INSO
21144
1st.Edition
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۱۱۴۴
چاپ اول
۱۳۹۵

فناوری نانو- مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء

Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for *in vitro* assays to evaluate inherent nano-object toxicity

ICS:07.030

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج – ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه : standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

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

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به‌موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه 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 به‌عهده دارد. تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف-کنندگان، 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 کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و 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 کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد. سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد(ISO)[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 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 درجه بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تایید صلاحیت ایران آزمون می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تایید 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

«مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
کوهی، محمد کاظم (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
دبیر:	
حامی، زهرا (دکتری نانو تکنولوژی پزشکی)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ارتش
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست شناسی)	کارشناس کارگروه استاندارد سازی- ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
زایرزاده، احسان (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی پژوهشگاه استاندارد
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد- بازنشسته سازمان ملی استاندارد ایران
قاضی خوانساری، محمود (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران
محمدیان، یوسف (کارشناسی ارشد بهداشت حرفه ای)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
منهاج نیا، رابعه (کارشناسی ارشد سم شناسی)	دانشجوی دکتری سم شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
ویراستار:	
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد- بازنشسته سازمان ملی استاندارد ایران

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار و

مقدمه ز

۱ هدف و دامنه کاربرد ۱

۲ مراجع الزامی ۱

۳ اصطلاحات و تعاریف، نمادها و کوته‌نوشت‌ها ۱

۴ مشخصه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری ۳

۵ گزارش ۶

پیوست الف (آگاهی‌دهنده) روند اندازه‌گیری‌ها ۹

پیوست ب (آگاهی‌دهنده) اندازه‌گیری و ارزیابی پایداری ۱۰

پیوست پ (آگاهی‌دهنده) اندازه‌گیری یون‌های فلزی ۱۱

پیوست ت (آگاهی‌دهنده) اندازه‌گیری اجزای محیط کشت ۱۳

کتاب‌نامه ۱۵

پیش‌گفتار

استاندارد «مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء»که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط در سازمان ملی استاندارد ایران تهیه و تدوین شده و در بیست و نهمین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۹۵/۷/۵ 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 تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

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

ISO/TS 19337:2016, Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for *in vitro* assays to evaluate inherent nano-object toxicity

مقدمه

قبل از ورود نانواشیاء[1] به بازار، تاثیرات احتمالی آنها بر سلامت انسان و محیط‌زیست باید به‌دقت ارزیابی شود. آزمون‌های سمیت برون‌تن[2] با استفاده از کشت سلولی، اغلب به‌عنوان ابزاری در غربالگری مواد مخاطره‌آمیز استفاده می‌شود. این آزمون اطلاعات ضروری برای درک سازوکار اثرات زیستی ناشی از مواد را فراهم می‌کند. با این‌حال، با توجه به آزمون‌های برون‌تن سمیت نانواشیاء ملاحظات خاصی در مورد آنها نیاز است، زیرا رفتار آنها متمایز از مواد شیمیایی محلول در آب است. به‌عنوان مثال، بلافاصله پس از ورود نمونه‌های نانوشیء به محیط کشت، نانواشیاء متحمل تغییراتی نظیر (**الف**) انحلال (حل شدن نانواشیاء داخل همتایان یونی خود)، (**ب**) تشکیل تاج[3] (جذب سطحی اجزای محیط کشت بر روی سطح نانوشیء)، یا (**پ**) تغییرات در حالت انبوهگی[4]/ کلوخه شدن[5] می‌شوند که منجر به تغییر در ته‌نشینی و اندازه ذرات می‌شود بنابراین، مدنظر قرار دادن پدیده فوق بسیار مهم است تا شفاف‌سازی شود که آیا اثرات مشاهده شده، مربوط به خود نانوشیء مورد آزمایش بوده و یا از سایر منابع کنترل نشده ناشی می‌شود و همچنین از تفسیر غلط نتایج آزمون جلوگیری شود.

مشخصه یابی دقیق سوسپانسیون کاری قبل و در طول آزمون‌های سمیت برون‌تن برای حذف ذرات مداخله‌گر[6] آزمایشی برون‌تن ضروری است. به‌عنوان مثال، تشکیل تاج، آزاد شدن یون فلزی از نانواشیاء و ناخالصی‌ها (باقی‌مانده از فرایند سنتز نانوشیء) می‌تواند با برخی آزمون‌های برون‌تن تداخل کرده [1]، نتایج نادرست ارائه دهد. علاوه براین، تشکیل کلوخه‌ها و انبوهه‌ها می‌تواند سمیت یک سوسپانسیون را تغییردهد. بنابراین مهم است که مشخصه‌های سوسپانسیون نانواشیاء مورد آزمایش بادقت ارزیابی و توصیف شود.

