



فصلنامه

# دانش آزمایشگاهی ایران

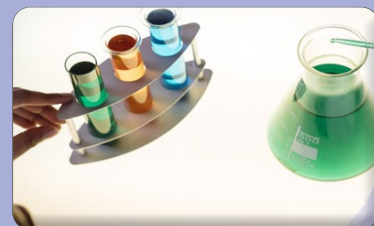
سال یازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۳

ISSN 2538-3450



## تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون کشتش

حضور شبکه آزمایشگاهی و مراکز عضو در چهاردهمین نمایشگاه بین‌المللی فناوری نانو



ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمایشگاه‌ها با ارائه یک نمونه عینی



مروری بر اهمیت و طبقه‌بندی روش واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی و کاربرد آن در صنایع غذایی



ساخت نانوزیست کامپوزیت کیتوسان-هالوسیت به‌عنوان جاذب برای روش ریزاستخراج فیلم نازک



کالیبراسیون مرتبه بالا و آنالیز داده‌ها در کروماتوگرافی



نقش پایگاه داده COMAR برای مواد مرجع



# پیدا مبارک





# فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران

سال یازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۳

ISSN 2538-3450

صاحب امتیاز: ستاد ویژه توسعه فناوری نانو معاونت علمی  
و فناوری ریاست جمهوری

سر دبیر: علیرضا بدیعی

مدیرمسئول: مجتبی نسب

مدیریت اجرایی: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

دبیر مقالات: داود قزایلو

همکاران این شماره: حامد دارابی، مهری ندیری نیری  
صفا سراج مهدی زاده، محمد سراجی، مهتاب تارمی  
نرگس مهرافزا، فریده باتقوا، حمید حیدری  
سید احمد ظهیرمیردامادی، روح‌الله کاشانکی، فرزانه زمانی  
فهیمه نوری کوهانی، عباس عابدفر، فاطمه عباس زاده

طراحی و صفحه آرایی: سیمین رفیع پور لنگرودی

ویراستار: زینب زرینچه

نشانی: تهران، صندوق پستی ۳۴۴-۱۴۵۶۵

تلفن: ۰۲۱ ۶۶۹۴۱۰۸۵

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

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



شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

## فهرست مطالب

حضور شبکه آزمایشگاهی و مراکز عضو در چهاردهمین نمایشگاه  
بین‌المللی فناوری نانو

۴ <



فناوری نانو- نانوشیء- لایه‌های چیدمان یافته برای  
کاربردهای زیست حسگری الکتروشیمیایی  
تعیین مشخصه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری

۶ <



ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمایشگاه‌ها با  
ارائه یک نمونه عینی

۷ <



مروری بر اهمیت و طبقه‌بندی  
روش واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی و  
کاربرد آن در صنایع غذایی

۱۳ <



ساخت نانوزیست کامپوزیت کیتوسان-  
هالوسیت به‌عنوان جاذب برای روش  
ریزاستخراج فیلم نازک

۲۲ <



کالبراسیون مرتبه بالا و آنالیز داده‌ها در  
کروماتوگرافی

۳۲ <



نقش پایگاه داده COMAR برای مواد مرجع

۳۸ <



تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در  
آزمون کشش

۴۲ <

اخبار

استاندارد

مقالات

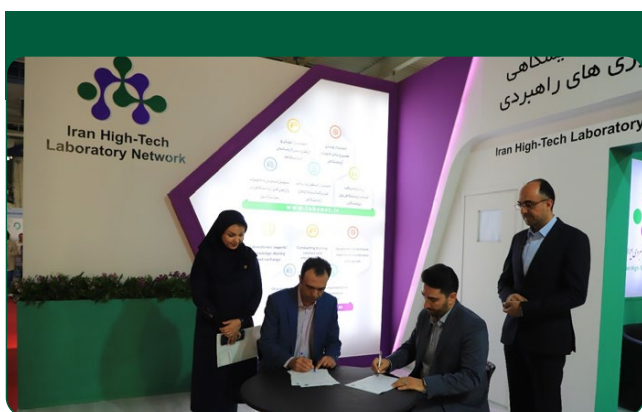


## حضور شبکه آزمایشگاهی و مراکز عضو در چهاردهمین نمایشگاه بین‌المللی فناوری‌نانو

نانوفناوری، یکی از شاخص‌ترین بسترهای نمایش توانمندی فناوری‌های ایران در بین فناوری‌های راهبردی و مقیاس جهانی است. از این رو، هر ساله با هدف معرفی و عرضه این دستاوردها و توانمندی‌های فناورانه، نمایشگاه فناوری‌نانو با حضور و مشارکت پژوهشگران و محققان، دانشگاهیان، مدیران شرکت‌های تولیدکننده محصولات مبتنی بر فناوری‌نانو، سازندگان ماشین‌آلات و تجهیزات ساخت و تجهیزات آزمایشگاهی این حوزه برگزار می‌شود. در این میان، نقش آزمایشات و تحقیقات کیفی و کارآمد در به نتیجه رسیدن محصولات و فناوری‌های این حوزه اهمیتی حیاتی دارد. بر همین اساس، شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی که بستر به اشتراک‌گذاری تجهیزات، خدمات و توانمندی‌های آزمایشگاهی است با حضور در نمایشگاه فناوری‌نانو، زمینه را برای بهره‌مندی هر چه بهتر مخاطبان این حوزه از امکانات و زیرساخت‌های آزمایشگاه‌های سراسر کشور و به‌طور خاص، در حوزه نانوفناوری فراهم کرده است.

در حال حاضر، بیش از ۱۶۳۰ مجموعه آزمایشگاهی با عضویت در شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، خدمات خود را به مخاطبانی از سراسر کشور عرضه می‌کنند. این آزمایشگاه‌ها بیش از ۳۱ هزار تجهیز آزمایشگاهی را اشتراک‌گذاری نموده و بیش از ۱۴۶ هزار آزمون و خدمت متنوع با تجهیزات ثبت شده قابل ارائه است.

همچنین شبکه آزمایشگاهی با هدف تسهیل در پیشبرد پژوهش‌ها، بهره‌مندی هر چه بیشتر جامعه پژوهش و فناوری از خدمات آزمایشگاهی کیفی و کارآمد، تسهیلاتی را در قالب طرح‌های تخفیفی از طریق باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی به مخاطبین خود ارائه می‌دهد.



تفاهم‌نامه همکاری بین شرکت گوهرشناسی پارلا گوهر درخشان و آزمایشگاه مرکزی پژوهشگاه مواد و انرژی

### امضای تفاهم‌نامه‌های همکاری بین مراکز عضو

یکی از برنامه‌های اولویت‌دار شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، ایجاد بستری برای همکاری‌های دوجانبه و چندجانبه میان مجموعه‌های آزمایشگاهی و پژوهشی عضو با یکدیگر است و از این دست همکاری‌های سازنده، حمایت می‌کند. در همین راستا، غرفه شبکه آزمایشگاهی در سالن خلیج فارس محل دائمی نمایشگاه‌های بین‌المللی تهران، میزبان رویدادهای انعقاد ۳ تفاهم‌نامه همکاری، میان آزمایشگاه‌های عضو در راستای توسعه و ارتقای توانمندی‌ها و خدمات قابل ارائه آنها بود.



تفاهم‌نامه همکاری بین شرکت دانش‌بنیان کیمیا اورنگ جنوب و شرکت رستاک



تفاهم‌نامه همکاری بین سازمان زمین‌شناسی و اکتشافات معدنی کشور و مرکز تحقیقات فرآوری مواد معدنی ایران

## دهمین نشست سراسری مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی برگزار شد



برای پژوهش‌های نیازمحور فناورانه، گفت: «خدمات حمایتی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی با حمایت معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش بنیان ریاست جمهوری، به ۹۰۰ میلیارد ریال افزایش داده شد و بر این اساس، در سال جاری، ۳۰۰ میلیارد ریال حمایت‌های عمومی و ۶۰۰ میلیارد ریال حمایت برنامه محور در شبکه آزمایشگاهی ارائه شده است.» همچنین در سال ۱۴۰۲ علاوه بر اعتبارات عمومی باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی ویژه اعضای هیئت علمی و دانشجویان تحصیلات تکمیلی که به صورت فصلی ارائه می‌شود، اعتبارات جدیدی مبتنی بر فعالیت‌های برنامه محور در حوزه توسعه فناوری و همچنین خروجی فعالیت‌های پژوهشی نیز ارائه شد.

هر ساله اعضای شبکه آزمایشگاهی و سایر سازمان‌های همکار، در نشست سراسری، به بررسی عملکرد آزمایشگاه‌ها، نیازها و چگونگی ارائه خدمات جدید می‌پردازند و طی این مراسم، از مدیران آزمایشگاه‌هایی که در طول مدت یک سال گذشته عملکرد مطلوبی داشته‌اند، تقدیر می‌شود.

دهمین نشست سراسری مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی ۵ آذر ماه ۱۴۰۲ به میزبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران برگزار شد. در این برنامه، مدیر شبکه آزمایشگاهی، ضمن قدردانی از زحمات معاون علمی، فناوری و اقتصاد دانش بنیان درباره افزایش بودجه شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و اعتبارات ویژه



آزمایشگاهی، مشتری‌مداری، ارتقای استانداردها و روش آزمون‌ها و در نهایت، ارائه خدمات بهتر به مخاطبان با رونق پژوهش‌های کارآمد، ارتقای کیفیت محصولات و نیز تحول آفرینی در اقتصاد دانش‌بنیان است.

شرکت کنندگان در این رویداد که هر ساله یکی از مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی میزبان آن است، ضمن تعامل و گفتگو با یکدیگر، به بیان تازه‌ترین اقدامات، دستاوردها و بیان تجربه‌ها می‌پردازند و با ظرفیت‌ها و توانمندی‌های یکدیگر و مرکز میزبان آشنا می‌شوند. این رویداد همچنین فرصتی است تا مدیران و فعالان مراکز عضو شبکه، به بیان دغدغه‌ها و چالش‌های خود بپردازند، دیدگاه‌هایشان را با مسئولان شبکه آزمایشگاهی مطرح کنند و برای ریل‌گذاری مسیر پیش رو، توسعه خدمات آزمایشگاهی و ارتقای ظرفیت‌ها تبادل نظر کنند.

طی این مراسم، از ۲۰ مرکز رتبه اول، ۲۰ رابط برتر و ۲۷ کارشناس برتر آزمایشگاه‌های عضو شبکه، براساس ارزیابی عملکرد سال ۱۴۰۱ تقدیر شد. همچنین ۱۰ مرکز آزمایشگاهی که نسبت به سال گذشته رشد عملکرد قابل توجهی داشته‌اند، معرفی شده و مورد تقدیر قرار گرفتند.

بیان مسائل آزمایشگاه‌ها در بخش پرسش و پاسخ با حضور مدیر و دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و بازدید از آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات فیزیک پلاسما، مجتمع آزمایشگاهی رازی و همچنین آزمایشگاه فناوری نانو دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، از دیگر برنامه‌های دهمین نشست مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی بود.

نشست سالانه، اما هدف دیگری را نیز دنبال می‌کند که ایجاد انگیزه، ترویج و فرهنگ‌سازی توسعه ظرفیت‌های



## نشست هم‌اندیشی فعالان آزمایشگاهی حوزه گهرسنگ برگزار شد



و نادر خاکی عنوان کرد: «یکی از رویکردهای اصلی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، رسیدن ظرفیت بالقوه تجهیزات و زیرساخت‌های آزمایشگاهی موجود به بیشینه کارآمدی و بهره‌وری خود است و ایجاد یک فضای مساعد و مناسب برای پیوند میان متقاضیان و عرضه‌کنندگان خدمات در راستای ارتقای توانمندی‌های فناورانه و به‌طور خاص، ارتقای صنعت درآمدزا و پرظرفیت سنگ‌های قیمتی و زینتی را به‌طور جدی دنبال می‌کنیم.»

وی اظهار داشت: «در مجموع، تمام تلاش ما این است که بتوانیم با همکاری آزمایشگاه‌ها، متخصصین و کارشناسان، استانداردهای لازم در حوزه گهرسنگ‌ها تدوین و ممیزی آزمایشگاه‌ها را نیز به خوبی اجرایی کنیم.»

نخستین نشست هم‌اندیشی فعالان آزمایشگاهی حوزه گهرسنگ‌ها در مرکز تحقیقات فرآوری مواد معدنی ایران، با حضور شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و مجری طرح توسعه صنعت گهرسنگ کشور و گروهی از فعالان آزمایشگاهی بخش خصوصی و دولتی در این حوزه به میزبانی مرکز تحقیقات فرآوری مواد معدنی ایران برگزار شد.

#### • نقش‌آفرینی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی در توسعه صنعت و بازار فناورانه گهرسنگ‌ها

در این نشست، دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی با اشاره به ظرفیت‌های بالقوه مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی در حوزه معدن، گهرسنگ‌ها و عناصر ارزشمند

تهیه کننده

حامد دارابی

darabi.hami@gmail.com

کارشناسی ارشد مهندسی شیمی -  
بیوتکنولوژی، کارشناس شبکه آزمایشگاهی  
فناوری‌های راهبردی



## فناوری نانو - نانوشیء - لایه‌های چیدمان یافته برای کاربردهای زیست حسگری الکتروشیمیایی تعیین مشخصه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری

یافته نانوشیء روی الکترودها با استفاده از فرآیند انحلال<sup>۱</sup> برای کاربردهای الکتروشیمیایی تمرکز دارد.

هدف از تدوین این استاندارد، اندازه‌گیری و تعیین مشخصه‌های لایه‌های چیدمان یافته نانوشیء روی الکترودها با استفاده از فرآیند انحلال و نانوشیء تشکیل دهنده لایه‌ها برای کاربردهای الکتروشیمیایی مانند نانوزیست حسگری یا کاربردهای تشخیصی است. همچنین این استاندارد، روش‌های اندازه‌گیری را به منظور تعیین مشخصه‌ها ارائه می‌دهد و برای موارد زیر کاربرد ندارد:

- الزامات نانوساختارها با نانوساخت از بالا به پایین؛
- پوشش بعدی موادی مانند مواد زیستی روی لایه‌های چیدمان یافته نانوشیء؛
- الزامات خاص ایمنی و سلامتی در طول ساخت؛
- شرایط تجربی حسگری الکتروشیمیایی؛
- بسته‌بندی، برچسب‌گذاری، تاریخ‌های انقضاء و جابجایی الکترودهای الکتروشیمیایی بهبود یافته نانوشیء<sup>۴</sup>.

در این استاندارد، ویژگی‌های نانوشیء تشکیل دهنده یک لایه چیدمان یافته، براساس استاندارد ISO/TS 12805 ارائه شده است که مشخصه‌های نانوشیء ساخته شده و روش‌های اندازه‌گیری آن‌ها را توضیح می‌دهد. علاوه بر این، ویژگی‌های لایه چیدمان یافته با نانوشیء برای کاربردهای زیست حسگری الکتروشیمیایی پیشرفته و روش‌های اندازه‌گیری آن‌ها به تفصیل ارائه شده است. این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی ISO/TS 21412 به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده است که شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی بوده و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است [۱]:

الکترودهای الکتروشیمیایی می‌توانند پس از رسوب‌گذاری نانوشیء روی سطح الکترودها، عملکرد نانوبهبود یافته از خود نشان دهند. افزایش مساحت سطح، جهت‌گیری، چگالی لایه چیدمان یافته<sup>۱</sup> و توانایی در کنترل گیرنده زیستی<sup>۲</sup> لایه نانوشیء، عملکرد نانوزیست حسگرها را بهبود می‌بخشد. حساسیت، گزینش‌پذیری و قابلیت اطمینان نانوزیست حسگر را می‌توان با نانوشیء خاص افزایش داد؛ به‌عنوان مثال، با نانوذرات طلا، نانولوله‌های کربنی، نانومیله‌های CuS<sub>2</sub> و نقره یا نانوصفحات پالادیم.

در حال حاضر، بیشتر الکترودهای الکتروشیمیایی نانوبهبود یافته توسط پژوهشگران به منظور دستیابی به عملکرد قابل پیش‌بینی در برنامه‌های ساخت خود، بدون تولید انبوه، ساخته می‌شوند. با این حال، این فناوری در حال رسیدن به مرحله تجاری است. سازندگان، الکترودهای نانوبهبود یافته را به‌عنوان بستری برای افزودن پوشش‌های اضافی به منظور کاربردهای حسگری خاص به تولیدکنندگان دستگاه ارائه می‌کنند. این استاندارد، ویژگی‌های مواد برای تراکنش بین ساخت الکترودها و سازندگان دستگاه را تأمین می‌کند تا امکان خرید الکترودهایی با عملکرد قابل پیش‌بینی را فراهم کند و برای کمک به این موضوع در نظر گرفته شده است.

همچنین این استاندارد به فرآیند کیفیت‌سنجی، ویژگی و استفاده از الکترودهای اصلاح شده نانوشیء مرتبط است. استانداردسازی قراردادهای مشخص کردن انواع مختلف الکترودهای اصلاح شده نانوشیء مربوط به شناسایی الکتروشیمیایی، توسط بیشتر تولیدکنندگان یا صاحبان مشاغل محصولات الکترودهای الکتروشیمیایی استفاده می‌شود. این استاندارد بر لایه چیدمان



## نویسندگان

مهتری ندیری نیری<sup>\*۱</sup>  
صفا سراج مهدی زاده<sup>۲</sup>

۱. دکتری شیمی آلی، شرکت طنین پیک سبلان، اردبیل  
۲. کارشناسی ارشد مدیریت بازرگانی، شرکت طنین پیک سبلان (تولیدکننده توپ‌های بتا)، اردبیل

\*mnadiriniri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵

## ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمایشگاه‌ها با ارائه یک نمونه عینی

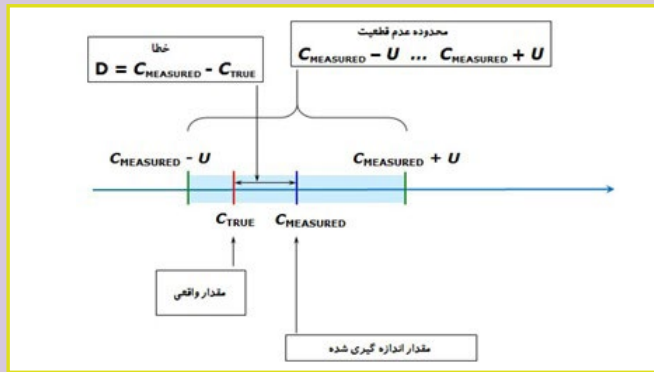
### چکیده

آزمایشگاه‌ها برای ارزشیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری، باید سهم عدم قطعیت عوامل مختلف تأثیرگذار در عدم قطعیت اندازه‌دهی را شناسایی کرده و به‌طور منظم عدم قطعیت اندازه‌گیری شده را بازنگری نمایند. در این پژوهش، نتایج محاسبه عدم قطعیت اندازه‌گیری جرم یک نمونه توپ با روش راهنمای بیان عدم قطعیت در اندازه‌گیری<sup>۱</sup> و با استفاده از نرم‌افزار کیوآم‌سیز جی‌یوآم اینترپرایز<sup>۲</sup> ارائه شده‌است و به‌منظور صحت‌گذاری نتایج حاصل از نرم‌افزار، محاسبه عدم قطعیت به‌صورت دستی نیز انجام و با نتایج حاصل از نرم‌افزار مقایسه شده‌است. نتایج نشان می‌دهند که عدم قطعیت به‌دست آمده با روش دستی و نرم‌افزار یکی هستند. همچنین نتایج حاکی از آن است که سهم عدم قطعیت تکرارپذیری روی عدم قطعیت اندازه‌دهی نسبت به سایر عوامل بیشتر است؛ بنابراین، بهینه‌سازی عدم قطعیت به‌دست آمده از طریق بیشتر کردن تعداد تکرار آزمون و یا آموزش هر چه بیشتر شخص آزمون‌گر برای ارائه نتایج دقیق‌تر، امکان‌پذیر است.

### واژه‌های کلیدی

عدم قطعیت، عوامل تأثیرگذار، اندازه‌دهی، روش GUM، جرم.

عدم قطعیت عددی است که بعد از نتیجه اندازه‌گیری به‌صورت  $\pm$  استفاده می‌شود و عاملی مربوط به نتیجه اندازه‌گیری است که به‌طور منطقی، میزان پراکندگی را که می‌توان به اندازه‌دهی نسبت داد، مشخص می‌کند. تفاوت عدم قطعیت با خطا در این است که خطا به‌صورت تک مقدار بوده و در واقع، اختلاف بین مقدار مشاهده شده و مقدار واقعی است. در صورت برآورد خطا می‌توان از آن برای تصحیح نتایج استفاده نمود. عدم قطعیت به شکل یک بازه است و تک مقدار نیست و بیان می‌کند که مقدار واقعی با یک احتمال مشخص درون این بازه قرار می‌گیرد و از آن نمی‌توان برای تصحیح نتایج استفاده نمود (شکل (۱)) [۱ تا ۳].



شکل (۱): مقایسه خطا و عدم قطعیت [۱].

اهمیت ارزشیابی عدم قطعیت به دلایل زیر است:

- هیچ اندازه‌گیری بدون یک بیانیه، در خصوص مقدار عدم قطعیت نتایج کامل نیست؛
  - کیفیت و هزینه در آزمایشگاه به‌طور مستقیم تحت تأثیر عدم قطعیت اندازه‌گیری هستند؛
  - عدم قطعیت اندازه‌گیری، یکی از ویژگی‌های عملکردی یک روش است که تناسب آن برای استفاده مورد نظر باید هنگام تصدیق روش‌های آزمون بررسی شود؛
  - هنگام تعیین تعداد ارقام اعشار در نتیجه اندازه‌گیری باید عدم قطعیت اندازه‌گیری در نظر گرفته شود.
- دو روش رایج برای محاسبه عدم قطعیت وجود دارد که عبارتند از: (۱) - روش GUM که به آن روش مدل‌سازی یا جزء به جزء نیز می‌گویند. (۲) - روش بالا به پایین که روش رویکرد کلی‌گرا نیز نامیده می‌شود. محاسبه عدم قطعیت به روش بالا به پایین بسیار ساده‌تر از روش GUM است اما عدم قطعیت به‌دست آمده با روش بالا به پایین، بزرگتر از روش GUM بوده و قابلیت بهینه‌سازی ندارد. این در شرایطی است که یکی از خروجی‌های نرم‌افزار محاسبه عدم قطعیت با روش GUM، نمودار پارتو مؤلفه‌های تأثیرگذار است. این نمودار، مؤلفه‌هایی که بیشترین سهم را در عدم قطعیت اندازه‌ده دارند، نشان می‌دهد و با انتخاب بزرگترین مؤلفه و بهبود آن می‌توان عدم قطعیت را کاهش داد [۴ تا ۶]. بنابراین، در این پژوهش نیز برای محاسبه عدم قطعیت آزمون اندازه‌گیری جرم یک نمونه توپ، از نرم‌افزار کیووم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز استفاده شده‌است.

## روش تحقیق

نرم‌افزار کیووم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز، یک ابزار نرم‌افزاری، ساخت شرکت کوآلیسیست<sup>۳</sup> است که برای محاسبه عدم قطعیت و در چهار نسخه اینترپرایز<sup>۴</sup>، حرفه‌ای<sup>۵</sup>، استاندارد<sup>۶</sup> و آموزشی<sup>۷</sup> منتشر شده‌است. از این نرم‌افزار برای آنالیز عدم قطعیت در آزمون‌های فیزیکی، شیمیایی و کالیبراسیون می‌توان استفاده نمود. در نرم‌افزار کیووم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز، عدم قطعیت اندازه‌گیری با استفاده از دو روش متفاوت محاسبه می‌شود:

(۱) محاسبه عدم قطعیت اندازه‌گیری با استفاده از روش GUM (چارچوب محاسبه عدم قطعیت به روش GUM دارای محدودیت‌هایی بوده که فقط برای مدل‌های خطی و شبه خطی مناسب است).

(۲) محاسبه عدم قطعیت اندازه‌گیری به روش مونت کارلو. (روش مونت کارلو، روشی قابل اعتماد و آسان به‌منظور ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری است که برای تمام مدل‌های خطی و غیرخطی اندازه‌گیری مناسب است).

با توجه به آن که نرم‌افزار کیووم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز از

هر دو روش GUM و مونت کارلو<sup>۸</sup> برای محاسبه عدم قطعیت استفاده می‌کند، می‌توان چهارچوب محاسبه عدم قطعیت با روش GUM را با روش MCM اعتبارسنجی نمود. در این پژوهش نیز از روش GUM برای محاسبه عدم قطعیت جرم یک نمونه توپ والیبال سایز ۵ داخل سالن استفاده شده‌است و به‌منظور صحت‌گذاری نتایج حاصل از نرم‌افزار، نتایج حاصل با نتایج محاسبه عدم قطعیت به‌صورت دستی مقایسه شده‌است.

## بحث و نتایج

به‌منظور محاسبه عدم قطعیت با نرم‌افزار کیووم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز، ابتدا باید اندازه‌ده را مشخص نمود و مدل ریاضی اندازه‌گیری را تعیین کرد. در تعیین مدل ریاضی باید تمامی عواملی که عدم قطعیت آنها بر عدم قطعیت اندازه‌ده تأثیرگذار هستند را در نظر گرفت. مرحله بعدی محاسبه عدم قطعیت، به‌صورت کمی است. عوامل تأثیرگذار در عدم قطعیت جرم که باید در معادله ریاضی وارد شوند عبارتند از:  $m_{acc}$ ،  $m_{read}$ ،  $m_{drift}$ ،  $m_{cal}$ ،  $m_{rep}$  (رابطه (۱)).

## رابطه (۱)

$$m = m_{rep} + m_{cal} + m_{drift} + m_{read} + m_{acc}$$

که در آن:

$(m_{rep})$ : عدم قطعیت ناشی از تکرارپذیری بوده و نوع آن در نرم‌افزار (A) است،  $(m_{cal})$ : عدم قطعیت ناشی از کالیبراسیون ترازو و یا به عبارتی، عدم قطعیت بسط یافته از گواهینامه کالیبراسیون تجهیز هستند،  $(m_{drift})$ : عدم قطعیت ناشی از رانش یا گرایش به فرسودگی ترازو،  $(m_{read})$ : عدم قطعیت ناشی از قابلیت قرائت یا تفکیک‌پذیری نمایشگر ترازو و  $(m_{acc})$ : عدم قطعیت درستی تجهیز تعیین شده در استاندارد انجام آزمون است.

نوع  $(m_{rep})$ ، در نرم‌افزار (A) بوده و سایر کمیت‌های ورودی از نوع (B) انتخاب می‌شوند. پس از نوشتن معادله ریاضی در قسمت توضیحات<sup>۱</sup>، با کلیک در قسمت مقادیر<sup>۲</sup>، مقادیر و واحد تک تک کمیت‌های ظاهر شده را وارد کرده و در نهایت با کلیک روی دکمه گاف<sup>۱</sup>، عدم قطعیت محاسبه می‌شود.

به‌منظور صحت‌گذاری نتایج حاصل از نرم‌افزار می‌توان عدم قطعیت اندازه‌دهی را به‌صورت دستی نیز محاسبه و با نتایج حاصل از نرم‌افزار مقایسه کرد. مراحل محاسبه عدم قطعیت اندازه‌دهی به‌صورت دستی در زیر ذکر شده‌است:

● **گام اول:** باید رابطه ریاضی میان کمیت مورد اندازه‌گیری (اندازه‌دهی) و عوامل تأثیرگذار بر آن (کمیت‌های ورودی یا  $X_i$ ) که کمیت مورد اندازه‌گیری به آنها وابسته است، مشخص شود (یعنی  $f(X_1, X_2, \dots, X_n)$ ). تابع  $f$  باید شامل همه کمیت‌ها، تصحیح‌ها و عوامل تصحیح باشد که می‌توانند جزء معینی از ایجاد عدم قطعیت در اندازه‌گیری باشند. در بعضی از روش‌های آزمون و یا مقالات و مدارک علمی، ممکن است این رابطه و عوامل مرتبط تعریف شده باشد.

● **گام دوم:** بهترین تخمین هر یک از کمیت‌های ورودی معین می‌شود و در مواردی که یک سری از مشاهدات برای یک کمیت ورودی در دسترس باشد، بهترین تخمین، معادل میانگین آن سری از مشاهدات است.

● **گام سوم:** هر یک از کمیت‌های ورودی را به‌عنوان یک متغیر تصادفی فرض کرده و عدم قطعیت استاندارد  $(u_{xi})$ ، برای هر یک از آنها محاسبه می‌شود. عدم قطعیت استاندارد، معادل انحراف استاندارد میانگین برای یک متغیر تصادفی است. در صورتی که یک سری از مشاهدات از یک متغیر تصادفی در دسترس باشد، محاسبات برای تعیین عدم قطعیت اندازه‌گیری مرتبط با آن کمیت ورودی و مطابق با رابطه (۲) انجام می‌شود:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, u_{x_i} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad \text{رابطه (۲)}$$

● **گام چهارم:** در صورتی که کمیت‌های ورودی مستقل نباشند، باید کواریانس<sup>۱۳</sup> مربوط به کمیت‌های ورودی که مستقل نیستند، محاسبه شود. از آنجایی که به‌طور معمول، متغیرهای ورودی مستقل بوده و همچنین در صورت عدم استقلال، تأثیر آنها بر یکدیگر و در نتیجه، مقدار محاسبه شده برای کواریانس کوچک است، برای تخمین عدم قطعیت کل می‌توان از انجام محاسبات مربوط به این مرحله در بیشتر موارد صرف‌نظر کرد و فرض استقلال کمیت‌های ورودی را پذیرفت.

