



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۱۲۹۶۳

چاپ اول

**ISIRI**

12963

1st. Edition

فناوری نانو - تعیین ویژگی‌های همولیتیک  
نانوذرات - روش آزمون

**Nanotechnologies- Analysis of hemolytic  
properties of nanoparticles**

ICS:11.040.20-71.100.01

## به نام خدا

### آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه\* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود 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 وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup> کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

\* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

- 1- International Organization for Standardization
- 2 - International Electro technical Commission
- 3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
- 4 - Contact Point
- 5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد  
"فناوری نانو - تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات - روش آزمون"

رئیس:

قاضی خوانساری، محمود  
(دکترای سم شناسی)

سمت و/یا نمایندگی

عضوهیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی  
تهران و عضو کمیته فنی متناظر  
فناوری نانو (ISIRI/TC229)

دبیر:

نوربخش، رویا  
(کارشناسی ارشد سم شناسی)

کارشناس گروه پژوهشی مواد غذایی  
سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

پوی پوی، حسن

(کارشناس ارشد شیمی)

کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو  
و عضو کمیته فنی متناظر فناوری نانو  
(ISIRI/TC229)

سیفی، مهوش

(کارشناس ارشد مدیریت دولتی)

کارشناس استاندارد و نایب رئیس کمیته  
فنی متناظر فناوری نانو (ISIRI/TC229)

کوهی، محمد کاظم

(دکترای سم شناسی)

عضو هیئت علمی دانشگاه تهران

مختاری، فهیم دخت

(کارشناس ارشد شیمی)

مسئول آزمایشگاه بیولوژی مولکولی سازمان  
سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسوی، ربابه

(کارشناس ارشد شیمی)

کارشناس اندیشگاه نانوفناوری وزارت بهداشت  
و درمان و آموزش پزشکی

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با مؤسسه استاندارد
ج	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
ه	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۳	۴ اصول آزمون
۴	۵ وسائل
۴	۶ مواد و/یا واکنشگرها
۴	۷ تهیه و آماده‌سازی استانداردها و کنترل‌ها
۷	۸ تعیین <b>PFH</b> و <b>TBH</b> در نمونه‌های خون جمع‌آوری شده افراد بومی
۸	۹ روش اجرایی آزمون با مواد مورد آزمون
۱۰	۱۰ اندازه‌گیری میزان همولیز
۱۰	۱۱ محاسبات
۱۱	۱۲ معیارهای پذیرش
۱۲	۱۳ گزارش نتایج

## پیش‌گفتار

استاندارد " فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات- روش آزمون " که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط توسط ستاد توسعه فناوری نانو مستقر در دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری تهیه و تدوین شده و در دویست و سی و ششمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۸۹/۶/۲۷ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

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

ASTM E 2524 : 2008, Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles

# فناوری نانو- تعیین ویژگی‌های همولیتیک نانوذرات - روش آزمون

## ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه روش آزمون ارزیابی اثرات مواد حاوی نانوذرات<sup>۱</sup> بر یکپارچگی گلبول‌های قرمز خون می‌باشد.

در این روش، از خون کامل رقیق شده و گرمخانه‌گذاری شده با ماده حاوی نانوذرات استفاده می‌شود و میزان هموگلوبین آزاد شده از گلبول‌های قرمز آسیب دیده خون، اندازه‌گیری می‌شود.

این روش، مشابه روش ارائه شده در استاندارد ASTM- F756 است با این تفاوت که حجم‌های به کار رفته برای تطبیق با ماده حاوی نانوذرات، کاهش می‌یابد.

این روش، بخشی از ویژگی‌های پیش بالینی برون تن<sup>۲</sup> می‌باشد و برای ماده حاوی نانوذراتی که در پزشکی کاربرد دارد و با خون در تماس است، اهمیت دارد.

این استاندارد همه جنبه‌های ایمنی را در بر نمی‌گیرد. وظیفه کاربر این استاندارد است تا پیش از استفاده از این استاندارد روش‌های سلامت و ایمنی را مشخص نموده و قابلیت اجرا و محدوده مقررات را تعیین کند.

**یاد آوری ۱-** این روش یکی از مجموعه روش‌ها برای آزمون سازگاری زیستی مواد به کار رفته در پزشکی هنگام تماس با خون است که در استاندارد ASTM- F748 و استاندارد ملی ایران به شماره ۴-۷۲۱۶ فهرست شده‌اند.