این استاندارد، مشخصه‌های ضروری و روش‌های اندازه‌گیری کاربردی سوسپانسیون کاری حاوی نمونه‌های نانوشیء را برای آزمون‌های سمیت برون‌تن توصیف می‌کند. هدف این است که نتایج آزمون‌های قابل اعتماد سمیت نانوشیء بتواند با ذی‌نفعان نانواشیاء مانند قانون‌گذاران، عموم مردم، سازندگان وکاربران نهایی به اشتراک گذاشته و به آنها ابلاغ شود. این استاندارد برای اعتبارسنجی سوسپانسیون کاری روشی توصیف نمی‌کند.

1- Nano-objects
2- *In vitro*
3- Corona
4- Aggregation
5- Agglomeration
6- Artefacts

مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد توصیف مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء است تا هنگام آزمون‌های برون‌تن، به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء، درنظرگرفته شود. علاوه بر این، این استاندارد روش‌های اندازه‌گیری کاربردی برای این مشخصه‌ها را تعیین می‌کند.

این استاندارد برای نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها با اندازه بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر کاربرد دارد.

یادآوری – این استاندارد در نظر دارد کمک نماید به شفاف سازی اینکه آیا اثرات سمی مشاهده شده، ناشی از خود نانواشیاء مورد آزمایش بوده و یا از سایر منابع کنترل نشده نشات می‌گیرد.

۲ مراجع الزامی

در این استاندارد به تمام یا بخشی از استانداردهای زیر ارجاع داده شده و استفاده از این مراجع برای کاربرد این استاندارد ضروری است. برای مراجع تاریخ دار، تنها نسخه ذکر شده به‌کار می‌رود. در مورد مراجع بدون تاریخ، آخرین نسخه از استاندارد ارجاع داده شده (شامل هر نوع اصلاحیه) به‌کار می‌رود.

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۱۵۳، فناوری نانو - آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن - روش آزمون Limulus Amebocyte Lysate (LAL)

۳ اصطلاحات و تعاریف، نمادها و کوته‌نوشت‌ها

۳-۱ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات با تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۳-۱-۱

محیط کشت

culture medium

محلول آبی از مواد مغذی مورد نیاز برای رشد سلول است.

۳-۱-۲

ذره ثانویه

secondary particle

کلوخه/ انبوهه پیچیده‌ای از ذره (ذرات) اولیه، پروتئین‌ها و سایر اجزای محیط کشت است.

۳-۱-۳

پایداری

stability

خواصی که در طول یک زمان معین تحت شرایط مورد انتظار معقول یا معین برای ذخیره و استفاده درآزمون سمیت برون‌تن، بدون تغییر می‌ماند.

۴-۱-۳

سوسپانسیون کاری

working suspension

سوسپانسیون تهیه شده برای یک آزمون برون‌تن که شامل محیط کشت و نمونه نانوشیء می‌باشد.

۳-۲ نمادها و کوته‌نوشت‌ها

در جدول ۱ نمادها و کوته‌نوشت‌های به‌کار رفته در این استاندارد فهرست گردیده است.

جدول ۱- نمادها و کوته‌نوشت‌ها

کوته‌نوشت‌ها	انگلیسی	فارسی
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	طیف‌سنجی جذب اتمی
BCA	Bicinchoninic Acid	بیسین کنینیک اسید
C-U/F	Ultrafiltration Assisted by Centrifugation	اولترافیلتراسیون بوسیله سانتریفیوژ
DLS	Dynamic Light Scattering	پراکندگی پویای نور
FFFF	Flow Field-Flow Fractionation	تفکیک‌کنندگی میدان جریان
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry	طیف‌سنجی نشر اتمی- پلاسمای جفت شده القایی
ICP-MS	Iinductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	طیف‌سنجی جرمی - پلاسمای جفت‌شده القایی
LD	Laser Diffraction	انکسار لیزر
SLS	Static Light Scattering	پراکندگی پایای نور
TFF	Tangential Flow Filtration	فیلتراسیون جریان مماسی

فارسی	انگلیسی	کوته‌نوشت‌ها
کربن آلی کل	total organic carbon	TOC
اولترافیلتراسیون	ultrafiltration	U/F
فرابنفش- مرئی	ultraviolet-visible	UV-Vis

۴ مشخصه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری

۴-۱ کلیات

برای مشخصه‌یابی سوسپانسیون کاری برای آزمون‌های سمیت برون‌تن، لازم است مشخصه‌های خاصی که ممکن است بر سیستم زیستی مورد آزمون اثر داشته باشند، تعیین گردند. این بند مشخصه‌های اساسی سوسپانسیون کاری که در زیر فهرست شده و روش‌های اندازه‌گیری کاربردی برای آن‌ها را مشخص می‌کند.

