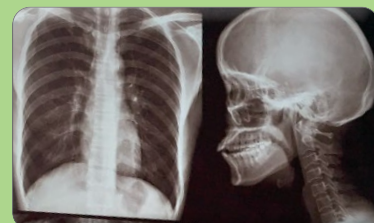


بررسی تاثیر برخی از عوامل موثر در نتایج DLS و راهکارهای کاهش خطا

ارتقا و توسعه شبکه آزمایشگاهی در سومین دهه فعالیت



بررسی اثر شرایط کاشت آرماتور با
چسب‌های شیمیایی در بتن بر میزان
مقاومت بیرون‌کشی



تفسیر فیلم رادیوگرافی با استفاده از هوش
مصنوعی و روش‌های پردازش تصویر



کاربرد فیلتراسیون در آماده‌سازی نمونه‌ها در
کروماتوگرافی (بخش اول)



مقایسه دو روش هضم اسیدی و هضم خشک
در تعیین فلزات سنگین سرب و کادمیوم به
روش جذب اتمی کوره گرافیت در برنج



واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای، گامی نو در
تشخیص مولکولی

نویسنده
داود قرایلو*
 ۱. مدیر فنی آزمایشگاه DLS مرکز خدمات
 آزمایشگاهی، دانشگاه صنعتی شریف
***Davoud.Gharailou@gmail.com**
 تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹
 تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱

**بررسی تاثیر برخی
از عوامل موثر در
نتایج DLS و
راهکارهای کاهش خطا**

واژه‌های کلیدی
 پراکندگی نور پویا، آماده سازی نمونه،
 مسائل فنی، اندازه گیری اندازه ذرات.

چکیده

تفرق نور پویا^۱ یکی از روش‌های پرکاربرد برای اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات در مقیاس نانومتری است. دقت این آزمون به آماده‌سازی نمونه و تنظیمات صحیح دستگاه بستگی دارد. غلظت نمونه عامل مهمی در دقت نتایج است. غلظت‌های بالا باعث پراکندگی چندگانه و بزرگ‌نمایی اندازه ذرات و غلظت‌های پایین موجب کاهش سیگنال و تولید نویز می‌شود. بنابراین، تنظیم غلظت در محدوده بهینه (۰/۱ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) برای نتایج معتبر ضروری است. پایداری نمونه نیز نقش کلیدی دارد. تجمع ذرات، رسوب‌گذاری و تجزیه شیمیایی می‌توانند نتایج را منحرف کنند. برای جلوگیری از این مشکلات، استفاده از پایدارکننده‌های شیمیایی، تنظیم pH و انجام آزمون در کوتاه‌ترین زمان ممکن توصیه می‌شود. عوامل دستگاه نیز باید به دقت تنظیم شوند. زاویه پراش، زمان اندازه‌گیری و دمای آزمون از عوامل تأثیرگذار بر نتایج هستند. زاویه ۱۷۳ درجه برای نمونه‌های غلیظ و ۹۰ درجه برای نمونه‌های رقیق مناسب‌تر است. مدت زمان مناسب اندازه‌گیری (۳۰ تا ۱۸۰ ثانیه) و کنترل دما برای جلوگیری از تغییرات ناخواسته در اندازه ذرات ضروری هستند. در این مقاله به صورت اجمالی برخی از عواملی که می‌تواند منشاء خطا در آزمون‌های DLS شوند مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرند و راهکارهایی برای انجام دقیق‌تر این آزمون‌ها ارائه می‌شود.

تفرق نور پویا یا DLS یکی از روش‌های مهم و پرکاربرد در علم نانومواد و بیوفیزیک است که برای اندازه‌گیری اندازه ذرات در مقیاس نانومتر تا میکرومتر استفاده می‌شود. این روش مبتنی بر تحلیل تغییرات شدت نور پراکنده شده از ذرات معلق در یک محیط سیال است. دستگاه DLS با استفاده از یک منبع نور لیزری، پرتو نوری را به نمونه می‌تاباند و میزان تغییرات شدت نور را که در اثر حرکت براونی ذرات ایجاد می‌شود، ثبت و پردازش می‌کند. براساس این داده‌ها، اندازه هیدرودینامیکی ذرات و توزیع آن‌ها تعیین می‌شود.

DLS در حوزه‌های مختلفی از جمله علوم دارویی، زیست‌شناسی، شیمی، فیزیک مواد و مهندسی نانو کاربرد دارد. در تحقیقات فناوری نانو، این دستگاه برای بررسی پایداری نانوذرات، تعیین میزان تجمع آن‌ها و ارزیابی توزیع اندازه ذرات به کار می‌رود. در زیست‌شناسی، از DLS برای مطالعه پروتئین‌ها، ویروس‌ها و سایر زیست‌مولکول‌های معلق در محیط‌های مایع استفاده می‌شود. همچنین در صنایع داروسازی، بررسی توزیع اندازه نانوذرات دارویی با این روش اهمیت زیادی دارد، زیرا اندازه ذرات تأثیر مستقیمی بر جذب، رهایش و اثربخشی دارو دارد. در شکل (۱) نمایی از چگونگی قرار گرفتن نمونه در دستگاه DLS نشان داده شده‌است.



