke, R. Loos, Ph. Quevauviller, J. Wollgast, J. Chromatogr., A 1216 (2009) 302.
- [8] European Commission, Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status, Off. J. Eur. Union L201(2009)36.
- [9] European Commission, Commission Decision of 12 August 2002(2002/657/CE). Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, off. J. Eur. Union L221 (2002) 8.
- [10] A.G. Fragkaki, I.P. Leontiou, N. Kioukia-Fougia, M. Tsivou, M.H.E. Spyridaki, C.G. Georgakopoulos, Technovation 26 (2006) 1162.
- [11] K.H. Chung, G.S. Choi, W. Lee, Y.H. Cho, C.W. Lee, Accred. Qual. Assur. 10 (2006) 603.
- [12] S.M. Resnizky, R.R. Pla', R.C. Jasan, S.E. Hevia, M.A. Moreno, R. Invenizzi, Accred. Qual. Assur. 10 (2006) 590.
- [13] P. Arikan, O. Acar, R. Acar, Radioanal. Nucl. Chem. 259 (2004) 391.
- [14] M. Valca'rcel, A. Rios, Accred. Qual. Assur. 8 (2003) 78.
- [15] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD): OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 1 - OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD, Paris, France, 1997.
- [16] P. Gupta, Qual. Prog. 39 (2006) 45.
- [17] M. Valca'rcel, A. Rios, Trends Anal. Chem. 13 (1994) 17.xc
- [18] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 535.
- [19] Working Group 2 of the Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG 2), International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3rd Edition, JCGM200:2008 (available electronically at <http://www.bipm.org/>).
- [20] I.R.B. Olivares, H.T. Godoy, F.A. Lopes, Fit for purpose validation: Understanding different protocols of the European Community to analyze residues and contaminants in Brazilian food, in: V Congreso Virtual Iberoamericano Gestio'n de Calidad de Laboratorios, 2009.
- [21] Document SANCO/10684/2009. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Implemented by 01/01/2010. Supersedes Document SANCO/3131/2007 (available electronically at [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)).
- [22] EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 1998 (available electronically at <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>).
- [23] Environmental Protection Agency (EPA). Guidance for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program (available electronically at <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/methdev.pdf>).
- [24] European Commission, Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo (a) pyrene in food stuffs, Off. J. Eur. Union L88 (2007) 29.
- [25] ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) (available electronically at <http://www.ich.org/>)

LOB/media/MEDIA417.pdf).

[26] EURACHEM / CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd Edition, 2000 (available electronically at <http://www.eurachem.org/guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>).

[27] P. Konieczka, J. Namiesnik, Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory. A Practical Approach, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, USA, 2009.#.

[28] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R.Savant, P.G. Adsule, J. Chromatogr., A 1173 (2007) 98.

[29] S. Populaire, E.C. Gimenez, Accred. Qual. Assur. 10 (2006) 485.

[30] S. Walorczyk, B. Gnusowski, J. Chromatogr, A 1216 (2009)6522.

[31] ILAC-G17:2002. Introducing the Concept of Uncertainty of Measurement in Testing in Association with the Application of the Standard ISO/IEC 17025 (available electronically at [http://www.ilac.org/documents/ILAC\\_G172002\\_intro\\_the\\_concept\\_of\\_uncert\\_meas\\_with\\_17025.pdf](http://www.ilac.org/documents/ILAC_G172002_intro_the_concept_of_uncert_meas_with_17025.pdf)).

[32] Ph. Quevauviller, W. Cofino, L. Cortez, Trends Anal. Chem. 17(1998) 241.

[33] H. Emons, T.P.J. Linsinger, B.M. Gawlik, Trends Anal. Chem. 23(2004) 442.

[34] S.D. Rasberry, Fresenius\_ J. Anal. Chem. 360 (1998) 277.

[35] M. Lipp, Accred. Qual. Assur. 9 (2004) 539.

[36] J. Pauwels, A. Lamberty, Fresenius\_ J. Anal. Chem. 370 (2001)111.