- حضور اندوتوکسین‌ها
- پایداری سوسپانسیون کاری
- غلظت یون‌های فلزی
- غلظت اجزای محیط کشت

اندازه‌گیری این مشخصه‌ها برای هر دُز سوسپانسیون کاری باید انجام شود. اندازه‌گیری اندوتوکسین می‌تواند جایگزینی برای استوک[1] سوسپانسیون نانوشیء باشد که از آن دُزها ساخته می‌شوند.

به پیوست **الف** به عنوان مثالی از روند اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۴-۲ اندوتوکسین

آلودگی با اندوتوکسین‌ها که بخشی از غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌باشند ممکن است به طور قابل توجهی نتایج حاصل از آزمون سمیت برون‌تن را تغییر دهد. بنابراین تعیین کمیت غلظت اندوتوکسین‌های موجود در سوسپانسیون کاری بسیار مهم است. غلظت اندوتوکسین‌ها در سوسپانسیون کاری باید توسط آزمون LAL مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۱۵۳و آزمون فعال‌سازی مونوسیت (MAT)[2] اندازه‌گیری شود [2][3].

1-Stock
2- Monocyte activation test

۴-۳ پایداری سوسپانسیون‌های کاری

۴-۳-۱ کلیات

پایداری سوسپانسیون کاری یک مشخصه کلیدی است زیرا بر حسب دُز نانواشیاء به سلول‌ها، تاثیرات مستقیمی بر شرایط آزمون برون‌تن دارد [4][5]. انبوهگی / کلوخه‌شدن و ته‌نشینی گرانشی[1] نانواشیاء موضوعات اصلی هستند که ممکن است پایداری نانواشیاء سوسپانسیونی را تحت تاثیر قرار دهند. پایداری باید برای دو مشخصه مورد بررسی قرار گیرد که عبارتند از؛ تغییر نسبی اندازه ذرات ثانویه نانواشیاء و تغییر نسبی غلظت نانواشیاء در سوسپانسیون کاری، ناشی از ته‌نشینی گرانشی در طول آزمون سمیت برون‌تن با درنظر گرفتن مدت زمان مورد نیاز آزمایشگاهی برای آزمون سمیت برون‌تن. ارزیابی نتایج پایداری باید با واحد درصد (٪) بر مقیاس زمان برای آزمون سمیت برون‌تن بیان شود.

یادآوری - استاندارد ISO / TR 13097 [6] به عنوان راهنمایی جامع برای پایداری سوسپانسیون کاری توصیه می‌شود.

۴-۳-۲ تغییر اندازه ذرات ثانویه نانواشیاء

از میان روش‌های پراکندگی پویای نور [7][4]، انکسار لیزر [8] و پراکندگی پایای نور[9] باید روشی مناسب انتخاب شود تا به‌طور مستقیم تغییر اندازه ذرات ثانویه نانواشیاء را اندازه‌گیری کند. سایر روش‌هایی که با این استاندارد مطابقت ندارند نیز می‌توانند استفاده شده و مطابق با زیربند ۵-۶ گزارش شوند.

به پیوست **ب** برای اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۴-۳-۳ تغییر غلظت نانواشیاء

از میان روش‌های پراکندگی نور [10][7][4]، طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت شده القایی [12][11] [13]، جذب فرابنفش- مرئی، عبور پرتو ایکس [14] و تجزیه‌وتحلیل کربن آلی کل یک روش مناسب باید انتخاب شود تا تغییر غلظت نانواشیاء سوسپانسیونی در محیط‌زیستی را اندازه‌گیری نماید. سایر روش‌هایی که با این استاندارد مطابقت ندارند نیز می‌توانند استفاده شده و مطابق با زیربند ۵-۶ گزارش شوند.

به پیوست **ب** برای اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۴-۴ غلظت یون‌های فلزی

یون‌های فلزی تولید شده از انحلال نمونه نانوشیء می‌توانند در آزمون سمیت سلولی شرکت کنند. غلظت یون‌های فلزی در سوسپانسیون کاری باید پس از جدا شدن از ذرات اندازه‌گیری شود. ذرات می‌توانند بوسیله اولترافیلتراسیون، اولترافیلتراسیون بوسیله سانتریفیوژ و یا فیلتراسیون جریان مماسی، از جزء فلزی جدا

1- Gravitational settling

شوند. اندازه‌گیری باید برای تمام عناصر فلزی موجود در نمونه نانوشیء انجام شود. از میان روش‌های طیف سنجی نشر اتمی - پلاسمای جفت‌شده القایی، طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت شده القایی، طیف‌سنجی جذب اتمی و روش رنگ‌سنجی[1] ، باید روش مناسبی انتخاب شود تا غلظت‌های یون فلزی را اندازه‌گیری کند. سایر روش‌هایی که با این استاندارد مطابقت ندارند نیز ممکن است استفاده شده و مطابق با زیربند ۵-۶ گزارش شوند. نتایج اندازه‌گیری غلظت‌ها باید با واحد مولاریته جرم/جرم یا حجم/جرم بیان شود. زمانی‌که اثر سمی از سوسپانسیون‌های کاری روی سلول‌ها مشاهده نمی‌شود، می توان اندازه‌گیری‌ها را حذف کرد.

