



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۲۰۴۵۴
چاپ اول
۱۳۹۵

INSO
20454
1st.Edition
2016

اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات نانومواد در
سوسپانسیون به روش آنالیز ردیابی مسیر
حرکت نانوذره (NTA)



دارای محتوای رنگی

Measurement of particle size distribution of
nanomaterials in suspension by
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

ICS: 07.030

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج- ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: <http://www.isiri.org>

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: <http://www.isiri.org>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

-
- 1- International Organization for Standardization
 - 2- International Electrotechnical Commission
 - 3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
 - 4- Contact point
 - 5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«اندازه گیری توزیع اندازه ذرات نانومواد در سوسپانسیون به روش آنالیز ردیابی مسیر حرکت

نانوذره (NTA)»

رئیس:

رحیمی، رهبر

(دکتری مهندسی شیمی)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان

دبیر:

کلانتری، احسان

(کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)

کارشناس امور استاندارد اداره کل استاندارد استان سیستان و بلوچستان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه

(کارشناسی ارشد زیست شناسی)

کارشناس کارگروه استانداردسازی فناوری نانو – ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

اعرابی، امیر مسعود

(دکتری مهندسی مواد)

عضو هیئت علمی موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

بهزاد مهر، امین

(دکتری مهندسی مکانیک)

عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان

پوی پوی، حسن

(کارشناسی ارشد شیمی)

دبیر کمیته فنی کارگروه استانداردسازی فناوری نانو – ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

چوخاچی زاده مقدم، امین

(کارشناسی ارشد فناوری نانو)

کارشناس کارگروه استانداردسازی فناوری نانو – ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

رودینی، قدرت الله

(دکتری مهندسی مواد)

عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان

حسینی زری، مریم

(دکتری مهندسی مواد)

عضو هیئت علمی موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

رحمانی، ماشاء الله

(دکتری شیمی تجزیه)

عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو مستقل	رحمانی شستان، شفق (کارشناسی ارشد زبان شناسی)
عضو مستقل	سرگزی، مَنا (کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)
کارشناس استاندارد- بازنشسته سازمان ملی استاندارد ایران	سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)
عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان	شایسته، مسعود (دکتری مهندسی شیمی)
عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان	شفیعی آفرانی، مهدی (دکتری مهندسی مواد)
عضو هیئت علمی دانشگاه علم و صنعت	شکوهی مهر، محمدرضا (دکتری نانو تکنولوژی)
کارشناس کارگروه استانداردسازی فناوری نانو – ستاد ویژه توسعه فناوری نانو	علوی، سید محمد امین (دکتری شیمی معدنی)
عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان	فناپی شیخ الاسلامی، طاهره (دکتری مهندسی برق)
عضو هیئت علمی موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش	قهاری، مهدی (دکتری مهندسی مواد)
کارشناس کارگروه استانداردسازی فناوری نانو – ستاد ویژه توسعه فناوری نانو	گل زردی، سمیرا (کارشناسی ارشد مهندسی مواد)
کارشناس واحد ایمنی شرکت آب و فاضلاب شرق تهران	هومن، مهسا (کارشناسی ارشد HSE)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیئت علمی دانشگاه سیستان و بلوچستان

عضو هیئت علمی دانشگاه علم و صنعت

کارشناس استاندارد- بازنشسته سازمان ملی استاندارد ایران

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

مقدم دیمه، حمید

(دکتری مهندسی شیمی)

میرکازمی، سید محمد

(دکتری مهندسی مواد)

ویراستار:

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ح	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۲	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۶	۴ کلیات
۷	۵ واکنش‌گرها
۸	۶ روش انجام آزمون
۸	۱-۶ صحه‌گذاری
۹	۲-۶ اندازه‌گیری
۱۵	۳-۶ اندازه‌گیری و آنالیز ضریب نفوذ
۱۶	۷ روش آزمون
۲۶	۸ گزارش
۲۸	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات نانومواد در سوسپانسیون به روش آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره (NTA)» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط در سازمان ملی استاندارد ایران تهیه و تدوین شده و در بیست و پنجمین اجلاس هیئت کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۹۵/۱/۲۸ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران - ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ASTM E2834: 2012, Standard guide for Measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات نانومواد در سوسپانسیون به روش آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره^۱ (NTA)

هشدار- در این استاندارد تمامی موارد ایمنی و بهداشتی درج نشده است. در صورت مواجهه با چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن بر عهده کاربر این استاندارد است.

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات معلق از تقریباً ۱۰nm تا آغاز ته‌نشینی بسته به نمونه با استفاده از روش آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره است. این استاندارد روش کاملی برای اندازه‌گیری نانوماده ویژه‌ای را فراهم نمی‌کند؛ بلکه دیدگاه کلی را ارائه می‌کند که علی‌رغم کاستی‌های بالقوه، برای آیین-کاری مناسب توصیه می‌شود.

روش NTA یکی از چند روشی است که قادر به اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات در ناحیه نانو می‌باشد. این استاندارد روش NTA را برای مشاهده مستقیم و اندازه‌گیری حرکت براونی^۲، که به‌طور معمول محدوده مناسب اندازه ذرات را از چندین نانومتر تا ابتدای ته‌نشینی در نمونه است توصیف می‌کند. روش NTA برای سوسپانسیون‌های رقیق ماده جامد در مایع حامل به کار می‌رود. این اولین روش اصولی است (این استاندارد نیاز به واسنجی ندارد). اساس این روش اندازه‌گیری هیدرودینامیکی است و بنابراین اطلاعات مربوط به اندازه را در محیط تعلیق (به‌طور معمول آب) فراهم می‌آورد. بنابراین قطر هیدرودینامیکی به‌طور قطع متفاوت از اندازه قطر تعیین شده توسط سایر روش‌ها است و کاربران روش NTA قبل از مقایسه کردن روش‌ها باید از تفاوت توصیف‌گرهای مختلف قطر ذره آگاه باشند. با این وجود، این روش به‌صورت عادی در صنعت و دانشگاه هم به صورت ابزار تحقیق و توسعه و هم به عنوان یک روش کنترل کیفیت برای توصیف سیستم-های زیر میکرون به کار برده می‌شود.

این استاندارد پایه علمی را برای روش فنی، محدوده اندازه، محدوده غلظت، ملاحظات مربوط به نمونه‌برداری و تهیه نمونه، انتخاب شرایط و آنالیز، تفسیر داده‌ها و مقایسه با سایر روش‌های مکمل ذکر می‌نماید. مقادیر ذکر شده در واحدهای سیستم بین‌المللی یکاها SI، استاندارد در نظر گرفته می‌شوند. سایر واحدهای اندازه‌گیری مشمول این استاندارد نمی‌شوند.

1- Nanoparticle Tracking Analysis
2- Brownian motion

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۷۸۹: سال ۱۳۸۷، آنالیز اندازه ذرات - طیف‌سنجی همبستگی فوتون

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۹۲۲: سال ۱۳۸۸، مواد ذره‌ای - نمونه‌برداری و تقسیم نمونه برای تعیین خواص

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۲، آنالیز اندازه ذرات - پراکندگی نور دینامیک (DLS)

۴-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۳۳۲: سال ۱۳۹۲، نمونه‌برداری رس‌های ظروف سرامیکی بدنه سفید - آئین‌کار

2-5 ISO 13320, Particle Size Analysis—Laser Diffraction Methods

2-6 ASTM E456, Terminology Relating to Quality and Statistics

2-7 ASTM E1617, Practice for Reporting Particle Size Characterization Data

2-8 ASTM E2490, Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

۳ اصطلاحات و تعاریف و کوته‌نوشت‌ها

در این استاندارد اصطلاحات با تعاریف زیر به کار می‌رود:

۱-۳

ضریب نفوذ

diffusion coefficient

اندازه‌ای برای مشخص کردن آهنگ حرکات مولکول یا ذره‌ای خاص در محیط خاص که با جنبش گرمایی^۱ تصادفی، برانگیخته شده است (حرکت براونی).

یادآوری - مقدار اندازه‌گیری شده باید در معادله استوکس - انیشتین قرار گیرد (به معادله ۱، زیر بند ۶-۲-۱-۳ مراجعه شود). واحدهای ضریب نفوذ در اندازه‌گیری‌های آنالیز مسیر حرکت نانوذره (NTA)، به جای واحدهای صحیح SI، m^2/s به-طور معمول cm^2/s هستند.

۲-۳

تکرارپذیری

repeatability

تکرارپذیری در NTA و سایر روش‌های فنی اندازه‌گیری ذره به‌طور معمول به دقت اندازه‌گیری‌های متوالی تکرار شده در همان گروه از ذرات تحت شرایط یکسان اشاره دارد، و با انحراف استاندارد نسبی^۲ (RSD) یا ضریب تغییر^۳ (CV) بیان می‌شود.

یادآوری - ارزش تکرارپذیری، بیانگر پایداری (دستگاهی، ولی عمدتاً نمونه) در طی زمان است.

تغییرات در نمونه می‌تواند شامل پخش^۴، انبوهه^۵ و ته‌نشینی^۶ باشد.

۳-۳

تجدیدپذیری

reproducibility

در روش NTA و اندازه‌گیری ذرات، تجدیدپذیری به اندازه انحراف نتایج به‌دست‌آمده از اولین سهم^۷ و آنچه که از سهم‌های بعدی همان توده به‌دست آمده است، ارجاع داده می‌شود. (و بنابراین تجدیدپذیری به همگن^۸ همگن^۸ بودن یا ناهمگن^۹ بودن ماده شروع و روش نمونه‌برداری به‌کار برده شده مربوط می‌شود). معمولاً به صورت انحراف استاندارد نسبی (RSD) یا ضریب تغییر (CV) بیان می‌شود.

1- Thermal agitation

2- Relative Standard Deviation

3- Coefficient of variation

4- Dispersion

5- Aggregation

6- Settling

7- Aliquot

8- Homogeneity

9- Heterogeneous

یادآوری - در یک سامانه ناهمگن و بس پراکنده^۱ (برای مثال دوغاب^۲)، بزرگترین خطا هنگامی است که نمونه‌های تکراری برداشته می‌شوند. سایر تعاریف تجدیدپذیری به تغییرپذیری در میان نتایج یک آزمون جمع‌آوری شده از چندین آزمایشگاه برمی‌گردد که آزمون درون آزمایشگاهی آن به صورت آزمونگر به آزمونگر، دستگاه به دستگاه، مکان به مکان یا حتی روز به روز انجام می‌شود. همچنین باید در نظر داشت که نمی‌توان همان گروه ذرات را با چنین سامانه آزمونی اندازه‌گیری کرد و مقادیر تجدیدپذیری به طور قابل توجهی بیشتر از ارزش تکرارپذیری باشند.