[37] N. Majcen, Accred. Qual. Assur. 8 (2003) 108.

[38] EURACHEM / CITAC Guide. Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement, 2003 (available electronically at [http://www.eurachem.org/guides/pdf/EC\\_Trace\\_2003.pdf](http://www.eurachem.org/guides/pdf/EC_Trace_2003.pdf)).

[39] International Standards Organization (ISO), ISO Guide 34:2009 -General requirements for the compe-

tence of reference material producers, ISO, Geneva, Switzerland, 2009.

[40] ILAC-G12:2000. ILAC Guidelines for the Competence of Reference Material Producers, 2000 (available electronically at [http://www.ilac.org/documents/ILAC\\_G12-2000\\_guidelines\\_for\\_the\\_requirements\\_for\\_the\\_competence\\_of\\_reference\\_materials\\_producers.pdf](http://www.ilac.org/documents/ILAC_G12-2000_guidelines_for_the_requirements_for_the_competence_of_reference_materials_producers.pdf)).

[41] International Standards Organization, ISO 7870:1993, Control Charts. General Guide and Introduction, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.

[42] International Standards Organization, ISO 7966:1993, Acceptance Control Charts, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.

[43] International Standards Organization, ISO 8258:1991, Shewart Control Charts, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.

[44] F.J.E. Gonza' lez, M.E.H. Torres, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, A.M.G.Campanã, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 361.

[45] ILAC-G13:08/2007. ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes (available electronically at [http://www.ilac.org/documents/ILAC\\_G13\\_08\\_2007.pdf](http://www.ilac.org/documents/ILAC_G13_08_2007.pdf)).

[46] International Standards Organization, ISO/IEC 17043:2010: Conformity assessment - General requirements for proficiency testing, ISO, Geneva, Switzerland, 2010.

[47] K.M. Chan, S.T.C. Cheung, Y.L. Wong, A.L.S. Cheng, C. Mok, W.Wong, D.W. Tholen, Y. Wong, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 562.

[48] P. Medina-Pastor, C. Rodriguez-Torreblanc, A. Andersson, A.R.Fernandez-Alba, Trends Anal.Chem. 29 (2010) 70.

[49] Ph. Quevauviller, Trends Anal. Chem. 23 (2004) xi.

[50] M. Valcarcel, A. Rios, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 570



## Authors

Bibi somayeh mirjalili<sup>1,4\*</sup>Somayeh jalilzadeh<sup>2,4</sup>Ali hamze beige<sup>3,4</sup>

dsmirjalily@gmail.com

1. Industrial Engineering, Absar kavir , Science and Technology Park. Yazd
2. BSc Biology, Mahar Fan Abzar Company.
3. Materials Engineering, Mechanical Engineering Department, Tabriz University
4. Iran Nanotechnology Laboratory Network (INLN) Standard and Calibration Experts Workgroup



# Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle

## Abstract

Considering how demand for quality assurance (QA) has grown in analytical laboratories, we show the trends in analytical science, illustrated through international standard ISO/IEC 17025, validation, measurements of uncertainty, and quality-control (QC) measures. A detailed review of the history of analytical chemistry indicates that these concepts are consistently used in laboratories to demonstrate their traceabilities and competences to provide reliable results.

We propose a new approach for laboratory QA, which also develops a diagram to support routine laboratories (which generally apply a quality system, such as ISO/IEC 17025) or research laboratories (that have some difficult applying this international standard). This approach, called the Analytical Quality Assurance Cycle (AQAC), presents the major QA concepts and the relationships between these concepts in order to provide traceability and reliable results. The AQAC is a practical tool to support the trend towards QA in analytical laboratories.