شکل (۱): نمایی از چگونگی قرار گرفتن نمونه در دستگاه DLS.

اهمیت انجام صحیح آزمون‌های DLS

دقت و صحت نتایج حاصل از دستگاه DLS به شدت وابسته به شرایط آزمایش و روش انجام اندازه‌گیری است. در صورتی که آزمون‌های DLS به درستی انجام نشوند، ممکن است نتایج نادرست و گمراه‌کننده‌ای ارائه نماید که می‌تواند منجر به خطاهای علمی و عملی در کاربردهای مختلف شود. به‌عنوان مثال، اگر غلظت نمونه بسیار بالا باشد، پدیده پراکندگی چندگانه رخ می‌دهد که باعث انحراف در اندازه‌گیری و گزارش اندازه‌های نادرست خواهد شد. از سوی دیگر، غلظت بسیار پایین می‌تواند منجر به کاهش نسبت سیگنال به نویز شده و موجب ایجاد قله‌های کاذب در توزیع اندازه ذرات شود.

آماده‌سازی مناسب نمونه، استفاده از پایدارکننده‌های شیمیایی، تنظیم pH و قدرت یونی محلول و انجام آزمایش‌ها در کوتاه‌ترین زمان پس از آماده‌سازی نمونه از جمله راهکارهایی هستند که می‌توانند صحت نتایج DLS را افزایش دهند. تنظیم صحیح عوامل دستگاه نظیر زاویه پراش، زمان اندازه‌گیری و کالیبراسیون با استانداردهای مرجع، تأثیر بسزایی در بهبود دقت داده‌ها دارد. به کارگیری روش‌های مکمل مانند

میکروسکوپ الکترونی عبوری^۲ و میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ برای تأیید نتایج، می‌تواند به درک بهتر ویژگی‌های نانومواد کمک کند.

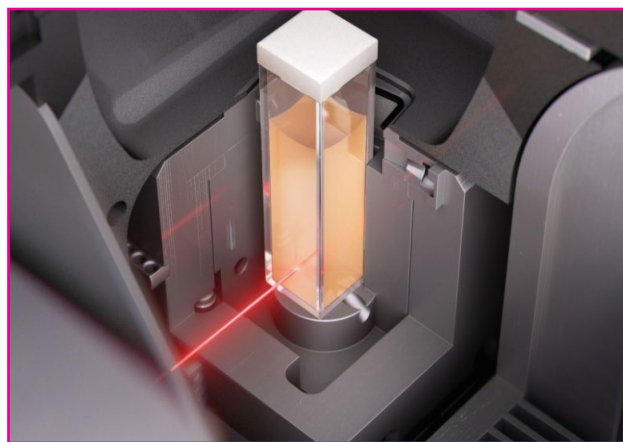
چه عواملی بر انجام آزمون DLS موثر هستند؟

تحلیل نتایج دستگاه DLS به عوامل متعددی وابسته است که در دقت و صحت اندازه‌گیری اندازه ذرات و توزیع آنها تأثیرگذار هستند. برخی از این عوامل به اختصار در ذیل آمده است.

غلظت نمونه

غلظت بیش از حد باعث افزایش تداخل نور پراکنده شده^۴ و خطا در محاسبه اندازه ذرات می‌شود. همچنین غلظت بسیار کم، سیگنال کافی برای تحلیل ایجاد نمی‌کند. وقتی غلظت ذرات در نمونه بالا باشد، فاصله بین ذرات کاهش می‌یابد. در این حالت، پرتو لیزر قبل از رسیدن به آشکارساز، ممکن است

از چندین ذره متوالی پراکنده شود. این پدیده باعث تغییر در تابع همبستگی^۵ و محاسبه نادرست ضریب انتشار^۶ می‌شود (شکل (۲)).



شکل (۲): پراش لیزر دستگاه DLS در نمونه‌هایی با غلظت بالا.

ضریب انتشار با اندازه ذرات رابطه معکوس دارد. اگر پراکندگی چندگانه رخ دهد، ضریب انتشار محاسبه شده کوچکتر از مقدار واقعی خواهد بود و در نتیجه، اندازه ذرات بزرگتر از حد واقعی گزارش می‌شود. فرض کنید نمونه حاوی نانوذرات طلا با قطر واقعی ۲۰ نانومتر است. اگر غلظت نمونه به حدی بالا باشد که پراکندگی چندگانه غالب شود، دستگاه ممکن است اندازه ذرات را ۳۰ نانومتر یا بیشتر گزارش کند. این خطا در صنایع دارویی که اندازه ذرات بر جذب و رهایش دارو تأثیر مستقیم دارد، می‌تواند منجر به نتایج فاجعه بار شود. اما در غلظت بسیار کم (سیگنال ضعیف) چه اتفاقی می‌افتد؟

نویز در داده‌ها یکی از پیامدهای منفی غلظت کم است. در غلظت‌های بسیار پایین، تعداد ذرات موجود در مسیر پرتو لیزر کافی نیست. در نتیجه، شدت نور پراکنده شده کم شده و نسبت سیگنال به نویز^۷ کاهش می‌یابد.

