استاندارد ملی ایران

۲۱۱۹۷

چاپ اول

۱۳۹۵

جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization

INSO

21197

1st. Edition

2016

سنجش تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای نانو مواد زیستی

Measurement of electrophoretic mobility and zeta potentialof nanosized biological materials

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 تهران- ایران
تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)
دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)
رایانامه: standard@isiri.org.ir
وبگاه: http://www.isiri.org

(Iranian National Standardization Organization (INSO
No. 2592 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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ 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 منصفانهٔ 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 پیشنهادها در کمیتهٔ 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 درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ 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)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] 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 استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی 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، گواهینامهٔ 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
« سنجش تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای نانو مواد زیستی »

رئیس:	سمت و/ یا محل اشتغال
مسروری، حسن (دکتری شیمی)	عضو هیئت علمی - پژوهشگاه استاندارد
دبیر:	
میرزاجانی دمنه، فاطمه (دکتری فیتوشیمی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه شهید بهشتی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست شناسی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
آگند، فریما (کارشناسی ارشد شیمی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
زهری، نرگس (دکتری شیمی)	عضو هیئت علمی – دانشگاه مالک اشتر
سهرابی جهرمی، ابوذر (دکتری نانو مواد)	مدیر عامل شرکت راصد توسعه و فن آوری نانو
علی‌احمدی، آتوسا (دکتری، میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه شهید بهشتی
قاسم‌پور، علیرضا (دکتری شیمی تجزیه)	عضو هیئت علمی- دانشگاه شهید بهشتی
قرایلو، داوود (کارشناسی ارشد نانو)	مدیر فنی DLS- دانشگاه صنعتی شریف

ویراستار: نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	۵
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف، نمادها و کوته نگاشت ها	۲
۳-۱ اصطلاحات و تعاریف	۲
۳-۱-۱ حرکت براونی	۲
۳-۱-۲ ثابت دی‌الکتریک	۲
۳-۱-۳ تحرک الکتروفورتیک	۲
۳-۱-۴ نقطه ایزوالکتریک	۲
۳-۱-۵ تحرک	۳
۳-۱-۶ واکنش اکسایشی-کاهش	۳
۳-۱-۷ پایداری	۳
۳-۱-۸ نیروی واندروالس	۳
۳-۱-۹ پتانسیل زتا	۳
۳-۱-۱۰ زوج یون	۳
۳-۲ نمادها و کوته نگاشت ها	۴
۴ کلیات	۴
۴-۱ نکات مورد توجه	۵
۴-۲ برخی نکات در مورد مولکول‌های زیستی و انواع مشابه	۹
۵ ارتباط دامنه پتانسیل زتا و پایداری	۱۰
۶ مواد مورد نیاز	۱۱
۶-۱ کلیات	۱۱
۶-۲ تنظیم pH	۱۲
۶-۳ سایر افزودنی‌ها	۱۲
۶-۴ رقیق سازی نمونه	۱۳
۷ روش کار	۱۳
۷-۱ کلیات	۱۳
۷-۲ تمیزی و خلوص سیستم و مرطوب کردن الکترود	۱۴
۷-۳ ورود نمونه به دستگاه	۱۶
۷-۴ اندازه‌گیری	۱۶
۷-۵ تفسیر نتایج	۱۶
۸ دقت و اریبی	۱۶
۸-۱ کلیات	۱۶
۹ گزارش	۱۷
پیوست الف کتابنامه	۱۹

پیش‌گفتار

استاندارد «سنجش تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای نانو مواد زیستی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط در سازمان ملی استاندارد ایران تهیه و تدوین شده و در سی و دومین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۰/ ۰۸/ ۱۳۹۵ تصویب شد، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان 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 تجدید نظر 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 E2865-12: 2012, Measurement of Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Nanosized Biological Material

سنجش تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتای نانو مواد زیستی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارایه توصیه‌هایی در زمینه سنجش میزان تحرک و پتانسیل زتای سیستم‌های حاوی موادزیستی مانند پروتئین، DNA، لیپوزوم و سایر ترکیبات آلی دارای ابعاد نانو (nm <۱۰۰) است. در این استاندارد، مقادیر مندرج در واحد SI به‌عنوان استاندارد درنظرگرفته شده‌است. هیچ واحد دیگری از اندازه‌گیری‌ها در این استاندارد گنجانده نشده است.

در این استاندارد به کلیه مخاطره‌های ایمنی منتج از کاربرد، پرداخته نشده‌است. مسئولیت برقراری شرایط ایمنی و بهداشتی، کنترل و نظارت بر حسن انجام آزمایش‌ها به‌عهده کاربر است.

۲ مراجع الزامی

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

درصورتی که 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 به آنها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربران این استاندارد الزامی است:

2-1 E1470 Test Method for Characterization of Proteins by Electrophoretic Mobility
2-2 E2456 Terminology Relating to Nanotechnology
2-3 ISO 13099-1 Colloidal systems — Methods for zeta potential determination — Part 1: Electroacoustic and electrokinetic phenomena
2-4 ISO 13099-2 Colloidal systems — Methods for zeta potential determination — Part 2: Optical methods
2-5 ISO 13321 Particle Size Analysis — Photon correlation spectroscopy

اصطلاحات و تعاریف، نمادها و کوته‌نوشت‌ها

۳-۱ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد علاوه بر اصطلاحات و تعاریف به‌کار رفته در استاندارد ASTM E2456، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به کار می‌رود.

۳-۱-۱ حرکت براونی

Brownian motion

حرکت تصادفی ذرات معلق در یک سوسپانسیون است که به‌دلیل برخورد آنها با مولکول‌ها یا اتم‌های سایر ترکیبات معلق ایجاد می‌شود.

۳-۱-۲ ثابت دی‌الکتریک

dielectric constant

میزان نفوذپذیری[1] و جابجایی نسبی یک ماده در میدان الکتریکی با بسامد صفر را ثابت دی‌الکتریک (یا گذردهی نسبی در حالت سکون) آن ماده می‌نامند.

یادآوری - از نظر عملی، عبارت است از نسبت میزان انرژی الکتریکی ذخیره شده در ماده به ازای اعمال ولتاژ، به مقدار انرژی ذخیره شده در خلاء.

۳-۱-۳

تحرک الکتروفورتیک

electrophoretic mobility

نسبت حرکت ذرات معلق و پراکنده شده به‌وسیله میدان الکتریکی به کل جریان اعمال شده (اغلب یکنواخت درنظر گرفته می‌شود) است.

۳-۱-۴

نقطه ایزوالکتریک

1- Permittivity

isoelectric point

محدوده‌ای که حرکت الکتروفورتیک در آن وجود نداشته باشد.

۳-۱-۵

تحرک

mobility

[به بند **۳-۱-۳** مراجعه شود]

۳-۱-۶

واکنش اکسایش- کاهش

redox reaction

واکنش شیمیایی که در آن عدد اکسایش (یا حالت اکسایشی) اتم‌های تشکیل‌دهنده تغییر می‌کند.

۳-۱-۷

پایداری

stability

تمایل ذرات معلق به عدم پراکنش در محیط سیال، در طول مدت زمان مشخص (به‌عنوان مثال: در طول زمان انجام آزمایش و نگهداری در شرایط 358K).

یادآوری- در برخی موارد (مانند کلوئیدهای فلوکولی [1] با پایه آبی) ناپایداری می‌تواند ویژگی مطلوب باشد.

۳-۱-۸

نیروی واندروالس

Van der Waals forces

نیروهایی که بین ذرات و یا مولکول‌ها وجود دارد.

