INSO
21328
1st.Edition
2017

Identical with
ISO 14101:
2012

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۱۳۲۸
چاپ اول
۱۳۹۵

فناوری نانو- مشخصه‌یابی سطح نانوذرات طلا برای غربال‌گری سمیت اختصاصی نانومواد: روش FT-IR

Nanotechnologies- Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method

ICS: 07.30;07.120

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران،ضلع جنوب‌غربی میدان ونک،خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن:۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

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.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

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 مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ 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 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 کمیتهٔملی 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 تعیین‌شده تهیه می‌کنند در کمیتهملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به‌عنوان 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 کمیتهٔملی 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 به‌عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن تـوجه 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 پیش‌بینی‌شده 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 به‌منظور 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 درزمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهیسیستم‌های 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 بین‌المللییکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گران‌بها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهایملی 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

«عنوان استاندارد»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
قاضی خوانساری، محمود (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
دبیر:	
زایرزاده، احسان (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی- پژوهشگاه استاندارد
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست شناسی)	کارشناس - ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد- بازنشسته سازمان استاندارد
سهرابی جهرمی، ابوذر (دکتری نانو)	مدیرعامل- شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته
فاضلی، فخرالدین (کارشناسی ارشد مهندسی مواد)	کارشناس - ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
کوهی، محمد کاظم (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه تهران
گشتی آذر، سمانه (کارشناسی ارشد مواد)	کارشناس واحد بررسی مواد و محصولات- ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

مزینانی، سعیده — عضو هیئت علمی- دانشگاه امیرکبیر

(دکتری مهندسی شیمی پلیمر)

ویراستار:

سیفی، مهوش — کارشناس استاندارد - بازنشسته سازمان استاندارد

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار خ
مقدمه د
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ نمادها و کوته‌نوشت‌ها ۵
۵ روش آماده‌سازی نمونه ۵
۵-۱حذف مولکول‌های غیرپیوندی ۵
۵-۲ آب‌زدایی ۹
۵-۳ آزمایش غربالگری برای ناخالصی‌ها در آب مقطر از لوله‌های آزمایشگاهی نمونه ۱۰
۶ روش اندازه‌گیری FT-IR ۱۰
۶-۱ کلیات ۱۱
۶-۲ روش بازتاب کلی کاهش‌یافته ۱۲
۶-۳ روش عبوری ۱۳
۶-۴ تعیین زمان موردنیاز برای پاک‌سازی کامل ۱۴
۶-۵ محدوده خطی شدت نوار IR بر حسب غلظت ۱۶
۶-۶ تعیین LOD و LOQ ۱۷
۶-۷ تعیین تکرارپذیری ۱۸
۷ مثال‌های کاربردی ۱۹
۷-۱ درجه تبادل لیگاند ۱۹
۷-۲ اندازه‌گیری کیفی پیوند زیست مولکولی ۲۱

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- مشخصه‌یابی سطح نانوذرات طلا برای غربال‌گری سمیت اختصاصی نانومواد: روش FT-IR» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره‌شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین‌شده، در چهل و سومین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۹۵/۱۱/۳۰ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی درزمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران درصورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادیکه برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر درکمیسیون فنی مربوط، موردتوجه قرارخواهدگرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای مزبور است:

ISO/TS 14101: 2012 - Nanotechnology - Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method

مقدمه

نانوذرات طلا را می‌توان با توجه به اندازه، شکل و سطح لیگاندها کنترل کرد. این خصوصیت، آنها را برای مطالعه روابط بین خواص فیزیکوشیمیایی و سمیت سلولی آنها در موجودات زنده ایده‌آل می‌سازد. در میان خواص مختلف نانوذرات طلا، ویژگی‌های لیگاند سطح، مانند ترکیب شیمیایی، ساختار و کمیت مولکول‌های اتصالی، نقش مهمی در تعیین رفتار نانوذرات طلا، برای مثال درجه انبوهه‌ای شدن یا کلوخه‌ای شدن در محلول، اتصال با مولکول‌های زیستی در محیط‌های کشت سلولی و سمیت سلولی در سلول‌های زنده، بازی می‌کند. از سوی دیگر، اصلاح لیگاند سطح همیشه در مرحله سنتز موفقیت‌آمیز نیست و درجه تبادل لیگاند باید قبل از آزمون سمیت سلولی خاص نانوذرات طلا، به‌منظور دستیابی به نتایج قابل‌اعتماد و یکنواخت، شناسایی شود.

طیف‌سنجی جذبی تبدیل فوریه فروسرخ FT-IR [1] یکی از مفیدترین ابزارهای شناسایی و کمی‌سازی لیگاند سطح نانوذرات است. با استفاده از روش FT-IR، می‌توان ساختارها و مقدار نسبی مولکول‌های لیگاند پیوندشده به سطوح نانوذرات را آنالیز کرد. هرچند، غلظت پایین و محیط آبی نانوذرات طلای سنتزی، تفسیر نتایج اندازه‌گیری را پیچیده می‌سازد. غلظت‌های پایین نانوذرات طلا به مقادیر جذب کم منجر می‌شود، که به‌راحتی می‌تواند متأثر از نوفه[2] پس‌زمینه یا جذب ناخالصی‌های ناچیز تحت‌تأثیر قرار گیرد. ازآنجاکه آزمون سمیت سلولی در محیط‌های آبی انجام می‌شود، اگر بخواهیم اثر ویژگی‌های سطح را بر سمیت سلولی نانوذرات طلا مطالعه کنیم، بهتراست آنچه که در سطح نانوذرات طلا در محلول‌های آبی وجود دارد، آنالیز کنیم. هرچند، مولکول‌های آب به‌شدت نور IR[3] را در یک محدوده بسامد گسترده جذب می‌کند و آنالیز جذب IR را در ذرات حل‌شونده در غلظت‌های بسیار کم، غیرممکن می‌سازد. تدوین راهنماهای اندازه‌گیری که به‌وسیله آن بتوان مسائل فوق را به حداقل رساند، ضروری است. در این استاندارد، ما به دنبال تدوین روشی برای مشاهده گونه‌های عملکردی شیمیایی[4] پیوندشده به نانوذرات طلای سنتزی به‌صورت فیلم‌های آب‌زدایی شده هستیم که می‌تواند اطلاعات در مورد گروه‌های مولکولی پیوندشده به نانوذرات طلا را در حالتی که محلول‌های آبی هستند، ارائه دهد. اگرچه استانداردسازی روش‌های اجرایی اندازه‌گیری FT-IR، پایه و اساس این استاندارد خواهد بود، توجه زیادی نیز به روش آماده‌سازی نمونه برای آنالیز صحیح FT-IR معطوف شده است.

1 -Fourier Ttransform Infrared Absorption Spectroscopy (FT-IR)
2- Noise
3- Infrared
4- Chemical moieties

فناوری نانو- مشخصه‌یابی سطح نانوذرات طلا برای غربال‌گری سمیت اختصاصی نانومواد: روش FT-IR

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه راهنمایی برای شناسایی مولکول‌های سطح پیوندشده به فیلم‌های نانوذرات طلای آب‌زدایی‌شده با استفاده از روش FT-IR قبل و بعد از آزمون سمیت سلولی نانومواد می‌باشد.

یادآوری ۱- نانوذرات طلا ممکن است دارای لیگاندهای سطح پیوندشده قبل از آزمون بوده و ممکن است علاوه‌برآن توسط مولکول‌های آلی یا زیستی در حین آزمون سمیت سلولی پوشانده شود.

یادآوری - اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای آمینه، چربی‌ها یا اجزای غشای پیوندشده به نانوذرات طلا را می‌توان با روش FT-IR توسط آشکارسازی نوارهای جذب مربوط به فسفودی‌استر، آمین یا چربی به ترتیب مشاهده کرد. هرچند، نوع اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها یا چربی نمی‌تواند به‌صورت کامل در طیف‌های IR مشاهده شود.

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.

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

استفاده از مرجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران- ایزو ۱-۸۰۰۰۴: ۱۳۹۵، فناوری نانو- اصطلاحات اصلی

۳ اصطلاحات و تعاریف

۳-۱ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به‌کار می‌رود.

۳-۱-۱

حالت بازتابش کلی ضعیف شده

attenuated total reflection mode

ATR

حالت دستگاهی عملیات است که در آن زاویه تابش نور IR بر روی بلور بالاتر از زاویه بحرانی تنظیم‌شده است.

یادآوری - نور به‌طور کامل توسط سطح بالایی بلور منعکس می‌شود، و شدت نور از طریق جذب توسط مواد پوشاننده سطح بالایی بلور کاهش می‌یابد. بسامد نور IR جذب‌شده برای شناسایی گونه عملکردی شیمیایی جذب‌شده استفاده می‌شود و کسری از نور جذب‌شده برای تعین مقدار گونه عملکردی حاضر استفاده می‌شود.

۳-۱-۲

دیالیز

dialysis

فرآیندی که به‌وسیله آن مولکول‌های کوچک یا یون‌ها به یک غشا نفوذ می‌کنند، در نتیجه باعث جدایی آنها از مولکول‌های بزرگ‌تر در محلول و از ماده معلق می‌شود.

[تعریف ۳۸، ISO 6107-2:2006].

۳-۱-۳

طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FT-IR

یک روش شیمیایی تحلیلی مبتنی بر جذب تابش IR توسط گونه‌های عملکردی شیمیایی در نمونه است، که برای شناسایی و تعیین مقدار جذب گونه‌های عملکردی شیمیایی استفاده می‌شود.

۳-۱-۴

حد آشکارسازی

limit of detection

LOD

مقدار کمیت اندازه‌گیری شده‌ای که با یک روش اجرایی اندازه‌گیری معین به‌دست می‌آید و در آن اگر احتمال ادعای نادرست در مورد عدم وجود یک جزء از ماده β باشد، احتمال ادعای نادرست وجود آن جزء α می‌باشد.

یادآوری ۱- برگرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۴۷۲۳ بند ۵-۱۸

یادآوری ۲- حد آشکارسازی می‌تواند به‌صورت ۲/۷۷۶ برابر انحراف استاندارد اندازه‌گیری ۵ شاهد تکرار تحت شرایط تکرارپذیری با مقادیر ۰.۰۵ توصیه‌شده توسط آیوپاک[1] برای α و β تعیین شود.

یادآوری ۳- به استاندارد ISO 17191 مراجعه شود.

۳-۱-۵

حد کمی سازی

limit of quantification

LOQ

کمترین مقدار یک آنالیت که می‌تواند با سطح قابل‌قبولی از درستی و دقت تعیین شود.