نویز بالا در تابع همبستگی می‌تواند منجر به شناسایی قله‌های کاذب در توزیع اندازه ذرات شود. برای مثال، ممکن است دستگاه وجود ذرات با اندازه‌های غیرواقعی (به‌عنوان مثال، ۱۰۰ نانومتر) را در یک نمونه رقیق گزارش کند، در حالی که چنین ذراتی وجود خارجی ندارند. در یک آزمایش با نانوذرات سیلیکا با قطر واقعی ۵۰ نانومتر، اگر نمونه بیش از حد رقیق شود (غلظت کمتر از ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر)، دستگاه ممکن است به جای یک قله واضح، چندین قله با اندازه‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ نانومتر نشان دهد که ناشی از نویز است.

در این میان تعیین غلظت بهینه برای DLS اهمیت زیادی پیدا می‌کند. محدوده غلظت بهینه برای DLS براساس نوع دستگاه تعیین می‌شود اما به‌طور معمول بین ۰/۱ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر (برای ذرات با اندازه ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر) می‌تواند باشد. ذرات کوچک (به‌عنوان مثال، ۱۰ نانومتر)

نیاز به غلظت بالاتر (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) دارند، زیرا پراکندگی نور توسط ذرات کوچک ضعیف‌تر است. ذرات بزرگ (به‌عنوان مثال، ۵۰۰ نانومتر) غلظت پایین (۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر) کافی است، زیرا ذرات بزرگ نور را قوی‌تر پراکنده می‌کنند.

روش‌هایی برای تعیین غلظت بهینه وجود دارد. اندازه‌گیری شدت پراکندگی^۸ یکی از این روش‌ها است. دستگاه‌های DLS مدرن شدت نور پراکنده شده (بر حسب کیلوکانت بر ثانیه، kcps) را نمایش می‌دهند. محدوده ایده‌آل به‌طور معمول بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ کیلوکانت بر ثانیه است. به‌عنوان مثال، اگر شدت پراکندگی نمونه اولیه ۲۰۰۰ کیلوکانت بر ثانیه باشد، نشان‌دهنده غلظت بیش از حد است و باید رقیق شود. با تنظیم برخی بخش‌های دستگاه نظیر زاویه پراش نیز می‌توان اثر منفی غلظت را به حداقل رساند. برای نمونه‌های با غلظت بالا، استفاده از زاویه ۱۷۳ درجه تداخل نوری را کاهش می‌دهد.

برای نمونه‌های رقیق، افزایش زمان اندازه‌گیری (به‌عنوان مثال، از ۶۰ به ۱۸۰ ثانیه) باعث بهبود نسبت سیگنال به نویز می‌شود. در نهایت می‌توان گفت که غلظت نمونه یکی از مهمترین عوامل در اندازه‌گیری DLS است. غلظت بیش از حد منجر به پراکندگی چندگانه و گزارش اندازه‌های بزرگتر از واقعیت می‌شود، در حالی که غلظت بسیار کم باعث افزایش نویز و شناسایی قله‌های کاذب خواهد شد. برای دستیابی به نتایج دقیق، ضروری است که غلظت نمونه در محدوده ۰/۱ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم شود. از رقیق‌سازی و فیلتراسیون برای بهبود کیفیت نمونه استفاده شود. همچنین عوامل دستگاه (زاویه پراش، زمان اندازه‌گیری) با توجه به غلظت نمونه بهینه‌سازی شوند. با رعایت این نکات، می‌توان از خطاهای رایج جلوگیری و داده‌های قابل اطمینانی برای آنالیز نانوذرات به‌دست آورد.

پایداری نمونه

تجمع ذرات^۹ یا رسوب‌گذاری^{۱۰} طی اندازه‌گیری، نتایج را مخدوش می‌کند. استفاده از مواد پایدارکننده (مانند سورفکتانت‌ها) برای جلوگیری از تجمع ضروری است. نبود مواد پایدارکننده (مانند سورفکتانت‌ها) و یا شرایط نامناسب محیطی (به‌عنوان مثال، pH نامناسب یا قدرت یونی بالا) موجب کاهش نیروی دافعه بین ذرات شده و همین امر باعث تشکیل تجمعات می‌شود. حرکت براونی ذرات در غلظت‌های بالا نیز احتمال برخورد و تجمع را افزایش می‌دهد. در شکل (۳) تأثیر سورفکتانت روی تغییر محل پیک در نتایج دیده می‌شود. در این شکل، خط مشکی مربوط به نتیجه نانوذراتی است که بدون سورفکتانت اندازه‌گیری شده‌اند و خط قرمز مربوط به نتایجی است که پس از افزودن سورفکتانت، اندازه‌گیری شده‌اند.

برای بررسی تأثیر پایداری نمونه بر اندازه‌گیری نانوذرات طلا با قطر اولیه ۳۰ نانومتر به مثال زیر توجه کنید:
دو نمونه (A) و (B) آماده شده‌اند:
■ **نمونه (A):** نانوذرات طلا در آب دیونیزه + سورفکتانت (سیترات سدیم).

