



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران - ایزو
۲۲۶۱۴
چاپ اول

INSO
22614
1st.Edition

2018

Identical with
ISO/TS 18827:
2017

۱۳۹۶

فناوری نانو - تشدید اسپین
الکترون (ESR) به عنوان روشی برای
اندازه‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنشگر
(ROS) تولیدشده به وسیله نانومواد
اکسید فلزی

**Nanotechnologies — Electron spin
resonance (ESR) as a method for
measuring reactive oxygen species
(ROS) generated by metal oxide
nanomaterials**

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.gov.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

Iranian National Standardization Organization (INSO)

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

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

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

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

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد 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 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، 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)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ 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 صدور گواهی 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، 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

«تشدید اسپین الکترون (ESR) به عنوان روشی برای اندازه گیری گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) تولید شده به وسیله نانومواد اکسید فلزی»

رئیس:

میر کاظمی، سید محمد
(دکتری مهندسی مواد و متالورژی)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیئت علمی دانشگاه علم و صنعت ایران

دبیر:

دباغ کاشانی، فاطمه
(دکتری فیزیک)

عضو هیئت علمی دانشگاه علم و صنعت ایران

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه
(کارشناسی ارشد زیست شناسی)

کارشناس کمیته استانداردسازی- ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

تاج آبادی، مریم
(دکتری مهندسی پزشکی - بیومواد)

عضو هیئت علمی دانشگاه علم و صنعت ایران

صادق حسنی، صدیقه
(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

عضو هیئت علمی پژوهشگاه صنعت نفت

غضنفری، سید محمد حسین
(کارشناسی ارشد نانومواد)

کارشناس واحد ارزیابی محصولات ستاد نانو

گل زردی، سمیرا
(کارشناسی ارشد نانومواد)

کارشناس کمیته استانداردسازی- ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

میرزاجانی، فاطمه
(دکتری فیتوشیمی)

عضو هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی

نجم الدین، نجمه
(دکتری مهندسی مواد)

عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

کارشناس استاندارد- نایب رییس کمیته فنی متناظر فناوری نانو

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ز	پیش‌گفتار
ح	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات، تعاریف و کوتاه‌نوشت‌ها
۱	۳-۱ اصطلاحات، تعاریف
۳	۳-۲ کوتاه‌نوشت‌ها
۳	۴ اصول
۳	۴-۱ کلیات
۴	۴-۲ روش به تله‌اندازی اسپینی
۴	۴-۲-۱ کلیات
۴	۴-۲-۲ تله DMPO
۴	۴-۲-۳ تله BMPO
۵	۴-۲-۴ تله TPC
۵	۴-۳ کنترل مثبت برای تولید رادیکال‌های آزاد
۵	۴-۳-۱ واکنش فنتون
۵	۴-۳-۲ سیستم هیپوزانتین- زانتین اکسیداز
۶	۴-۳-۳ حساسیت به نور رز بنگال
۶	۵ واکنشگرها
۷	۶ دستگاه‌ها
۷	۷ نمونه برداری
۷	۷-۱ آماده‌سازی آزمایش (تعلیق نانومواد اکسید فلزی)
۸	۷-۲ آماده‌سازی محلول برای تولید رادیکال هیدروکسیل
۸	۷-۲-۱ محلول FeSO ₄
۸	۷-۲-۲ محلول H ₂ O ₂
۸	۷-۳ آماده‌سازی محلول برای تولید رادیکال آنیون سوپراکسید
۸	۷-۳-۱ بافر فسفات
۸	۷-۳-۲ محلول هیپوزانتین
۸	۷-۳-۳ محلول زانتین اکسیداز

صفحه	عنوان
۸	۴-۷ آماده‌سازی محلول برای تولید اکسیژن منفرد
۹	۵-۷ آماده‌سازی عامل به تله‌اندازی اسپینی
۹	۱-۵-۷ کلیات
۹	۲-۵-۷ محلول پایه DMPO
۹	۳-۵-۷ محلول پایه BMPO
۹	۴-۵-۷ محلول پایه TPC
۹	۶-۷ واکنش آزمایش و عامل به تله‌اندازی اسپینی
۹	۱-۶-۷ کلیات
۱۰	۲-۶-۷ واکنش DMPO
۱۰	۳-۶-۷ واکنش BMPO
۱۰	۴-۶-۷ واکنش TPC
۱۰	۷-۷ واکنش کنترل مثبت و عامل به تله‌اندازی اسپینی
۱۰	۱-۷-۷ ترکیب محصول افزایشی رادیکال DMPO (DMPO/OH)
۱۱	۲-۷-۷ ترکیب محصول افزایشی رادیکال BMPO (BMPO/OOH)
۱۱	۳-۷-۷ ترکیب محصول افزایشی رادیکال TPC ($TPC/{}^1O_2$)
۱۱	۸-۷ آماده‌سازی نمونه استاندارد برای محاسبه اسپین
۱۲	۸ تداخل‌ها
۱۲	۱-۸ نمونه‌برداری
۱۲	۲-۸ زمان نمونه‌برداری
۱۳	۹ روش کار
۱۳	۱-۹ کلیات
۱۵	۲-۹ تزریق نمونه
۱۵	۳-۹ اندازه‌گیری ESR
۲۳	۱۰ مثال‌هایی از نتایج
۲۳	۱-۱۰ DMPO/OH
۲۳	۲-۱۰ BMPO/OOH
۲۳	۳-۱۰ $TPC/{}^1O_2$
۲۴	۴-۱۰ TEMPOL
۲۵	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد « تشدید اسپین الکترون (ESR) به عنوان روشی برای اندازه‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS) تولیدشده به وسیله نانومواد 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 شصت و سومین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۳۹۶/۱۲/۲۳ تصویب شد. اینک این استاندارد 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.

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.

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 18827: 2017, Nanotechnologies - Electron spin resonance (ESR) as a method for measuring reactive oxygen species (ROS) generated by metal oxide nanomaterials

مقدمه

اخیراً استفاده از نانومواد پایه فلزی یا پایه اکسید فلزی یا فلز به شدت در مصارف صنعتی و زیست پزشکی رشد یافته است. هرچند، مبنای علمی برای سمیت یاخته‌ای و سمیت ژنتیکی اکثر نانومواد ساخته شده، کاملاً قابل درک نیستند. یکی از سازوکارهای مهم نانوسمیت، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر^۱ (ROS) است. مطالعه بر روی آثار خطرناک نانومواد اکسید فلزی هنوز در مرحله ابتدایی خود قرار دارد. توانایی تولید ROS یک منبع مهم از سمیت نانومواد اکسید فلزی است. تولید بیش از حد ROS می‌تواند تنش اکسایشی^۲ و در نتیجه ناتوانی یاخته‌ها در حفظ کارکرد تنظیم شده اکسایش- کاهش^۳ فیزیولوژی طبیعی، را تحمیل کند. در نتیجه، این فرآیند ممکن است منجر به تخریب DNA، ارسال سیگنال‌های نامنظم سلولی، تغییر در تحرک سلولی، سمیت یاخته‌ای، مرگ برنامه‌ریزی شده یاخته‌ای (خزان یاخته‌ای)^۴ و آغاز سرطان شود. عوامل مهمی وجود دارند که می‌توانند بر روی تولید ROS تأثیر بگذارند. عوامل تعیین کننده مهم مانند اندازه، شکل، سطح ذره، بارهای مثبت سطحی، گروه‌های موجود بر سطح^۵، انحلال ذره، یون فلزی رهایش یافته از نانوفلزات و اکسیدهای نانوفلزی، فعال سازی نور فرابنفش، انبوهش، نحوه برهمکنش با یاخته‌ها، التهاب^۶ و pH محیط هستند [1]. بنابراین به منظور آشکارسازی و تعیین میزان تشکیل ROS روی سطح مواد نانو اکسید فلزی، این استاندارد روش تشدید اسپین الکترون^۷ (ESR) را پیشنهاد می‌دهد.

