



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization



استاندارد ملی ایران  
۲۳۳۹۰  
چاپ اول  
۱۴۰۲

INSO  
23390  
1st Edition  
2023

Identical with  
ISO/TS 5094:  
2023

فناوری نانو - ارزیابی فعالیت شبه پراکسیداز  
نانوذرات فلزی و اکسید فلزی

**Nanotechnologies- Assessment of  
peroxidase-like activity of metal and  
metal oxide nanoparticles**

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۳۹۰ (چاپ اول): سال ۱۴۰۲

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج - شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@inso.gov.ir](mailto:standard@inso.gov.ir)

وبگاه: <http://www.inso.gov.ir>

**Iran National Standards Organization (INSO)**

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@inso.gov.ir](mailto:standard@inso.gov.ir)

Website: <http://www.inso.gov.ir>

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران موجب بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی 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 مشاروپوش آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

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

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

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

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

### « فناوری نانو - ارزیابی فعالیت شبه پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی »

#### رئیس:

حسینی حسن آبادی، مریم  
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

#### سمت و/یا محل اشتغال:

کارشناس - دانشگاه علوم پزشکی مشهد

#### دبیر:

نجفی اصلی پاشاکی، شبنم  
(دکتری شیمی تجزیه)

مدیر فنی - آزمایشگاه‌های مرکز پژوهش‌های کاربردی علوم زمین  
البرز

#### اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

احمدی، سارا  
(دکتری مهندسی مواد)

عضو هیئت علمی - پژوهشگاه استاندارد ایران

اسلامی پور، الهه  
(کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)

کارشناس مسئول - گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه  
فناوری نانو

امیری، امیرحسن  
(دکتری شیمی تجزیه)

عضو هیئت علمی - دانشگاه فردوسی مشهد

برخی، محمد  
(کارشناسی ارشد شیمی معدنی)

معاون - آزمایشگاه‌های مرکز پژوهش‌های کاربردی علوم زمین  
البرز

#### ویراستار:

سیفی، مهوش  
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

مشاور - گروه استاندارد و ایمنی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش‌گفتار
ز	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات، تعاریف و کوتاه‌نوشت‌ها
۱	۱-۳ اصطلاحات و تعاریف
۲	۲-۳ کوتاه‌نوشت‌ها
۳	۴ اصول
۵	۵ مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی
۵	۶ وسایل و واکنشگرها
۵	۱-۶ وسایل و لوازم
۶	۲-۶ واکنشگرها
۷	۷ آماده‌سازی محلول
۷	۱-۷ الزامات عمومی
۷	۲-۷ محلول TMB
۷	۳-۷ محلول بافر
۷	۴-۷ محلول پراکنه نانوذرات
۷	۵-۷ محلول کنترل بیشتر
۸	۸ روش اجرایی آزمون
۸	۱-۸ شرایط اندازه‌گیری
۸	۲-۸ مراحل اندازه‌گیری
۹	۳-۸ اندازه‌گیری جذب شاهد واکنشگر
۱۰	۴-۸ اندازه‌گیری کنترل مثبت
۱۰	۵-۸ اندازه‌گیری کنترل بیشتر
۱۰	۹ تحلیل داده
۱۱	۱۰ اندازه‌گیری عدم قطعیت
۱۱	۱۱ گزارش آزمون
۱۳	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) اندازه‌گیری جرم نانوذرات فلزی و اکسید فلزی آزمون شده
۱۴	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) مثالی از محاسبه و ارزشیابی عدم قطعیت فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات اکسید آهن
۲۱	کتاب‌نامه

## پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- ارزیابی فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصد و سی‌امین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۲/۰۷/۰۴ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس 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.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی 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 مزبور است:

ISO/TS 5094: 2023, Nanotechnologies — Assessment of peroxidase-like activity of metal and metal oxide nanoparticles

آنزیم‌ها کاتالیست‌های (کنش‌یاران) زیستی هستند که واکنش‌های بیوشیمیایی را کنترل می‌کنند. آنزیم پراکسیداز یک آنزیم فلزی<sup>۱</sup> با هم‌شکل‌های<sup>۲</sup> فراوان است. این آنزیم، اکسایش بستره‌های<sup>۳</sup> آلی مختلف را به وسیله هیدروژن پراکسید، کاتالیز می‌کند که به‌طور گسترده در کاربردهای زیست‌شیمیایی استفاده می‌شود. نانوذرات فلزی و اکسید فلزی دارای گستره وسیعی از کاربردها در زیست‌پزشکی، حفاظت از محیط‌زیست و برخی زمینه‌های دیگر مانند جداسازی مغناطیسی، تشخیص، ضدباکتری، تخریب آلاینده‌ها، تصویربرداری پزشکی و درمان تومور است. در سال‌های اخیر، فعالیت ذاتی شبه‌پراکسیداز در برخی از نانوذرات فلزی و اکسید فلزی مشاهده شده است، به این معنی که این نانوذرات فلزی و اکسید فلزی می‌توانند اکسایش بستره‌های پراکسیداز طبیعی به‌وسیله هیدروژن پراکسید را تحت شرایط واکنش ملایم با کارایی و سینتیک قابل مقایسه کاتالیز کنند. نانوذرات آهن اکسید ( $Fe_3O_4$ ) یک ماده نماینده<sup>۴</sup> است و گزارش شده است که نانوذرات کبالت اکسید ( $Co_3O_4$ )، نانوذرات مس اکسید ( $CuO$ )، نانوذرات منگنز اکسید ( $MnO_2$ )، وانادیم اکسید ( $V_2O_5$ )، نانوذرات طلا ( $Au$ ) و نانوذرات پلاتین ( $Pt$ ) نیز دارای فعالیت شبه‌پراکسیداز هستند. این یافته‌ها شبیه‌سازی آنزیم‌ها از ترکیبات آلی به نانومواد معدنی را گسترش می‌دهند.

بعضی از نانوذرات فلزی و اکسید فلزی می‌توانند انتقال الکترون‌ها از  $H_2O_2$  به شناساگر<sup>۵</sup> رنگ‌سنجی را تحت شرایط فیزیولوژیکی<sup>۶</sup> (کاراندام‌شناختی) کاتالیز کنند. این پدیده مانند واکنش رنگ‌سنجی با واسطه پراکسیداز است و بنابراین به‌عنوان کاتالیز شبه‌پراکسیداز نامیده می‌شود. این خاصیت کاتالیستی را می‌توان برای تولید سیگنال‌های رنگ‌سنجی، نورتایی شیمیایی یا الکتروشیمیایی که کاربردهای بالقوه زیادی در حسگرهای زیستی، حسگرهای الکتروشیمیایی و ایمنی‌سنجی<sup>۷</sup> دارند استفاده کرد. نانوذرات با فعالیت شبه‌پراکسیداز ممکن است کارکردهای ضدتوموری، ضدباکتریایی یا آنتی‌اکسیدانی در سیستم زیستی داشته باشند. علاوه بر این، نانوذرات با چنین فعالیتی می‌توانند اثرات بالقوه‌ای بر سلامت و ایمنی داشته باشند. بنابراین، ارزیابی فعالیت شبه‌پراکسیداز یک نانوذره در کاربردهای عملی مهم است.

فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات به شدت به عوامل متعددی از جمله ترکیب، اندازه، شیمی سطح و ساختار بلوری نانوذرات و همچنین شرایط اندازه‌گیری بستگی دارد. بنابراین، ایجاد یک روش استاندارد برای ارزیابی فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی مهم است.

- 
- 1 - Metalloenzyme
  - 2 - Isoforms
  - 3 - Substrates
  - 4 - Representative
  - 5 - Indicator
  - 6 - Physiological
  - 7 - Immunoassay

این استاندارد ویژگی‌هایی را برای ارزیابی فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی ارائه می‌کند. این پروتکل برای شرکت‌ها، آزمایشگاه‌های تحقیقاتی یا مؤسسات و سازمان‌های اندازه‌شناسی که روی نانومواد مورد استفاده در کاربردهای زیست‌پزشکی و حفاظت از محیط زیست کار می‌کنند، مفید است.



## فناوری نانو- ارزیابی فعالیت شبه پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روشی برای ارزیابی فعالیت شبه پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی با طیف نورسنجی<sup>۱</sup> است. این استاندارد می تواند به عنوان مرجعی برای اندازه گیری فعالیت های شبه پراکسیداز در انواع دیگر نانوذرات باشد.

### ۲ مراجع الزامی

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

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ نشری ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ نشری به آنها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی برای این استاندارد الزام آور است.

۱-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو - واژه نامه - قسمت ۲: نانو اشیاء

2-2 ISO 18153:2003, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples— Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned calibrators and control materials

### ۳ اصطلاحات، تعاریف و کوتاه نوشتها

در این استاندارد، علاوه بر تعاریف ارائه شده در استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴ تعاریف و اصطلاحات زیر نیز به کار می رود.<sup>۲</sup>

#### ۱-۳ اصطلاحات و تعاریف

۱-۱-۳

نانوذره

nanoparticle

1 - Spectrophotometry

۲ - اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در این استاندارد در وبگاه های [www.iso.org/obp](http://www.iso.org/obp) و [www.electropedia.org](http://www.electropedia.org) قابل دسترس است.

نانوشیئی با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاهترین محورهای نانوشیء به طور قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

[منبع: زیربند ۴-۴، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، تغییر یافته- یادآوری ۱ حذف شده است.]

۲-۱-۳

### فعالیت کاتالیستی

#### catalytic activity

ویژگی یک جزء در یک سامانه اندازه‌گیری معین است که متناظر با نرخ تبدیل یک ماده کاتالیز شده در واکنش شیمیایی معین است.

یادآوری ۱- در این استاندارد، «جزء» یکی از انواع نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی است.

یادآوری ۲- در این استاندارد، فعالیت کاتالیستی، فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی است.

یادآوری ۳- یکای مشتق شده منسجم دستگاه بین‌المللی SI «کتال» (kat)، برابر با «مول بر ثانیه» ( $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ) است.

[منبع: زیربند 2-3 استاندارد ISO 18153:2003، تغییر یافته- یادآوری‌های ۱، ۲ و ۳ اضافه شده است.]

۳-۱-۳

### فعالیت کاتالیستی ویژه

#### specific catalytic activity

فعالیت کاتالیستی بر یکای جرم نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی است.

یادآوری - فعالیت کاتالیستی ویژه بر حسب  $\text{kat}\cdot\text{kg}^{-1}$  بیان می‌شود.

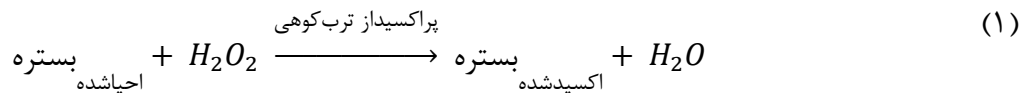
### ۲-۳ کوتاه‌نوشت‌ها

کوتاه‌نوشت	اصطلاح انگلیسی	معادل فارسی
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt)	نمک آمونیم ۲ و ۲'-آزینوبیس (۳- اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید
DMSO	dimethyl sulfoxide	دی‌متیل سولفوکسید
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide	هیدروژن پراکسید
HRP	horseradish peroxidase	پراکسیداز ترب‌کوهی
IONPs	iron oxide nanoparticles	نانوذرات اکسید آهن
NPs	nanoparticles	نانوذرات

معادل فارسی	اصطلاح انگلیسی	کوتاه نوشت
O- فنیلن دی آمین	o-phenylenediamine	OPD
۳،۳،۵،۵- تترامتیل بنزیدین	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	TMP

#### ۴ اصول

واکنش HRP را می توان با فرمول ۱ بیان کرد:



یادآوری - در فرمول بالا، منظور از بستره احیاشده، بستره طبیعی است و لزوماً فرآیند کاهش روی آن انجام نشده است.

برای ارزشیابی فعالیت HRP، اغلب از بستره های رنگزا<sup>۱</sup> مانند TMB، OPD، ABTS استفاده می شود که در این میان، TMB پرمصرف ترین مورد است.

برخی از نانوذرات فلزی و اکسید فلزی نیز می توانند بستره های پراکسیداز ترب کوهی را در حضور H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> کاتالیز کنند که در این استاندارد به آن فعالیت شبه پراکسیداز گفته می شود. برای بستره TMB، واکنش شیمیایی را می توان با فرمول (۲) بیان کرد:



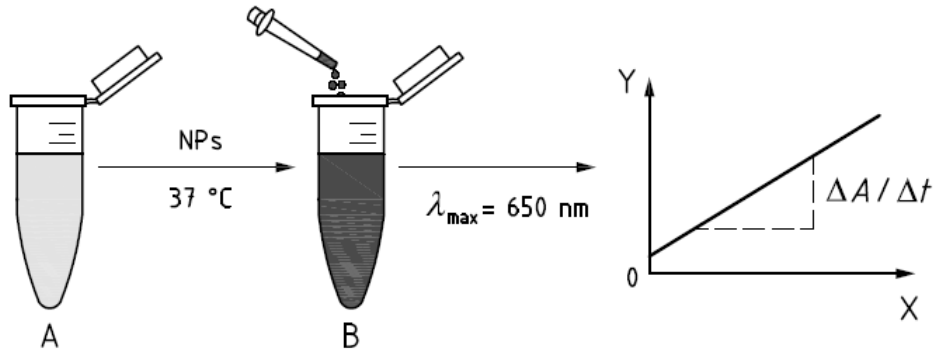
واکنش فرمول (۲) یک محصول اکسیدشده با رنگ آبی تولید می کند که دارای پیک جذبی شاخصی در طول موج ۶۵۰ nm است. جذب به عنوان تابعی از زمان در ۳۷±۱ °C اندازه گیری می شود (به شکل ۱ مراجعه شود). زمان اندازه گیری را می توان براساس گستره خطی منحنی پیش رونده واکنش پراکسیداز تعیین کرد. در طول فاز اولیه واکنش در چند درصد اولیه پیشرفت به سمت تکمیل، یک فاز خطی از واکنش وجود دارد. توصیه می شود جذب در فاز خطی واکنش ثبت شود. برای تعیین فعالیت آنزیمی، کافی است تغییر جذب در یکای زمان در طول این فاز خطی محاسبه شود.