■ **نمونه (B):** نانوذرات طلا در آب دیونیزه (بدون پایدارکننده).
هر نمونه بلافاصله پس از آماده‌سازی و در بازه‌های زمانی ۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه با دستگاه DLS اندازه‌گیری شد.
عوامل دستگاه: طول موج ۶۳۲ نانومتر، زاویه ۱۷۳ درجه و دمای ۲۵ سانتی‌گراد. نتایج آزمون‌های انجام شده در جدول (۱) آمده است:

جدول (۱): نتایج آزمون DLS روی دو نمونه (A) و (B).

اندازه ذرات نمونه (A) برحسب نانومتر	PDI در نمونه (A)	اندازه ذرات نمونه (B) برحسب نانومتر	PDI در نمونه (B)	زمان (دقیقه)
۳۰	۰/۰۵	۳۰	۰/۰۵	۰
۳۱	۰/۰۶	۴۵	۰/۲	۱۵
۳۲	۰/۰۷	۷۵	۰/۴	۳۰
۳۳	۰/۰۸	۱۲۰	۰/۶	۶۰

تحلیل نتایج

نمونه (A) (پایدار):

اندازه ذرات طی ۶۰ دقیقه تغییر محسوسی نداشت (۳۰ به ۳۳ نانومتر) و PDI پایین باقی ماند. وجود سورفکتانت از تجمع ذرات جلوگیری کرد.

نمونه (B) (ناپایدار):

پس از ۱۵ دقیقه، اندازه ذرات به ۴۵ نانومتر افزایش یافت (تجمع جزئی). پس از ۶۰ دقیقه، اندازه ذرات به ۱۲۰ نانومتر رسید (تجمع کامل). افزایش PDI از ۰/۰۵ به ۰/۶ نشان‌دهنده ناهمگنی شدید در نمونه است.

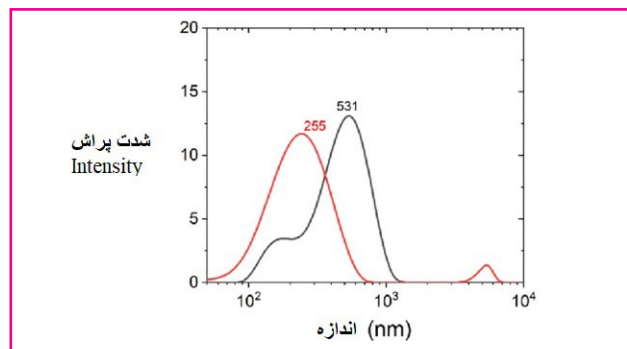
روش‌های تشخیص ناپایداری نمونه در DLS

بررسی تغییرات تابع همبستگی

در نمونه پایدار، تابع همبستگی یکنواخت و بدون نویز است. در نمونه ناپایدار، تابع همبستگی دارای نوسانات غیرعادی یا افت ناگهانی (ناشی از رسوب‌گذاری) است.

اندازه‌گیری‌های مکرر در بازه‌های زمانی

اگر اندازه ذرات یا PDI در اندازه‌گیری‌های پیاپی افزایش یابد، نشان‌دهنده ناپایداری نمونه است.



شکل (۲): تفاوت نتایج در نمونه‌ای که فاقد سورفکتانت است (خط مشکی) و همان نمونه با سورفکتانت (خط قرمز).

تجمع ذرات منجر به افزایش اندازه هیدرودینامیکی گزارش شده می‌شود. شاخص ضریب غیریکنواختی^{۱۱} بالاتر از ۰/۷ به‌طور معمول نشان‌دهنده ناهمگنی در اندازه ذرات است. در چنین حالتی تابع همبستگی غیرنرمال و دارای نویز بالا می‌شود.
برای درک بهتر این مشکل، مثال عملی را بررسی کنیم.
نانوذرات نقره با قطر اولیه ۲۰ نانومتر در آب دیونیزه (بدون پایدارکننده) در معرض تجمع قرار می‌گیرند. اگر اندازه‌گیری DLS بلافاصله پس از آماده‌سازی انجام شود، قطر ذرات ۲۰ نانومتر گزارش می‌شود، اما پس از ۳۰ دقیقه، اندازه ذرات به ۱۰۰ نانومتر افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده تجمع ذرات به مرور زمان است.

رسوب‌گذاری

علت رسوب‌گذاری ذرات بزرگ (به‌طور معمول بالای ۱ میکرومتر) نمونه‌های با چگالی بالا هستند که در اثر نیروی گرانش ته‌نشین می‌شوند. این پدیده باعث کاهش غلظت ذرات در ناحیه پرتو لیزر و ایجاد خطا در اندازه‌گیری می‌شود. در چنین شرایطی دستگاه ممکن است اندازه ذرات باقیمانده در محلول را کوچکتر از حد واقعی گزارش کند. در چنین حالتی شدت پراکندگی به‌طور ناگهانی کاهش می‌یابد.
برای درک بهتر این موضوع به این مثال توجه کنید؛ ذرات میکرونی سیلیکا با قطر واقعی ۲ میکرومتر در آب دیونیزه معلق هستند. پس از ۱۰ دقیقه، رسوب‌گذاری رخ می‌دهد و دستگاه DLS تنها ذرات کوچکتر از ۲۰۰ نانومتر (ناشی از ناخالصی‌ها) را تشخیص می‌دهد.