● **گام پنجم:** مقادیر محاسبه شده برای کمیت‌های ورودی را در تابع مربوطه قرار داده و نتیجه اندازه‌گیری محاسبه می‌شود. هدف از محاسبات عدم قطعیت، تعیین عدم قطعیت این نتیجه است.

● **گام ششم:** ضریب حساسیت ( $C_i$ ) هر یک از کمیت‌های ورودی مطابق با رابطه (۳) محاسبه می‌شود:

$$C_i = \frac{\partial f(X_1, X_2, \dots, X_n)}{\partial X_i} \quad \text{رابطه (۳)}$$

برای اندازه‌گیری میزان تأثیر و یا سهم هر یک از کمیت‌ها در عدم قطعیت کل، باید تأثیر ضریب حساسیت مطابق با رابطه (۴) بر عدم قطعیت استاندارد کمیت ورودی اعمال شود. سهم هر یک از کمیت‌ها در عدم قطعیت کل با  $(u_{yi})$  نشان داده می‌شود.

$$u_{yi} = C_i \times u_{xi} \quad \text{رابطه (۴)}$$

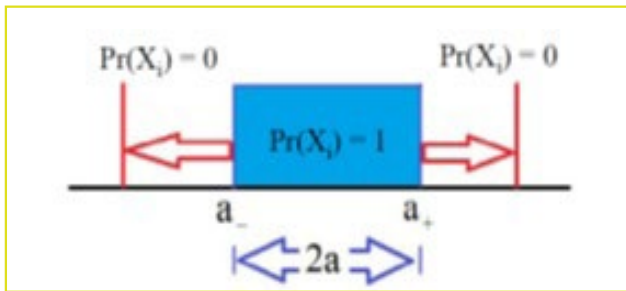
ضرایب حساسیت، ضرایب تبدیلی هستند که واحدهای کمیت‌های ورودی را به واحدهای اندازه‌دهی تبدیل می‌کنند. منابع عدم قطعیت قبل از اینکه تبدیل شود باید دارای واحد یکسانی باشند.

● **گام هفتم:** بعد از محاسبه  $(u_{yi})$ ، عدم قطعیت مرکب استاندارد  $(u_c(y))$  با استفاده از رابطه (۵) محاسبه می‌شود:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum (u_{yi})^2} \quad \text{رابطه (۵)}$$

● **گام هشتم:** اگر لازم باشد که عدم قطعیت اندازه‌گیری در یک گزارش آزمون درج شود، عدم قطعیت بسط یافته محاسبه شده که این کار به‌منظور فراهم ساختن یک فاصله  $Y \pm U$  انجام می‌شود. این فاصله، این اطمینان را فراهم می‌آورد که نتیجه اندازه‌گیری با یک احتمال مشخصی در این فاصله قرار دارد. عدم قطعیت بسط یافته، با ضرب عدم قطعیت استاندارد مرکب در یک فاکتور پوششی ( $k$ )، مطابق با رابطه (۶) به‌دست می‌آید [۷ و ۸]:

$$U = k \times u_c(y) \quad \text{رابطه (۶)}$$



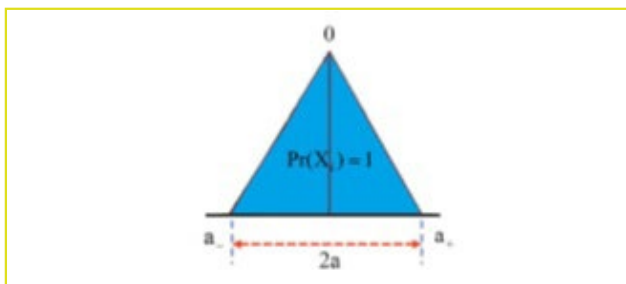
شکل (۳): توزیع مستطیلی [۹].

عدم قطعیت استاندارد برای توزیع مستطیلی به صورت رابطه (۸) است:

$$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{رابطه (۸)}$$

#### • توزیع مثلثی

در حالتی که حدود بالا و پایین مساوی بوده اما گرایش به سمت مرکز وجود داشته باشد، توزیع مثلثی است (شکل (۴)).



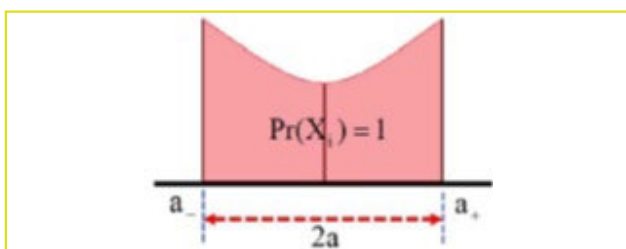
شکل (۴): توزیع مثلثی [۹].

عدم قطعیت استاندارد برای توزیع مثلثی به صورت رابطه (۹) است:

$$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad \text{رابطه (۹)}$$

#### • توزیع U شکل

در این نوع توزیع، کمترین فراوانی روی مقدار میانگین دیده می‌شود و با دور شدن از مقدار میانگین، بر فراوانی داده‌ها افزوده می‌شود (شکل (۵)) [۹ تا ۱۲].



شکل (۵): توزیع U شکل [۹].

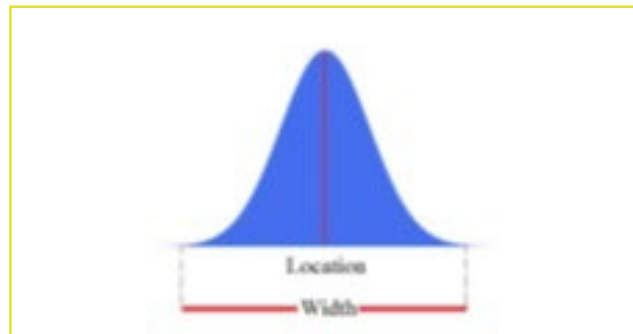
عدم قطعیت استاندارد برای توزیع U شکل به صورت رابطه (۱۰) است:

$$u(X_i) = \frac{a}{\sqrt{2}} \quad \text{رابطه (۱۰)}$$

## • توابع توزیع برای محاسبه عدم قطعیت استاندارد کمیت‌های ورودی و اندازه‌ده

### • توزیع نرمال

توزیع نرمال یکی از مهم‌ترین توزیع‌های احتمالی پیوسته در نظریه احتمالات است. شکل توزیع نرمال، قرینه و شبیه زنگوله است. دامنه مقادیر توزیع نرمال، نامحدود بوده و یا به عبارت دیگر، شکل منحنی نرمال از طرفین تا بی‌نهایت ادامه دارد ولی به ندرت اتفاق می‌افتد که لازم باشد شکل منحنی نرمال را بیشتر از سه الی چهار انحراف معیار در طرفین میانگین ادامه داد (شکل (۲)).



شکل (۲): منحنی توزیع نرمال [۹].

عدم قطعیت استاندارد برای توزیع نرمال به صورت رابطه (۷) است:

$$u(X_i) = \frac{U}{k} \quad \text{رابطه (۷)}$$

(K) یا ضریب پوششی، عددی بزرگتر از یک است که با ضرب آن در عدم قطعیت استاندارد مرکب، عدم قطعیت بسط یافته به دست می‌آید. برای سطوح اطمینان مختلف مقدار (K) را می‌توان از جداول آماری به صورت جدول (۱) استخراج نمود.

جدول (۱): مقادیر (K) در سطوح اطمینان مختلف [۹].

عامل انحراف استاندارد	احتمال
1±/00	۶۸/۲۶
1±/۶۵	۹۰/۰۰
1±/۹۶	۹۵/۰۰
۲±/۵۸	۹۹/۰۰
۳±/۰۰	۹۹/۷۳

### • توزیع مستطیلی

هنگامی که اندازه‌گیری‌ها به‌طور کاملاً مساوی بین بالاترین و پایین‌ترین مقدار قرار دارند، یک توزیع مستطیلی وجود دارد (شکل (۳)).

## محاسبه عدم قطعیت با استفاده از نرم افزار

نتایج حاصل از نرم افزار در محاسبه عدم قطعیت اندازه گیری جرم یک نمونه توپ، در شکل (۶) آمده است:

Quantity	Value	Stand. uncertainty	Distribution	DoF	Sensitivity coefficient	Quantities with zero contribution
$m_{rep}$	278.0538 g	0.0172 g	Normal	9	1.00	
$m_{cal}$	0.0 g	0.00150 g	Normal	$\infty$	1.00	
$m_{drift}$	0.0 g	0.00346 g	Rectangular	$\infty$	1.00	
$m_{read}$	0.0 g	0.000289 g	Rectangular	$\infty$	1.00	
$m_{acc}$	0.0 g	0.00577 g	Rectangular	$\infty$	1.00	

Quantity	Comb. stand. uncertainty	Comb. rel. uncertainty	Effective degrees of freedom
$m$	0.0185 g	0.000666	12

Quantity	Value	Expanded uncertainty	Expanded rel. uncertainty	Coverage factor	Coverage probability	Distribution
$m$	278.054 g	$\pm 0.037$ g	$\pm 0.013$ %	2.00	95.45 %	Normal

Quantity	Validation	Tolerance $\delta$	$\Delta$ Coverage interval	$\Delta$ Result	$\Delta$ Comb. stand. uncert.
$m$	---	---	---	---	---

Quantity	Capability	Index	Limit value	Compliance	P-inside	P-outside
$m$	Yes	$C_m = 269.9$	4	Yes	100.000%	0.000%

Quantity	Uncert. contribution	Rel. contribution
$m_{rep}$	0.0172 g	86.11 %
$m_{acc}$	0.00577 g	9.71 %
$m_{drift}$	0.00346 g	3.50 %
$m_{cal}$	0.00150 g	0.66 %
$m_{read}$	0.000289 g	0.02 %
$m$	0.0185 g	

شکل (۶): نتایج حاصل از نرم افزار در محاسبه عدم قطعیت در اندازه گیری جرم نمونه توپ.

نتایج حاصل نشان می دهد که عدم قطعیت استاندارد و عدم قطعیت بسط یافته مربوط به اندازه ده به ترتیب برابر  $0.0185$  g و  $0.037$  g بوده که با نتایج محاسبه دستی یکسان هستند. یکسان بودن نتایج در هر دو حالت، صحت نتایج حاصل از نرم افزار را تأیید می کند. همچنین نمودار پارتو حاصل از نرم افزار نشان می دهد که عدم قطعیت تکرار پذیری، بزرگترین سهم را در عدم قطعیت اندازه ده دارد؛ بنابراین، با آموزش هر چه بهتر شخص آزمون گر برای ارائه داده های دقیق تر و همچنین با بیشتر کردن تعداد تکرار آزمون می توان عدم قطعیت در اندازه گیری جرم یا اندازه ده را کاهش داد. اهمیت کاهش عدم قطعیت در این است که کیفیت و هزینه در آزمایشگاه به طور مستقیم تحت تاثیر عدم قطعیت اندازه گیری هستند و به عبارتی، آزمایشگاهی که عدم قطعیت کوچکتری دارد به عنوان آزمایشگاه با صلاحیت تلقی می شود.

## محاسبه عدم قطعیت در اندازه گیری جرم یک نمونه توپ

## محاسبه عدم قطعیت به صورت دستی

مراحل محاسبه عدم قطعیت در اندازه گیری جرم نمونه توپ به صورت دستی با توجه به توضیحات بند (۲)، در جدول (۲) آورده شده است.

جدول (۲): مراحل محاسبه عدم قطعیت در اندازه گیری جرم نمونه توپ به صورت دستی.

۱. تعیین مدل ریاضی اندازه گیری در محاسبه عدم قطعیت جرم:

$$m = m_{rep} + m_{cal} + m_{drift} + m_{read} + m_{acc}$$

۲. محاسبه میانگین نتایج حاصل از ۱۰ بار تکرار آزمون اندازه گیری جرم نمونه توپ:

$$278.085-278.026-277.965-278.014-278.085-278.032-278.015-278.155-278.100-278.062 \text{ (g)}$$

$$\text{Mean} = 278.0538 \text{ g}$$

۳. محاسبه عدم قطعیت استاندارد برای کمیت های ورودی:  $U$ ، عدم قطعیت بسط یافته بوده و با توجه به گواهینامه کالیبراسیون تجهیز به دست می آید.

$$SE_{mean} = m_{rep} = 0.0172$$

$$m_{cal} = \frac{U}{2} = \frac{0.003}{2} = 0.0015$$

$$m_{drift} = \frac{0.006}{\sqrt{3}} = 0.00346$$

$$m_{read} = \frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 0.000289$$

$$m_{acc} = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.00577$$

$$SE_{mean} = \frac{SD}{\sqrt{n}}, SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

۴. محاسبه ضریب حساسیت (C) برای تک تک کمیت های ورودی: به دلیل خطی بودن رابطه ریاضی، ضریب حساسیت کمیت های ورودی برابر با یک است.

$$C_{rep} = C_{cal} = C_{acc} = C_{drift} = C_{read} = 1$$

۵. محاسبه حاصلضرب ضریب حساسیت در عدم قطعیت استاندارد تک تک کمیت های ورودی:

$$C_{rep} \times m_{rep} = 1 \times 0.0172 = 0.0172$$

$$C_{cal} \times m_{cal} = 1 \times 0.0015 = 0.0015$$

$$C_{drift} \times m_{drift} = 1 \times 0.00346 = 0.00346$$

$$C_{read} \times m_{read} = 1 \times 0.000289 = 0.000289$$

$$C_{acc} \times m_{acc} = 1 \times 0.00577 = 0.00577$$

۶. محاسبه عدم قطعیت استاندارد اندازه ده (جرم):

$$u_m = \sqrt{(0.0172)^2 + (0.0015)^2 + (0.00346)^2 + (0.000289)^2 + (0.00577)^2} = 0.0185 \text{ g}$$

۷. محاسبه عدم قطعیت بسط یافته اندازه ده:

$$U_m = u_m \times 2 \rightarrow U_m = 0.0185 \times 2 = 0.037 \text{ g}$$

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش، عدم قطعیت در اندازه‌گیری جرم یک نمونه توپ با استفاده از نرم‌افزار کیوم‌سیز جی‌یوام اینترپرایز و همچنین به‌صورت دستی محاسبه شده‌است. نتایج حاصل شده حاکی از یکسان بودن عدم قطعیت در هر دو حالت است. همچنین نمودار پارتو مؤلفه‌های تأثیرگذار نشان می‌دهد که سهم عدم قطعیت تکرارپذیری بر عدم قطعیت اندازه‌دهه نسبت به سایر عوامل بیشتر است؛ بنابراین، کاهش عدم قطعیت به‌دست آمده از طریق بیشتر کردن تعداد تکرار آزمون و یا آموزش هر چه بیشتر شخص آزمون‌گر به‌منظور ارائه نتایج دقیق‌تر، امکان‌پذیر است.

## پی‌نوشت

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. GUM (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement) | 7. Educational              |
| 2. QMSys GUM Enterprise  | 8. Monte Carlo method (MCM) |
| 3. Qualisyst Ltd   | 9. description              |
| 4. Enterprise  | 10. quantity                |
| 5. Professional  | 11. GUF                     |
| 6. Standard  | 12. Covariance              |

## مراجع

- [1] Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories (NORDTEST NT TECHN REPORT 537).
- [2] Uncertainty of measurement – part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (ISO/IEC Guide 98-3:2008)
- [3] Measurement and uncertainty for metrological applications-Repeated measurements and nested experiments (ISO/TS 21749).
- [4] Uncertainty of measurement-part 4: Role of measurement uncertainty in conformity assessment (ISO/IEC Guide 98-4:2012).
- [5] Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty (Eurolab Technical Report 1/2007).
- [6] Quantifying uncertainty in analytical measurement, published by eurochem, third edition (QUAM 2012).
- [7] The expression of uncertainty and confidence in measurement, Edition 4, October 2019 (UKAS M3003).
- [8] EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, rev 00, December 2003, European Cooperation for Accreditation (EA-4/16).
- [9] Evaluation of measurement data guide to the expression of uncertainty in measurement (JCGM 100:2008).
- [10] Evaluation of measurement data- Supplement 2 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement”- Extension to any number of output quantities (JCGM 102:2011).
- [11] Evaluation of measurement data- An introduction to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” and related documents (JCGM 104:2009).
- [12] Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025 (ILAC-G17).

## نویسندگان

عباس عابدفر<sup>۱\*</sup>  
فاطمه عباسزاده<sup>۲</sup>

۱. دکتری صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی،  
دانشگاه گیلان  
۲. دانشجوی دکتری صنایع غذایی، دانشکده صنایع  
غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\*a.abedfar@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۸

## واژه‌های کلیدی

روش RT-PCR، طبقه‌بندی روش، تشخیص باکتری‌های پاتوژن،  
تشخیص آلرژن‌های غذایی، تقلبات مواد غذایی.

## مروری بر اهمیت و طبقه‌بندی روش واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی و کاربرد آن در صنایع غذایی

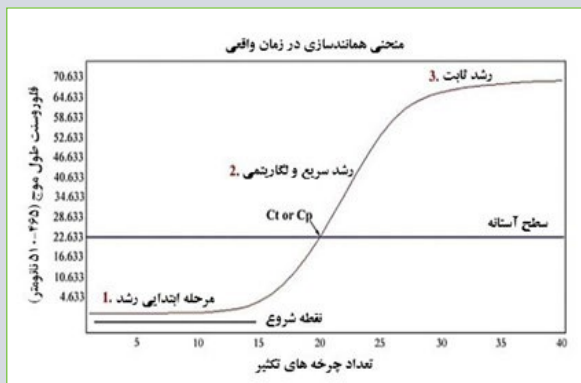
## چکیده

پیشرفت فناوری مولکولی (سبب تسریع در شناسایی صحیح گونه‌های نزدیک به هم در مواد اولیه، نمونه غذایی) منجر به فراوانی آزمون‌های مولکولی برای کاربردهای وسیعی نظیر انگشت‌نگاری ژنتیکی به‌منظور تشخیص هویت، تشخیص بیماری‌های عفونی، حساسیت‌های غذایی (آلرژی‌ها نظیر گلوتن غلات و لاکتوز شیر) و تشخیص تقلبات در صنعت غذا، امری ضروری به نظر می‌رسد. بی‌شک، به کارگیری روش‌های مرسوم (وابسته به کشت) برای شناسایی بیماری‌های عفونی، آنتی‌بیوتیک‌ها و میکروارگانیسم‌های پاتوژن‌ها در صنعت فرآوری مواد غذایی امری پرهزینه و بسیار وقت‌گیر خواهد بود؛ از این رو، به کارگیری روش‌های نوین مولکولی مستقل از کشت، نظیر واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی<sup>۱</sup> با کمترین زمان و دقت بسیار بالا برای ارزیابی گونه‌های ایجاد کننده عفونت و کیفیت و ایمنی مواد غذایی معرفی شد. در این روش نوین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۲</sup> با مولکول‌های گزارشگر فلورسنتی انجام گرفته و محصول تکثیر، طی هر چرخه گزارش می‌شود؛ بر این اساس، ضمن حساسیت و اختصاصیت بالا، داده‌های قابل اعتماد با کمترین خطر آلودگی، قابلیت در تعیین کمیت سطوح بیان ژن را خواهد داشت؛ بنابر این، جایگزین مناسبی برای PCR معمولی است. از این رو، در این مقاله مروری، بر اهمیت این روش و روش‌های مختلف RT-PCR، مزایا و کاربرد آن در تشخیص آلرژن‌های غذایی به خصوص گلوتن و در نهایت، تقلبات در مواد غذایی پرداخته می‌شود.

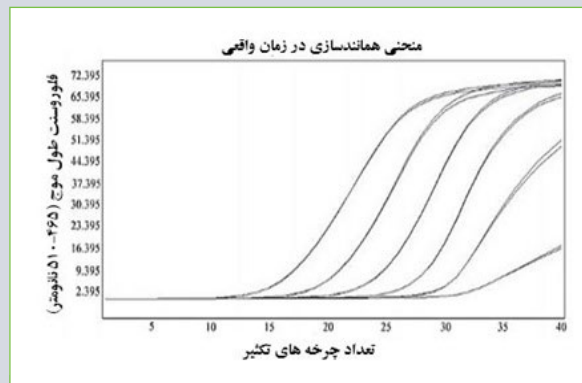


واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی که به‌عنوان واکنش زنجیره پلیمراز کمی<sup>۳</sup> شناخته می‌شود، یک روش آزمایشگاهی زیست‌شناسی مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره پلیمراز است. این روش، تکثیر یک مولکول DNA را در طول PCR (در زمان واقعی) و نه در پایان آن، مورد هدف قرار می‌دهد. از این روش می‌توان به‌عنوان یک آزمون کمی و نیمه کمی استفاده کرد [۱]. در این روش، یک ماده فلورسنت در هر چرخه از واکنش آزاد می‌شود که میزان آزادسازی آن با مقدار محصولات تکثیر شده متناسب است. این مقدار از فلورسنت با استفاده از یک نمایانگر<sup>۴</sup> شناسایی و ثبت می‌شود و در نهایت، نتایج RT-PCR شامل منحنی‌های همانندسازی است که با استفاده از دستگاه، ترسیم خواهد شد (شکل (۱)).

این منحنی‌ها، در واقع نشان‌دهنده تصویری از فرآیند در حال انجام و تکثیر محصولات است که می‌تواند برای تعیین کمیت مقادیر اولیه مولکول‌های DNA الگو با دقت بالا در محدوده وسیعی از غلظت‌ها استفاده شود [۲ و ۳]. علاوه بر این، در شکل (۲) مراحل رشد میکروبی در فازهای مختلف در طی فرآیند PCR نشان داده شده است. استفاده از RT-PCR کمی، در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی-مولکولی، کشاورزی و صنایع غذایی در حال افزایش بوده و جایگزین خوبی برای PCR معمولی است. در واقع این روش بر پایه PCR معمولی بوده و امکان آنالیز داده‌ها در آن وجود دارد. مزیت اصلی qPCR نسبت به PCR معمولی این است که غلظت DNA اولیه با دقت و حساسیت بالایی تعیین می‌شود. بدین ترتیب، نتایج به‌دست آمده می‌تواند به‌صورت کیفی و یا کمی باشد [۴]. از دیگر مزایای qPCR این است که واکنش‌ها در یک لوله در بسته انجام شده و داده‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند که با این روند، دیگر نیازی به دستکاری‌های پس از تکثیر نبوده و از این رو، امکان آلودگی کاهش می‌یابد [۵]. سازگاری و مزیت فناوری RT-PCR در مطالعه‌های متعدد از قبیل تعیین کمیت و تعیین ژنوتایپ عوامل عفونی، بحث کشاورزی و فناوری زیستی، بررسی بیان ژن‌ها، آنالیز DNA متیله شده و میکرو RNA و ژنوتایپینگ (شناسایی جهش‌ها، آنالیز پلی مورفیسم تک نوکلئیدی و شناسایی تغییرات کروموزومی)، تایید اثربخشی دارو درمانی و مطالعات پزشکی قانونی و تشخیص گونه‌های پارازیت در مواد غذایی و آب است [۶]. اجزای اصلی qPCR شامل ترموسایکلر با یک منبع نوری (لامپ، لیزر یا LED) یک سیستم نمایانگر فلورسنت (فلوریمتر) و همچنین نرم‌افزاری به‌منظور رسم منحنی تکثیر DNA با استفاده از داده‌های فلورسنت است [۷]. همچنین حضور ترکیبات رنگی ایمن (نظیر اتیدیوم بروماید، سایبرگرین I و اواگرین) در این سازوکار واکنشی، قابلیت ردیابی فرآورده تکثیری اختصاصی و غیراختصاصی برای DNA دو رشته‌ای هدف و پروب نشاندار با فلوروفور متصل شده به الیگونوکلوئتیدها را خواهد داشت [۵].



شکل (۲): منحنی‌های همانندسازی PCR در طی فرآیند رشد میکروبی [۲۵].



شکل (۱): منحنی‌های همانندسازی در نمای نیمه لگاریتمی به‌دست آمده از رقت‌های مختلف DNA هدف. منحنی ورودی، رگرسیون به‌دست آمده از مقادیر CT [۲۵].

افزایش محصول DNA در طی PCR باعث افزایش شدت فلورسانس در هر چرخه شده و شدت فلورسانس با یک ردیاب اندازه‌گیری می‌شود. رنگ فقط در صورت اتصال به DNA فلورسنت می‌شود. این روش، این مزیت را دارد که فقط با یک جفت آغاز می‌شود. هدف توالی را می‌توان در لوله با استفاده از انواع مختلف رنگ کنترل کرد (شکل (۳)).

## طبقه‌بندی شیمیایی RT-PCR به‌منظور تعیین کمیت اسیدهای نوکلئیک

### ◆ تشخیص غیر اختصاصی (RT-PCR)

در این روش، یک رنگ به DNA متصل شده که باعث افزایش عملکرد کوانتومی فلورسانس رنگ می‌شود. بنابراین،

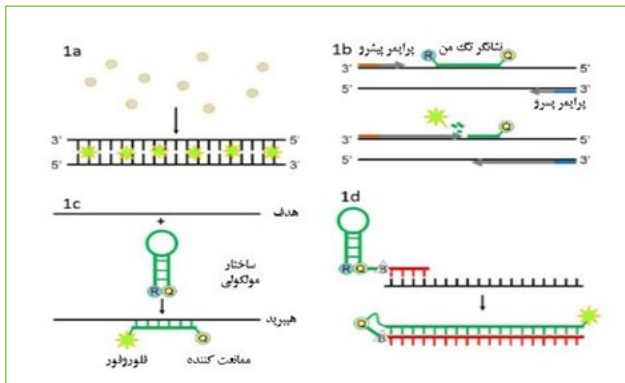


### ◆ کاربرد، مزایا و معایب روش Real Time PCR

سایبرگرین I را می‌توان به‌منظور شناسایی توالی‌های DNA در واکنش PCR و همچنین به‌طور عمده برای شناسایی عوامل عفونی، سویه پاتوژن در مواد غذایی، بررسی بیان ژن، شناسایی جهش، شناسایی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و همچنین شناسایی ارگانوسم‌های اصلاح شده از نظر ژنتیکی<sup>۱۰</sup> استفاده نمود. به لحاظ اقتصادی، هزینه رنگ سایبرگرین I در مقایسه با پروب‌های اختصاصی به مراتب پایین‌تر است. با وجود محبوبیت سایبرگرین I اما دارای محدودیت‌هایی از قبیل پایداری محدود و همچنین مهار PCR است [۱۰].

### ◆ تشخیص اختصاصی (RT-PCR)

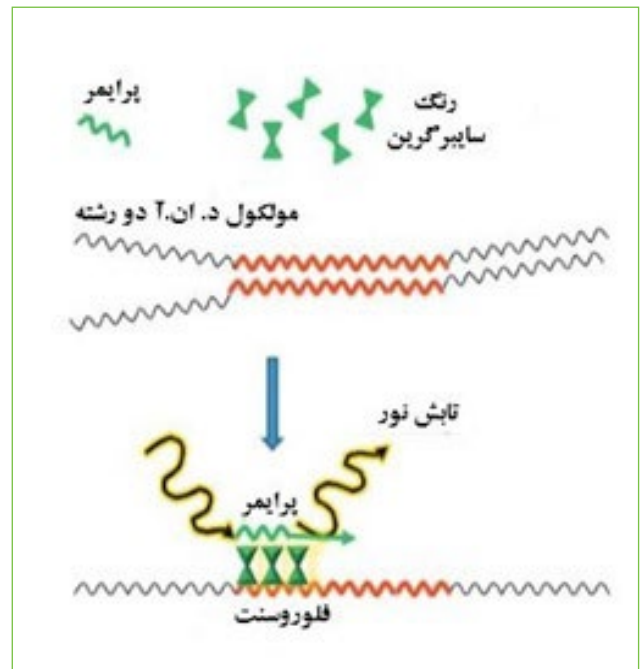
پروپ‌های (کاوشگر) گزارشگر فلورسنت، فقط DNA حاوی توالی مکمل پروب را تشخیص می‌دهد. بنابراین، استفاده از گزارشگر کاوشگر به‌طور قابل توجهی ویژگی‌های اختصاصی را افزایش می‌دهد و این روش را حتی در حضور DNA امکان‌پذیر می‌کند. با استفاده از برجسب‌های مختلف رنگ، می‌توان از پروپ‌های فلورسنت در روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه<sup>۱۱</sup> برای کنترل هدف در همان لوله استفاده کرد. همچنین کاوشگرهای گزارشگر فلورسنت از تداخل اندازه‌گیری‌های ناشی از دیم‌های آغازگر که از محصولات جانبی بالقوه نامطلوب در PCR هستند، جلوگیری می‌کند [۱۱]. پروپ‌های گزارشگر فلورسنت از اثر توانایی دایمرهای آغازگر جلوگیری نمی‌کنند و ممکن است باعث تولید محصولات مورد نظر در واکنش شوند (شکل (۵)).



شکل (۵): روش RT-PCR با روش کاوشگر گزارشگر فلورسنت یا الیگونوکلئوتیدهای متصل به فلوروفور (پرایمر یا پروب) [۲۵].