یادآوری- این نیروها از عوامل عامل جاذبه بین مولکول‌ها و ذرات در طبیعت بوده (چرا که این نیروها باعث کاهش سطح انرژی سیستم می‌شود) و برای جلوگیری از جاذبه میان مولکول‌ها و ذرات باید اقدامات خاصی را انجام داد.

1- Colloid flocculation

۳-۱-۹

پتانسیل زتا

zeta potential

اختلاف پتانسیل بین محیط پخش و لایه ساکن ایجاد شده حول ذره پخش‌شده در آن سیال است.

۳-۱-۱۰

زوج یون

zwitterionic

مولکولی که همزمان دارای بار مثبت و منفی است.

یادآوری- اسیدهای آمینه بهترین مثال از این نوع ترکیبات هستند.

۳-۲ نمادها و کوته نوشت‌ها

Brownian motion	حرکت براونی
dielectric constant	ثابت دی‌الکتریک
electrophoretic mobility	تحرک الکتروفورتیک
isoelectric point	نقطه ایزوالکتریک
mobility	تحرک
redox reaction	واکنش اکسایش-کاهش
stability	پایداری
Van der Waals forces	نیروی واندروالس
zeta potential	پتانسیل زتا
zwitterionic	زوج یون

۴ کلیات

هدف از تدوین این استاندارد مرور اطلاعات تئوری در زمینه پتانسیل زتا و قوانین کاربرد آن در مورد بررسی تغییرات پایداری و بار ذرات در سیستم‌های کلوئیدی یا سوسپانسیون نیست. لازم به ذکر است بررسی نحوه تحرک و جابجایی ذرات تحت میدان الکتریکی، نتایج مفید و کارا داشته و نیازی به مطالعه مستقیم پتانسیل زتا نیست. در ارتباط با این موضوع کتاب‌های متعدد [۱] و یا برخی مستندات علمی سازمان استاندارد [استانداردهای ISO 13099-1 و ISO 13099-2] وجود دارند. همچنین سازمان IUPAC[1]، [۲]، گزارشی بسیار مفید و البته تئوری را در این زمینه منتشر کرده است. این گزارش هم‌چنین دارای زیربند ۴-۱-۲، با عنوان «چگونه و تحت چه شرایطی می‌توان تحرک الکتروفورتیک را به پتانسیل زتا تبدیل کرد»، است [۳]. این مرجع حاوی پیشنهادات کاربردی مفیدی برای اندازه‌گیری حرکت پروتئین‌ها است و برای مطالعه توصیه می‌شود.

استاندارد ASTM E1470 بر پایه تجهیزاتی با فروشندگان منحصربفرد[2] است ولیکن در آن دستورکار نحوه اندازه‌گیری و مطالعه ذکر نشده است. یکی از اهداف استاندارد حاضر، رفع این کمبود و ارایه روش کاربردی است.

۴-۱ نکات مورد توجه:

۴-۱-۱ پتانسیل زتا حاصل کلیت یک سیستم ذره‌ای[3] است. بنابراین ویژگی‌های محیطی که ذره درون آن قرار دارد (مانند pH، غلظت، قدرت یونی و یون‌های چند ظرفیتی)، به شکل مستقیم روی مقدار پتانسیل زتا و در برخی موارد بر علامت بار (مثبت یا منفی بودن) آن موثرند. به‌عنوان مثال، مقدار کمی (یک میلیونیوم) از یون‌های چند ظرفیتی (مانند یون کلسیم (Ca^{2+})، آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+})) و یا اندکی ناخالصی موجود در محیط بر مقدار پتانسیل زتا تاثیر زیادی دارند. همچنین واضح و مشخص است که برای ذرات پودری، پتانسیل زتا مفهومی نداشته و اغلب این موضوع آشکار، در مطالعات نادیده گرفته می‌شود.

۴-۱-۲ محاسبه پتانسیل زتا از روی اندازه‌گیری میزان تحرک، معمولا به حرکات نامحدود ذرات در سوسپانسیون مربوط می‌شود. در محیط شلوغ (با غلظت‌های بالا) برهمکنش‌های میان ذرات، سهولت حرکت ذرات را محدود می‌کند. در چنین شرایطی، با آنکه حرکت ذرات قابل مشاهده و اندازه‌گیری است، ممکن است باعث مشکلاتی در محاسبه و تبدیل نتایج به پتانسیل زتا شود.

۴-۱-۳ پتانسیل زتا فقط در مورد ذرات با ابعاد کمتر از ۵ میکرومتر (شامل ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر موضوع موردتوجه در این استاندارد) که نیروهای درونی آنها تقریباً معادل نیروهای جاذبه وان‌دروالسی هستند، اهمیت پیدا می‌کند. بنابراین در صورت ته‌نشینی[4] سیستم، (ابعاد و چگالی ذرات نسبت به محیط پیرامون

1- International Union of Pure and Applied Chemistry
2- Sole vendor
3- Particulate system
4- Sedimentation

منجر به ته‌نشینی می‌شود) روش مطالعه بر اساس پتانسیل زتا و یا تحرک ذره‌ای ایده‌آل نیستند. به‌دلیل ته‌نشینی زیاد در این سیستم‌ها، محاسبه تحرکات ذره‌ای و یونی اغلب دچار خطا می‌شوند. حد پایین[1] تحرک الکتروفورتیک متاثر از نسبت سیگنال به نویز است، که این نسبت، تحت تاثیر عوامل متعددی مانند اندازه، غلظت و ضریب شکست نسبی ذرات تشکیل دهنده سیستم است. بنابراین بررسی دقیق تحرک الکتروفورتیک در مورد ذرات با اندازه‌های کوچک غیرممکن است.

۴-۱-۴ عملکرد پتانسیل زتا و مجموعه اثرات ناشی از آن روی پایداری سیستم‌های آبی تا حدود زیادی مشخص شده است [۴]. ارتباط آشکار و معینی بین فرمولاسیون یا پایداری محصول نهایی در نمونه‌های محیط‌های آلی مشاهده نشده است. در محیط‌های آلی، یون‌های مخالف اتصالات محکمی با سطح ذرات ایجاد می‌کنند و در نتیجه تمایز و تشخیص لایه خارجی متصل به ذره (لایه نفوذی[2]) در محیط غیرهادی خارجی سخت است. آنچه در این رابطه به‌صورت مداوم از قلم می‌افتد آن است که رسانایی الکتریکی به ترکیب شیمیایی محلول پایه، (معمولا از محلول سدیم کلرید NaCl ۰/۰۰۱ مول بر لیتر استفاده می‌شود)، بستگی دارد و در این شرایط میدان الکتریکی به‌درستی اعمال شده و از اثراتی مانند قطبش (که باعث بی‌نظمی و اختلال در ولتاژ می‌شود) جلوگیری می‌شود. اندازه‌گیری تحرک یونی یا پتانسیل زتا نباید در آب یون‌زدایی شده یا دوبار تقطیر انجام شود. درصورتی‌که مایع پخش‌کننده ذرات غیرقطبی باشد برای تبدیل میزان تحرک یونی مشاهده شده به پتانسیل زتا به مطالعه دقیق‌تر و درک چگونگی قرارگیری لایه‌های یونی و ضخامت آنها نیاز است. در این مورد باید مواردی نظیر تشکیل لایه دوگانه الکتریکی از تک اتم‌ها و یا مولکول‌ها و همچنین ایجاد تک‌لایه‌ها و یا لایه‌های دوتایی مشخص شوند. قابل ذکر است چنین مطالعاتی در مورد نمونه‌های زیستی و در بستر آبی لازم نیست.