تجزیه شیمیایی

تجزیه به عوامل مختلفی می‌تواند مرتبط باشد. قرارگیری نمونه در معرض نور، اکسیژن و یا دمای نامناسب ممکن است باعث تخریب شیمیایی ذرات شود. برای مثال، نانوذرات آهن در محیط آبی اکسید شده و به ذرات اکسید آهن با اندازه متفاوت تبدیل می‌شوند. چنین وضعیتی تأثیرات مختلفی بر نتایج DLS می‌گذارد. ظهور قله‌های جدید در توزیع اندازه ذرات و افزایش PDI و کاهش تکرارپذیری داده‌ها از جمله این مشکلات هستند.

■ مقایسه با روش‌های مکمل

استفاده از روش‌هایی مانند TEM یا SEM برای تأیید اندازه ذرات و مشاهده مستقیم تجمع می‌تواند مفید باشد.

■ راهکارهای عملی برای بهبود پایداری نمونه

■ افزودن پایدارکننده‌ها

سورفکتانت‌ها: مانند سدیم دودسیل سولفات^{۱۲} یا سیترات سدیم برای ایجاد دافعه الکترواستاتیک استفاده می‌شوند. پلیمرها: مانند پلی اتیلن گلیکول^{۱۳} برای ایجاد دافعه فضایی به کار گرفته می‌شوند.

■ کنترل شرایط محیطی

pH: تنظیم pH به گونه‌ای که بار سطحی ذرات را افزایش دهد (به عنوان مثال، pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک). قدرت یونی: کاهش غلظت نمک در نمونه برای جلوگیری از فشردگی لایه دوگانه الکتریکی.

■ بهینه‌سازی فرآیند آماده‌سازی

■ اعمال امواج فراصوت: استفاده از حمام فراصوت برای جداسازی تجمعات قبل از اندازه‌گیری به بهینه‌سازی فرآیند آماده‌سازی نمونه کمک می‌کند.

■ ذخیره‌سازی نمونه: نگهداری نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور مستقیم نیز برای بسیاری از نمونه‌ها توصیه می‌شود. بدیهی است که نمونه‌های حساس به دمای پایین از این قاعده مستثنا هستند.

برای جمع‌بندی این بخش می‌توان گفت که پایداری نمونه پیش نیاز اصلی برای اندازه‌گیری دقیق DLS است. تجمع، رسوب‌گذاری و یا تجزیه شیمیایی ذرات می‌تواند نتایج را به طور کامل مخدوش کند. به منظور جلوگیری از بروز چنین مشکلاتی رعایت نکات ذیل ضروری است:

■ از پایدارکننده‌های شیمیایی (سورفکتانت‌ها یا پلیمرها) استفاده شود.

■ شرایط محیطی (pH، دما، قدرت یونی) به دقت کنترل شود.

■ اندازه‌گیری‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن پس از آماده‌سازی نمونه انجام شود.

با رعایت این موارد، می‌توان از خطاهای ناشی از ناپایداری نمونه جلوگیری و داده‌های معتبری برای تحلیل نانوذرات به دست آورد.

■ خلوص نمونه

وجود ناخالصی‌ها (مانند ذرات گردوغبار یا حباب هوا) باعث ایجاد قله‌های کاذب در توزیع اندازه ذرات می‌شود. خلوص نمونه در آزمون DLS نقش اساسی در دقت و صحت اندازه‌گیری دارد.

آلودگی‌های شیمیایی ممکن است بر ویسکوزیته و ضریب شکست محلول تأثیر گذاشته و نتایج را دچار خطا کند. برای جلوگیری از این مشکلات، نمونه باید قبل از اندازه‌گیری فیلتر شده و از حلال‌های خالص و سازگار با ذرات مورد مطالعه استفاده شود. روش‌هایی مانند سانتریفیوژ یا فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی می‌تواند به بهبود خلوص نمونه کمک کند.

به عنوان مثال، نانوذرات لیپوزومی با قطر واقعی ۸۰ نانومتر در یک محلول آبی پراکنده شده‌اند. اگر نمونه دارای حباب‌های هوا یا ذرات گردوغبار باشد، DLS ممکن است قله‌هایی در اندازه‌های ۲۰۰ یا ۳۰۰ نانومتر نشان دهد که مربوط به این ناخالصی‌ها است. این امر می‌تواند منجر به تفسیر نادرست توزیع اندازه و اشتباه در تحلیل پایداری نمونه شود. برای رفع این مشکل، نمونه می‌تواند قبل از اندازه‌گیری به آرامی سانتریفیوژ شده و از طریق فیلتراسیون مناسب، ناخالصی‌ها حذف شوند.