معمولاً نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در شرایط اسیدی فعالیت شبه پراکسیداز نشان می دهند و در شرایط خنثی یا بازی این فعالیت ضعیف شده یا حتی از بین می رود. ارتباط تعیین فعالیت شبه پراکسیداز در محیط اسیدی به این دلیل در نظر گرفته می شود که pH پایین در همه سامانه های زیستی مانند لیزوزومها<sup>۲</sup>،

1- Chromogenic  
2- Lysosomes

تومورها، زخم‌ها، معده و در سامانه‌های محیط زیستی از جمله آب آلوده وجود دارد. در شرایط اسیدی، حل شدن یون‌ها امکان‌پذیر است و بنابراین گنجاندن کنترل بیشتر نیاز است (به زیربند ۷-۵ مراجعه شود).

حلالیت TMB به‌طور قابل توجهی در محلول‌هایی با  $\text{pH} \geq 5.5$  کاهش می‌یابد. این استاندارد برای تعلیقه‌هایی با مقدار  $\text{pH}$  در گستره ۳.۵ تا ۵.۵ قابل استفاده است.



راهنما:

TMB+H <sub>2</sub> O	A	زمان، برحسب s	X
TMB <sub>ox</sub> +H <sub>2</sub> O	B	جذب	Y

شکل ۱- طرحواره‌ای از اندازه‌گیری فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی

تعداد واحدهای فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی طبق قانون بیر-لامبرت محاسبه می‌شود:

نرخ تغییر اولیه جذب ( $\text{min}^{-1}$ ) از شیب فاز خطی اولیه آزمایش، همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، به دست می‌آید. پس از کسر نرخ شاهد واکنشگر، تعداد واحدهای فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی مطابق با فرمول ۳ محاسبه می‌شود.

$$b_{\text{nano}} = \frac{V}{\varepsilon \times l} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3)$$

که در آن:

تعداد واحدهای فعالیت آنزیمی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی، برحسب kat است؛	$b_{\text{nano}}$
حجم کل محلول واکنش، برحسب l است؛	V

$\epsilon$  ضریب تضعیف مولی<sup>۱</sup> مشتق TMB که برابر  $39000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  است؛  
 $I$  طول مسیر نوری کووت، برحسب cm است؛  
 $\Delta A / \Delta t$  نرخ تغییر اولیه جذب محلول واکنش پس از تصحیح با نرخ شاهد واکنشگر، برحسب  $\text{s}^{-1}$  است.

فعالیت کاتالیستی ویژه نانوذرات،  $a_{\text{nano}}$ ، با تقسیم  $b_{\text{nano}}$  بر جرم نانوذرات مورد آزمایش محاسبه می‌شود.  
 فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی طبق فرمول (۴) محاسبه می‌شود.

$$a_{\text{nano}} = \frac{b_{\text{nano}}}{m_M} \quad (4)$$

که در آن:

$a_{\text{nano}}$  فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی، برحسب  $\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$  است؛  
 $m_M$  جرم نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی، برحسب mg است.  
 یادآوری - در مورد مثالی از اندازه‌گیری و محاسبه جرم، به پیوست الف مراجعه شود.

## ۵ مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی

پیش از ارزیابی فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی، توصیه می‌شود اندازه (توزیع)، شکل، ترکیب، شیمی سطح و ساختار بلوری نانوذرات طبق مرجع [۱] مشخص شود، زیرا فعالیت شبه‌پراکسیداز به شدت به این عوامل بستگی دارد.

## ۶ وسایل و واکنشگرها

### ۱-۶ وسایل و لوازم

#### ۱-۱-۶ طیف‌نورسنج

از یک طیف‌نورسنج استاندارد کالیبره‌شده که گستره طول‌موج مرئی را پوشش می‌دهد باید استفاده شود (به مرجع [2] کتاب‌نامه مراجعه شود). طیف‌نورسنج باید یک ساعت پیش از اندازه‌گیری روشن شود تا خط زمینه به پایداری برسد.

۲-۱-۶ دماسنج، با درستی برابر یا کمتر از  $\pm 1.0^\circ \text{C}$ .

۳-۱-۶ pH متر، با تفکیک‌پذیری برابر یا کمتر از ۰٫۰۱ و درستی  $\pm 0.002$ .

---

1- Molar attenuation coefficient

۴-۱-۶ حمام آب دم‌پایی شده<sup>۱</sup>

حمام آب دم‌پایی شده طیف‌نورسنج برای کنترل مخزن کووت در دمای ثابت °C (۳۷±۱) استفاده می‌شود.

۴-۱-۶-۵ ترازوی الکتریکی، با دقت ۰٫۱ mg و تکرارپذیری (کالیبراسیون وزنی) از ۰٫۱۵ mg ≤ برای (۵g).

۴-۱-۶-۶ پیپت تنظیم‌پذیر، از ۲۰۰ μl (عدم قطعیت، % ۰٫۳ < u) و ۱۰۰۰ μl (عدم قطعیت، % ۰٫۳ < u).

۴-۱-۶-۷ بالن حجمی، حجم ml (۱۰ ± ۰٫۰۴) و ml (۱۰۰ ± ۰٫۲).

۴-۱-۶-۸ کووت، با طول مسیر نوری mm (۱۰ ± ۰٫۰۵).

۲-۶ واکنشگرها

تمام واکنشگرهای ضروری برای سنجش در جدول ۱ فهرست شده‌اند.