**یاد آوری ۲-** این روش مشابه روش ارائه شده در استاندارد ASTM-F756 بوده که برای مواد حاوی نانوذرات بهینه شده است.

## ۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن استاندارد به آنها ارجاع شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

---

1- Nanoparticulate  
2- in vitro

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۷۲۱۶، ارزیابی زیست شناختی وسایل پزشکی - بخش چهارم :  
گزینش آزمون جهت بررسی اثرات متقابل با خون ( اثرات تداخل خونی)

2-2 ASTM-F 748-06:2010, Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Method for Materials and Devices

2-3 ASTM-F 756-08:2010, Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials

2-4 ASTM-F 1877-05:2010, Standard Practice for Characterization of Particles

2-5 ASTM-F 1903-10:2010, Standard Practice for Testing for Biological Responses to Particles *in vitro*.

### ۳ اصطلاحات، تعاریف و اختصارات

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۱-۳

#### درون تن<sup>۱</sup>

مجموعه آزمایش‌هایی که در داخل بدن موجود زنده انجام می‌شود.

۲-۳

#### برون تن

مجموعه آزمایش‌هایی که در محیط آزمایشگاه و خارج از بدن انجام می‌شود.

### ۳-۳ اختصارات

۱-۳-۳ استاندارد کالیبراسیون ( $Cal^2$ )

۲-۳-۳ سیان متهموگلوبین ( $CMH^3$ )

۳-۳-۳ فسفات بافر سالین دالبکو ( $DPBS^4$ )

---

1- in vivo

2- Calibration Standard

3- Cyanmethemoglobin

4- Dulbecco's Phosphate – Buffered Saline

۴-۳-۳ پلی اتیلن گلیکول (PEG<sup>۱</sup>)

۵-۳-۳ پلاسما عاری از هموگلوبین (PFH<sup>۲</sup>)

۶-۳-۳ کنترل کیفیت (QC<sup>۳</sup>)

۷-۳-۳ هموگلوبین کل خون (توتال) (TBH<sup>۴</sup>)

۸-۳-۳ نمونه های خون (هموگلوبین) رقیق شده تا ۱۰ میلی گرم  $\pm$  ۱ میلی گرم در میلی لیتر

(TBHd<sup>۵</sup>)

## ۴ اصول آزمون

### ۱-۴ کلیات

این روش آزمون پروتکلی را برای آزمون ضایعات حاد گلوبول های قرمز خون (همولیز) در آزمایش های برون تن ناشی از قرار گرفتن در معرض نانوذرات ارائه می دهد.

این روش بر اساس اندازه گیری کمی هموگلوبین آزاد شده درون PFH به عنوان درصد غلظت TBH است هنگامی که خون در معرض مواد حاوی نانو ذره قرار می گیرد.

با استفاده از یک روش آزمون رنگ سنجی مدون برای هموگلوبین و مشتقات آن مانند سولف هموگلوبین<sup>۶</sup> در محیط قلیایی با فری سیانید به متهموگلوبین، اکسید می شود. غلظت پایداری از CMH با استفاده از اسپکترو فتومتر پلیت خوان<sup>۷</sup> در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

برای رسم منحنی استاندارد، استانداردهای هموگلوبین به کاررفته باید محدوده غلظتی ۰/۰۲۵ تا ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر را پوشش دهند و نمونه های کنترل کیفی ارزیابی عملکرد روش در سه سطح غلظتی، پایین (۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، متوسط (۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و بالا (۰/۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، آماده شود. حجم نمونه مورد نیاز ۱۰۰ میکرو لیتر در هر تکرار آزمون می باشد.

نتایج بیان شده به عنوان درصد همولیز برای آزمون ویژگی های حاد همولیتیک نانوذرات در برون تن ارزیابی می شود.