۴-۳

تحمل پذیری

robustness

معیاری از تغییر عامل مورد نیاز با اعمال تغییرات عمدی و مشخص در هر کدام یا کل عامل‌های کلیدی که آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

یادآوری - برای مثال: مقدار انرژی پخش^۳ ورودی (توان و مدت زمان فراصوت^۴) به احتمال زیاد بر نتایج گزارش شده موثر است. تغییر در pH احتمالاً بر درجه تراکم و غیره تاثیر دارد. توصیف مناسبی از بررسی‌های آزمایش تحمل‌پذیری در دستورالعمل اعتبارسنجی روش‌های اجرایی تحلیلی Q2(R1) موجود است. (به منبع شماره [۱] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود)

۵-۳

نفوذ چرخشی

rotational diffusion

فرآیندی است که به واسطه آن توزیع آماری تعادلی^۵ برای جهت‌گیری کل مولکول‌ها یا ذرات، حفظ یا ذخیره ذخیره می‌شود.

۶-۳

نفوذ انتقالی

translational diffusion

فرآیندی است که به واسطه آن توزیع آماری تعادلی برای مولکول‌ها یا ذرات در فضا، حفظ یا ذخیره می‌شود.

-
- 1- Polydisperse
 - 2- Slurry
 - 3- Dispersion energy
 - 4- Ultrasound
 - 5- Equilibrium statistical distribution

۷-۳

تصویرسازی

visualization

از آنجایی که این امر به روش NTA مرتبط است، ذراتی که زیر حد پراش^۱ هستند، دیده نمی‌شوند؛ هر ذره به صورت یک پراکنده‌کننده نقطه‌ای عمل می‌کند، بدین معنی که سامانه تصویربرداری^۲ فقط نور پراکنده شده از ذره را می‌بیند. این امر امکان شناسایی مکان هر ذره و همچنین بررسی آن را براساس زمان فراهم می‌کند. به زیربند ۶-۲ این استاندارد مراجعه شود.

یادآوری - ممکن است شدت^۳ و شکل الگوی نور پراکنده شده برای هر ذره متفاوت باشد و می‌توان حداقل از لحاظ کیفی اطلاعات بیشتری از این تفاوت‌ها بدست آورد، اما خارج از محدوده این استاندارد است.

۸-۳

صدک (محاسبه شده به‌قرار هر صدی، برحسب درصد)

percentile

مقیاس آماری توزیع اندازه‌ها است. اندازه کمتر از یک درصد معین است که توزیع در آن رخ می‌دهد. برای مثال صدک دهم، اندازه کمتر از مقداری است که ۱۰ درصد ذرات ممکن است، پیدا کنند. این امر در فرم ISO به صورت X_{10} ، X_{50} ، X_{90} و همچنین معمولاً به صورت D10، D50 و D90 بیان می‌شود. صدک پنجاهم میانه است.

۹-۳

ضریب تغییر

coefficient of variation

در آمار اندازه نرمال شده، پراکندگی توزیع است و به صورت انحراف استاندارد تقسیم بر مقدار میانگین تعریف می‌شود.

یادآوری - ضریب تغییر = انحراف استاندارد تقسیم بر میانگین

۱۰-۳

-
- 1- Diffraction limit
 - 2- Imaging system
 - 3- Intensity

انحراف استاندارد نسبی

relative standard deviation

در آمار، مقدار مطلق ضریب تغییر است که به صورت درصدی بیان می‌گردد.

یادآوری - انحراف استاندارد نسبی = ((انحراف استاندارد × ۱۰۰) / میانگین)

۲-۳ کوتاه‌نوشت‌ها

در جدول ۱ کوتاه‌نوشت‌های به کار رفته در این استاندارد فهرست گردیده است.

جدول ۱ - کوتاه‌نوشت‌ها

مخفف‌ها	فارسی	انگلیسی
CV	ضریب تغییر	Coefficient of Variation
CCD	قطعه بار جفت‌شده	Charge-Coupled Device
CMOS	نیم‌رسانای اکسید فلزی مکمل	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
DLS	پراکندگی نور دینامیک	Dynamic Light Scattering
EMCCD	قطعه بار جفت‌شده تکثیر الکترون	Electron-Multiplying Charge-Coupled Device
NTA	آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره	Nanoparticle Tracking Analysis
PCS	طیف‌سنجی همبستگی فوتون	Spectroscopy Correlation Photon
RSD	انحراف استاندارد نسبی	Relative Standard Deviation

۴ کلیات

۴-۱ آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره (NTA) روشی برای مشاهده مستقیم و آنی و آنالیز نانوذرات در مایعات است. ذرات موجود در سوسپانسیون با پرتو لیزر^۱ متمرکز، نوردهی می‌شوند. نور پراکنده شده از هر ذره از طریق عدسی‌های بزرگنمایی کننده متصل به دوربین دیجیتالی مانند CCD قابل رویت هستند. نرم-افزار با شناسایی و ردیابی مسیر حرکت هر ذره با زمان، تصاویر ویدئوی را آنالیز می‌کند. توزیع اندازه ذرات به دست آمده از NTA، یک توزیع مستقیم مبتنی بر تعداد است با اینکه هر ذره به صورت هم‌زمان در میدان دید است اما جداگانه ردیابی و آنالیز می‌شود.

۴-۲ دلیل متمرکز کردن پرتو لیزری این است که فقط ذرات داخل صفحه کانونی بزرگنمایی نوری شده، روشن می‌شوند. ذرات خارج از صفحه کانونی روشن نمی‌شوند و ذراتی که دارای محدوده اندازه کمتر از اندازه مورد بحث هستند، برای دوربین قابل رویت نیستند و این امر منجر به تشکیل تصویری با نسبت سیگنال به نوفه^۲ بالا می‌شود و اجازه می‌دهد تا ذراتی به کوچکی ۱۰ nm قابل رویت شوند. با این وجود خارج از اهداف این استاندارد، این روش قادر است به طور معمول ذراتی به بزرگی حدوداً ۱ μm را اندازه‌گیری کند.

۴-۳ فاصله میانگین حرکات ذرات در تصویر به صورت خودکار به وسیله نرم‌افزار محاسبه می‌شود. از این مقدار، می‌توان ضریب نفوذ ذره را به دست آورد و با استفاده از معادله استوکس- انیشتین اندازه ذره را تعیین کرد.

۵ واکنشگرها

۵-۱ به طور کلی هیچ واکنشگر خاصی برای این روش نیاز نیست. با وجود این، عامل‌های پراکنده‌ساز و تثبیت کننده اغلب برای حفظ پایداری کلوئیدی در طی اندازه‌گیری برای یک آزمایش^۳ ویژه لازم است. برای رسیدن به غلظت مناسبی از ذرات جهت اندازه‌گیری، رقیق کننده مناسبی استفاده می‌شود. اندازه هیدرودینامیکی ظاهری^۴ یا ضریب نفوذ ممکن است در اثر رقیق شدن تغییر کنند، همانند محیط یونی، که در آن ذرات پراکنده می‌شوند، یا در ماهیت یا غلظت تغییر ایجاد کند. این عمل به خصوص هنگام رقیق کردن یک شیرابه تک‌پخشی^۵ قابل توجه است. شیرابه یعنی وجود ذرات ۶۰ nm در محلول 1×10^{-3} M سدیم کلراید که ممکن است قطر هیدرودینامیکی بیش از ۷۰ nm در محلول 1×10^{-6} M (در حد آب دوبار تقطیر) داشته باشند.

1- Laser beam
2- Noise
3- Test sample
4- Apparent hydrodynamic size
5- monodisperse latex

۲-۵ برای کمینه کردن هر تغییری در سامانه در مرحله رقیق‌سازی، استفاده از محلول مادر^۱ (صافیده) معمول است. محلول مادر مایعی است که در آن ذرات به شکل پایدار هستند و معمولاً با سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون یا وارد کردن برخی ترکیبات یونی مایع پراکنده‌ساز در صورت آگاهی از این اجزاء، به دست می‌آید. بسیاری از مواد بیولوژیکی در یک بافر (اغلب بافر فسفات نمکی^۲) با ایجاد شرایط (محدوده) صحیح pH و قدرت یونی برای اطمینان از پایداری سیستم اندازه‌گیری می‌شوند. ناپایداری (معمولاً از طریق پتانسیل زتای ناکافی^۳ - به کتاب‌نامه شماره [۲] این استاندارد مراجعه شود) می‌تواند باعث افزایش بهم‌پیوستگی ذرات شود که آن نیز منجر به ته‌نشینی در یک سیستم جامد-مایع یا پدیده تشکیل حالت خامه‌ای در یک سامانه مایع - مایع (امولسیون^۴) گردد. چنین تغییرات اساسی با پایداری سوسپانسیون تداخل دارند و نیاز به کمینه کردن آنچه روی کیفیت (درستی و تکرارپذیری) اندازه‌گیری‌های گزارش شده تأثیر می‌گذارد، وجود دارد. توصیه می‌شود این موارد در یک آزمایش اعتبارسنجی مورد بررسی قرار گیرند.

۶ روش انجام آزمون

۱-۶ صحه‌گذاری^۵

۱-۱-۶ توصیه می‌شود که عملکرد صحیح دستگاه مورد استفاده برای اندازه‌گیری با توجه به اسناد چاپ شده توسط سازنده دستگاه در محدوده‌های از قبل تعریف‌شده کنترل کیفیت، تأیید گردد. این آزمایش‌های صحت‌سنجی معمولاً شامل استفاده از یک یا چندین ماده مرجع تأیید شده اندازه ذرات کروی قابل‌ردیابی می‌شود. در ناحیه زیر میکرون (کمتر از 10^{-6} m)، این استانداردها گرایش به تک‌پخش^۶ شدن (که توزیع توزیع حالت تک و باریک است، $CV < 1\%$) دارند، و هنگام تأیید محور x (اندازه)، محور y (یا کیفیت) توزیع اندازه را تأیید نمی‌کند. توجه داشته باشید که NTA اولین اندازه‌گیری اصولی است و بنابراین نیاز به واسنجی به معنای رسمی (تنظیم دستگاه برای خواندن مقدار درست و شناخته شده) نیست. در صورت عدم موفقیت در مرحله صحه‌گذاری، مواردی که باید مورد بررسی قرار گیرند شامل کیفیت آب رقیق‌ساز، حالت پراکندگی و پایداری محلول استاندارد حین رقیق‌سازی، علاوه بر مسائل مربوط به ابزار مانند پایداری حرارتی، تمیزی و جهت‌گیری اجزاء نوری می‌شود. می‌توان داده‌های ویدئویی خام را در هنگام و پس از دریافت، مورد بررسی قرار داد. چنین آنالیزی اطلاعات کیفی مفیدی در مورد شرایط نمونه، غلظت ذرات و عملکرد سیستم می‌دهد. در طی دریافت داده‌ها به نظر می‌رسد برای تعدادی از ذرات پایدار در میدان دید، ذرات خوب‌جداشده^۷،

-
- 1- mother liquor
 - 2- Phosphate buffered saline
 - 3- Inadequate zeta potential
 - 4- Emulsion
 - 5- Verification
 - 6- Monodisperse

جدا شده^۱، با سطح پائین اختلال تصادفی یا زمینه‌ای، طول ردیابی ذرات برای اندازه‌گیری دقیق هر ذره کافی باشد. سازندگان همچنین روش‌های دیگری برای اطمینان از اعتبار داده‌ها فراهم می‌آورند و پیشنهاد می‌شود که این پروتکل‌ها به صورت صحیحی مورد مشورت قرار گیرند.