۴-۱-۵ به‌طور معمول، تحرک یا جابجایی اندازه‌گیری شده و بر اساس معادله هنری[3]، (به شکل ۱ مراجعه شود) به پتانسیل زتا تبدیل می‌شود.

(۱)

$$U_E = \frac{\varepsilon \zeta f(\kappa\alpha)}{6\pi\eta}$$

که در این معادله پارامترهای استفاده شده عبارتند از:

U_E: تحرک الکتروفورتیک (توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود.)؛

□ : ثابت دی‌الکتریک محیط پخش کننده ذرات؛

ζ : پتانسیل زتا (محاسبه شده)؛

$f(\kappa\alpha)$: ثابت هنری، (در ادامه توضیح داده می‌شود)؛

1 -Lower limit
2- Diffusion layer
3- Henry

η : گرانروی کلی محیط (برابر یک مقدار پیش‌فرض گذاشته شده و یا اندازه‌گیری می‌شود).

پتانسیل زتا

ثابت دی الکتریک

~ ضخامت لایه دوگانه الکتریکی

$$U_E = \frac{\varepsilon \ \zeta \ f(\kappa\alpha)}{6 \ \pi \ \eta}$$

معادله هنری

تحرک الکتروفورتیک (توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود.)

گرانروی

شکل ۱ – معادله (۱)

۴-۱-۵-۱ در استفاده از این معادله باید یکاهای مقادیر مورد اندازه‌گیری مشخص شده و در یک سیستم اندازه‌گیری تعریف شوند، درغیراین صورت مقادیر دو طرف معادله تطابق نداشته و نتایج نادرستی به دست خواهدآمد. سیستم یکای اندازه‌گیری معمول SI (شامل متر، کیلوگرم و ثانیه) به‌دلیل ابعاد بزرگی که دارند، در این محاسبه غیرقابل استفاده‌اند، (فواصل انتشار در حدود ۱ متر اغلب مطالعه نمی‌شوند [۵]. به این نکته باید توجه شود که تحرک و ضریب نفوذ در شار[1]، در واحد زمان اندازه‌گیری می‌شود. میزان تحرک اغلب براساس میدان الکتریکی و با واحد ولت بر فاصله ارزیابی می‌شود. همچنان که در مرجع شماره ۵ مشاهده می‌شود، واحد اندازه‌گیری تحرک الکتروفورتیک $m^2s^{-1}V^{-1}$ است. این واحد را می‌توان به‌صورت $(ms^{-1})/(Vm^{-1})$ و یا سرعت در واحد میدان الکتریکی بیان کرد. در آزمایش‌های تجربی، تحرک الکتروفورتیک، U_E، بر اساس واحد ساده و کاربردی‌تر $\mu m^2/Vs$ نیز بیان می‌شود که اغلب باعث ایجاد خطا و پیچیده شدن نتایج می‌شود (به‌عنوان مثال، میزان این خطا در مورد میزان تحرک حدود $\mu mcm^{-1}/Vs$ ۱۰ ± است). نتایج تحرک با علامت منفی نشان دهنده پتانسیل زتای منفی هستند.

۴-۱-۵-۲ ثابت دی‌الکتریک یا □، عبارت است از میزان نفوذپذیری و انتشار نمونه در محیط آزمایش نسبت به میزان نفوذ پذیری و انتشار آن در خلاء، که واحد ندارد و معادل ۱ است.

۴-۱-۵-۳ مقدار $f(\kappa\alpha)$، ضریب هنری نام داردکه در آن، α، شعاع ذره مورد مطالعه است. در این معادله κ پارامتر دبای[2] بوده و با استفاده از بار الکتریکی، ثابت بولتزمن و ثابت آووگادرو در دمای مشخص و قدرت یونی ثابت قابل محاسبه است. در محدوده باردار اطراف ذره و در فاصله حدود 3/κ از سطح ذره مورد مطالعه،

1- Flux
2- Debey

بار سطحی در حدود ۲ درصد افت پیدا می‌کند. بر این اساس، در محیطی با قدرت یونی $molL^{-1}$ ۰/۰۱، مقدار $3/\kappa$ از سطح در حدود nm ۱۰ و برای محیطی با قدرت یونی $molL^{-1}$ $۱۰^{-۵}$، مقدار $3/\kappa$ از سطح در حدود nm ۲۸۰ است [۶]. مقدار $1/\kappa$ را می‌توان «ضخامت» دولایه دوگانه الکتریکی[۱] (یا طول دبای) درنظر گرفت. براین‌اساس، واحد κ معکوس واحد طول است. بنابراین، $f(\kappa\alpha)$، بدون واحد بوده و اغلب مقداری معادل ۱/۰۰ یا ۱/۵۰ دارد. $f(\kappa\alpha)$، در مورد ذرات در محیط‌های قطبی حداکثر مقدار و معادل ۱/۵۰ (تقریب اسمولوکوسکی[۲]) و در محیط‌های غیر قطبی حداقل مقدار و معادل ۱/۰۰ (تقریب هوکل[۳])، است. از تقریب اول در محاسبات استاندارد حاضر استفاده شده است. در منابع، برای $f(\kappa\alpha)$ برخی مقادیر میانی[۴] نیز گزارش شده است، ولی مقدار آن برای محیط‌های زیستی در اغلب موارد ۱/۵۰ درنظرگرفته می‌شود.

۴-۱-۵-۴ اصطلاح گرانروی، η، مربوط به گرانروی پویا[۵] و دارای یکای فیزیکی SI، پاسکال ثانیه (Pa.s)، معادل $N.s/m^2$ و یا kg/(m.s) است. آب در دمای K ۲۹۳ دارای گرانروی معادل Pa.s ۰/۰۰۱۰۰۲ است. واحد فیزیکی گرانروی پویا در سیستم cgs، پویز[۶]، P، است. این واحد در استانداردهای ASTM متداول‌تر بوده و اغلب به‌صورت سنتی‌پویز[۷]، cP، استفاده می‌شود. آب در دمای K ۲۹۳ دارای گرانروی معادل cP ۱/۰۰۲۰ است.

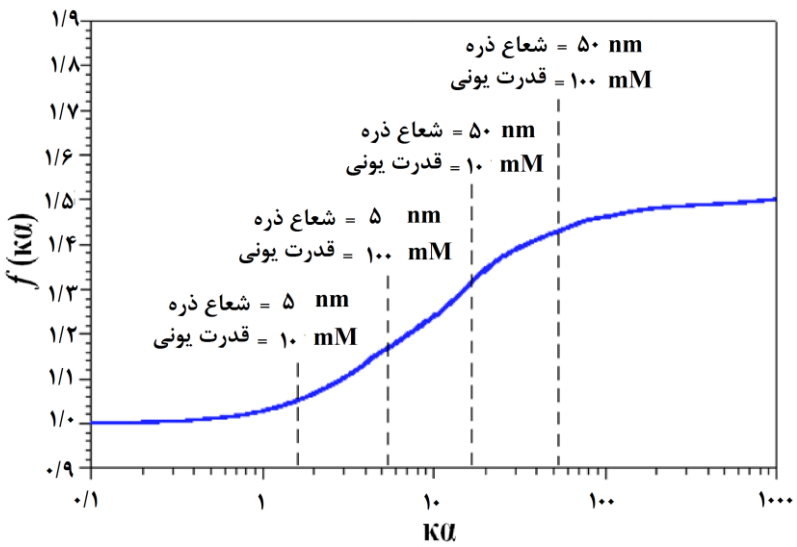
یادآوری- کلیه مقادیر محاسباتی برای آب در دمای اتاق (تقریباً K ۲۹۸)، ثابت است به‌غیر از تحرک محاسباتی ذرات که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$U_E \sim ۱۲/۸۵\times U_E \text{، تحرک الکتروفورتیک تقریبی} = K \times \text{تحرک} \text{ پتانسیل زتا} \qquad (۲)$$

در این معادله مقدار K، ثابت تناسب جمعی، درصورتی‌که پتانسیل زتا بر اساس mV استفاده شود، تقریباً معادل ۱۲/۸۵ است. در صورتی که پتانسیل زتا بر اساس معادله هنری (معادله شماره ۱) بدست آید، واحد $\mu mcm^{-1}/Vs$ برای تحرک الکتروفورتیک استفاده می‌شود.