طبق مطالعات گسترده و مرتبط زیست‌شناسی انجام شده در میان گونه‌های ROS، رادیکال هیدروکسیل^۸ (OH)، رادیکال آنیون سوپراکسید^۹ (O₂-)، اکسیژن منفرد^{۱۰} (O₂^۱) و هیدروژن پراکسید^{۱۱} (H₂O₂)، اهمیت بیشتری دارند.

هرچند، آشکارسازی مستقیم برخی رادیکال‌های آزاد (مانند آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل) در محلول در دمای اتاق بسیار مشکل یا غیرممکن است [2]. به تله‌اندازی اسپینی^{۱۲} ESR ابزاری ارزشمند در مطالعه رادیکال‌های آزاد گذرا^{۱۳} است [3]. به تله‌اندازی اسپینی روشی است که در اواخر دهه ۱۹۶۰ توسعه یافت و طی آن، یک نیترون^{۱۴} یا ترکیب دارای نیتروسیل^{۱۵} (یک تله اسپین) با رادیکال آزاد هدف، واکنش

-
- 1 - Reactive oxygen species
 - 2- Oxidative stress
 - 3 - Redox-regulated functions
 - 4- Apoptosis
 - 5- S-containing groups
 - 6- Inflammation
 - 7- Electron-spin-resonance
 - 8 - Hydroxyl radical
 - 9- Superoxide anion radical
 - 10- Singlet oxygen
 - 11- Hydrogen peroxide
 - 12- Spin trapping
 - 13- Transient free radicals
 - 14- Nitron
 - 15 - Nitroso Compound

می‌دهد تا یک رادیکال آزاد پایدار و قابل تشخیص (محصولات افزایشی^۱ اسپین) شکل بگیرد و به وسیله طیف‌سنجی ESR آشکارسازی شود.

محصولات افزایشی اسپینی به صورت مستقیم به وسیله طیف‌سنج ESR قابل مشاهده هستند. طیف‌های ESR این محصولات افزایشی اسپینی منحصر به فرد بوده و اثر انگشتی برای حضور ROS محسوب می‌شوند.

این استاندارد، روش‌های آشکارسازی به وسیله ESR روی محصول افزایشی هیدروکسیل^۵، ۵ - دی‌متیل - ۱ - پیرولین - N - اکسید (DMPO)، محصول افزایشی سوپراکسید^۵ - یرت - بوتوکسی کربنیل - ۵ - متیل - ۱ - پیرولین - N - اکسید (BMPO) و تشکیل محصول افزایشی اکسیژن منفرد، ۲، ۲، ۵، ۵ - تترامیل - ۳ - پیرولین - ۳ - کربوکس آمید (TPC) از نانومواد اکسید فلزی را تعیین می‌کند. این استاندارد روشی برای تشخیص تولید ROS روی نانومواد اکسید فلزی در شرایط آزاد یاخته فراهم می‌کند. این روش ممکن است اطلاعات ارزشمندی برای پیش‌بینی سمیت یاخته‌ای ROS - واسطه^۲ بدون نیاز به بررسی سمیت یاخته‌ای در در فاز سنجش فیزیکی شیمیایی ارائه دهد.

1- Adducts
2 - ROS-mediated

فناوری نانو- تشدید اسپین الکترون (ESR) به عنوان روشی برای اندازه گیری گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) تولید شده به وسیله نانومواد اکسید فلزی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه روشی برای آشکارسازی ROS ($^1O_2, O_2^-, OH^\bullet$) تولید شده به وسیله نانومواد اکسید فلزی در محلول آبی با گونه های اکسیژن واکنشگر- عامل به تله اندازی اسپینی ویژه به وسیله ESR است، ولی این استاندارد روش های ESR را که از عامل به تله اندازی اسپینی استفاده نمی کنند، شامل نمی شود.

۲ مراجع الزامی

هیچ مرجع الزامی برای این استاندارد وجود ندارد.

۳ اصطلاحات، تعاریف و کوتاه نوشت ها

در این استاندارد، اصطلاحات، تعاریف و کوتاه نوشت های زیر به کار می روند:
سازمان های ISO و IEC پایگاه های داده ها مربوط به اصطلاحات را که برای استاندارد سازی استفاده می شود نگهداری می کنند، آدرس های آن ها در زیر آمده است:

— IEC Electropedia ، موجود در <http://www.electropedia.org/>

— سامانه برخط ISO، موجود در <http://www.iso.org/obp>

۱-۳ اصطلاحات و تعاریف

۱-۱-۳

نانوماده

nanomaterial

ماده ای که هر بعد خارجی آن نانومقیاس است یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن نانومقیاس است.
یادآوری ۱- این اصطلاح عمومی شامل نانوشیء و ماده نانو ساختار است.
یادآوری ۲- نانوماده مهندسی شده، نانوماده ساخته شده و نانوماده تصادفی نیز مشاهده شوند.
[منبع: برگرفته از زیربند ۲-۴ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره: ۱-۸۰۰۰۴]

۲-۱-۳

آزمایه

test sample

ماده، افزاره^۱، بخشی از افزاره، جزء، محصول استخراجی یا بخشی از آن که در معرض سنجش یا آزمون شیمیایی یا زیست‌شناسی قرار دارد.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۵ استاندارد ISO/TS 10993-5:2009]

۳-۱-۳

کنترل مبنا صفر

zero baseline control

معادل کنترل مثبت که در آن هیچ رادیکالی آشکار نمی‌شود.

یادآوری ۱- به‌عنوان مثال، کنترل مبنا صفر برای کنترل مثبت واکنش فنتون^۲، H_2O_2 و BMPO در غیاب آهن است؛ برای سامانه هیپوزانتین- زانتین اکسیداز^۳ (HX-XO)، در غیاب HX-XO، هیپوزانتین^۴ و DMPO خواهد بود؛ برای حساسیت نوری رز بنگال^۵، رز بنگال و TPC در غیاب نور خواهد بود.

۴-۱-۳

کنترل مثبت

positive control

ماده یا جسم به خوبی مشخصه‌یابی شده، هنگامی که با روش آزمون خاصی ارزیابی می‌شود، شایستگی سامانه آزمون برای دستیابی به یک پاسخ مثبت یا واکنشی را به‌صورت مناسب و تکرارپذیر نشان می‌دهد.