به پیوست **الف** به عنوان مثالی از روند اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

به پیوست **پ** برای اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۴-۵ غلظت اجزای محیط کشت

۴-۵-۱ کلیات

نمونه نانوشیء اضافه شده به محیط کشت برای تولید سوسپانسیون کاری ممکن است اجزای محیط کشت را جذب سطحی کند [1]. این امر می‌تواند منتج به استرس ناشی از عدم تغذیه سلول‌های مورد آزمون شود. با اختصاص زمان کافی پس از افزودن نمونه نانوشیء به محیط کشت باید غلظت اجزای پروتئینی و کلسی به‌طور قابل توجهی پایداری سوسپانسیون کاری را در آزمون سمیت برون‌تن تحت تاثیر قرار دهند، اگر سایر اجزای محیط کشت شناخته‌شده باشند غلظت این اجزاء نیز باید اندازه‌گیری شود. زمانی‌که اثر سمی از سوسپانسیون‌های کاری روی سلول‌ها مشاهده نمی‌شود، اندازه‌گیری‌ها را می‌توان حذف کرد.

به پیوست **الف** به عنوان مثالی از روند اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

یادآوری - نانواشیاء می توانند pH، اسمولالیته و سایر مشخصه‌های اساسی را در محیط کشت تحت تاثیر قرار دهند.

۴-۵-۲ پروتئین‌ها

از میان روش‌های بیسین کنینیک اسید، برادفورد[2]، لوری[3]و فرابنفش، شاخص شکست و پراکندگی پایای نور جفت‌شده با تفکیک‌کنندگی میدان جریان [9]، باید روش مناسبی برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین انتخاب شود. زمانی‌که روش بیسین کنینیک اسید [16]، برادفورد [17] و یا لوری [18] انتخاب می‌شود، غلظت پروتئین در حلال باید پس از جدا شدن ذرات از سوسپانسیون کاری اندازه‌گیری شود. نتایج اندازه گیری غلظت پروتئین باید با واحد حجم/جرم بیان شود.

1- Colourimetric method
2- Bradford
3- Lowry

به پیوست **ت** برای اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۴-۵-۳ کلسیم

از میان روش‌های طیف‌سنجی نشر اتمی - پلاسمای جفت شده القایی، طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت شده القایی، طیف‌سنجی جذب اتمی و رنگ‌سنجی باید روشی مناسب برای اندازه‌گیری غلظت کلسیم انتخاب شود. نتایج اندازه‌گیری غلظت کلسیم باید با واحد مولاریته، جرم/جرم، و یا حجم/جرم بیان شود.

به پیوست **ت** برای اندازه‌گیری‌ها مراجعه شود.

۵ گزارش

۵-۱ کلیات

نتایج اندازه‌گیری و ارزیابی به دست آمده مطابق با این استاندارد باید با توصیف منبع و ترکیبات نانواشیاء، محیط کشت و سرم، همانطور که در زیربندهای توضیح داده شده ذیل، گزارش گردد:

۵-۲ نام نانواشیاء و سازنده

نام و شماره کالانما (کاتالوگ) نانواشیاء و اطلاعات سازنده شامل نام، آدرس و اطلاعات تماس.

۵-۳ عناصر فلزی موجود در نمونه نانوشیء

مواد اصلی و جانبی، مواد پوششی، مواد کاتالیزوری و ناخالصی‌ها شامل مقدار معلوم یا تخمینی آن‌ها.

۵-۴ محیط کشت و سرم

نام و سازنده محیط، نوع و غلظت سرم اضافه شده (v/v %)، مقادیر pH محیط اصلی و مقادیر pH در طول آزمون، و در صورت وجود، نوع و غلظت مواد افزودنی دیگر.

۵-۵ نتایج اندازه‌گیری

موارد زیر برای گزارش دُزهای جداگانه سوسپانسیون‌های کاری مورد نیازند. با این‌حال، نتایج حاصل از آزمون اندوتوکسین‌ها می‌تواند برای استوک سوسپانسیون‌های نانواشیاء، به جای دُزهای جداگانه آنها گزارش شود. زمانیکه اثر سمی دُزهای جداگانه سوسپانسیون کاری مشاهده نمی‌شود، گزارش یون‌های فلزی و اجزای محیط کشت مورد نیاز نیست.