### ◆ پرایمر- پروب‌ها

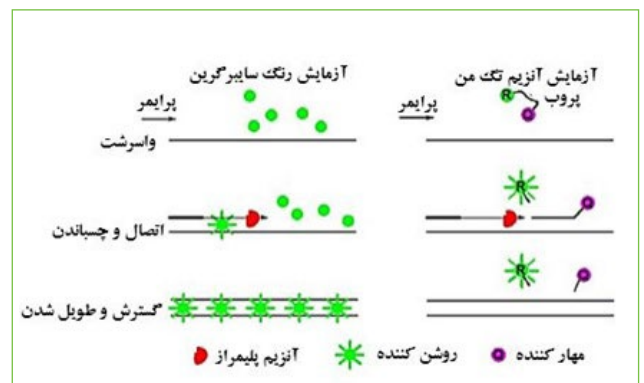
الیگونوکلئوتیدها متشکل از توالی نوکلئوتیدی در یک مولکول واحد بوده که می‌توان به سه گروه پروب‌های سنجاق سری، سیکلیکونز و آنگر طبقه‌بندی کرد. فلورسنت ساطع شده طی مرحله گسترش توالی (qPCR) شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود. استفاده از این پرایمرها منجر به تکثیر محصولات غیر اختصاصی در طول واکنش PCR می‌شود. بنابراین، آنالیز منحنی ذوب برای تعیین کارایی واکنش در نظر گرفته می‌شود [۱۲].



شکل (۳): روش Real Time PCR با استفاده از رنگ‌های اتصال شونده DNA دو رشته‌ای [۲۵].

### ◆ ساختار و نمونه رنگ‌های متصل شونده به DNA

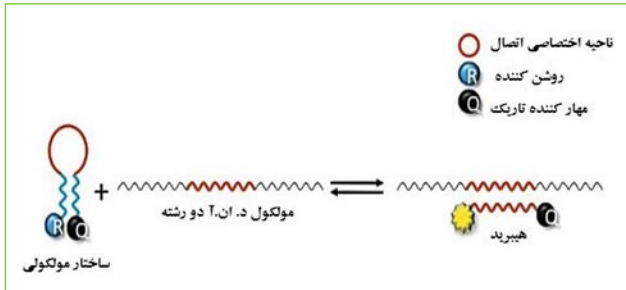
طیف گسترده‌ای از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA به‌صورت تجاری وجود دارد که شامل اتیدیوم بروماید، یو پرو وان<sup>۵</sup>، سایبرگرین I، سایبرگلد، سیتو<sup>۶</sup>، بوکستو<sup>۷</sup>، بیبو<sup>۸</sup> و اوگرین است. استفاده از این رنگ‌ها باعث شناسایی محصولات اختصاصی و غیراختصاصی و محصولات پرایمر-دایمر تولیدی در طول واکنش qPCR می‌شود (شکل (۴)). پرمصرف‌ترین رنگ، سایبرگرین I است که در شرایط استاندارد واکنش PCR، بار مثبت آن به اتصال قوی این رنگ به DNA دو رشته‌ای کمک می‌کند [۸]. کمپلکس DNA-رنگ حاصل، نور آبی با طول موج ( $\lambda_{max}=497$ ) نانومتر را جذب کرده و نور سبز را با طول موج ( $\lambda_{max}=520$ ) نانومتر ساطع می‌کند. با توجه به این که در طی فرآیند PCR محصولات غیراختصاصی و پرایمر-دایمرها می‌تواند شکل گیرد، آنالیز منحنی ذوب<sup>۹</sup> به‌منظور بررسی اختصاصیت قطعات تکثیر شده توصیه می‌شود [۹].



شکل (۴): نمایی از سنجش SYBR Green I و TaqMan در طی مراحل PCR [۲۵].

## ◆ پروب‌ها

هدف هیبرید شوند به طوری که دو فلوروفور در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند. طی مرحله اتصال که دو پروب در مجاورت هم قرار دارند، کوئنچر با توجه به این واقعیت که انرژی آزاد شده از مولکول گزارشگر از قبل باعث برانگیختگی آن شده‌است، نور فلورسنت ساطع می‌کند [۱۶].



شکل (۷): مراحل هیبریداسیون PCR در تأثیر ترکیبات فلوروفور و خاموش کننده [۲۵].

### چالش‌های اساسی در تشخیص آلودگی مواد غذایی با روش RT-PCR

مهمترین تقاضای اصلی مصرف کنندگان مواد غذایی، ضمانت بر ایمنی و کیفیت مواد غذایی است. وجود پاتوژن‌های منتقل شده از غذا و خطر بالقوه آنها، به کارگیری میکروارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی (GMOs) در تولید مواد غذایی و همچنین بحث برچسب‌گذاری صحیح در غذاهای مناسب برای افراد گیاه‌خوار از جمله موضوعاتی است که جامعه، خواستار شفافیت کامل آن است. اعمال کنترل‌های دوره‌ای در برنامه‌های ارزیابی کیفیت صنایع غذایی روشی برای ارضای این خواسته‌ها است. استفاده از روش RT-PCR به‌عنوان رویکردی جایگزین و امیدوار کننده در تشخیص مواد غذایی تبدیل و همچنین تقلبات در مواد غذایی مطرح شده‌است. این روش دارای مزیت‌های بالاتری در مقایسه با روش‌های کشت مرسوم است، از جمله سرعت، حساسیت تحلیلی عالی و گزینش‌پذیری و پتانسیل کمی‌سازی. با این حال، استفاده از تجهیزات و معرف‌های زیستی گران قیمت، نیاز به کارشناسان متخصص و همچنین فقدان پروتکل‌های استاندارد، اجرای عملی آن برای نظارت و کنترل مواد غذایی را سخت و مختل می‌کند [۱۷].

### ◆ چالش‌های فعلی در این روش

از مزایای ذاتی روش‌های همانندسازی سریع می‌توان به چرخه همانندسازی کوتاه‌تر، بهبود محدودیت‌های تشخیصی، عملکرد اختصاصی و پتانسیل اتوماسیون شدن اشاره نمود که باید اجرای همه آنها را در آزمایشگاه‌های مواد غذایی تقویت کرد [۱۸]. از موضوعات اصلی به‌منظور انطباق موثر روش‌های مولکولی در آزمایشگاه‌های مواد غذایی عبارتند از:

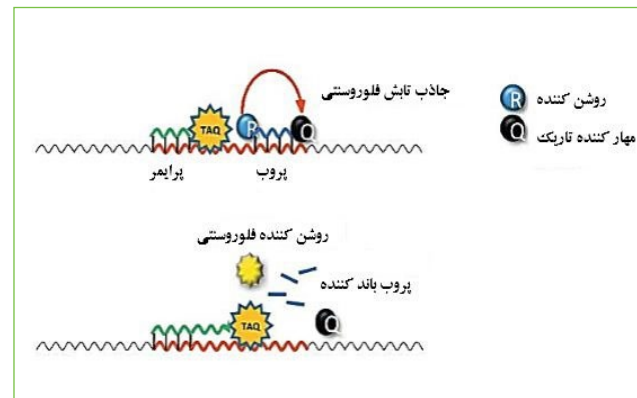
- ◆ توسعه راهبردهای علمی-منطقی با کاربری آسان برای پیش آزمون PCR در نمونه‌های غذایی؛
- ◆ طراحی و کاربرد کنترل‌های تحلیلی؛

پروب‌ها، الیگونوکلوئوتیدهایی هستند که شامل یک ساختار فلوروفور دهنده و یک فلوروفور پذیرنده است. در حالت کلی، دو نوع از آن شامل پروب‌های هیدرولیز و هیبریداسیون وجود دارد.

#### ۱. پروب‌های هیدرولیز کننده:

چگونگی عملکرد این پروب‌ها به میزان فعالیت ۵' به ۳' اگزونوکلازای Taq پلیمرز متکی است که با این ویژگی خود، پروب متصل را در طول واکنش تکثیر تخریب و همچنین از انجام آنالیز منحنی ذوب مانع می‌کند. در این سیستم، فلورسنت در پایان مرحله گسترش، محاسبه می‌شود که متناسب با مقدار محصول اختصاصی تکثیر شده است [۱۳ و ۱۴].

از مهمترین نوع این پروب‌ها می‌توان به پروب تک‌ممن<sup>۱۲</sup> اشاره نمود. در واقع در این پروب، در انتهای ۵' خود حاوی مولکول دهنده فلورسنت و در انتهای ۳' خود دارای مولکول پذیرنده فلورسنت است (شکل (۶)).



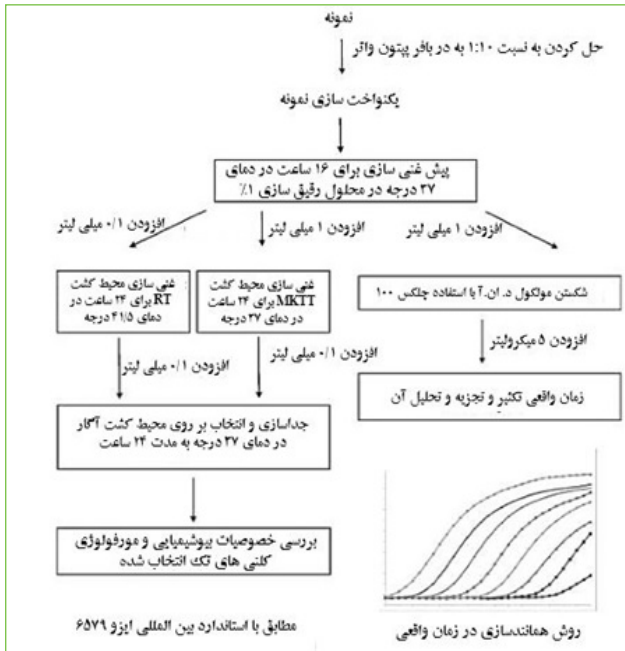
شکل (۶): سازوکار تشخیص با استفاده از کاوشگر تک‌ممن. فعالیت ۵'-۳' پلیمرز و اگزونوکلاز تک پلیمرز دی. ان. ای. R: روشن کننده و Q: مهار کننده [۲۵].

از این سیستم می‌توان در شکل‌های تک‌ممن و چندتایی برای شناسایی ویروس، تعیین کمیت بار ویروس یا باکتری، بررسی بیان ژن، تأیید نتایج میکرواروی، افتراق آلی، شناسایی جهش، تشخیص پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی و GMO استفاده کرد [۱۵].

#### ۲. پروب‌های هیبریداسیون:

از این پروب برای اندازه‌گیری فلورسنت ساطع شده در طول مرحله اتصال یا مرحله گسترش استفاده می‌شود. از قابلیت‌های این پروب در مقایسه با پروب‌های هیدرولیز کننده، توانایی آنالیز قطعات تکثیر شده توسط منحنی ذوب است. در واقع، میزان نور فلورسنت اندازه‌گیری شده ارتباط مستقیمی با میزان تکثیر DNA هدف، طی واکنش qPCR دارد (شکل (۷)). از مهمترین پروب‌های این دسته، هایپ پروب<sup>۱۳</sup> و یا پروب اف‌آرای‌تی<sup>۱۴</sup> نام دارد که در سازوکار عملکرد آنها توالی‌های این دو پروب طوری طراحی می‌شوند تا در جهت سر به دم با توالی‌های DNA

راپورت-واسیلیادیس<sup>۱۷</sup> و مولر کافمن تتراتیونات نووبوسین<sup>۱۸</sup>؛  
 شناسایی روی محیط کشت زایلوز لیزین دنوکسی کولات  
 آگار<sup>۱۹</sup> و یک محیط کشت عمومی آگار؛  
 تأیید هویت با آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی  
 مناسب (شکل (۸)).



شکل (۸): مقایسه روش کشت استاندارد و روش RT-PCR برای تشخیص سالمونلا در غذا [۲۵].

تعداد زیادی از روش‌های RT-PCR برای تشخیص گونه‌های سالمونلا منتشر شده‌است. علاوه بر این، چندین کیت و تجهیزات برای این منظور به صورت تجاری در دسترس هستند. با این حال، هنوز چالش‌هایی باقی مانده تا روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های مبتنی بر کشت شوند. یکی از چالش‌های پیش روی کارشناسان واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی، تعداد کم روش‌های استاندارد و رسمی تأیید شده برای تشخیص و تجزیه و تحلیل پاتوژن‌های منتقل شده (نظیر سالمونلا) از مواد غذایی به انسان است. چالش دیگر، قابل قبول بودن نتایج مثبت RT-PCR در یک نمونه است. مقامات قانونی اغلب خواستار تأیید نتیجه با جداسازی گونه‌های میکروبی هستند؛ بنابراین، لازم است برای ادعای مثبت بودن نمونه‌ها، که دیگر نیازی به جداسازی سویه نخواهد بود، قانونگذاران را متقاعد نمود. این بازاندیشی، از منافع مصرف‌کننده حمایت می‌کند و آزمایشگاه‌های مصوب، قانونی را برای استفاده از روش‌های مقرون به صرفه‌تر فراهم می‌کند [۲۴].

علیرغم صرفه‌جویی فوق‌العاده در زمان تشخیص با استفاده از روش‌های تشخیص مبتنی بر PCR در زمان واقعی، در مقایسه با روش مبتنی بر کشت سنتی، هنوز یک محدودیت مهم در مرحله غنی‌سازی محیط کشت در خصوص تحلیل برای جمعیت اولیه به اندازه کافی بالا میکروارگانیسم‌ها (تقریباً ۱۰۴ CFU/ml) به منظور فعال کردن واقعی و تشخیص زمان PCR نهفته است.

توسعه راهبردهایی برای استفاده کمی از RT-PCR برای نمونه‌های غذایی؛  
 اتوماسیون در کل فرآیند تحلیلی و در نهایت، برای مورد خاص در حوزه میکروبیولوژی مواد غذایی به منظور تشخیص واضح ارگانیسم‌های زنده حین فرآیند تکثیر و نقطه ایجاد آلودگی [۱۹].  
 تضمین مستمر ایمنی، کیفیت غذاها و در اختیار داشتن ابزارهای علمی برای مقابله با چالش‌های ناشی از تهدیدات احتمالی نوظهور، مستلزم توسعه روش‌های نوین و اصلاح روش‌های تحلیلی است. از این رو، در چند دهه اخیر منابع قابل توجهی به سمت این تلاش‌ها هدایت شده‌است. با این حال، از زمان اجرای روش‌های جدید یا بهبود یافته، تلاش‌ها در بیشتر موارد به منافع ملموس برای مصرف‌کننده و ذینفعان تبدیل نشده‌است و باید یک حرکت متمرکز به سمت روش‌های اثبات شده از آزمایشگاه‌های دانشگاهی و اجرای عملیاتی آنها در صنعت باشد. مشارکت شرکت‌های تولیدی، تولیدکنندگان مواد غذایی، شرکت‌های خرده‌فروشی و سازمان‌های ایمنی مواد غذایی برای اطمینان از رویکردی آگاهانه و ساختار یافته به کیفیت و ایمنی در مراحل حیاتی در فرآیندهای تولید مواد غذایی ضروری و بسیار حائز اهمیت است. تعقیب این اهداف، مستلزم یک ابتکار بزرگ بین‌المللی است، اما پاداش آن در تمام سطوح در جامعه آشکار خواهد شد [۲۰].

## تشخیص سالمونلا<sup>۱۵</sup> بیماری‌زا در مواد غذایی با روش RT-PCR

عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری پاتوژن گرم منفی «سالمونلا انتریکا» به عنوان یک نگرانی مهم بهداشت عمومی در سراسر جهان است. سالمونلاها گروه پیچیده‌ای از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند که از دو گونه، شش زیرگونه و بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ تشکیل شدند که در اصل از طریق خوردن غذا یا خوراک آلوده، باعث ایجاد بیماری‌های محدود شونده گوارشی در طیف وسیعی از پستانداران می‌شوند. در دهه گذشته، سنجش‌ها با روش RT-PCR برای تشخیص سریع سالمونلاها در مواد غذایی یا خوراک بالقوه آلوده توسعه یافته‌اند [۲۱].

بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی، RT-PCR را به عنوان روشی سریع برای تشخیص سالمونلا در نمونه‌های غذایی، محیطی و انسانی اجرا کرده‌اند یا قصد دارند آن را معرفی کنند. به عنوان روش تحلیلی برای تشخیص و جداسازی سالمونلا در مواد غذایی، یک روش پذیرفته شده بین‌المللی در سند استاندارد EN ISO 6579:2002 با حساسیت ۱ CFU به ازای هر ۲۵ گرم غذایی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است [۲۲]. روش جداسازی سالمونلا در مواد غذایی از چهار مرحله متوالی تشکیل شده‌است [۲۳]:

- غنی‌سازی از قبل در محلول رقیق سازی با محیط مایع غیرانتخابی آب پپتون بافر<sup>۱۶</sup>؛
- غنی‌سازی در دو محیط کشت مایع انتخابی مختلف،

## تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز<sup>۲۰</sup> بیماری‌زا در مواد غذایی با روش RT-PCR

ممکن است بهترین رویکرد تحلیلی را نشان دهد تا مقامات تصمیم‌گیرنده را قادر سازد تا در سریع‌ترین زمان ممکن و با توجه به نتایج آلودگی مواد غذایی تصمیم بگیرند تا از ایمنی مواد غذایی اطمینان حاصل کنند و از شیوع بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا جلوگیری نمایند [۲۸]. RT-PCR بیشتر برای ارائه نتایج کمی طراحی شده‌است؛ با این حال در معرض بازدارنده‌های متعدد و منابع تنوع قرار می‌گیرد، به ویژه هنگامی که برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های پیچیده محیطی استفاده می‌شود. تنوع نیز می‌تواند به دسته‌های مختلف معرف استخراج DNA مرتبط باشد [۲۹]. هنگامی که غنی‌سازی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی حضور میکروارگانیسم زنده<sup>۲۸</sup> و در ترکیب با روش RT-PCR اعمال شود، (شکل (۹)) ابزاری قوی و عملی برای تشخیص کمی پاتوژن‌های بیماری‌زا فراهم می‌شود؛ همچنین تشخیص سلول‌های زنده و حذف سلول‌های مرده را تضمین می‌کند.



شکل (۹): تلفیق دو روش MPN در مجاورت با روش RT-PCR [۲۵].

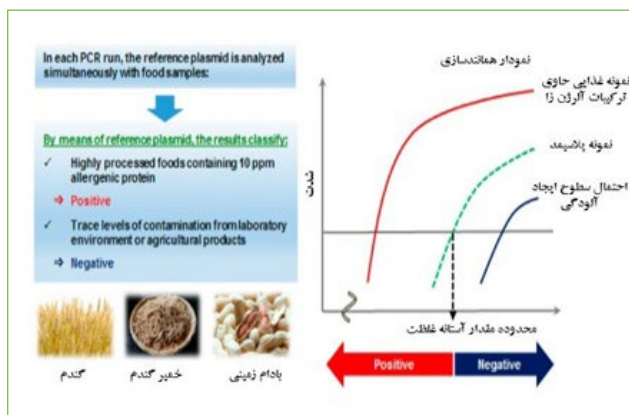
## تشخیص آلرژن‌های غذایی، به خصوص گلوتن با روش RT-PCR

به‌طور کلی، آلرژی‌های غذایی، در اثر واکنش بیش از اندازه سیستم ایمنی به برخی از ترکیبات غذایی یا موادی است که در اصل بی‌خطر هستند که نتیجه این درگیری در سیستم ایمنی منجر به تولید آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین E<sup>۲۹</sup> در آن خواهد شد. این واکنش‌های نامطلوب ممکن است ارثی یا ناشی از یک نقص

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری پاتوژن است که باعث عفونت‌های جدی موضعی و عمومی در انسان می‌شود. این باکتری کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری با محتوای توالی نوکلئوتیدی گوانین-سیتوزین<sup>۲۱</sup> با وزن مولکولی و باندهای هیدروژنی بیشتر GC پایین بوده که نزدیک به گونه‌های باسیل، کلاستریدیوم، انتروکوک، استرپتوکوک و استافیلوکوک هستند. روش‌های سنتی تشخیص این پاتوژن شامل دو مرحله غنی‌سازی و جداسازی انتهایی در دو محیط کشت اختصاصی و تایید نهایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و یا مولکولی است؛ بنابراین، بیش از ۵ روز برای تایید نهایی نیاز دارد [۲۵]. نشانگرهای مولکولی مختلفی برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز انتخاب شده‌است که بیشتر آنها براساس عوامل تعیین‌کننده ژن‌های *actA*، *hly* و *iap* و یا در ژن‌های آرانی<sup>۲۲</sup> ریبوزومی مانند *S RNA ۲۳* هستند.

رودریگز-لازارو<sup>۲۳</sup> و همکارانش [۲۶] برای تشخیص گونه خاص لیستریا مونوسیتوژنز از روش RT-PCR و با کمک ژن‌های *hly* و *iap* استفاده کردند. هر دو روش سنجش، ۱۰۰ درصد اختصاصی بودند؛ همان‌طور که با استفاده از ۱۰۰ سویه لیستریا و ۴۵ سویه غیر لیستریا تعیین شد. حد تشخیص برای هر دو سنجش به یک معادل ژنوم صد تکرار معادل (۱۱-۵۶ درصد) تعیین شد که مطابقت عالی بین تعداد پیش‌بینی شده مقدار واقعی واحد تشکیل کلنی<sup>۲۴</sup> در نمونه‌ها را نشان داد. لونگی<sup>۲۵</sup> و همکاران [۲۷] روش مبتنی بر qPCR را برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای نرم ایتالیایی (موزارلا، کرسنزا و ریکوتا) طراحی کردند. در این روش، یک نمونه تیمار ساده براساس جوشاندن نمونه پنیر هموزن شده قبل از PCR استفاده شد. در ادامه سنجش qPCR و ژن عامل حرکت باکتری یا معروف به ژن ویرولانسیس *actA*<sup>۲۶</sup> مورد هدف قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطوح جمعیت میکروبی پاتوژن در نمونه‌های لبنیاتی نظیر پنیرهای موزارلا و کرسنزا (به ترتیب ۰/۴ و ۴ CFU/g)، پایین‌تر از ریکوتا با حد تشخیص بود (۴۰ CFU/g). در فرآورده‌های گوشتی، از روش qPCR برای تشخیص کمی لیستریا مونوسیتوژنز در این محصولات استفاده شد. روش qPCR براساس یک آزمایش PCR براساس ژن هدف *hly* در آزمایشگاه تحقیقاتی توسعه یافته بود. پروتکل‌های استخراج DNA باکتری برای محصولات مختلف گوشت خوک (گوشت خوک خام، سوسیس تخمیر شده خوک، ژامبون پخته شده و سوسیس فرانکفورتر) براساس کیت مخصوص و مراحل بعدی آن نظیر فیلتراسیون (با استفاده از فیلتر با اندازه منافذ ۲۲ تا ۲۵ میکرومتر و سپس از طریق یک غشای نایلونی) (با اندازه منافذ ۱۱ میکرومتر) ایجاد شد. استخراج DNA نهایی، با استفاده از رزین چلکس-صد<sup>۲۷</sup> ساخت کشور آلمان فراهم شد. این روش، امکان کمی‌سازی هدف را تا ۱۰<sup>۳</sup> CFU/g لیستریا مونوسیتوژنز و تشخیص ۱۰<sup>۲</sup> CFU/g را در حداقل ۵۰ درصد تکرار فراهم کرد. تشخیص پاتوژن‌های میکروبی براساس روش‌های مولکولی

بر پروتئین برای برخی از آلرژن‌های جدید تعیین شده، مشکلات تحلیلی برخی از روش‌های ELISA و در نهایت، نیاز به روش‌های تاییدی غیر از ELISA منجر به ایجاد برخی از سنجش‌های مبتنی بر DNA در طول دوره چند سال گذشته شده است. در واقع، این موضوع نشان‌دهنده این است که آزمون‌های تحلیلی مبتنی بر DNA جایگاه خود را در تجزیه و تحلیل آلرژن‌های غذایی و گلوتن پیدا کرده است [۳۳].



شکل (۱۰): تشخیص آلرژن‌های غذایی با روش RT-PCR [۳۴].

در ارزیابی برخی از ترکیبات آلرژن، روش RT-PCR حساس‌تر از الایزا عمل می‌کند. با این حال، مطالعات بیشتری به منظور تعیین کاربرد روش RT-PCR به عنوان ابزار معمول برای ماتریس‌های غذایی خاص مورد نیاز است. واضح است که حداقل در مورد دو آلرژن اصلی غذایی، نظیر تخم‌مرغ و شیر، حساسیت روش PCR تاکنون نشان داد که نسبت به تشخیص پروتئین به مراتب پایین است و همچنین نمی‌تواند بین اجزای غیر حساسیت‌زای گوشت (گوشت مرغ، گوشت گاو) و پروتئین‌های آلرژیک واقعی (به عنوان مثال، اووآلبومین یا کارژین) تمایز قائل شود.

اكتسابی بیوشیمیایی باشد. علائم ممکن است در عرض چند دقیقه یا چند ساعت پس از خوردن آن غذایی به خصوص، ظاهر شوند [۳۰]. نباید آلرژی را با واکنش‌های عدم تحمل مواد غذایی، واکنش‌های فارماکولوژی و واکنش‌های نیمه سمی که سیستم ایمنی در آن درگیر می‌کند، اشتباه گرفت. به عنوان مثال، بعضی افراد، مبتلا به نوعی بیماری سلول‌ها هستند؛ این افراد، نسبت به گلوتن موجود در فرآورده‌های غلات، عدم تحمل دارند در حالی که به خود ترکیبات غلات حساسیت ندارند. این بیماری، خود ایمنی و وراثتی است؛ غشای مخاطی روده کوچک فرد مبتلا پس از مصرف فرآورده‌های غله‌ای حاوی پروتئین گلوتن (اسیدهای آمینه موجود در پرولامین) آسیب دیده و دچار التهاب می‌شود [۳۱]. از این رو، امروزه تنها راه درمان این بیماری، استفاده از یک رژیم غذایی بدون گلوتن است. در میان روش‌های تشخیصی که در حال حاضر استفاده می‌شود، روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی (الایزا) [۳۰] (آزمایش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم) و دستگاه‌های جریان جانبی [۳۱] به طور سنتی برای تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن استفاده می‌شوند، زیرا پروتئین‌های مهاجم را هدف قرار می‌دهند. طیف‌سنجی جرمی یکی دیگر از رویکردهای تحلیلی مبتنی بر پروتئین با کاربردهای جدید و امیدوارکننده در تشخیص، به ویژه غربالگری و تایید آلرژن‌های غذایی و گلوتن، روش‌های نوین برای تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن، روش فناوری‌های مبتنی بر DNA به خصوص RT-PCR است (شکل (۱۰)). این فناوری‌ها، آلرژن (پروتئین‌ها) را هدف قرار نمی‌دهند، بلکه DNA را به عنوان نشانگر برای حضور مواد آلرژن‌زا و گلوتن در محصولات غذایی هدف قرار می‌دهند. استفاده از این فناوری مبتنی بر DNA عاری از بحث نیست، زیرا نظرات متفاوتی در مورد مناسب بودن این روش‌ها برای تشخیص آلرژن‌ها نیز وجود دارد؛ در واقعیت این روش، ارتباط بین پروتئین مهاجم و محتوای DNA در غذاها را مورد هدف قرار می‌دهد [۳۲]. اجرای قوانین و مقررات جدید بر چسب‌گذاری، عدم به کارگیری روش‌های تشخیصی مبتنی

کاربرد روش‌های مدرن مولکولی نظیر روش RT-PCR در تایید کیفیت ویژگی‌های کمی میکروبیولوژیک، شناسایی گونه‌های پاتوژن و تشخیص آلرژن‌های غذایی (لبنیات و غلات) گسترش زیادی به خصوص در صنعت غذایی با نگاه میکروبی در دهه اخیر داشته است. روش RT-PCR نیازمند تجهیزات پیچیده‌تری است، اما بسیار دقیق بوده و نسبت به سایر روش‌های مبتنی بر DNA کم‌زحمت‌تر است. در این روش، از کاوشگرهای هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسنت در انتهای ۳' یا ۵' استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آنها و روش‌های الکتروفورز در ژل آگارز یا ژل پلی‌اکریل‌امید می‌دهد.

در حال حاضر، عمده روش‌های شناسایی ترکیبات آلرژن مواد غذایی شامل تشخیص (۱) - پروتئین عامل آلرژی و (۲) - شناسایی DNA ترکیبات آلرژن‌زا مدنظر است. در همین راستا، روش‌های آزمایشگاهی مختلفی ابداع و استفاده شده‌اند که گاهی حساسیت بالایی داشته و قادرند ترکیبات آلرژن را در محدوده تعیین شده توسط مجامع رسمی و بین‌المللی (کمتر از ۱ میلی‌گرم تا بیشتر از ۱ گرم در هر کیلوگرم ماده غذایی یا بین ۱ تا ۱۰۰) تشخیص دهند. علاوه بر این، کیت‌های تجاری متعددی با کاربری آسان و سریع نیز به بازار عرضه شده‌است و تلاش‌ها برای ورود فناوری‌های نوین به این عرصه همچنان ادامه دارد. هدف از این مقاله مروری، توصیف دقیق و طبقه‌بندی روش RT-PCR و دانش موجود در ارتباط با جنبه‌های شیمیایی تشخیصی qPCR و عملکرد آن در تشخیص گونه‌های پاتوژن غذایی و همچنین بررسی و تعیین کمی آلرژن‌های غذایی در سال‌های اخیر است.