یادآوری ۱ - حد تعیین کمی می‌تواند ده برابر انحراف استاندارد اختلال نورسنجی تعیین شود، که دقت نسبی $\sigma A/A \leq 10$ % را برای حداقل سطح سیگنال A را ارائه می‌دهد.

یادآوری ۲- به مرجع [24] مراجعه شود.

۳-۱-۶

مقدار برش وزن مولکولی

molecular weight cut-off value

MWCV

وزن مولکولی حل شونده است که بیش از ۹۰ درصد آن پس از ۱۶ ساعت دیالیز باقی‌مانده است.

یادآوری- به مراجع [25] و [26] مراجعه شود.

۳-۱-۷

نانو شئ

nano-object

ماده‌ای که یک، دو یا سه بعد خارجی آن نانومقیاس است.

[بند ۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۰۰۰۴]

1- IUPAC

یادآوری- این یک اصطلاح عمومی است که برای اشیاء نانومقیاس مجزا به کار می‌رود.

۳-۱-۸

نانوذرات

nanoparticle

نانو شئ که هر سه بعد خارجی آن نانو مقیاس است.

[بند ۱-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۰۰۰۴]

یادآوری- چنانچه طول درازترین محور نسبت به طول کوتاه‌ترین محورهای یک نانو شئ، تفاوت بیش از سه برابر داشته باشد، اصطلاح‌های نانومیله یا نانوصفحه باید منظور شود.

۳-۱-۹

نانومقیاس

nanoscale

محدوده اندازه از تقریبا ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد.

[بند ۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۰۰۰۴]

یادآوری۱- خواصی را که لزوماً از اندازه بزرگ‌تر به اندازه کوچک‌تر نمی‌توان برونیابی کرد و برای چنین خواصی این حدود اندازه، تقریبی است.

یادآوری۲- حدود پایین‌تر در این تعریف (تقریباً یک نانومتر) جهت جلوگیری از نانوشئ‌شدن یا اجزاء نانوساختارشدن گروه-های اتمی کوچک و تک معرفی می‌شوند که توصیه می‌شود به‌وسیله عدم حضور حدود پایین‌تر تفهیم شود.

۳-۱-۱۰

آب مقطر پیش آزمایش‌شده

pre-tested distilled water

آب مقطراعتباردهی شده عاری از ناخالصی‌های جذب IR توسط FT-IR است.

۳-۱-۱۱

نیروی مرکزگریزی نسبی

relative centrifugal force

نیروی شتاب نسبت به جاذبه زمین است.

۳-۱-۱۲

نوار تشدید سطح پلاسمون

surface plasmon resonance band

محدوده بسامد نور جذب‌شده، که در آن جذب، نتیجه نوسان جمعی الکترون در منطقه نزدیک به سطح جامد است.

یادآوری- تشدید سطح پلاسمون در فیلم‌های نازک فلزی یا نانوذرات فلزی اتفاق می‌افتد.

۴ نمادها و کوته‌نوشت‌ها

AuNP	gold nanoparticle	نانوذرات طلا
IR	infrared	فروسرخ
MW	molecular weight	وزن مولکولی
SCM	serum containing media	محیط حاوی سرم
UV/Vis	ultraviolet/visible	فرا بنفش/ مرئی
$\times g$	Earth’s gravimetric acceleration as a reference unit for the relative centrifugal force	g شتاب جاذبه زمین به‌عنوان یک واحد مرجع برای نیروی گریز از مرکز نسبی

۵ حالت آماده‌سازی نمونه

۵-۱ حذف مولکول‌های غیرپیوندی

۵-۱-۱ کلیات

از آنجا که طیف جذب FT-IR، همه گونه‌های مولکولی در فیلم نمونه را اندازه‌گیری می‌کند، همه مولکول‌های غیر پیوندشده دارای گونه‌های جذب فعال IR، به‌جز حلال‌ها باید قبل از آماده‌سازی فیلم نمونه حذف شوند تا مولکول‌های پیوندشده به سطح نانوذرات طلا، به‌طور صحیح شناسایی شوند.

۵-۱-۲ دیالیز

زمانی که غشا با مقدار برش[1] وزن مولکولی کافی در دسترس باشد، دیالیز یک روش کارآمد برای جدا کردن مولکول‌های غیرپیوندشده از نانوذرات طلا است. اگر به اندازه کافی از غشاء دیالیز استفاده شود، غلظت مولکول‌های غیرپیوندشده را با توجه به نسبت حجم نمونه و محلول‌های دیالیز کاهش می‌دهد، به‌طوری‌که بیش از ۹۰ درصد از نانوذرات را حفظ می‌کند. توصیه می‌شود که مقدار برش وزن مولکولی کمتر از نیمی از

1- Cut off

وزن مولکولی گروه‌هایی باشد که باید حفظ شود و بالاتر از سه برابر وزن مولکولی گروه‌هایی باشد که از خود عبور می‌دهند. چون کارایی غشای دیالیز بستگی به بار و شکل مولکول‌ها دارد، کارایی حذف مولکول‌های غیرپیوندشده یک غشای دیالیز باید قبل از جداسازی نانوذرات طلا از مولکول‌های غیرپیوندشده تائید شود. قبل از آزمون کارایی، غشا باید آزموده شود که عاری از ناخالصی‌های جذب IR باشد. روش آزمون ناخالصی به شرح زیر است:

الف- کیسه دیالیز را با نیم میلی‌لیتر تا سه میلی‌لیتر آب مقطری که قبلاً آزمایش شده است، پر کنید؛

ب- کیسه دیالیز حاوی آب مقطر را با یک گیره مناسب آب‌بندی کنید و در حمام حاوی آب مقطر پیش آزمایش شده (≤۶۰۰ میلی‌لیتر در حجم) به مدت ۱۶ ساعت دیالیز کنید؛

پ- سطح بلور ATR یا پنجره IR را با استفاده از یک پنبه آغشته به حلال تمیز کنید؛

ت- حجم موردنیاز (۲ یا بیشتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) از مایع در کیسه دیالیز را بردارید؛

یادآوری- از ۲ میکرولیتر برای روش ATR و بیشتر از ۲۰۰ میکرولیتر برای روش عبوری استفاده کنید.

ث- مایع نمونه را بر روی بلور[1] ATR یا پنجره IR بچکانید و آن را در محفظه رطوبت‌گیری خشک‌کنید (به زیربند۵-۲ مراجعه شود)؛ این فرایند «چکاندن و خشک‌کردن» نامیده می‌شود؛

ج- **مقدار** FT-IR هر ناخالصی احتمالی حل‌شده در مایع نمونه را، با استفاده از روش شرح داده‌شده در زیربندهای ۶-۲ یا ۶-۳ اندازه‌گیری کنید.

چ- اگر هیچ نوار IR بزرگ‌تر از LOD در منطقه بسامد موردنظر وجود نداشته باشد، غشا، عاری از ناخالصی فعال IR درنظر گرفته می‌شود.

غشا عاری از ناخالصی فعال را می‌توان برای دیالیز استفاده کرد. روند آزمون کارایی دیالیز به‌شرح زیر است:

الف- کیسه دیالیز را با ۰.۵ میلی‌لیتر تا ۳ میلی‌لیتر محلول که فقط شامل مولکول‌هایی است که باید به‌وسیله دیالیز حذف شود، پر کنید؛

- مولکول‌های زیستی در SCM یا عصاره‌های سلول برای آزمون اتصال یا مولکول‌های مرتبط با لیگاندهای سطح، قبل و بعد از تبادل توسط دیالیز حذف می‌شوند.

- غلظت محلول نمونه برابر با مقدار بیشینه لیگاندهای سطح تنظیم شده است که در سوسپانسیون (تعلیقه) نانوذرات وجود دارد. این مقدار ممکن است همان مقدار اضافه‌شده از مولکول‌های لیگاند برای تبادل یا

1- Crystal

برآوردشده از تعداد اتم‌های طلا بر روی سطح باشد، که از ثابت شبکه[1] و قطر نانوذرات طلا محاسبه می‌شود. بیشینه تعداد مولکول‌های لیگاند، برابر تعداد اتم‌های طلا بر روی سطح، با فرض تک لایه پیوندشده بدون ممانعت فضایی در میان لیگاندها، می‌باشد.

ب- کیسه دیالیز حاوی آب مقطر را با یک گیره مناسب آب‌بندی کنید و در حمام حاوی آب مقطر پیش آزمایش‌شده (≤۶۰۰ میلی‌لیتر در حجم) به مدت ۱۶ ساعت دیالیز کنید؛

پ- حجم موردنیاز (۲ میکرولیتر یا بیشتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) از نمونه در کیسه دیالیز را بردارید؛

ت- محلول نمونه را بر روی بلور ATRیا پنجره « بچکانید و خشک‌کنید»؛

ث- FT-IR فیلم نمونه را با استفاده از روش شرح داده‌شده در زیربندهای ۶-۲یا ۶-۳ اندازه‌گیری کنید؛

ج - حجم موردنیاز (۲ یا بیشتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) از نمونه را از داخل حمام بردارید،

چ- محلول نمونه را بر روی بلور ATR یا پنجره «بچکانید و خشک‌کنید»؛

ح- FT-IR فیلم نمونه را با استفاده از روش شرح داده‌شده در زیربندهای ۶-۲ یا ۶-۳ اندازه‌گیری کنید.

خ- طیف به‌دست آمده در مراحل ت و ج را مقایسه کنید. اگر هیچ‌کدام از طیف‌ها نوار را بالای LOD نشان نداد، با افزایش غلظت محلول نمونه، آن را تکرار کنید. ازآنجاکه هر دو نمونه در کیسه دیالیز و در حمام باید ترکیب یکسانی پس از دیالیز صحیح داشته باشند، درصورتی‌که هر دو نوار، بالای LOD باشند و شدت‌ها در محدوده اندازه‌گیری عدم قطعیت یکسان باشند. غشا تائید خواهد شد.

۵-۱-۳ سانتریفیوژ کردن (گریز دادن)

از روش سانتریفیوژ می‌توان برای جداسازی نانوذرات طلا از مولکول‌های غیرپیوندشده استفاده کرد، به‌ویژه هنگامی‌که وزن مولکولی مولکول‌های غیرپیوندشده برای یافتن یک غشای دیالیز با مقدار برش وزن مولکولی کافی بسیار بالا باشد. سرعت ناکافی سانتریفوژ را که به سوسپانسیون‌شدن نانوذرات طلا در مایع رویی منتج خواهد شد، می‌توان از نوار جذب SPR مشاهده‌شده با استفاده از طیف‌سنجی UV/VIS شناسایی کرد. سرعت بیش از حد سبب ته‌نشین شدن مولکول‌های غیرپیوندشده می‌شود. سوسپانسیون‌سازی مؤثر نانوذرات طلا باید در روش سانتریفیوژ تضمین شود تا غلظت کافی از نانوذرات طلا در محلول برای آنالیز FT-IR به‌دست آید.