۴-۱-۵-۵ با اینکه جابجایی ذرات به دنبال اعمال میدان الکتریکی رخ می‌دهد، ولیکن همیشه مقداری از آن بر اساس تحرک براونی است و این نوع جابجایی نیز باید مورد توجه قرار گیرد. در محیط‌های زیستی که اغلب قدرت‌های یونی نسبتاً بالایی دارند مدل هوکل، $f(\kappa\alpha)=۱$ برای ارزیابی پتانسیل زتا کافی نیست و مقدار $f(\kappa\alpha)$ در این موارد باید بر اساس ابعاد ذرات و قدرت یونی (یا رسانایی محاسبه شده) اصلاح شود، (به شکل ۱ مراجعه شود).

1- Electrical double layer
2- Smoluchowski
3- Hückel
4- Intermadiate Value
5- Dynamic Viscosity
6- Poise
7- Centipoise



شکل ۲ – تابع هنری بر اساس ضریب κα برای چهار نوع ذره در قدرت‌های یونی متفاوت

۴-۱-۶ ارزیابی و اندازه‌گیری در سیستم‌های دارای بار مثبت نسبت به انواع دارای بار منفی، مشکلات و چالش‌های بیشتری به همراه دارد. چرا که بسیاری از محیط‌های آلی از جمله سل نمونه[1] پلاستیکی که در pH های خنثی ذاتاً دارای بار منفی بوده و ذرات دارای بار مخالف را جذب کرده و منجر به حذف آنها از محیط مورد بررسی و در نتیجه تغییر پتانسیل دیواره و در نهایت، سبب خطای آزمایش می‌شوند. در این موارد، می‌توان از روش تنظیم خودکار pH و یا استفاده از ترکیبات تیترکننده که باعث کاهش خطا می‌شوند، استفاده کرد. به این ترتیب تنظیم pH و غلظت‌های اضافه شده، آسان می‌شود.

۴-۱-۷ درصورتی‌که به همراه مقادیر گزارش شده برای پتانسیل زتا، در مورد چگونگی روش مطالعه و ارزیابی سایر پارامترها گزارشی وجود نداشته باشد، پتانسیل زتای گزارش شده فاقد ارزش و اعتبار است. پتانسیل زتا بدون گزارش pH، ترکیب یونی و غلظت الکترولیت تقریباً بی‌معنی است.

۴-۲ برخی نکات در مورد مولکول‌های زیستی و انواع مشابه

۴-۲-۱ بسیاری از ترکیبات مانند پروتئین‌ها، باردار و اغلب زوج یون (دارای بار مثبت و منفی) هستند. این مولکول‌ها تقریباً ناپایدار بوده و تحت میدان الکتریکی، روی سطح الکترود جذب و یا تخریب می‌شوند که منجر به لایه نشانی کربن، (با سیاه شدن الکترود مشخص می‌شود)، بر روی الکترود و تولید گاز می‌شود. این فرآیند واکنش اکسایشی-کاهشی عمومی است و درصورت مواجهه ترکیبات آلی با الکترودهای فلزی غیرقابل اجتناب است. نحوه جریان میدان الکتریکی از مولکولی که به سطح الکترود چسبیده است تا حدود زیادی به نحوه اتصال آن مولکول به سطح الکترود بستگی دارد. دستورالعمل‌های مورد استفاده در این حوزه باید میزان

1- Sample cell

احتمال چنین رخدادی را تخمین زده و تا حدامکان این پدیده را کاهش دهند. در مورد برخی از مولکول‌ها، حذف این نوع تخریب مولکولی نیاز به اتخاذ شرایط ویژه‌ای دارد، به‌عنوان مثال، از غشاءهای متخلخل جهت جدایی فیزیکی سطح الکترود و مولکول‌های زیستی موجود در محیط استفاده می‌شود که اجازه نفوذ یون‌ها را می‌دهد ولی از نفوذ مولکول‌های درشت[1] جلوگیری می‌کند. همچنین افزایش سرعت اندازه‌گیری‌ها، تحت ولتاژ پایین و کاهش احتمال برخورد با الکترود (به‌دلیل کاهش قدرت میدان الکتریکی) به کاهش اثرات تخریبی کمک خواهد کرد. با این حال در این موارد، انحلال مجدد مواد غیرقابل انجام خواهد بود. برای انتشار و حرکت مولکول‌های پروتئینی به مقدار چند ده میلی‌متر، زمان بسیار زیادی لازم است. همچنین فاصله بین محل اندازه‌گیری و الکترود در اغلب سیستم‌های الکتروفورز موئین براساس پرتو لیزر داپلر[2]، زیاد است. سرعت کند انجام این فرایند از یک سو و زمان لازم برای انتشار و اندازه‌گیری نتایج با استفاده از لیزر که چند ده دقیقه طول می‌کشد از سوی دیگر، محدودیت زمانی شدیدی است و باعث می‌شود که از این روش کمتر استفاده شود. شکست پرتو نور به علت وجود تجمعات مولکولی و مشاهده چشمی کلوخه[3] روی الکترود (سطح فلزی براق) حاکی از تخریب نمونه است. البته در مورد سطوح اکسید شده سیاه رنگ، نمی‌توان این نشست کربن را مشاهده کرد. تخریب مولکولی و ایجاد لایه روی الکترود، منجر به خطای منفی در اندازه گیری و ناپایداری پاسخ دستگاهی در حین آزمایش است. افزایش سرعت آزمایش و جلوگیری از گرم شدن محیط این مشکل را کاهش می‌دهد ولیکن تاثیری بر تمایل مولکول‌های پروتئینی برای واکنش دادن و اتصال به سطح الکترود ندارد.

۴-۲-۲ گاهی ترکیبات زیستی در غلظت‌های بسیار کم در محیط حضور داشته و نسبت به سایر ذرات معدنی و کلوئیدی، دارای ضریب شکست نسبی[4] بسیار کمی هستند. در نتیجه پاسخ دستگاهی ثبت شده با استفاده از جابجایی داپلر مربوط به شکست نور و در ادامه تحرک ذره‌ای بسیار ضعیف و در حد نویز زمینه سیستم خواهد بود.

۴-۲-۳ در برخی موارد مقدار نمونه مورد مطالعه بسیار کم بوده و در نتیجه نحوه نمونه‌گیری اهمیت بسیاری پیدا می‌کند، آیا یک قطره واقعا می‌تواند نماینده یک سیستم بزرگتر باشد؟ در مورد برخی دستگاه‌های تجزیه‌ای، تنها چند میکرولیتر از نمونه را می‌توان بررسی کرد چراکه الکترود دارای اندازه مشخص و محدود است. درحالی‌که در بسیاری موارد با چند میلی‌لیتر از محلول یا سوسپانسیون می‌توان به راحتی مطالعات را انجام داد ولی اغلب این مقدار در دسترس نیست. اگر بتوان مواد را به صورت توده و مجتمع[5] نگه‌داشت، مطالعه مقادیر بسیار کم نیز امکان‌پذیر است.