■ ویسکوزیته حلال

ویسکوزیته مایع در آزمون DLS یکی از عوامل کلیدی است که به طور مستقیم بر محاسبه اندازه هیدرودینامیکی ذرات تأثیر می‌گذارد. دستگاه DLS اندازه ذرات را براساس حرکت براونی آن‌ها و ضریب انتشار محاسبه می‌کند. این ضریب از طریق معادله استوکس-اینشتین^{۱۴} به دست می‌آید که در آن ویسکوزیته سیال نقش اساسی دارد. اگر مقدار ویسکوزیته به اشتباه وارد شود، اندازه گزارش شده ذرات نادرست خواهد بود. در محیط‌های با ویسکوزیته بالا، حرکت براونی ذرات کاهش می‌یابد که منجر به کاهش ضریب انتشار و در نتیجه، گزارش اندازه بزرگ‌تر از مقدار واقعی می‌شود. برعکس، اگر ویسکوزیته پایین‌تر از مقدار واقعی در نظر گرفته شود، ضریب انتشار بیش از مقدار واقعی محاسبه شده و اندازه ذرات کمتر از مقدار صحیح گزارش می‌شود. بنابراین، دقت در اندازه‌گیری و استفاده از مقدار صحیح ویسکوزیته، به ویژه در محلول‌های غلیظ، ضروری است.

به عنوان مثال، نانوذرات پلی‌استایرن با قطر واقعی ۱۵۰ نانومتر را در نظر بگیرید که در دو محیط مختلف اندازه‌گیری می‌شوند: آب (با ویسکوزیته ۰/۸۹ mPa.s) و محلول گلیسرول ۵۰ درصد (با ویسکوزیته ۵/۵ mPa.s). اگر هنگام اندازه‌گیری در محلول گلیسرول، ویسکوزیته آن به اشتباه مقدار آب در نظر گرفته شود، دستگاه اندازه نانوذرات را کمتر از مقدار واقعی گزارش خواهد کرد. این خطا می‌تواند باعث تفسیر اشتباه در تحلیل رفتار ذرات، پایداری و میزان پراکندگی آن‌ها شود. برای جلوگیری از این مشکل، ضروری است که مقدار ویسکوزیته دقیق سیال در هر آزمایش به درستی وارد شود.

■ دمای نمونه

دمای آزمون DLS یکی از عوامل کلیدی در دقت اندازه‌گیری

اندازه واقعی ۱۰۲ نانومتر به دست می آید که دقیق تر است. حال اگر نمونه شامل نانوذرات بزرگتر (به عنوان مثال، ۵۰۰ نانومتر) باشد، در زاویه ۹۰ درجه، پراکندگی چندگانه باعث می شود دستگاه اندازه های کوچک تر از مقدار واقعی (به عنوان مثال، ۴۵۰ نانومتر) گزارش کند. اما در زاویه ۱۷۳ درجه، اثرات پراکندگی چندگانه کاهش یافته و اندازه واقعی تر (۴۹۵ نانومتر) به دست می آید. بنابراین، انتخاب زاویه پراش مناسب تأثیر زیادی بر صحت اندازه گیری دارد.

زمان اندازه گیری

زمان اندازه گیری^{۱۶} در آزمون DLS تأثیر مستقیمی بر کیفیت و دقت داده ها دارد. دستگاه DLS برای تحلیل اندازه ذرات، تابع همبستگی را براساس تغییرات شدت نور پراکنده شده در طول زمان ثبت می کند. اگر زمان اندازه گیری خیلی کوتاه باشد، داده های ثبت شده کافی نخواهند بود و نیز در تابع همبستگی افزایش می یابد که منجر به نتایج نادرست یا ناپایدار می شود. برعکس، اگر زمان اندازه گیری خیلی طولانی باشد، ممکن است اثرات محیطی (مانند تغییر دما یا تجمع ذرات) باعث ایجاد انحراف در نتایج شود.

به طور معمول زمان بهینه برای اندازه گیری بسته به غلظت نمونه و اندازه ذرات بین ۳۰ تا ۱۸۰ ثانیه است. برای نمونه های رقیق، افزایش زمان اندازه گیری می تواند نسبت سیگنال به نویز را بهبود دهد، در حالی که برای نمونه های غلیظ، زمان کوتاه تر می تواند از تأثیر تجمع ذرات جلوگیری کند.

فرض کنید نانوذرات پلی استایرن با قطر واقعی ۱۵۰ نانومتر در دو زمان مختلف اندازه گیری شوند:

■ در زمان اندازه گیری ۳۰ ثانیه، اندازه گزارش شده ۱۴۸ نانومتر است، اما تابع همبستگی دارای نویز زیادی است که می تواند منجر به عدم اطمینان در داده ها شود.

■ در زمان اندازه گیری ۹۰ ثانیه، اندازه ۱۵۱ نانومتر به دست می آید و تابع همبستگی صاف و پایدار است که نشان دهنده دقت بالاتر داده ها است.

■ اما در زمان اندازه گیری ۳۰۰ ثانیه، به دلیل تأثیرات محیطی و احتمال تجمع ذرات، دستگاه اندازه های بزرگ تر (به عنوان مثال، ۱۶۰ نانومتر) را گزارش می کند که نشان دهنده تغییرات در نمونه است.