از طیف جذبی مرئی/فرابنفش می‌توان برای ارائه اطلاعات در مورد ته‌نشین شدن مؤثر و سوسپانسیون مجدد با توجه به مشاهدات نوار SPR استفاده کرد. اگر طیف جذب مولکول‌های پیوندشده به‌درستی در منطقه جذب SPR حذف شود، درجه انبوهگی شدن/کلوخه‌ای شدن نیز می‌تواند با پهن‌شدگی نوار جذب

1- Lattice constant

SPR در نانوذرات طلا قابل تخمین باشد. روش اجرایی تعیین ترکیب نیروی گریز از مرکز و زمان برای ته‌نشین شدن مؤثر نانوذرات طلا بدون دخالت مولکول‌های غیرپیوندشده به‌شرح زیر است:

الف- یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری را با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا پرکنید؛

ب- ته‌نشین شدن نانوذرات طلا به‌وسیله سانتریفوژ با نیرو و زمان توصیه‌شده در جدول ۱؛

پ- تاحدامکان از حجم لایه بالایی لوله، بدون به‌هم‌ریختگی قرص‌ها[1] خارج کنید؛ طیف جذبی UV/VIS محلول بالایی بین ۴۰۰ نانومتر و ۷۵۰ نانومتر در مقابل آب مقطر به‌عنوان نمونه شاهد است؛

- بررسی کنید که آیا نوار SPR در نانوذرات طلا با توجه به جذب مولکول‌های غیرپیوندشده مشاهده‌شده است؛

ت- اگر بیشینه جذب SPR بالاتر از ۰،۰۵ باشد، که حد پایین UV / VIS کمی است، مراحل الف- تا ج را با افزایش نیروی سانتریفیوژ یا زمان سانتریفوژ با افزایش ۲۰ درصد، تکرار کنید.

ث- اگر بیشینه نوار جذب SPR کمتر از ۰،۰۵ باشد، نیرو و زمان سانتریفیوژ به‌اندازه کافی برای ته‌نشین شدن بالا است.

جدول ۱ - RCF و زمان توصیه‌شده برای ته‌نشین شدن نانوذرات طلا به عنوان تابعی از قطر ذره

اندازه قطر نانوذرات طلا (nm)	حجم نمونه(ml)	RCF	زمان(دقیقه)
۵	۱/۵	۱۹۰۰۰	۶۰
۱۵	۱/۵	۱۰۰۰۰	۲۰
۳۰	۱/۵	۵۰۰۰	۲۰
۵۰	۱/۵	۲۰۰۰	۲۰
۱۰۰	۱/۵	۱۰۰۰	۲۰

روش اجرایی برای تعیین حد بالایی از نیروی سانتریفیوژ و زمان به‌شرح زیر است:

1 -Pellets

ج- یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری را با ۱.۵ میلی‌لیتر از محلول که شامل تمام اجزای دیگر به‌جز نانوذرات طلا همچون محلول لیگاند آزاد قبل و بعد از تبادل، SCM یا عصاره‌های سلولی، پر کنید؛

چ- لوله آزمایش را با نیروی سانتریفیوژ و زمان در مرحله الف تا ث سانتریفیوژ کنید؛

ح- ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی را بدون هیچ مواد ته‌نشین شده‌ای بردارید؛

خ- حجم مورد نیاز (۲ میکرولیتر یا بیشتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) از محلول رویی را بردارید؛ محلول را بر روی بلور ATRیا پنجره IR « بچکانید و خشک‌کنید» و طیف FT-IR را اندازه‌گیری کنید؛

د- محلول باقی‌مانده در لوله را با دستگاه ورتکس تکان دهید[1] و یک حجم مورد نیاز (۲ میکرولیتر یا بیشتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) بردارید؛ محلول را بر روی بلور ATR یا پنجره IR «بچکانید و خشک‌کنید» و FT-IR را اندازه‌گیری کنید؛

ذ- مراحل ج تا د را به‌عنوان آزمایش‌های مستقل سه بار تکرار کنید؛ از FT-IR لایه رویی «طیف ۱-IR» و محلول باقی‌مانده «طیف ۱-IR» میانگین بگیرید؛

ر- «طیف ۱-IR»و «طیف ۲-IR»را مقایسه کنید؛ اگر هر نوار جذب در «طیف ۲ -IR» بیشتر از LOQ و بزرگ‌تر از ۱.۳ برابر «طیف ۱-IR» باشد، نیروی سانتریفیوژ یا زمان باید کاهش یابد تا از ته‌نشین شدن مولکول‌های غیرپیوندشده جلوگیری شود. اگر تمام نوارهای جذب در «طیف ۲-IR» بزرگ‌تر از LOQ در محدوده ۰/۷ تا ۱/۳ نوار جذب «طیف 1-IR» باشد، حد بالایی نیروی سانتریفیوژ و زمان ایجاد شده است؛

ز- اگر نیروی سانتریفیوژ و زمان طی مراحل الف تا ث بالاتر از حد بالای به‌دست آمده طی مراحل ج تا ر باشد، نیروی سانتریفیوژ و زمان را می‌توان تا رسیدن به حد پایین‌تر که در آن بیشینه جذب SPR از محلول رویی به بزرگی ۰.۰۵ باشد، افزایش داد. پس از این که نیروی سانتریفیوژ و زمان تعیین شدند، نانوذرات طلا باید از مولکول‌های غیرپیوندشده از طریق روش‌های اجرایی زیر جداسازی شود:

ژ- یک لوله میکرو سانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری را با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا پر کنید؛

س- نانوذرات طلا را توسط نیروی سانتریفوژ با نیرو و زمان توصیه شده در مراحل جدول ۱ ته‌نشین کنید؛

ش- تاحدممکن از حجم مایع رویی لایه بالایی لوله، بدون به‌هم‌ریختن قرص خارج کنید؛

ص- ۱/۵ میلی‌لیتر از آب مقطر را به قرص در لوله اضافه کنید؛ لوله را به مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس تکان دهید تا سوسپانسیون پایداری به‌دست آید؛

ض- مراحل س تا ص را سه بار تکرار کنید؛

---

1 -Vortex

ط- محلول پس از انجام مرحله ض تا ب برای ساخت فیلم نمونه برای اندازه‌گیری FT-IR استفاده می‌شود؛

ظ- اگر قرص نانوذرات طلا به دلیل کلوخه‌ای شدن در مرحله ص، مجدداً سوسپانسیون نشود، مقدار کمی اسید یا باز را برای تهیه سوسپانسیون مجدد و مؤثر می‌توان افزود؛

ر- برای نانوذرات طلای آمینه شده،۱۵۰ میکرولیتر از HCl یک نرمال را به ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانوذرات طلا پس از مرحله ص اضافه کنید و دوباره به مدت ۳۰ ثانیه بچرخانید؛

ز- برای نانوذرات طلا کربوکسیلاته شده،۱۵۰ میکرولیتر از NaOH یک نرمال را به ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانوذرات طلا پس از مرحله ص اضافه کنید و دوباره به مدت ۳۰ ثانیه بچرخانید؛

س- این افزودنی‌ها در مرحله ض شسته می‌شوند.

۵-۲ آب‌زدایی

حذف آب در فیلم نمونه ضروری است، چون نور IR به‌شدت توسط آب جذب می‌شود. جهت آماده‌سازی یک فیلم آب‌زدایی‌شده نانوذرات طلا بر روی بلور ATR یا پنجره IR، از آلودگی باید اجتناب شود و باید عدم آلودگی آن را توسط آزمایش بلانک در روند زیر تایید کرد:

الف- زمان موردنیاز برای آب‌زدایی محلول نانوذرات طلا در یک محفظه آب‌زدایی استفاده‌شده برای این آزمایش را اندازه‌گیری کنید. محفظه آب‌زدایی می‌تواند یک آون[1] (خلاء) یا دسیکاتور (خلاء) باشد. درصورت استفاده از آون یا دسیکاتور «خلا»، پمپ خلاء باید از نوع بدون روغن باشد، یا یک تله سرد[2] باید بین محفظه و پمپ خلا وجود داشته باشد؛

ب- بلور ATR خالی یا پنجره IR را در محفظه آب‌زدایی در طول زمان لازم برای آب‌زدایی محلول نانوذرات طلا، قرار دهید؛

پ- شدت طیف IR خالی را در بلور ATR یا پنجره IR اندازه‌گیری کنید؛

ت- سطح بلور ATR یا پنجره IR را با یک پنبه مرطوب شده با ایزوپروپانول با خلوص بالا تمیز کنید.شدت طیف IR را در بلور ATR تمیز یا پنجره IR اندازه‌گیری کنید؛

ث- FT-IR بلور ATR یا پنجره IR را که در محفظه آب‌زدایی انکوبه شده را محاسبه کنید؛

ج- اگر هیچ نوارIR بزرگ‌تر از LOD در منطقه بسامد موردنظر وجود نداشته باشد، فرایند آب‌زدایی بدون ناخالصی‌های فعال IR هست. درغیراین صورت سعی کنید تا منبع ناخالصی را بیابید و جذب IR زیر LOD را کاهش دهید درحالی‌که مراحل ب تا ث را تکرار می‌کنید.

1- Oven
2- Cold trap

۵-۳ آزمایش غربالگری برای ناخالصی‌ها در آب مقطر از لوله‌های آزمایشگاهی نمونه

برخی از لوله‌های آزمایشگاهی مخروطی و لوله‌های آزمایشگاهی میکروسانتریفیوژ، هنگامی‌که حاوی آب مقطر برای بیش از چند دقیقه باشند، ناخالصی‌های هیدروکربنی را آزاد می‌سازند. اگرچه مقادیر جذب به دلیل این ناخالصی‌ها بسیار پایین است ($<10^{-3}$)، به‌طورجدی می‌تواند بر آنالیز لیگاندهای سطحی روی نانوذرات طلا تأثیر بگذارد، چون مقادیر جذب FTIR در خود نانوذرات طلا نیز بسیار کم است. جلوگیری از آزادسازی ناخالصی‌های هیدروکربنی توسط لوله‌های آزمایشگاهی نمونه، بهترین کار است. قبل از آزمودن ناخالصی‌ها از لوله‌های آزمایشگاهی نمونه، آب مقطر باید از نظر عاری بودن از ناخالصی‌ها آزموده شود. روند آزمودن ناخالصی آب مقطر به شرح زیر است:

الف- حجم مورد نیاز (۲ میکرولیتر یا کمتر مساوی از ۲۰۰ میکرولیتر) از آب مقطر را بردارید؛

ب- آب مقطر را روی بلور ATR یا پنجره IR " بچکانید و خشک‌کنید"؛

پ- شدت IR را در بلور ATR یا پنجره IR اندازه‌گیری کنید (زیربندهای۶-۲ یا ۶-۳ را ببینید)؛

ت- بلور ATR یا سطح پنجره IR را با یک پنبه مرطوب شده با ایزوپروپانول با خلوص بالا تمیز کنید. شدت طیف IR را در بلور ATRتمیز یا پنجره IR اندازه‌گیری کنید؛

ث- طیف FT-IR آب مقطر چکانده شده و خشک‌شده را محاسبه کنید؛

ج- اگر هیچ نوارIR بزرگ‌تر از LOD در منطقه بسامد موردنظر وجود نداشته باشد، آنگاه از آب مقطری استفاده کنید که عاری از ناخالصی‌های فعال IR باشد. این آب، «آب مقطر پیش‌آزموده» نامیده می‌شود. درغیراین‌صورت سعی کنید تا منبع ناخالصی را بیابید و جذب IR زیر LOD را با تکرار مراحل الف تا ج کاهش دهید.