- اندوتوکسین

الف- اندوتوکسین مثبت / منفی

ب- تاریخ اندازه‌گیری

پ- روش آزمون به‌کار گرفته شده

ت- اطلاعات اعتبار داده‌ها و موسسه انجام‌دهنده

ث- سایر اطلاعات کمکی خاص، در صورت وجود

- **پایداری سوسپانسیون کاری**

الف- تغییر اندازه و تغییر غلظت

ب- تاریخ اندازه‌گیری

پ- روش‌های اندازه‌گیری به‌کار گرفته شده برای تغییر اندازه و تغییر غلظت

ت- اطلاعات اعتبار داده‌ها و موسسه انجام‌دهنده

ث- اطلاعات کمکی در مورد روش تهیه سوسپانسیون کاری

ج- سایر اطلاعات کمکی خاص، در صورت وجود

- **یون‌های فلزی**

الف- نام یون‌های فلزی و غلظت آن‌ها

ب- تاریخ اندازه‌گیری

پ- روش اندازه‌گیری به‌کار گرفته شده

ت- اطلاعات اعتبار داده‌ها و موسسه انجام‌دهنده

ث- سایر اطلاعات کمکی خاص، در صورت وجود

- **اجزای محیط کشت**

الف- غلظت پروتئین و کلسیم

ب- تاریخ اندازه‌گیری

پ- روش‌های اندازه‌گیری به‌کار گرفته شده برای غلظت پروتئین و کلسیم

ت- اطلاعات اعتبار داده‌ها و موسسه انجام دهنده

ث- سایر اطلاعات کمکی خاص، در صورت وجود

۵-۶ انحراف

انحرافات از این استاندارد باید با ذکر نام روش به‌کار گرفته شده، اطلاعات تفصیلی آن، قابلیت اطمینان و توجیه در گزارش شرح داده شود.

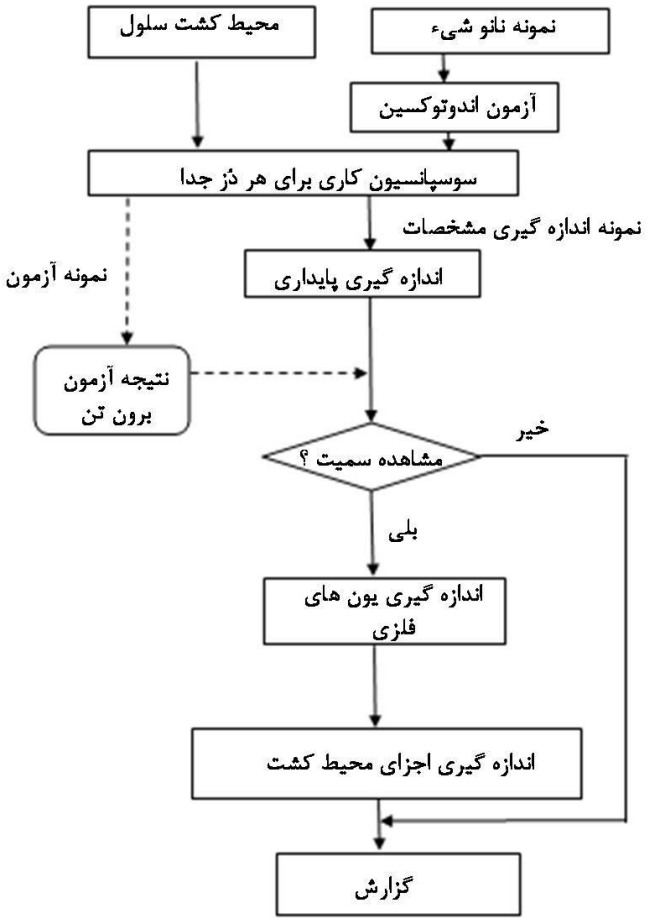
پیوست الف

(آگاهی دهنده)

روند اندازه‌گیری‌ها

نمودار مراحل اندازه‌گیری‌هایی که باید بر اساس این استاندارد انجام شوند در زیر نشان داده شده است.

اندازه‌گیری پایداری، یون‌های فلزی و اجزای محیط کشت برای هر دُز سوسپانسیون کاری تهیه شده بوسیله نمونه مخلوط نانوشیء و محیط کشت سلول انجام می‌شود. اندازه‌گیری‌های اندوتوکسین برای دُز های نمونه نانوشیء انجام می‌شود، که می‌تواند جایگزین استوک سوسپانسیون کاری شود. سوسپانسیون کاری به دو بخش تقسیم می‌شود: یکی برای آزمون سمیت (نمونه آزمون) و دیگری برای اندازه‌گیری مشخصه‌ها (نمونه اندازه‌گیری مشخصه‌ها). زمانی که اثر سمی برای نمونه آزمون مشاهده می‌شود اندازه‌گیری یون‌های فلزی و اجزای محیط کشت برای نمونه‌های اندازه‌گیری مشخصه‌ها انجام می‌شود.