۲-۱-۶ با توجه به احتمال اینکه اندازه استاندارد توسط میکروسکوپ الکترونی^۲ تأیید شده است، باید در مقایسه مستقیم نتایج دقت گردد. زیرا میکروسکوپ الکترونی تحت شرایط خلأ بالا کار می‌کند، اما NTA آنالیز را با ذرات درون سوسپانسیون انجام می‌دهد. روش NTA ضریب نفوذ ذرات را اندازه‌گیری می‌کند و قطر از رابطه استوکس-انیشتین (معادله ۱) به دست می‌آید که همان قطر هیدرودینامیکی کره معادل است (خود ذره به اضافه لایه‌ای با مقیاس مولکولی حلال چسبیده به سطح ذره). این لایه حلال ممکن است با افزایش دادن اندازه ظاهری ذرات، نسبت به اندازه ذرات استاندارد که مورد آنالیز قرار می‌گیرند قابل توجه باشد. برای ذرات بزرگتر، اثر این لایه هیدرودینامیکی به حداقل می‌رسد.

۳-۱-۶ دقت نمایند که تأیید یک سیستم فقط نشان‌دهنده این است که ابزار با مواد استاندارد که قبلاً توصیف شد به خوبی عمل می‌کنند. ملاحظات عملی برای مواد واقعی (بخصوص «پراکندگی» در صورت استفاده در آماده کردن نمونه یا اگر توزیع نسبتاً چند پخشی باشد) بدین معناست که روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری مواد واقعی نیاز به دقت (تکرارپذیری) دارد.

۲-۶ اندازه‌گیری

۱-۲-۶ مقدمه

۱-۱-۲-۶ اندازه‌گیری توزیع اندازه ذره در ناحیه نانو (زیر ۱۰۰ nm) به وسیله آنالیز ردیابی مسیر حرکت نانوذره، به برهمکنش نور با ماده و حرکت تصادفی یا براونی که ذره در محیط مایع در سوسپانسیون آزاد دارد وابسته است. (به منبع شماره [۳] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود) برای رخ دادن پراکندگی نور باید در ضریب‌های بازتابی ذره و محیطی که ذره در آن قرار دارد، غیر همگنی وجود داشته باشد. بدون چنین غیرهمگنی (برای مثال، در سامانه‌های نامیده شده شاخص همسان) پراکندگی وجود ندارد و ذره برای نور قابل رویت نیست و هیچ‌گونه اندازه‌گیری توسط NTA یا هر شیوه دیگری که از پراکندگی نور استفاده می‌کند، نمی‌تواند انجام شود. پوشش دادن یا عامل‌دار کردن ذره اولیه ممکن است به‌طور کافی روی ضریب شکست اثر بگذارد تا آن نیز روی خواص پراکندگی نور اثر بگذارد. تا وقتی که چند پدیده فیزیکی مورد استفاده به وسیله شیوه اندازه‌گیری NTA با شیوه پراکندگی دینامیکی نور مشترک است (طیف‌سنجی همگن

1- Well-Separated particles

2- Electron microscopy

فوتونی)، همانطور که در استاندارد ASTM E2490 و استاندارد ملی ایران به شماره ۱۶۲۴۷ تعریف شده، NTA یک روش کاملاً متفاوت است.

۲-۱-۲-۶ برای ذرات کوچکتر از ۱۰۰ nm، همانطور که در این استاندارد ذکر شده، چند واقعیت وجود دارد:

۱-۲-۱-۲-۶ مقدار پراکندگی بسته به شرایط ضعیف است و به اندازه ترکیب ذره بسیار وابسته است. در ناحیه تقریب رایلی^۱ (نوعاً $d < \lambda/10$) که d قطر ذره و λ طول موج نور به کار رفته است)، بنابراین این شدت پراکندگی با d^6 یا (حجم به توان ۲) یا (جرم مولکولی نسبی^۲ به توان ۲) متناسب است. با استفاده از یک نوع لیزر دیودی (۶۳۸ nm)، حد بالایی اندازه رفتار پراکنش رایلی تقریباً ۶۴ nm است. این به آن معنی است که، در عمل، یک ذره ۶۰ nm یک میلیون بار بیشتر از یک ذره ۶ nm با همان ترکیب نور را پراکنده می‌کند. بنابراین، برای نمونه‌ای که توزیع اندازه ذرات آن گسترده است یا ذرات آلاینده (مانند غبار) را همراه دارد که اغلب در محیط محلی وجود دارند و معمولاً به‌طور قابل ملاحظه‌ای بزرگتر از ماده‌ای است که نیاز به اندازه‌گیری دارد، باید توجه کرد که انتخاب شرایط اندازه‌گیری مناسب برقرار باشد تا تمام ذرات آنالیز شوند. روش NTA قادر است محدوده وسیعی از اندازه ذرات را اندازه‌گیری کند، اما ممکن است پیدا کردن مجموعه‌ای از تنظیمات دستگاهی مشکل باشد تا تمام ذرات را در یک مرحله آنالیز اندازه‌گیری کند. این به آن معنی است که مایعات غریب کننده باید برای نگهداری یا رقیق‌سازی ذرات به حداقل سطح یکسانی از اندازه ذرات که نیازمند تشخیص است، استفاده شود مگر اینکه کاربر آگاهانه این ذرات را در نتیجه نهایی به حساب آورد. متناوباً، دو آنالیز جداگانه با شرایط بهینه‌شده هم برای ذرات کوچکتر و هم ذرات بزرگتر، ممکن است انجام شود، سپس نتایج از هر کدام به همدیگر افزوده شود. در مواردی که دو جمعیت کاملاً مجزا نیستند باید در تفسیر نتایج ترکیب شده بخصوص در ناحیه‌ای که دو آنالیز همپوشانی دارند با دقت عمل کرد.

۲-۲-۱-۲-۶ شدت پراکندگی در ناحیه رایلی، با توان چهارم طول موج نور به کار رفته رابطه عکس دارد. بنابراین اگر طول موج نور برخوردکننده بتواند نصف شود، آنگاه شدت پراکندگی مشاهده شده ۱۶ برابر افزایش می‌یابد. برای افزایش میزان پراکندگی و در نتیجه افزایش سیگنال، می‌توان از لیزرهایی با طول موج کمتر از ۶۳۸ nm استفاده نمود. معمولاً بهتر است توان لیزر را با اثرات نامطلوب ممکنه (برای مثال، گرمایش، جریان همرفت) افزایش داد. اما دقت نماید که طول موج کوتاهتر گاهی برای برخی انواع مولکول-ها با لبه جذب همپوشانی دارد که منجر به از دست رفتن شدت سیگنال می‌شود. یک آشکارساز از نوع دوربین ویدئویی دیجیتالی (مانند CCD، EMCCD، با حساسیت بیشتر یا CMOS) با سرعت فریم و پاسخ

1- Rayleigh approximation region
2- Relative molecular mass

طیفی مناسب برای طول موج لیزری مورد استفاده قرار می‌گیرد. حساسیت دوربین با توجه به سازنده و در مجموع با سایر متغیرهای مورد بحث مانند طول موج و قدرت لیزر، ضریب شکست ذره یا مایع متفاوت است، و ترکیب بندی نوری حد تشخیص کمتر سامانه را تعیین می‌کند.

۳-۲-۱-۲-۶ تعیین اندازه ناحیه زیر ۱۰۰ نانومتر بستگی دارد به اندازه‌گیری میزان حرکت براونی ذره (به-خصوص ضریب نفوذ) که در معادله استوکس-انیشتن به صورت معادله درآمده است:

$$d_H = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (1)$$

که در آن:

d_H قطر هیدرودینامیکی ذره؛

K_B ثابت بولتزمن؛

T دمای مطلق برحسب کلوین؛

η گرانروی برحسب centipoise؛

D_t ضریب نفوذ انتقالی (اندازه گیری شده) بر حسب $\frac{cm^2}{s}$.

۴-۲-۱-۲-۶ توجه نمایید که در معادله (۱) چگالی ذره نقشی در حرکت براونی ندارد (هر چند مطمئناً در ته‌نشینی نقش دارد، به زیربند ۹-۲-۱-۲-۶ این استاندارد مراجعه شود)، اگرچه به نظر غیرمنطقی می‌آید. همچنین دقت نمایید که قطر هیدرودینامیکی ذرات به‌دست آمده باشد. این امر اشاره دارد به اندازه معادل ذره برحسب واحدهای کروی به‌طوری‌که ذره متحرک با همان ضریب نفوذ قابل مشاهده شود. بنابراین، برای یک ذره با شکل نامنظم و یا با ریخت‌شناسی^۱ قابل توجه و یا پوشش سطحی (یا هر دو)، احتمالاً قطر به‌دست آمده با هیچکدام از محورهای اندازه‌گیری شده تصویر ذره مطابقت ندارد (به منبع شماره [۴] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود) گرانروی اشاره به محیطی دارد که در آن ذره پخش می‌شود. در یک سامانه رقیق فرض بر این است که ذره دارای برهم‌کنش نیست، بنابراین می‌توان گرانروی را برای محیط یا رقیق‌کننده در نظر گرفت.

۵-۲-۱-۲-۶ به اصطلاح ضریب نفوذ توجه نمایید. دو نوع نفوذ ذرات برای بررسی در سوسپانسیون آزاد وجود دارد.