هنگامی‌که تائید شود آب مقطر عاری از ناخالصی است، آلودگی آب مقطر توسط ناخالصی‌های فعال FT-IR از لوله‌های آزمایشگاهی نمونه را می‌توان با روش‌های زیر آزمایش کرد:

الف- لوله آزمایشگاهی نمونه را (میکروسانتریفیوژ یا لوله مخروطی) را با آب مقطر پیش‌آزموده تا ۸۰٪ پرکنید؛

ب- سرپوش را ببندید و لوله را برای ۳۰ ثانیه تکان دهید؛

پ- آب مقطر را در لوله آزمایشگاهی نمونه برای بیش از ۳۰ دقیقه نگه‌دارید؛

ت- حجم موردنیاز (۲ میکرولیتر یا کمتر مساوی ۲۰۰ میکرولیتر) از مایع را در لوله آزمایشگاهی نمونه بردارید؛

ث- مایع نمونه را روی بلور ATR یا پنجره IR " بچکانید و خشک‌کنید"؛

ج- FT-IR ناخالصی‌های بالقوه در آب مقطر ذخیره‌شده در لوله آزمایشگاهی نمونه را اندازه بگیرید (به زیربندهای۶-۲ یا ۶-۳ مراجعه شود).

چ- اگر هیچ نوارIR بالاتر از LOD در منطقه بسامد موردنظر وجود نداشته باشد، لوله آزمایشگاهی نمونه عاری از ناخالصی فعال IR است. این لوله آزمایشگاهی «لوله آزمایشگاهی نمونه پیش آزموده شده» نامیده می‌شود. درغیراین‌صورت، لوله آزمایشگاهی نمونه را مجدداً با آب مقطر پیش‌آزموده‌شده یا ایزوپروپانول با خلوص بالا تمیز کنید و مرحله الف تا ج را پس از خشک شدن لوله آزمایشگاهی نمونه تکرار کنید.

درصورتی‌که هنوز نوارIR بیش‌ازحد LOD در منطقه بسامد موردنظر وجود داشته باشد، از یک لوله آزمایشگاهی نمونه تولیدشده توسط شرکت‌های دیگر استفاده کنید و مراحل الف تا ج را تکرار کنید.

۶ روش اندازه‌گیری FT-IR

۶-۱ کلیات

در این بند، روش‌های اجرایی اندازه‌گیری برای آنالیزFT-IR توصیف‌شده است. روش اجرایی ATR و عبوری با استفاده از مواد عبور دهنده IR نامحلول در آب را می‌توان استفاده کرد.

۶-۲ روش اجرایی بازتاب کلی ضعیف شده

روش اجرایی ATR برای آنالیز کمی فیلم‌های نازک همچون فیلم نانوذرات طلا تهیه‌شده از محلول، قابل‌استفاده است. کسر مساوی[1] از سوسپانسیون نانوذرات طلا یا محلول روی جزء بلور ATR ته‌نشین خواهد شد. حلال تبخیر می‌شود و نانوذرات طلا یا مولکول‌های حل‌شده یک فیلم نازک را با ضخامت متناسب با غلظت، شکل می‌دهد. به شرطی که این فیلم در تماس خیلی نزدیک با بلور باقی بماند و ضخامت آن کمتر از عمق نفوذ موج ناپایدار در بالای بلور ATR باشد، سیگنال جذب اندازه‌گیری‌شده متناسب با ضخامت فیلم خواهد بود. ازآنجاکه غلظت نانوذرات طلا در محلول به‌طورکلی کم است (کمتر از ۱ میکرومولار)، فیلم نمونه تهیه‌شده از محلول بسیار نازک است (کمتر از ۱ میکرون ضخامت).

توصیه می‌شود از ZnSe یا الماس به‌عنوان مواد برای بلور ATR با ناحیه مدور فعال پنجره با قطر حدود ۲ میلی‌متر استفاده شود. این مواد برای استفاده به‌عنوان پنجره IR مناسب هستند زیرا آنها ضد آب هستند و در منطقه طول‌موج IR شفافیت بالا دارند. یکی از مزایای اصلی استفاده از حالت ATR این است که حجم نمونه موردنیاز برای اندازه‌گیری‌های FT-IR، با توجه به منطقه فعال کوچک بلور ATR، بسیار کوچک (تقریباً ۲ میکرولیتر) است. پروفایل جذب IR در FT-IR به‌دست‌آمده با استفاده از روش اجرایی ATR را نمی‌توان به‌طور مستقیم با پروفایل به‌دست آمده از روش اجرایی عبوری مقایسه کرد، زیرا شدت‌های IR بازتابیده‌شده در امتداد بسامد در سطح بلور ATR اعوجاج[2] یافته است. بااین‌وجود، FT-IR به‌دست‌آمده با

1- Aliquot
2- Distorted

استفاده از روش اجرایی ATR، اطلاعات کمی را فراهم می‌سازد، اگر اطلاعات با طیف به‌دست‌آمده توسط همین روش اجرایی مقایسه شوند، و اگر از محدوده خطی فراتر نرود. روند اندازه‌گیری FT-IR با استفاده از روش اجرایی ATR با کمترین اعوجاج پس‌زمینه به شرح زیر است:

الف- طیف‌سنج FT-IR را روشن کنید و جریان نیتروژن خشک (نیتروژن) را برقرار کنید تا عدسی‌های IR را در طول مسیر پرتو پاک‌سازی کند. سپس آن را گرم‌کنید و دستگاه را برای بیش از ۶۰ دقیقه تمیز کنید. زمان موردنیاز برای تکمیل پاک‌سازی باید با توجه به روش اجرایی آزمون پاک‌سازی در زیربند ۶-۴ آزمایش شود. به‌طورکلی توصیه می‌شود که دستگاه به‌صورت ثابت در حالت روشن قرار داده شود تا از بازه پایدارسازی دستگاه جلوگیری شود؛

ب- در صورت لزوم آشکارساز IR را با استفاده از نیتروژن مایع و یا دیگر سامانه‌های خنک‌کننده همراه با دستگاه، خنک‌کنید. توصیه می‌شود که از آشکارسازی استفاده شود که LOD حداقل 3×10^{-4}را در واحد جذب، در مدت‌زمان تائید شده در روند بر اساس ۶-۴، ارائه کند؛

پ- پایداری دستگاه را بررسی کنید؛

ت- بلور را با یک پنبه مرطوب شده با ایزوپروپانول با خلوص بالا تمیز کنید؛

ث- نمونه را بر روی بلور " بچکانید و خشک‌کنید"

ج- طیف، تک‌پرتو نمونه را اندازه‌گیری کنید؛ همچنین تفکیک‌پذیری و بیشینه زمان یکپارچه‌سازی را ثبت کنید؛

چ- بلور تمیز را در محل با استفاده از یک پنبه مرطوب‌شده با حلال تمیز کنید؛

ح- طیف تک‌پرتو پس‌زمینه را اندازه‌گیری کنید؛

خ- طیف جذب نمونه از پس‌زمینه و طیف تک‌پرتوی نمونه را محاسبه کنید.

اندازه‌گیری پس‌زمینه پس از اندازه‌گیری نمونه بهتر است، زیرا فاصله زمانی کوچک‌تری وجود دارد و نیازی به حذف بلور نیست.

۶-۳ روش عبوری

از قرص‌های فشرده‌شده با فشار بالا به‌صورت مکرر در روش عبوری برای اندازه‌گیری طیف FT-IR استفاده می‌شود. بااین‌حال، جذب کوچک IR در نانوذرات طلا می‌تواند به‌شدت توسط اعوجاج پس‌زمینه با توجه به ریخت‌شناسی قرص‌ها تحت‌تأثیر قرار گیرد. توصیه می‌شود که یک فیلم نمونه آب‌گیری‌شده نامحلول در آب ساخته شود و از پنجره IR شفاف در آماده‌سازی نمونه برای استفاده از روش عبوری استفاده شود، که نتایج از نظر پایداری پس‌زمینه سازگارتر از استفاده از قرص‌ها باشد.

روند اندازه‌گیری طیفFT-IR با استفاده از روش عبوری به‌شرح زیر است:

الف- طیف‌سنج FT-IR را روشن کنید و جریان نیتروژن خشک را برقرار کنید تا عدسی‌های IR را در طول مسیر پرتو پاک‌سازی کند. سپس آن را گرم‌کنید و دستگاه را برای بیش از ۶۰ دقیقه تمیز کنید. زمان موردنیاز برای تکمیل پاک‌سازی باید با توجه به روش اجرایی آزمون پاک‌سازی درزیربند ۶-۴-۶ آزمون شود. به‌طورکلی توصیه می‌شود که دستگاه به‌صورت ثابت در حالت روشن قرار داده شود تا از دوره تثبیت جلوگیری شود؛

ب- درصورت لزوم دستگاه IR را با استفاده از نیتروژن مایع و یا دیگر دستگاه‌های خنک‌کننده همراه با دستگاه، خنک‌کنید. توصیه می‌شود که از دستگاهی استفاده شود که LOD حداقل 3×10^{-4} را در واحد جذب، در مدت زمان تائیدشده در روند بر اساس زیربند ۶-۴، ارائه کند؛

پ- پایداری دستگاه را بررسی کنید؛

ت- پنجره IR را با یک پنبه مرطوب‌شده با ایزوپروپانول با خلوص بالا تمیز کنید؛

ث- نمونه را بر روی پنجره IR «بچکانید و خشک‌کنید».