[منبع: ISO/TS 10993-12:2012, 3.12]

-
- 1 - Device
 - 2 - Fenton reaction
 - 3- Hypoxanthine-xanthine oxidase
 - 4- Hypoxanthine
 - 5 - Rose bengal photosensitization

۲-۳ کوتاه‌نوشت‌ها

ROS	Reactive Oxygen Species	گونه‌های اکسیژن واکنشگر
ESR	Electron Spin Resonance	تشدید اسپین الکترون
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide	۵، ۵-دی‌متیل-۱-پیرولین-N-اکسید
BMPO	5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide	۵-ترت-بوتوکسی‌کربنیل-۵-متیل-۱-پیرولین-N-اکسید
TPC	2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide	۲، ۲، ۵، ۵-تترامتیل-۳-پیرولین-۳-کربوکس‌آمید
DTPA	diethylenetriaminepentaacetic acid	اسید دی‌اتیلن‌تری‌آمین پنتا استیک اسید
OH [•]	hydroxyl radical	رادیکال هیدروکسیل
OH ⁻	hydroxide ion	یون هیدروکسید
O ₂ ^{•-}	superoxide anion radical	رادیکال آنیون سوپراکسید
¹ O ₂ ^{••}	singlet oxygen	اکسیژن منفرد
TEMPOL	4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	۴-هیدروکسیل-۲، ۲، ۶، ۶-تترامتیل‌پیریدین-۱-اکسید

۴ اصول

۱-۴ کلیات

در اغلب اتم‌ها و مولکول‌ها، الکترون‌ها جفت هستند. الکترون‌های جفت‌شده سیگنال ESR نمی‌دهند درحالی‌که اتم‌ها و مولکول‌ها با الکترون‌های جفت‌نشده یک سیگنال ESR می‌دهند. زمانی که یک اتم یا مولکول با یک الکترون جفت‌نشده در میدان مغناطیسی قرار می‌گیرد، اسپین الکترون جفت‌نشده می‌تواند هم‌جهت یا خلاف جهت میدان تنظیم شود. این دو جهت اسپین الکترونی انرژی‌های متفاوتی دارند. کاربرد

میدان مغناطیسی در یک الکترون جفت نشده، حذف حالت‌های اسپینی تبهگن^۱ آن است. طیف‌سنجی ESR جذب تابش ریزموج مرتبط با گذار بین این دو حالت اسپینی غیرتبهگن^۲ را اندازه‌گیری می‌کند [4].

۲-۴ روش به تله‌اندازی اسپینی

۱-۲-۴ کلیات

در طیف‌سنجی ESR به تله‌اندازی اسپینی برای آشکارسازی و شناسایی رادیکال‌های آزاد با عمر کوتاه استفاده می‌شود. به‌طور ایده‌آل، محصول افزایشی شکل گرفته بین یک عامل به‌تله‌اندازی اسپینی و رادیکال آزاد دارای مشخصه طیفی ESR بوده و ویژه آن رادیکال آزاد است. مطالعات پیشرفته ESR با به‌کارگیری عامل‌های تله-اسپینی برای تشخیص انواع متفاوت ROS پذیرفته شده‌است.

۲-۲-۴ تله DMPO

تله DMPO مزایای مهمی نسبت به دیگر تله‌های اسپین نیترون دارد. به ویژه، برای شناسایی رادیکال‌های اکسیژن محور، به‌طور مثال آنیون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار مفید هستند. محصول افزایشی اسپینی شکل گرفته بین تله DMPO و رادیکال هیدروکسیل، یک سیگنال ESR چهار بخشی با نسبت شدت ۱:۲:۲:۱ و تقسیم فوق‌ظریف^۳ a_N و a_H مساوی و برابر با $1/49$ mT تا $1/5$ mT دارد که با محصول افزایشی DMPO-OH سازگار است [5].

۳-۲-۴ تله BMPO

تله BMPO برای آشکارسازی برون‌تنی و درون‌تنی ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید با عمر کوتاه با شکل‌گیری محصولات افزایشی قابل تشخیص سنجش‌پذیر به‌وسیله طیف‌سنجی ESR مناسب است [6]. دیگر تله‌های اسپینی نیترون، مانند تله DMPO، به آسانی بین رادیکال هیدروکسیل و سوپراکسید تمایز قائل نمی‌شوند زیرا واپاشی^۴ خودبه‌خودی محصول افزایشی سوپراکسید DMPO ($t_{1/2}$ از $0/9$ تا $1/3$) به محصول افزایشی هیدروکسیل DMPO اتفاق می‌افتد. محصول افزایشی سوپراکسید BMPO به محصول افزایشی هیدروکسیل واپاشیده نمی‌شود و نیم‌عمر خیلی طولانی‌تری دارد ($t_{1/2}$ از $8/5$ تا $15/7$) [7]. محصول افزایشی سوپراکسید BMPO با $a_N = 1/34$ mT و $a_H = 1/18$ mT منطبق است [8] [9].

1 - Degenerate
2 - Non- degenerate
3 - Hyperfine splitting
4 - Decay

۴-۲-۴ تله TPC

تله TPC حساسیت و گستره دینامیکی مناسبی برای آشکارسازی تشکیل اکسیژن منفرد دارد [10]. طیف محصول افزایشی اکسیژن منفرد-TPC، سیگنال سه تایی با شدت سیگنال ۱:۱:۱ نشان می‌دهد [11]. محصول افزایشی TPC/O_2^1 یک شکاف فوق‌ظریف $a_{N=0}/172 \text{ mT}$ دارد [12].

یادآوری ۱- ثوابت جفت‌شدگی فوق‌ظریف هسته‌های مغناطیسی $a =$ شکاف فوق‌ظریف طیف، a_i که در آن i نوع هسته‌ها، به‌طور مثال $^1H, ^{13}C, ^{14}N$ و الگوی یک طیف ESR شامل اطلاعاتی درباره ساختار و هندسه چنین رادیکال‌هایی هستند.

یادآوری ۲- پهنای خط طیفی، مشخصه شرایط تشدید جذب بسامد- انرژی است [13].

۴-۳ کنترل مثبت برای تولید رادیکال‌های آزاد

واکنش فنتون، سامانه هیپوزانتین- زانتین اکسیداز (HX-XO) و حساسیت به نور رز بنگال سامانه‌هایی به خوبی مشخصه‌یابی شده‌ای هستند که می‌توانند به ترتیب رادیکال هیدروکسیل، آنیون‌های سوپراکسید و اکسیژن منفرد تولید کنند. این سامانه‌ها، مناسب بودن عامل‌های به‌تله‌اندازی اسپینی را نشان می‌دهند که منجر به الگوهای سیگنال ESR تکرارپذیر متعلق به محصولات افزایشی اسپینی می‌شوند؛ مانند نسبت شدت و شکاف فوق‌ظریف.

۴-۳-۱ واکنش فنتون [14]

یون‌های فلز واسطه می‌توانند H_2O_2 را فعال سازند تا رادیکال‌های هیدروکسیلی که اکسندنده‌های قوی هستند را شکل دهند. این سامانه واکنش فنتون نامیده می‌شود. آهن (II) (یون فروس^۱) به‌وسیله هیدروژن پراکسید اکسیده می‌شود تا آهن (III) (یون فریک^۲)، یک رادیکال هیدروکسیل و آنیون هیدروکسیل (واکنش ۱) تولید شود. رادیکال هیدروکسیل تولیدشده در واکنش فنتون ممکن است توسط DMPO به تله افتد تا محصول افزایشی اسپینی، DMPO/OH حاصل شود (واکنش ۲).