(الف) نفوذ انتقالی، که به اصطلاح از رابطه استوکس - انیشتین طبق معادله (۱) استفاده می‌شود. بازنویسی آن با ضریب نفوذ در سمت چپ به صورت زیر است:

$$D_t = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_H} \quad (2)$$

(ب) نفوذ چرخشی، که از رابطه استوکس - انیشتین - دبی استفاده می‌شود.

$$D_r = \frac{K_B T}{\pi\eta d_H^3} \quad (3)$$

۶-۲-۱-۲-۶ تجمع ذرات (یا مولکول‌ها) باعث تغییرات ضریب نفوذ چرخشی می‌شود و هم‌چنین بر ضریب نفوذ انتقالی تاثیر می‌گذارد. بنابراین اثر متقابل ذرات بر هم، تفسیر ضریب نفوذ مشاهده شده را پیچیده می‌کند که در مورد ذرات غیرکروی ترکیبی از ضرایب نفوذ چرخشی و انتقالی است. چنین برهم‌کنش‌های ذره - ذره به جای وابستگی به اندازه ذره به غلظت تمایل دارند و ضرایب نفوذ چرخشی و انتقالی به گرانروی سیال محیط بستگی دارد. غلظت‌های ذرات مناسب روش NTA بسیار رقیق بوده، بنابراین اثرات قابل ملاحظه نمی‌باشند.

۷-۲-۱-۲-۶ حرکت انتقالی براونی در سه بعد انجام می‌شود اما NTA حرکت را در دو بعد مشاهده می‌کند. ممکن است ضریب نفوذ بر مبنای یک، دو یا سه بعد انجام شود. (و از دیدگاه نظری تا شش جهت حرکتی قابل اندازه‌گیری است، اگر چرخش را بتوان اندازه‌گیری کرد). با اندازه‌گیری درجه بالاتری از ضریب نفوذ $D_{r,t}$ ، تقریب درستی را می‌توان از اندازه ذرات به ازای تعداد مراحل که در مسیر حرکت سهمیم است به‌دست آورد. با اندازه‌گیری میانگین مجذور جابجایی ذره در یک، دو یا سه بعد (به ترتیب در معادلات ۴ تا ۶ این استاندارد) D_t به‌دست می‌آید. (به منابع شماره [۵] و [۶] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود)

$$\overline{(x^2)} = \frac{2TK_B t}{3\pi\eta d} \quad (4)$$

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{4TK_B t}{3\pi\eta d} \quad (5)$$

$$\overline{(x, y, z)^2} = \frac{2TK_B t}{\pi\eta d} \quad (6)$$

که در آن:

t زمان بین اندازه‌گیری جابجایی‌های متوالی، در این حالت دوره فریم به فریم است.

الف) در حالتی که اندازه‌گیری حرکت در دو بعد باشد:

$$\frac{\overline{(x, y)^2}}{4t} = D_t = \frac{TK_B}{3\pi\eta d} \quad (7)$$

و بنابراین نتایج به دست آمده با NTA بر حسب تابعی از قطر ذره (d)، به دست می‌آید.

۸-۲-۱-۲-۶ حرکت ذرات باید تصادفی باشد. حرکت غیرتصادفی ذره دلیل اصلی عدم موفقیت یا غیر-کاربردی شدن روش است. چنین حرکت غیرتصادفی به خاطر جریان‌های همرفتی موجود در سیستم، به خاطر ذرات ته‌نشین‌شونده (اندازه بزرگ و یا غلظت بالا ذرات برای روش) در حین مرحله اندازه‌گیری، یا به خاطر ذرات تأثیرگذار بر واکنش شیمیایی یا بار الکتریکی، می‌تواند اتفاق بیافتد. هر چند سیستم می‌تواند چنین حرکتی را اندازه‌گیری و جبران نماید، اما ترجیح می‌دهد که آن را با اندازه‌گیری دمایی درست و ایجاد پایداری تا جایی که ممکن است، کاهش دهد. اگر ته‌نشینی در حین اندازه‌گیری اتفاق بیافتد، چنانچه خیلی کم باشد، نتایج به‌طور حتم درست است، که دلالت بر یک تغییر و سیستم ناپایدار دارد. اگر جامد ته‌نشین شده‌ای در ته ظرف دیده شود، روش NTA توصیه نمی‌شود. در این حالت پراکندگی نور لیزر معمولی احتمالاً روش ترجیحی است. هرگاه ته‌نشینی هم در ظرف نمونه و هم در اتاقک اندازه‌گیری مشاهده شود می‌توان احتمال داد که ماده اصلی مورد اندازه‌گیری «نانو» نبوده و یا در حین اندازه‌گیری ناپایدار شده است.

۹-۲-۱-۲-۶ با در نظر داشتن اندازه و چگالی، محاسبات ارائه شده در جدول ۲ که با استفاده از قانون استوکس می‌باشد را در نظر بگیرید.

۱۰-۲-۱-۲-۶ از جدول ۲ می‌توان استنباط کرد که اگر اندازه یک ماده واقعاً از ۱۰۰ نانومتر کوچکتر است، تمایل دارد که در حالت معلق باقی بماند و اگر کمی هم گرایش به ته‌نشین شدن داشته باشد آن را نشان نمی‌دهد. در بسیاری از موارد، برای مثال در مورد ژل، چگالی ذره به دلیل حضور آب در شبکه ذره، به‌طور قابل توجهی کمتر می‌شود و بنابراین زمان ته‌نشینی بیشتر می‌شود.

۱۱-۲-۱-۲-۶ گاهی به‌نظر می‌رسد که قرار دادن ذرات در یک ماده با گرانشی بالاتر میل به ته‌نشینی را کاهش داده و حتی برطرف کند. این مطلب درست است، اما حرکت براونی نیز به همان نسبت کاهش می‌یابد و هیچ نتیجه‌ای حاصل نمی‌شود.

بیشتر مواد پودری خشک به‌سختی به اندازه اولیه خودشان پخش می‌شوند و بنابراین اندازه‌گیری آنها بازتابی از حالت کلوخه شدن سیستم است نه اندازه واقعی «هنگام تولید» اولیه آنها. بنابراین این استاندارد

فرض را بر این می‌گذارند که کاربر دسترسی به یک سوسپانسون خوب پخش شده، یا آماده‌سازی مناسب ذرات در مقیاس نانو برای اندازه‌گیری، داشته است یا اینکه تمایل به اندازه‌گیری حالت‌های کلوخه شدن می‌باشد.

۱۲-۲-۱-۲-۶ به نکات بدیهی معادله ۱ توجه کنید که عبارتند از:

- با افزایش اندازه ذره مقدار حرکت براونی کاهش می‌یابد.

- با افزایش گرانیوی محیط مقدار حرکت براونی کاهش می‌یابد.

- با افزایش درجه حرارت مقدار حرکت براونی متناسب با آن افزایش می‌یابد.

جدول ۲ - محاسبات ته‌نشینی بر اساس قانون استوکس بصورت تابعی از اندازه و چگالی ($T=298K$)

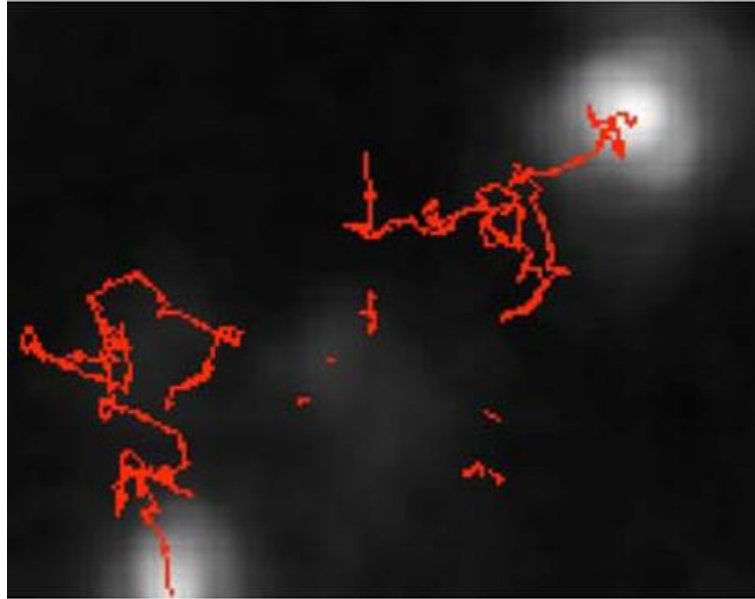
قطر μm	قطر nm	چگالی (ماده) kg/m^3	چگالی (آب) kg/m^3	گرانیوی (آب) 298 K, Poise	زمان ته‌نشینی شدن $1\text{ cm } (1 \times 10^{-2}\text{ m})$ در آب		
					دقیقه	ساعت	روز
۰٫۰۱	۱۰	۲۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۸۱۵۴۹۴٫۳۹	۳۰٫۲۵۸	۱۲٫۶۱
۰٫۱	۱۰۰	۲۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۸۱۵۴٫۹۴	۳۰٫۲۵۸	۱۲٫۶۱
۱	۱۰۰۰	۲۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۸۱٫۵۵	۳٫۰۳	۰٫۱۲۶
۱۰	۱۰۰۰۰	۲۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱٫۸۲	۰٫۰۳	۰٫۰۰۱
۱۰۰	۱۰۰۰۰۰	۲۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۰٫۰۲	۰٫۰۰	۰٫۰۰۰
۰٫۰۱	۱۰	۳۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۰۸۹۲۹۶٫۶۴	۱۸۱۵۴٫۹۴	۷٫۵۶
۰٫۱	۱۰۰	۳۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۰۸۹۲٫۹۷	۱۸۱٫۵۵	۷٫۵۶
۱	۱۰۰۰	۳۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱۰۸٫۹۳	۱٫۸۲	۰٫۰۷۶
۱۰	۱۰۰۰۰	۳۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱٫۰۹	۰٫۰۲	۰٫۰۰۱
۱۰۰	۱۰۰۰۰۰	۳۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۰٫۰۱	۰٫۰۰	۰٫۰۰۰
۰٫۰۱	۱۰	۴۲۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۸۵۱۰۱۳٫۰۰	۱۴۱۸۳٫۵۵	۵٫۹۱
۰٫۱	۱۰۰	۴۲۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۸۵۱۰٫۱۳	۱۴۱٫۸۴	۵٫۹۱
۱	۱۰۰۰	۴۲۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۸۵٫۱۰	۱٫۴۲	۰٫۰۵۹
۱۰	۱۰۰۰۰	۴۲۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۰٫۸۵	۰٫۰۱	۰٫۰۰۱
۱۰۰	۱۰۰۰۰۰	۴۲۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۰٫۰۱	۰٫۰۰	۰٫۰۰۰

۰٫۰۱	۱۰	۵۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۶۰۵۱۶۴٫۸۰	۱۰۰۰۸۶٫۰۸	۴۲۰
۰٫۱	۱۰۰	۵۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۶۰۵۱٫۶۵	۱۰۰٫۸۶	۴٫۲۰
۱	۱۰۰۰	۵۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۶۰٫۵۲	۱۰٫۱	۰٫۴۲
۱۰	۱۰۰۰۰	۵۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۰٫۶۱	۰٫۱	۰٫۰۰۰
۱۰۰	۱۰۰۰۰۰	۵۵۰۰	۹۹۷	۰٫۰۰۸۹۵۵	۱٫۰۱	۰٫۰۰	۰٫۰۰۰

۳-۶ اندازه‌گیری و آنالیز ضریب نفوذ

۱-۳-۶ برای به‌دست آوردن اندازه ذره لازم است تا ضریب نفوذ را برای اندازه‌گیری به معادله (۱) وارد کرد. ضریب نفوذ برای هر ذره در میدان دید به صورت جداگانه تعیین شده و اندازه‌های به‌دست آمده برای ایجاد توزیع اندازه ذره نهایی با هم جمع می‌شوند. این بخش به اندازه‌گیری ضریب نفوذ مربوط است و هدف، تهیه توزیع اندازه ذره از داده‌های اندازه‌گیری شده است.