- 
- 1- Poly Ethylen Glycol
  - 2- Plasma- Free Hemoglobin
  - 3- Quality Control
  - 4- Total Blood Hemoglobin
  - 5- TBHd - Blood sample diluted to 10mg  $\pm$  1 mg/ml
  - 6- Sulfhemoglobin
  - 7- Plate Reader



## ۵ وسایل

۱-۵	پیپت در محدوده حجمی ۰/۰۵ میلی لیتر تا ۱۰ میلی لیتر
۲-۵	پلیت های ۹۶ چاهکی <sup>۱</sup>
۳-۵	حمام آب تنظیم شده در $(37 \pm 1)$ درجه سلسیوس
۴-۵	پلیت خوان با قابلیت اندازه گیری در طول موج ۵۴۰ نانو متر
۵-۵	تکان دهنده صفحه ای
۶-۵	بشرهای پلاستیکی
۷-۵	لوله های میکرو سانتریفوژ ۱/۵ میلی لیتری شفاف و غیررنگی
۸-۵	سانتریفوژ تنظیم شده در ۷۰۰g تا ۸۰۰g

## ۶ مواد و/یا واکنشگرها

در تمام آزمون ها باید از مواد با درجه شیمیایی و خلوص بالا استفاده شود. سایر خلوص ها نیز ممکن است به کار رود، به شرط آن که ثابت شود که خلوص واکنشگر به قدر کافی بالا است که کاربرد آن موجب کاهش درستی اندازه گیری نمی شود.

۱-۶	واکنشگر CMH
۲-۶	هموگلوبین استاندارد
۳-۶	DPBS عاری از یون های $Ca^{+2}$ و $Mg^{+2}$
۴-۶	مخلوطی از چند نمونه خون کامل چند انسان <sup>۲</sup> که به آن ماده ضد انعقاد لیتیم-هپارین افزوده شده باشد.
۵-۶	پلی ال لیزین هپارین هیدرو برومید <sup>۳</sup> با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰
۶-۶	PEG با وزن مولکولی متوسط ۸۰۰۰
۷-۶	آب مقطر

## ۷ تهیه و آماده سازی استانداردها و کنترل ها

---

1- 96 Well Plate  
2- Pooled blood  
3- Poly-L- lysine hydrobromide

یاد آوری - نیازی به انجام اقدامات احتیاطی و ایجاد شرایط استریل نیست، اما از آلوده شدن واکنشگرهای نگهداری شده جلوگیری کنید.

### ۱-۷ آماده سازی استانداردهای کالیبراسیون

حجم‌های مورد نیاز باید بر طبق جدول ۱ تنظیم شوند.

جدول ۱- استانداردهای کالیبراسیون

ردیف	سطح	غلظت اسمی میلی گرم بر میلی لیتر	روش تهیه
۱	کالیبراسیون ۱	۰/۸	۲ میلی لیتر از محلول مادر
۲	کالیبراسیون ۲	۰/۴	یک میلی لیتر از کالیبراسیون ۱ + یک میلی لیتر از واکنشگر CMH
۳	کالیبراسیون ۳	۰/۲	یک میلی لیتر از کالیبراسیون ۲ + یک میلی لیتر از واکنشگر CMH
۴	کالیبراسیون ۴	۰/۱	یک میلی لیتر از کالیبراسیون ۳ + یک میلی لیتر از واکنشگر CMH
۵	کالیبراسیون ۵	۰/۰۵	یک میلی لیتر از کالیبراسیون ۴ + یک میلی لیتر از واکنشگر CMH
۶	کالیبراسیون ۶	۰/۰۲۵	یک میلی لیتر از کالیبراسیون ۵ + یک میلی لیتر از واکنشگر CMH

### ۲-۷ آماده سازی استانداردهای کنترل کیفی

حجم‌های مورد نیاز باید بر طبق جدول ۲ تنظیم شوند.

جدول ۲- کنترل‌های کیفی

ردیف	سطح	غلظت اسمی میلی گرم بر میلی لیتر	روش تهیه
۱	کنترل کیفیت ۱	۰/۶۲۵	۱/۵ میلی لیتر از محلول مادر + ۰/۴۲ میلی لیتر از واکنشگر CMH
۲	کنترل کیفیت ۲	۰/۱۲۵	۲۰۰ میکرولیتر از کنترل کیفیت ۱ + ۸۰۰ میکرولیتر از واکنشگر CMH
۳	کنترل کیفیت ۳	۰/۰۶۲۵	۱۰۰ میکرولیتر از کنترل کیفیت ۱ + ۹۰۰ میکرولیتر از واکنشگر CMH

### ۳-۷ آماده سازی کنترل مثبت

پودر پلی ال لیزین هپارین هیدروبرومید را در آب مقطر استریل شده حل کنید تا به غلظت ۱٪ (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) برسد. بخش‌های مساوی را برای مصرف روزانه تهیه کنید و در دمای

$^{\circ}\text{C}$  ( $20 \pm 3$ ) درجه سلسیوس برای مدت دو ماه نگهداری کنید. به عنوان جایگزین می توان از محلول ۱۰٪ تریتون - ایکس صد<sup>۱</sup> در آب به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده کرد.