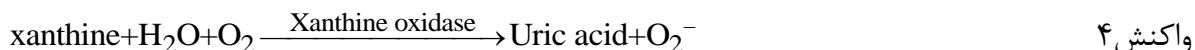
۴-۳-۲ سامانه هیپوزانتین- زانتین اکسیداز [15]

سامانه هیپوزانتین- زانتین اکسیداز، (HX-XO) سامانه‌ای است که به خوبی مشخصه‌یابی شده‌است که می‌تواند آنیون‌های سوپراکسید را تولید کند (واکنش ۳ و واکنش ۴). آنیون سوپراکسید می‌تواند به‌وسیله BMPO به تله افتاده و محصول افزایشی اسپینی BMPO/OOH را تشکیل دهد (واکنش ۵).



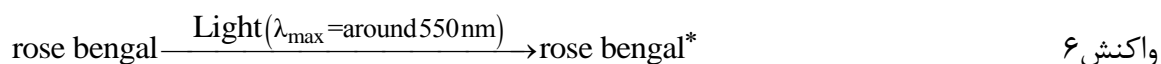
1- Ferrous ion

2- Ferric ion



۳-۳-۴ حساسیت به نور رز بنگال [16] [17]

رز بنگال به عنوان حساس کننده نوری برای تولید اکسیژن منفرد شناخته می شود. هنگام برانگیختگی نوری، رز بنگال انرژی خود را به اکسیژن مولد اکسیژن منفرد منتقل می کند (واکنش ۶ و واکنش ۷). سپس TPC با به تله انداختن اکسیژن منفرد می تواند تشکیل محصول افزایشی $\text{TPC}/^1\text{O}_2$ را بدهد (واکنش ۸).



۵ واکنشگرها

صرفاً از واکنشگرهای با درجه تجزیه ای^۱ شناسایی شده و فقط از آب مقطر یا آب با خلوص معادل استفاده کنید.

۱-۵ عامل اسپین-تله

به عنوان مثال، DMPO، BMPO و TPC.

۲-۵ واکنشگرهای کنترل مثبت

برای نمونه، H_2O_2 ، FeSO_4 ، بافر فسفات (pH ۷/۴)، اسید دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید (DTPA) یا رزین تبادل یون چنگالنده^۲، هیپوزانتین، زانتین اکسیداز، رز بنگال.

۳-۵ آب یون زدایی شده ($18.2 \text{ M}\Omega$ در 25°C)

۴-۵ نمونه استاندارد برای محاسبه اسپینی

به عنوان مثال، TEMPOL.

1 - Analytical grade

2 - Chelating ion

۶ دستگاه‌ها

دستگاه آزمایشگاهی معمولی مورد نیاز است، به‌ویژه، موارد زیر:

۶-۱ ترازوی آزمایشگاهی.

۶-۲ لوله سانتی‌فیوژ ۱/۵ میلی لیتر.

۶-۳ پیپت‌ها، با حجم $10 \mu\text{l}$ تا $1000 \mu\text{l}$.

۶-۴ سوزن‌های پیپت^۱، برای حجم $10 \mu\text{l}$ تا $1000 \mu\text{l}$.

۶-۵ هم‌زن گردابه‌ای.

۶-۶ سانتی‌فیوژ، برای لوله سانتی‌فیوژ 1.5 ml .

۶-۷ سل نمونه (سل نمونه مسطح یا لوله نمونه شبه‌مویین نازک)، برای نمونه‌های محلول‌های آبی؛ متشکل از کوارتز (سیلیکون دی‌اکسید خالص، SiO_2).

۶-۸ منبع نوری، λ_{max} حدود 550 nm .

۶-۹ طیف‌سنج تشدید اسپین الکترون، ESR.

۷ نمونه‌برداری

۷-۱ آماده‌سازی آزمایش (تعلیق نانوماده اکسید فلز)

نانوماده اکسید فلز به‌صورت تازه در آب یون‌زدایی‌شده آماده شده و فوراً در یک هم‌زن گردابه‌ای یا با پیپت کردن^۲ هم‌زده می‌شود. تقریباً $500 \mu\text{l}$ برای هر نمونه لازم است. با هم‌زدن گردابه‌ای یا کشیدن ماده به‌وسیله پیپت کردن به خوبی مخلوط شود. سونیک کردن^۳ نباید انجام شود زیرا در طی فرآیند سونیک کردن رادیکال‌ها می‌تواند تولید شوند [18]. به زیربند ۸-۱ و استاندارد OECD [19] مراجعه شود.

انواع و مقادیر گونه اکسیژن واکنشگر ROS تولیدشده از نانومواد بر اساس نوع ماده می‌تواند تغییر کند. توصیه می‌شود غلظت نمونه نانومواد به‌صورت تجربی تعیین شود. مقادیر گونه اکسیژن واکنشگر، ROS، تولیدی از نانومواد با غلظت یکسان بر اساس نوع گونه اکسیژن واکنشگر مقایسه شود. به زیربند ۹-۳-۹ مراجعه شود.

1 - Pipette tips
2- Pipetting
3- Sonicate

۲-۷ آماده‌سازی محلول برای تولید رادیکال هیدروکسیل

۱-۲-۷ محلول FeSO_4

برای ساخت محلول با غلظت 0.1 mM FeSO_4 را در آب یون‌زدایی شده رقیق کنید. برای هر نمونه دقیقاً $50 \mu\text{l}$ مورد نیاز است. فقط از محلول FeSO_4 که به تازگی آماده شده‌است، استفاده شود.

۲-۲-۷ محلول H_2O_2

برای ساخت محلول با غلظت 0.1 mM H_2O_2 را در آب یون‌زدایی شده رقیق کنید. برای هر نمونه دقیقاً $50 \mu\text{l}$ مورد نیاز است. توصیه می‌شود از محلول‌های H_2O_2 که به تازگی آماده شده‌است، استفاده شود.

۳-۷ آماده‌سازی محلول برای تولید رادیکال آنیون سوپراکسید

۱-۳-۷ بافر فسفات

محلول بافر فسفات (100 mM ، $\text{pH } 7.4$) را در آب یون‌زدایی شده که یون‌های فلزات واسطه از آن خارج شده‌است، آماده کنید. برای هر نمونه دقیقاً $70 \mu\text{l}$ مورد نیاز است. برای خارج نمودن یون‌های فلزات واسطه، به یادآوری ۱ یا یادآوری ۲ مراجعه شود.

یادآوری ۱- ترکیب DTPA برای حذف اکسایش ناخواسته (که ممکن است وجود داشته باشد) به وسیله مقادیر کم یون‌های فلزی آلوده استفاده می‌شود.

یادآوری ۲- رزین‌های تبادل یون چنگالنده، تبادل‌گرها یا چنگالنده‌هایی خاص هستند. یک محلول بافر فسفات را با استفاده از رزین تبادل یونی چنگالنده تهیه کنید [21] [22].

۲-۳-۷ محلول هیپوزانتین

هیپوزانتین را بافر فسفات 100 mM حل کنید تا غلظت $0.125 \mu\text{M}$ حاصل شود. برای هر نمونه دقیقاً $100 \mu\text{l}$ لازم است.