## پی‌نوشت

- |  |  |   |
|--|--|---|
| 1. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) | reaction (Multiplex PCR)                             | 22. Ribonucleic acid (RNA)                        |
| 2. The polymerase chain reaction (PCR)                 | 12. TaqMan   | 23. Rodriguez-Lazaro                              |
| 3. Quantitative PCR (qPCR)                             | 13. Hybprobe   | 24. Colony-forming unit (CFU)                     |
| 4. Detector  | 14. FRET   | 25. Longhi  |
| 5. YO-PRO-1  | 15. Salmonella                                       | 26. virulence gene                                |
| 6. SYTO  | 16. Buffered Peptone Water (BPW)                     | 27. Chelex-100                                    |
| 7. BOXTO   | 17. Rappaport-Vassiliadis (RV)                       | 28. The most probable number (MPN) test (MPN)     |
| 8. BEBO  | 18. Müller-Kauffmann tetrathionate novobiocin (MKTn) | 29. Immunoglobulin E (IgE)                        |
| 9. Melting curve                                       | 19. Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar)       | 30. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) |
| 10. genetically modified organism (GMO)                | 20. <i>Listeria monocytogenes</i>                    | 31. Lateral flow devices (LFDs)                   |
| 11. The multiplex polymerase chain                     | 21. GC-content (or guanine-cytosine content)         |   |

## مراجع

- [1] Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
- [2] Nazarenko, I., Bhatnagar, S.K., and Hohman, R.J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 25, 2516–2521.
- [3] Schmitgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., and Reed, M.W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay, comparison of endpoint and realtime methods. *Anal. Biochem.* 285, 194–204.
- [4] Karbalaie-Niya, M. H., Mokhtari-Azad, T., Jondoghi, N. Z. S., & Yavarian, J. (2015). Detection of Oseltamivir resistant influenza A/H3N2 viruses by Real-time RT-PCR. *Razi Journal of Medical Sciences*, 22(133), 64-69.
- [5] Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in clinical chemistry*, 40, 219.
- [6] Sadeghi, F., Salehi-Vaziri, M., Alizadeh, A., Ghodsi, S. M., Bokharaei-Salim, F., Fateh, A., ... & Keyvani, H. (2015). Detection of Merkel cell polyomavirus large T-antigen sequences in human central nervous system tumors. *Journal of medical virology*, 87(7), 1241-1247.
- [7] Fraga D, Meulia T, Fenster S. (2008). *Current protocols: essential laboratory techniques*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
- [8] Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., & Kubišta, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic acids research*, 31(8), 45.
- [9] Ahmad, A. I., & Ghasemi, J. B. (2007). New unsymmetrical cyanine dyes for real-time thermal cycling. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 983-988.
- [10] Monis, P. T., Giglio, S., & Saint, C. P. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical biochemistry*, 340(1), 24-34.
- [11] Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T., & Ji, H. P. (2014). High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Analytical chemistry*, 86(5), 2618-2624.
- [12] Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., & Balis, U. J. (1997). The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22(1), 176-181.
- [13] Weissenborn, S. J., Wieland, U., Junk, M., & Pfister, H. (2010). Quantification of beta-human papillomavirus DNA by RT-PCR. *Nature protocols*, 5(1), 1-13.
- [14] Gravel, A., Sinnett, D., & Flamand, L. (2013). Frequency of chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8(12), e84322.
- [15] Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31(5), 1106-1121.

- [16] Lazaro, D. R., Cook, N., & Pérez, M. H. (2013). Current Challenges in RT-PCR Diagnostics in Food Science. In RT-PCR in food science: current technology and applications (pp. 21-26). Caister Academic Press.
- [17] Hoorfar, J., and Cook, N. (2003). Critical aspects in standardization of PCR. In Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens, K. Sachse and J. Frey, eds. (Totowa, USA: Humana Press), pp. 51–64.
- [18] D'Agoštino M., and Rodriguez-Lazaro, D. (2009). Harmonization and validation of methods in food safety – 'FOOD-PCR', a case study. In Global Issues in Food Science and Technology. Barbosa-Cánovas, G., Mortimer, A., Colonna, P., Lineback, D., Spiess, W., and Buckle, K., eds. (Maryland Height, USA: Academic press), pp. 199–209.
- [19] Rodríguez-Lázaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agoštino, M., Helmuth, R., ... & Cook, N. (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. Trends in food science & technology, 18(6), 306-319.
- [20] Anonymous (2007a). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. (ISO 6579:2002/A1:2007) Amendment 1: Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- [21] Anonymous (2005a). Regulation (EC) No 2073/2005 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2005 on the microbiological criteria for foodstuffs. Oficial J. Euro. Union L338, 1–26.
- [22] De Zuter, L., De Smedt, J.M., Abrams, R., Beckers, H., Cateau, M., de Borchgrave, J., Debevere, J., Hoekstra, J., Jonkers, F., and Lenges, J. (1991). Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of Salmonella from foods. Int. J. Food Microbiol. 13, 11–20.
- [23] Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N., and Hoorfar, J. (2008). Enumeration of Salmonella in food and feed samples by RT-PCR for quantitative microbial risk assessments. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1299–1304.
- [24] Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kref, J. (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14, 584–640.
- [25] Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scorti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A., and Pla, M. (2004a). Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by RT-PCR: assessment of hly, iap and lin02483 targets and AmpliFluor technology. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1366–1377.
- [26] Campbell, M.S., and Wright, A.C. (2003). RT-PCR analysis of Vibrio vulnificus from oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7137–7144.
- [27] Nordström, J.L., Vickery, C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L., and De Paola, A. (2007). Development of a multiplex RT-PCR with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus bacteria in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5840–5847.
- [28] Varasteh, A., Jabbari, F., & Sankian, M. (2008). Food allergy. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 15(2), 5-20.
- [29] Abbaszadeh, F., Aalami, M., Kadkhodae, R., Maghsoudlou, Y., & Sadeghi Mahoonak, A. (2023). Effect of Pickering Emulsion Stabilized by Soy Protein Nanoparticles on Physical and Rheological Properties of Gluten-Free Cake Batter. Journal of Food Processing and Preservation, 2023.
- [30] Zeltner, D., Glomb, M.A., and Maede, D. (2009). RT-PCR systems for the detection of the gluten containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. Eur. Food Res. Technol. 228, 321–330.
- [31] Demmel, A., Hupfer, C., Ilg Hampe, E., Busch, U., and Engel, K.H. (2008). Development of a RT-PCR for the detection of lupine DNA (Lupinus species) in foods. J. Agric. Food Chem. 56, 4328–4332.
- [32] Miyazaki, A., Watanabe, S., Ogata, K., Nagatomi, Y., Kokutani, R., Minegishi, Y., ... & Hirao, T. (2019). RT-PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids. Journal of agricultural and food chemistry, 67(19), 5680-5686.
- [33] Betazzi, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Berti, F., Marrazza, G., and Mascini, M. (2008). Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. Anal. Chim. Acta 614, 93–102.
- [34] Dahinden, I., von Büren, M., and Lüthy, J. (2001). A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. Eur. Food Res. Technol. 212, 228–233.

## نویسندگان

مهتاب تارمی<sup>۱\*</sup>محمد سراجی<sup>۲</sup>، نرگس مهرافزا<sup>۳</sup>

۱. فوق دکتری شیمی تجزیه، استاد شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. دانشجوی دکتری شیمی تجزیه دانشگاه کاشان، مدیر فنی آزمایشگاه شیمی شهرک علمی و تحقیقاتی اصفهان
۳. دکتری شیمی تجزیه، دانشگاه صنعتی اصفهان

\*Mahtab.tarami@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

# ساخت نانوزیست کامپوزیت کیتوسان-هالوسیت به عنوان جاذب برای روش ریزاستخراج فیلم نازک

## واژه‌های کلیدی

کیتوسان، هالوسیت، ریزاستخراج فیلم نازک، ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول، نمونه‌های آبی

## چکیده

این مقاله، یک جاذب سازگار با محیط‌زیست مبتنی بر نانوکامپوزیت هالوسیت-کیتوسان برای ریزاستخراج فیلم نازک را معرفی می‌کند. کیتوسان به‌عنوان یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار برای تهیه جاذب فیلم نازک استفاده شد. برای بهبود مقاومت مکانیکی و شیمیایی فیلم و افزایش کارایی جذب، نانولوله‌های هالوسیت با کیتوسان ترکیب شدند تا جاذب فیلم نازک تهیه شود. این فیلم برای ریزاستخراج فیلم نازک ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول و به دنبال آن اندازه‌گیری به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به عنصر تشخیص فلورسانس استفاده شد. عوامل موثر مانند میزان کیتوسان و هالوسیت، قدرت یونی محلول نمونه، نوع و حجم حلال و جاذب، زمان استخراج و جاذب بهینه شدند. محدوده دینامیکی خطی روش در محدوده  $10^{-1}$  تا  $50 \mu\text{g/L}$  و حد تشخیص و انحراف استاندارد نسبی روش به ترتیب  $\mu\text{g/L}$  و ۰/۴ و ۹ درصد بود. این روش، برای نمونه‌های آب رودخانه، فاضلاب و آب لوله‌کشی اعتبارسنجی و درصد بازیابی‌ها در محدوده ۱۰۶-۶۷ درصد حاصل شد.

## مقدمه

ریزاستخراج فیلم نازک<sup>۱</sup> نوعی از ریزاستخراج فاز جامد<sup>۲</sup> است که در آن یک لایه نازک از جاذب با مساحت سطح بالا به‌عنوان فاز استخراج استفاده می‌شود. در TFME، به دلیل ویژگی‌های سطح ویژه، ظرفیت استخراج از روش‌های رایج SPME بیشتر است. از طرفی، لایه نازک جاذب باعث شده‌است که زمان رسیدن به تعادل از SPME کمتر باشد [۱]. از زمان ارائه روش TFME تاکنون پوشش‌های مختلف مانند پلی دی متیل سیلوکسان، پلی دوپامین، پلی آنیلین/نایلون ۶، نانوکامپوزیت پلی‌آمید-نانوذرات اکسید روی، پلی دی متیل سیلوکسان/ژئولیت ۵، پلی اکریلونیتریل/ژئولیت ایمیدازول ۸، پلی استایرن/چارچوب آلی فلزی ۱۹۹ ارائه شده‌اند [۲ تا ۸]. برای سنتز بیشتر جاذب‌ها، واکنشگرها و حلال‌های آلی سمی و خطرناک استفاده می‌شود و در مقالات گزارش شده، سنتز و استفاده از فیلم‌های دوستدار محیط‌زیست کمتر گزارش شده‌است [۳].

اخیراً نانورس‌ها مانند نانولوله‌های هالوسیت در ساخت نانوکامپوزیت‌ها به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند



[۹ تا ۱۲]. نانولوله‌های هالوسیت دارای شبکه بلوری چهار وجهی منتظم اکسید سیلیکا و هشت وجهی منتظم اکسید آلومینا هستند [۱۳]. پایداری دمایی و مکانیکی مناسب، مساحت سطح و ظرفیت جذب بالا، ارزان، سمیت کم و دوستدار محیط زیست بودن نانورس‌ها، دلیل اصلی استفاده آنها در تهیه و ساخت نانوکامپوزیت‌ها است. نانوکامپوزیت‌های متنوع از هالوسیت‌ها مانند نانولوله‌های هالوسیت-گرافن اکسید-پلی تیوفن [۹]، نانولوله‌های هالوسیت-پلی آنیلین [۱۰]، نانولوله‌های هالوسیت عامل دار شده با نانوذرات طلا [۱۱] و نانولوله‌های هالوسیت مغناطیسی مولکولی [۱۲] به‌عنوان فاز استخراج برای تجزیه و تحلیل ترکیبات مختلف در مقالات قبلی گزارش شده‌اند.

کیتوسان، یک پلیمر زیست تخریب پذیر با گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آمینو فراوان در ساختار خود است. خواص آبدوستی، زیست سازگاری، عدم سمیت و قابلیت جذب بالا، کیتوسان را به‌عنوان یک پلیمر در زمینه‌های مختلف زیست پزشکی، تصفیه آب و علوم جداسازی تبدیل کرده است [۱۴ تا ۱۷]. علاوه بر این، کیتوسان در تهیه کامپوزیت‌ها و نانوکامپوزیت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است؛ زیرا دارای گروه‌های آمینو و هیدروکسیل فراوانی است که می‌تواند با ترکیبات آلی و معدنی تعامل داشته باشند و به‌عنوان یک غشاء، کاربردهای زیادی در سیستم‌های زیست پزشکی و تصفیه آب دارد. با این حال، ایراد اصلی فیلم کیتوسان، پایداری مکانیکی و شیمیایی ضعیف آن است [۱۸]. برای کاهش این نقص در عملکرد مواد معدنی مختلف به‌عنوان مثال، گاما-گلیسی دوکسی پروپیل و تری متوسیلان [۱۹]، دی اکسید سیلیکون<sup>۳</sup> [۲۰]، دی اکسید تیتانیوم<sup>۴</sup> [۲۱] و زئولیت [۲۲] با پلیمر کیتوسان ترکیب شده‌اند.

در چند سال گذشته، تلاش‌هایی برای کاربرد پلیمر کیتوسان در زمینه استخراج صورت گرفته است. به‌عنوان جاذب استخراج، کیتوسان در فیبر SPME [۲۳ و ۲۴]، استخراج فاز جامد مغناطیسی [۲۵]، SPME درون لوله‌ای [۲۶] و پراکندگی فاز جامد ماتریس [۲۷] استفاده شده است. با این حال، طبق اطلاعات ما، هیچ گزارشی در مورد استفاده از کیتوسان در روش TFME تاکنون منتشر نشده است. دلیل این امر، پایداری مکانیکی پایین فیلم نازک کیتوسان است. در این روش، نانولوله‌های هالوسیت را برای بهبود پایداری مکانیکی و کارایی جذب فیلم به کیتوسان وارد کردیم تا به‌عنوان جاذب در TFME استفاده شود.

۱۷-آلفا اتینیل استرادیول، به‌عنوان یک ماده شیمیایی، در عملکرد غدد درون ریز اختلال ایجاد می‌کند و عملکرد عادی هورمون‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طور معمول، این مواد از طریق تصفیه‌خانه فاضلاب، فاضلاب کارخانه‌های داروسازی و بیمارستان‌ها رها می‌شوند و در معرض قرار گرفتن آنها می‌تواند منجر به مشکلات سلامتی مانند افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه و اختلالات تولید مثل شود. به دلیل تأثیرات نامطلوب ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول برای سلامتی، اندازه‌گیری این ترکیب در نمونه‌های زیست‌محیطی حائز اهمیت است [۲۸].

در این روش، تهیه فیلم نانوکامپوزیت زیست‌سازگار بر پایه کیتوسان و هالوسیت برای استفاده در روش TFME گزارش شده است. از فیلم نانوزیست کامپوزیت برای استخراج ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول از نمونه‌های آب و فاضلاب استفاده شد. از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز فلورسانس برای اندازه‌گیری استفاده شد. تأثیر عوامل آزمایشگاهی (مانند مقدار کیتوسان، هالوسیت، قدرت یونی نمونه، زمان استخراج، نوع حلال، حجم و زمان واجذب) روی عملکرد استخراج بررسی شد.

## بخش آزمایشگاهی

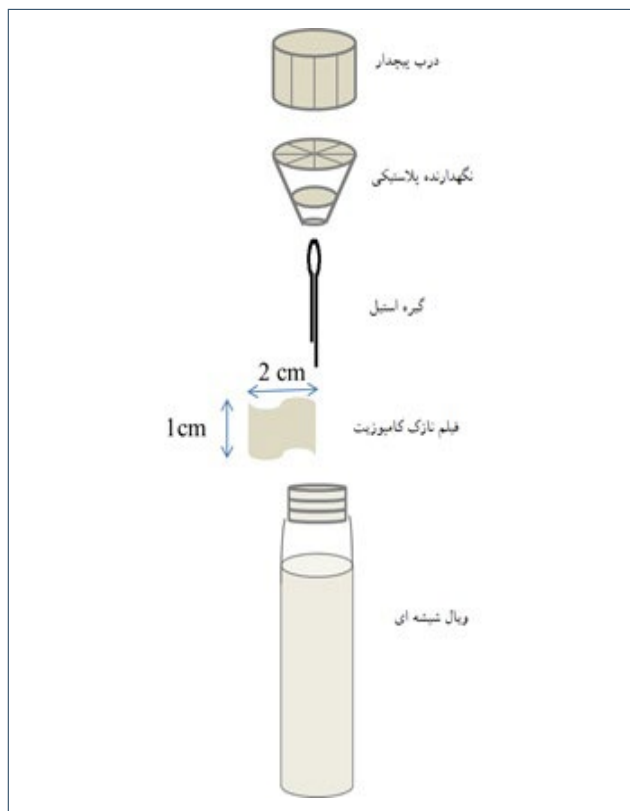
### مواد شیمیایی و محلول‌ها

کیتوسان با جرم مولکولی ۳۰۰,۰۰۰-۱۰۰,۰۰۰ Da با ۹۰ درصد داستیله شدن، هالوسیت و ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول، سدیم هیدروکسید، استیک اسید ۹۶ درصد و سدیم سولفات، متانول، استونیتریل، استون و ایزوپروپانول با درجه خلوص HPLC خریداری شد. آب خالص با دستگاه فیلتراسیون تهیه شد. محلول مادر ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول در متانول تهیه و محلول‌های روزانه از محلول مادر تهیه شد.

### دستگاهوری

اندازه‌گیری کروماتوگرافی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۵</sup> مجهز به آشکارساز فلورسانس (HP 1046) و یک شیر تزریق دستی (حلقه نمونه ۲۰ μL) انجام شد. از یک ستون C8 (طول ۱۵۰ mm × قطر داخلی ۳/۰ mm، اندازه ذرات ۳ μm) برای جداسازی استفاده شد. یک ستون محافظ (۱۰ mm × ۳) به ستون تجزیه‌ای متصل شد. طول موج برانگیختگی و انتشار به ترتیب روی ۲۰۳ nm و ۳۰۲ nm تنظیم و فاز متحرک با ترکیب ۷۰ درصد استونیتریل و ۳۰ درصد آب با سرعت جریان ۰/۵ mL.min از ستون عبور داده

رسید، لایه نازک همراه پین از نگهدارنده پلی اتیلنی درپوش جدا و به مدت ۵ ثانیه در آب غوطه‌ور و جاذب لایه نازک تا حدی با استفاده از یک دستمال تمیز خشک شد. برای جذب آنالیت، فیلم نازک در ویال شیشه‌ای کوچک (قطر داخلی mm ۴) حاوی  $110 \mu\text{L}$  متانول رول و به مدت ۵ دقیقه نگهداشته و پس از آن،  $20 \mu\text{L}$  از محلول به HPLC تزریق شد.



شکل (۲): نمای کلی تجهیز استخراج [۳۹].

### • نمونه‌های واقعی

پساب شهری از جریان ورودی تصفیه‌خانه فاضلاب دانشگاه صنعتی اصفهان (اصفهان، ایران)، نمونه آب رودخانه، از رودخانه زاینده‌رود در مرکز شهر (اصفهان، ایران) و آب لوله‌کشی از دانشگاه صنعتی اصفهان (اصفهان، ایران) جمع‌آوری شد. نمونه‌های آب قبل از استخراج با استفاده از فیلتر نایلونی  $0.45 \mu\text{m}$  فیلتر شدند.

### • بحث و نتایج

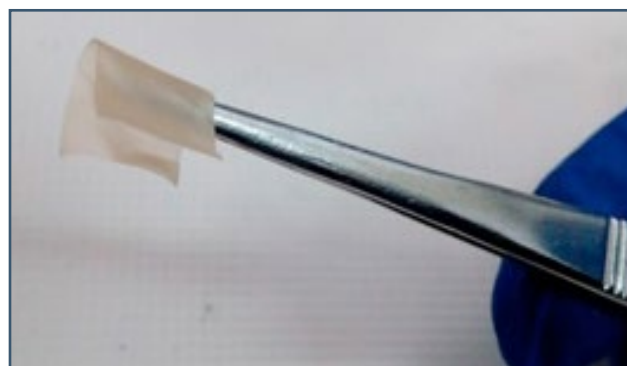
#### • ویژگی‌های فیلم هالوسیت / کیتوسان

ریخت‌شناسی فیلم هالوسیت/کیتوسان با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۱۰</sup> مورد مطالعه قرار گرفت. تصویر فیلم در شکل (۳) نشان داده شده‌است. ادغام هالوسیت در پلیمر کیتوسان را می‌توان در تصویر مشاهده کرد.

شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی<sup>۶</sup> برای بررسی مورفولوژی فیلم هالوسیت/کیتوسان استفاده شد. طیف FT-IR در حالت ATR با استفاده از طیف‌سنج مادون قرمز<sup>۷</sup> به‌دست آمد. دستگاه پراش‌سنج<sup>۸</sup> برای دستیابی به الگوی XRD استفاده شد. مساحت سطح فیلم با استفاده از تخلخل‌سنج<sup>۹</sup> به‌دست آمد.

### • تهیه فیلم نانوزیست کامپوزیت

براساس مطالعه قبلی، نانوزیست کامپوزیت با تغییرات جزئی تهیه شد [۲۹]. به‌طور خلاصه،  $15 \text{ mm}$  محلول اسید استیک ۱ درصد حاوی  $0.3 \text{ g}$  کیتوسان و  $0.45 \text{ g}$  از نانورس تهیه شد. نانورس هالوسیت با استفاده از امواج فراصوت در محلول پراکنده و سوسپانسیون به مدت ۴ ساعت در دمای  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد و سپس یک شب در دمای اتاق هم‌زده شد. سوسپانسیون در پتری دیش پلی پروپیلن (با قطر داخلی  $7.5 \text{ cm}$ ) ریخته و در آن با دمای  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. برای خنثی کردن اسید استیک باقیمانده، فیلم خشک شده در  $25 \text{ mm}$  سدیم هیدروکسید  $1 \text{ mol/l}$  به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور و سپس با آب خالص شسته شد. فیلم انعطاف‌پذیر به‌دست آمده به قطعات  $2 \times 1 \text{ cm}$  سانتی‌متر بریده شد. عکس فیلم نازک واقعی در شکل (۱) نشان داده شده‌است.



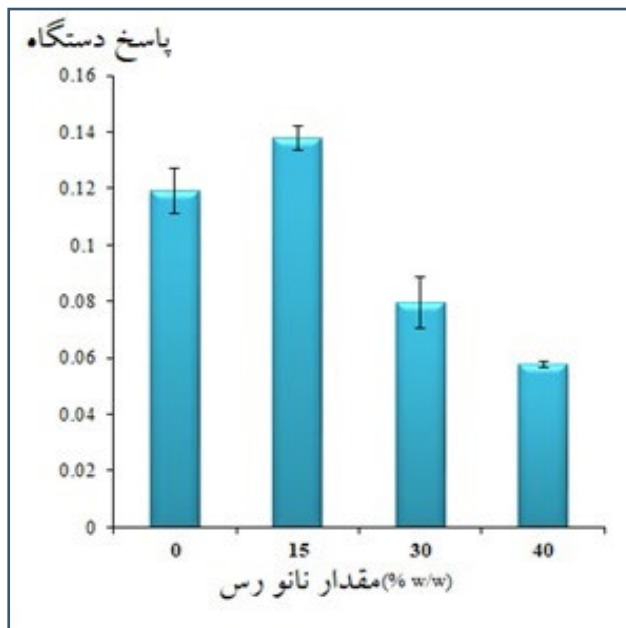
شکل (۱): تصویر فیلم نازک کیتوسان/هالوسیت [۳۹].

### • روش ریزاستخراج فیلم نازک

قبل از شروع فرآیند ریزاستخراج، فیلم نازک به مدت ۱۰ دقیقه در آب غوطه‌ور شد تا متورم شود و انعطاف‌پذیری آن افزایش یابد. سپس فیلم با استفاده از یک دستمال تمیز تا حدی خشک شد. یک ویال شیشه‌ای درپوش‌دار  $15 \text{ mL}$  حاوی  $14 \text{ mL}$  محلول نمونه برای TFME استفاده شد. جاذب لایه نازک در بالای ویال شیشه‌ای با استفاده از یک پین از جنس استیل ضد زنگ و نگهدارنده پلی اتیلنی متصل به درپوش ویال ثابت شد (شکل (۲)). محلول نمونه با استفاده از لرزاننده با سرعت  $210$  دور در دقیقه را هم‌زده و استخراج در دمای اتاق به مدت  $30$  دقیقه انجام شد. هنگامی که استخراج به پایان

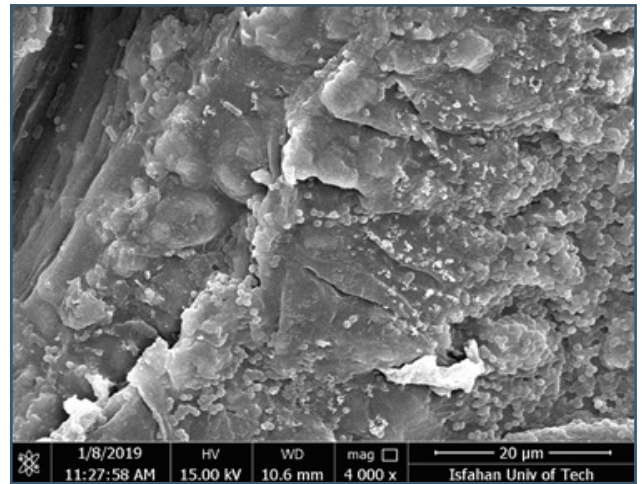
### • تهیه جاذب لایه نازک

برای بهینه‌سازی اثر مقدار هالوسیت بر استخراج آنالیت، فیلم نازک با نسبت وزنی مختلف هالوسیت به کیتوسان (۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ درصد وزنی/وزنی) سنتز و برای استخراج آنالیت مطابق روش‌های مورد بحث در بخش‌های (۲-۳) و (۲-۴) استفاده شد. داده‌ها (شکل (۴)) نشان داد که فیلم با نسبت وزنی ۱۵ درصد کارایی بهتری را برای استخراج ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول ارائه کرد. نانوساختار هالوسیت نسبت سطح به حجم زیادی را فراهم کرد و کارایی استخراج را بهبود بخشید. در مقادیر بالاتر نانوس، تجمع هالوسیت می‌تواند سطح موثر را کاهش دهد؛ بنابراین، کارایی استخراج کاهش می‌یابد.



شکل (۴): اثر مقدار هالوسیت بر کارایی استخراج فیلم با استفاده از ۱۰ mL محلول استیک (۱ درصد وزنی) حاوی ۲۰ g کیتوسان و نسبت وزنی مختلف نانوس به کیتوسان تهیه شد (حلال شستشو: متانول، حجم حلال شست و شو: ۲۵۰ μL، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه و زمان واجذب هوا: ۱۰ دقیقه) [۳۹].

برای تهیه فیلم نازک از محلولی حاوی ۲ g کیتوسان و ۰/۳ نانوس در ۱۰۰ mL محلول اسید استیک ۱ درصد استفاده شد. برای ساخت لایه‌های نازک با ضخامت‌های مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ از محلول ذکر شده به ظروف پتری پلی پروپیلن اضافه شد. سپس از فیلم‌ها برای استخراج آنالیت استفاده و برای استخراج از محلول آنالیت با غلظت ۵۰ μg/L استفاده شد. پس از استخراج، فیلم‌های بارگذاری شده با استفاده از ۲۵۰ μL متانول طی ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک شسته شدند. نتایج نشان داد که فیلم تهیه شده با استفاده از ۱۵ mL محلول کیتوسان، بهترین کارایی را دارد (شکل (IV)، اطلاعات تکمیلی). ضخامت فیلم با استفاده از میکروسکوپ نوری ۱۵ μm محاسبه شد. در حجم‌های بیش از ۱۵ mL، بازده استخراج به دلیل کاهش سرعت انتقال جرم آنالیت در فیلم‌های ضخیم‌تر کاهش یافت.



شکل (۳): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی از مقطع عرضی کامپوزیت کیتوسان/هالوسیت [۳۹].

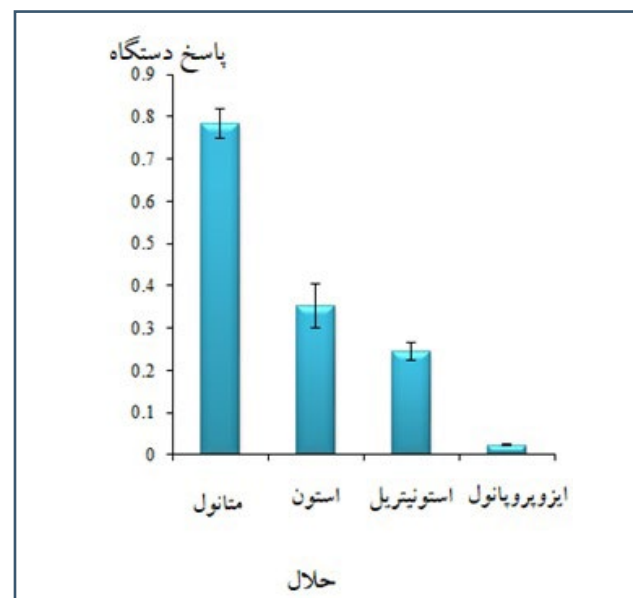
طیف‌سنجی اشعه ایکس پراکندگی انرژی<sup>۱۱</sup> برای فیلم هالوسیت/ کیتوسان نیز به دست آمد. سیلیس، اکسیژن، نیتروژن و کربن در اندازه‌گیری EDX مشاهده شد. بررسی انجام شده وجود هالوسیت را تایید کرد. مساحت سطح از آنالیز بی ای تی<sup>۱۲</sup>، ۱/۶۴ g/m<sup>۲</sup> به دست آمد.