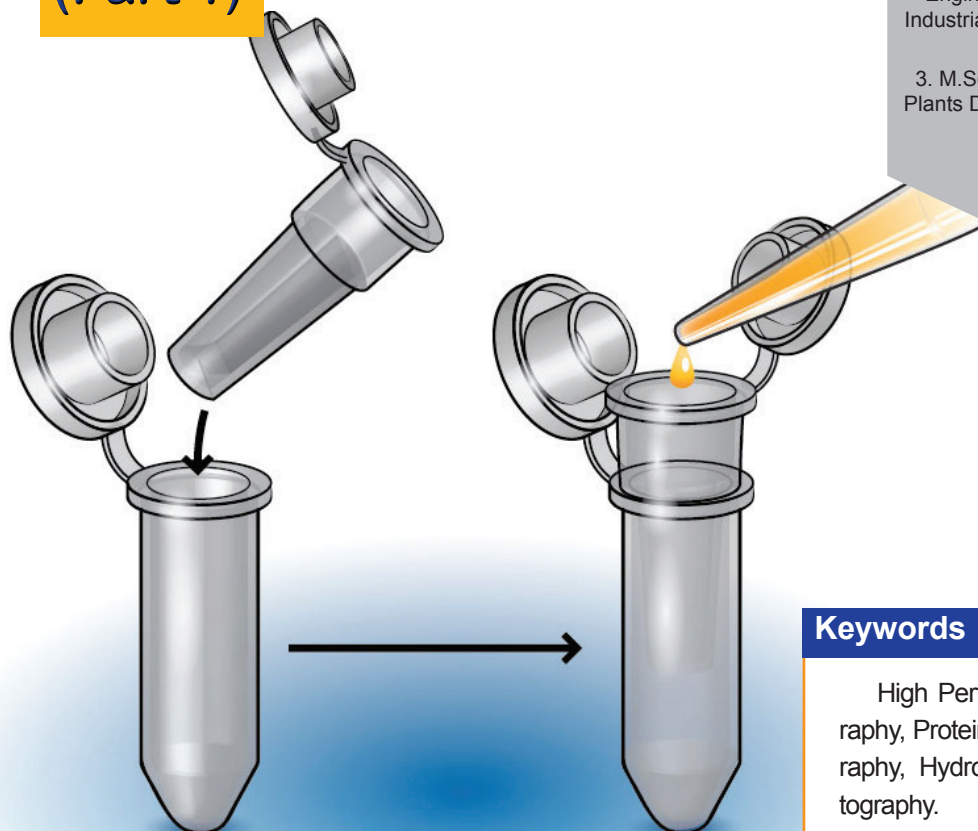
## Keywords

Analytical Quality Assurance Cycle (AQAC); Analytical laboratory; ISO/IEC 17025; Laboratory quality assurance; Quality assurance

(QA); Quality control (QC); Reliable result; Traceability; Uncertainty; Validation

# Chromatographic methods for protein purification

(Part 1)



## Authors

Maryam Yousefi<sup>1,4\*</sup>  
Mehdi Mohammadi<sup>2</sup>  
Mahmoud Naderi<sup>3,4</sup>

[m.yousefi@avicenna.ac.ir](mailto:m.yousefi@avicenna.ac.ir)

1. Organic Chemistry Ph.D, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research.
2. Organic Chemistry Ph.D, Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology (IIEB), Tehran, Iran
3. M.Sc. Organic Chemistry, Medicinal Plants Department, Research Institute of Forests and Rangelands
4. INLN chromatography Experts Workgroup

## Keywords

High Performance Liquid Chromatography, Protein, Ion Exchange Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography.

## Abstract

To achieve a high level of purity in the purification of proteins for therapeutic or analytical application, it is necessary to use several chromatographic steps. There is a range of techniques available including anion and cation exchange, which can be carried out at different pHs, hydrophobic interaction chromatography, size exclusion and affinity chromatography. Separation by HPLC can be done by reverse-phase, ion-exchange or size-exclusion methods. Reverse-phase chromatography (RPC) separates proteins based on their relative hydrophobicities. This technique is highly selective but requires the use of organic solvents. Some proteins are permanently denatured by solvents and will lose functionality during RPC, therefore this method is not recommended for all applications. Ion-exchange chromatography refers to separation of proteins based on charge. Size-exclusion chromatography (gel filtration) separates larger proteins from small ones. Affinity chromatography is a very useful technique for "polishing" or completing the protein purification process. Beads in the chromatography column are cross-linked to ligands that bind specifically to the target protein.