جدول ۱- واکنشگرها

نام	نام شیمیایی	دسته‌بندی
سدیم استات	استات سدیم انیدرید <sup>a</sup> (AR)	واکنشگرها
استیک اسید گلاسیال	استیک اسید انیدرید <sup>a</sup> (AR)	
TMB	۳،۳'،۵،۵'-تترامیل‌بنزیدین <sup>a</sup> (AR)	
۳۰٪ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	هیدروژن پراکسید ۳۰٪ <sup>a</sup> (AR)	
HRP	پراکسیداز ترپ‌کوهی (جامد ۱۰ <sup>-۶</sup> kat/mg × ۴،۱۶۷ ≥)	
آب دوبار تقطیر	آب دوبار تقطیر، درجه ۲، متناسب با مرجع [۳]	حلال‌ها
DMSO	دی‌متیل سولفوکسید انیدرید (AR)	
NA	محلول استاندارد عناصر فلزی، مانند محلول استاندارد عناصر آهن <sup>b</sup> (به عنوان مثال GBW08616)	مواد استاندارد
NA	پتاسیم بی‌فتالات <sup>b</sup> (به عنوان مثال GBW(E)130070)	
NA	مخلوط فسفات <sup>b</sup> (به عنوان مثال GBW(E)130071)	
<p><sup>a</sup> AR بیانگر درجه خلوص واکنشگر تجزیه‌ای است.</p> <p><sup>b</sup> GBW08616، GBW(E)130070 و GBW(E)130071 مثال‌هایی از محصولات مناسب در دسترس تجاری هستند. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد داده شده است و به منزله تاییدیه سازمان ملی استاندارد نیست.</p>		

## ۷ آماده‌سازی محلول

### ۱-۷ الزامات عمومی

جرم داده‌شده برای هر جزء در محلول به محتوای % ۱۰۰ اشاره دارد. اگر محتوای ماده شیمیایی کمتر از % ۱۰۰ باشد [به‌عنوان مثال  $y$  (%)]، توصیه می‌شود از ضریب  $(F_{\text{content}} = 100/y)$  برای محاسبه جرم ماده شیمیایی هم‌ارز جرم داده شده، استفاده شود.

توصیه می‌شود هنگام توزین با ترازوی الکترونیکی، عدم قطعیت در محدوده %  $\pm 0.5$  باشد.

### ۲-۷ محلول TMB

محلول  $4.16 \text{ mmol.l}^{-1}$  از TMB را در DMSO آماده کنید. توصیه می‌شود TMB کاملاً حل شود. بهتر است محلول TMB در بسته‌بندی‌های جداگانه نگهداری شود. توصیه می‌شود از ذوب-یخ‌زدگی مکرر اجتناب شود. در صورت مشاهده تغییر رنگ یا تغییر طیف جذبی، محلول نباید استفاده شود. طیف جذب TMB را می‌توان در مرجع [4] یافت.

### ۳-۷ محلول بافر

محلول استات سدیم  $0.2 \text{ mmol.l}^{-1}$  و محلول استیک اسید گلاسیال  $0.2 \text{ mmol.l}^{-1}$  را با آب دوبار تقطیر آماده کنید.

محلول بالا را به نسبت معینی مخلوط کنید تا محلول بافری با مقدار pH در گستره  $3.5$  تا  $5.5$  آماده شود (به بند ۴ مراجعه شود).

### ۴-۷ محلول پراکنه<sup>۲</sup> نانوذرات

محلول ذخیره پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی را مطابق مرجع [۵] تهیه کنید. محلول ذخیره را می‌توان رقیق کرد تا اطمینان حاصل شود که مقادیر جذب متناسب با حد آشکارسازی دستگاهی است.

### ۵-۷ محلول کنترل بیشتر

یون‌های فلزی ممکن است از سطح نانوذرات در محیط اسیدی آزاد شوند و ممکن است به فعالیت کاتالیستی کمک کنند. برای کم کردن سهم احتمالی، می‌توان یک محلول کنترل بیشتر تهیه کرد (به مرجع [6] کتاب‌نامه مراجعه کنید).

---

1- Glacial  
2- Dispersion

محلول کنترل بیشتر را با مخلوط کردن محلول پراکنه نانوذرات با محلول بافر در  $37 \pm 1$  °C برای مدت زمان مشابه با طول زمان اندازه‌گیری آماده کنید. سپس نانوذرات را با استفاده از فراصافش<sup>۱</sup> از محلول خارج کنید، توصیه می‌شود اندازه منافذ فراصافش کوچکتر از اندازه نانوذرات باشد یا برای حذف نانوذرات مغناطیسی از محلول، می‌توان از آهنربا استفاده کرد. محلول حاصل به‌عنوان محلول کنترل بیشتر نامیده می‌شود.

## ۸ روش اجرایی اندازه‌گیری

### ۸-۱ شرایط اندازه‌گیری

شرایط ویژه اندازه‌گیری در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ - شرایط اندازه‌گیری

پارامتر	شاخص
دما	$37 \pm 1$ °C
طول موج آشکارسازی	$650 \pm 1$ nm
مسیر نوری	$10.00 \pm 0.05$ mm
زمان گرم‌خانه‌گذاری	$60 \pm 10$ s
زمان اندازه‌گیری	$\geq 300$ s (جذب را در فاز خطی واکنش ثبت کنید)
نقطه اندازه‌گیری	$\geq 11$ (گستره، $\leq 30$ s)

### ۸-۲ مراحل اندازه‌گیری

۸-۲-۱ با حمام آب دمایابی شده، دمای کووت را در  $37 \pm 1$  °C کنترل کنید.

۸-۲-۲ کووت‌های حاوی آب دوبار تقطیر را برای خط زمینه کالیبراسیون و ثبت مرجع طیف‌نورسنج، قرار دهید.

۸-۲-۳ واکنشگرها و نمونه‌های مورد آزمون را آماده‌سازی کنید (به بند ۶ مراجعه شود).

۸-۲-۴ محلول بافر، محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی، محلول کنترل بیشتر، محلول TMB و  $H_2O_2$  ۳٪ را در حمام آب دمایابی شده تا  $37$  °C به تعادل برسانید.

۸-۲-۵ محلول‌های بالا را در بشر واکنش بریزید روش اجرایی جدول ۳ را دنبال کنید.

1 - Ultrafiltration



جدول ۳- روش اجرایی اندازه‌گیری

حجم	روش اجرایی اندازه‌گیری
۲۰۰ ml	محلول بافر به بشر واکنش اضافه شده و در ۳۷ °C گرم‌خانه‌گذاری شود.
۱۰۰ µl	محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی یا محلول کنترل بیشتر به بشر واکنش اضافه شده و با مخلوط‌کن ورتکس <sup>۱</sup> کاملاً مخلوط شود.
۱۰۰ µl	محلول TMB به بشر واکنش اضافه شده، با مخلوط‌کن ورتکس کاملاً مخلوط شود و برای ۶۰ ثانیه گرم‌خانه‌گذاری شود. در پایان گرم‌خانه‌گذاری، دمای محلول در بشر واکنش باید به ۳۷ °C برسد.
۲۰۰ µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ۳۰٪ به بشر واکنش اضافه شده و با مخلوط‌کن ورتکس کاملاً مخلوط شود. مقدار مناسبی از محلول واکنش به کووت منتقل شده و تغییر جذب (۶۵۰ nm) در زمان معین اندازه‌گیری شود.