ج- طیف تک پرتو نمونه را اندازه‌گیری کنید؛ همچنین تفکیک‌پذیری و بیشینه زمان یکپارچه‌سازی را ثبت کنید؛

چ- پنجره IR را بردارید و فیلم نمونه را با استفاده از یک پنبه مرطوب‌شده با حلال تمیز کنید؛

ح- طیف تک پرتو پس‌زمینه را اندازه‌گیری کنید؛

خ- طیف جذب نمونه از پس‌زمینه و طیف تک پرتو نمونه را محاسبه کنید؛

د- به‌جای مراحل چ و ح، بهتر است از دریچه[1] پنجره نمونه‌ای استفاده شود که بتواند به دو پنجره برای اندازه‌گیری نمونه و پس‌زمینه مجهز شود؛

- با دستگاه مجهز به دریچه پنجره نمونه، هوای تخلیه‌شده در جهت پرتو، می‌تواند با استفاده از اندازه‌گیری طیف نمونه و پس‌زمینه حفظ شود؛

- در این مورد، طیف شدت پس‌زمینه با استفاده از پنجره خالی تمیز و متشکل از ماده و شکل یکسانی همانند پنجره استفاده‌شده برای آماده‌سازی فیلم نمونه، اندازه‌گیری می‌شود؛

- طیف اختلاف جذب بین دو پنجره IR خالی[2] برای نمونه و پس‌زمینه به ترتیب اندازه‌گیری می‌شود و از طیف جذب نمونه کم می‌شود.

۶-۴ تعیین زمان موردنیاز برای تخلیه کامل

۶-۴-۱ کلیات

1 - Shuttle
2 - Blank

ازآنجاکه روش اجرایی FT-IR آشکارسازی بسیار حساسی از ترکیبات مولکولی را حتی در فاز گازی فراهم می‌کند، تخلیه هوا در جهت IR باید برای جلوگیری از تداخل جذب توسط بخارآب، دی‌اکسیدکربن و سایر ناخالصی‌های هوا انجام شود. تخلیه را می‌توان در امتداد کل منطقه‌ای که در آن نور IR عبور می‌کند، با جریان گاز نیتروژن خشک انجام داد. تخلیه ناکافی معمولاً به نوارهای IR در منطقه بخارآب و دی‌اکسیدکربن با توجه به تفاوت غلظت این مولکول‌ها بین نمونه و اندازه‌گیری پس‌زمینه، منجر می‌شود. بنابراین، زمان موردنیاز برای تخلیه کامل باید تعیین شود و قبل از اندازه‌گیری شدت طیف IR، به‌کار گرفته شود. روش اجرایی زیر برای تعیین زمان موردنیاز برای تخلیه کامل باید انجام شود.

۶-۴-۲ روش ATR

روش اجرایی ATR به شرح زیر است:

الف- درحالی‌که نیتروژن خشک از طریق ورودی تخلیه در دستگاه، تزریق می‌شود؛ یک بلور ATR تمیز را در محل بلور در دستگاه نصب کنید؛

ب- طیف شدت IR منعکس‌شده از بلور ATR به‌عنوان پس‌زمینه را ثبت کنید؛

پ- تا مدت‌زمان از پیش تعیین‌شده، به‌عنوان‌مثال ۱۰ دقیقه، برای تخلیه صبر کنید. زمان از پیش تعیین‌شده می‌تواند ترجیحاً به‌صورت اختلاف‌زمان بین اندازه‌گیری نمونه و پس‌زمینه در آنالیز روزانه، تنظیم شود؛

ت- طیف شدت IR منعکس‌شده از بلور ATR را به‌عنوان سیگنال ثبت کنید؛ طیف جذب FT-IR بلور ATR تمیز را محاسبه کنید؛

ث- تا مدت‌زمان از پیش تعیین‌شده اضافی، به‌عنوان‌مثال ۱۰ دقیقه، برای تخلیه بیشتر صبر کنید (طبق بند پ)؛

ج- طیف شدت IR منعکس‌شده از بلور ATR را به‌عنوان سیگنال ثبت کنید؛ طیف جذبی FT-IR بلور ATR تمیز را محاسبه کنید؛

چ- طیف به‌دست‌آمده توسط این دو اندازه‌گیری آخر را مقایسه کنید؛

- اگر دو نوار جذب IR در محدوده LOD در کل طول‌موج سازگاری داشته باشد، زمان موردنیاز برای تخلیه کامل به‌عنوان زمان تخلیه تا اندازه‌گیری قبلی تعیین می‌شود؛

- درغیراین صورت، مراحل ث تا چ را تکرار کنید تا زمانی که نوارهای جذب IR از دو اندازه‌گیری آخر در کل طیف محدوده LOD سازگاری داشته باشند.

۶-۴-۳ روش عبوری

روش اجرایی عبوری به‌صورت زیر است:

الف- یک پنجره IR را در محل پنجره در دستگاه نصب کنید، درحالی‌که نیتروژن خشک از طریق ورودی تخلیه در دستگاه، تزریق می‌شود؛

ب- طیف شدت IR منعکس‌شده توسط پنجره IR را به‌عنوان پس‌زمینه ثبت کنید؛

پ- تا مدت‌زمان از پیش تعیین‌شده، به‌عنوان‌مثال ۱۰ دقیقه، برای تخلیه صبر کنید. زمان از پیش تعیین‌شده می‌تواند ترجیحاً به‌صورت اختلاف‌زمان بین اندازه‌گیری نمونه و پس‌زمینه در آنالیز روزانه، تنظیم شود؛

ت- طیف شدت IR منتقل‌شده از پنجره IR را به‌عنوان سیگنال ثبت کنید؛ طیف جذب FT-IR پنجره IR تمیز را محاسبه کنید؛

ث- تا مدت‌زمان از پیش تعیین‌شده اضافی، به‌عنوان‌مثال ۱۰ دقیقه، برای تخلیه بیشتر صبر کنید؛

ج- طیف شدت IR منتقل‌شده از پنجره IR را به‌عنوان سیگنال ثبت کنید؛ طیف جذبی FT-IR پنجره IR تمیز را محاسبه کنید؛

چ- طیف به‌دست‌آمده توسط این دو اندازه‌گیری آخر را مقایسه کنید؛

- اگر دو نوار جذب IR در محدوده LOD در کل طول‌موج سازگاری داشته باشد، زمان موردنیاز برای تخلیه کامل به‌صورت زمان تخلیه تا اندازه‌گیری قبلی تعیین می‌شود؛

- درغیراین‌صورت، مراحل ث تا چ را تکرار کنید تا زمانی که نوارهای جذب IR از دو اندازه‌گیری آخر در کل طیف محدوده LOD سازگاری داشته باشند.

۶-۵ محدوده خطی شدت نوار IR برحسب غلظت

به‌منظور آنالیز کمی، لازم است که محدوده خطی نوار جذب IR برحسب غلظت نانوذرات طلا برای حالت‌های مشخص ارتعاشی تعیین شود. ازآنجاکه جذب IR نوار ارتعاشی مولکولی ممکن است پس از اتصال با نانوذرات طلا تغییر یابد، تعیین کمی، فقط برای شدت نوار است و برای مقدار لیگاند پیوندشده به نانوذرات طلا نیست. زمانی که خطی بودن شدت نوار IR برحسب غلظت ایجاد شود، شناسایی تبادل لیگاند با مشاهده شدت نوار نسبی ممکن خواهد بود (به زیربند ۷-۱ مراجعه شود). این شناسایی را می‌توان با مشاهده شدت نوار IR فیلم نمونه ساخته‌شده با محلول‌های پیاپی رقیق‌شده[1] نانوذرات طلا، انجام داد. روش تجربی برای تعیین محدوده غلظت خطی با توجه به‌شدت نوار IR به شرح زیر است:

الف- حجم موردنیاز (۲ میکرولیتر یا بیشتر مساوی ۲۰۰میکرولیتر) از نمونه را بردارید؛ محلول را بر روی بلور ATR یا پنجره IRK «بچکانید و خشک‌کنید»؛

1 -Serially diluted

ب- طیف FT-IR را با توجه به روند ۶-۲ یا ۶-۳ اندازه بگیرید؛

پ- محلول نمونه را پیاپی به‌صورت نصف رقیق کنید (برای مثال: ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ ، ۱/۱۶)؛ حداقل چهار محلول پیاپی رقیق‌شده را آماده کنید؛

ت- طیف جذبی FT-IR هر محلول رقیق‌شده را اندازه‌گیری کنید؛

ث- معکوس ضریب رقت را به‌صورت «x» تنظیم کنید (برای مثال: ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ ، ۱/۱۶) و جذب بالاترین نوار IR را به‌صورت « y » تعریف کنید. این مقادیر را در مقیاس خطی رسم کنید؛

ج- محدوده غلظتی که در آن جذب خطی وابسته به معکوس فاکتور رقت است حداقل در سه نقطه همپوشانی دارد؛

چ- نسبت‌های شدت نسبی نوارهای IR به بالاترین نوار را در هر طیف با رقت پیاپی به‌دست آورید؛

ح- نسبت شدت نسبی نوارهای IR را برحسب معکوس فاکتور رقت رسم کنید؛ محدوده غلظتی که در آن نسبت‌های شدت نسبی مستقل از فاکتور رقت حداقل در دو نقطه همپوشانی داشته باشند، تعیین کنید؛

خ- محدوده غلظت برای آنالیز طیف FT-IR معتبر باید هر دو شرایط را در مراحل ج و ح برآورده سازد.

۶-۶ تعیین LOD و LOQ

۶-۶-۱ کلیات

به‌منظور آنالیز کمی، تعیین LOD و LOQ برای هر بسامد ارتعاش لازم است. بر اساس استاندارد ISO 17191، ،% 10 $\geq \sigma_A/A$ ،۱۰ برابر انحراف معیار استاندارد[1] نوفه نورسنجی محاسبه می‌شود. بنابراین، LOD و LOQ می‌تواند به ترتیب برابر ۲/۷۷۶ و ۱۰ برابر انحراف معیار استاندارد نوفه نورسنجی، به ترتیب محاسبه شود ($2.776\sigma_A$برای LOD و $10\sigma_A$ برای LOQ). این روش اجرایی برای آنالیز نوفه نورسنجی برای تخمینLOD و LOQ در هر بسامد به‌شرح زیر است (راه‌اندازی و ایجاد پایداری در دستگاه همان‌طور که در زیربندهای ۶-۲ یا ۶-۳ تشریح شده است، مهم است).