#### ۴-۷ آماده سازی کنترل منفی

واکنشگر PEG به صورت محلول مادر ۴۰٪ وجود دارد. این محلول را به عنوان محلول کنترل منفی به کار ببرید. محلول مادر را در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ( $3 \pm 4$ ) نگهداری کنید.

#### ۵-۷ آماده سازی نمونه های حاوی مواد نانو ذره

۱-۵-۷ برای دوز اولیه از بالاترین غلظت نانوذرات که به خوبی در محلول فیزیولوژیک پراکنده می شود استفاده کنید. اگر غلظت پایانی مشخص است، می توان آن را به عنوان غلظت آغازی به کار برد. مواد باید تحت شرایط فیزیولوژیک طبق روش های استاندارد که در مورد ذرات در استاندارد ASTM F1877 و ASTM F1903 ارائه شده به خوبی توصیف شوند. مواد حاوی نانوذرات برای آزمون باید در محلول فیزیولوژیکی که در  $\text{pH} = 7.2 \pm 2$  ایزوتونیک<sup>۲</sup> قرار گیرند. ویژگی این محلول ( میلی گرم بر میلی لیتر) باید تعریف شده و ویژگی ذرات (تعداد ذرات در میلی لیتر) باید به درستی در این محلول تعیین شده باشند.

تعیین ویژگی های قبلی باید به طور مناسب انجام گیرد تا امکان داده های تفسیری به حد کافی فراهم شود.

مثال: تنوع در اندازه و ویژگی های سطحی ذرات از بهر<sup>۳</sup> به بهر می تواند موجب تفاوت در نتایج آزمون شود.

چنانچه ذرات معلق استریل می شوند، روش استریل کردن باید مشخص شود. مواد حاوی نانو ذره و بافرهای به کاررفته برای نگهداری / باز ترکیبی<sup>۴</sup> باید با همان روش مورد آزمون قرار گیرد.

در این آزمون حداقل به ۳۰۰ میلی لیتر از ماده مورد آزمون و مقدار کافی از آن برای تهیه رقت های مختلف نیاز است. سوسپانسیون آغازین باید در DPBS با نسبت رقت یک به پنج (۱:۵) در حد اقل سه نوبت رقیق شده تا چهار نمونه آزمایشی برای آزمون را تامین کند.

۲-۵-۷ چون نانوذرات در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذبی ندارند، برای تشخیص ناخالصی ها پیشنهاد می شود تا مواد حاوی نانوذرات در DPBS در طول موج ۵۴۰ نانومتر کنترل شوند. اگر جذبی مشاهده شد، توصیه می شود برای حذف تداخل ها، سانتریفوژ با سرعت بالا انجام شده و ذرات رسوب داده شوند. در صورتی که سانتریفوژ کردن تاثیری نداشته باشد، نتایج آزمون به دست آمده برای ذرات

---

1 - Triton -100X  
2 - Isotonic  
3- Lot to lot  
4-Reconstitution

گرمخانه‌گذاری شده خون با تفریق نتایج بدست آمده برای همان ذرات در نمونه‌های کنترل بدون خون (طبق بند ۹-۴) تصحیح می‌شود.

## ۶-۷ آماده‌سازی نمونه‌های خون

نمونه‌های خون کامل را از حداقل سه دهنده در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد لیتیم - هپارین جمع‌آوری کنید. خون را می‌توان در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  تا  $8^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸ ساعت نگهداری نمود. در روز انجام آزمون، نمونه خون (مخلوطی از خون جمع‌آوری شده چند انسان)<sup>۱</sup> را با مخلوط کردن نسبت‌های برابر خون از هر دهنده آماده کنید. اگر ریز توده‌هایی<sup>۲</sup> از خون مشاهده شد، خون را از یک صافی ۴۰ میکرومتری مخصوص خون عبور دهید. بخش‌های ۲ تا ۳ میلی‌لیتری از نمونه خون جمع‌آوری شده را بردارید و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفوژ کنید.

محلول رویی (پلاسما) را جمع‌آوری کنید. در طول تهیه منحنی کالیبراسیون، نمونه‌های کنترل کیفی و هموگلوبین کل را در دمای اتاق نگهداری کنید.

پلاسمای جمع‌آوری شده را برای تعیین PFH به کار ببرید.