۸-۲-۶ فرایند اندازه‌گیری ویژه در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- روندنمای اندازه‌گیری

۸-۳ اندازه‌گیری جذب شاهد واکنشگر

در روندنمای اندازه‌گیری (به شکل ۲ مراجعه شود)، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۳۰٪ یا محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی با آب دوبار تقطیر جایگزین شده و مقدار جذب طبق روش اجرائی زیربند ۸-۲ اندازه‌گیری می‌شود.

1 - Vortex

توصیه می‌شود از مقدار میانگین سه اندازه‌گیری برای جایگذاری در محاسبه استفاده شود.

#### ۴-۸ اندازه‌گیری کنترل مثبت

محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی با HRP جایگزین شده و مقدار جذب طبق روش‌اجرایی زیربند ۲-۸ اندازه‌گیری می‌شود.

#### ۵-۸ اندازه‌گیری کنترل بیشتر

محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی با محلول کنترل بیشتر جایگزین شده و مقدار جذب طبق روش‌اجرایی زیربند ۲-۸ اندازه‌گیری می‌شود.

### ۹ تحلیل داده

روش‌اجرایی تعیین فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی به شرح زیر است:

**الف** - وابستگی زمانی جذب را در ۶۵۰ nm برای نانوذرات فلزی و اکسید فلزی ( $A_{MOi}$ ) و دو محلول شاهد ( $A_{B1i}$  و  $A_{B2i}$ ) با زمان ( $t_i$ ) اندازه‌گیری کنید.

که در آن:

$i$	نقطه زمان اندازه‌گیری و به صورت ...، ۲، ۱، ۰ است؛
$A_{MOi}$	جذب نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در ۶۵۰ nm و زمان $t_i$ است؛
$A_{B1i}$	جذب محلول شاهد با محلول $H_2O_2$ ۳۰٪ جایگزین شده با آب دوبار تقطیر در ۶۵۰ nm و زمان $t_i$ است؛
$A_{B2i}$	جذب محلول شاهد با محلول پراکنه نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی جایگزین شده با آب دوبار تقطیر در ۶۵۰ nm و زمان $t_i$ است؛
$t_i$	زمان داده شده برای اندازه‌گیری جذب است.

**ب** - جذب نسبی را در ۶۵۰ nm برای نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی ( $A_{Mi}$ ) در زمان ( $t_i$ ) با استفاده از فرمول (۵) محاسبه کنید.

$$A_{Mi} = A_{MOi} - A_{B1i} - A_{B2i} \quad (5)$$

که در آن:

$i$  نقطه زمان اندازه‌گیری و به صورت ...، ۲، ۱، ۰ است؛  
 $A_{Mi}$  جذب نسبی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در ۶۵۰ nm ناشی از کم کردن جذب محلول‌های شاهد از جذب نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در زمان  $t_i$  است؛

پ- نرخ اولیه تغییر جذب ( $\Delta A/\Delta t$ ) را طبق فرمول (۶) محاسبه کنید،

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{(A_{Mj} - A_{Mi})}{(t_j - t_i)} \quad (6)$$

که در آن:

$t_i$  و  $t_j$  زمان داده شده برای اندازه‌گیری جذب و به صورت ...، ۲، ۱، ۰ و  $i > j$  است؛  
 $A_{Mi}$  و  $A_{Mj}$  جذب نسبی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در ۶۵۰ nm به ترتیب در زمان‌های  $t_i$  و  $t_j$  است.

ت- تعداد واحدهای فعالیت آنزیمی نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی ( $b_{nano}$ ) را طبق فرمول (۳) در بند ۴ محاسبه کنید.

ث- جرم نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی را اندازه‌گیری کنید.

ث- فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی ( $a_{nano}$ ) را طبق فرمول (۴) در بند ۴ محاسبه کنید.

## ۱۰ اندازه‌گیری عدم قطعیت

عدم قطعیت‌ها در محاسبه فعالیت شبه‌پراکسیداز نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی از موارد زیر ناشی می‌شود:

الف- اثر گسترش یافته ناشی از تجمع نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در نمونه؛

ب- جذب نوری توسط ناخالصی‌ها از جمله نانوذرات فلزی یا اکسید فلزی در نمونه؛

پ- عدم قطعیت‌های نظام‌مند و آماری مرتبط با استنتاج از فرمول (۲) به فرمول (۶)؛

ت- مقدار اندک آب در حلال که باعث جذب کاذب می‌شود.

## ۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید روش اجرایی به کار گرفته شده برای آزمون را کاملاً توصیف کند تا آزمایش تکرارپذیر باشد.

گزارش آزمون باید شامل موارد زیر باشد:

الف- نمونه مورد آزمون؛

ب- نتایج آزمون؛

پ- روش‌های اجرایی آزمون؛

ت- مشخصات کامل نانوذرات آزمون‌شده (ترکیب، توزیع اندازه، خلوص و غیره).

ث- روش‌های اجرایی آماده‌سازی نمونه مورد آزمون و شرایط نگهداری نمونه مورد آزمون.

ج- مشخصات شناساگر استفاده‌شده (نام تجاری، کد سازنده، شماره کالانما یا فرمولاسیون، شماره بهر یا تاریخ ساخت، حساسیت و غیره).

چ- استاندارد ملی مورد استفاده (شامل سال انتشار آن).

ح- هرگونه انحراف از روش اجرایی؛

خ- هرگونه ویژگی غیرعادی مشاهده شده؛

د- تاریخ آزمون.

یادآوری- برای اطلاعات بیشتر در مورد پارامترهای فیزیکوشیمیایی، به مرجع [۱] مراجعه شود.

## پیوست الف

### (آگاهی‌دهنده)

#### اندازه‌گیری جرم نانوذرات فلزی و اکسید فلزی آزمون شده

##### الف-۱ نمونه‌های جامد یا پودری

برای محاسبه جرم نانوذرات آزمون شده در  $100 \mu\text{l}$  محلول پراکنه،  $10 \text{ mg}$  از جامد یا پودر را ۳ مرتبه وزن کرده و مقدار میانگین جرم را محاسبه کنید. پودر را به  $10 \text{ ml}$  از  $\text{H}_2\text{O}$  اضافه کنید تا محلول پراکنه اصلی تهیه شود و غلظت متوسط ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) را محاسبه کنید. جرم نانوذرات آزمون شده در  $100 \mu\text{l}$  محلول پراکنه با ضرب میانگین غلظت در  $100 \mu\text{l}$  محاسبه می‌شود.