۲-۳-۶ در مشاهده نور پراکنده شده از گروهی از ذرات متحرک معلق در طی یک دوره زمانی، هر ذره با حرکت براونی حرکت می‌کند. هر ذره در طی مدت زمان حضورش در حجم نمونه‌برداری با توجه به میدان دید دوربین، ابعاد پرتو تابشی و سطح کانونی عدسی بزرگ‌نمایی شناخته شده و ردیابی می‌شود. مجذور میانگین جابجایی هر ذره مستقیماً از تصاویر فایل ویدئویی اندازه‌گیری می‌شود. ابعاد جابه‌جایی (بر حسب پیکسل‌ها) از طریق دانستن بزرگ‌نمایی سیستم و ابعاد هر پیکسل، به جابه‌جایی واقعی تبدیل می‌شود. توصیه می‌شود ابعاد جابجایی برای افزایش دقت اندازه‌گیری جابه‌جایی، واسنجی^۱ یا صحنه‌گذاری شود. ضریب نفوذ از مجذور میانگین جابجایی، محاسبه شده و در معادله (۱) گنجانده می‌شود.



شکل ۱- ردیابی حرکت براونی

۳-۳-۶ هر ذره باید به مدت کافی برای تعیین درستی میانگین جابه‌جایی ردیابی شود. نرم‌افزار، قطر ذرات را بر مبنای آنالیز حرکت براونی آنها با شناسایی و ردیابی مراکز نقاط نور پراکنده شده توسط هر ذره منفرد و سپس اندازه‌گیری فاصله جابه‌جایی بین فریم‌ها، اندازه می‌گیرد. با فرض آهنگ ۳۰ frame/s از دوربین، طول مسیر ردیابی در طی فقط ۰.۵ ثانیه، داده‌های آماری مفیدی برای اکثر ذرات مورد نظر فراهم می‌آید. ممکن است نرم‌افزار به صورت خودکار تعداد حداقل بهینه مراحل را بر مبنای پایش پیوسته اندازه ذره تخمینی انتخاب کند. (به منبع شماره [۷] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود)

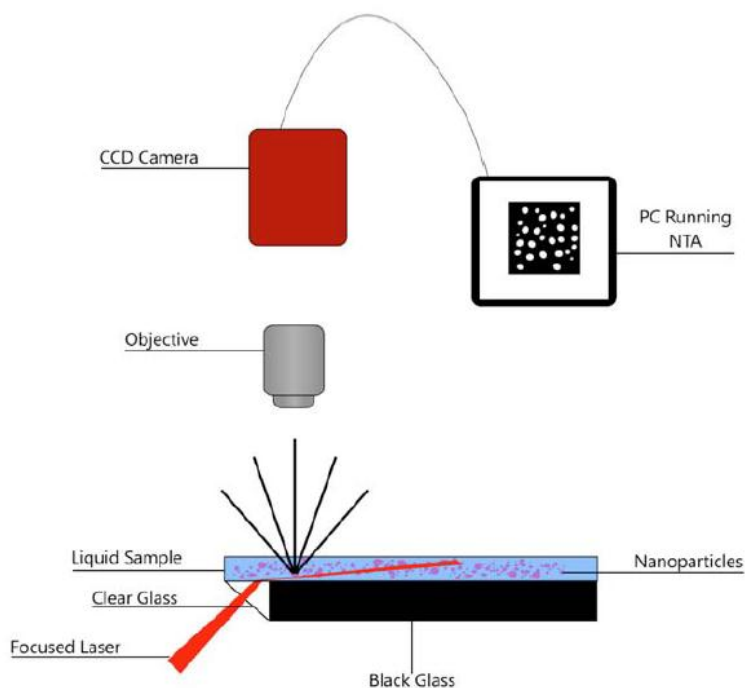
۴-۳-۶ ذرات برای ردیابی مسیرشان باید توسط دوربین آشکار شوند و حد پایین اندازه ذرات را که با روش NTA می‌توان آنالیز کرد، در درجه اول با ترکیب ذره و ضرایب شکست مربوط تعیین می‌شود. مقدار نور پراکنده شده توسط یک ذره در یک جهت معین، تابعی از چند متغیر شامل توان روشنایی برخوردی^۱، طول موج، زاویه و قطبش و اندازه ذره، ضریب شکست مجموعه و شکل و همچنین ضریب شکست حلال^۲ می‌باشد (به منبع شماره [۸] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود). به‌طور مشابه، مقدار نور فرودآمده بر روی آشکارساز و قدرت سیگنال حاصل، البته به راندمان جمع‌آوری عدسی‌ها (در دریچه دیافراگم عددی خاص) و پاسخ طیفی و حساسیت دوربین وابسته است. تنظیمات دستگاه، چه دستی و چه خودکار تنظیم شده باشند، اثر مستقیمی بر پاسخ سیستم به نور پراکنده شده خواهد داشت.

1- Incident illumination power
2- Solvent refractive index

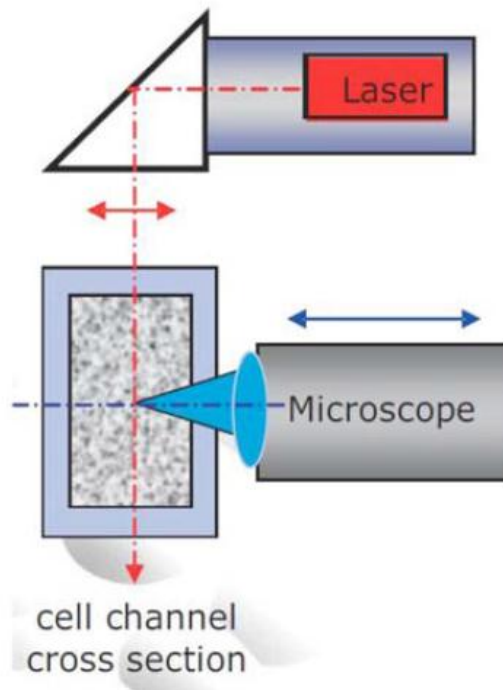
۵-۳-۶ توزیع اندازه ذره بدست آمده از آنالیز NTA به طور طبیعی توزیعی بر پایه تعداد است. با توجه به اینکه ذرات کوچکتر نسبت به ذرات بزرگتر، نفوذ سریع تری در طی زمان اندازه گیری، به داخل یا خارج میدان دید دارند اگر نتیجه نهایی به صورت شمارش ذرات اندازه گیری شده گزارش شود، ذرات کوچکتر بیشتر نمایش داده می شوند. این اثر را می توان با شمارش هر مرحله ای از حرکت ذره به عنوان یک رویداد واحد، به جای شمارش مسیر حرکت کامل ذره به عنوان یک رویداد واحد، خنثی نمود. این کار را می توان برای کل فریم های آنالیز شده به صورت نرمال شده در آورد. با حجم نمونه برداری معلوم، غلظت کل نیز اندازه گیری شده و توزیع اندازه گزارش شده به صورت غلظت ذرات در هر طبقه از اندازه، اندازه گیری می شود (به منبع شماره [۳] کتاب نامه این استاندارد مراجعه شود).

۷ روش آزمون

۱-۷ چندین آرایش نوری توسط سازندگان مختلف برای NTA مبتنی بر سیستم های اندازه گیری به کار می رود. اساساً منبع لیزر در مسیر سلول نمونه متمرکز و هم تراز شده است، در حالی که بزرگنمای نوری (میکروسکوپ) مجهز به یک دوربین ویدئویی ضبط تصاویر است. رویکردهای مختلفی ممکن است برای متمرکز کردن پرتو و تنظیم آن استفاده شود. نمودار کلی از یک آرایش نوری در حال ظهور پرتو در شکل ۲ نشان داده شده است. روش روشن سازی درون سلولی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲- سیستم اندازه گیری NTA برای نشان دادن اجزای اصلی به روش آرایش نوری در حال ظهور پرتو



یادآوری: سایر ترکیبات نوری ممکن است شامل روشنایی از کنار نمونه (عمود بر عدسی‌های میکروسکوپ) یا یک ترکیب روشنایی میکروسکوپی با زمینه سیاه کلی باشد.

شکل ۳- سیستم اندازه‌گیری NTA برای نشان دادن اجزای اصلی به روش روشن‌سازی درون سلولی

۲-۷ اجزا دستگاه

۱-۲-۷ واحد آنالیز نمونه^۱ در روش روشن‌سازی (ظهور پرتو) شامل یک اتاقک مناسب حاوی نمونه پخش‌شده، عنصر نوری و منبع نور، معمولاً یک لیزر دیودی حالت جامد است. پرتو باعث شکست در سطح مشترک بین نمونه مایع و عنصر نوری می‌شود؛ به طوری که توصیف شد از آنجا در یک مسیر تقریباً موازی با سطح مشترک شیشه - نمونه عبور می‌کند. این زاویه وابسته به مایع حاوی ذرات به کار رفته است. این نتایج در یک مسیر نوری سطحی گسترده است که با عمق میدان نوری مطابقت می‌کند، بدیهی است که تنها ذراتی با بزرگنمایی نوری، در عمق میدان، روشن‌سازی می‌شوند، در غیر این صورت ذرات خارج از تمرکز از طریق کاهش نسبت سیگنال به نوفه تصویر در اندازه‌گیری، تداخل ایجاد خواهند کرد. پرتو نوری سپس از ذرات موجود در مواد معلق پراکنده می‌شود. عنصر نوری ممکن است دارای یک سطح فلزاندود باشد و یا از شیشه سیاه^۲ تا یک پس‌زمینه تیره با کنتراست تصویر بالا تهیه شود.