# Zeta potential: Theory and short tutorial of Zeta potential measurement by DLS

## Authors

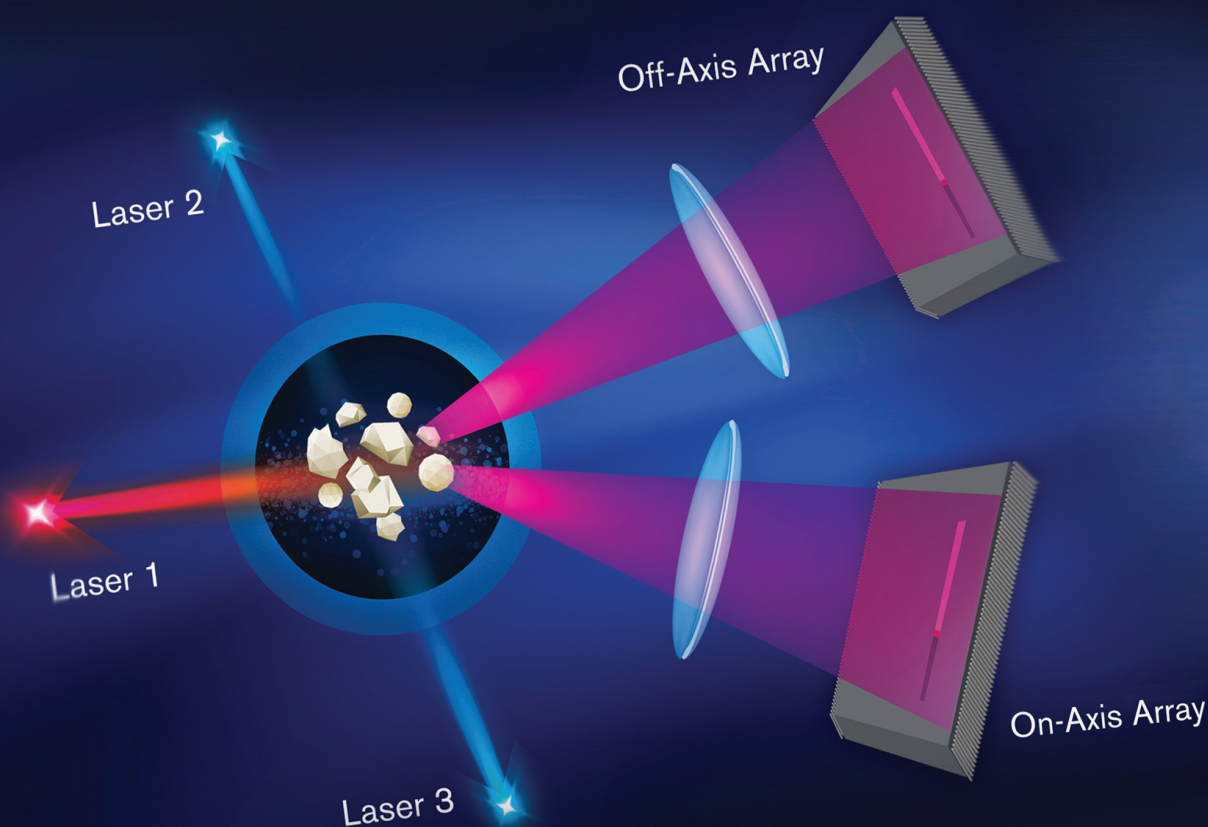
Davoud Gharailou<sup>1\*</sup>

Sasan Moraddeh<sup>2</sup>

[davoud.gharailou@gmail.com](mailto:davoud.gharailou@gmail.com)

1. MSc NanoTechnology, KEFA  
nanolaboratory Complex

2. MSc Material Eng, KEFA  
nanolaboratory Complex



## Abstract

The zeta potential is the overall charge a particle acquires in a specific medium. The measurement of zeta potential is an important factor in the stability of colloidal materials. It plays an important role in theory of aggregative stability. There are a few ways to measure the zeta potential. This paper explained theory of zeta potential and how it is measured by DLS.