##### الف-۲ نمونه‌های محلول

برای برآورد جرم نانوذرات آزمون شده در  $100 \mu\text{l}$  محلول پراکنه،  $100 \text{ ml}$  از محلول نمونه را با خشک‌کن انجمادی<sup>۱</sup> یا خشک‌کن خلأ<sup>۲</sup>، خشک کنید تا نمونه‌های جامد یا پودری به دست آید. پودر را سه مرتبه وزن کرده و مقدار میانگین جرم را محاسبه کنید. جرم نانوذرات آزمون شده در نمونه محلول با تقسیم میانگین جرم نمونه پودری بر  $1000$  محاسبه می‌شود.

---

1 - Freeze dry  
2 - Vacuum dry

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

مثالی از محاسبه و ارزشیابی عدم قطعیت فعالیت شبه پراکسیداز نانوذرات اکسید آهن

ب-۱ مشکل اندازه‌گیری

فعالیت شبه پراکسیداز  $a_{nano}$  IONPs با تقسیم تعداد واحدهای فعالیت آنزیمی  $b_{nano}$  موجود در IONP های آزمون شده به جرم  $m_{IONPs}$  IONPs تعیین می‌شود. همانطور که در این استاندارد مشخص شده است،  $b_{nano}$  با اندازه‌گیری تولید محصول اکسید شده آبی رنگ در یکای زمان کاتالیست توسط IONPs در حضور  $H_2O_2$  در دمای  $37^\circ C$  در شرایط اسیدی  $pH = 3.6$  به دست می‌آید و براساس قانون بیر-لامبرت محاسبه می‌شود.

ب-۲ مدل ریاضی

از فرمول‌های ۳ و ۴، اندازه‌دهه  $a_{nano}$  را می‌توان به صورت زیر محاسبه کرد:

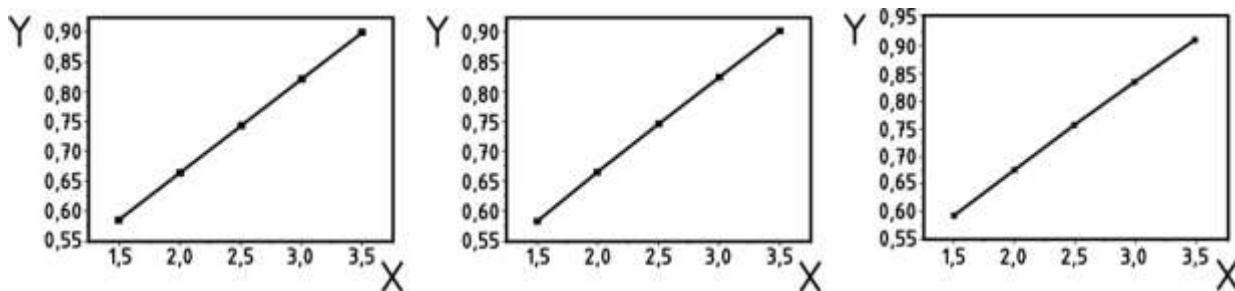
$$a_{nano} = \frac{V}{\varepsilon \times l \times m_{IONPs}} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (ب-۱)$$

که در آن:

$a_{nano}$	فعالیت شبه پراکسیداز IONPs، بر حسب $kat \cdot mg^{-1}$ است؛
$V$	حجم کل محلول واکنش، بر حسب $l$ است؛
$E$	ضریب تضعیف مولی مشتق TMB که برابر $1 \cdot 10^4 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ است؛
$l$	طول مسیر نوری کووت، بر حسب $cm$ است؛
$m_{IONPs}$	جرم IONPs به $mg$ است؛
$\Delta A / \Delta t$	نرخ تغییر اولیه جذب محلول واکنش پس از تصحیح با نرخ شاهد واکنشگر، بر حسب $s^{-1}$ است.

ب-۳ مثالی از محاسبه فعالیت شبه پراکسیداز IONPs

به عنوان مثال، تغییرات طیفی محصولات اکسایش TMB که با زمان با استفاده از IONPs کاتالیز شده‌اند در شکل ب-۱ نشان داده شده است.



شکل ب-۱- تغییرات طیفی محصولات اکسایش TMB نسبت به زمان (n=3)

در نظر بگیرید که سه مجموعه مستقل از اندازه‌گیری‌های تکراری  $\Delta A/\Delta t$  از طریق همان روش اجرایی به دست می‌آیند (به زیربند ۸-۲ مراجعه شود) که منجر به داده‌های ارائه شده در جدول ب-۱ می‌شود. مقادیر متناظر  $a_{\text{nano}}$  طبق فرمول (ب-۱) محاسبه می‌شود. میانگین حسابی  $\bar{a}_{\text{nano}}$  و انحراف استاندارد محاسبه شده از فرمول‌های (ب-۲) و (ب-۳) نیز در جدول ب-۱ ارائه شده است.

$$\bar{a}_{\text{nano}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_{\text{nano } i} \quad (\text{ب-۲})$$

$$s_{(a_{\text{nano } i})} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (a_{\text{nano } i} - \bar{a}_{\text{nano}})^2} \quad (\text{ب-۳})$$

جدول ب-۱- مقادیر کمیت‌های ورودی  $V, l, \varepsilon, m_{\text{Fe}}, l, \varepsilon, V$  به دست آمده از سه مجموعه از اندازه‌گیری‌های تکراری و  $a_{\text{nano}}$  محاسبه شده

۰,۰۰۲۴			$V, l$	مقادیر ورودی
۳۹۰۰۰			$\varepsilon, \text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$	
۱۰۰۰			$l, \text{cm}$	
$m_{\text{Fe}} = C_{\text{Fe}} \times V_{\text{Fe}} = 0,066 \times 0,1 = 6,6 \times 10^{-3}$			$m_{\text{IONPs}}, \text{mg}$	
۱	۲	۳	$\Delta A/\Delta t, \text{s}^{-1}$	
۰,۰۰۲۶۲	۰,۰۰۲۶۵	۰,۰۰۲۶۵		
$2,44 \times 10^{-8}$	$2,47 \times 10^{-8}$	$2,47 \times 10^{-8}$	$a_{\text{nano}}, \text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$	
$2,46 \times 10^{-8}$			میانگین حسابی $\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$	
$1,73 \times 10^{-10}$			انحراف استاندارد $\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$	

ب-۴ ارزشیابی عدم قطعیت فعالیت شبه پراکسیداز IONPs

ب-۴-۱ ارزشیابی نوع A عدم قطعیت استاندارد

با استفاده از روش اجرایی اندازه گیری اشاره شده در زیر بند ۸-۲، فعالیت شبه پراکسیداز IONPs در چهار اندازه گیری برای هر سه گروه در هر سه روز اندازه گیری می شود و  $a_{\text{nano}}$  محاسبه شده، در جدول ب-۲ نشان داده شده است.