شکل الف-۱ - نمودار نشان دهنده مراحل اندازه‌گیری

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

اندازه‌گیری و ارزیابی پایداری

ب-۱ کلیات

نمونه‌هایی از روش‌های اندازه‌گیری پایداری نمونه‌های نانوشیء به‌نفع کاربر ارائه شده است. به کاربر هشدار داده می‌شود که این روش‌ها لزوماً برای استفاده در انواع مختلف مشخصه‌یابی نمونه‌های نانوشیء تایید اعتبار نشده‌اند. با توجه به تنوع نمونه‌های نانوشیء، به کاربر توصیه می‌شود روشی مناسب برای ارزیابی پایداری سوسپانسیون کاری در طول آزمون‌های سمیت برون‌تن انتخاب کند.

توصیه می‌شود تمام اندازه‌گیری‌ها روی سوسپانسیون کاری یا سوسپانسیون‌های نانوشیء تهیه شده به همان روش مورد استفاده در آزمون سمیت برون‌تن انجام شود. توصیه می‌شود استوک‌های نمونه مشابه از سوسپانسیون نانوشیء برای اندازه‌گیری‌ها و آزمون‌های سمیت برون‌تن استفاده شود. نتایج ارزیابی شده تغییر مقادیر در طول آزمون‌های سمیت برون‌تن توصیه می شود با واحد درصد (٪) بیان شود. پیشنهاد

می‌گردد اندازه‌گیری‌های متعدد (حداقل سه بار) انجام شود و داده‌ها به‌صورت میانگین اندازه‌گیری‌ها ارائه گردد.

ب-۲ تغییر اندازه ذرات ثانویه نانواشیاء

به‌منظور نظارت بر تغییرات اندازه ذرات ثانویه نانواشیاء، به کاربر توصیه می‌شود از میان روش‌های پراکندگی پویای نور، انکسار لیزر و پراکندگی پایای نور روشی مناسب انتخاب کند. توصیه می‌شود روش توسط محدوده اندازه قابل مشاهده در اصول اندازه‌گیری مربوطه انتخاب شود.

ب-۳ تغییر غلظت نانواشیاء

تا زمانی‌که اندازه واحد نانواشیاء، بزرگتر از مولکول‌های پروتئین در سوسپانسیون کاری باشد، به‌منظور پایش تغییرات غلظت اکثریتی از انواع نانواشیاء، روش‌های پایش شدت پراکندگی نور مانند پراکندگی پویای نور یا پراکندگی پایای نور می‌تواند استفاده شود. هنگامی‌که دماهای احتراق و یا دماهای تجزیه حرارتی نانوشیء مبتنی بر کربن و محیط‌های کشت متفاوت باشند، روش کربن آلی کل می‌تواند در تجزیه و تحلیل نانوشیءکاربردی باشد. هرگاه کربن زمینه به طور صحیح از کربن کل کم بشود نیز روش کربن آلی کل می‌تواند کاربردی باشد. زمانی‌که مقادیر جذب فرابنفش - مرئی نانواشیاء بتواند از جذب زمینه محیط کشت تفکیک شود، روش جذب فرابنفش - مرئی برای تمام گروه‌های نانواشیاء استفاده می‌شود. اندازه‌گیری عبور پرتو ایکس برای نمونه‌های نانوشیء با جذب فرابنفش - مرئی زمینه‌ای بالا کاربردی است، با این‌حال این اندازه‌گیری عملاً به نانواشیاء سوسپانسیونی با اعداد اتمی کمتر از تعداد کربن محدود می‌شود.

پیوست پ

(آگاهی دهنده)

اندازه‌گیری یون‌های فلزی

پ-۱ جداسازی یون‌ها از ذرات

غشاء اولترافیلتراسیون بوسیله سانتریفیوژ با وزن مولکولی تفکیک بهینه، بسته به اندازه نانوذرات انتخاب می‌شود. شرایط اولترافیلتراسیون بوسیله سانتریفیوژ را برای مثال می‌توان به‌منظور جدا کردن ذرات و یون‌های فلزی به‌کار گرفت. در اولترافیلتراسیون، توصیه می‌شود شتاب گریز از مرکز مربوطه و مدت زمان سانتریفیوژ به اندازه کافی درنظرگرفته شود تا به‌طور کامل مایع فیلتر شده حاوی یون‌ها بازیابی شود [19]. اولتراسانتریفیوژ را به‌طور جایگزین می‌توان به ویژه برای نانواشیاء فلزی استفاده کرد. توصیه می‌شود شرایط سانتریفیوژ، یعنی شتاب گریز از مرکز و مدت زمان سانتریفیوژ به اندازه کافی درنظرگرفته شود تا به‌طور کامل محلول حاوی یون‌ها بازیابی شود. مایع فیلتر شده یا مایع رویی با استفاده از روش‌های شرح داده شده در بند زیر (پ-۲) تجزیه‌وتحلیل می‌شود.

پ-۲ اندازه‌گیری‌ها

پ-۲-۱ انتخاب روش‌ها

روش طیف‌سنجی جرمی - پلاسمای جفت شده القایی یک روش بسیار حساس است و می‌تواند میزان قسمت در تریلیون[1] (PPT) را شناسایی کند. از سوی دیگر، طیف‌سنجی جذب اتمی بسیار قابل اعتماد است.