۴-۲-۴ مواد زیستی اغلب در محیط بافری که دارای قدرت‌های یونی بالایی هستند، قرار دارند. به عنوان مثال، بافر نمکی فسفات، (PBS)، از ۰/۰۰۳۲ $molL^{-1}$ سدیم دی هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4)، $molL^{-1}$

1- Larger molecules
2- Doppler
3- Aglomerate
4- Relative refractive index
5- Plug

۰/۰۰۵ پتاسیم منو هیدروژن فسفات، (KH_2PO_4)، $0/0013\ molL^{-1}$ کلرید پتاسیم، (KCl)، $0/135\ molL^{-1}$ کلریدسدیم، (NaCl) تشکیل شده و pH آن روی ۷/۴ تنظیم شده است. وقتی به این محیط ولتاژ اعمال شود، سیستم گرم شده و امکان تخریب ترکیبات و خطاهای ناشی از آن افزایش می‌یابد. برای رفع این مشکل فاصله زمانی ۶۰ ثانیه‌ای میان دو آنالیز متوالی جهت خنک شدن سیستم پیشنهاد می‌شود. یون‌های کلرید که اغلب از کلریدسدیم (با غلظت $0/9\ molL^{-1}$) تامین می‌شوند ممکن است به الکترود (بخصوص الکترودهای خانواده فلزی پتاسیم) حمله کنند، بنابراین مطالعه مواد تشکیل دهنده الکترود پیش از شروع آزمایش لازم است. با کاهش ولتاژ احیاکننده اعمالی و یا کاهش فاصله میان دو الکترود می‌توان جریان مناسبی برای اندازه‌گیری ایجاد کرد. البته این روش عمومی نیست.

۵ ارتباط دامنه پتانسیل زتا و پایداری

۵-۱ دامنه پتانسیل زتا در سیستم‌های آبی اغلب نشان‌دهنده میزان پایداری فرمولاسیون انجام شده و یا ابزاری برای دانستن بار پروتئین است. بازه پایداری سیستم در پتانسیل زتای ۳۰ mV+ و یا ۳۰ mV- بدست آمده و در زیر جدول کامل توضیحات قرار دارد [۴]:

مشخصات پایداری	میانگین پتانسیل زتا، mV
بیشترین مقدار انبوهه شدن[1] و رسوب دهی	۰ تا ۳+
احتمال بالای انبوهه شدن و رسوب دهی	۵- تا ۵+
آستانه آغاز انبوهه شدن	۱۵- تا ۱۰-
آستانه پراکندگی حساس[2]	۳۰- تا ۱۶-
پایداری متوسط[3]	۴۰- تا ۳۱-
پایدار	۶۰- تا ۴۱-
پایداری خوب	۸۰- تا ۶۱-
پایداری بسیار خوب	۱۰۰- تا ۸۱-

۵-۲ باید به این نکته توجه داشت که ۳۰ mV- نشان‌دهنده پایداری متوسط است [۴] و در این مرجع در مورد این شرایط کیفی توضیح بیشتری وجود ندارد. به‌عنوان مثال «آستانه پراکندگی حساس به شرایط دقیقاً به چه معنی است؟» همچنین باید توجه داشت که در این جدول به مقادیر پتانسیل زتای بزرگ‌تر از ۵ mV+ نیز اشاره‌ای نشده است. بنابراین میتوان نتیجه گرفت مقدار کمیت و علامت پتانسیل زتا مهم نبوده و مقدار کیفی آن اهمیت دارد. برای سیستم‌های دارای ذرات با ابعاد کوچک تر از یک میکرومتر، باید دامنه وسیع‌تری از پتانسیل زتا مشخص و استفاده شود. در مورد مواد با ابعاد نانو متری نیز احتمالاً به دامنه‌های بالای mV ۱۰۰ برای دستیابی به پایداری مناسب نیاز است.

1- Aggregate
2- Threshold of delicate dispersion
3- Moderate stability

۶ مواد مورد نیاز

۶-۱ کلیات

۶-۱-۱ با توجه به اینکه سیستم‌های مورد مطالعه شرایط متفاوتی دارند، تعیین فهرست مشخصی از مواد مورد نیاز، کار دشوار و غیرممکنی است. اغلب بهتر است برای افزودن مقدار مشخصی از مواد افزودنی، از روش تیتراسیون خودکار استفاده کرد. همچنین بهتر است به جای افزودن مستقیم اسید و باز برای تنظیم pH، از سایر تنظیم کننده‌ها استفاده شود. تمام مواد و معرف‌ها باید در آب دیونیزه (۲۹۳ K، MΩcm ۱۸/۲)، و فیلتر شده با فیلتر ۰/۲۲ µm یا ریزتر، تهیه و گاززدایی شوند. باید توجه داشت که، آب دارای برخی ترکیبات آلی (مانند آمین‌هایی که از ستون تعویض یونی وارد آب شده‌اند) است که اثرات شدیدی بر پتانسیل زتا می‌گذارند و با اندازه‌گیری میزان هدایت الکتریکی آب، قابل تشخیص نیستند. در برخی شرایط که کیفیت آب تولید شده غیرقابل‌اطمینان است، و کیفیت آب دیونیزه اثر شدیدی در نتایج بررسی های پتانسیل زتا دارد می‌توان از بررسی مقدار کلی کربن آلی کل[1] برای مشخص کردن کیفیت آب دیونیزه استفاده کرد.

۶-۱-۲ سایر ترکیبات مانند فعال‌کننده سطحی[2] (عوامل تر کننده[3]) و پایدار کننده (ترکیبات یونی مانند PO_4^{2-}) نیز اغلب استفاده می‌شوند ولی سبب ایجاد مشکلاتی می‌شوند چرا که با شستشوی سیستم، حذف نشده و با نمونه‌های پروتئینی نیز واکنش نمی‌دهند. اتانول برای تمیز کردن سیستم قابل استفاده بوده و همچنین به راحتی از محیط حذف می‌شود.

۶-۲ تنظیم pH

۶-۲-۱ بسیار مهم است که برای تنظیم pH از ترکیبات مناسب که سبب تخریب نمونه نمی‌شوند، استفاده شود. به صورت متداول، هیدروکسید سدیم (NaOH) ۰/۰۰۱ مولار ، (به عنوان باز) و اسید کلریدریک (HCl) ۰/۰۰۱ مولار ، (به عنوان اسید) برای تنظیم pH استفاده می‌شود. محدوده تنظیم pH، ۲ تا ۱۲ است. اسید کلریدریک در محیط واکنش، هیدروژن تولید کرده و عامل خورده‌شدن ظروف فولاد ضد زنگ[4] می‌شود، بنابراین آزمایش‌هایی که به pHهای کمتر از ۲ نیاز دارند نباید در این ظروف انجام شوند و محیط واکنش نباید فولاد ضد زنگ تماس داشته باشد. در شرایطی که به ناچار واکنش در ظروف فولاد ضد زنگ انجام می‌شود، باید از اسید نیتریک (که با فولاد ضد زنگ واکنش پذیری ندارد) استفاده کرد. گزارش‌های اولیه در این زمینه برای تنظیم pH از نیترات پتاسیم استفاده کرده‌اند. در pHهای بالای ۱۲، شیشه به آهستگی خورده شده و هضم می‌شود. چگونگی انجام چنین واکنش شیمیایی هنوز مشخص نیست. پایین آوردن pH محیط حاوی اکسید آهن تا حدود ۳، (با افزودن اسید)، منجر به انحلال این ترکیب می‌شود. افزایش بیش از

1- Total organic carbon, TOC
2 - Surfactant
3- Wetting agent
4- Stainless steel

حد pH و یا گرمادهی به سیستم پروتئینی باعث تخریب آن می شود که اصطلاحاً واسرشت شدن[1] نام دارد. نمک‌ها حلال‌های آلی و گرما اغلب اثرات مشابهی روی سیستم‌های مورد مطالعه دارند.