## ۸ تعیین PFH و TBH در نمونه‌های خون جمع‌آوری شده افراد بومی<sup>۳</sup>

۸-۱ به هر چاهک در پلیت ۹۶ چاهکی، ۲۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد کالیبراسیون، کنترل کیفی و واکنشگر CMH شاهد را بیفزایید. از دو چاهک برای هر کالیبره‌کننده و چهار چاهک برای هر QC و شاهد استفاده کنید. بنابر این نمونه آزمایشی با QC ها محصور می‌شود.

مثال: ترتیبی مانند: شاهد، Cal1, Cal6, QC1, QC2, QC3, نمونه آزمایشی، شاهد، QC1, QC2, QC3 رعایت شود.

۸-۲ نمونه‌های TBH را با ترکیب کردن ۲۰ میکرولیتر از نمونه خون جمع‌آوری شده و ۵ میکرو لیتر از واکنشگر CMH تهیه کنید. پس از ۱۵ دقیقه ۲۰۰ میکرولیتر به هر ۶ چاهک بیفزایید.

۸-۳ به ۶ چاهک ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما (طبق بند ۷-۶-۳) اضافه کنید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از واکنشگر CMH را به هر چاهک بیفزایید. واکنشگر CMH را به چاهک‌های حاوی استانداردهای کالیبراسیون و کنترل کیفی اضافه نکنید.

---

1- Pooled blood  
2- Micro Aggregate  
3- Native

۴-۸ درپوش پلیت را گذاشته و آن را روی یک تکان دهنده پلیت به آرامی (با سرعت متوسط ۲-۳) تکان دهید.

۵-۸ جذب را در ۵۴۰ نانومتر برای تعیین غلظت هموگلوبین بخوانید. استفاده از فاکتور رقت ۲ برای نمونه های PFH و ۲۵۱ را برای نمونه های TBH در نظر بگیرید. اگر غلظت محاسبه شده PFH زیر یک میلی گرم بر میلی لیتر بود، مرحله بعدی را انجام دهید. اگر غلظت بالای یک میلی گرم بر میلی لیتر بود نمونه های خون برای این روش مناسب نیستند.

## ۹ روش اجرای آزمون با مواد مورد آزمون

۱-۹ نمونه خون جمع آوری شده را با DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم برای تثبیت غلظت TBH در  $(1 \pm 1)$  میلی گرم بر میلی لیتر براساس نتایج به دست آمده از بند ۸-۵ رقیق کنید.

۲-۹ درلوله های میکروسانتریفوژ، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، محلول شاهد (PBS) یا هر بافری که برای انحلال نانوذرات به کار رفته است، محلول کنترل مثبت و محلول کنترل منفی را بریزید. شش لوله برای نمونه مجهول، سه لوله برای شاهد، دو لوله برای محلول کنترل مثبت و دو لوله برای محلول کنترل منفی آماده کنید.

۳-۹ به هر لوله، ۷۰۰ میکرولیتر از DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم بیفزایید.

۴-۹ در همه لوله ها به جز سه لوله نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر از خون کامل آماده شده را طبق بند ۱-۹ بریزید. در این سه لوله، ۱۰۰ میکرولیتر از DPBS عاری از یون کلسیم و منیزیم بریزید. این نمونه ها نماینده نمونه کنترل بدون خون بوده و برای ارزیابی تداخل های نانو مواد با آزمون (به طور مثال جذب در نزدیکی و یا خود طول موج ۵۴۰ نانومتر، بر هم کنش با واکنشگر CMH و مانند آن) به کار می رود.

۵-۹ در لوله ها را ببندید و به آرامی تکان دهید تا مخلوط شوند. در یک بازه زمانی ۳۰ دقیقه ای مشاهده کنید که آیا در طول آزمایش نانوذرات لخته، پراکنده، غوطه ور یا شناور می شوند.