۳-۳-۷ محلول زانتین اکسیداز

زانتین اکسیداز را در بافر فسفات 100 mM حل کنید تا غلظت 0.125 ml واحد حاصل شود. دقیقاً $10 \mu\text{l}$ برای هر نمونه لازم است. توصیه می‌شود محلول‌های زانتین اکسیداز که به تازگی تهیه شده‌اند، استفاده شده و در دمای 2°C تا 8°C نگهداری شود.

۴-۷ آماده‌سازی محلول برای تولید اکسیژن منفرد

رز بنگال را در آب یون‌زدایی شده حل کنید تا غلظت $100 \mu\text{M}$ حاصل شود. دقیقاً $50 \mu\text{l}$ برای هر نمونه مورد نیاز است. از قرار گرفتن در مقابل نور حفظ شود.

۷-۵ آماده‌سازی عامل به تله‌اندازی اسپینی

۷-۵-۱ کلیات

عوامل به‌تله‌اندازی اسپینی شامل ناخالصی‌های پارامغناطیسی هستند که سبب پس‌زمینه‌های زیاد و سیگنال‌های نوفه‌ای می‌شوند. از عوامل به تله‌اندازی اسپینی با خلوص بسیار زیاد استفاده شود و آزمایش کنترلی انجام شود که در آن همه عوامل به تله‌اندازی اسپینی نانومواد حذف شده باشد تا سیگنال ESR تولید شود. عوامل به تله‌اندازی اسپینی با سیگنال‌های نوفه‌ای نیازمند فرآیند پیش‌خالص‌سازی همچون زغال چوب فعال شده هستند.

۷-۵-۲ محلول پایه^۱ DMPO

ترکیب DMPO را در آب یون‌زدایی شده حل کنید تا غلظت ۵۰۰ mM حاصل شود. برای هر نمونه دقیقاً ۱۰۰ μl مورد نیاز است. از DMPO با خلوص بسیار بالا ($\geq 99\%$) استفاده کنید. در دمای 20°C نگهداری و از نور و رطوبت محافظت کنید.

۷-۵-۳ محلول پایه BMPO

ترکیب BMPO را در آب یون‌زدایی شده حل کنید تا غلظت ۵۰۰ mM حاصل شود. برای هر نمونه دقیقاً ۱۰۰ μl مورد نیاز است. از BMPO با خلوص بسیار بالا ($\geq 99\%$) استفاده کنید. در دمای 20°C نگهداری و از نور و رطوبت محافظت کنید.

۷-۵-۴ محلول پایه TPC

ترکیب TPC را در آب یون‌زدایی شده حل کنید تا محلول ۴۰۰ mM حاصل شود. برای هر نمونه دقیقاً ۲۰ μl مورد نیاز است. از TPC با خلوص بسیار بالا ($\geq 99\%$) استفاده کنید.

۷-۶ واکنش آزمایش و عامل به تله‌اندازی اسپینی

۷-۶-۱ کلیات

آزمایه و عامل به تله‌اندازی اسپینی را با هم‌زدن گردابه‌ای یا توسط پیپت کردن مخلوط کنید. سونیک نکنید زیرا سونیک کردن می‌تواند سبب تولید رادیکال‌ها شود [18]. به زیربند ۸-۱ مراجعه شود. نمونه‌برداری را در معرض نور انجام ندهید. رادیکال‌ها می‌توانند توسط نور تولید شوند [23]. یک واکنش مبنا صفر با تمام واکنشگرهای به تله‌اندازی اسپینی انجام شود. غلظت نهایی واکنشگر را طبق آنچه در جدول ۱ ارائه شده است، به کار برید.

1 - Stock solution

جدول ۱- غلظت نهایی واکنشگر

غلظت نهایی	
۵۰۰ mM	DMPO
۱۰ μM	FeSO ₄
۱۰۰ μM	H ₂ O ₂
۵۰۰ mM	BMPO
۶۲٫۵ μM	هیپوزانتین
۶۲٫۵ $\frac{\mu\text{U}}{\text{ml}}$	زانتین اکسیداز
۱۰ mM	TPC
۲۵ μM	رز بنگال
۱۰ mM × ۱۰ ^{-۳} mM	TEMPOL

۲-۶-۷ واکنش DMPO

مقدار ۵۰ μl از محلول پایه ۵۰۰ mM DMPO را به ۴۵۰ μl از محلول نانوماده اکسید فلزی اضافه کرده و با هم زدن گردابه‌ای یا کشیدن توسط پیپت خوب مخلوط کنید.

۳-۶-۷ واکنش BMPO

مقدار ۵۰ μl از محلول پایه ۵۰۰ mM BMPO را به ۴۵۰ μl از محلول نانوماده اکسید فلزی اضافه کرده و با هم زدن گردابه‌ای یا پیپت کردن خوب مخلوط کنید.

۴-۶-۷ واکنش TPC

مقدار ۵۰ μl از محلول پایه ۴۰ mM TPC را به ۴۵۰ μl از محلول نانوماده اکسید فلزی اضافه کرده و با هم زدن گردابه‌ای یا پیپت کردن خوب مخلوط کنید.

۷-۷ واکنش کنترل مثبت و عامل به تله اندازی اسپینی

۱-۷-۷ تشکیل محصول افزایشی رادیکال DMPO (DMPO/OH)

۱-۷-۷-۱ مقدار ۱۴۰ μl آب یون زدایی شده را به میکرولوله^۱ اضافه کنید.

۷-۷-۱-۲ مقدار ۲۰ μl از محلول پایه ۵۰۰ mM DMPO به ۲۰ μl از ۰٫۰۱ mM FeSO_4 اضافه کنید.

۷-۷-۱-۳ واکنش را با ۲۰ μl از ۰٫۱ mM H_2O_2 شروع کنید.

۷-۷-۲ تشکیل محصول افزایشی رادیکال (BMPO/OOH)

۷-۷-۲-۱ مقدار ۷۰ μl از بافر فسفات ۱۰۰ mM (pH ۷٫۴) حاوی ۲۵ μM DTPA به یک میکرولوله اضافه کنید.

۷-۷-۲-۲ مقدار ۲۰ μl از محلول پایه ۵۰۰ mM BMPO و ۱۰۰ μl از محلول پایه هیپوزانتین ۰٫۱۲۵ mM اضافه کنید.

۷-۷-۲-۳ واکنش را با ۱۰ μl زانتین اکسیداز $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$ ۰٫۱۲۵ شروع کنید.

۷-۷-۳ تشکیل محصول افزایشی TPC ($\text{TPC}/^1\text{O}_2$)

۷-۷-۳-۱ مقدار ۱۰۰ μl آب یونزدایی شده را به صفحات کشت ۹۶ چاهک^۱ اضافه کنید.

۷-۷-۳-۲ مقدار ۵۰ μl از محلول پایه ۴۰ mM TPC را به ۵۰ μl از رز بنگال ۱۰۰ μM اضافه کنید. هرچند زمان تابش دهی به منبع نور و فاصله بین نمونه و منبع نور وابسته است، اثبات شده است که زمان تابش دهی ۱۰ دقیقه در بسیاری از موارد کافی است. بنابراین، توصیه می شود زمان تابش دهی بهینه به صورت آزمایشگاهی تعیین شود.