۶-۳ سایر افزودنی‌ها:

۶-۳-۱ همانطور که برای تنظیم و کنترل پتانسیل زتا، مطالعه و تنظیم pH لازم است، مطالعه و تنظیم سایر افزودنی‌ها نیز اهمیت دارد. به عنوان مثال، در صنایع مرتبط با محیط‌های آبی برای جلوگیری از لخته‌شدن ذرات و پایدار نگه‌داشتن سیستم از برخی نمک‌ها مانند یون‌های آلومینیوم (Al^{3+}) و یا آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+}) استفاده شده و با توجه به نتایج مطالعه نقطه ایزوالکتریک، شرایط احتمالی ایجاد ته‌نشینی تخمین زده می‌شود. همچنین در برخی صنایع مانند مواد سرامیکی یا پوشش دهی[2]، فسفات (PO^{4-}) به عنوان پایدار کننده به محیط اضافه می‌شود.

۶-۴ رقیق سازی نمونه

۶-۴-۱ پتانسیل زتا عبارت از بار سطحی ذره است و بر اساس حرکت ذرات درون سیستم محاسبه می‌شود. این محاسبه در شرایطی که تحرک ذرات آزاد و بدون مانع درون سیستم انجام گیرد، صحیح است. در غلظت‌های بالا که محیطی با تراکم بالا از ذرات وجود دارد، به دلیل برخوردها و برهم‌کنش‌های ذرات با یکدیگر، محاسبه یا تفسیر تحرک بر اساس پتانسیل زتا دشوار است.

۶-۴-۲ اندازه‌گیری‌های تحرک الکتروفورتیک با استفاده از پراکندگی پرتو[3] بر اساس نفوذ و سپس خروج پرتو از درون سیستم انجام می‌شود. با توجه به این نکته، بسیاری از نمونه‌ها برای مطالعه به این روش بسیار غلیظ بوده و امکان اندازه‌گیری سیستم آنها وجود ندارد. در چنین شرایطی و درصورتی‌که نیاز به رقیق‌سازی وجود داشته باشد، بهتر است محیط اولیه و مادر تشکیل‌دهنده سیستم، با قدرت یونی و شرایط محیطی یکسان برای رقیق سازی نمونه استفاده شود. اجزاء مزاحم و عوامل ایجاد خطا در اندازه‌گیری‌ها را می‌توان با استفاده از سانتریفوژ جدا و نمونه اصلی را مطالعه کرد. با این حال حتی با استفاده از سانتریفیوژ دور بالا، امکان جداسازی پروتئین‌ها یا درشت مولکول‌های محلول وجود ندارد. گاهی ذرات از نظر اندازه و چگالی شرایط ویژه‌ای دارند. در برخی موارد می‌توان محلول رویی آنها را پس از سانتریفیوژ خارج کرده و ذرات معلق محیط را مورد مطالعه قرار داد، البته این روش فقط برای جداسازی غبار و ذرات بسیار درشت مزاحم قابل استفاده است. به‌طور کلی مقدار پتانسیل زتا به‌صورت مستقل از اندازه ذرات تعریف شده و برای اندازه‌گیری آن پایدار نگه‌داشتن شرایط نمونه لازم است. در استاندارد ملی ۱۱۷۸۹، ذکر شده که برای انجام فرآیند رقیق سازی باید سری رقت از نمونه تهیه و بر اساس آن اثر رقیق‌سازی بر میزان پایداری تعیین و نتایج با توجه به آن اصلاح و گزارش شوند.

1- Denaturation
2- Coating
3 - Light scattering

۷ روش کار

۷-۱ کلیات

۷-۱-۱ در ابتدا دستگاهی را که با آن نمونه مطالعه خواهد شد بر اساس اصول و روش کار و همچنین شرایط استاندارد، تنظیم و کالیبره کنید. یک روش استاندارد NIST[5] برای ارزیابی تحرک الکتروفورتیک وجود دارد، و پیشنهاد می‌شود دستگاه همواره بر اساس این روش کالیبره و تنظیم شود [۷]. روشی برای مطالعه تحرک مثبت بر اساس استفاده از ۵۰۰ $mg\ dm^3$ ترکیب گوئتیت[۱]، (α-FeOOH)، در محیط بافر فسفات ۰/۰۵ $mol\ g^{-1}$ در محلول الکترولیت پرکلرات سدیم ۰/۰۵ $mg\ dm^3$ با pH معادل ۲/۵ است. سوسپانسیون تهیه شده قبل از آزمایش باید رقیق شود. مقدار تحرک ثبت شده برای این محیط معادل µm $cm\ V^{-1}s^{-1}$ ۰/۱۲ ± ۲/۵۳ است. علاوه بر این محیط استاندارد می‌توان از کربوکسیلات پلی‌استایرن لاتکس یا سیلیکا کلوئیدی برای اعتبارسنجی مرسوم استفاده کرد. شیر مورد استفاده در تهیه قهوه (که دارای کازئین[۲]؛ با نقطه ایزوالکتریک در pH حدود ۴/۶ است)، نیز قابل استفاده است. این ترکیب به‌عنوان ماده شبهه استاندارد و ارزان قیمت، بخصوص زمانی که پتانسیل زتا با استفاده از روش تیتراسیون محاسبه می‌شود، قابل استفاده است. این ترکیب پروتئینی فاقد پیوند دی‌سولفیدی است و ساختار سوم ساده‌ای داشته و پدیده واسرشت[۳] در موردش اتفاق نمی‌افتد. کازئین تقریباً آب‌گریز بوده و بنابراین به‌سختی در آب حل می‌شود.

۷-۱-۲ دما و pH را اندازه‌گیری کنید. اندازه‌گیری غلظت گونه‌ها مانند مطالعه یون‌ها (فسفات و کلرید) به بهبود نتایج کمک خواهد کرد. گرانروی و ثابت دی‌الکتریک محیط آزمایش باید مشخص باشد،گاهی این مقادیر بصورت نرم‌افزاری برای سیستم آبی محاسبه می‌شود.

۷-۱-۳ دمای سیستم مورد مطالعه باید در مقدار مشخص و قابل‌کنترل، تنظیم شود. دقت معادل ۰/۱ ± کلوین برای تنظیم دما لازم است.

۷-۲ تمیزی و خلوص سیستم و مرطوب کردن الکترود

۷-۲-۱ مقادیر بسیار کم ناخالصی (بویژه یون‌های چند ظرفیتی یا مقادیر اندک ترکیبات آلی) ممکن است مقادیر پتانسیل زتا را به‌شدت تغییر دهند. بنابراین، کلیه ظروف شیشه‌ای و سیستم‌های فلاش[۴]، ابتدا با آب[۵] دوبار تقطیر و دیونیزه و سپس الکل مطلق شسته شوند.