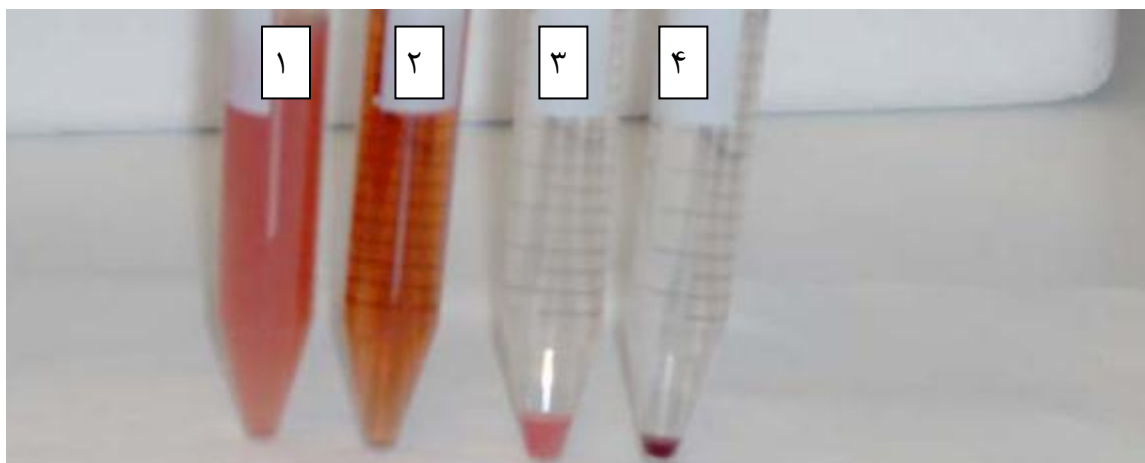
یاد آوری - از تکان دادن به دلیل امکان تخریب گلبول های قرمز خون خودداری کنید.

۶-۹ لوله ها را در حمام آب تنظیم شده در دمای  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  و به مدت  $(15 \pm 1)$  دقیقه قرار داده و در دمای  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری کنید و هر ۳۰ دقیقه یکبار نمونه را با چرخاندن مخلوط کنید. لوله ها را می توانید در یک چرخاننده لوله در یک گرمخانه که در دمای  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  تنظیم شده گرمخانه گذاری کنید.

۷-۹ نمونه ها را از حمام آب یا گرمخانه بیرون بیاورید. اگر از حمام آب استفاده می کنید، لوله ها را با کاغذ جاذب خشک کنید.

۸-۹ لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰ سانتریفوژ کنید.

۹-۹ پس از پایان سانتریفوژ کردن، لوله‌ها را بررسی کنید و هر گونه ظاهر غیرطبیعی در مایع رویی یا توده‌هایی را که نشان‌دهنده تخریب اضافی گلبول‌های قرمز یا هموگلوبین باشد ثبت کنید. (مطابق شکل ۱)



شکل ۱- شمایی از اهمیت ثبت شکل ظاهری نمونه‌ها پس از سانتریفوژ برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب

۹-۱۰ در شکل ۱، ذرات موجود تجاری پلی استیرن با اندازه ۲۰ نانومتر (لوله شماره ۱) و ۵۰ نانومتر (لوله شماره ۲) فعالیت همولیتیک را نشان داده که می‌تواند به وسیله رنگ مایع رویی مشاهده شود. ذرات پلی استیرن با اندازه ۸۰ نانومتر نیز همولیتیک هستند، در حالی که هموگلوبین را جذب می‌کنند و این با رنگ و اندازه توده معین می‌شود (لوله شماره ۳). اگر که مایع رویی برای این آزمون به کار رود، جذب در طول موج ۵۴۰ نانو متر نتیجه منفی نشان خواهد داد. نمونه شماره ۴ کنترل منفی است. هیچ فعالیت همولیتیکی در محلول رویی مشاهده نمی‌شود و گلبول‌های سالم قرمز خون به صورت یک توده فشرده قرمز تیره در ته لوله دیده می‌شود.

۹-۱۱ چنانچه نانوذرات در محدوده و یا خود طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب داشته باشند، این ذرات را پیش از انجام مرحله بعدی از مایع رویی حذف کنید (طبق بند ۷-۵). این مایع رویی باید به لوله‌های تمیز منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و یا سرعت تعیین شده طبق بند ۷-۵ سانتریفوژ شود.