طیف FT-IR فیلم هالوسیت/کیتوسان در شکل (I) (اطلاعات تکمیلی) نمایش داده شده است. قله در محدوده ۳۶۰۰-۳۰۰۰ cm<sup>-۱</sup> به ارتعاش کششی گروه‌های O-H نسبت داده می‌شود. قله در محدوده ۲۸۷۵ و ۲۹۲۵ cm<sup>-۱</sup> به پیوندهای C-H اختصاص داده می‌شوند. قله در ۳۶۹۱ cm<sup>-۱</sup> به دلیل ارتعاش کششی گروه‌های هیدروکسیل سطح داخلی هالوسیت است. قله در محدوده ۱۱۵۱ cm<sup>-۱</sup> و ۱۳۷۵ به ارتعاش نامتقارن گروه‌های Co و خمشی گروه‌های C-H کیتوسان نسبت داده می‌شوند. قله در ۱۶۴۹ cm<sup>-۱</sup>، به دلیل گروه امید کیتوسان است. قله در محدوده ۱۰۲۵ cm<sup>-۱</sup>، به دلیل ارتعاش کششی گروه‌های Si-O از هالوسیت است. خمشی NH آمین اولیه کیتوسان در ۱۵۸۷ cm<sup>-۱</sup> مشاهده شد [۲۹ و ۳۰]. الگوی XRD فیلم (شکل (II)، اطلاعات تکمیلی) پیک پراش را در حدود ۲θ = ۲۰ نشان داد که به ترتیب به شاخص‌های (۱۱۰) و (۰۲۰۱) برای کیتوسان و هالوسیت نسبت داده می‌شود. قله پراش در حدود ۲θ = ۱۲ به صفحات هالوسیت (۰۰۱) اختصاص داده شده است [۳۱]. نمایی از برهم‌کنش بین آنالیت و جاذب در شکل (III) (اطلاعات تکمیلی) نشان داده شده است. کیتوسان دارای گروه‌های هیدروکسیل و آمین فراوانی در ساختار خود است که می‌تواند با گروه‌های هیدروکسیل هالوسیت از طریق پیوند هیدروژنی برهم‌کنش داشته باشد. از آنجایی که آنالیت (۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول) دارای گروه‌های هیدروکسیل در ساختار خود است، آنها می‌توانند با گروه‌های عاملی قطبی جاذب (گروه‌های هیدروکسیل هالوسیت و گروه‌های آمین و هیدروکسیل کیتوسان) برهم‌کنش داشته باشند. به نظر می‌رسد برهم‌کنش‌های واندروالسی و پیوند هیدروژنی بین گروه‌های عاملی جاذب و آنالیت، نقش غالب را در سازوکار جذب داشته باشند.

## • ریزاستخراج لایه نازک

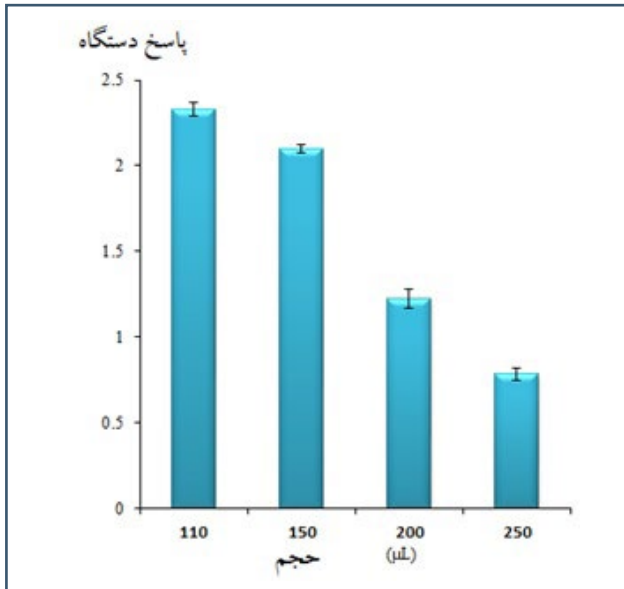
محلول‌های مختلف نمونه، حاوی مقادیر مختلف سولفات سدیم (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ درصد وزنی/حجمی) برای بررسی اثر افزودن نمک بر استخراج آنالیت تهیه شد. با توجه به نتایج (شکل ۷)، اطلاعات تکمیلی، استخراج آنالیت از محلول حاوی ۲۰ درصد سدیم سولفات، بالاترین سیگنال تجزیه‌ای را ارائه داد. افزایش کارایی استخراج آنالیت با افزودن نمک را می‌توان با اثر نمک‌زدایی توضیح داد. با افزایش مقدار نمک، حلالیت آنالیت در محلول نمونه کاهش می‌یابد. بنابراین، انتقال آنالیت از محلول به جاذب افزایش می‌یابد. مقدار بالاتر سولفات سدیم تاثیر معناداری روی بازده استخراج نداشت.

حلال مورد استفاده برای واجذب آنالیت باید با آب قابل اختلاط باشد تا با آنالیز HPLC فاز معکوس سازگار شود. علاوه بر این، حلال‌های قطبی مناسب‌تر هستند؛ زیرا می‌توانند با گروه‌های عاملی آنالیت برهم‌کنش داشته باشند و کارایی واجذب را افزایش دهند. براساس عوامل ذکر شده، چهار حلال آلی شامل متانول، استونیتریل، استون و ایزوپروپانول مورد آزمایش قرار گرفتند. داده‌های تجربی (شکل ۵)) نشان داد که متانول، بهترین حلال برای شویش آنالیت از فیلم است. پس از بهینه‌سازی حلال شستشو، حجم‌های مختلف متانول (۱۱۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰) برای یافتن حجم کافی متانول به‌منظور واجذب آنالیت انتخاب شد. حجم‌های کمتر از ۱۱۰  $\mu\text{L}$  مورد بررسی قرار نگرفتند؛ زیرا در این صورت، فیلم به‌طور کامل پوشش درون حلال قرار نمی‌گرفت. بهترین حجم حلال واجذب، حداقل مقدار حلال است که بیشترین حساسیت را ایجاد کند.



شکل ۵: اثر نوع حلال شستشو بر کارایی استخراج فیلم با استفاده از ۱۵ mL محلول استیک (۱ درصد وزنی) حاوی ۰/۳ گ کیتوسان و ۰/۴۵ گ هالوسیت (حجم حلال شستشو: ۲۵۰  $\mu\text{L}$ ، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه، زمان واجذب: ۱۰ دقیقه، غلظت نمک تهیه شده: ۲۰ درصد) [۳۹].

واجذب آنالیت در یک ویال کوچک انجام شد تا حجم حلال مورد نیاز برای پوشش فیلم را به حداقل برساند. براساس نتایج (شکل ۶)، ۱۱۰  $\mu\text{L}$  متانول بیشترین کارایی را به همراه داشت. در حجم حلال بالاتر، کارایی واجذب به دلیل اثر رقت، کاهش یافت.



شکل ۶: اثر حجم حلال شستشو بر کارایی استخراج فیلم با استفاده از ۱۵ mL محلول استیک (۱ درصد وزنی) حاوی ۰/۳ گ کیتوسان و ۰/۴۵ گ هالوسیت (حلال شستشو: متانول، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه، زمان واجذب: ۱۰ دقیقه، غلظت نمک: ۲۰ درصد) تهیه شد [۳۹].

برای واجذب آنالیت، آزمایش‌ها در زمان‌های ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه (در یا خارج از حمام فراصوت) انجام شد. همان‌طور که در شکل VI اطلاعات تکمیلی، مشاهده می‌شود، امواج فراصوت هیچ اثر قابل توجهی در واجذب آنالیت ندارد. براساس نتایج، در آزمایش‌های بعدی، واجذب به مدت ۵ دقیقه و خارج از حمام فراصوت انجام شد. زمان لازم برای استخراج آنالیت از محلول به فیلم با استفاده از زمان‌های استخراج ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه بهینه‌سازی شد. نتایج شکل VII اطلاعات تکمیلی نشان داد که سیگنال تجزیه‌ای بعد از مدت ۵۰ دقیقه به حالت تعادل می‌رسد؛ اما به دلیل تفاوت کم در کارایی استخراج بین ۳۰ و ۵۰ دقیقه، برای کاهش زمان آنالیز، ۳۰ دقیقه به‌عنوان زمان استخراج انتخاب شد.

تأثیر pH نمونه بر کارایی استخراج در pH‌های بین ۴ تا ۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به ماهیت اصلی آنالیت (۱۰/۴  $\text{pKa}$ )، در pH‌های زیر ۱۰ به شکل خنثی وجود دارد. همان‌طور که در شکل VIII اطلاعات تکمیلی مشاهده می‌شود، کارایی استخراج در pH بین ۴ تا ۸ به‌طور تقریبی یکسان بود، از آنجایی که آنالیت در این pH‌ها به شکل خنثی است، گروه هیدروکسیل آنالیت می‌تواند با گروه‌های هیدروکسیل و آمین جاذب، تعامل کند. به نظر می‌رسد پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های واندروالسی بین

حلال شستشو به غلظت آن در محلول نمونه محاسبه شد که برابر با ۱۵ بود. مقایسه نتایج اندازه‌گیری روش موجود با روش‌های استخراجی مبتنی بر جاذب برای تعیین ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول در نمونه‌های آب در جدول (۱) نشان داده شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، حد تشخیص و دقت روش با بیشتر روش‌ها قابل مقایسه بود. از سوی دیگر، در روش موجود، از حجم کم حلال واجدبی استفاده شد و زمان استخراج به نسبت کم بود. در همین حال، جاذب، یک ماده زیست سازگار بود که با استفاده از روش سبز یک مرحله‌ای، تهیه و از هیچ معرف سمی برای سنتز جاذب استفاده نشد. در مقایسه با روش‌های سنتی مانند استخراج فاز جامد<sup>۱۴</sup>، روش پیشنهادی به تجهیزات پیچیده (مانند پمپ) نیاز ندارد. از طرفی، مصرف حلال آلی سمی کمتر بود. در مقایسه با ریزاستخراج فاز جامد<sup>۱۵</sup> و استخراج جاذب میله چرخان<sup>۱۶</sup>، فیلم پیشنهادی با یک روش ساده و یک مرحله‌ای ساخته شد. به دلیل هندسه خاص TFME که از یک ورق صاف جاذب برای استخراج استفاده می‌کند، زمان اندازه‌گیری روش موجود کمتر از روش SPME است. برخلاف فیبر SPME، فیلم به دلیل روش تهیه آسان و کم هزینه می‌تواند یکبار مصرف باشد. بنابراین، مشکل اثر حافظه با استفاده از فیلم پیشنهادی حذف شد.

جاذب و آنالیت، نقش مهمی در سازوکار جذب دارند. هنگامی که pH نمونه افزایش یافت، شکل خنثی آنالیت به آنیونی تغییر و کارایی استخراج در pHهای ۱۰-۱۲ کاهش یافت.

### • اعتبارسنجی روش

شرایط بهینه برای به‌دست آوردن بیشینه مقدار حساسیت به شرح زیر بود:

- حجم محلول کیتوسان: ۱۵ mL
  - مقدار هالوسیت<sup>۱۳</sup>: ۱۵ درصد (وزنی/وزنی)؛
  - غلظت نمک:  $0.2 \text{ g mL}^{-1}$ ؛
  - حلال واجذب: ۱۱۰  $\mu\text{L}$  متانول؛
  - زمان واجذب: ۵ دقیقه؛
  - زمان استخراج: ۳۰ دقیقه.
- محدوده خطی پویای روش، در شرایط بهینه  $10^{-1} - 50/0$  بود. حد کمی‌سازی و حد تشخیص (براساس نسبت سیگنال به نویز ۱۰ و ۳ محاسبه شد) به ترتیب  $1 \mu\text{g/L}$  و  $0.4 \mu\text{g/L}$  بود. تکرارپذیری روش برای سه استخراج تکراری در غلظت  $10, 9 \mu\text{g/L}$  درصد بود. ضریب غنی‌سازی روش براساس نسبت غلظت آنالیت در

جدول (۱): مقایسه روش ارائه شده با سایر روش‌های استخراج فاز جامد برای تعیین ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول.

روش اندازه‌گیری	نمونه واقعی	دقت و درستی (%)	حد تشخیص ( $\mu\text{g/L}$ )	حجم واجذب ( $\mu\text{L}$ )	زمان استخراج (دقیقه)	مراجع
SBSE/HPLC-UV <sup>۱۷</sup>	آب رودخانه، دریاچه و استخر ماهی	۷	۰/۳۵	۱۰۰	۳۰	[۳۲]
SPME/HPLC-UV	فاضلاب و رودخانه	۹	۰/۴	-	۴۵	[۳۳]
SBSE/HPLC-DAD <sup>۱۸</sup>	ادرار و آب سطحی	۷/۶	۱/۰	۱۵۰۰	۱۲۰	[۳۴]
FPSE <sup>۱۹</sup> / HPLC-FLD <sup>۲۰</sup>	آب آشامیدنی، رودخانه، زیرزمینی و ادرار	۲	۰/۰۳۶	۵۰۰	۲۰	[۳۵]
SPME/HPLC-UV	آب دریاچه و شیر آب	۸/۳	۰/۵	۳۰	۶۰	[۳۶]
MIPSPÉ <sup>۲۱</sup> / HPLC-FLD	فاضلاب	۱۰>	۰/۴۵	۱۵۰۰	-	[۳۷]
SPE/HPLC-FLD	آب زیرزمینی، آشامیدنی و رودخانه	۱۳/۳	۰/۶۵	۲۰۰۰	-	[۳۸]
TFME/HPLC-FLD	فاضلاب، شیر آب و رودخانه	۹	۰/۴	۱۱۰	۳۰	مقاله حاضر

جدول (۲): نتایج به دست آمده برای آنالیز نمونه واقعی.

نمونه	میزان اندازه گیری شده در نمونه واقعی (µg/L)	میزان اضافه شده (µg/L)	مقدار اندازه گیری شده بعد از تغلیظ (µg/L)	بازیابی (درصد)
آب رودخانه	ND <sup>۲۲</sup>	۲/۰ ۱۰	۲/۱۲ (± ۰/۱۱) <sup>۲۳</sup> ۸/۳ (± ۰/۵۸)	۱۰۶ ۸۳
آب فاضلاب	ND	۲/۰ ۱۰	۱/۳۴ (± ۰/۱۲) ۸/۵ (± ۰/۶۸)	۶۷ ۸۵
آب لوله کشی	ND	۲/۰ ۱۰	۲/۰۲ (± ۰/۱۱) ۹/۶ (± ۰/۳۸)	۱۰۱ ۹۶

### • اندازه گیری نمونه واقعی

سه نمونه مختلف آب (آب رودخانه، فاضلاب و آب لوله کشی) با استفاده از روش حاضر (ریزاستخراج فیلم نازک با کامپوزیت کیتوسان/هالوسیت) مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیت در نمونه‌ها شناسایی نشد. نمونه‌ها با آنالیت در دو سطح غلظت (۱۰ و ۲ µg/L) تغلیظ شدند.

نتایج اندازه گیری نمونه واقعی در جدول (۲) نشان داده شده است. بازیابی براساس نسبت غلظت اندازه گیری شده آنالیت در نمونه واقعی پس از تغلیظ (C) به غلظت محاسباتی آنالیت در نمونه واقعی (C) اضافه شده محاسبه شد. بازیابی برای نمونه‌های واقعی بین ۶۷ تا ۱۰۶ درصد بود. بازیابی کم به دست آمده برای برخی از نمونه‌ها نشان داد که بافت نمونه اثر نامطلوب بر کمیت آنالیت دارد. اجزای بافت نمونه می‌توانند مکان‌های فعال جاذب را اشغال کنند و بر بازیابی روش تأثیر منفی بگذارند. بنابراین، برای به دست آوردن نتایج دقیق و حذف اثر ماتریس نمونه، باید روش افزایش استاندارد برای اندازه گیری آنالیت استفاده شود.

### پی‌نوشت

- Thin-film microextraction (TFME)
- Solid phase microextraction (SPME)
- Silicon Dioxide (SiO<sub>2</sub>)
- Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)
- High-performance liquid chromatography (HPLC)
- Quanta™, 450
- Jasco-FTIR-350
- X'pert Eindhoven
- Belsorp-mini II, BEL
- Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)
- Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)
- BET (Brunauer-Emmett-Teller)
- halloysite
- Solid Phase Extraction (SPE)
- Solid Phase Microextraction (SPME)
- Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)
- High-Performance Liquid Chromatography Ultraviolet Spectrophotometry
- High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection
- fabric phase sorptive extraction
- high performance liquid chromatography-fluorescence detection
- Molecularly imprinted solid-phase extraction
- Not detected (ND)
- Standard deviation (±SD)

### نتیجه گیری

در این کار، یک فیلم نانوکامپوزیت زیستی جدید بر پایه کیتوسان و هالوسیت برای ریزاستخراج فیلم نازک (TFME) ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول تهیه شد. زیست‌پلیمر کیتوسان و هالوسیت، به‌عنوان ترکیبات کم هزینه، سازگار با محیط‌زیست و ترکیبات در دسترس، برای تهیه جاذب فیلم نازک انعطاف‌پذیر و ارزان قیمت استفاده شد. افزودن نانولوله‌های هالوسیت به پلیمر کیتوسان باعث افزایش پایداری مکانیکی و کارایی استخراج کامپوزیت می‌شود. مقایسه روش حاضر با برخی از روش‌های ریزاستخراج که در حال حاضر برای تعیین ۱۷-آلفا-اتینیل استرادیول استفاده می‌شود، نشان داد که نتایج اندازه گیری‌های به دست آمده در روش حاضر با سایرین قابل مقایسه است. علاوه بر این، جاذب مورد استفاده در این روش سازگار با محیط‌زیست بوده و روش تهیه آن آسان و کم هزینه است.

- [1] R. Jiang, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction offers another geometry for solid phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 39 (2012) 245–254.
- [2] Z. Qin, L. Bragg, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions, *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 89–95.
- [3] C. Ye, Y. Wu, Z. Wang, Modification of cellulose paper with polydopamine as a thin film microextraction phase for detection of nitrophenols in oil samples, *RSC Adv.* 6 (2016) 9066-9071.
- [4] H. Bagheri, A. Aghakhani, Polyaniline-nylon-6 electrospun nanofibers for head space adsorptive microextraction, *Anal. Chim. Acta* 713 (2012) 63–69.
- [5] Z. Ayazi, F.S. Esfahlan, Z.M. Khoshhesab, ZnO nanoparticles doped polyamide nanocomposite coated on cellulose paper as a novel sorbent for ultrasound-assisted thin film microextraction of organophosphorous pesticides in aqueous samples, *Anal. Methods* 10 (2018) 3043–3051.
- [6] H. Shigeyama, T. Wang, M. Ichinose, T. Ansai, S.-W. Lee, Identification of volatile metabolites in human saliva from patients with oral squamous cell carcinoma via zeolite-based thin-film microextraction coupled with GC–MS, *J. Chromatogr. B* 1104 (2019) 49–58.
- [7] N. Mehrafza, M. Saraji, Electrospun polyacrylonitrile-zeolite imidazolate framework-8 nanofibers for the thin-film microextraction of bisphenol A, *Sep. Sci. Plus* 1 (2018) 382–388.
- [8] F. Liu, H. Xu, Development of a novel polystyrene/metal-organic framework-199 electrospun nanofiber adsorbent for thin film microextraction of aldehydes in human urine, *Talanta* 162 (2017) 261–267.
- [9] M. Darvishnejad, H. Ebrahimzadeh, Halloysite nanotubes functionalized with a nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and polythiophene as a viable sorbent for the preconcentration of six organochlorine pesticides prior to their quantitation by GC/MS, *Microchim. Acta* 184 (2017) 3603–3612.
- [10] M.M. Abolghasemi, N. Arsalani, V. Yousefi, M. Arsalani, M. Piryaee, Fabrication of polyaniline-coated halloysite nanotubes by in situ chemical polymerization as a solid-phase microextraction coating for the analysis of volatile organic compounds in aqueous solutions, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 956–963.
- [11] Z. Qin, Y. Jiang, H. Piao, S. Tao, Y. Sun, X. Wang, P. Ma, D. Song, Packed hybrids of gold nanoparticles and halloysite nanotubes for dispersive solid phase extraction of triazine herbicides, and their subsequent determination by HPLC, *Microchim. Acta* 186 (2019) 489.
- [12] M. Fizir, L. Wei, N. Muchuan, A. Itatahine, Y.A. mehdi, H. He, P. Dramou, QbD approach by computer aided design and response surface methodology for molecularly imprinted polymer based on magnetic halloysite nanotubes for extraction of norfloxacin from real samples, *Talanta* 184 (2018) 266–276.
- [13] Y. Lvov, W. Wang, L. Zhang, R. Fakhruddin, Halloysite clay nanotubes for loading and sustained release of functional compounds, *Adv. Mater.* 28 (2016) 1227–1250.
- [14] J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I.C. Kwon, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 28–41.
- [15] A. Ghace, M. Shariaty-Niassar, J. Barzin, A. Ismail, Chitosan/polyethersulfone composite nanofiltration membrane for industrial wastewater treatment, *IJNN* 9 (2013) 213–220.
- [16] P. Hou, C. Shi, L. Wu, X. Hou, Chitosan/hydroxyapatite/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic composite for metal-complex dye AY220 removal: recyclable metal-promoted Fenton-like degradation, *Microchem. J.* 128 (2016) 218–225.
- [17] A. Padilla-Rodríguez, J.A. Hernández-Viezcas, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea Torresdey, O. Perales-Pérez, F.R. Román-Velázquez, Synthesis of protonated chitosan flakes for the removal of vanadium (III, IV and V) oxyanions from aqueous solutions, *Microchem. J.* 118 (2015) 1–11.
- [18] M.M. Naim, H.E.M. Abdel Razeq, Chelation and permeation of heavy metals using affinity membranes from cellulose acetate–chitosan blends, *Desalin. Water Treat.* 51 (2013) 644–657.
- [19] Y.L. Liu, Y.H. Su, J.Y. Lai, In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan–silica hybrid membranes with using  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxysilane as a crosslinking agent, *Polymer* 45 (2004) 6831–6837.
- [20] M.M.A. Nikje, Z.M. Tehrani, Novel hybrid membranes based on chitosan and organically modified nano-

SiO<sub>2</sub>, Des. Monomers Polym. 12 (2009) 315–322.

[21] Y. Tao, J. Pan, S. Yan, B. Tang, L. Zhu, Tensile strength optimization and char acterization of chitosan/TiO<sub>2</sub> hybrid film, Mater. Sci. Eng. B 138 (2007) 84–89.

[22] J. Wang, X. Zheng, H. Wu, B. Zheng, Z. Jiang, X. Hao, B. Wang, Effect of zeolites on chitosan/zeolite hybrid membranes for direct methanol fuel cell, J. Power Sources 178 (2008) 9–19.

[23] R. Alizadeh, Chlorophenol's ultra-trace analysis in environmental samples by chit osan-zinc oxide nanorod composite as a novel coating for solid phase micro-extraction combined with high performance liquid chromatography, Talanta 146 (2016) 831–838.

[24] W.N. Wan Ibrahim, M.M. Sanagi, N.S.M. Hanapi, S. Kamaruzaman, N. Yahaya, W.A. Wan Ibrahim, Solid-phase microextraction based on an agarose-chitosan multiwalled carbon nanotube composite film combined with HPLC–UV for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous samples, J. Sep Sci. 41 (2018) 2942–2951.

[25] Q.G. Liao, D.G. Wang, L.G. Luo, Chitosan-poly (m-phenylenediamine)@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite for magnetic solid-phase extraction of polychlorinated biphenyls from water samples, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 7571–7579.

[26] S. Wu, C. Cai, J. Cheng, M. Cheng, H. Zhou, J. Deng, Polydopamine/dialdehyde starch/chitosan composite coating for in-tube solid-phase microextraction and in situ derivation to analysis of two liver cancer biomarkers in human blood, Anal. Chim. Acta 935 (2016) 113–120.

[27] L.Q. Peng, Q. Li, Y.-x. Chang, M. An, R. Yang, Z. Tan, J. Hao, J. Cao, J.J. Xu, S.S. Hu, Determination of natural phenols in olive fruits by chitosan assisted matrix solid phase dispersion microextraction and ultrahigh performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1456 (2016) 68–76.

[28] A.Z. Aris, A.S. Shamsuddin, S.M. Praveena, Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review, Environ. Int. 69 (2014) 104–119.

[29] R. De Silva, P. Pasbakhsh, K. Goh, S.-P. Chai, H. Ismail, Physico-chemical characterisation of chitosan/halloysite composite membranes, Polym. Test. 32 (2013) 265–271.

[30] M. Liu, Y. Zhang, C. Wu, S. Xiong, C. Zhou, Chitosan/halloysite nanotubes bionanocomposites: structure, mechanical properties and biocompatibility, Int. J. Biol. Macromol. 51 (2012) 566–575.

[31] M. Liu, Ch. Wu, Y. Jiao, Sh. Xiong, Ch. Zhou, Chitosan–halloysite nanotubes nanocomposite scaffolds for tissue engineering, J. Mater. Chem. B 1 (2013) 2078–2089.

[32] C. Hu, M. He, B. Chen, C. Zhong, B. Hu, Polydimethylsiloxane/metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled to high performance liquid chromatography-ultraviolet detector for the determination of estrogens in environmental water samples, J. Chromatogr. A 1310 (2013) 21–30.

[33] A. Penalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. Marcé, Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electro chemical detection to determine estrogenic compounds in water samples, J. Chromatogr. A 964 (2002) 153–160.

[34] C. Almeida, J. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1303–1311.

[35] R. Kumar, A.K. Malik, A. Kabir, K.G. Furton, Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection, J. Chromatogr. A 1359 (2014) 16–25.

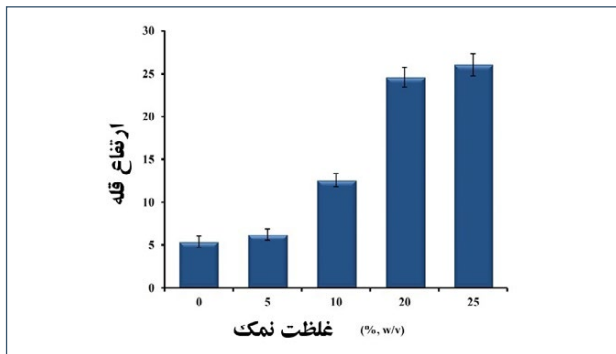
[36] H. Yu, J. Merib, J.L. Anderson, Crosslinked polymeric ionic liquids as solid-phase microextraction sorbent coatings for high performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1438 (2016) 10–21.

[37] R. Guedes-Alonso, S. Santana-Viera, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and fluorescence detection for the determination of estrogens and their metabolites in wastewater, J. Sep. Sci. 38 (2015) 3961–3968.

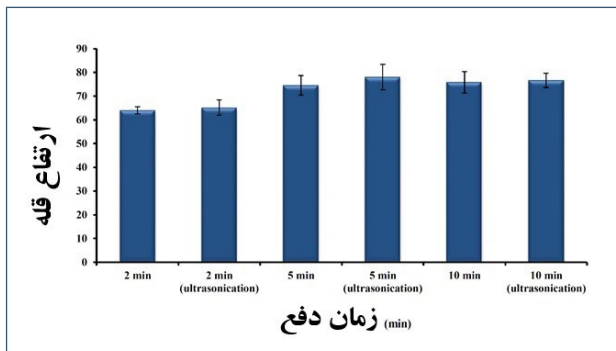
[38] S.M. Melo, N.M. Brito, Analysis and occurrence of endocrine disruptors in Brazilian water by HPLC-fluorescence detection, Water Air Soil Pollut. 225 (2014) 1783.

[39] M. Saraji, et al. Microchemical Journal 150 (2019) 104171

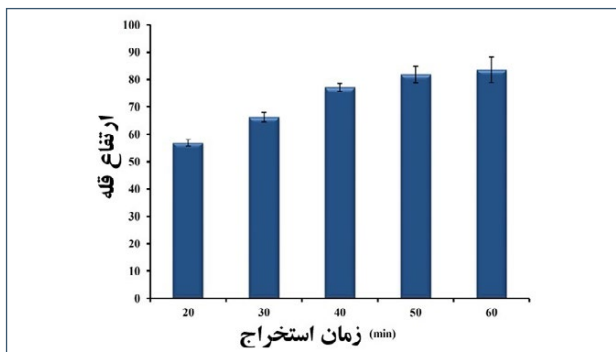




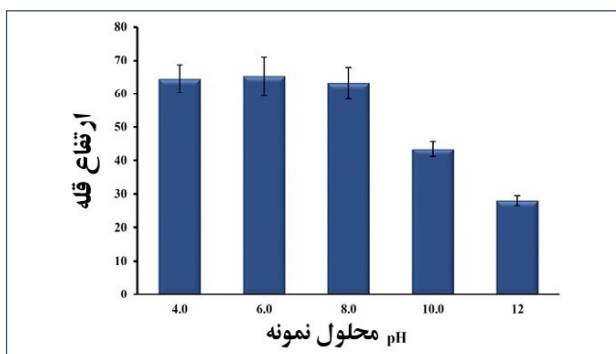
شکل (V): تاثیر غلظت نمک روی کارایی استخراج. فیلم با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۱ درصد وزنی/وزنی) حاوی ۰/۳ گرم کیتوسان و ۰/۴۵ گرم از هالوسیت (مقدار از هالوسیت: ۱۵ درصد وزنی/وزنی)، مقدار کیتوسان: ۰/۳ گرم، حلال شویش: متانول، حجم حلال شویش: ۲۵۰ میکرولیتر، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه، زمان واجذب: ۱۰ دقیقه تهیه شد.



شکل (VI): تاثیر زمان واجذب روی کارایی استخراج. فیلم با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۱ درصد وزنی/وزنی) حاوی ۰/۳ گرم کیتوسان و ۰/۴۵ گرم هالوسیت (حلال شویش: متانول، حجم حلال شویش: ۱۱۰ میکرولیتر، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه، غلظت نمک: ۲۰ درصد) تهیه شد.