1- Sample analysis module

2- Black glass

۷-۲-۲ واحد آنالیز نمونه از طریق «روشن‌سازی درون- سلولی» شامل یک اتاقک مناسب حاوی نمونه پراکنده‌شده، عنصرنوری و منبع نور، به‌طور معمول یک لیزر دیودی حالت جامد است. پرتو روی نقطه کانونی^۱ لنزهای یک میکروسکوپ در زاویه ۹۰ درجه متمرکز شده است. پرتو نوری سپس از ذرات موجود در مواد معلق پراکنده می‌شود.

۷-۲-۳ ذرات در پرتو توسط یک میکروسکوپ نوری رایج که به‌طور معمول با محور پرتو تنظیم شده است، قابل مشاهده می‌شوند و نورهای پراکنده‌شده از هر ذره در میدان دید جمع‌آوری می‌شوند. ممکن است بزرگ‌نمایی کل سیستم کاملاً تعدیل شود زیرا سیستم تنها به دیدن نور پراکنده‌شده نیاز دارد، نه خود ذرات. ذرات توسط میکروسکوپ به‌صورت نقاط نوری کوچک متحرک و تحت حرکت براونی دیده می‌شوند. دوربین یک دوربین ویدئویی رقمی^۲ است. با توجه به تغییرات قابل توجهی از شدت تصویر هر ذره با اندازه، برخی از تنظیمات دوربین (برای مثال تقویت و سرعت دیافراگم^۳) یا به‌صورت تنظیم دستی یا خودکار توسط نرم‌افزار ارائه می‌شود. باید دقت شود که تنظیمات کافی صورت گیرد تا ذرات با شدت کمتر رویت شود در حالی که کیفیت تصویر مناسب برای همه محدوده ذرات در میدان دید حفظ شود. توصیه می‌شود که این محدوده تنظیمات بخشی از هر یک از آزمایش‌های معتبر باشد.

۷-۲-۴ تصویر ویدئویی با مدت زمان معمول ۳۰ ثانیه تا ۹۰ ثانیه از ذرات متحرک توسط دوربین مجهز به عدسی‌ها گرفته می‌شود. تعداد ذرات اندازه‌گیری شده به غلظت نمونه، حجم پراکندگی، اندازه ذرات (زیرا این مورد بر آهنگ نفوذ اثر دارد) و زمان آنالیز بستگی دارد. هرچه تعداد ذرات اندازه‌گیری شده بیشتر باشد، آنالیز نماینده از کل نمونه بیشتر می‌شود و نتایج تکرارپذیرتر خواهند شد. برای توزیع گسترده‌تر اندازه به اندازه‌گیری بیشتر کل ذره نیاز است، به‌طوری‌که تعداد معنی‌داری از ذرات از نظر آماری لازم است تا در هر کلاس از توزیع اندازه، اندازه‌گیری انجام شود. اندازه‌گیری مجموع ذرات کمتر از ۱۰۰ ذره ممکن است برای مواد تک‌پخشی کافی باشد در حالی که، برای توزیع گسترده ممکن است به چند صد تا هزاران ذره نیاز باشد. کاربر باید تکرارپذیری مورد نیاز و اندازه‌گیری‌های آماری را برای هدف نهایی مورد نظر تعریف کند. برای مثال، اگر خصوصیات دقیق از بخش‌های کمتر توزیع مواد نیاز باشد، پس باید ذرات قابل توجه بیشتری نسبت به حالتی که تنها اندازه متوسط/ میانه/ حالت مورد نظر است، اندازه‌گیری شوند. این تعداد کل به چند-پخشی بودن و شکل توزیع بستگی دارد ولی به‌طور کلی توصیه می‌شود که تعداد به اندازه کافی باشد تا اندازه‌گیری بخش کمتر توزیع، تکرارپذیری و تجدیدپذیری مورد نظر تعریف شده توسط کاربر را فراهم کند.

1- Focal point
2- Digital video camera
3- Shutter speed

۷-۲-۵ تصویر ویدئویی توسط نرم‌افزار آنالیز می‌شود تا مکان هر ذره تعیین شده و حرکت آن در طی زمان ردیابی شود. نرم‌افزار ردیابی شیء^۱ کاربردهای زیادی داشته و همین‌طور روش‌های بسیاری در ورود به جزئیات داخل برنامه وجود دارد (به منابع شماره [۹] و [۱۰] کتاب‌نامه این استاندارد مراجعه شود). ویژگی‌ها و عملیات برنامه بسته به تامین‌کننده متغیر خواهد بود. به‌طور کلی، تصاویر ویدئویی متوالی به صورت قالب به قالب آنالیز می‌شود، به‌طوری‌که هر ذره شناسایی و به‌طور خودکار تعیین مکان شده و حرکت آن با مرور زمان ردیابی می‌گردد. ممکن است پارامترهای مختلف به صورت دستی و یا به‌طور خودکار تنظیم شود تا شرایط برای ردیابی ذره و از بین بردن اختلال نوری بهینه گردد. این پارامترها ممکن است شامل آستانه‌هایی برای شناسایی ذره، بهره، روشنایی، و یا تاری^۲ باشد. بنابراین به کاربر اجازه می‌دهد تا تصویر را برای یک نوع نمونه خاص بهینه‌سازی کند و یا می‌تواند توسط برنامه انتخاب شود. همچنین ممکن است این تصاویر ویدئویی متوالی از لحاظ واضح بودن تصویر، تفریق پس زمینه، تنظیم آستانه‌ها، و یا حذف تاری تنظیم شود و اجازه دهد تا ذرات مورد نظر بدون مزاحمت نورهای سرگردان یا الگوهای پراش که گاهی اوقات می‌تواند با انواع نمونه‌های غیر بهینه رخ دهد، ردیابی شود. بدلیل تفاوت در جزئیات برنامه‌های سازندگان و اینکه حتی نسخه‌های مختلف این برنامه‌ها ممکن است به‌طور قابل توجهی متفاوت باشد، کاربر برای اطلاعات بیشتر به کتابچه راهنمای آموزش برای دستگاه خاص ارجاع داده می‌شود.

۷-۲-۶ پس از آن نتیجه توزیع اندازه ذره به صورت فرکانس و یا هیستوگرام تولید می‌شود. لازم است که کاربر معقول بودن توزیع به‌دست آمده را بررسی کند و اندازه‌گیری‌های متوالی را تکرار نماید تا پاسخ نهایی با قطعیت مشخص شود (بسته به پایداری ماده و ناهمگونی آن). نمونه‌های تکراری تغییر از یک نمونه به نمونه دیگر را مشخص می‌کنند. توصیه می‌شود یک آزمایش تحمل‌پذیری برای تشخیص محدوده‌های قابل پذیرش این تغییرات انجام شود.

۷-۳ نمونه‌برداری

۷-۳-۱ آماده‌سازی یک نمونه نماینده در حالت پایدار و پخش‌شده برای یک آنالیز درست و معنادار حیاتی است. دستیابی به ماده در این حالت موضوع کم‌اهمیتی نیست. استاندارد ملی ایران به شماره ۱۲۹۲۲ (مواد ذره‌ای - نمونه‌برداری و دسته‌بندی نمونه^۳ برای تعیین خواص ذره‌ای) به‌طور گسترده به این موضوع می‌پردازد. راهنمایی‌های مفیدی در منابع شماره‌های [۱۱] و [۱۲] کتاب‌نامه این استاندارد یافت می‌شود، همچنین تعداد زیادی از استانداردها وجود دارد مانند ISO 13320 و استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۷۸۹ (استانداردهای آنالیز اندازه ذرات برای روش‌هایی که الزامات نمونه‌برداری و آماده‌سازی مشابه دارند)، و

1- Object-tracking software
2- Blur
3- Sample splitting

استانداردهای ASTM ، که فقط تعداد محدودی از آنها به سیستم‌های نانو مربوط است (برای مثال، استاندارد ASTM C322).

۷-۳-۲ بررسی روند زمانی (اندازه با گذشت زمان، اندازه‌گیری‌های متوالی، انرژی ورودی- فراصوت^۱) برای توزیع اندازه ذرات در یک مطالعه تکرارپذیری حیاتی است تا از قطعیت و قابل اعتماد بودن نتایج نهایی گزارش شده اطمینان حاصل شود. تجدیدپذیری از یک نمونه به نمونه دیگر را می‌توان با برداشتن بخش‌های تکراری یا جزیی نمونه از همان بخش توده نمونه ارزیابی کرد.

۷-۳-۳ برای برداشتن سهم نماینده از ماده، لازم است تا ماده هنگام استخراج نمونه حرکت نکند. نمونه- برداری به‌طور معمول در محیط دوغابی یا سوسپانسیون، با برداشتن مقدار مورد نیاز از نمونه توسط پی‌پت از یک بشر هم‌زده شده حاوی ماده اولیه انجام می‌شود. اگر نمونه ته‌نشین شده یا در حال ته‌نشین شدن باشد، و ماده فقط از روی سطح آن استخراج شود، واضح است که مقدار پاسخ کوچکتر از مقدار واقعی توده ماده به- دست می‌آید. نمونه‌برداری صحیح از محیط دوغابی به سختی انجام می‌شود و استفاده از یک نمونه‌بردار بورت‌دار^۲ (مانند یک هم‌زننده چرخان^۳ برای پودرها در دوغاب) پیشنهاد می‌شود.

۷-۳-۴ هرچه توزیع اندازه ذره وسیع‌تر باشد، ممکن است مشکلات بالقوه بیشتری در طول نمونه‌برداری و اندازه‌گیری ایجاد شود، به‌ویژه اگر «توزیع» مورد نظر باشد. هرچه توزیع اندازه ذره وسیع‌تر باشد، امکان کلوخه شدن یا ته‌نشینی بیشتر می‌شود که مسائل مربوط به نمونه‌برداری و اندازه‌گیری را پیچیده می‌کند هر چند دوباره این موارد احتمالاً برای سیستم‌های زیر ۱۰۰ نانومتر به درستی کمینه می‌شود.

۷-۳-۵ هنگامی که فقط مقادیر کمی از کل نمونه در دسترس است، بنابراین نمونه‌گیری-جزیی^۴ به احتمال زیاد از نظر آماری برای حصول درستی در سطح مورد نظر و هر مقداری که شاید آنالیز شود، قابل قبول نیست. توجه داشته باشید که محدودیت‌های مشابه در هر روشی که در آن تعداد نسبتاً کمی از ذرات (جرم کوچک، پیکوگرم یا نانوگرم) نمونه‌برداری می‌شود اعمال می‌گردد.