## ۱۰ اندازه گیری میزان همولیز

- ۱-۱۰ سری تازه‌ای از محلول‌های کالیبره‌کننده و کنترل کیفی را مطابق بندهای ۷-۱ و ۷-۲ آماده کنید.
- ۲-۱۰ به هر پلیت ۹۶ چاهکی تازه، مقدار ۲۰۰/۰ میکرولیتر از CMH شاهد، کالیبره‌کننده‌ها، کنترل‌های کیفی یا TBHd رقیق شده (TBHd رقیق شده به صورت ترکیبی از ۴۰۰/۰ میکرولیتر خون با ۵/۰ میلی‌لیتر واکنشگر CMH که مطابق بند ۹-۱ تهیه می‌شود) اضافه کنید. دو چاهک را با هر کالیبره‌کننده، چهار چاهک را با هر شاهد و هر کنترل کیفی و شش چاهک را با هر نمونه TBHd پر کنید. همه نمونه‌های آزمایشی را بین کنترل‌های کیفی در پلیت محصور کنید.
- ۳-۱۰ به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آزمایشی، محلول کنترل مثبت و محلول کنترل منفی آماده شده طبق بند ۹-۲، اضافه کنید. شش چاهک را با نمونه‌های آزمایشی (دو چاهک برای هر سه لوله آزمایش آماده شده طبق بند ۹-۲) و ۴ چاهک را با هر یک از محلول‌های کنترل (دو چاهک برای هر دو لوله آزمایش) پر کنید.
- ۴-۱۰ به هر یک از چاهک‌های حاوی نمونه و محلول کنترلی، ۱۰۰ میکرولیتر واکنشگر CMH اضافه کنید. واکنشگر CMH را به چاهک‌های حاوی استانداردهای کالیبراسیون، محلول‌های کنترل کیفی و TBHd که خود حاوی CMH می‌باشند اضافه نکنید.
- ۵-۱۰ پلیت را با درپوش، پوشانده و به آرامی با یک تکان‌دهنده پلیت (با سرعت متوسط ۲ تا ۳) تکان دهید.
- ۶-۱۰ جذب را در ۵۴۰ نانومتر برای تعیین غلظت هموگلوبین قرائت کنید. فاکتور رقیق سازی ۱۸ را برای نمونه و کنترل‌ها و فاکتور رقیق سازی ۱۳/۵ را برای TBHd در نظر بگیرید.

## ۱۱ محاسبات

۱-۱۱ یک الگوریتم رگرسیون چهار پارامتری برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار ببرید. پارامترهای زیر را در هر استاندارد کالیبره‌کننده و محلول‌های کنترل محاسبه کنید.

۲-۱۱ درصد اختلاف از مقدار نظری

$$\text{PDFT} = \frac{\text{غلظت نظری} - \text{غلظت محاسبه شده}}{\text{غلظت نظری}} \times 100\% \quad (1)$$

که در آن :

PDFT، درصد اختلاف از مقدار نظری است.

۳-۱۱ درصد CV باید برای هر نمونه شاهد، کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه مجهول محاسبه شود.

$$\%CV = \frac{SD}{\text{میانہ}} \times 100\% \quad (۲)$$

که در آن:

CV، ضریب تغییرات

SD، انحراف معیار

۴-۱۱ درصد همولیز از فرمول زیر محاسبه می شود :

$$\% \text{همولیز} = \frac{PFH_{\text{نمونه}}}{TBHd} \times 100\% \quad (۳)$$

## ۱۲ معیارهای پذیرش

۱-۱۲ درصد CV و PDFT برای هر استاندارد کالیبراسیون و کنترل کیفی باید تا ۲۰٪ باشد. تنها مورد استثنا Call6 است که تا ۳۰٪ قابل پذیرش است. پلیتی قابل قبول است که ۲ میزان همه کنترل کیفی ها و حداقل یکی از هر سطح عملکرد قابل قبولی داشته باشد. در غیر این صورت کل آزمون باید تکرار شود.

۲-۱۲ درصد CV برای هر کنترل مثبت و منفی و نمونه مجهول باید تا ۲۰٪ باشد.

۳-۱۲ اگر هر دو تکرار کنترل مثبت یا کنترل منفی با معیار شرح داده شده در بند ۱۲-۱ مردود شود، کل آزمون باید تکرار شود.

۴-۱۲ در پذیرش هر دور آزمون، اگر دو از سه تکرار از نمونه مجهول با معیار شرح داده شده در بند ۱۲-۱ مردود شود، نمونه مجهول باید مجدداً آزمون شود.



### ۱۳ گزارش نتایج

درصد همولیز ایجاد شده در نمونه را تعیین کنید. درصد همولیزی که بیشتر از ۵٪ باشد نشان‌دهنده آن است که مواد موجب تخریب گلبول‌های قرمز خون می‌شوند. چنانچه منحنی دوز - پاسخ وجود دارد، آن را تعیین کنید.