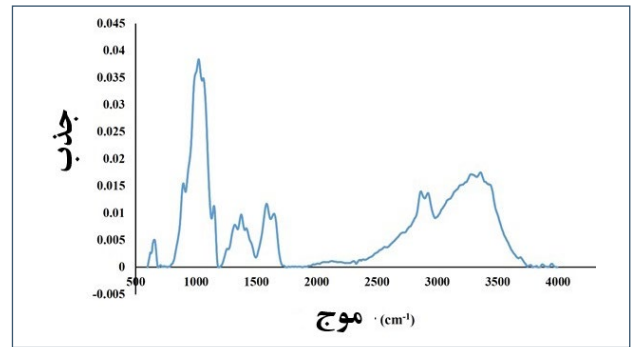


شکل (VII): تاثیر زمان استخراج روی کارایی استخراج. فیلم با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۱ درصد وزنی/وزنی) حاوی ۰/۳ گرم کیتوسان و ۰/۴۵ گرم هالوسیت (حلال شویش: متانول، حجم حلال شویش: ۱۱۰ میکرولیتر، زمان واجذب: ۵ دقیقه، غلظت نمک: ۲۰ درصد) تهیه شد.

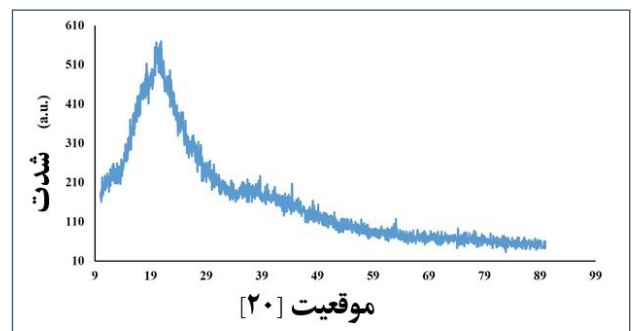


شکل (VIII): تاثیر pH محلول نمونه روی کارایی استخراج. فیلم با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۱ درصد وزنی/وزنی) حاوی ۰/۳ گرم کیتوسان و ۰/۴۵ گرم هالوسیت (حلال شویش: متانول، حجم حلال شویش: ۱۱۰ میکرولیتر، زمان واجذب: ۵ دقیقه، زمان استخراج: ۳۰ دقیقه، غلظت نمک: ۲۰ درصد) تهیه شد.

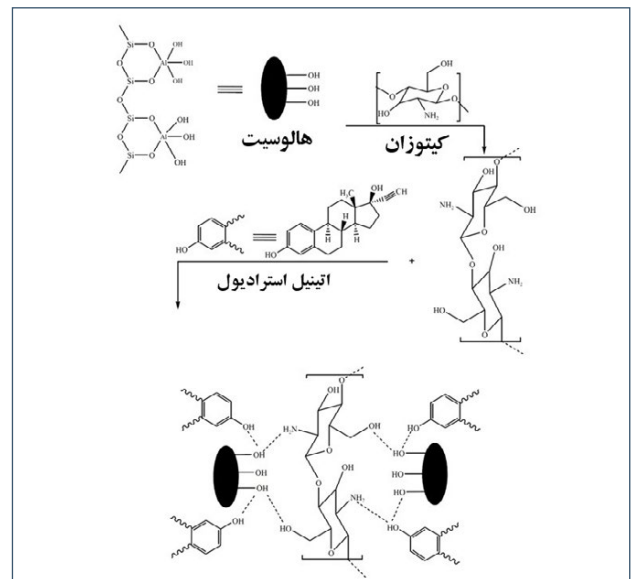
## اشکال اطلاعات تکمیلی



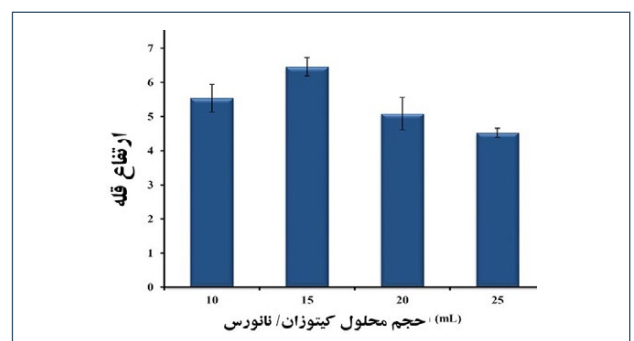
شکل (I): طیف FT-IR فیلم هالوسیت-کیتوسان.



شکل (II): الگوی XRD فیلم هالوسیت-کیتوسان.



شکل (III): نمایی از نمودار برهم کنش بین آنالیت و جاذب.



شکل (IV): اثر حجم محلول کیتوسان-هالوسیت مورد استفاده برای تهیه فیلم جاذب بر کارایی استخراج. محلول کیتوسان/هالوسیت حاوی ۲ گرم کیتوسان و ۰/۳ گرم هالوسیت در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استیک اسید (۱ درصد حلال شویش: متانول، حجم حلال شویش: ۲۵۰ میکرولیتر، زمان استخراج: ۴۰ دقیقه و زمان واجذب: ۱۰ دقیقه).

## نویسندگان

فریده باتقوا<sup>۱\*</sup>حمید حیدری<sup>۲</sup>

۱. دکترای شیمی تجزیه، کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی

اکسیر تجهیز آزما

۲. عضو کارگروه کروماتوگرافی

\*exirtajhizazma@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۲

## کالیبراسیون مرتبه بالا و آنالیز داده‌ها در کروماتوگرافی

## چکیده

با توسعه سریع ابزارهای کروماتوگرافی چند کاناله، آنالیز داده‌های چندتایی و کالیبراسیون تانسوری، مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. با ترکیب روش‌های

کروماتوگرافی و کمومتری کس مبتنی بر روش‌های کالیبراسیون مرتبه بالا، برخی از مشکلات گذشته در آنالیز، به‌عنوان مثال، مراحل آماده‌سازی پیچیده، زمان‌های شستشوی طولانی و یا حتی نتایج آنالیز اشتباه، قابل اجتناب/بهبود هستند. این مقاله یک نمای کلی از داده‌های مرتبه دوم تا سوم را ارائه می‌کند که نظریه‌ها و کاربردها را همراه با پردازش داده‌های مربوطه در کروماتوگرافی پوشش می‌دهد.

## واژه‌های کلیدی

کمومتری، مدل سه گانه، کروماتوگرافی مایع-اشکارسازی آرایه دیودی، کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی.

## مقدمه

کمومتری را می‌توان به‌عنوان استفاده از روش‌های ریاضی و یا آماری برای آنالیز شیمیایی تعریف کرد. در کمومتری نیز مانند هر مدلی در ریاضیات، نیاز به استفاده از اعداد به‌دست آمده از مقادیر اندازه‌گیری شده متغیرهای شیمیایی وجود دارد [۱ و ۲]. برای شیمی تجزیه، تعداد زیادی روش ابزاری وجود دارد که مزایای خاصی برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها و یا ماتریس‌های خاص دارند. از این رو، می‌توان به روش‌های طیف‌سنجی (مادون قرمز، فرابنفش مرئی، اشعه ایکس و غیره)، طیف‌سنجی جرمی، کروماتوگرافی، الکتروشیمیایی و حرارتی و روش‌های ترکیبی اشاره کرد [۳ و ۴]. پیشرفت‌ها در الکترونیک و پردازش داده‌ها به کمک رایانه، ابزار قدرتمندی را فراهم کرده است که اطلاعاتی بیش از آنچه که با استفاده از روش‌های قدیمی تجزیه و تحلیل داده‌ها قابل آنالیز باشد، به‌دست می‌آورند. بنابراین، در این مرحله، کمومتری به‌عنوان انتخاب ارجح، برای آنالیز این داده‌های پیچیده به نظر می‌رسد. از این رو، در این مقاله به معرفی این موضوع می‌پردازیم.

## معرفی

کروماتوگرافی شامل روش‌های جداسازی براساس تقسیم آنالیت‌ها بین فاز متحرک و فاز ثابت است. به دلیل حساسیت، گزینش‌پذیری و تکرارپذیری بالا، از کروماتوگرافی به‌طور گسترده در صنایع غذایی، علوم دارویی و فناوری محصولات طبیعی استفاده می‌شود. تنوع روش‌های کروماتوگرافی، امکان آنالیز طیف وسیعی از متابولیت‌ها، گازهای آلیفاتیک با وزن مولکولی کم تا مواد پلیمری پیچیده با وزن مولکولی بالا را فراهم می‌کند.

تاکنون روش‌های کروماتوگرافی زیادی توسعه یافته‌اند و می‌توان آن‌ها را براساس ویژگی‌های مختلف طبقه‌بندی کرد. براساس یک نوع تقسیم‌بندی، می‌توان آن‌ها را به کروماتوگرافی ستونی و کروماتوگرافی مسطح تقسیم نمود. همچنین کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع براساس حالت فیزیکی فاز متحرک طبقه‌بندی می‌شوند. علاوه بر این، دسته‌های بسیار دیگری نیز وجود دارند که با ویژگی‌های دیگر (به‌عنوان مثال، سازوکار جداسازی، روش‌های خاص) طبقه‌بندی می‌شوند. در هر صورت، طبقه‌بندی کروماتوگرافی خارج از محدوده این مقاله است.

هدف از کروماتوگرافی، جداسازی اجزای یک مخلوط است. این مخلوط در سیالی به نام فاز متحرک که آن را از طریق ساختاری که ماده دیگری به نام فاز ساکن را در خود نگه می‌دارد، حل می‌شود. جداسازی براساس تقسیم تقاضی بین فاز متحرک و ثابت انجام می‌شود. تفاوت‌های جزئی در ضریب تقسیم یک ترکیب، منجر به باقی ماندن در فاز ثابت می‌شود که بر جداسازی تأثیرگذار است.

امروزه به دلیل ویژگی جداسازی منحصر به فرد، روش‌های کروماتوگرافی به ابزاری ضروری برای آنالیز و تحقیقات معمول در صنایع دارویی، زیست‌پزشکی، غذایی و محیطی تبدیل شده‌اند. با این حال، دو ایراد اصلی وجود دارد که باید برطرف شوند / بهبود یابند. مورد اول در مورد خود نمونه است. هنگامی که نمونه‌های ماتریس پیچیده آنالیز می‌شوند، برخی از روش‌های پیش آماده‌سازی خسته‌کننده اما مناسب همچون استخراج و خالص‌سازی، برای حذف تداخل‌های بالقوه موجود در ماتریس‌های پیچیده ضروری هستند. بهینه‌سازی این روش‌ها به نسبت خسته‌کننده بوده و استفاده از حجم زیادی از مصرف حلال‌ها اجتناب‌ناپذیر است که این روش را غیراقتصادی و ناسازگار با محیط‌زیست می‌کند. علاوه بر این، در آنالیزهای کروماتوگرافی قدیمی، هنگامی که یک نمونه پیچیده آنالیز می‌شود، همپوشانی بین آنالیت‌ها و اجزای ماتریس بیشتر مشاهده می‌شود؛ در نتیجه، زمان طولانی یا شرایط کروماتوگرافی بسیار پیچیده‌تر برای جداسازی مورد نیاز است. به‌طور کلی، زمان شویش برای هر نمونه اغلب ۳۰ تا ۵۰ دقیقه طول می‌کشد که بسیار زمان‌بر و ناکارآمد است. در عین حال، برخی مشکلات دیگر مانند رانش خط پایه،

تغییر در شکل پیک‌ها، استخراج ناقص آنالیت‌ها و جابجایی در زمان شویش نیز ممکن است کیفیت نتیجه نهایی آنالیز را کاهش دهد. مشکل دیگر کروماتوگرافی به دلیل جنبه جهانی آن است. در حال حاضر صدها ستون کروماتوگرافی مختلف وجود دارد که می‌توان آن‌ها را از بازار تهیه کرد و ستون‌های جدید به‌طور دائم در حال توسعه هستند. با این حال، هنگامی که با تعداد زیادی از ستون‌های احتمالی مواجه می‌شویم، برای کارشناسان دشوار است که مناسب‌ترین ستون برای یک شرایط خاص را انتخاب کنند. در همین حال، بسیاری از آزمایشگاه‌ها و مؤسسات عمومی ممکن است تمام فازهای ثابت موجود را نداشته باشند و عملکرد ستون ممکن است در طول زمان و نگهداری طولانی‌مدت و یا استفاده در آنالیزهای مداوم بدتر شود [۴]. بنابراین، کارشناسان اغلب، زمان زیادی را در جستجوی مناسب‌ترین ستون از چندین فاز ثابت مختلف برای تحلیل تلف می‌کنند. همه کاستی‌های فوق ممکن است مانع از توسعه بیشتر کاربردهای کروماتوگرافی شود.

یکی از روش‌های فعلی در آنالیز کمی، اجتناب از مراحل خسته‌کننده آماده‌سازی نمونه و شویش‌های طولانی کروماتوگرافی، بهره‌برداری از توانایی ابزارهای پردازش داده مدرن با استفاده از تفکیک ریاضی اجزای هم شویش<sup>۱</sup> است [۵]. ترکیب ابزارهای کمومتری مناسب همراه با داده‌های طیفی کروماتوگرافی و یا داده‌های گرمی کروماتوگرافی ممکن است مشکل را حل کند / بهبود دهد. با صرف زمان کمتر و مصرف حلال کمتر می‌توان نتایج کمی بهتری به‌دست آورد. کالیبراسیون چند مرتبه (مرتبه دوم و سوم) براساس «جداسازی ریاضی» روشی ارزشمند در زمینه آنالیز شیمیایی است که می‌تواند تداخلات بالقوه را کالیبره کند و پیک‌های هم شویش را با موفقیت در نمونه‌های واقعی با حداقل مراحل آماده‌سازی نمونه حل کند. همچنین پروفایل غلظت دقیق اجزای مورد نظر را نیز می‌توان به‌دست آورد. به‌طور کلی، این ویژگی به «مزیت مرتبه دوم» اشاره می‌کند که پتانسیل بسیار زیادی در آنالیز چند مرتبه دارد که اخیراً به کانون تحقیقات نظری و کاربردهای عملی تبدیل شده‌است. ترکیب کروماتوگرافی با کالیبراسیون مرتبه بالاتر، دارای مزایایی است. از جمله می‌تواند مراحل آماده‌سازی خسته‌کننده چند مرحله‌ای و جستجوی شرایط پیچیده جداسازی بهینه در کروماتوگرافی را ساده کند و توانایی‌های بالقوه را برای آنالیز نمونه‌های مختلف با تداخل‌های مختلف در یک زمان نشان دهد. روش‌های آماده‌سازی خسته‌کننده را می‌توان با استفاده از «جداسازی ریاضی» به جای روش‌های قدیمی‌تر «جداسازی فیزیکی/شیمیایی» جایگزین کرد. روش کروماتوگرافی مایع همراه با روش‌های مرتبه دوم کالیبراسیون نیز محبوب است چرا که می‌تواند به سرعت و به‌طور هم‌زمان چندین ترکیب را در پس زمینه‌های پیچیده با تداخل‌های ناشناخته تعیین و پیک‌های هم شویش را جدا و انحرافات خطوط پایه را حذف کند [۶].

طرفه، سه طرفه، چهار طرفه و N-طرفه مربوطه را ایجاد کنند. کالیبراسیون تانسور مرتبه صفر به‌عنوان کالیبراسیون تک متغیره نیز نامیده می‌شود. روش کالیبراسیون تک متغیره، دارای محدودیت‌هایی در کاربرد آن است زیرا به گزینش پذیری کامل برای سیگنال‌های آنالیت‌های هدف نیاز دارد. به جز کالیبراسیون تک متغیره برای آنالیز داده‌ها، سایر کالیبراسیون‌ها به‌عنوان کالیبراسیون چند متغیره شناخته می‌شوند. آنالیز تانسور مرتبه دوم و تانسور مرتبه بالاتر به‌عنوان کالیبراسیون چند متغیره یا چند جزئی نشان داده می‌شود.

علاوه‌بر این، شرح مفصلی برای انواع مختلف نمونه نیز ارائه شده‌است. براساس توابع مختلف، نمونه‌ها را می‌توان به کالیبراسیون، پیش‌بینی و مجموعه‌های واقعی<sup>۷</sup> تقسیم کرد. مجموعه‌های واقعی شامل نمونه‌های پیش‌بینی شده (شامل آنالیت‌های) هدف) و یا نمونه‌های واقعی (اعم از اینکه شامل آنالیت‌های) هدف یا ناشناخته باشند) هستند. اجزای موجود در نمونه‌های مورد استفاده برای کالیبراسیون و اعتبارسنجی به‌طور معمول، «معلوم<sup>۸</sup>» و یا «مورد انتظار<sup>۹</sup>» نامیده می‌شوند، که در این مجموعه‌ها انتظار می‌رود در نمونه‌های واقعی وجود داشته باشند. اجزای مورد انتظار را می‌توان بیشتر به «کالیبره شده» و «کالیبره نشده» تقسیم کرد. غلظت‌های اولیه مورد استفاده برای کالیبراسیون، از قبل طراحی شده و معلوم است؛ در حالی که اجزای «کالیبره شده» در مجموعه‌های واقعی نیز می‌تواند در دسترس باشد که شامل آنالیت‌های) مورد نظر می‌شود. از سوی دیگر، اجزایی که فقط در مجموعه‌های واقعی هستند، «ناشناخته<sup>۱۰</sup>» و یا «غیر منتظره<sup>۱۱</sup>» و همچنین تداخل‌های بالقوه نامیده می‌شوند.

## تئوری

### • مدل‌های چند خطی

با توجه به نوع داده و ویژگی تقارن چرخه‌ای داخلی آن، مدل‌های چند خطی را می‌توان به مدل‌های سه خطی<sup>۱۲</sup>، چهار خطی<sup>۱۳</sup>، پنج خطی<sup>۱۴</sup> و حتی خطی بالاتر تقسیم کرد. در آنالیز کروماتوگرافی همراه با کالیبراسیون چند راهه، به‌طور معمول از مدل‌های سه خطی و چهار خطی استفاده می‌شود.

هارشمن [۹] همراه با کارول و چانگ [۱۰] برای اولین بار مدل آنالیز فاکتور مشابه<sup>۱۵</sup> را در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد کردند. در این مدل سه خطی، هر عنصر  $(X_{ijk})$  شامل یک آرایه سه طرفه با ارزش واقعی  $X(IJKL)$  است. در مدل چهار خطی از آرایه داده چهار طرفه با ارزش واقعی  $X(IJKL)$ ، که در آن، هر عنصر  $(X_{ijkl})$  را می‌توان بیان کرد.

تاکنون الگوریتم‌های زیادی برای تجزیه آرایه‌های داده‌های چند مرتبه پیشنهاد شده‌اند که ابزارهای جایگزینی برای شیمی دانان تجزیه به‌منظور مطالعه راحت بدنه آرایه‌های داده چند مرتبه ارائه کرده‌اند. چندین روش نیز در «دانشنامه شیمی تحلیلی» [۷] و «تحلیل عاملی در شیمی» [۸] به‌طور مفصل توضیح داده شده‌است. در این مقاله نیز مروری بر مدل‌های چند خطی، ویژگی تقارن چرخه‌ای چند مرتبه، الگوریتم‌های کالیبراسیون چند مرتبه، تخمین رتبه شیمیایی، جعبه ابزار برای کالیبراسیون چند مرتبه و سایر مسائل و کاربردهای اساسی در کروماتوگرافی برای کمک به خوانندگان در درک سیستمی و فشرده در مورد الگوریتم‌ها ارائه شده‌است.

### اصطلاحات و نامگذاری در داده‌های چند مرتبه

برای تسهیل درک خوانندگان در هنگام برخورد با آنالیز چند متغیره در آرایه‌های داده چند مرتبه، لازم است اصطلاحات و نامگذاری مورد استفاده در داده‌های چند مرتبه معرفی شود.

مرتبه صفر<sup>۲</sup> مربوط به ابزارهایی است که در هر نمونه، یک پاسخ واحد تولید می‌کنند؛ به‌عنوان مثال، خوانش داده‌های یک pH متر یا مقدار جذب در یک طول موج. داده‌های مرتبه اول به‌عنوان یک بردار مرتبه اول برای یک نمونه منفرد، مانند طیف‌های UV، فلورسانس، مادون قرمز و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای مرتب می‌شوند. داده‌های مرتبه دوم زمانی تشکیل می‌شوند که داده‌های ماتریسی را بتوان برای یک نمونه به‌دست آورد. دو راه برای دستیابی به داده‌های مرتبه دوم وجود دارد:

۱. استفاده از یک ابزار منفرد؛ به‌عنوان مثال، طیف‌سنج تهیه‌شده<sup>۳</sup> و یا طیف‌سنج آرایه دیود برای بررسی سینتیک یک واکنش شیمیایی.
۲. استفاده از ابزارهای کوپل شده مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - تشخیص آرایه فتودیود<sup>۴</sup> و یا کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی<sup>۵</sup>.

هنگامی که داده‌های مرتبه دوم که از یک سری نمونه به‌دست آمد، کالیبراسیون مرتبه بالا و آنالیز داده‌ها در کروماتوگرافی (نمونه‌های کالیبراسیون و نمونه‌های پیش‌بینی<sup>۶</sup>) در یک جهت روی هم چیده می‌شوند، آرایه سه بعدی که به آن آرایه سه طرفه نیز گفته می‌شود، می‌تواند به‌دست آید و داده‌های مربوطه به‌طور معمول به‌عنوان داده‌های سه طرفه شناخته می‌شوند. بنابراین، یک سری نمونه در یک ردیف، به‌عنوان مرتبه صفر (اسکالر)، مرتبه اول (بردار)، مرتبه دوم (ماتریس)، مرتبه سوم (آرایه سه طرفه) و تانسورهای مرتبه بالاتر قرار می‌گیرند که می‌توانند به ترتیب مجموعه داده‌های یک طرفه، دو

## برخی مسائل اساسی مرتبط

### روش هم‌ترازی پیک<sup>۱۹</sup> کروماتوگرافی

هم‌ترازی پیک کروماتوگرافی، چالشی در زمینه آنالیز سیستم‌های پیچیده با روش‌های کالیبراسیون چند راهه است. چندین روش برای هم‌ترازی پیک، براساس ابزارهای مرتبه دوم که داده‌های ماتریسی را برای هر نمونه تولید می‌کنند، توسعه یافته‌اند. این روش‌ها به‌عنوان مثال، شامل کمینه‌سازی مرتبه‌ای<sup>۲۰</sup>، هم‌ترازی آنالیز عامل موازی<sup>۲۱</sup> و سایر روش‌هایی است که اخیراً پیشنهاد شده و مبتنی بر حداقل مربعات متناوب برای هم‌ترازی پیک‌های کروماتوگرافی است. این روش‌ها با هدف هم‌ترازی نواحی کروماتوگرافی موضعی است؛ از این رو، می‌توان نتایج رضایت‌بخشی را برای جابجایی‌های زمان بازداری در کل کروماتوگرام به‌دست آورد به‌گونه‌ای که بدون توجه به وجود تداخل‌های ناشناخته، به تراز زمانی دقیق دست یافت.

### انحراف پس‌زمینه<sup>۲۲</sup>

در آنالیز کروماتوگرافی، گاهی عوامل غیر سه خطی مانند انحراف پس‌زمینه به دلیل ترکیب شیب شوی و یا ماهیت ماتریس‌های پیچیده، اجتناب‌ناپذیر است که ممکن است منجر به نتایج آنالیز اشتباه با الگوریتم‌های کمومتری شود. آمیگو<sup>۲۳</sup> و همکارانش، در مقاله‌ای مروری، مدل‌های ریاضی مورد استفاده را خلاصه کرده‌اند که مثال معمول آن، روش‌های جداسازی منحنی چند متغیره<sup>۲۴</sup> است.

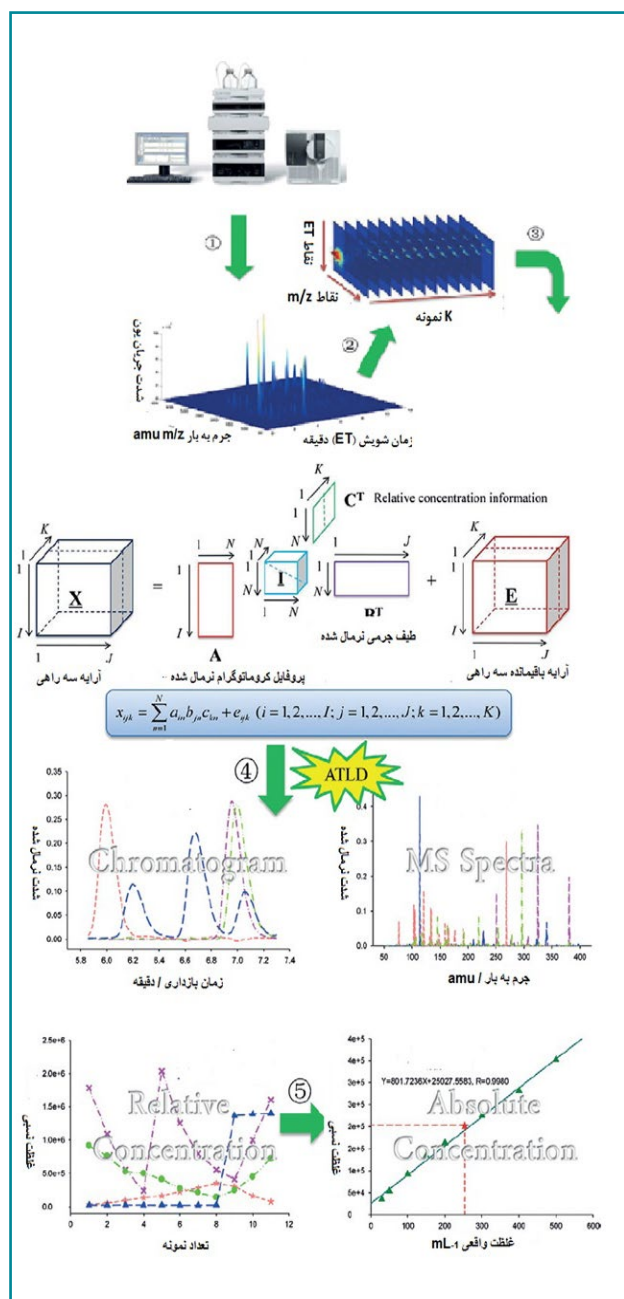
روش تصحیح انحراف پس‌زمینه در کروماتوگرافی در سال ۲۰۰۷ برای داده‌های کروماتوگرافی مایع با آشکارساز آرایه فوتودیودی<sup>۲۵</sup> ایجاد شد. ایده اصلی آن، انجام تجزیه سه خطی است که براساس الگوریتم تجزیه سه خطی متناوب<sup>۲۶</sup> برای داده‌های پاسخ دستگاه است. در آنالیز، انحراف پس‌زمینه را می‌توان با در نظر گرفتن آن به‌عنوان یک جزء یا عامل اضافی حذف کرد. در این روش از تجزیه سه خطی برای حل داده‌های خام، استخراج و کسر مؤلفه پس‌زمینه از داده‌های خام برای به‌دست آوردن سیگنال آنالیت‌ها با خط پایه صاف استفاده می‌شود.

## کاربرد

از آنجایی که روش‌های کمومتری دارای «مزایای مرتبه دوم یا مرتبه بالا» هستند، برخی از برنامه‌های کاربردی واقعی برای آنالیز داروها، ماتریس‌های زیستی، مواد غذایی، لوازم آرایشی، ماتریس‌های محیطی و غیره توسعه یافته‌اند. برای افزایش گزینش‌پذیری از الگوریتم‌های کالیبراسیون چند راهه استفاده شده‌است که می‌توان غلظت پیش‌بینی شده دقیق آنالیت‌ها (های) مورد نظر را بدون تداخل ماتریس تداخل بالقوه به‌دست آورد. این کاربردها به‌طور خلاصه در جدول (۱) نشان داده شده‌است که در آینده به‌طور مفصل به شرح آنها پرداخته می‌شود.

## پردازش داده

صحت تجزیه یک مدل چند خطی<sup>۱۶</sup> مستلزم آن است که مدل چند خطی، حالت چند خطی بودن را حفظ کند. با این حال، برخی از عوامل غیر چند خطی وجود دارد که می‌تواند باعث شود یک مدل چند خطی از حالت خود منحرف شود. به‌عنوان مثال، در نوع کروماتوگرافی مدل سه خطی<sup>۱۷</sup> مانند داده‌های HPLC-DAD و LC-MS، جابجایی زمان بازداری و مشکل خط زمینه<sup>۱۸</sup> در بین تزریق‌های مختلف باعث انحراف مدل سه خطی از حالت خود می‌شود. بنابراین، آرایه‌های داده در کالیبراسیون چند متغیره قبل از تجزیه چند خطی، به روش‌های پیش پردازش مناسب داده نیاز دارند. در شکل (۱) نمایی از کل برنامه آنالیز LC-MS با کمک کمومتری نشان داده شده‌است.



شکل (۱): نمایی از کل برنامه آنالیز LC-MS با کمک کمومتری [۱۰].

جدول (۱): مروری بر کاربردها [۱۰].