اگر یک عامل چنگالی[2] در اندازه‌گیری رنگ‌سنجی برای تشخیص یون فلزی مورد انتظار مناسب باشد، روش رنگ‌سنجی می‌تواند استفاده شود. توصیه می‌شود عامل چنگالی برای سوبسترا بسیار اختصاصی باشد و هیچ واکنش متقاطعی نداشته باشد. زمانی‌که هیچ عامل چنگالی مناسبی برای یون فلزی مورد انتظار وجود ندارد استفاده از روش رنگ‌سنجی توصیه نمی‌گردد.

پ-۲- ۲ طیف‌سنجی نشر اتمی - پلاسمای جفت شده القایی

منحنی‌های کالیبراسیون برای یون‌های فلزی مورد نظر با استفاده از محلول‌های استاندارد یون‌های فلزی لازم است. اندازه‌گیری طیف‌سنجی نشر اتمی - پلاسمای جفت شده القایی باید از استانداردISO 11885 تبعیت کند [20].

1- Parts per trillion
2- Chelating agent

پ-۲- ۳ طیف‌سنجی جرمی - پلاسمای جفت شده القایی

مطابق با پ-۱ آماده سازی سوسپانسیون کاری و ایجاد منحنی کالیبراسیون صورت می‌گیرد. توصیه می‌شود اندازه‌گیری‌ها از استاندارد ISO 17294-1[21] و استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۴۹۴۵[۲۲] تبعیت کند.

پ-۲- ۴ طیف‌سنجی جذب اتمی

منحنی‌های کالیبراسیون برای یون‌های مورد نظر با استفاده از محلول‌های استاندارد یون‌ها لازم است.

پ-۲- ۵ روش رنگ‌سنجی

اگر یون‌های فلزی سوسپانسیون کاری دارای باند جذب مشخص در ناحیه مرئی یا فرابنفش باشند، روش‌های رنگ‌سنجی می‌تواند برای تعیین غلظت استفاده شود. قبل از تجزیه و تحلیل کمی، طیف‌های جذب برای یون‌ها اندازه‌گیری و شناسایی می‌شوند. یک باند جذب مشخص که با باند سایر یون‌ها مداخله نداشته باشد برای تجزیه و تحلیل انتخاب می‌شود.

پیوست ت

(آگاهی دهنده)

اندازه‌گیری اجزای محیط کشت

ت-۱ پروتئین‌ها

نانواشیاء بوسیله سانتریفیوژ یا اولتراسانتریفیوژ از سوسپانسیون کاری جدا می‌شوند. اگر جداسازی ذرات از مواد پخش‌شده به‌وسیله سانتریفیوژ / اولتراسانتریفیوژ دست یافتنی باشد، غلظت پروتئین در محیط کشت با روش بیسین کنینیک اسید [16]، روش برادفورد [17]، و یا روش لوری [18] با استفاده از آلبومین سرم گاوی[1] (BSA) به‌عنوان استاندارد پروتئین تعیین می‌شود.

اگر جداسازی ذرات از مواد پخش شده پیچیده باشد، روش تفکیک‌کنندگی میدان جریان می‌تواند به‌کار گرفته شود. زمانی‌که محیط کشت مانند محیط بدون سرم هیچ پروتئینی نداشته باشد، بررسی غلظت پروتئین مورد نیاز نمی‌باشد.

ت-۲ کلسیم

نانواشیاء بوسیله اولترافیلتراسیون به‌وسیله سانتریفیوژ از سوسپانسیون کاری جدا می‌شوند [19]. اگر مواد بتوانند به آسانی از سوسپانسیون کاری جدا شوند، سانتریفیوژ یا اولتراسانتریفیوژ نیز می‌توانند به‌کار گرفته شوند. در اولترافیلتراسیون بسته به اندازه نانواشیاء، غشاء مربوطه با دارا بودن وزن مولکولی تفکیکی بهینه برای جداسازی آنها انتخاب می‌شود. زمانی‌که اولترافیلتراسیون بوسیله سانتریفیوژ به‌کار گرفته می‌شود، توصیه می‌شود شرایط اولترافیلتراسیون به‌وسیله سانتریفیوژ یعنی شدت گریز از مرکز و مدت زمان سانتریفیوژ به اندازه کافی درنظرگرفته شود تا محلول حاوی کلسیم (Ca^{2+}) به‌طور کامل بازیابی شود. پس از جداسازی مناسب نانواشیاء از سوسپانسیون کاری، میزان Ca^{2+} محیط کشت می‌تواند به‌وسیله طیف‌سنجی نشر اتمی - پلاسمای جفت شده القایی، طیف‌سنجی جرمی- پلاسمای جفت شده القایی و یا طیف‌سنجی جذب اتمی تعیین شود. اگر نانواشیاء به وسیله سانتریفیوژ یا اولتراسانتریفیوژ از سوسپانسیون کاری جدا شوند، غلظت Ca^{2+} در محیط سوسپانسیون می‌تواند به‌وسیله روش رنگ‌سنجی تعیین شود (به پیوست **پ** مراجعه شود).