جدول ب-۲- محاسبه نتایج  $a_{\text{nano}}$

$a_{\text{nanos}}$ $\text{kat.mg}^{-1}$				گروه	تاریخ
n=۴	n=۳	n=۲	n=۱		
$۲,۲۳ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۰۷ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۴ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۸ \times ۱۰^{-۸}$	I	روز ۱
$۲,۵۷ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۳۹ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۳ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۷۴ \times ۱۰^{-۸}$	II	
-	$۲,۴۴ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۳۵ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۷۱ \times ۱۰^{-۸}$	III	
$۲,۳۱ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۱۲ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۹ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۱۵ \times ۱۰^{-۸}$	IV	روز ۲
$۲,۱۸ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۱ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۱ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۳۵ \times ۱۰^{-۸}$	V	
$۲,۰۷ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۱۸ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۹ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۱ \times ۱۰^{-۸}$	VI	
$۲,۴۶ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۶ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۴ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۴ \times ۱۰^{-۸}$	VII	روز ۳
$۲,۳۶ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۲ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۵۷ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۲۸ \times ۱۰^{-۸}$	VIII	
$۲,۴۰ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۴ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۱۷ \times ۱۰^{-۸}$	$۲,۴۸ \times ۱۰^{-۸}$	IX	

یادآوری- در این جدول، «-»، بر اساس معیار گروبز<sup>۱</sup>، داده های خارج از محدوده<sup>۲</sup> هستند.

با جایگزینی مقادیر جدول ب-۲ در فرمول های (ب-۲) و (ب-۳)،  $\bar{a}_{\text{nano}} = ۲,۳۵ \times ۱۰^{-۸} \text{ kat.mg}^{-1}$  و  $S(a_{\text{nanoi}}) = ۱,۶۴ \times ۱۰^{-۹} \text{ kat.mg}^{-1}$  به دست می آید.

عدم قطعیت استاندارد A یا  $U_{A(a_{\text{nanoi}})}$ ، که انحراف استاندارد تجربی میانگین  $S(\bar{a}_{\text{nanoi}})$  است براساس فرمول (ب-۴)  $۲,۷۸ \times ۱۰^{-۱۰} \text{ kat.mg}^{-1}$  محاسبه می شود.

$$U_{A(a_{\text{nano}})} = S(\bar{a}_{\text{nano}}) = \frac{S(a_{\text{nanoi}})}{\sqrt{n}} = \frac{1.64 \times 10^{-9}}{\sqrt{35}} = 2.78 \times 10^{-10} \text{ kat.mg}^{-1} \quad (\text{ب-۴})$$

1- Grubbs  
2- Outlaier



ب-۴-۲ ارزشیابی نوع B عدم قطعیت استاندارد

ب-۴-۲-۱ کلیات

ب-۴-۲-۱-۱ مقدمه

با توجه به فرمول ب.۱، می توان تحلیل کرد که مولفه های عدم قطعیت نوع B متناسب با  $V$ ،  $\varepsilon$ ،  $l$ ،  $m_{\text{IONPs}}$  و  $\Delta A/\Delta t$  هستند. بنابراین، عدم قطعیت استاندارد نسبی نوع B را می توان به صورت زیر بیان کرد:

$$\frac{u_B(a_{\text{nano}})}{a_{\text{nano}}} = \sqrt{\left[\frac{u(V)}{V}\right]^2 + \left[\frac{u(\varepsilon)}{\varepsilon}\right]^2 + \left[\frac{u(l)}{l}\right]^2 + \left[\frac{u(m_{\text{IONPs}})}{m_{\text{IONPs}}}\right]^2 + \left[\frac{u\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)}{\frac{\Delta A}{\Delta t}}\right]^2} \quad (\text{ب-۵})$$

ب-۴-۲-۲ عدم قطعیت نسبی حجم کل محلول واکنش،  $u(V)/V$

از آنجایی که حجم واکنش IONPs، محلول TMB و  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۳۰٪ به ترتیب ۱۰۰  $\mu\text{l}$ ، ۱۰۰  $\mu\text{l}$  و ۲۰۰  $\mu\text{l}$  بوده که بسیار کوچکتر از محلول ۱ (۲۰۰۰  $\mu\text{l}$ ) است، عدم قطعیت های ایجاد شده توسط آنها ناچیز است و می توان این عدم قطعیت ها را نادیده گرفت. بنابراین، منبع  $u(V)$  پیپت قابل تنظیم (محدوده ۱۰۰  $\mu\text{l}$  تا ۱۰۰۰  $\mu\text{l}$ ) است و توسط سازنده پیپت ارائه می شود. عدم قطعیت نسبی  $V$  از طریق فرمول زیر بیان می شود:

$$\frac{u(V_{1000})}{V} = 0.002$$

ب-۴-۲-۳ عدم قطعیت نسبی ضریب تضعیف مولی مشتق TMB،  $u(\varepsilon)/\varepsilon$

ضریب تضعیف مولی مشتق TMB،  $\varepsilon$  است. عدم قطعیت در  $\varepsilon$  به قدری کوچک است که قابل چشم پوشی باشد و عبارت نشان داده شده به خوبی با مقدار صفر تقریب شود.

$$\frac{u(\varepsilon)}{\varepsilon} = 0$$

ب-۴-۲-۴ عدم قطعیت نسبی مسیر نوری کووت،  $u(l)/l$

گواهی کالیبراسیون،  $l = 1/1000 \text{ cm}$  و عدم قطعیت گسترش یافته استاندارد  $U = 0.103 \text{ cm}$  را نشان می دهد و بیان می کند که با استفاده از ضریب پوشش  $k = 2$  به دست آمده است. در این صورت عدم قطعیت نسبی  $l$  برابر است با:

$$\frac{u(l)}{l} = \frac{U}{k \times l} = 0.0015$$

ب-۴-۲-۵ عدم قطعیت نسبی جرم IONPs،  $u(m_{\text{IONPs}})/m_{\text{IONPs}}$

عدم قطعیت  $m_{\text{IONPs}}$  را می توان با فرمول (ب-۶) محاسبه کرد:

$$\left[\frac{u(m_{\text{IONPs}})}{m_{\text{IONPs}}}\right]^2 = \left[\frac{u(V_{\text{IONPs}})}{V_{\text{IONPs}}}\right]^2 + \left[\frac{u(C_{\text{IONPs}})}{C_{\text{IONPs}}}\right]^2 = 0.001^2 + \left(\frac{0.000361}{0.066}\right)^2 = 3.09 \times 10^{-5} \quad (\text{ب-۶})$$

بنابراین،

$$\frac{u(m_{\text{IONPs}})}{m_{\text{IONPs}}} = 5.56 \times 10^{-3}$$

ب-۴-۲-۶ عدم قطعیت نسبی نرخ تغییر طیفی اولیه محلول واکنش پس از تصحیح نرخ شاهد واکنشگر،  $u(\Delta A/\Delta t)/\Delta A/\Delta t$

عدم قطعیت ایجادشده در اثر زمان، ناچیز است و می توان آن را نادیده گرفت.