۷-۷-۳-۳ پس از تابش دهی، صفحه ها تا زمان اندازه گیری در اتاق تاریک و در دمای اتاق نگهداری شوند، اما زمان بین تابش دهی و گرفتن طیف تشدید اسپین الکترونی خیلی کوتاه باشد.

۷-۸ آماده سازی نمونه استاندارد برای محاسبه اسپین

ماده TEMPOL را در محلول بنزن حل کنید تا غلظت $10^{-3} \text{ mM} \times 10^{-3} \text{ mM}$ حاصل شود. دقیقاً ۵۰۰ μl مورد نیاز است.

یادآوری ۱- ماده TEMPOL در هر مولکول یک رادیکال نیتروکسید پایدار دارد. بنابراین، رادیکال TEMPOL می تواند به عنوان جستجوگر اسپین مناسب یا نمونه استاندارد استفاده شود.

یادآوری ۲- در $10^{-3} \text{ mM} \times 10^{-3} \text{ mM}$ TEMPOL، تعداد رادیکال برابر با $10^{-4} \text{ sp} \times 370$ است [24].

۸ تداخل‌ها

۸-۱ نمونه‌برداری

اگر نانومواد رسانا باشند، افت توان ریزموج حاصل می‌شود. برای جلوگیری از این موضوع، گزینه اول اندازه‌گیری در دمای بسیار پایین (۴ K) است تا رسانندگی نمونه کاهش یابد. در صورت استفاده از این روش، کمترین دمای ممکن سل نمونه را برای محلول‌های آبی بررسی کنید. گزینه دوم استفاده از روش‌های سانتریفیوژ نمودن یا صافش برای حذف نانومواد پس از واکنش با عامل به تله‌اندازی اسپینی است. اندازه روزنه صافی و شرایط سانتریفیوژ با اندازه و قابلیت پراکنش^۱ نانومواد تعیین شود. گزینه سوم روش تفریقی برای خارج کردن سیگنال ESR نامناسب نمونه‌ها با عملیات ریاضی است [25].

برای بازبینی ROS تولید شده از خود نانومواد، با سونیک کردن نانومواد را پراکنده نکنید زیرا با سونیک کردن رادیکال‌ها تولید می‌شوند [18]. در بسیاری از آزمون‌های سمیت یاخته‌ای، روش سونیک کردن برای پراکنش نانومواد به‌طور گسترده استفاده می‌شود. بنابراین لازم است که شدت‌های سیگنال ESR قبل و بعد از پراکنش فراصوتی نانومواد بازبینی شود. رادیکال‌ها می‌توانند به‌وسیله نور تولید شوند بنابراین حین نمونه‌برداری از نور محافظت شود [23] [26] [27].

یادآوری ۱- صافش، عملیاتی فیزیکی برای جدا نمودن نانومواد از مایعات با قرار دادن غشایی است که از میان آن فقط مایع می‌تواند بگذرد. پس از صافش برای نمونه‌برداری ESR از این صافیده^۲ استفاده کنید.

یادآوری ۲- سانتریفیوژها برای ایزوله کردن و جداسازی تعلیق نانومواد استفاده می‌شوند. برای نمونه‌برداری ESR پس از سانتریفیوژ کردن از این رومانده^۳ استفاده کنید.

یادآوری ۳- تفریق، عملیاتی ریاضی است که عملیات خارج نمودن سیگنال ESR نمونه‌ها را از سیگنال ESR آن‌ها پس از واکنش با عامل به‌تله‌اندازی اسپینی ارایه می‌دهد.

۸-۲ زمان نمونه‌برداری

تولید ROS فرآیندی پویا است که در آن میزان و انواع گونه ROS شکل‌گرفته معمولاً وابسته به زمان هستند. نیم‌عمر محصول افزایشی اسپین متغیر است. بنابراین، ضروری است که فوراً و در چند زمان پس از نمونه‌برداری اندازه‌گیری شود. توصیه می‌شود زمان بهینه برای شروع اندازه‌گیری‌های ESR پس از نمونه‌برداری به‌طور تجربی تعیین شود.

1- Dispersability
2- Filtrate
3 - Supernatant

۹ روش کار

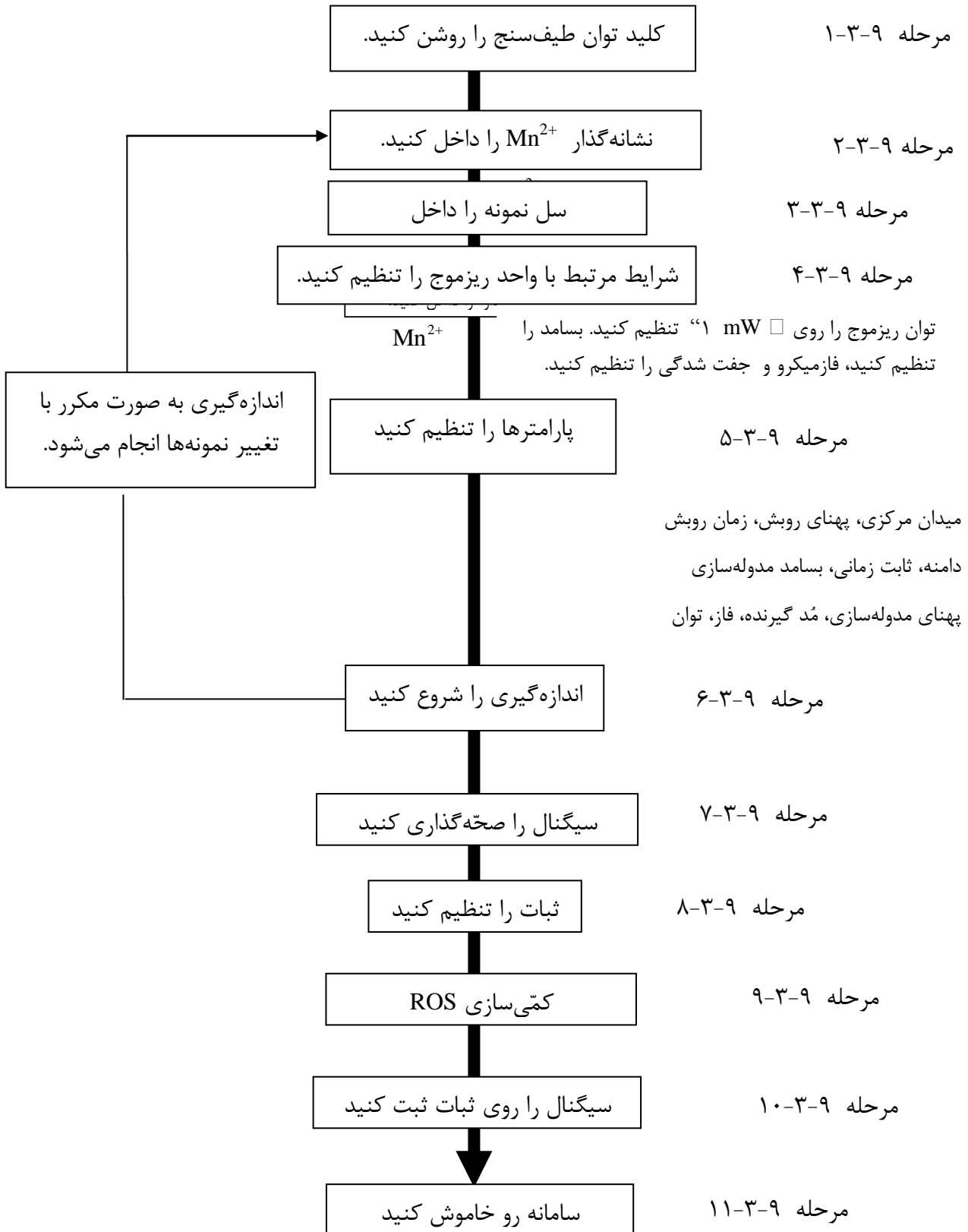
۹-۱ کلیات

حساسیت روش به عوامل دستگاهی گوناگون همچون محفظه^۱، نگهدارنده سل نمونه، پارامتر و غیره مرتبط است و دستگاه‌های مختلف می‌توانند تنظیمات متفاوتی داشته باشند. جدول ۲ مثال‌هایی از تنظیمات با پارامترهای ESR برای اندازه‌گیری‌ها را فراهم نموده‌است.