بنابراین، تنظیم زمان اندازه گیری متناسب با نوع نمونه و شرایط آزمایش، برای دستیابی به نتایج دقیق و پایدار ضروری است.

کالیبراسیون دستگاه

کالیبراسیون نادرست یا وجود مشکل در تنظیمات دستگاه، نتایج را غیرقابل اعتماد می کند. توصیه می شود با استانداردهای مرجع (مانند نانوذرات سیلیکا یا پلی استایرن) دقت و صحت عملکرد دستگاه کنترل شود.

اندازه ذرات است، زیرا به طور مستقیم بر حرکت براونی ذرات، ویسکوزیته محیط و در نتیجه ضریب انتشار تأثیر می گذارد. افزایش دما باعث کاهش ویسکوزیته و افزایش تحرک ذرات می شود که منجر به محاسبه ضریب انتشار بیشتر و در نتیجه گزارش اندازه ذرات کوچک تر از مقدار واقعی می شود. برعکس، کاهش دما باعث افزایش ویسکوزیته، کاهش حرکت ذرات و در نتیجه گزارش اندازه های بزرگ تر از مقدار واقعی خواهد شد.

علاوه بر این، دما می تواند بر پایداری نانوذرات تأثیرگذار باشد. برخی نانوذرات مانند پروتئین ها و لیپوزوم ها در دماهای بالا دچار تغییر ساختاری یا تجمع می شوند که باعث ایجاد قله های کاذب در توزیع اندازه می شود. بنابراین، کنترل دقیق دما در طول آزمون برای دستیابی به نتایج دقیق ضروری است. فرض کنید نانوذرات لیپیدی با قطر واقعی ۱۰۰ نانومتر در دو دمای مختلف اندازه گیری شوند: ۲۵ و ۴۰ سانتی گراد. در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، اندازه گزارش شده ۱۰۲ نانومتر است که به مقدار واقعی نزدیک است. اما در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، به دلیل کاهش ویسکوزیته و افزایش حرکت ذرات، اندازه گزارش شده به ۹۰ نانومتر کاهش می یابد. اگر نمونه شامل پروتئین باشد، ممکن است در دمای بالا تجمع ایجاد شود و دستگاه DLS اندازه هایی در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر گزارش کند که نشان دهنده تخریب و ناپایداری نمونه است.

زاویه پراش

انتخاب زاویه تشخیص (به طور معمول ۹۰ درجه یا ۱۷۳ درجه) بر شدت نور پراکنده شده و حساسیت اندازه گیری تأثیرگذار است. در دستگاه DLS، نور لیزر پس از برخورد با ذرات معلق در محیط، پراکنده می شود و آشکارساز این نور پراکنده شده را در زوایای مختلف ثبت می کند. زاویه اندازه گیری به طور معمول بین ۹۰ درجه (زاویه جانبی) و ۱۷۳ درجه (زاویه عقب گرد^{۱۵}) انتخاب می شود. انتخاب زاویه مناسب تأثیر مستقیمی بر حساسیت و دقت اندازه گیری دارد. زاویه های بزرگ تر (۱۷۳ درجه و بالاتر) به طور معمول برای نمونه های غلیظ و دارای ذرات بزرگ تر مناسب هستند. این زاویه ها به کاهش تأثیر پراکندگی چندگانه کمک کرده و نتایج دقیق تری ارائه می دهند.

زاویه های کوچک تر (۹۰ درجه یا کمتر) برای نمونه های رقیق یا دارای ذرات کوچک تر استفاده می شوند، زیرا در این زاویه ها، سیگنال قوی تر و پایدارتر است. اگر زاویه به درستی انتخاب نشود، ممکن است اندازه ذرات بزرگ تر یا کوچک تر از مقدار واقعی گزارش شود و یا حتی قله های کاذب در توزیع اندازه ظاهر شوند. فرض کنید نانوذرات سیلیکا با قطر واقعی ۱۰۰ نانومتر در دو زاویه مختلف اندازه گیری شوند:

■ در زاویه ۹۰ درجه، اندازه گزارش شده ۹۸ نانومتر است که مقدار دقیقی محسوب می شود.

■ در زاویه ۱۷۳ درجه، به دلیل کاهش تأثیر پراکندگی چندگانه،

نتیجه گیری

یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر نتایج DLS، غلظت نمونه است. غلظت‌های بسیار بالا باعث پراکندگی چندگانه می‌شوند که موجب انحراف در نتایج و گزارش اندازه‌های بزرگ‌تر از مقدار واقعی خواهد شد. از سوی دیگر، غلظت‌های بسیار پایین ممکن است منجر به نسبت سیگنال به نویز پایین و ایجاد قله‌های کاذب در توزیع اندازه ذرات شوند. بنابراین، تنظیم مناسب غلظت نمونه در محدوده ایده‌آل، به‌طور معمول بین ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، امری ضروری است.