گواهی کالیبراسیون طیف نورسنج توسط موسسه اندازه شناسی صادر می شود و عدم قطعیت گسترش یافته و ضریب پوشش به صورت  $U = 0.1008$  و  $k=2$  داده شده است. عدم قطعیت استاندارد A به صورت زیر است:

$$u(A) = \frac{0.008}{2} = 0.004$$

می توان تحلیل کرد که عدم قطعیت  $\Delta A/\Delta t$  با اندازه گیری طیفی و برازش خطی معرفی می شود.

با استفاده از داده های این مثال،  $\Delta A/\Delta t$  را می توان به صورت زیر بیان کرد:

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{-2A_1 - A_{1.5} + A_{2.5} + 2A_3}{5}$$

بنابراین، عدم قطعیت استاندارد ایجادشده با اندازه گیری طیفی به صورت زیر است:

$$u(\Delta A) = \frac{6}{5}u(A) = 0.0048$$

انحراف استاندارد شیب بخش خطی اول را می توان با فرمول زیر محاسبه کرد:

$$s_b = b \sqrt{\frac{1-r^2}{r^2(n-2)}}$$

که در آن:

b شیب برازش خطی است؛

r ضریب همبستگی برازش خطی است.

$S_b$  ناچیز است و می توان آن را نادیده گرفت. بنابراین، عدم قطعیت نسبی  $\Delta A/\Delta t$  را می توان به صورت زیر بیان کرد:

$$\frac{u\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)}{\frac{\Delta A}{\Delta t}} = \frac{0.0048}{\frac{\Delta A}{\Delta t}}$$

ب-۴-۲-۷ خلاصه عدم قطعیت نوع B استاندارد

جنبه‌های مربوط به این مثال همانطور که در بالا مورد بحث قرار گرفت در جدول ب-۳ خلاصه شده است.

جدول ب-۳- خلاصه اجزا عدم قطعیت استاندارد نوع B

ارزش عدم قطعیت نسبی $u(x_i)/x_i$	منبع عدم قطعیت	جزء عدم قطعیت استاندارد نسبی $u(x_i)/x_i$	جزء عدم قطعیت استاندارد $u(x_i)$
۰٫۰۰۲	پیپیت تنظیم‌پذیر	$u(V)/V$	$u(V)$
-	ثابت بدون عدم قطعیت	$u(\varepsilon)/\varepsilon$	$u(\varepsilon)$
۰٫۰۰۱۵	مسیر نوری کووت	$u(l)/l$	$u(l)$
۰٫۰۰۵۵۶	پیپیت تنظیم‌پذیر توزین نمونه‌های IONPs جامد	$u(m_{\text{IONPs}})/m_{\text{IONPs}}$	$u(m_{\text{IONPs}})$
$\approx ۰٫۰۳۲$	اندازه‌گیری طیفی	$u(\frac{\Delta A}{\Delta t})/\frac{\Delta A}{\Delta t}$	$u(\frac{\Delta A}{\Delta t})$

چون  $\frac{\Delta A}{\Delta t} \approx ۰٫۱۵$  است، عدم قطعیت نسبی  $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  را می‌توان از فرمول زیر محاسبه کرد که به‌طور معناداری با  $U_{B(a_{\text{nano}})}$  متناسب و با سایر اجزا قابل مقایسه است:

$$\frac{u\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)}{\frac{\Delta A}{\Delta t}} = \frac{0.0048}{\frac{\Delta A}{\Delta t}} \approx \frac{0.0048}{0.15} \approx 0.032$$

براساس اصل یک‌سوم عدم قطعیت کوچک در محاسبه عدم قطعیت،  $\frac{0.0048}{\frac{\Delta A}{\Delta t}}$  را می‌توان برای بیان کلی عدم قطعیت نوع B استاندارد معرفی کرد. بنابراین:

$$u_{B(a_{\text{nano}})} = a_{\text{nano}} \times \frac{0.0048}{\frac{\Delta A}{\Delta t}} = \frac{0.0048 \times V}{\varepsilon \times l \times m_{\text{IONPs}}} = 4.48 \times 10^{-11} \text{ kat. mg}^{-1}$$

ب-۴-۳ راهبرد استاندارد ادغام‌شده

بیان عدم قطعیت استاندارد ادغام‌شده  $a_{\text{nano}}$  را می‌توان با اعمال قانون انتشار عدم قطعیت به‌دست آورد، به‌طوری‌که:

$$u_c = \sqrt{u_{A(a_{\text{nano}})}^2 + u_{B(a_{\text{nano}})}^2} = \sqrt{(2.78 \times 10^{-10})^2 + (4.48 \times 10^{-11})^2} \\ = 2.82 \times 10^{-10} \text{ kat. mg}^{-1}$$

ب-۴-۴ عدم قطعیت گسترش یافته

عدم قطعیت گسترش یافته  $U(a_{\text{nano}})$  با ضرب عدم قطعیت استاندارد تلفیقی  $u_c$  در ضریب پوششی  $k=t_{0.05,34}=2.03$  به دست می آید:

$$U(a_{\text{nano}}) = u_c \times k = 2.82 \times 10^{-10} \times 2.03 = 1.16 \times 10^{-9} \text{ kat.mg}^{-1}$$

ب-۴-۵ نتیجه نهایی

فعالیت شبه پراکسیداز IONPs براساس

$$a_{\text{nano}} = 2.35 \times 10^{-8} \pm 1.16 \times 10^{-9} \text{ kat.mag}^{-1} \text{ و } k=2.03$$

اندازه گیری می شود.

### کتابنامه

- [۱] استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۰۶: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو-راهنمای مشخصه یابی فیزیکو-شیمیایی مواد نانو مقیاس مهندسی شده برای ارزیابی توکسیکولوژیک
- [۲] استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۰۶۳: سال ۱۳۹۲، توصیف و عملکرد اندازه گیری طیف سنج های نوری و ماوراء بنفش
- [۳] استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۲، آب- مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی ها و روش های آزمون
- [4] Josephy PD, Eling T, Mason RP, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem.* 1982; 257(7):3669-3675.
- [۵] استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۲۵۰: سال ۱۳۹۸، فناوری نانو- آماده سازی نمونه برای مشخصه یابی نانو اشیاء فلزی و اکسید فلزی در آب
- [6] Gao L, Zhuang J, Nie L et al., Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* 2007; 2(9):577-583.
- [7] ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)