1- Bovine serum albumin

ت-۳ سایر اجزاء

سایر اجزای محیط کشت که برای رشد سالم سلول‌های مورد آزمون مهم هستند را می‌توان گزارش کرد. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت این جزء (اجزاء) در سوسپانسیون کاری، ذرات به همان روش مورد استفاده در اندازه‌گیری Ca^{2+} جدا می‌شوند. این جزء (اجزاء) سپس به وسیله روش‌های مناسب اندازه‌گیری می‌شوند. توصیه می‌شود جزئیات روش‌های اندازه‌گیری این جزء (اجزاء) در گزارش شرح داده شود.

پیوست ث

(آگاهی دهنده)

کتاب‌نامه

[1] Horie M., Nishio K., Fujita K., Endoh S., Miyauchi A., Saito Y. Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. Chem. Res. Toxicol. 2009, 22 pp. 543–553

[2] Hartung T., & Sabbioni E. Alternative *in vitro* assays in nanomaterial toxicology.Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine Nanobiotechnology. 2011, 3 (6) pp. 545–573

[3] Schindler S., von Aulock S., Daneshian M., Hartung T. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. ALTEX. 2009, 26 (4) pp. 265–277

[4] Kato H., Suzuki M., Fujita K., Horie M., Endoh S., Yoshida Y. Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for *in vitro* toxicology assessment. Toxicol.*In Vitro*. 2009, 23 pp. 927–934

[5] Teeguarden J.G., Hinderliter P.M., Orr G., Thrall B.D., Pounds J.G. Particokinetics *in vitro*: dosimetry considerations for *in vitro* nanoparticle toxicity assessments. Toxicol. Sci. 2007, 95 (2) pp. 300–312

[6] ISO/TR 13097:2013, Guidelines for the characterization of dispersion stability

[7] Kato H., Fujita K., Horie M., Suzuki M., Nakamura A., Endoh S. Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for *in vitro* toxicology assessment. Toxicol.*In Vitro*. 2010, 24 pp. 1009–1018

[8] ISO 13320:2009, Particle size analysis — Laser diffraction methods

[9] Kato H., Shinohara N., Nakamura A., Horie M., Fujita K., Takahashi K. Characterization of fullerene colloidal suspension in a cell culture medium for *in vitro* toxicity assessment. Mol. Biosyst. 2010, 6 pp. 1238–1246

[10] Schierz A., & Zanker H. Aqueous suspensions of carbon nanotubes: Surface oxidation, colloidal stability and uranium sorption. Environ. Pollut. 2009, 157 pp. 1088–1094

[11] Saleh B.S., Pfefferle D.L., Elimelech M. Aggregation kinetics of multiwalled carbon nanotubes in aquatic systems: measurements and environmental implications. Environ. Sci. Technol. 2008, 42 pp. 7963–7969

[12] Sato Y., Shibata K., Kataoka H., Ogino S., Bunshi F., Yokoyama A. Strict preparation and evaluation of water-soluble hat-stacked carbon nanofibers for biomedical application and their high biocompatibility: influence of nanofiber-surface functional groups on cytotoxicity. Mol. Biosyst. 2005, 1 pp. 142–145

[13] Wang X., Xia T., Ntim S.A., Ji Z., George S., Meng H. Quantitative techniques for assessing and controlling the dispersion and biological effects of multiwalled carbon nanotubes in mammalian tissue culture cells. ACS Nano. 2010, 4 pp. 7241–7252

[14] ISO 13317-3:2001, Determination of particle size distribution by gravitational liquid sedimentation methods — Part 3: X-ray gravitational technique

[15] Kato H., Mizuno K., Shimada M., Nakamura A., Takahashi K., Hata K. Observations of bound Tween80 surfactant molecules on single-walled carbon nanotubes in an aqueous solution. Carbon. 2009, 47 pp. 3434–3440

[16] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal.Biochem. 1985, 150 pp. 76–85

[17] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 1976, 72 pp. 248–254

[18] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193 pp. 265–275

[19] Horie M., Kato H., Fujita K., Endoh S., Iwahashi H. *In vitro* evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. Chem. Res. Toxicol. 2012, 25 pp. 605–619

[20] ISO 11885:2007, Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)

[21] ISO 17294-1:2004, Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 1: General guidelines

[۲۲] استاندارد ملی ایران شماره۲-۱۴۹۴۵ : سال ۱۳۹۲ ، کیفیت آب- کاربرد طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-MS) - قسمت ۲ : تعیین ۶۲ عنصر