۷-۴ پراکندگی

۷-۴-۱ مشخص کردن هدف اندازه‌گیری قبل از شروع آزمایش مهم است. متأسفانه، اغلب تمایل به دنبال «کوچکترین پاسخ ممکن» است، بدون در نظر گرفتن اینکه آیا مشکل اصلی رئولوژی واحد صنعتی یا مشکل صاف کردن، که با اندازه ذره نمونه توده کنترل می‌شود، یا اینکه اطلاعاتی مرتبط با اندازه ذره اولیه مورد نیاز

1- Sonication
2- Burt sampler
3- Spinning riffler
4- Subsampling

است (انحلال، واکنش‌پذیری، گرفتن یونها از محلول و غیره). توصیه می‌شود هدف اصلی آزمون و تعیین اندازه ذره اولیه در مقابل اندازه حالت کلوخه شده و آنچه که به مفهوم کنترل فرآیند یا کاربرد مواد در شرایطی است که در آن مورد استفاده قرار می‌گیرند، به دقت در نظر گرفته شود. این نیازها و اهداف مقدار انرژی مورد نیاز برای پراکندگی قبل آنالیز را تعیین می‌کند.

۲-۴-۷ استفاده از نتایج نهایی، نیز بسیار مهم می‌باشد مخصوصاً اگر ارزشهای اقتصادی در خطر باشد (برای مثال، کنترل ناپیوسته، بررسی کالاهای وارداتی). ما نیاز به در نظر گرفتن مفاهیمی از یک نتیجه «غیر ویژه»^۱ که در شرایط مالی معنی خواهد داد، داریم. توجه شود که این بیان، این مفهوم را می‌رساند که ما یک ویژگی در محل و یک آزمون در مقابل این ویژگی داریم.

۳-۴-۷ پراکندگی در سیستم‌های کوچک اغلب نیازمند استفاده از مقدار زیاد انرژی (فراصوت) ورودی است، به خصوص اگر ماده در ابتدا به حالت پودری باشد. بعضی مواد (به خصوص مواد بیولوژیکی یا آنهایی که نسبت ظاهری بالایی دارند) احتمالاً قادر به تحمل مقادیر زیاد انرژی ورودی نیستند. توجه شود که ما حرکت براونی سیستم ذره را اندازه می‌گیریم، بعد از آن گروه‌های بهم متصل شده (انبوهه شده یا کلوخه شده یا هر دو) ذرات اولیه مانند یک سیستم منفرد بزرگ‌تر عمل می‌کنند. این واقعیت باید در نظر گرفته شود که این روش قادر به تفاوت گذاشتن بین یک ذره منفرد (بزرگ‌تر) و ذرات کوچک‌تر تجمع یافته یا کلوخه شده، نمی‌باشد.

۴-۴-۷ به موضوع شدت پراکندگی روی اندازه، در زیربند ۶-۲-۱-۲ این استاندارد نیز باید توجه داشت. این روش برای هر ذره کلوخه شده یا بزرگ‌تر در این سیستم، حساس است. از آنجاکه این روش قادر به اندازه‌گیری محدوده وسیعی از ذرات به صورت همزمان است، اغلب مطلوب است که مقادیر کمی از هر ماده بزرگ‌تر موجود حذف شود (بوسیله فیلتر یا سانتریفیوژ کردن)، با درک این واقعیت که توزیع اندازه ذره به‌ویژه بر اساس جرم، تغییر می‌کند. از آنجا که همه ذرات موجود در نمونه را اندازه‌گیری می‌کند و اما شناسایی ذرات از پس زمینه (رقیق‌کننده) غیرممکن است، محاسبه اختلاف پس‌زمینه حلال، ممکن یا عملی نیست. بنابراین پاک‌سازی پس‌زمینه حلال ضروری می‌باشد و صاف کردن مفید است. اندازه‌گیری ذرات در حلال باید برای تعیین کمی آلودگی از این منبع، انجام شود.

۵-۷ غلظت ذره

۱-۵-۷ در یک سیستم برای اینکه از لحاظ آماری تعداد قابل توجهی از ذرات را بتوان آنالیز کرد، نیاز به غلظت معینی از ذرات است. این غلظت به حجم اندازه‌گیری، طول زمانی که نمونه آنالیز می‌شود و اندازه

ذرات موجود بستگی دارد. اما دقت نمایید که غلظت‌های بسیار کم موادی که به صورت ضعیف پراکنده شده‌اند (برای مثال لیپوزوم^۱ها) احتمالاً سیگنال کافی برای اندازه‌گیری منطقی در چندین موقعیت، ایجاد نمی‌کنند.

۷-۵-۲ باید بین الزامات غلظت مناسب ذره که در این غلظت، میزان ذرات به حدی زیاد نیست که باعث برخورد ذرات گردد، تناسب برقرار کرد. بسته به مشخصات حجم اندازه‌گیری، اندازه ذرات موجود و قابلیت‌های نرم‌افزار، هنگامی که ذرات به فاصله خاصی از ذره دیگر می‌رسند، مسیریابی به علت ناتوانی نرم‌افزار در شناسایی جداگانه هر ذره، متوقف شده و امکان آنالیز مسیر ذراتی که از کنار هم عبور می‌کنند، کاهش می‌یابد. در حالی که احتمال جلوگیری از اندازه‌گیری وجود ندارد (مگر این که محلول به قدری غلیظ باشد که دوربین اشباع شود)، مسیرهای منقطع مانع اندازه‌گیری ذرات می‌شوند. در چنین موقعیتی ممکن است آنالیز طولانی‌تری انجام شود تا اثری بر نتایج مشاهده گردد. تعداد کل مسیرهای تکمیل شده یا نسبت مسیرهای تکمیل شده به کل مسیرها می‌تواند نشانه‌ای از این اثر باشد. در نواحی که تنظیم مرحله رقیق-سازی، سخت یا غیرممکن است و همچنان تمایل به اندازه‌گیری وجود دارد، باید دقت کرد که غلظت ذرات کنترل و ثبت گردد.

۷-۶ اندازه‌گیری

۷-۶-۱ برای این که حرکت تصادفی براونی به دقت اندازه‌گیری شود، نیاز است که سیستم در پایداری حرارتی کامل باشد (به‌طور بهینه $10 \pm 0.1^\circ\text{C}$). نتایج بهینه با یک سیستم کاملاً ساکن و بی‌تحرك موقعی به-دست می‌آید که روش قادر باشد جریانهای جابجایی و حرارتی را در سل اندازه‌گیری یا کووت^۲ جبران کند. برای گرم کردن و زمانهای تعادل نمونه، دستورالعمل‌های سازنده دنبال شود. شرایط برای اندازه‌گیری انتخاب گردد، از اینکه پارامترها، به درستی برای ابزار تنظیم شده و این که نمونه به‌طور صحیح در اسناد توصیف می-شود، اطمینان حاصل کنید. پارامترهایی که نیاز به تنظیم یا ثبت شدن دارند عبارتند از:

- طول موج لیزر به کار رفته در آزمایش‌ها؛

- مدت زمان آزمایش و هر زیر آزمایش انجام شده. امکان دارد که اندازه‌گیری به‌صورت مجموعه‌ای متوالی از آزمایشات تکراری با مدت زمان یکسان یا در فواصل زمانی ثابت انجام شود. در این شیوه هر تغییری با زمان (کلوخه شدن، کلوخه‌زدایی، انحلال، ته‌نشینی) می‌تواند رخ دهد؛

- دمای تنظیم یا اندازه‌گیری شده که اندازه‌گیری‌ها در آن انجام شده است؛

- گرانروی مناسب برای مایع استفاده شده در مطالعه؛

1- Liposom
2- Cuvette

- نام کاربر.

۷-۶-۱-۱ برای ارزیابی پایداری سیستم مفید است که اندازه‌گیری‌های متوالی تکراری انجام شود. در این شیوه، سیستم در حال ته‌نشینی یا سایر اثرات نامساعد را می‌توان دید. دوره‌های زمانی اندازه‌گیری مجزا نیاز به تطابق با پیشنهادات سازنده دارد. ذرات بزرگتر (حرکت براونی کمتر) یا توزیع گسترده‌تری از اندازه (تعداد کمتر برای هر طبقه‌ای از اندازه) شاید نیاز به زمان‌های اندازه‌گیری طولانی داشته باشد.

۷-۶-۲ محفظه اندازه‌گیری را قبل و بعد از اندازه‌گیری برای اثبات ته‌نشینی بازرسی کنید.

۷-۶-۳ در پایان اندازه‌گیری، توزیع اندازه به شکل نمودار و جدول تهیه شود. در بعضی حالتها امکان دارد (به‌خاطر محدودیت‌های سیستم و مواد) رویدادهای جنبشی مانند تجمع، انحلال، یا بسپارش با تکرار اندازه‌گیری‌ها در فواصل زمانی مناسب دنبال شود.

۷-۶-۴ مفیدترین عوامل اصلی محاسبه شده / مشتق شده به‌صورت زیر می‌باشند:

- میانگین؛

- میانه؛

- مقادیر درصدی - به‌طور معمول D10, D50, D90؛

- غلظت

۷-۶-۵ سایر اطلاعات را می‌توان نشان داد، اما باید فرضیات برای به‌دست آوردن این اطلاعات مشتق شده دقیقاً فهمیده شود و مضمون گزارش‌دهی این اطلاعات به دقت ارزیابی شود. هنگامیکه توزیع غلظت گزارش‌شده به‌طور مستقیم اندازه‌گیری می‌شود، توزیع بر پایه حجم مشتق شده از ردیابی مسیر نانوذره را می‌توان برای مقایسه یا برای تخمین مقادیر نسبی نمونه‌های چند حالتی (چند پیک اندازه) استفاده کرد، با درک اینکه آمار محدود ممکن است منجر به تغییرپذیری قابل توجهی در این شکل از توزیع‌های جایگزین گردد.

۷-۷ تفسیر و مقایسه با دیگر روش‌ها

۷-۷-۱ نتیجه‌ای که از روش NTA به‌دست می‌آید، توزیع اندازه مبتنی بر تعداد است که مطابق با چگونگی حرکت ذره درون مایع (قطر هیدرودینامیک) می‌باشد. ذرات غیرکروی در جهات مختلف در امتداد محورهای مختلف حرکت می‌کنند، اما NTA حرکت کل را در طول زمان مشاهده اندازه‌گیری می‌کند، بنابراین، قطر هیدرودینامیک معادل کروی براساس این نفوذ کلی به‌دست می‌آید. توزیع اندازه ذرات به‌دست آمده بر مبنای

مجموع همه ذرات اندازه‌گیری شده می‌باشد. اگر شرایط برای اندازه‌گیری محدوده اندازه ذره داده شده (یا شدت) نامناسب باشد، این ذرات در نتیجه نهایی گنجانده نخواهد شد.