## Keywords

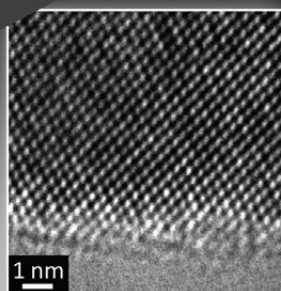
Zeta potential, DLS, dynamic light scattering, stability of the solution.

## Authors

Bitā Faridnia<sup>1</sup>  
 Abdolhamid Hatefi Mehrjardi<sup>2,5</sup>  
 Sahar Tayeb tahr<sup>3,5</sup>  
 Sedigheh Sadegh Hassani<sup>4,5\*</sup>  
 sadeghs@ripi.ir

1. Msc. Inorganic chemistry, Research institute of Petroleum Industry, Catalysis and Nanotechnology Research Division
2. Ph.D Analytical Chemistry, Payame Noor University, Department of Chemistry, P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran
3. Msc. physics solid state, Materials and Energy Research Center (MERC), semiconductors department, material characterization laboratory
4. Msc. Analytical chemistry, Research institute of Petroleum Industry, Catalysis and Nanotechnology Research Division
5. Iran Nanotechnology Laboratory Network (INLN), SPM Experts work group.

# Photoconductive Atomic Force Microscopy and Investigation of Electrical Properties and Morphology of Surface

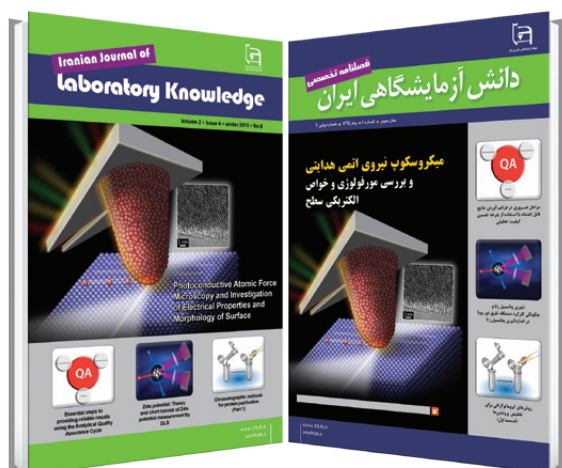


## Keywords

photoconductive AFM, photovoltaic cells, organic solar cells, reversed microscope

## Abstract

Photoconductive AFM has been well-known as a effective and applicable method to investigate morphology in nanoscale and surface properties simultaneously. It, also, images the relationship between function-properties and structure in nanoscale materials. Similar to other methods of AFM, this technic possess specific machinery including a reversed microscope and a light source. In this regards, PC-AFM can be used to characterization of hole-electron transfer in photoconductive cells and organic solar cells. In fact, PC-AFM is still novel and requires to be investigated and developed.



# Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Volume 3 ■ Issue 1 ■ Spring 2015 ■ No. 9

Concessionaire: Iran Nanotechnology Laboratory Network

Managing Editor: Reza Asadifard

Editor in Chief: Mojtaba Nasab

Executive Management: Iran Nanotechnology laboratory network (INLN)

Article Editor: Davoud Gharailou

### Authors:

Bibi somayah mirjalili, Somayah jalilzadeh, Ali hamze beige, Maryam Yousefi Mehdi Mohammadi, Mahmoud Naderi, Sasan Moraddeh, Davoud Gharailou, Bita Faridnia, Abdolhamid Hatefi Mehrjardi Sahar Tayeb taheer, Sedigheh Sadegh Hassani masoume madanipour