۷-۲-۲ الکترودهای فلزی (و الکترودهای با پوشش فلزی) در آب به خوبی مرطوب نشده و اغلب منجر به ایجاد اثر قطبش شدن[۶] در الکترود می‌شوند. برای رفع این مشکل الکترودها پیش از قرار گرفتن در آب، درون

1- Goethite
2- Casein
3 - Denature
4- Flush systems
5- D-ionized water
6- Polarization effects

مایعی با چگالی کمتر (از آب) مانند اتانول خیسانده می‌شوند. در چنین مواردی از محلول رقیق حاوی مواد فعال سطحی نیز می‌توان استفاده کرد ولی با توجه به مطالبی که در قسمت‌های قبلی ذکر شد، این ترکیبات به خوبی با پروتئین‌ها ترکیب نشده و همچنین حذف آنها از محیط دشوار است، بهتر است از این روش استفاده نشود. مشکل عدم مرطوب شدن مناسب در مورد الکترودهای با پوشش اکسیدی (به عنوان مثال پالادیوم یا پلاتین) اغلب رخ نمی‌دهد. اعمال ولتاژ (جریان متناوب (AC) یا جریان مستقیم (DC))، منجر به واکنش بسیاری از ترکیبات آلی با الکترودها و در ادامه واسرشت نمونه در سطح الکترود شده، [۸ و ۹] و در نهایت عامل سیاه‌شدن آن است. با توجه به مراجع اشاره‌شده، در لایهٔ دوگانه الکتریکی داخلی در مجاورت سطح الکترود[1] (ضخامت این لایه در حد قطر چندین اتم است و تحت واکنش مرسوم اکسایش-کاهش ایجاد می‌شود) که به سطح فلز چسبیده، میدان الکتریکی ناهمگن وجود دارد (حداکثر تا $۱۰^{۹}$ Vm^{-1}). برای جلوگیری از این فرآیند از پوشش دهی سطح الکترود با گونه‌های متفاوتی از ترکیباتی که به سطح خارجی آن می‌چسبند، استفاده می‌شود. البته ممکن است این پوشش‌دهی منجر به ایجاد برخی اثرات ناخواسته روی مقادیر اندازه‌گیری شده و یا ایجاد برخی تفاوت‌ها میان مقدار ولتاژ اعمال شده و رسیده به نمونه شود. تنها روش واقعی برای جلوگیری از واسرشت پروتئین جلوگیری از برهمکنش و مجاورت متداوم ترکیبات آلی با الکترود بوده و به چندین روش قابل اجرا است. می‌توان سطح الکترود را با استفاده از غشاءهای نیمه تراوا، که به یون‌ها اجازه عبور داده ولی مانع از نفوذ مولکول‌های آلی می‌شوند، پوشش داد. غشاء نیمه تراوا باید سریع و آسان مرطوب شود. می‌توان از ترکیباتی مانند پلی‌تترافلوئورواتیلن[2] استفاده کرد و البته باید توجه داشت این روش منجر به تولید مقادیر بسیاری حباب، که غیرقابل حذف هستند، می‌شود. افزایش شدید pH، قدرت یونی و دما، با افزایش احتمال واسرشت نمونه همراه است. در سطح الکترودهای فلزی، واسرشت نمونه به-راحتی رخ داده، پایداری نتایج پتانسیل زتا به مرور کاهش یافته (بیشتر مقادیر منفی تولید می‌شوند) و الکترود سیاه می‌شود. در الکترودهای پالادیوم یا پلاتین این واسرشت قابل مشاهده نیست. برای دستیابی به مقادیر پتانسیل زتای قابل قبول می‌توان از کاهش ولتاژ الکترود و انجام سریع تعداد کمتری آزمایش‌ها استفاده کرد. البته این روش احتمالاً باعث کاهش جداسازی و پایداری شده و اغلب روشی در مراحل اولیه کنترل کیفیت است. برای بازیابی سیاه‌شدن سطح و بهبود ویژگی‌های الکترود می‌توان از سل اندازه‌گیری[3] یکبار مصرف استفاده کرد. این روش وقت‌گیر بوده و به همین دلیل در برخی موارد امکان‌پذیر نیست. اندازه‌گیری‌ها در دیپ سل[4] و کوارتز، همچنین انواع موئین[5] (از جنس شیشه یا پلاستیک؛ یکبار یا چندبار مصرف) قابل انجام است. با توجه به شرایط مطالعه، ممکن است یکی از این ظروف برای انجام آزمایش‌ها مناسب‌تر و کاربردی‌تر بوده و نتایج تکرارپذیرتری داشته باشد. به‌عنوان مثال، در سیستم الکتروفورز موئین اغلب از ولتاژ بالا استفاده شده و میزان واسرشت نمونه کمتر است. میدان مناسب برای مطالعه نمونه، با توجه به ویژگی‌های پراکندگی نور، ولتاژ اعمالی، ویژگی هندسی سل اندازه‌گیری و فاصله آن از الکترود و در طی

1- Inner double layer
2- PTFE
3- Measurement cells
4- Dip cell
5 - Capillary

چندین آزمایش تعیین می‌شود. وجود تحرک الکتروفورتیک برای بدست آوردن نتایج مناسب لازم بوده و وابسته به قدرت میدان است. بنابراین، برای دستیابی به پاسخ مربوط به تحرک الکتروفورتیک که متمایز از حرکات نفوذی ساده است، ولتاژ افزایش می‌یابد که منجر به افزایش قدرت میدان و در ادامه تحرک الکتروفورتیک و پاسخ سیستمی می‌شود. البته افزایش ولتاژ با مشکل افزایش احتمال واسرشت پروتئین از طریق شکست پیوند دی‌سولفیدی، حذف گروه آمین طی واکنش آمین‌زدایی، اکسیداسیون زنجیره جانبی هیستیدین به آسپارتیک اسید در سطح الکترود فلزی همراه است. کلیه این فرآیندها باعث تغییر بار کلی مولکول به مقادیر منفی شده و همزمان منجر به تغییرات شدید ساختاری، استحکام، پایداری و غیره در پروتئین می‌شود. در حالت ایده‌آل اندازه‌گیری باید تحت شرایطی انجام شود که نمونه هرگز در تماس با الکترود قرار نگیرد.

۷-۲-۳ پیشنهاد می شود مواقعی که دستگاه برای مدت طولانی استفاده نمی‌شود، قسمت‌های غیرقابل تعویض سیستم مرطوب نگه‌داشته شود (ابتدا با محلول حاوی فعال کننده سطحی غیریونی شسته شده و سپس در آب دوبار تقطیر و دیونیزه نگهداری شود).

۷-۳ ورود نمونه به دستگاه

۷-۳-۱ ابتدا دستگاه را براساس روش تنظیم و دستور کار شرکت سازنده راه‌اندازی و تنظیم کنید. در صورت لزوم نمونه را فیلتر و رقیق کنید. کلیه اطلاعات لازم در مورد نمونه ثبت و مستندات را تهیه کنید. بعد از تمیز کردن ظرف نگهداری، مقدار کمی از نمونه را وارد دستگاه کنید. در مواردی خاص و برای جلوگیری از ته‌نشینی مواد درشت و تداخل در اندازه‌گیری‌ها می‌توان نمونه را از فیلتر مناسب عبور داده و سپس اندازه‌گیری کرد. توجه داشته باشید تا زمانی که به سیستم میدان الکتریکی اعمال می‌شود مواد به‌صورت سوسپانسیون باقی می‌مانند. بنابراین مقدار حد بالایی پتانسیل زتای ذرات درشت بزرگ‌تر از حرکت دینامیکی براونی اندازه‌گیری شده با استفاده از سیستم تفرق نور پویا (DLS) است. پیش از اعمال ولتاژ، زمان کافی برای تنظیم و به تعادل رسیدن دما (معمولاً ۲ دقیقه کافی است) درنظر بگیرید.