۶-۶-۲ روش اجرایی بازتاب کلی ضعیف شده

روش اجرایی ATR به‌شرح زیر است:

الف- یک بلور ATR تمیز را در محل بلور در دستگاه قرار دهید؛

ب- طیف شدت IR منعکس‌شده از بلور ATR را ثبت کنید؛

پ- فرایند تخلیه بلور ATR را با استفاده پنبه مرطوب شده با حلال انجام دهید؛

1 - Standard deviation

ت- طیف شدت FT-IR منعکس‌شده از بلور ATR تمیز را محاسبه کنید؛

ث- حداقل پنج طیف IR مستقل را با تکرار مراحل ب تا ت اندازه‌گیری کنید؛

ج- انحراف معیار استاندارد طیف جذبی FT-IR به دست آمده در مراحل الف تا ث را در هر بسامد محاسبه کنید؛

چ- LOD را در هر بسامد با ضرب کردن انحراف معیار استاندارد در ۲/۷۷۶ محاسبه کنید؛

ح - LOQ را در هر بسامد با ضرب کردن انحراف معیار استاندارد در ۱۰ محاسبه کنید؛

۶-۶-۳ روش عبوری

روش اجرایی عبوری به‌شرح زیر است:

الف- یک پنجره IR تمیز را در محل نمونه در دستگاه قرار دهید؛

ب- طیف شدت IR منتقل‌شده در پنجره IR را ثبت کنید؛

پ- پنجره IR را بردارید و با استفاده از پنبه مرطوب‌شده با حلال، پاک‌سازی را انجام دهید؛

ت- پنجره تمیزشده را مجدداً نصب کنید و طیف شدت IR منتقل‌شده از طریق پنجره IR را به‌عنوان پس‌زمینه ثبت کنید؛

ث- طیف جذب FT-IR پنجره IR را محاسبه کنید؛

ج- حداقل پنج طیف IR مستقل را با تکرار مراحل الف تا ث را اندازه‌گیری کنید؛

چ- انحراف‌های استاندارد طیف جذب FT-IR به‌دست آمده در مراحل الف تا ج را در هر بسامد محاسبه کنید؛

چ- LOD را در هر بسامد با ضرب کردن انحراف معیار استاندارد در ۲/۷۷۶ محاسبه کنید؛

ح- LOQ را در هر بسامد با ضرب کردن انحراف معیار استاندارد در ۱۰ محاسبه کنید؛

۶-۷ تعیین تکرارپذیری[1]

به‌منظور آنالیز کمی، برای تعیین تکرارپذیری، اندازه‌گیری نوارهای جذب IR لازم است.تکرارپذیری می‌تواند به‌عنوان فاصله اطمینان ٪۹۵ از اندازه‌گیری جذب تکرارشونده ارزیابی شود. روش اجرایی برای آنالیز تکرارپذیری نوار جذب IR به‌صورت زیر است:

1 - Repeatability

الف– حجم موردنیاز از محلول نمونه را بردارید و طیف FT-IR نمونه خشک را با توجه به زیربندهای ۶-۲ یا ۶-۳ اندازه‌گیری کنید؛

- غلظت محلول نمونه را در محدوده خطی با توجه به زیربندهای ۶-۲ یا ۶-۳ تنظیم کنید؛

ب– شدت‌های نوار IR که بیش‌ازحد شدت LOQ است را آنالیز کنید؛

پ– حداقل سه طیف مستقل IR از فیلم نمونه‌ای که از همان محلول ساخته‌شده است را با تکرار نمونه‌برداری، اندازه‌گیری و روند محاسبه طیف، به‌دست آورید؛

ت– انحراف استاندارد نوارهای IR از طیف IR مشاهده‌شده را محاسبه کنید؛

ث– بازه اطمینان ٪۹۵ را برای تکرارپذیری ($CI_{95\%rRpt}$) از انحراف معیار استاندارد و تعداد مشاهده مستقل با استفاده از معادله زیر محاسبه کنید:

(۱)

$$CI_{95\%,rRpt} = \left[k \times s(A_v) / \sqrt{N} \right] / A_{v,m}$$

که در آن:

$CI_{95\%rRpt}$	بازه اطمینان ٪۹۵ تکرارپذیری نسبی
K	ضریب پوشش برای سطح اطمینان داده‌شده و تعداد تاریخ (مقادیر در مرجع [30] خلاصه‌شده است)
N	تعداد مشاهدات مستقل
$S(A_v)$	انحراف استاندارد جذب از N داده
$A_{v,m}$	مقدار میانگین جذب اندازه‌گیری شده

۷ مثال‌های کاربردی

۷-۱ درجه تبادل لیگاند

درجه تبادل لیگاند از یک ترکیب به ترکیب دیگر را می‌توان با مقایسه شدت‌های نسبی ارزیابی کرد. در این ارزیابی، تمام نوارهای جذب که شدت بالاتر از LOQ دارند قابل‌استفاده هستند. علاوه‌براین، توصیه می‌شود شدت نوار به‌صورت خطی به غلظت محلول نانوذرات طلا وابسته باشد همان‌طور که در زیربند ۶-۵ تشریح شده است. یک نمونه روش اجرایی اعتباردهی تبادل لیگاند به‌صورت زیر است:

الف- یک میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا را قبل از تبادل لیگاند بردارید. نانوذرات طلا را از لیگاندهای غیرپیوندشده با توجه به زیربندهای ۵-۱-۲ یا ۵-۱-۳ جدا کنید و سوسپانسیون نانوذرات طلا را در آب مقطر تهیه کنید؛

ب- محلول آماده‌شده در مرحله (الف) را بر بلور ATR یا پنجره IR «بچکانید و خشک‌کنید» و طیف FT-IR را اندازه‌گیری کنید. طیفIR از نانوذرات طلا را قبل از تبادل لیگاند از این اندازه‌گیری، به‌دست آورید؛

پ- حجم موردنیاز از محلول لیگاند را که در سطح نانوذرات طلا تبادل خواهد شد، بردارید. این محلول را روی بلورATR یا پنجره IR «بچکانید و خشک‌کنید» و طیف FT-IR را اندازه‌گیری کنید. طیف IRمولکول‌های لیگاند آزاد را از این اندازه‌گیری، به دست آورید؛

ت- یک میلی‌لیتر از محلول نانوذرات طلا را پس از تبادل لیگاند بردارید. نانوذرات طلا را از لیگاندهای غیرپیوندشده با توجه به بندهای ۵-۱-۲ یا ۵-۱-۳ جدا کنید و سوسپانسیون نانوذرات طلا را در آب مقطر تهیه کنید؛

ث- محلول آماده‌شده در قسمت ت را روی بلور ATR یا پنجره IR «بچکانید و خشک‌کنید» و طیف FT-IR را اندازه‌گیری کنید. طیف IR مولکول‌های نانوذرات طلا را پس از تبادل لیگاند از این اندازه‌گیری، به‌دست آورید؛

ج- نوارهای جذب بزرگ‌تر از LOQ را از بالاترین نوار بسامد به پایین‌ترین نوار در طیف IR از نانوذرات طلا قبل از تبادل فهرست کنید. شماره‌های پشت سر هم به نوارهای جذب شروع‌کننده از «۱» برای بالاترین نوار بسامد اختصاص دهید؛

چ- جذب نسبی هر نوارIR در سه طیف به‌دست‌آمده در مراحل ب، پ و ت نرمال‌شده با شدت‌های نوار کششی $-CH_2$ را به ترتیب محاسبه کنید؛

ح- اگر شدت‌های نوار کششی CH_2 کوچک‌تر از LOQ در هر طیفی باشد، از نوار جذب دیگری استفاده کنید که همه شدت‌های طیف FT-IR آن از LOQ در همه طیف‌های FT-IR به‌دست‌آمده در مراحل ب، پ و ت برای نرمال‌سازی بزرگ‌تر است؛

خ- شدت نسبی نوارهای IR را در مقابل اعداد تخصیص داده‌شده، رسم کنید؛

د- شدت نسبی نانوذرات طلا را قبل از تبادل لیگاند آزاد مقایسه کنید. بررسی کنید آیا هیچ گروه نوارIR وجود دارد که نشان‌دهنده تفاوت در نسبت‌های شدت نسبی بین دو طیف باشد؛

-اگر هیچ نوارIR وجود نداشته باشد که شدت نسبی متفاوت را نشان دهد، این روش اجرایی قابل‌استفاده نیست.

-اگر هیچ نوارIR وجود نداشته باشد که شدت نسبی متفاوت را نشان دهد، نوارIR را برای مقایسه علامت بزنید؛

ذ- نسبت‌های نسبی نوارهای IR لیگاند تبادل شده با نانوذرات طلا را با دو شدت نسبی دیگر مقایسه کنید. درجه تبادل کیفی را از نسبت نوارهای IR مجزا، تخمین بزنید؛

ر- نتیجه یک مطالعه موردی از تائید تبادل لیگاند در سطح نانوذرات طلا در پیوست الف ارائه‌شده است.

۷-۲ اندازه‌گیری کیفی پیوند زیست مولکولی[1]

پیوند گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی عمده به سطح نانوذرات طلا را می‌توان از طریق شناسایی آمین، فسفودی‌استر یا حالت‌های ارتعاش چربی، اندازه‌گیری کرد. این مشاهده را می‌توان قبل و بعد از آزمون سمیت سلولی نانوذرات طلا انجام داد. این نتایج ممکن است برای پی بردن به اتصال گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی به سطح نانوذرات طلا مورداستفاده قرار گیرد. روش اجرایی تشخیص این گونه‌های عملکردی در سطح نانوذرات طلا با استفاده از FT-IR در حین آزمون سمیت سلولی به صورت زیر است:

الف- طیف FT-IR نانوذرات طلا را که برای آزمون سمیت سلولی استفاده می‌شود، اندازه‌گیری کنید؛

ب- حجم ثابتی از محلول نانوذرات طلا را به لوله آزمایشگاهی نمونه اضافه کنید که شامل سلول‌های زنده و محیط کشت سلول است؛

پ- مخلوط را در یک دستگاه انکوباتور (گرمخانه) برای مدت‌زمان ثابت نگه‌دارید.