نوع داده	الگوریتم	آنالیت
صنایع دارویی		
HPLC-DAD	ATLD	پورارین و دیدزین
HPLC-DAD	ATLD	کاستونولید و دهیدروکاستوس لاکتون
HPLC-DAD	ATLD, SWATLD, AFR	ایزونیازید و پیرازینامید
ماتریس‌های زیستی		
HPLC-DAD	ATLD	یازده آنتی‌هایپرتنسیو
HPLC-DAD	ATLD	چهار بازدارنده تیروزین کیاناز
LC-MS	ATLD	شش معرف ضد دیابت
HPLC-DAD	ATLD	آلکالوئیدها
غذا		
HPLC-DAD	ATLD	شش رنگدانه سنتزی
HPLC-DAD	ATLD	آنتی‌اکسیدان‌های فنلی سنتزی
HPLC-DAD	ATLD	هشت فلاونوئید
HPLC-DAD	ATLD	نه پلی‌فنل
LC-MS	ATLD	ده مایکوتوکسین
ماتریس محیطی		
HPLC-DAD	SWATLD	سه آفت‌کش
HPLC	ATLD	۱-کلرو ۴۲ - دی‌نیتروبنزن و دی‌نیتروبنزوئیک اسید
HPLC	ATLD	پنج ایزومر دی‌متیل‌فنل
HPLC	ATLD	کاتچول و رزورسینول و هیدروکوینون

## نتیجه‌گیری

در این مقاله به روش‌ها و کاربردهای مختلف کمومتری چند راهه در کروماتوگرافی پرداخته و به چندین الگوریتم کالیبراسیون چند راهه اشاره شد. برخی از مسائل اساسی مربوط به آنالیز کروماتوگرافی مانند هم‌ترازی پیک و رانش پس‌زمینه نیز مورد بحث و بررسی قرار گرفت. با ترکیب روش‌های کروماتوگرافی با کمومتری مبتنی بر روش‌های کالیبراسیون چند راهه، می‌توان آماده‌سازی‌های پیچیده و خسته‌کننده نمونه را تا حد زیادی ساده کرد و از زمان‌های شوی‌ش طولانی کروماتوگرافی جلوگیری نمود. تمام کاربردهای ذکر شده جهانی، سریع و حساس برای تعیین انواع آنالیت در ماتریس‌های پیچیده هستند.

## پی‌نوشت

1. Coeluting
2. Zeroth Order
3. excitation-emission spectrofluorimeter (EEMs)
4. high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-DAD)
5. liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)
6. Predict samples
7. Real samples
8. Known
9. Expected
10. Unknown
11. Unexpected
12. Trilinear
13. Quadrilinear
14. Quinquelinear
15. Parallel factor analysis (PARAFAC )
16. Multilinear
17. Trilinear
18. Baseline
19. Peak alignment
20. Rank minimization (RM)
21. Parallel factor analysis alignment
22. Background drift
23. Amigo
24. Multivariate curve resolution (MCR)
25. Liquid chromatography photo diode array (LC DAD)
26. Alternating Trilinear Decomposition Algorithm (ATLD)

## مراجع

- [1] Yin XL, Wu HL, Gu HW, Hu Y, Wang L, Xia H, et al. Chemometrics-assisted high performance liquid chromatography-diode array detection strategy to solve varying interfering patterns from different chromatographic columns and sample matrices for beverage analysis. *Journal of Chromatography A*. 2016;1435:75-84.
- [2] Visky D, Haghedooren E, Dehouck P, Kovács Z, Kóczyán K, Noszá B, et al. Facilitated column selection in pharmaceutical analyses using a simple column classification system. *Journal of Chromatography A*. 2006;1101(1):103-114
- [3] Jandera P, Vyňuchalová K, Hájek T, Česla P, Vohralík G. Characterization of HPLC columns for two-dimensional LC-LC separations of phenolic acids and flavonoids. *Journal of Chemometrics*. 2008;22(3-4):203-217
- [4] Haghedooren E, Farkas E, Kerner Á, Dragovic S, Noszá B, Hoogmartens J, et al. Effect of long-term storage and use on the properties of reversed-phase liquid chromatographic columns. *Talanta*. 2008;76(1):172-182
- [5] Pérez RL, Escandar GM. Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments. *Environmental Pollution*. 2016;209:114-122.
- [6] Tan F, Tan C, Zhao A, Li M. Simultaneous determination of free amino acid content in tea infusions by using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection coupled with alternating penalty trilinear decomposition algorithm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(20):10839-10847
- [7] Fleming C, Kowalski B. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons Inc; 2000. pp. 9737-9764
- [8] Malinowski ER. *Factor Analysis in Chemistry*, 3rd Ed. *Technometrics*. 2002;36(1):180-181.
- [9] Harshman RA. Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an “explanatory” multi-model factor analysis. *Ucla Working Papers in Phonetics*. 1970;16
- [10] Carroll JD, Pruzansky S, Kruskal JB. CANDELINC: A general approach to multidimensional analysis

## نویسندگان

سید احمد ظهیر میردامادی<sup>۱\*</sup>روح‌الله کاشانکی<sup>۲</sup>، فرزانه زمانی<sup>۳</sup>

۱. کارشناسی ارشد مدیریت دولتی، پژوهشگاه مواد و انرژی
۲. دکترای شیمی تجزیه، پژوهشگاه مواد و انرژی
۳. کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، پژوهشگاه مواد و انرژی
۴. عضو کارگروه استاندارد و کالیبراسیون
۵. عضو کارگروه آنالیز عنصری

\*a.zmirdamadi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۳۰



## نقش پایگاه داده COMAR برای مواد مرجع

## واژه‌های کلیدی

پایگاه داده COMAR، آزمایشگاه، مواد مرجع.

## چکیده

پایگاه داده COMAR<sup>۱</sup> یک پایگاه داده جامع برای مواد مرجع است که نقشی اساسی در تضمین کیفیت و ایجاد قابلیت اطمینان برای مواد مرجع مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها ایفا می‌کند. این مقاله، به بررسی کلی پایگاه داده COMAR، اهمیت، قابلیت‌ها و مزایای آن برای آزمایشگاه‌ها و موسسات مرتبط می‌پردازد.

## مقدمه

گواهی‌های استاندارد، آزمایشگاه را ملزم می‌سازد با توجه به پیروی از اصول یکپارچه و قابل ردیابی، اقداماتی را برای پرداختن به خطر و فرصت، طرح‌ریزی و اجرا کند. مواد مرجع در تمامی مراحل اندازه‌گیری شامل صحت‌گذاری روش، کنترل کیفیت و کالیبراسیون به کار می‌روند؛ همچنین این مواد در مقایسات بین آزمایشگاهی به منظور صحت‌گذاری روش و ارزیابی مهارت آزمایشگاه کاربرد دارد. آزمایشگاه، شامل مجموعه‌ای از سخت‌افزارها، نرم‌افزارها، سرمایه انسانی متخصص، استانداردها و دستورالعمل‌های مرتبط است که در فضای فیزیکی مناسب و متناسب، برای انجام آزمون‌های علمی و تحقیقاتی، ایجاد و سازماندهی شده‌اند. پایگاه داده COMAR، پایگاهی جامع برای مواد مرجع است که نقش حیاتی در تضمین کیفیت و ایجاد قابلیت اعتماد نسبت به مواد مرجع استفاده شده در آزمایشگاه‌ها دارد. پایگاه داده COMAR به‌عنوان یک منبع ارزشمند برای آزمایشگاه‌ها، تأمین کنندگان و نظارت کنندگان در تضمین کیفیت و قابل اعتماد بودن مواد مرجع در سراسر جهان عمل می‌کند.



## □ شرح و تفسیر

آزمایشگاه‌ها به‌عنوان بخش خدماتی محسوب می‌شوند و به‌طور کلی، کیفیت خدمات عبارت است از قضاوت درک شده در نتیجه فرآیند ارزیابی که مشتریان انتظارات خود را با درکشان از خدمت دریافت شده مقایسه می‌کنند. به دلیل نامرعی بودن خدمات، توضیح آن برای تأمین‌کننده و ارزیابی آن از سوی مشتری سخت است. مهم‌ترین ویژگی در خدمات، فرآیند است و از ویژگی‌هایی چون تولید و مصرف به‌عنوان فرآیندهای هم‌زمان یاد می‌شود؛ هر چند مفهوم کیفیت همیشه در زندگی بشر مطرح بوده است ولی دانش کیفیت و مدیریت و کیفیت علمی به اوایل قرن گذشته بر می‌گردد. خدمت باید با کیفیت باشد، کیفیت هیچ معنا و مفهومی جز آنچه مشتری واقعا می‌خواهد ندارد. کیفیت باید به‌عنوان انطباق محصول با نیاز مشتری تعریف شود. سازمان استاندارد بین‌المللی (ایزو) تعریفی که از خدمات ارائه کرده است، خدمات را بخشی از مفهوم تولید در کل می‌داند [۱]. به‌طور معمول، خروجی یک آزمایشگاه آزمون، گواهی و تحلیل و تفسیر یا به زبان ساده‌تر، یک نظر کارشناسی به‌منظور قضاوت درباره یک موضوع خاص و یک مفهوم دانش‌بنیان است. آزمایشگاه شامل مجموعه‌ای از سخت‌افزارها، نرم‌افزارها، سرمایه انسانی متخصص، استانداردها و دستورالعمل‌های مرتبط است که در فضای فیزیکی مناسب و متناسب برای انجام آزمون‌های علمی و تحقیقاتی ایجاد و سازماندهی شده‌اند. آزمایشگاه‌ها محصول مصرفی تولید نمی‌کنند. به‌طور معمول، خروجی یک آزمایشگاه آزمون، گواهی، تحلیل و تفسیر و یا به زبان ساده‌تر، یک نظر کارشناسی برای قضاوت درباره یک موضوع خاص و یک مفهوم است [۲]. آزمایشگاه به‌عنوان بخش کلیدی در کنترل کیفیت مواد اولیه و محصولات نهایی در صنایع نقش مهمی ایفا می‌کند؛ از این رو، مدیریت آزمایشگاه باید براساس استانداردهای ملی و بین‌المللی انجام شود. مدیریت آزمایشگاه می‌تواند جنبه‌های مختلفی مانند مدیریت کیفیت، مدیریت عملکرد، مدیریت کارکنان و غیره داشته باشد؛ بنابراین، اجرای یک سیستم مدیریت قوی و مبتنی بر استاندارد در آزمایشگاه باعث بهبود و ارتقای آزمایشگاه خواهد شد. استانداردسازی آزمایشگاه‌ها در واقع بستر مناسبی برای استفاده بهینه از تجهیزات، امکانات و نیروی متخصص شاغل در آنها است. گواهی استاندارد با هدف افزایش اعتماد به عملیات آزمایشگاه، ایجاد شده و در برگیرنده الزاماتی برای آزمایشگاه است. آزمایشگاه موفق در یک زمینه باید مدیریت سازمان یافته و روش‌های مناسب اجرایی داشته باشد که براساس آن بتواند از حفاظت اطلاعات محرمانه و حقوق مالکیت معنوی مشتریان اطمینان داشته باشد؛ همچنین آزمایشگاه باید خط‌مشی‌ها و روش‌های اجرایی داشته باشد که براساس آن بتواند از دخالت در هر نوع کاری که باعث کاهش اعتماد به صلاحیت، بی‌طرفی، درستی قضاوت یا درستی عمل آن شود، جلوگیری نماید. آزمایشگاه باید سازمان و ساختار مدیریتی آزمایشگاهی، جایگاه در سازمان

اصلی و روابط میان مدیریت کیفیت، عملیات فنی و خدمات پشتیبانی را تعیین نماید.

همچنین آزمایشگاه باید مسئولیت، اختیارات و روابط میان تمامی کارکنان را تعیین کند که بر کیفیت آزمون‌ها و یا کالیبراسیون تأثیرگذار است و به وسیله اشخاصی که تسلط بر روش‌های آزمون، روش‌های اجرایی و همچنین ارزیابی نتایج دارند، باید نظارت کافی بر کارکنان انجام دهنده آزمایش و کالیبراسیون، از جمله کارورزان داشته باشد.

گواهی استاندارد، آزمایشگاه را ملزم می‌سازد با توجه به پیروی از اصول یکپارچه و قابل ردیابی، اقداماتی را به‌منظور پرداختن به خطر و فرصت، طرح‌ریزی و اجرا نماید. پرداختن به فرصت‌ها و خطرها، مبنایی به‌منظور افزایش کیفیت و اثربخشی سیستم مدیریت و دستیابی به نتایج صحیح است، از طرفی، جلوگیری از ایجاد اثرات منفی و نتایج نامنتظر با استاندارد نیز از فواید استانداردسازی است. استفاده از گواهی استاندارد در آزمایشگاه، همکاری میان آزمایشگاه‌ها و نهادهای دیگر را آسان نموده و تبادل اطلاعات، تجربه و هماهنگی بین آزمایشگاه‌های دارای گواهی استاندارد را سرعت بیشتری می‌بخشد [۳].

آن چه آزمایشگاه را دارای اهمیت می‌کند، مسئولیت قضاوت آن است. آزمایشگاه‌ها قضاتی هستند که براساس نظراتشان تصمیمات مهمی اتخاذ می‌شود. در واقع هدف از فعالیت آزمایشگاه‌های غیرطبی، ارائه پاسخ‌های صحیح و دقیق به شرط قبول مسئولیت از طرف آزمایشگاه است. در این راستا، ابزار رسیدن به چنین هدفی استقرار استاندارد ISO/IEC 17025 است. گواهی‌نامه توسط یک نهاد مستقل ارائه می‌شود که یک تضمین نوشته شده (یک گواهی) است و نشان می‌دهد محصول، خدمت و یا سیستم درخواستی، مطابق با الزامات خاصی است. در این زمینه، اعتبارنامه به رسمیت شناختن رسمی مرجع صدور گواهی‌نامه برای صدور گواهی‌نامه در بخش‌هایی از کسب و کارهای خاص توسط یک سازمان متخصص (یک سازمان اعتباردهی) اشاره دارد، به عبارت ساده‌تر، مجوز گواهی‌نامه مرجع صدور گواهی‌نامه است [۴].

یکی از مهم‌ترین اقدامات به‌منظور حصول اطمینان از اندازه‌گیری‌ها و کیفیت خدمات آزمایشگاه‌ها، ارزیابی عملکرد فنی آنها است. آزمون مهارت، فرصتی برای بررسی داده‌های آزمایشگاهی در مقایسه با مقادیر مرجع، عملکرد آزمایشگاه‌های مشابه و یا دیگر معیارهای عملکرد است و به‌عنوان یک روش کنترل کیفیت خارجی برای تضمین کیفیت نتایج آنالیز بسیار اهمیت دارد. نتایج حاصل از مشارکت در این آزمون، دریافت تایید و یا هشدار در خصوص مشکلات احتمالی موجود برای مدیران آزمایشگاه‌ها است که در بهبود عملکرد آتی آنها نقش بسزایی را ایفا می‌کند. اگر نتایج یک آزمایشگاه در یک الگوی آزمون مهارت، نشان دهد که داده‌های آن قابل مقایسه با مقادیر مرجع یا دیگر شاخص‌های عملکرد نیست، این خود منجر به شروع

## □ قابلیت‌ها و ویژگی‌های پایگاه داده COMAR

پایگاه داده COMAR قابلیت‌ها و ویژگی‌های مختلفی را برای حمایت از فعالیت‌های مرتبط با مواد مرجع ارائه می‌دهد که از جمله آنها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

■ **ثبات مواد:** تأمین کنندگان می‌توانند مواد مرجع خود را ثبت کنند و جزئیات ضروری مانند ترکیب، گواهی‌نامه و اطلاعات قابل ردیابی را ارائه دهند.

■ **قابلیت جستجو:** کاربران می‌توانند براساس معیارهای مختلفی مانند ترکیب، گواهی‌نامه و تأمین کننده، به دنبال مواد مرجع خاص باشند.

■ **تضمین کیفیت:** پایگاه داده با ارائه اطلاعات در مورد گواهی‌نامه و قابل ردیابی بودن مواد مرجع، کیفیت آن‌ها را تضمین می‌کند.

■ **تجزیه و تحلیل داده:** پایگاه داده COMAR با تولید گزارش‌های آماری و شاخص‌های عملکرد برای هر ماده مرجع، تجزیه و تحلیل داده را امکان‌پذیر می‌کند.

■ **ارتباطات:** این پلتفرم با امکانات پیام‌رسانی، ارتباط موثر بین تأمین کنندگان و کاربران را تسهیل می‌کند.

## □ مزایای پایگاه داده COMAR

پایگاه داده COMAR چندین مزیت برای آزمایشگاه‌ها، تأمین کنندگان و نظارت کنندگان دارد که عبارتند از:

■ **بهبود تضمین کیفیت:** آزمایشگاه‌ها با دسترسی به مواد مرجع گواهی شده و قابل ردیابی موجود در پایگاه داده، می‌توانند کیفیت فرآیندهای آزمایشگاهی خود را تضمین کنند.

■ **افزایش شفافیت:** پایگاه داده با ارائه اطلاعات جامع در مورد مواد مرجع، شفافیت را ترویج می‌کند و آزمایشگاه‌ها را قادر می‌سازد تصمیمات آگاهانه‌ای بگیرند.

■ **همکاری بین‌المللی:** پایگاه داده COMAR با تسهیل دسترسی به مواد مرجع از کشورهای و مناطق مختلف، همکاری بین‌المللی را ترویج می‌دهد.

■ **بهبود پیوسته:** بازخورد و تحلیل ارائه شده از طریق پایگاه داده COMAR، آزمایشگاه‌ها را قادر می‌سازد تا بهبود پیوسته در فرآیندها و استانداردهای آزمایشگاهی خود داشته باشند.

## □ چالش‌ها و توسعه‌های آینده

اگرچه پایگاه داده COMAR به‌طور قابل توجهی، دسترسی و هماهنگی مواد مرجع را بهبود داده است اما هنوز چالش‌هایی وجود دارد؛ به‌عنوان مثال، تضمین امنیت داده و گسترش پوشش آن برای شامل کردن طیف گسترده‌تری از مواد. توسعه‌های آینده ممکن است شامل یکپارچه‌سازی تجزیه و تحلیل داده‌های پیشرفته و هوش مصنوعی برای بهبود تفسیر داده و ارائه توصیه‌های شخصی‌سازی شده برای آزمایشگاه‌ها باشد.

فرآیند بررسی منابع خطا یا عملکرد غیرقابل قبول می‌شود. بدون مشارکت در الگوی آزمون مهارت و مقایسه‌های بین آزمایشگاهی، چنین منابع خطایی کشف نشده باقی می‌ماند و آزمایشگاه قادر به انجام اقدامات اصلاحی مناسب نیست که می‌تواند به ارائه نتایج نادرست به مشتریان و یا دیگر ذینفعان منجر شود و در نهایت، چنین خطاهایی موجب از دست دادن حسن شهرت و حتی مجوز قانونی آزمایشگاه می‌شود. در مقابل، عملکرد رضایت‌بخش در برنامه آزمون مهارت، باعث افزایش اعتماد به نفس و دلگرمی در بین پرسنل آزمایشگاه و ارائه شواهد مستقل و عینی برای قابلیت اندازه‌گیری و تضمین کیفیت آزمایشگاه می‌شود. استاندارد بین‌المللی ISO/IEC 17043 با هدف تعیین صلاحیت سازمان‌های مجری آزمون مهارت در سال ۲۰۱۰ میلادی توسط سازمان بین‌المللی استاندارد و کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک تهیه شد. این استاندارد جایگزین استاندارد ISO/IEC Guide 43:1997 شده‌است که اصول مربوط به اجرای آزمون مهارت را مطابق با استاندارد ISO/IEC Guide 43:1997 حفظ و به روز کرده است [۵].

مواد مرجع در تمامی مراحل اندازه‌گیری شامل صحت‌گذاری روش کنترل کیفیت و کالیبراسیون به کار می‌روند؛ همچنین این مواد در مقایسات بین آزمایشگاهی به‌منظور صحت‌گذاری روش و ارزیابی مهارت آزمایشگاه کاربرد دارد. اثبات صلاحیت فنی و علمی تولیدکنندگان ماده مرجع الزامی و برای اطمینان از کیفیت ماده مرجع است. به علت بهبود دقت تجهیزات اندازه‌گیری و الزام برای داده‌های صحیح‌تر و مطمئن‌تر در زمینه‌های علمی و فناوری، تقاضا برای مواد مرجع جدید با کیفیت بالاتر در حال افزایش است (ISO/IEC 17034). مواردی مانند برنامه‌ریزی آزمون‌های مهارت، مواد مرجع و خدمات کالیبراسیون در کنترل مستقیم آزمایشگاه نیستند؛ در این گونه موارد، آزمایشگاه باید به ارائه کنندگان این خدمات یعنی انجام دهندگان آزمون مهارت، تولید کنندگان مواد مرجع و آزمایشگاه‌های کالیبراسیون اطمینان نموده و مستندات لازم در این خصوص را تهیه کند و مستندات مذکور باید مناسب بودن محصولات و خدمات ارائه شده را به‌صورت واضح نشان دهند [۶].

پایگاه داده COMAR [۷] به‌عنوان پلتفرمی جامع است که سازماندهی، هماهنگی و انتشار اطلاعات در مورد مواد مرجع را تسهیل و نقش مهمی در تضمین کیفیت فرآیندهای آزمایشگاهی در دنیا ایفا می‌کند.

## □ مروری بر پایگاه داده COMAR

پایگاه داده COMAR یک پلتفرم مبتنی بر وب است که به تأمین کنندگان اجازه می‌دهد مواد مرجع خود را ثبت‌نام کنند و اطلاعات جامعی در مورد مواد موجود ارائه دهند. این پلتفرم دارای یک محیط کاربر پسند با گزینه‌های جستجوی مختلف است تا دسترسی آسان به مواد مرجع مربوطه را تسهیل کند.

پایگاه داده COMAR به عنوان یک منبع ارزشمند برای آزمایشگاه‌ها، تأمین کنندگان و نظارت کنندگان در تضمین کیفیت و قابل اعتماد بودن مواد مرجع در سراسر جهان عمل می‌کند. رابط کاربری کاربرپسند، اطلاعات جامع و ویژگی‌های همکاری آن، استفاده از این ابزار را برای آزمایشگاه‌ها، تأمین کنندگان مواد مرجع و نظارت کنندگان در تضمین کیفیت ضروری می‌سازد. استفاده پیوسته و پیشرفت‌های مداوم در پایگاه داده COMAR به بهبود پیوسته فرآیندها و استانداردهای آزمایشگاهی کمک خواهد کرد.

## پی نوشت

1. COMAR: International database for certified reference materials

## مراجع

- [۱] بهمن نورالهی و همکاران مدیریت کیفیت خدمات سومین کنفرانس ملی اقتصاد مدیریت و حسابداری ۱۳۹۸.
- [۲] سید احمد ظهیرمیردامادی و همکاران، مدیر کیفیت و نقش آن در آزمایشگاه انجام آزمون با توجه به استاندارد ISO/IEC ۱۷۰۲۵ دانش آزمایشگاهی ایران، سال نهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، شماره پیاپی ۳۵.
- [۳] مجید قهرمان افشار و همکاران، تامین الزامات استاندارد مدیریتی ISO/IEC ۱۷۰۲۵ در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی الکتروشمی و جداسازی، سومین کنفرانس بین‌المللی فناوری‌های جدید در صنایع نفت گاز و پتروشیمی.
- [۴] مریم امیرخیز و همکاران، پیاده‌سازی سیستم مدیریت کیفیت در مراکز تحقیقات عمومی، فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران، سال ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، شماره پیاپی ۲۱.
- [۵] الهام هاشمی‌شاد و همکاران، کاربرد آزمون مهارت به‌عنوان ابزار کنترل کیفیت خارجی آزمایشگاه‌ها مطالعه موردی آزمایشگاه‌های سیم و کابل، نشریه بین‌المللی مهندسی صنایع و مدیریت تولید، شماره ۱، جلد ۲۸، بهار ۱۳۹۶.
- [۶] فریبا علی و همکاران، نیازهای آموزشی به‌منظور درک تضمین کیفیت، فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران، سال ۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، شماره پیاپی ۲۵.
- [7] ISO GUDE 32 : 1997 Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials

## نویسنده

فهیمه نوری کوهانی

دکتری فیزیک، دانشگاه قم

fahimehnoori3305@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در  
آزمون کشش

## واژه‌های کلیدی

عدم قطعیت، دستگاه کشش، تکرارپذیری، عدم قطعیت نوع (A) و (B).

## چکیده

اندازه‌گیری یک کمیت، به‌خصوص اگر این اندازه‌گیری با استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی انجام شود، دچار خطاها و عدم قطعیت‌هایی در گزارش اندازه نهایی می‌شود؛ در نتیجه، باید برای به‌دست آوردن مقدار دقیق‌تر، عوامل ایجاد عدم قطعیت در مقدار نهایی، بررسی و ارزیابی شود. از این رو، در این مقاله پژوهشی-میدانی به بررسی عوامل ایجاد کننده خطا و عدم قطعیت در مقدار نهایی آزمون کشش که آزمونی پرکاربرد برای بررسی خواص مکانیکی مواد مختلف مانند فولاد در ساخت لوله‌های فولادی به‌منظور استفاده در انتقال آب، گاز و نفت بوده، پرداخته شده‌است. عدم قطعیت دستگاه به همراه عدم قطعیت حاصل از تکرارپذیری، بررسی و محاسبه شده‌است و در نهایت، تنش نهایی دستگاه کشش موجود در آزمایشگاه شرکت نورد لوله قائم قم بررسی و مقدار ۷۲/۶۲ کیلوپاسکال با عدم قطعیت بسط یافته ۰/۶۳ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. همچنین با توجه به اطلاعات به‌دست آمده، سهم عدم قطعیت تکرارپذیری نسبت به دیگر عوامل عدم قطعیت بیشتر است.

آزمایش کشش یکی از متداول ترین آزمایش های مکانیکی است که به منظور تعیین کمیت های سختی، استحکام و خواص شکل پذیری و چکش خواری مواد انجام می شود. در اصل، آزمایش کشش، بارگذاری نمونه با طول و سطح مقطع گیج مشخص و افزایش طول یا کرنش با نرخ ثابتی است تا نمونه دچار شکستگی<sup>۱</sup> شود. نیرویی که به طور معمول بار نامیده می شود باعث افزایش طول نمونه و افزایش طول گیج در طول آزمایش شده و این کار به منظور محاسبه ویژگی های مختلف مشخصه مواد انجام می شود. به طور معمول، نمونه ها دارای سطح مقطع مستطیلی یا دایره ای در ناحیه گیج هستند. تنش مهندسی که ماده در ناحیه گیج در هر لحظه از آزمایش تجربه می کند، با تقسیم نیروی وارد شده به نمونه بر سطح مقطع اولیه گیج به دست می آید و کرنش مهندسی با نسبت افزایش طول در گیج به طول اولیه گیج است [۱]. به طور معمول، در صنایع مختلف از جمله فولاد دستگاه آزمون کشش در آزمایشگاه مکانیکی آن وجود دارد؛ رویکرد این مقاله، بررسی علل مختلف بروز عدم قطعیت در آزمون کشش است. در آزمون کشش که به طور معمول با یک دستگاه یونیورسال انجام می شود، مقاومت کششی مقطع جوش لوله های فولادی برای مطالعه تعیین استحکام تسلیم، افزایش طول نقطه تسلیم، استحکام کششی، ازدیاد طول و کاهش سطح مقطع مورد بررسی قرار می گیرد [۲].

(وسط نمونه) است.

این آزمون به کمک یک دستگاه کشش<sup>۸</sup> انجام می شود. این دستگاه مجهز به دو فک متحرک و قدرتمند است. با قرار دادن نمونه استاندارد دمبلی شکل در دستگاه، فک ها شروع به دور شدن از هم و کشیدن نمونه می کنند. هم زمان رفتار ماده با یک رایانه رصد شده و خروجی به صورت یک نمودار روی صفحه پدیدار می شود. سطح مقطع گیج نسبت به سایر قسمت های نمونه در مرحله آماده سازی نمونه، کاهش می یابد تا تغییر شکل و شکست در این ناحیه موضعی شود [۳]. عدم قطعیت در اندازه گیری، ناشی از عوامل زیادی است. در بیشتر موارد، این مولفه ها را می توان از توزیع آماری نتایج یک سری اندازه گیری، تخمین و از طریق انحراف استاندارد ها مشخص کرد ولی از روش های دیگر به غیر از توزیع آماری مانند توزیع های احتمال فرضی بر پایه تجربه یا دیگر اطلاعات، تخمین زده می شوند که به روش اول نوع (A) و به روش دوم نوع (B) محاسبه عدم قطعیت گفته می شود [۴]. رابطه عمومی بین عدم قطعیت استاندارد مرکب  $U_c(y)$  از یک مقدار  $(y)$  و عدم قطعیت عوامل مستقل  $x_1$  و  $x_2$  و ... و  $x_n$  که عدم قطعیت به آنها وابسته بوده به شکل زیر است (رابطه (۲)):

$$U_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n C_i^2 U(x_i)^2} \quad \text{رابطه (۲)}$$

که در آن:

$y(x_1, x_2, \dots)$  تابع چندین عوامل مختلف  $x_1, x_2, \dots$  و

$C_i$  ضریب حساسیت با رابطه  $C_i = \partial y / \partial x_i$  است.