۲-۷-۷ همان‌گونه که در استانداردهای ASTM E2490 و ISO 22412 تعریف شده است، روش PCS روش رایج اندازه‌گیری نانوذره است. نتیجه میانگینی که از PCS به دست می‌آید میانگین شدت-وزن (به طور معمول به عنوان میانگین Z شناخته شده است) است که مطابق با چگونگی حرکت‌های ذره درون مایع و برهم‌کنش‌ها با نور می‌باشد. از آنجاکه شدت متناسب با d^6 (یا v^2 یا mw^2) است، میانگین Z به سمت ذرات بزرگتر توزیع اندازه ذره متمایل می‌شود. به بیان ساده اگر ما یک ذره ۱۰۰ نانومتری داشته باشیم، معادل با شدت وزن 10^{12} (۱ تریلیون) از ذرات یک نانومتری است. این متفاوت از آزمایش پراش لیزر کلاسیک می‌باشد که در آن وزن حجمی 10^6 (یا ۱ میلیون) ذره یک نانومتری معادل با ذره ۱۰۰ نانومتری منفرد است که در شرایط جرمی صحیح می‌باشد (برای چگالی ثابت ذره). بنابراین یک نمونه چند پخشی ممکن است به طور معناداری نتایج متفاوتی از نتایج NTA بدهد. به منبع شماره [۱۳] کتاب‌نامه این استاندارد برای مقایسه گسترده مراجعه شود. توجه شود که با هر نوع میکروسکوپی، ذره یک نانومتری هم-ارزی برابر (یا وزن) با ذره ۱۰۰ نانومتری دارد حتی اگر آنها تفاوت زیادی در جرم (و بنابراین وزن در توزیع-های اندازه گزارش شده نهایی) داشته باشند. بنابراین تبدیلات به سایر توزیع‌ها که خواننده به احتمال زیاد با آن آشنا است (برای مثال، حجم یا تعداد)، دارای خطر هستند. به زیربند ۷-۸ این استاندارد مراجعه شود.

۳-۷-۷ درستی توزیع ارائه شده به محدودیت‌های روش بحث شده قبلی بستگی دارد. بنابراین داشتن اطلاعات قبلی درباره ماهیت نمونه به منظور نتیجه‌گیری از اینکه آیا جواب گزارش شده منطقی است یا نه، برای کار سودمند خواهد بود و مقایسه با سایر روش‌ها برای ایجاد اطمینان در مجموعه‌ای از نتایج، مفید می‌باشد. در خیلی از موارد، بعضی از انواع مشاهده مستقیم تعداد ذرات معتبر، از دیدگاه آماری مطلوب است. برای محدوده اندازه نانو (کوچکتر از ۱۰۰ nm) فقط میکروسکوپی الکترونی یا میکروسکوپی نیروی اتمی کاربرد دارد. باید توجه داشت که اغلب گرفتن تصاویر برای تعدادی از سیستم‌های بیولوژیکی خیلی مشکل است، برای مثال، مایسل^۱ها، پروتئین‌ها یا مواد دیگر مانند امولسیون‌هایی که به طور معمول نیازمند روش-های ویژه (برای مثال انجماد - شکستگی) هستند.

۴-۷-۷ برای توزیع‌های باریک ($RSD < 10\%$) یک مشکل ذاتی کوچک در آنالیز فایل‌های ویدئویی خام جهت تعیین اطلاعات اندازه ذره، وجود دارد. برای توزیع‌های پهن‌تر ($RSD > 10\%$)، باید توجه شود تا اطمینان حاصل گردد که روشها و شرایط مناسب برای اطمینان از نتایج قابل اعتماد، انتخاب گردند. زمان آنالیز، تنظیمات ضبط تصویر و غلظت نمونه متغیرهایی هستند که نیاز است مورد توجه قرار گیرند.

۷-۸ تبدیل توزیع غلظتی به سایر توزیع‌های اندازه ذره

۷-۸-۱ با هر روشی، معتبرترین نتایج آنهایی هستند که در قالب طبیعی روش گزارش شده باشند. تبدیل به سایر انواع توزیع ممکن است از لحاظ ریاضی معتبر باشد، اما لازم است فرضیه‌های کسب اطلاعات به دست آمده با دقت درک شوند و مفاهیم گزارش این اطلاعات نیز به دقت مورد ارزیابی قرار گیرند. تغییرات کوچک در داده‌های جمع‌آوری شده می‌تواند منجر به تغییرات زیادی در نتایج به دست آمده شود به گونه‌ای که در نتایج به دست آمده باید شک داشت و احتیاط نمود. برای تبدیل غلظت به توزیع حجمی، استفاده از داده‌های تجربی عاری از نوفه مناسب می‌باشد. هرچه توزیع ابتدایی وسیع‌تر باشد، خطاهای بالقوه در تبدیل بزرگتر هستند.

۷-۸-۲ علی‌رغم هشدارها و احتیاط‌های مذکور، تبدیل به توزیع حجمی - وزنی^۱ اغلب ممکن است نشانه برتری نسبی دو یا چند پیک گزارش شده باشد. موقعیت معمولی این است که بینیم یک پیک کوچک ظاهراً خاص تقریباً ناپدید شود و پیک بزرگ با شدت کم پس از تبدیل به حجمی-وزنی، به حالت اولیه برگردد.

۸ گزارش نتایج

۸-۱ به استاندارد ASTM E1617 مراجعه شود.

۸-۲ علاوه بر اطلاعات گرافیکی و جدولی، حداقل موارد زیر در گزارش ذکر می‌شود:

۸-۲-۱ نوع، سازنده و شماره سریال دستگاه. نسخه به کار رفته نرم افزار؛

۸-۲-۲ تاریخ و نتایج آخرین صحه‌گذاری. جزئیات قابلیت ردیابی استانداردهای به کار رفته؛

۸-۲-۳ تاریخ اندازه‌گیری همراه با نام و وابستگی، شخصی که اندازه‌گیری را انجام داده؛

۸-۲-۴ جزئیات نمونه شامل ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده آن. اطلاعات شکلی در صورتی که به وسیله میکروسکوپ الکترونی یا میکروسکوپ نیروی اتمی^۲ به دست آمده، مفید است.

1- Volume-Weighted distribution

2- Atomic force microscopy

۸-۲-۵ جزئیات شرایط پراکندگی (غلظت ماده، مایع استفاده شده، زمان آلتراسونیک^۱، فرکانس و توان، عامل فعال سطحی و پایدارکننده و غلظت آنها، اگر به کار رفته) و شواهد نشان دهنده پراکندگی کامل یا رسیدن به اندازه ذره اولیه.

۸-۲-۶ شرایط اندازه‌گیری- زمان اندازه‌گیری، طول موج لیزر، دوره تثبیت پیش از اندازه‌گیری، دما. دفعات اندازه‌گیری.

۸-۲-۷ حداقل سه مرتبه اندازه‌گیری تکراری متوالی. این مورد (به‌خصوص) ثبات ماده و دستگاه را در طول مدت اندازه‌گیری‌ها نشان می‌دهد. استفاده از انحراف استاندارد نسبی (RSD) یا ضریب تغییرات (CV) بسیار توصیه می‌شود.

۸-۲-۸ حداقل سه سهم /نمونه مجزا از همان توده، تحت شرایط یکسان اندازه‌گیری شود که هر نمونه به شرح بالا دست‌کم سه اندازه‌گیری تکراری متوالی داشته باشد. این مورد همگن بودن یا غیر همگن بودن توده و تکرارپذیری سهم تا سهم را نشان می‌دهد.

1- Ultrasound time

۹-۲-۸ شرایط اندازه‌گیری

۱-۹-۲-۸ گرانروی محیط (برای معادله استوکس-انیشتن). توجه شود که این گرانروی‌ایی است که ذره (ذرات) در تماس‌شان با محیط تجربه می‌کنند. این مقدار برابر است با گرانروی در تنش صفر.

۲-۹-۲-۸ دمای نمونه.

۳-۹-۲-۸ تنظیمات ضبط تصویر و آنالیز.

یادآوری- شامل هر تنظیم مرتبط شرح داده شده در بند ۷.

کتابنامه

- [1] International Conference on Harmonisation, *Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Published in the Federal Register, 19 May 1997, Vol 62, No. 96, p. 27463–7.
- [2] Hunter, R.J., *Zeta Potential in Colloid Science*, Academic Press, New York, 1981.
- [3] Malloy, A., and Carr, R., “NanoParticle Tracking Analysis—The Halo System,” *Particle & Particle Systems Characterization* (Special Issue: Particulate Systems Analysis), Vol 23, No. 2, 2006, pp. 197–204.
- [4] Pecora, R., (Ed.) *Dynamic Light Scattering, Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1985.
- [5] Chandrasekhar, S., “Brownian Motion, Dynamical Friction, and Stellar Dynamics,” *Reviews of Modern Physics*, Vol. 21, Num. 3, July 1949, pp. 383–388.
- [6] Einstein, A., and Fürth, R., translated by Cowper, A., “On the Movement of Small Particles Suspended in a Stationary Liquid Demanded by the Molecular-Kinetic Theory of Heat,” *Investigations on the Theory of the Brownian Motion*, Dover Publications, New York, 1926.
- [7] Saveyn, H. , De Baets, B., Thas, O., Hole, P., Smith, J., and Van der Meeren, P., “Accurate particle size distribution determination by Nanoparticle Tracking Analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 352, December 2010, pp. 593–600.
- [8] Provencher, S.M., “Low-bias Macroscopic Analysis of Polydispersity,” *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry (UK), Special Publication No. 99.
- [9] Crocker, J. and Grier, “Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 179, 1996, pp. 298–310.
- [10] Kalaidzidis, Y., “Multiple objects tracking in fluorescence microscopy,” *Journal of Mathematical Biology* , Vol 58, 2009, pp. 57–80.
- [11] Jillavenkatesa, A., Lin-Sien H. Lum, and Dapkunas S., *Particle Size Characterization*, NIST Recommended Practice Guide, Special Publication 960-1, National Institute of Standards and Technology, January 2001.
- [12] Allen, T., *Particle Size Measurement*, 5th Edition, Volume 1, Chapter 1, Chapman & Hall, London, 1993.

- [13] Filipe, V., Hawe, A., and Jiskoot, W., “Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates,” *Pharmaceutical Research*,(2010) Vol. 27, No. 5, pp. 796-810.