ت- در فواصل زمانی از پیش تعیین‌شده، محلول بالایی در لوله را بدون جذب سلول، بردارید؛

ث- محلول نمونه را در یک لوله میکروسانتریفیوژ ۲ میلی‌لیتری پر کنید و از سلول‌ها یا تکه‌های سلول کشیده شده با محلول بالایی توسط سانتریفوژ کردن لوله با $250\times g$ ته‌نشین‌کنید؛

ج- لایه رویی که ممکن است حاوی نانوذرات طلا، مولکول‌های زیستی غیرپیوندشده و نمک باشد را بردارید. نمک‌ها و مولکول‌های غیرپیوندشده را از محلول با استفاده از روش اجرایی دیالیز یا سانتریفیوژ حذف کنید؛

چ- طیف FT-IR نانوذرات طلا جداشده را اندازه‌گیری کنید. این طیف را با طیف به‌دست‌آمده در مرحله الف مقایسه کنید. بررسی کنید که آیا نوارهای IR جدیدی در طیف FT-IR به‌دست‌آمده در آخرین طیف، آشکارسازی شده است؛

- پیوند گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی مشخصه پروتئین‌ها به نانوذرات طلا را می‌توان به‌صورت کیفی با تشخیص هم‌زمان نوار cm^{-1} ۳۵۱۰ تا cm^{-1} ۳۳۱۰ (زنجیره‌ای/حلقوی و شاخه‌های کششی آمینه اولیه و

1-biomolecular

ثانویه) ونوار cm^{-1} ۱۶۵۰ تا cm^{-1} ۱۵۵۰ (خم زنجیره‌ای/ حلقوی و پیوند آمین اولیه/ثانویه) اندازه‌گیری کرد [۳۱] [۳۲] [۳۳]؛

- پیوند گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی مشخصه چربی یا اجزا غشا به نانوذرات طلا را می‌توان به‌صورت کیفی با تشخیص نوار افزایش‌یافته در cm^{-1} ۲۹۳۵ به cm^{-1} ۲۹۱۵ (شاخه نامتقارن متیلن C-H)، و cm^{-1} ۲۸۶۵ تا cm^{-1} ۲۸۴۵ (شاخه متقارن متیلن C-H) و cm^{-1} ۱۴۸۵ تا cm^{-1} ۱۴۴۵ (باند خمشی متیلن C-H)، اندازه‌گیری کرد [۳۴] [۳۵] [۳۶]؛

- پیوند گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی مشخصه نوکلئیک اسید به نانوذرات طلا را می‌توان به‌صورت کیفی با تشخیص هم‌زمان نوار cm^{-1} ۱۰۸۰ تا cm^{-1} ۱۱۳۰ / cm^{-1} ۱۲۲۰ تا cm^{-1} ۱۲۴۰ (اسکلت متقارن و نامتقارن باند کششی فسفودی استر) و نوار cm^{-1} 1500 تا cm^{-1} 1300 (ارتعاشات پایه قندی) اندازه‌گیری کرد [۳۷] [۳۸] [۳۹]؛

ح- اطلاعات در مورد نسبت دادن نوارIR به گونه‌های عملکردی را می‌توان در مرجع [۴۰] یافت؛

خ- یک مثال از اندازه‌گیری کیفی پیوند گونه‌های عملکردی بیوشیمیایی مشخصه پروتئین بر روی سطح نانوذرات طلا در SCM در پیوست ب ارائه شده است.

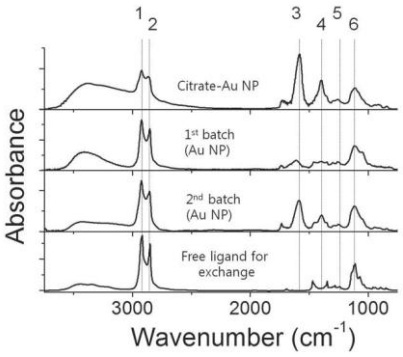
پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

مطالعه موردی اعتباردهی تبادل لیگاند

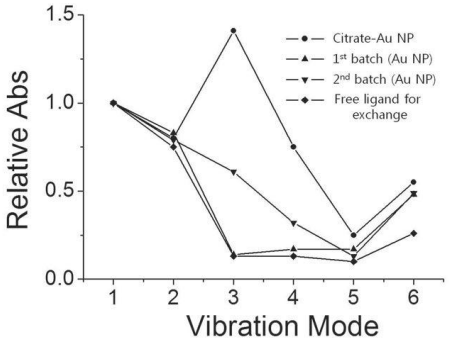
در این پیوست، مثال اعتباردهی تبادل لیگاند بر روی سطح نانوذرات طلا با استفاده از آنالیز FT-IR ارائه شده است. سطح نانوذرات طلا از سیترات به $HS-(CH_2)_{11}-(OCH_2CH_2)_3-OH$ (تری‌ایلن‌گلایکول مونو- ۱۱ مرکاپتان‌دسیل‌اتر، TEMUE) تغییر یافته و طیف FT-IR قبل و بعد از تبادل لیگاند پایش شده است. برای این مطالعه موردی، واکنش‌های تبادل لیگاند در دو آزمایش جداگانه انجام شد که دو بهر[1] مستقل از محلول‌های نانوذرات طلا را به‌کار بردند (اولین و دومین بهر در شکل الف-۱).

ازآنجاکه دو گونه عملکردی شیمیایی از گروه‌های متیلن و سه گونه عملکردی از گروه‌های کربوکسیلاته در سیترات وجود دارند، مقادیر جذب حالت‌های ارتعاش CH_2– (حالت ۱ و ۲) نسبتاً کوچک‌تر از حالت‌های ارتعاش C=O (حالت ۳ و ۴) در طیف FT-IR هستند. از طرف دیگر، ۱۷ گونه عملکردی متیلن و هیچ گروه کربوکسیلاته در TEMUE وجود ندارد، مقادیر جذب حالت ارتعاش CH_2– (حالت ۱ و ۲) بزرگ‌تر از جذب در بسامد ناحیه حالت ارتعاش C=O (حالت ۳ و ۴) در طیف FT-IR است. چنین تفاوت‌هایی را می‌توان در مقایسه طیف FT-IR (شکل۱- الف) و الگوی جذب نسبی حالت‌های ارتعاش به تغییرات حالت ۱ بر اساس درجه تبادل لیگاند، مشاهده کرد (شکل ۱- ب). مقایسه شدت‌های نسبی برای حالت‌های ارتعاش نشان می‌دهد که تبادل در بهر اول بسیار مؤثرتر از بهر دوم بوده است. چنین تفسیر کیفی نمی‌تواند با آشکارسازی نوار ساده قابل استخراج باشد.



الف

1- Batches



ب

راهنما:

اعداد بر روی هر خط، نشان‌دهنده اختلاف حالت‌های ارتعاش هست. بسامدهای ارتعاش و گروه‌های عاملی مربوطه به‌صورت زیر هست:

۱ cm^{-1} ۲۹۲۴ گروه کششی نامتقارن CH_2،

۲ cm^{-1} ۲۸۵۴ گروه کششی متقارنCH_2،

۳ cm^{-1} ۱۵۸۱ گروه کششیC=O،

۴ cm^{-1} ۱۳۹۶ خم کربوکسیلاته C-O-H ،

۵ cm^{-1} ۱۲۵۷ گروه کششی کربوکسیلاتهC-O ،

۶ cm^{-1} ۱۱۱۱ گروه کششی الکلی C-O ،

شکل الف-۱- الف- طیف FT-IR مولکول‌های لیگاند آزاد و نانوذرات طلا که در آن تبادل از سیترات به TEMUE انجام شده است؛ ب- شدت نوار جذب نسبی IR لیگاندهای آزاد و لیگاندهای پیوند شده به نانوذرات طلا . کسر نسبی به حالت ۱ نرمال شد.

پیوست ب

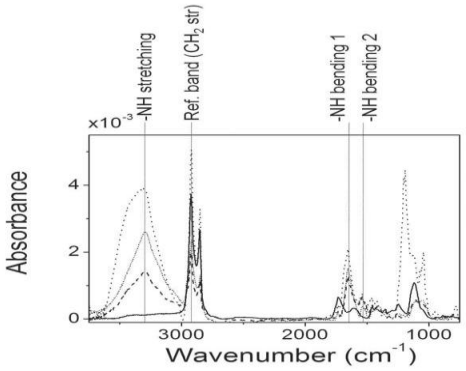
(آگاهی‌دهنده)

مطالعه موردی اندازه‌گیری کمی گونه‌های عملکردی پیوند شده به سطح نانوذرات طلا

در این پیوست، شواهد پیوند گونه‌های عملکردی به زنجیره الکیل کربوکسیلات پیوندشده به نانوذرات طلا با استفاده از طیف FT-IR نشان داده‌شده است. اتصال مولکول‌های زیستی به سطح نانوذرات طلا را می‌توان در تخصیص حالت‌های ارتعاشی آمین، فسفو دی استر یا چربی مشاهده کرد.

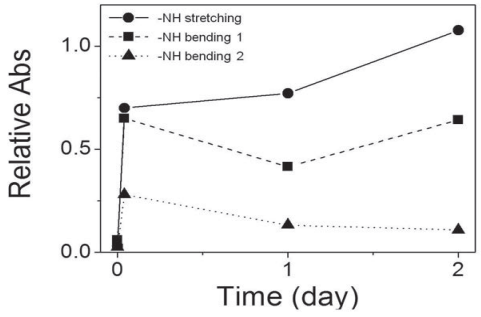
شکل ۲.۱ نشان می‌دهد که جذب سطحی زیست مولکولی بر روی سطح نانوذرات طلا را می‌توان با مشاهده شدت‌های نسبی طیف FT-IR دید. محلول حاوی نانوذرات طلای 30 nm دارای ۱۱- (کربوکسی متوکسی تری اتیلن گلایکول) تیول اندکان[1] (CMTEUT) بر روی سطح با ۲۰٪ از FBS حاوی محیط کشت سلول با نسبت حجمی ۱:۱ می‌باشد. یک نسبت ثابت از محلول در فواصل زمانی از پیش تعیین‌شده نمونه‌گیری شد. سپس، نانوذرات طلا از مولکول‌های غیرپیوندشده جدا شد و طیف FT-IR ثبت شد.

همان‌طور که در شکل ب-۱ نشان داده‌شده است، حالت‌های ارتعاشی پیوند N-H بعد از نگه‌داشتن نانو ذرات طلا در ۱۰٪ FBS حاوی محیط کشت سلول ظاهر می‌شود. زمانی که شدت‌های جذب در ۳۳۱۱ cm^{-1} به شاخه N-H نسبت داده می‌شود، ۱۶۵۳ cm^{-1} و ۱۵۵۰ cm^{-1} برای خمشN-H با استفاده از شدت نوار در ۲۹۲۴cm^{-1} نسبت داده شده به شاخه کششی نامتقارن CH_2 نرماله می‌شود، مقادیر نتیجه از مخلوط SCM بسیار بالاتر از مقادیر به‌دست‌آمده از محلول مخلوط شده است.