دو قانون کلی و ساده برای ترکیب عدم قطعیت های

استاندارد وجود دارد:

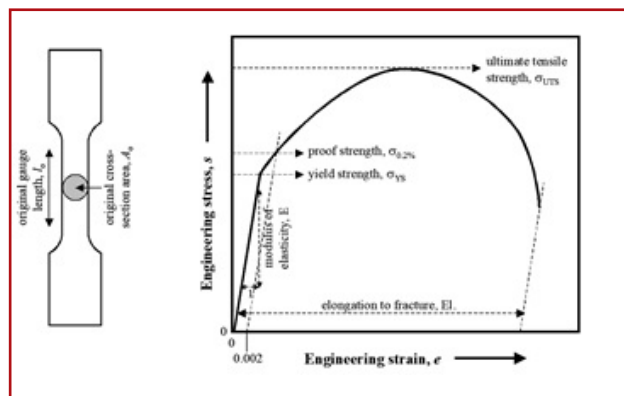
قانون اول برای مدل هایی که تنها شامل حاصل جمع و

تفریق کمیت ها هستند؛ به عنوان مثال،  $y = p + q + r + \dots$

عدم قطعیت استاندارد مرکب به شکل رابطه (۳) ارائه می شود:

## روش تحقیق

آزمون کشش یکی از آزمون های مخرب است که نمونه در معرض نیروی کششی تک بعدی تا نقطه شکست قرار می گیرد؛ این در حالی است که ازدیاد طول نیز به صورت هم زمان با نیروی اعمالی ثبت می شود. منحنی تنش کرنش در شکل (۱) نشان داده شده است. استحکام کششی با تقسیم بیشینه مقدار نیروی که نمونه در طول آزمون کشش تحمل می کند بر سطح مقطع اولیه نمونه محاسبه می شود [۳].



شکل (۱): منحنی تنش-کرنش و نمونه دمبلی شکل آماده شده براساس استاندارد [۳].

از نمودار تنش-کرنش فلزات، موارد تنش تسلیم<sup>۲</sup>، مدول یانگ<sup>۳</sup>، استحکام کششی<sup>۴</sup>، تنش شکست<sup>۵</sup> و چقرمگی<sup>۶</sup> قابل استخراج است. مقدار تنش،  $(S)$  که با رابطه (۱) تعریف می شود، حاصل تقسیم نیروی وارد بر نمونه بر مساحت سطح مقطع نمونه است:

$$S = \frac{F}{A} \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن:

$(F)$  نیروی کششی و  $(A)$  مساحت سطح مقطع گیج<sup>۷</sup>

که با کالیبراسیون کردن آن، عوامل عدم قطعیت گواهی نامه کولیس نیز علاوه بر تکرارپذیری در خلاء، موثر خواهند بود. عامل مهم دیگر که در اندازه گیری با کولیس اهمیت دارد، تغییرات دما است؛ زیرا کولیس ابزاری برای اندازه گیری طول است و رابطه (۷) نشان می دهد که تغییرات دما باعث تغییر طول می شود.

$$\Delta L = \alpha L_0 \Delta T \quad \text{رابطه (۷)}$$

که در آن:

$(\Delta T)$  تغییرات دما،  $(L_0)$  طول اولیه و  $(\alpha)$  ضریب انبساط خطی است و برای فولاد مقداری برابر با  $\frac{1}{K} \times 10^{-6}$  دارد. همیشه در محاسبه عدم قطعیت لازم است از روشی استفاده کرد که مقدار عدم قطعیت، کمترین مقدار خود را داشته باشد؛ بنابراین، به جای اینکه تکرارپذیری در همه عوامل بررسی شود، فقط برای عامل تنش بررسی شده است. برای هر کدام از ابعاد طول  $t$  و  $w$ ، رابطه عدم قطعیت به صورت رابطه (۸) با قانون اول عدم قطعیت بیان می شود:

$$U_w = \sqrt{U_{cal}^2 + U_{res}^2 + U_T^2} \quad \text{رابطه (۸)}$$

که در آن:

$(U_{res})$ : عدم قطعیت زینه دستگاه کشش براساس گواهی کالیبراسیون،  $(U_{cal})$ : عدم قطعیت گواهی کالیبراسیون و  $(U_T)$ : عدم قطعیت ناشی از تغییرات دما است. همچنین برای عامل نیرو نیز عدم قطعیتی براساس گواهی نامه کالیبراسیون به دست می آید (رابطه (۹)):

$$U_F = \sqrt{U_{cal}^2 + U_{res}^2} \quad \text{رابطه (۹)}$$

در نهایت، رابطه عدم قطعیت تنش با توجه به رابطه (۱) به صورت رابطه (۱۰) است:

$$U_\sigma = \bar{\sigma} \sqrt{\left(\frac{U_F}{F}\right)^2 + \left(\frac{U_A}{A}\right)^2} \quad \text{رابطه (۱۰)}$$

و روابط (۱۱) و (۱۲) مربوط به عدم قطعیت ترکیبی و گسترش یافته است:

$$U_{combined} = \sqrt{U_\sigma^2 + U_{Repet}^2} \quad \text{رابطه (۱۱)}$$

$$U_{expanded} = k \times U_{combined} \quad \text{رابطه (۱۲)}$$

که در آن:

$(U_{Repet})$ : عدم قطعیت تکرارپذیری تنش و  $(k)$ : ضریب پوشش هستند. پس از بیان تئوری عوامل ایجاد عدم قطعیت و روابط آنها، در بخش بعد، به محاسبه عدم قطعیت دستگاه کشش با اطلاعات به دست آمده پرداخته خواهد شد [۵].

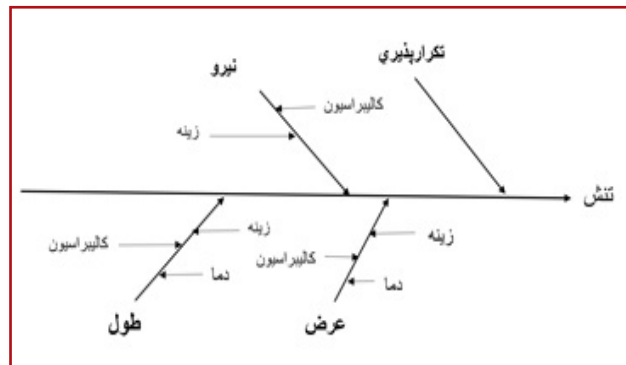
$$U_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{U(p)^2 + U(q)^2 + \dots} \quad \text{رابطه (۳)}$$

و قانون دوم برای مدل هایی است که تنها شامل حاصل ضرب و یا تقسیم می شوند؛ به عنوان مثال،  $y = p \times q \times r \times \dots$  و یا  $y = \frac{p}{q \times r \times \dots}$  در این صورت، عدم قطعیت استاندارد مرکب به شکل رابطه (۴) ارائه می شود:

$$U_c(y(p, q, \dots)) = y \sqrt{\left(\frac{U(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{U(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad \text{رابطه (۴)}$$

که در آن:  $\frac{U(p)}{p}$  عدم قطعیت نسبی عامل است [۴].

برای محاسبه تنش نمونه از رابطه (۱) استفاده می شود؛ بنابراین، یک آزمون فرمول دار است و براساس رابطه دوم عدم قطعیت که برای فرمول های ضرب و تقسیم دار است، به بررسی عدم قطعیت آن پرداخته می شود. با توجه به رابطه تنش که با نیرو نسبت مستقیم دارد و با مساحت سطح مقطع نسبت عکس دارد، نیرو به طور معمول با دستگاه خوانش می شود و عدم قطعیت آن با تکرارپذیری و همچنین گواهی کالیبراسیون دستگاه قابل بررسی است. همچنین مساحت سطح مقطع نیز در عدم قطعیت نهایی تنش تاثیر دارد که به طور معمول، مستطیلی یا دایره ای است و ابعاد آن با ابزار کولیس بررسی می شود. اگر سطح مقطع مستطیلی در نظر گرفته شود، نمودار استخوان ماهی علل بروز عدم قطعیت این آزمون در شکل (۲) آورده شده است.



شکل (۲): نمودار استخوان ماهی عدم قطعیت آزمون کشش.

در نتیجه، براساس قانون دوم عدم قطعیت که بیان شد مساحت سطح مقطع مستطیلی با رابطه زیر به دست می آید:

$$A = w \times t \quad \text{رابطه (۵)}$$

و رابطه عدم قطعیت آن با استفاده از رابطه (۶) به دست می آید:

$$U_A = \bar{A} \sqrt{\left(\frac{U_w}{w}\right)^2 + \left(\frac{U_t}{t}\right)^2} \quad \text{رابطه (۶)}$$

اندازه گیری عرض و طول نمونه با ابزار کولیس انجام می شود

## نتایج و بحث

در شرایط یکسان به تعداد ۱۰ بار نمونه‌های آماده شده مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج به‌دست آمده از تکرار در اندازه‌گیری طول و عرض یک نمونه به تعداد ده بار در جدول (۲) آورده شده‌است. همچنین نیرویی که دستگاه برای نمونه‌های مشابه نمایش می‌دهد به تعداد ده مرتبه به صورت خوانش از دستگاه انجام شده‌است و در نهایت، به کمک رابطه تنش (رابطه (۱))، مقدار تنش به‌وجود آمده محاسبه شد. البته باید توجه داشت که در این مقاله، فقط به استحکام نهایی<sup>۹</sup> پرداخته شده‌است. با تجزیه و تحلیل نتایج، بعد از انجام محاسبات مربوط به انحراف استاندارد نتایج، عدم قطعیت تکرارپذیری را محاسبه و داده‌های مورد نظر در جدول (۱) ثبت شده‌است.

داده‌ها و نتایج استفاده شده در این مقاله، براساس نتایج آزمون کشش شرکت نورد لوله قائم قم به‌دست آمده‌است. از جمله موارد استفاده از آزمون کشش، ارزیابی فولاد مورد استفاده در زمینه تولید لوله‌های انتقال آب، نفت، گاز است. طبق استاندارد AWWA C200، فولاد مورد استفاده در آزمون کشش باید شکل دمبلی مشخصی برابر نمونه وجود داشته باشد و در این کارخانه به‌طور معمول از نمونه‌هایی با فولادهایی براساس استاندارد ASTM A570 با گرید ۴۵ و ۵۰ با ابعادی مطابق با استاندارد استفاده می‌شود [۶ و ۷]. تکرارپذیری، شامل عدم قطعیت آماری نوع (A) است.

جدول (۱): نتایج تکرارپذیری آزمون کشش در نقطه استحکام نهایی.

	w(mm)	t(mm)	F(N)	A = w × t	$\sigma = F/(w \times t)$ (kPa)
۱	۳۰	۶	۱۳۲۸۹	۱۸۰	۷۳/۸۳
۲	۳۰/۱	۶/۱۱	۱۳۲۹۱	۱۸۳/۹۱	۷۲/۲۷
۳	۲۹/۹	۶/۲	۱۳۲۹۲	۱۸۵/۳۵	۷۱/۷۰
۴	۳۰	۶/۱	۱۳۲۹۰	۱۸۳	۷۲/۶۲
۵	۳۰/۱	۶/۲	۱۳۲۹۰	۱۸۶/۶۲	۷۱/۲۱
۶	۲۹/۹	۶/۲	۱۳۲۹۱	۱۸۵/۳۸	۷۱/۶۹
۷	۳۰	۶/۱	۱۳۲۹۱	۱۸۳	۷۲/۶۳
۸	۳۰	۶	۱۳۲۹۰	۱۸۰	۷۳/۸۳
۹	۳۰	۶/۱	۱۳۲۹۰	۱۸۳	۷۲/۶۲
۱۰	۳۰	۶	۱۳۲۸۹	۱۸۰	۷۳/۸۳
میانگین	۳۰	۶/۱	۱۳۲۹۰/۲۰	۱۸۳/۰۳	۷۲/۶۲
انحراف از معیار	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۹۲	۲/۴۱	۰/۹۵
عدم قطعیت	۰/۰۲	۰/۰۲۶	۰/۲۹	۰/۷۶	۰/۳

با توجه به روابط (۸) عدم قطعیت در اندازه‌گیری عرض و طول و در نهایت، مساحت سطح مقطع در این جدول محاسبه شده‌است:

علاوه‌بر عدم قطعیت تکرارپذیری نمونه که ناشی از ابزار کولیس به‌دست می‌آید، مقادیر عدم قطعیت کالیبراسیون و زینه در گواهی کالیبراسیون در جدول (۲) آورده شده‌است و

جدول (۲): عدم قطعیت نمونه.

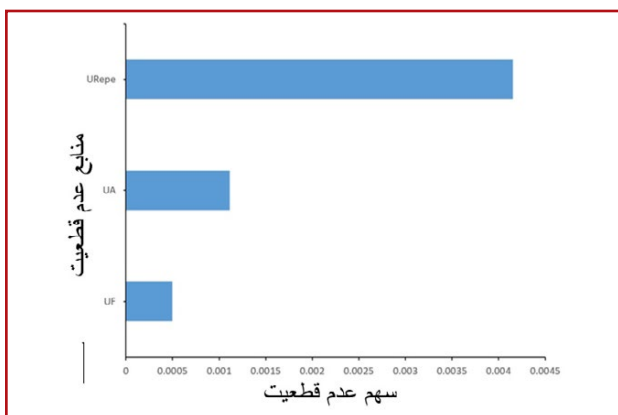
	میانگین (mm)	عوامل اولیه عدم قطعیت	نوع تابع توزیع	مقدار	بدون توزیع	عدم قطعیت ترکیب شده	بدون بعد	مساحت سطح مقطع
عدم قطعیت نمونه	t	کالیبراسیون	نرمال	۰/۰۱۲	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶۶	۰/۰۰۱۱	۰/۲۰۴
		زینه	مستطیلی	۰/۰۱	۰/۰۰۲۹			
		دما	مستطیلی	۰/۰۰۰۰۶۷				
	w	کالیبراسیون	نرمال	۰/۰۱۲	۰/۰۰۶			
		زینه	مستطیلی	۰/۰۱	۰/۰۰۲۹			
		دما	مستطیلی	۰/۰۰۰۳۳				

عدم قطعیت نیرو به کمک مقدار عدم قطعیت کالیبراسیون و زینه در گواهی کالیبراسیون دستگاه کشش در جدول (۳) آورده شده است:

همان‌گونه که بیان شد، تغییرات دما هنگام بررسی تغییرات طول بسیار موثر است که این تغییرات در اندازه‌گیری طول و عرض برای تغییر دمای ۱ درجه به کمک روابط (۸) و (۹) در جدول بالا محاسبه شده است. همچنین عوامل موثر بر

جدول (۳): عدم قطعیت نیرو.

بدون بعد	بدون توزیع	مقدار	نوع تابع توزیع	عوامل اولیه عدم قطعیت	میانگین (mm)	عدم قطعیت نیرو
	۶/۶۴۵	۱۳/۲۹	نرمال	cal		
۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۲۹	۰/۰۱	مستطیلی	res	۱۳۲۹۰	F



شکل (۳): نمودار سهم عوامل ایجاد عدم قطعیت در آزمون کشش.

در نهایت، به کمک روابط (۱۲) و (۱۳) عدم قطعیت ترکیبی مقدار تنش نهایی  $U_{combined} = 0.31$  و عدم قطعیت بسط یافته آن  $U_{expanded} = 0.63$  به دست می‌آید. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، سهم عدم قطعیت ناشی از تکرارپذیری نسبت به عوامل دیگر بیشتر است که در شکل (۳) جدول سهم هر عامل عدم قطعیت در آزمون کشش آورده شده است.

#### نتیجه‌گیری

در این مقاله که حاصل مطالعه پژوهشی-میدانی است، به بررسی منابع عدم قطعیت آزمون کشش که آزمونی پرکاربرد به منظور بررسی خواص مکانیکی مواد مختلف است، پرداخته شد و به‌طور دقیق، عوامل ایجاد عدم قطعیت در این آزمون معرفی شده است. در نهایت، برای راستی‌سنجی و بررسی عوامل ایجاد عدم قطعیت از داده‌های دستگاه آزمون کشش در آزمایشگاه مکانیک شرکت نورد لوله قائم قم استفاده شد و تنش نهایی با مقدار  $72/62$  کیلوپاسکال با عدم قطعیت بسط یافته  $0.63$  و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. همچنین با توجه به اطلاعات به دست آمده، سهم عدم قطعیت تکرارپذیری نسبت به دیگر عوامل عدم قطعیت بیشتر است.

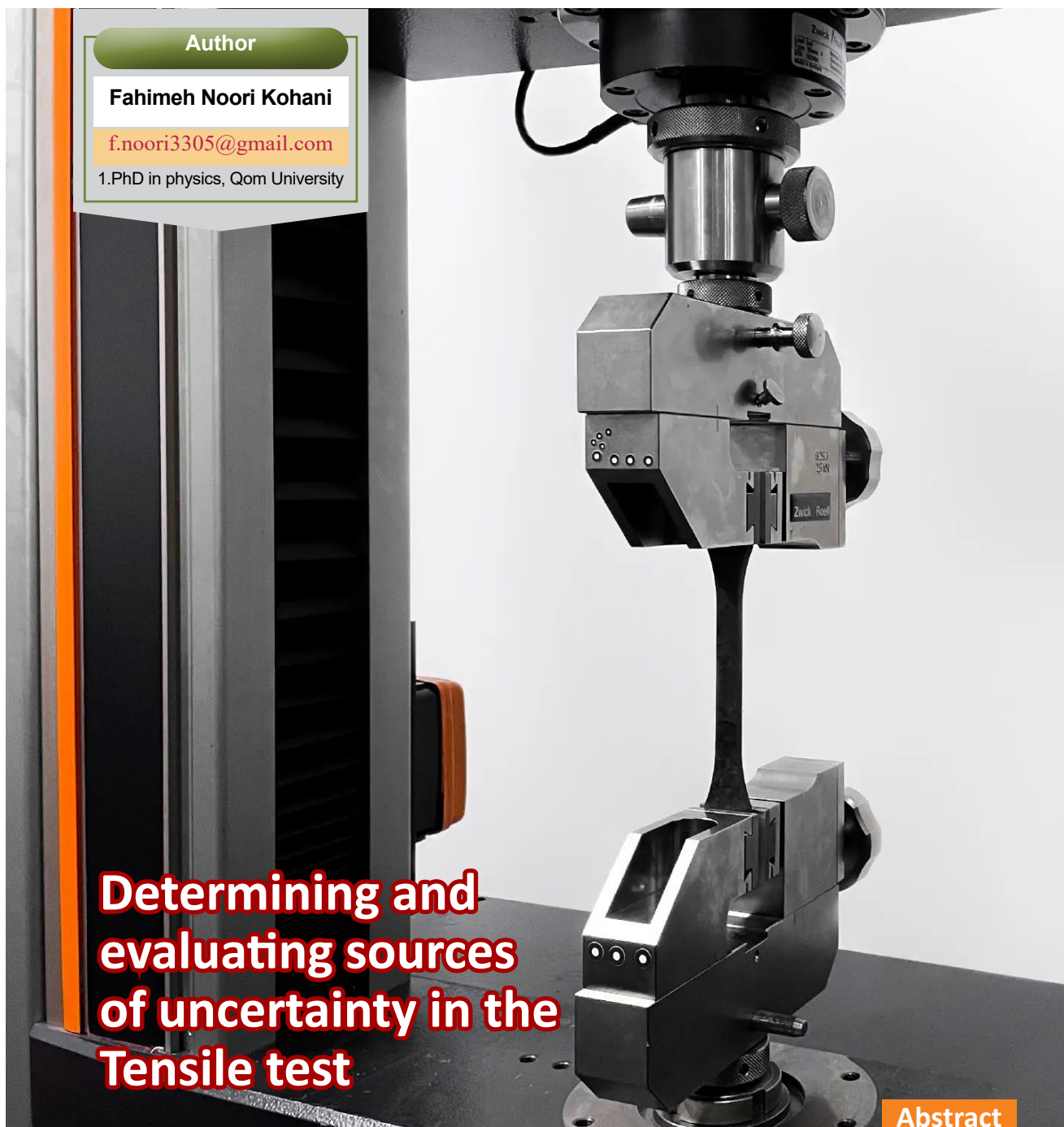
#### پی‌نوشت

1. Fracture
2. Yield Strength
3. Young's modulus
4. Ultimate tensile strength
5. Fracture strength
6. Toughness
7. Gage
8. Tensile
9. ultimate tensile strength (UTS)

#### مراجع

- [1] Tarafder S, Gupta KK. Estimation of uncertainty in mechanical testing.
- [2] ASTM I. Standard test methods and definitions for mechanical testing of steel products. ASTM A370. 2012.
- [3] Davis JR, editor. Tensile testing. ASM international; 2004.
- [4] Ellison SL, Williams A. Quantifying uncertainty in analytical measurement.
- [5] Gabauer W. The determination of uncertainties in tensile testing. Manual of Codes of Practice for the Determination of Uncertainties in Mechanical Tests on Metallic Materials. 2000 Sep.
- [6] Bambei, Jr JH, Keil B. Revision of the AWWA C200 Steel Water Pipe Manufacturing Standard: Consensus-Based Changes Mark Significant Improvements. In Pipelines 2013: Pipelines and Trenchless Construction and Renewals—A Global Perspective (pp. 398-410).
- [7] Kardak AA, Sinclair GB. Stress Concentration Factors for ASTM E8/E8M-16a Standard Round Specimens for Tension Testing. Journal of Testing and Evaluation. 2020 Jan 1;48(1):711-9.





## Author

Fahimeh Noori Kohani

f.noori3305@gmail.com

1.PhD in physics, Qom University

## Determining and evaluating sources of uncertainty in the Tensile test

Abstract

The measurement of a quantity has errors and uncertainties in the final size report, especially if this measurement is done with laboratory equipment. As a result, to obtain a more accurate value, attention is paid to the investigation and evaluation of the factors that create uncertainty in the final value. Therefore, in this research article, the factors and parameters that cause uncertainty in the final value of the tensile test, which is a widely used test for examining the mechanical properties of various materials such as steel in the construction of steel pipes for use in water, gas and oil transmission, are investigated. The device's uncertainty and the uncertainty resulting from the repeatability have been investigated and calculated. Finally, the ultimate stress of the tensile device in the laboratory of Qaem Pipe Rolling Company was investigated. The value of 72.62 kPa was calculated with an expanded uncertainty of 0.63 with a confidence factor of 95%. Also, according to the obtained information, the share of uncertainty of repeatability is more than other factors of uncertainty.

## Keywords

Uncertainty, Tensile device, Repeatability, Type A and B uncertainty.



## Authors

Seyed ahmad Zahirmirdamadi<sup>1,4\*</sup>  
Ruhollah Kashanaki<sup>2,5</sup>  
Farzaneh Zamani<sup>5,3</sup>

\*a.zmirdamadi@gmail.com

1. MSc governmental management, MERC (Material and Energy Research Center)
2. Ph.D. in Analytical chemistry, MERC (Material and Energy Research Center)
3. M.S in engineering chemistry, MERC (Material and Energy Research Center)
4. Standard and Calibration Experts Workgroup
5. Elemental Analysis Working Group

## The role of the COMAR database for reference materials

### Abstract

The COMAR database is a comprehensive database for reference materials that plays an essential role in ensuring quality and creating reliability for reference materials used in laboratories. This article overviews the COMAR database, its importance, capabilities, and benefits for laboratories and related institutions.

### Keywords

COMAR database, laboratory, reference material

## Author

Farideh Bataghva<sup>1,2\*</sup>  
Hamid Heydari<sup>1,2</sup>

\*[exirtajhizazma@gmail.com](mailto:exirtajhizazma@gmail.com)

1. PhD in analytical chemistry, Exir Tajhiz Azma research laboratory expert
2. Member of working group of chromatography



## High-Order Calibration and Data Analysis in Chromatography

### Abstract

Multiway data analysis and tensorial calibration are gaining widespread acceptance with the rapid development of multichannel chromatographic instruments. By combining chromatographic techniques with chemometrics based on high-order calibration methods, some traditional problems in analysis, such as complicated pretreatment steps, long elution times, or even worse analysis results, can be avoided/improved. This chapter presents an overview from second-order to third-order data that cover theories and applications together with corresponding data processing in chromatography.

### Keywords

chemometrics, second-order advantages, trilinear model, high-performance liquid chromatography-diode array detection, liquid chromatography-mass spectrometry.

## Authors

Mahtab Tarami<sup>1\*</sup>, Mohammad Saraji<sup>2</sup>  
Narges Mehrfaza<sup>3</sup>

\*Mahtab.tarami@yahoo.com

1. PhD Student of Chemistry Analysis of Kashan University, Technical Director of Isfahan Scientific and Research Chemistry Laboratory
2. PhD in Chemistry Analysis, Isfahan University of Technology, School of Chemistry
3. Doctor of Chemistry Analysis, Isfahan University of Technology

## Preparation of a nano-biocomposite film based on halloysite-chitosan as the sorbent for thin film microextraction

### Abstract

This work introduced an environmentally friendly sorbent based on halloysite-chitosan nano-biocomposite for thin film microextraction (TFME). Chitosan as a biodegradable and biocompatible polymer was used to prepare thin film sorbent. To improve the mechanical and chemical resistance of the film and increasing the adsorption efficiency, halloysite nanotubes were combined with the chitosan to prepare the thin film sorbent. The film was used for TFME of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol followed by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. Effective parameters such as the amount of chitosan and halloysite, ionic strength of sample solution, type and volume of desorption solvent, desorption and extraction times were optimized. The linear dynamic range of the method was in the range of 1.0–50.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The detection limit and relative standard deviation of the method were 0.4  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 9%, respectively. The method was validated for the TFME of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in river water, wastewater, and tap water samples, and recoveries were found to be in the range 67–106%.

### Keywords

Chitosan, Halloysite, Thin film microextraction, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, Water samples

## Authors

Abbas Abedfar<sup>1\*</sup>Fatemeh Abbaszadeh<sup>2</sup>

\* a.abedfar@guilan.ac.ir

1. Ph.D of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, University of Guilan
2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



## An overview of the importance and classification of Real-Time PCR technique and its application in food industry

### Abstract

The progress in the field of molecular technology and biology (caused to accelerate the correct identification of closely related species in a raw material and product) led to the frequency of molecular tests for wide applications such as genetic fingerprinting for identification, diagnosis of infectious diseases, food sensitivities and fraud detection in the food industry it seems necessary. Certainly, using traditional methods (based on culture) to detect diseases, antibiotics, and harmful microorganisms in the food industry will be costly and take a lot of time. That's why modern molecular methods like RT-PCR were brought in. They can quickly and accurately determine the specific species that cause infections and assess the food's safety and quality. In this new method, fluorescent molecules are used to detect the gene amplification process. This allows for accurate measurement of gene expression levels with minimal risk of contamination. This technique is highly sensitive and specific, providing reliable data. So, it can be used instead of regular PCR. This article talks about the different methods of RT-PCR, why it's important, and how it can be used to detect allergens in food, like gluten. It also mentions how it can help uncover cases of food fraud.

### Keywords

RT-PCR technique; Technique classification; Detection of pathogenic bacteria; Detection of food allergens; Food fraud.

## Authors

Mehri Nadiri Niri<sup>1\*</sup>  
Safa Saraj Mehdizadeh<sup>2</sup>

\*mnadiriniri@yahoo.com

1. PhD in Organic Chemistry, Research laboratory, Tanin Peak Sabalan Company (Beta), Ardabil.
2. Master of Business Administration, Research laboratory, Tanin Peak Sabalan Company (Beta), Ardabil.

## Evaluating of the measurement uncertainty in laboratories by presenting an objective example



### Abstract

In order to evaluate the measurement uncertainty, laboratories should identify the uncertainty contribution of various influencing factors on the measurand uncertainty and regularly review the measured uncertainty. In this research, the results of calculating the uncertainty of measuring the mass of a ball sample are presented using the QMSys GUM enterprise software. In order to validate the obtained results from the software, the uncertainty calculation was also done manually and compared with the results of the software. The results show that the obtained uncertainty by the manual method and the software are the same. Also, the results indicate that the contribution of the uncertainty of repeatability on the uncertainty of the measurand is greater than the other factors; therefore, the optimization of the obtained uncertainty is possible by increasing the number of repetitions of the test or training the examiner to provide more accurate results.

### Keywords

Uncertainty, Influencing factors, Measurand, GUM method, Mass.



# Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Volume 11 ■ Issue 3 ■ Fall 2023 ■ No.43

ISSN 2538-3450

**Concessionaire:**

Iran Nanotechnology Innovation Council

**Managing Editor:** Alireza Badiei

**Editor in Chief:** Mojtaba Nasab

**Executive Management:** Iran Nanotechnology  
Laboratory Network (INLN)

**Article Editor:** Davoud Gharailou

**Authors:**

Mehri Nadiri Niri, Safa Saraj Mehdizadeh,  
Abbas Abedfar, Fatemeh Abbaszadeh,  
Mahtab Tarami, Mohammad Saraji,  
Narges Mehrafza, Farideh Bataghva  
Hamid Heydari, Seyed ahmad Zahirmirdamadi,  
Ruhollah Kashanaki, Farzaneh Zamani  
Fahimeh Noori Kohani

**Designer :** Simin Rafipour Langroudi

**Editor:** Zeinab Zarincheh

Iran, Tehran, Po.Box: 14565-344

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

**Email :** [info@ijlk.ir](mailto:info@ijlk.ir)



## Contents

### Articles



Determining and evaluating  
sources of uncertainty in the  
Tensile test

>57



The role of the COMAR database for refer-  
ence materials

>58



High-Order Calibration and Data Analysis in  
Chromatography

>59



Preparation of a nano-biocomposite  
film based on halloysite-chitosan as  
the sorbent for thin film  
microextraction

>60



An overview of the importance  
and classification of RT-PCR  
technique and its application in  
food industry

>61



Evaluating of the measurement  
uncertainty in laboratories by pre-  
senting an objective example

>62



Iranian Journal of

# Laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 11 ■ Issue 3 ■ Fall 2023 ■ No.43



## Determining and evaluating sources of uncertainty in the Tensile test



Evaluating of the measurement uncertainty in laboratories by presenting an objective example



An overview of the importance and classification of Real-Time PCR technique and its application in food industry



Preparation of a nano-biocomposite film based on halloysite-chitosan as the sorbent for thin film microextraction



High-Order Calibration and Data Analysis in Chromatography



The role of the COMAR database for reference materials