آن‌مراحلی که مربوط به طیف‌سنج ESR است با رجوع به دستورالعمل‌های عملیاتی برای طیف‌سنج ESR که مورد استفاده قرار گرفته‌اند، به بهترین صورت ارائه شده‌اند. شکل ۱ نمودار جریان کار (فلوچارت) اندازه‌گیری‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۲- تنظیمات پارامترهای طیف‌سنج ESR برای اندازه‌گیری رادیکال هیدروکسیل، رادیکال یون منفی سوپراکسید و اکسیژن منفرد

پارامترهای میدان مغناطیسی	پارامترهای ریزموج	پارامترهای کانال سیگنال
میدان مرکزی	بسامد	بسامد مدوله‌سازی
۳۲۰ mT - ۳۴۰ mT	۹ GHz - ۱۰ GHz	۱۰۰ KHz
پهنای روبش	توان	پهنای مدوله‌سازی
±۵ mT - ±۱۰ mT	۱۰ mW - ۴۰ mW	۰٫۲۵ mT - ۰٫۴ mT
زمان روبش	-	دامنه
۵ دقیقه - ۱ دقیقه	-	۵۰ - ۳۰۰
-	-	ثابت زمانی
-	-	۰٫۳ s - ۰٫۵ s
-	-	مد R
-	-	اول
-	-	فاز
-	-	۰°



شکل ۱- مثالی از مراحل مورد نیاز برای به‌دست آوردن طیف ESR

۲-۹ تزریق نمونه

نمونه را با استفاده از عمل مویینگی یا تزریق با استفاده از خورانه (انژکتور^۱)، به داخل سل نمونه بکشید. از ایجاد حباب‌ها در طی فرآیند تزریق نمونه اجتناب شود.

پس از اتمام اندازه‌گیری، با چرخاندن پیچ بر روی آداپتور گاززدا، سل را از هر باقی‌مانده‌ای تخلیه کرده و آن را با آب یون‌زدایی شده، شستشو دهید. گاززدایی و پاکسازی را چندین بار تکرار کنید. اگر مقداری آب در سل باقی بماند، سل را به صورت عمودی نگه داشته و آب داخل را با استفاده از کاغذ خشک کن در دهانه سل نمونه یا با لرزاندن ظرف خارج کنید سپس با استفاده از مکش، یک نمونه جدید را قرار دهید.

پس از واکنش‌های کنترل مثبت و واکنش‌های نمونه، اگر برخی از نمونه‌ها شامل یون‌های فلزی و نانومواد در سل باقی ماندند، توصیه می‌شود به طور کامل با آب اسیدی (محلول هیدروکلریک اسید یا نیتریک اسید ۱٪ تا ۳۰٪) و آب یون‌زدایی شده به ترتیب بیان شده، شستشو شوند.

۳-۹ اندازه‌گیری ESR

۱-۳-۹ کلید طیف‌سنج را روشن کنید.

اجازه دهید آب خنک‌سازی جریان یابد.

اشیای فلزی را در اطراف دستگاه قرار ندهید.

۲-۳-۹ نشانه‌گذار Mn^{2+} را وارد کنید.

نشانه‌گذار Mn^{2+} در داخل محفظه قرار می‌گیرد.

یادآوری ۱- نشانه‌گذار ESR تضمین می‌کند که نتایج اندازه‌گیری می‌تواند به مقادیر مرجع مربوط باشد. علاوه بر این، از آن‌ها اغلب برای تعیین عدم قطعیت اندازه‌گیری و برای کالیبراسیون استفاده می‌شوند.

یادآوری ۲- طیف ESR ماده Mn^{2+} شامل شش خط بوده و بازه بین سومین (عامل g برابر ۲٫۰۳۴) و چهارمین خط (عامل g برابر ۱٫۹۸۱) $0.1 \text{ mT} \pm 8.69 \text{ mT}$ است [28]. بازه‌های بین سیگنال‌های دیگری به جز این دو، برای کالیبراسیون محور افقی (پهنای روبشی) را نمی‌توان استفاده کرد، زیرا آن‌ها طبق بسامد استفاده شده، تغییر می‌کنند.

۳-۳-۹ سل نمونه را وارد کنید.

۱-۳-۳-۹ گرد و غبار، رطوبت و سایر آلاینده‌ها را از دیواره سل نمونه پاک کنید.

۲-۳-۳-۹ توان ریزموج را بر روی صفر میلی‌وات تنظیم کنید.

۳-۳-۳-۹ سل نمونه را به درستی در مسیر قرارگیری در محفظه تشدیدگر قرار دهید. توصیه می‌شود هر بار سل نمونه در موقعیت یکسانی در محفظه قرار گیرد. نوع محفظه می‌تواند تفاوت زیادی در میزان

حساسیت ایجاد کند. محفظه‌ها با عامل کیفیتشان (عامل Q)^۱ مشخصه‌یابی می‌شوند، که نشان می‌دهد چگونه محفظه انرژی ریزموج را به‌طور موثر ذخیره می‌کند. با افزایش عامل Q، میزان حساسیت طیف‌سنج افزایش می‌یابد. آب در حالت مایع تابش ریزموج مورد استفاده برای اندازه‌گیری طیف ESR را به شدت جذب می‌کند. اگر محلول‌های آبی مورد آزمون قرار گیرند، توصیه می‌شود نمونه در یک سل تخت کوارتز به همراه قسمت نازکی از سل به صورت موازی با جهت میدان الکتریکی در محفظه قرار گیرد (معمولاً به صورت موازی با جهت میدان مغناطیسی).

اطمینان حاصل کنید که نمونه به درستی در محفظه قرار گرفته‌است. توصیه می‌شود نمونه در مرکز محفظه قرار گیرد.