الف

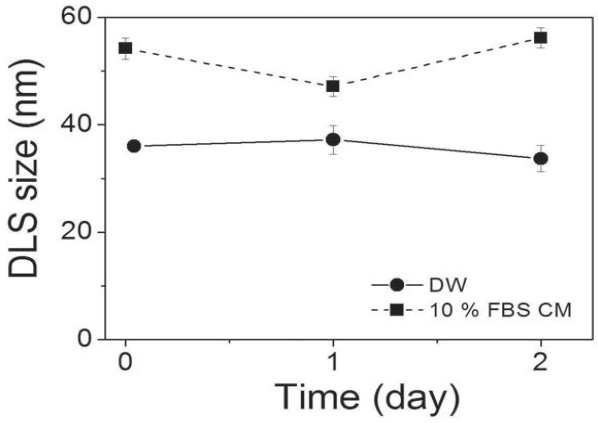
1-undecane thiol



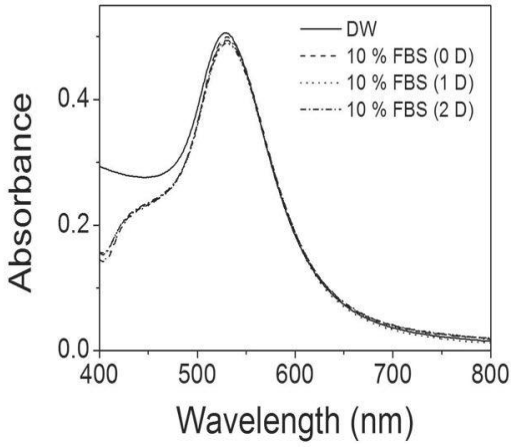
ب

شکل ب-۱- الف- طیف FT-IR فیلم‌های نانوذرات طلا به‌دست‌آمده با استفاده از حالت ATR. فیلم‌های نمونه از نانوذرات طلا با لیگاند CMTEUT در آب مقطر یا محیط کشت سلول FBS ده درصد پس از حذف مولکول‌های غیر پیوند شده توسط سانتریفیوژ ساخته شده است؛ ب- حالت شدت‌های نسبی نوارهای جذب IR نسبت داده‌شده به سطح نانوذرات طلا. نسبت نسبی نسبت به شدت‌های حالت کششی نامتقارن CH_2 نرماله شده است.

همان‌طور که در شکل ب- ۲ نشان داده شده است، اندازه‌های DLS ماده نانوذرات طلا به مقدار تقریباً ۵۰٪ افزایش یافت درحالی‌که تغییر بسیار کمی در طیف جذب UV/Vis از نانوذرات طلا در محلول پس از اختلاط با SCM ، وجود داشت. این نتایج نشان داد که شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات طلا به خاطر پیوند مولکول‌های اضافی افزایش یافت و با توجه به طیف جذب تقریباً ثابت نوار SPR در ناحیه با طول‌موج بلندتر، این افزایش ناشی از کلوخه‌ای شدن نانوذرات طلا نبود.



الف



ب

شکل ب-۲- الف- اندازه DLS ماده نانوذرات طلا با لیگاند CMTEUT در آب مقطر (آب مقطر) یا ۱۰٪ SCM پس از زمان سپری‌شده. برای آب مقطر، صفر روز به معنای بلافاصله بعد از حذف لیگاند آزاد توسط روش اجرایی سانتریفیوژ است. برای SCM 10% ، صفر روز به معنای ۱ ساعت بعد از اختلاط نانوذرات طلا با SCM 20% در نسبت حجمی ۱:۱؛ ب- طیف جذب UV/Vis ماده نانوذرات طلا در آب مقطر یا SCM 10% پس از زمان سپری‌شده.

نتایج ترکیبی بالا از سه روش مختلف پیشنهاد می‌کند که پروتئین پیوند شده به نانوذرات طلا در SCM 10% شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات طلا را افزایش داد و شدت‌های جذب IR در بسامدها به ارتعاش‌های آمین اولیه و ثانویه نسبت داده می‌شوند (۳۳۱۱ cm^{-1} برای شاخه N-H و ۱۶۵۳ و ۱۵۵۰ cm^{-1} برای خم N-H). شناسایی و تشخیص نوع زیست مولکول پیوندشده به نانوذرات طلا در طول آزمون سمیت سلولی بر اساس روند توصیف‌شده در زیربند ۲- ۷ ممکن است.

پیوست ج

(آگاهی‌دهنده)

راهنمای انتخاب برای مواد پنجره

پنجره‌های IR برای روش اجرایی عبوری باید به‌شدت شفاف باشد و نوارهای جذب کمی را در ناحیه بسامد IR نشان دهند. لازم است که آن‌ها در آب پایدار باشند زیرا اکثر نانوذرات طلا در محلول‌های آبی تهیه می‌شوند. ازآنجاکه منحنی عبوری پنجره‌های IR بر اساس عرض آن‌ها تغییر می‌کند، توصیه می‌شود که به منحنی عبوری ارائه‌شده در تارنمای تولیدکننده یا کاتالوگ محصول رجوع شود.

به‌عنوان‌مثال Zn، se ، Si و الماس مواد پنجره مناسب برای استفاده در طیف جذب IR هستند. آن‌ها ضد آب می‌باشند و دارای طول‌موج‌های برش بلندتری نسبت به بیشتر مواد پنجره IR هستند.

کتاب‌نامه

[1] Lewinski N. et al. Cytotoxicity of Nanoparticles.Small. 2008, 4 p. 26
[2] Murphy C.J. et al. Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging. Acc. Chem.Res. 2008, 41 (12) pp. 1721–1730
[3] Chen P.C. et al. Gold nanoparticles - from nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, Scienceand Applications. 2008, 1 pp. 45–66
[4] Vincent A .e t al. Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting. ACS Nano. 2009, 3 (5) pp. 1203–1211
[5] Xu Z .P. e t al. I norganic n anoparticles a s c arriers for efficient c ellular delivery. Chem. Eng. Sci.2006, 61 pp. 1027–1040
[6] Krpetic Z .e t al. S elective e ntrance o f gold n anoparticles i nto c ancer c ells. Gold Bull.2006,39 (2) pp. 66–68
[7] Liu Z., & Jiang M. Reversible aggregation of gold nanoparticles driven by inclusion complexation.J. Mater. Chem. 2007, 17 pp. 4249–4254
[8] Huang Y.F. et al. Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells throughlight scattering. J. Nanopart. Res. 2009, 11 pp. 775–783
[9] Uboldi C. et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 andCIH441. Part. Fibre Toxicol.2009, 6 pp. 18–29
[10] Bowman M.C. et al. Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. J. Am. Chem. Soc.2008, 130 (22) pp. 6896–6897
[11] Goodman C .e t al. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic sidechains. Bioconjug. Chem. 2004, 15 pp. 897–900
[12] Renault S .e t al. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (Scenedesmus subspicatus) and a benthic bivalve (Corbicula fluminea). Gold Bull.2008, 41 (2) pp. 116–126
[13] Kouassi K .G.,& I rudayaraj J. A Nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study. J. Nanobiotechnology. 2006, 4 pp. 8–17
[14] Shukla N. et al. FT-IR study of surfactant bonding to FePt nanoparticles.J. Magn. Magn.Mater.2003, 266 pp. 178–184
[15] Dablemont C .e t al. Functionalization and grafting of platinum nanoparticles on alumina surfaces : FT-IR and XPS study. Langmuir. 2008, 24 pp. 5832–5841
[16] De Moura M .R. e t al. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. J. ColloidInterface Sci. 2008, 321 (2) pp. 477–483
[17] Zhang B., & Yan B. Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles.Anal.Bioanal. Chem. 2010, 396 (3) pp. 973–982
[18] Fang C. et al. Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. Small.2009, 5 (14) pp. 1637–1641
[19] Wijaya A ., & H amad-Schifferli K. Ligand customization and DNA functionalization of gold nanorods via roundtrip phase transfer ligand exchange. Langmuir. 2008, 24 pp. 9966–9969
[20] Das M .e t al. Biofunctionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acidcoupling agent: new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. Nanotechnology. 2008, 19 (41) p. 415101

[21] ISO 6107-2:2006, Water quality — Vocabulary[22] ISO/IEC Guide 99: 2007, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts andassociated terms (VIM)
[23] ISO 17191, Urine-absorbing aids for incontinence — Measurement of airborne respirable polyacrylatesuperabsorbent materials — Determination of dust in collection cassettes by sodium atomicabsorption spectrometry
[24] MacDougall D.,& Crummett W.B. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation inenvironmental chemistry. Anal. Chem. 1980, 52 pp. 2242–2249
[25] Van der Bruggen B. et al. Influence of molecular size, polarity and charge on the retention of organic molecules by nanofiltration. J. Membr. Sci. 1999, 156 pp. 29–41
[26] Revchuk A.D. (Mel) Suffet, I. H., Ultrafiltration separation of aquatic natural organic matter: Chemical probes for quality assurance. Water Res. 2009, 43 (15) pp. 3685–3692
[27] Liu X. et al. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different cappingligands.Colloids Surf. B Biointerfaces. 2007, 58 pp. 3–7
[28] ISO 21571, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms andderived products — Nucleic acid extraction
[29] ISO 21270, Surface chemical analysis — X-ray photoelectron and Auger electron spectrometers —Linearity of intensity scale
[30] Taylor B .N.,& K uyatt C.E.Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, NIST Technical Note 1297, pp 10 1994 http://physics.nist.gov/Pubs/ guidelines/ TN1297/tn1297s.pdf)
[31] Kasthuri J., & Rajendrian N. Functionalization of silver and gold nanoparticles using amino acidconjugated bile salts with tunable longitudinal plasmon resonance. Colloids Surf. B Biointerfaces.2009, 73 pp. 387–393
[32] Aryal S. et al. Immobilization of collagen on gold nanoparticles: preparation, characterizationand hydroxyapatite growth. J. Mater. Chem. 2006, 16 pp. 4642–4648
[33] Venyaminov S .Y.,& K alnin N.N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds inwater solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. Biopolymers. 1990, 20 pp. 1243–1257
[34] Bhattacharya S ., & S rivastava A. Synthesis and characterization of novel cationic lipid and cholesterol-coated gold nanoparticles and their interactions with ipalmitoylphosphatidylcholine membranes. Langmuir. 2003, 19 pp. 4439–4447
[35] Zhang L. et al. Didodecyldimethylamimonium bromide lipid bilayer- protected gold nanoparticles:synthesis, characterization, and self-assembly. Langmuir. 2006, 22 pp. 2838–2843
[36] Zhu H. et al. One step synthesis and phase transition of phospholipid-modified Au particles intotoluene. Colloids Surf. A Physicochem.Eng. Asp.2005, 257-258 pp. 411–414
[37] Sauthier M.L. et al. Nanoparticle layers assembled through DNA hybridization: characterizationand optimization. Langmuir. 2002, 18 pp. 1825–1830
[38] Boncheva M. et al. Design of oligonucleotide arrays at interfaces. Langmuir. 1999, 15 pp. 4317–4320
[39] Brewer H.S. et al. Detection of DNA hybridization on gold surfaces by polarization modulationinfrared reflection absorption spectroscopy. Langmuir. 2002, 18 pp. 4460–4464
[40] Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers. ed. pp 10815-10837, 2000