۷-۴ اندازه‌گیری

۷-۴-۱ برای دستیابی به نتایج تکرارپذیر بهتر است آزمایش‌ها در گروه‌هایی با تعداد کمتر انجام شوند. همچنین برای جلوگیری از افزایش دمای سیستم بخاطر محیط یونی، آزمایش‌ها را با فواصل زمانی مناسب انجام دهید. به تولید حباب و سیاه‌شدن سطح الکترود توجه کنید. برای دستیابی به نتایج مناسب؛ رقت، فواصل زمانی و ولتاژ مناسب را انتخاب کنید. برای این کار می‌توانید چند آزمایش اولیه انجام و با استفاده از محاسبه ضریب قابل قبول از پیش تعریف شده (میانگین/۱۰۰×انحراف معیار) برای گروه‌های اندازه‌گیری پی‌درپی مقادیر مناسب را انتخاب کنید.

۷-۴-۲ نمونه ها و ظروف آنها را با شرایط مناسب امحا کنید.

۷-۵ تفسیر نتایج

۷-۵-۱ بسیاری از شرکت‌ها با توجه به نتایج مورد نیازشان و نوع داده‌های تولید شده در سیستم، از نرم‌افزارهایی شامل برخی عوامل کیفی (که اغلب در طی آزمایش مشخص شده‌اند) استفاده می‌کنند. بدین‌ترتیب در حین بروز برخی مشکلات، این نرم‌افزارها راهکارهای مناسبی را پیشنهاد می‌دهند. گاهی با استفاده از این نرم‌افزارها می‌توان داده‌های خام را نیز تفسیر کرد.

۸ دقت و اریبی[1]

۸-۱ کلیات

۸-۱-۱ این استاندارد فقط یک راهنما است و در آن به آزمایش‌هایی در زمینه ارزیابی اعتبار و خطای روش اشاره شده و فقط به ارایه برخی پیشنهادات می‌پردازد. بر روی نتایج پتانسیل زتا برخی آزمایش های روند-روبین[2] انجام شده و این روش در مراجع کاملاً مورد پذیرش است. این روش به مقادیر بسیار کم ناخالصی و حتی تغییرات بسیار کوچک در شرایط انجام آزمایش و بسیاری عوامل دیگر حساس است. در اغلب شرایط نتایج پتانسیل زتا با دقتی که بر اساس حداکثر ۱۰٪ انحراف استاندارد نسبی (برای حداقل ۵ تکرار) بدست آمده معتبر و قابل گزارش است.

۸-۲ برای اندازه‌گیری ترکیبات استاندارد قابل ردیابی با مقادیر کم به NIST_SRM 1980، به کتابنامه، مرجع شماره ۷ مراجعه شود.

۸-۲-۱ بر اساس انجام آزمایش‌های پشت سرهم روی نمونه گوئتیت، مقدار تحرک محیط معادل $\mu m\ cm\ V^{-1}\ s^{-1}$ ۲/۵۳ ± ۰/۱۲ (حدود اطمینان ۹۵٪ دو-طرفه؛ برای ۱۱۶ آزمایش) است. بنابراین مقدار پتانسیل زتا در دمای ۲۵۰ °C تقریباً ۳۲/۵ mV+ خواهد بود (بر اساس تقریب اسمولوکوسکی، $f(\kappa\alpha)$ = ۱/۵). اگر بهترین نتایج را در نظر بگیریم، انحراف استاندارد نسبی حدود ۰/۵ درصد به-طور مشخص نشان دهنده بیشترین حالت اندازه‌گیری است. این موضوع قبلاً برای نمونه پروتئینی SRM تایید و چاپ شده [۱۰]

۹ گزارش

۹-۱ حداقل مواردی که باید موردتوجه قرار گیرند:

۹-۱-۱ تاریخ و مدت زمان انجام اندازه‌گیری؛

۹-۱-۲ نام مسئول آزمون‌کننده[3]؛

1- Bias
2- Round robin
1- Operator

۹-۱-۳ توضیحات مربوط به دستگاه – سازنده و مدل دستگاه؛

۹-۱-۴ تاریخ آخرین اندازه‌گیری ترکیبات استاندارد و نتایج آن (باید وضعیت قبول یا رد نتایج آنالیزهای انجام شده مشخص باشد)؛

۹-۱-۵ دمای انجام آزمایش ؛

۹-۱-۶ ترکیب شیمیایی محیط پخش و یا رقیق شده؛

۹-۱-۷ pH؛

۹-۱-۸ گرانروی محیط؛

۹-۱-۹ ثابت دی‌الکتریک (ممکن است جزو مفروضات بوده، محاسبه و یا اندازه‌گیری شده باشد)؛

۹-۱-۱۰ ولتاژ مورد استفاده و جریان اندازه‌گیری شده؛

۹-۱-۱۱ رسانایی محاسبه شده سیستم (واحد SI: Simens/m است. اغلب در سیستم اندازه‌گیری غیر SI، به صورت mS/cm گزارش می‌شود)؛

۹-۱-۱۲ آزمایش‌ها حداقل با ۵ تکرار ، میانه آنها (اغلب به صورت mV) و انحراف معیار (اغلب به‌صورت انحراف استاندارد نسبی – RSD[1]، یا ضریب تغییرات – CV[2])گزارش می‌شود؛

۹-۱-۱۳ تحرک و مفروضات ذکر شده (به عنوان مثال، تقریب هوکل یا اسمولوکوسکی در معادله هنری) برای تعیین پتانسیل زتا استفاده می‌شوند.

1- Relative Standard Deviation
2- Coefficient of Variation

پیوست الف

کتابنامه

[۱] استاندارد ملی شماره ۱۱۷۸۹، آنالیز اندازه ذره- طیف سنجی همبستگی فوتون. سال تصویب ۱۳۸۷

[2] Hunter, R.J., Zeta Potential in Colloid Science Principles and Applications, Academic Press, 1981.

[3] Delgado, A.V., González-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K, and Lyklema, J., "Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC Technical Report)," Pure and Applied Chemistry, Vol 77, No. 10, 2005, pp. 1753–1805.

[4] Corbett, J.C.W., and Jack, R.O., "Measuring protein mobility using modern microelectrophoresis," Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Vol 376, 2011, pp. 31–41.

[5] Riddick, T.M., Control of Colloid Stability through Zeta Potential: With a Closing Chapter on its Relationship to Cardiovascular Disease, Volume 1, Livingston Publishing Company, 1968.

[6] "Quantities and units for electrophoresis in the clinical laboratory (IUPAC Recommendations 1994)," prepared for publication by G. Férard, Pure and Applied Chemistry, Vol 66, No. 4, 1994, pp. 891–896.

[7] Koutsoukos, P.K., Klepetsanis, P.G., and Spanos, N., "Calculation of Zeta-Potentials from ElectroKinetic Data" Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition, Volume 2, edited by P. Somasundaran, CRC Press Taylor and Francis Group, 2006, pp. 1097 –1114, p. 1100.

[8] Ostatná, V., C ˇ ernock, H., and Paleek, E., "Protein Structure-Sensitive Electrocatalysis at Dithiothreitol-Modified Electrodes," Journal of the American Chemical Society, Vol 132, No. 27, 2010, pp. 9408–9413.

[9] Armstrong, F.A., Encyclopedia of Electrochemistry, Vol 9, 2002.

[10] Hackley, V.A., et al., "A standard reference material for the measurement of particle mobility by electrophoretic light scattering," Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering Aspects, Vol 98, 1995, pp. 209–224.