Designer : Simin Rafipour Langroudi

Editors: Zeinab Zarincheh, Mahmoud Naderi

Iran, Tehran, Po.Box: 14565-344

[www.IJLK.ir](http://www.IJLK.ir)

Email : [journal@nanolab.ir](mailto:journal@nanolab.ir)

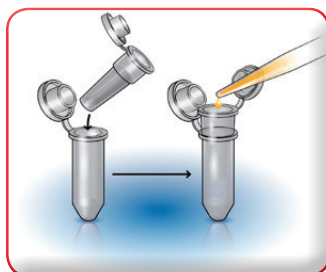


Iran Nanotechnology Laboratory Network

## Contents

Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle

38 <

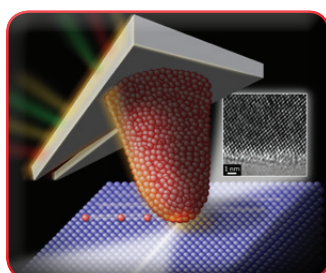
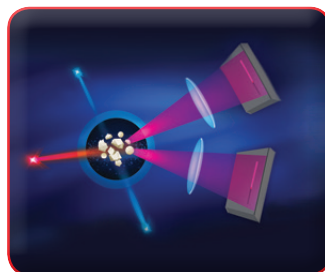


Chromatographic methods for protein purification (Part 1)

>39

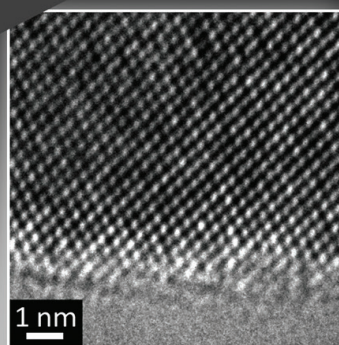
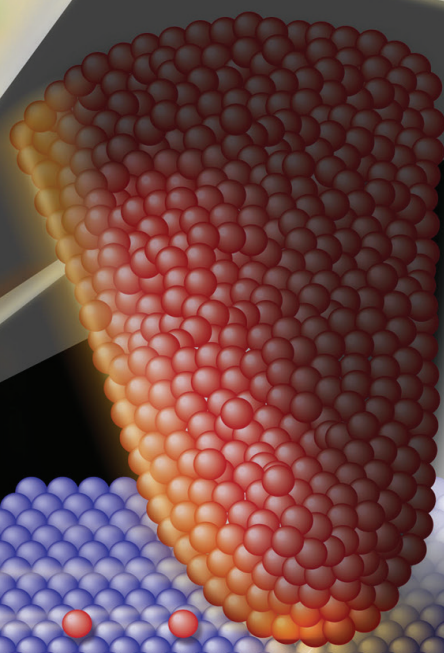
Zeta potential: Theory and short tutorial of Zeta potential measurement by DLS

40 <



Photoconductive Atomic Force Microscopy and Investigation of Electrical Properties and Morphology of Surface

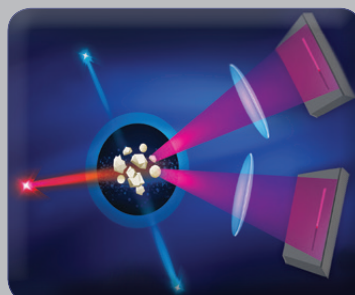
>41



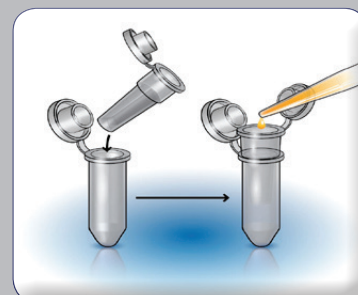
## Photoconductive Atomic Force Microscopy and Investigation of Electrical Properties and Morphology of Surface



Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle



Zeta potential: Theory and short tutorial of Zeta potential measurement by DLS



Chromatographic methods for protein purification (Part 1)