علاوه‌بر غلظت، پایداری نمونه نیز در دقت نتایج تأثیر زیادی دارد. تجمع ذرات، رسوب‌گذاری و تجزیه شیمیایی می‌توانند نتایج آزمون را به شدت تحت تأثیر قرار دهند. برای جلوگیری از این مشکلات، استفاده از پایدارکننده‌هایی مانند سورفکتانت‌ها و پلیمرهای پایدارکننده (مانند PEG) توصیه می‌شود. همچنین، کنترل pH و قدرت یونی محلول برای جلوگیری از تغییرات ساختاری در ذرات ضروری است. در نهایت، ذخیره‌سازی صحیح نمونه‌ها و انجام آزمایش در کوتاه‌ترین زمان پس از آماده‌سازی می‌تواند دقت نتایج را افزایش دهد.

تنظیمات زاویه پراش، زمان اندازه‌گیری و دمای آزمایش تأثیر مستقیمی بر نتایج آزمون DLS دارند. انتخاب زاویه مناسب برای اندازه‌گیری نور پراکنده شده از ذرات ضروری است.

زمان اندازه‌گیری نیز باید متناسب با شرایط نمونه تنظیم شود. زمان کوتاه ممکن است منجر به داده‌های نویزی شود، در حالی که زمان بیش از حد طولانی می‌تواند به دلیل تغییرات نمونه، نتایج را تحت تأثیر قرار دهد. به‌طور معمول ۳۰ تا ۱۸۰ ثانیه محدوده مناسبی برای اندازه‌گیری در نظر گرفته می‌شود.

همچنین، دمای آزمایش باید به دقت کنترل شود. افزایش دما منجر به کاهش ویسکوزیته و افزایش حرکت ذرات می‌شود که می‌تواند باعث گزارش اندازه‌های کوچک‌تر از مقدار واقعی شود. برعکس، دمای پایین‌تر باعث افزایش ویسکوزیته و کاهش حرکت ذرات خواهد شد که ممکن است اندازه‌های بزرگ‌تری نسبت به مقدار واقعی گزارش شود. بنابراین، انجام آزمایش در دمای کنترل‌شده (به‌طور معمول، ۲۵ درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش دقت داده‌ها می‌شود.

کالیبراسیون دقیق دستگاه DLS یکی از مراحل ضروری برای اطمینان از صحت اندازه‌گیری‌ها است. عدم کالیبراسیون یا استفاده از عوامل نادرست می‌تواند داده‌های غیرقابل اعتماد تولید کند. علاوه‌بر این، استفاده از روش‌های مکمل مانند میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای تأیید نتایج آزمون‌های DLS پیشنهاد می‌شود.

پی‌نوشت

1. Dynamic light scattering (DLS)
2. Transmission electron microscopy (TEM)
3. Scanning electron microscopy (SEM)
4. Multiple Scattering
5. Correlation Function
6. Diffusion Coefficient
7. Signal-to-Noise Ratio
8. Count Rate
9. Aggregation
10. Sedimentation
11. polydispersity index (PDI)
12. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
13. Polyethylene glycol (PEG)
14. Stokes-Einstein
15. Backscatter
16. Measurement Time



Author

Davoud Gharailoui^{1*}* Davoud.Gharailou@gmail.com

1. Technical Director of the DLS Laboratory, Sharif University of Technology Laboratory Services Center

Investigation of Key Factors Affecting DLS Results and Error Reduction Strategies

Abstract

Dynamic Light Scattering (DLS) is a widely used technique for measuring particle size and distribution in the nanometer scale. The accuracy of this method depends significantly on proper sample preparation and precise instrument settings. Sample concentration plays a crucial role in measurement accuracy. High concentrations can lead to multiple scattering, resulting in an overestimation of particle size, while low concentrations reduce signal strength and increase noise. Therefore, optimizing the concentration within the ideal range (0.1 to 1 mg/mL) is essential for reliable results. Sample stability is another critical factor. Particle aggregation, sedimentation, and chemical degradation can distort measurements. To mitigate these issues, the use of chemical stabilizers, pH adjustment, and conducting tests promptly after sample preparation is recommended. Instrument parameters also require careful calibration. Scattering angle, measurement duration, and temperature control are key factors influencing results. A 173-degree angle is preferable for concentrated samples, while a 90-degree angle is more suitable for dilute samples. Additionally, selecting an appropriate measurement duration (30 to 180 seconds) and maintaining temperature control are essential to prevent unwanted variations in particle size measurements.

Keywords

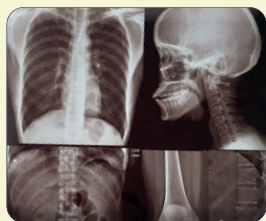
DLS, Dynamic Light Scattering, sample preparation, technical issues, particle size measurements.



Investigation of Key Factors Affecting DLS Results and Error Reduction Strategies



Investigation of the Effect of Reinforcement Installation Conditions Using Chemical Adhesives in Concrete on Pull-Out Resistance



Radiographic Film Interpretation Using Artificial Intelligence and Image Processing Techniques



Sample preparation on filtration in chromatography (Part 1)



Comparison of Acid Digestion and Dry Ashing Methods for Determination of Lead and Cadmium Heavy Metals in Rice by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry



Droplet Polymerase Chain Reaction; A New Step in Molecular Diagnosis