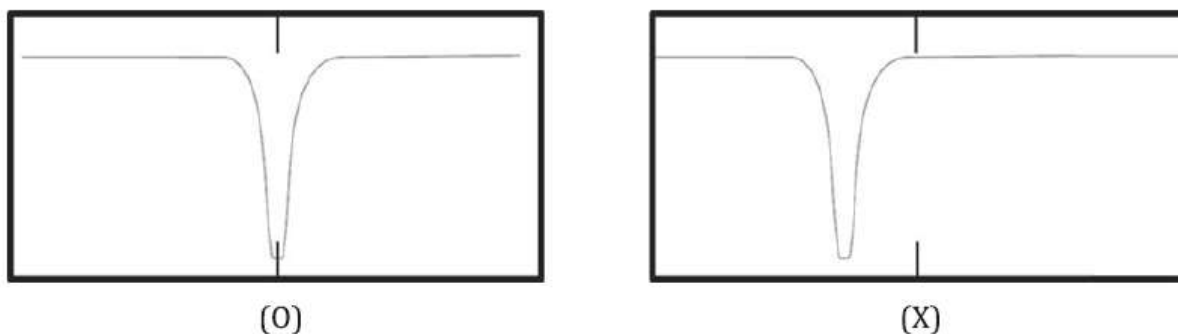
اطمینان حاصل کنید که قدرت ریزموج هر بار که نمونه‌ها را قرار داده یا خارج می‌کنید، روی صفر میلی‌وات تنظیم شده باشد.

۴-۳-۹ شرایط مربوط به واحد ریزموج را تنظیم کنید.

۱-۴-۳-۹ قدرت ریزموج را تا یک میلی‌وات تنظیم کنید.

۲-۴-۳-۹ بسامد را تنظیم کنید.

بسامد، نشان‌دهنده بسامد نوسان ریزموج است. بسامد را طوری تنظیم کنید تا فرورفتگی تشدید در مرکز قرار گیرد. شکل ۲ را مشاهده کنید.

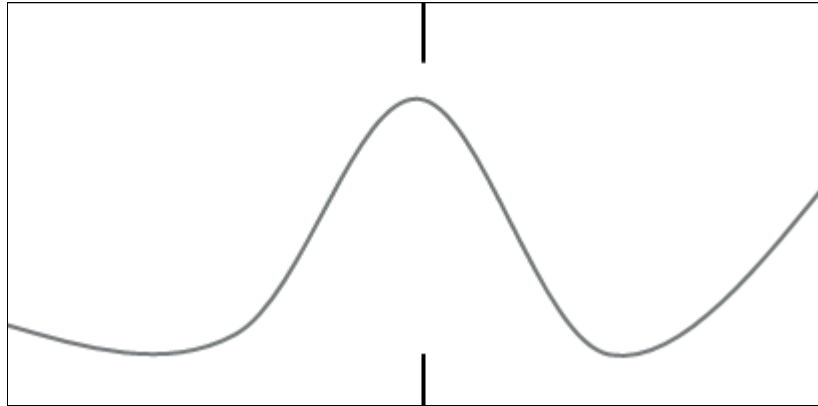


شکل ۲- تنظیم بسامد

۳-۴-۳-۹ فاز میکرو را تنظیم کنید.

فاز میکرو بیانگر فاز ریزموج است. مقدار فاز ریزموج واحد ندارد. اگر فرورفتگی تشدید مانند شکل ۳ تغییر شکل داده باشد، فاز میکرو را طوری تنظیم کنید که شکل فرورفتگی همانند آنچه که در شکل ۲ (o) نشانه‌گذاری شده‌است، تغییر یابد.

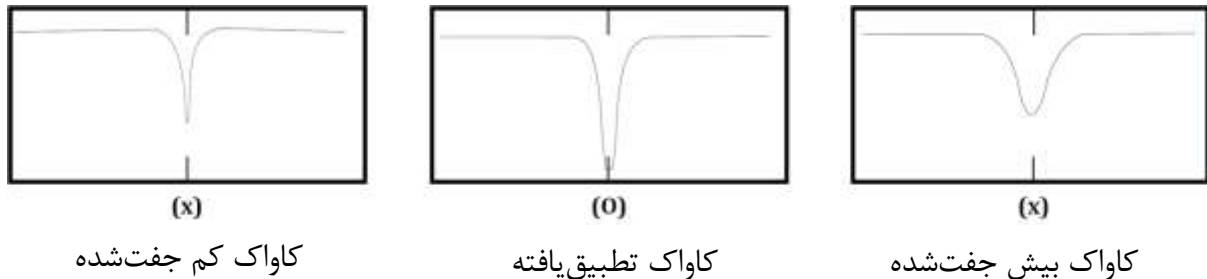
1 - Q factor



شکل ۳- تغییر شکل فرورفتگی تشدید

۹-۳-۴- جفت شدگی را تنظیم کنید

این مهم‌ترین مرحله در دستیابی به طیف با کیفیت (بالا) EPR است. در اغلب موارد، تنظیم خودکار^۱ به خوبی کار خواهد کرد، اما برای بعضی از موارد، محفظه به صورت دستی تنظیم می‌شود. شکل ۴ را مشاهده کنید.



شکل ۴ - تنظیم درجه جفت شدگی (بدون واحد)

یادآوری - یک کاواک بیش جفت شده^۲ دارای عامل Q پایین‌تری خواهد بود که به حساسیت کمتر آن منتج می‌شود. این تاثیرات زمانی دیده می‌شوند که محلول‌های آبی یا نمونه‌های رسانا استفاده شوند. اگر رهنبدی (امپدانس^۳) کاواک و موج‌بر با یکدیگر منطبق نباشند، توان ریزموج عبوری در موج‌بر به‌طور جزئی بازتاب می‌شود. کل توان وارد محفظه نمی‌شود. امپدانس محفظه به‌وسیله جفت‌کننده^۴ با موج‌بر منطبق می‌شود.

- 1 - Auto- tune
- 2 - Overcoupled cavity
- 3 - Impedance
- 4 - Coupler

۵-۳-۹ پارامترها را تنظیم کنید.

به جدول ۲ مراجعه شود.

۱-۵-۳-۹ میدان مرکزی: ۳۲۰ mT تا ۳۴۰/۰۰ mT.

به مرکز میدان مغناطیسی به اختصار میدان مرکزی گفته می‌شود.

یادآوری - یک رهنمون در مشاهده محدوده میدان مغناطیسی، ۵ تا ۱۰ برابر پهنای خط سیگنال است، اگرچه این با شکل خطوط تغییر می‌کند (لورنتسی، گاوسی).

۲-۵-۳-۹ پهنای روبش (\pm): ۵ mT تا ۱۰ mT

پهنای روبش بیانگر پهنای روبشی میدان مغناطیسی است. در محدوده بین ۰/۰۰۱ و ۷۵۰ متغیر بوده، اگر چه به وسیله میدان مغناطیسی مرکزی پهنای روبش محدود می‌شود.

۳-۵-۳-۹ زمان روبش: ۱ دقیقه تا ۵ دقیقه

در محدوده ۰/۱ ثانیه تا ۱۲۰ دقیقه متغیر است. هنگامی که زمان روبش بین ۲۰ ثانیه تا ۱۲۰ دقیقه قرار دارد، ثبات با حرکت خود، پهنای روبش را با شکل موج ESR که در نمودار رسم شده است، همزمان سازی می‌کند. زمانی که روبش سریع‌تر از ۱۰ ثانیه و یا کمتر باشد میله ثبات در مرکز ثابت می‌شود.

۴-۵-۳-۹ دامنه: ۵۰ تا ۳۰۰

دامنه نشان دهنده بهره تقویت کننده^۱ بوده که در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰۰ متغیر است.

بهترین نسبت سیگنال به نوفه (S/N) با یک تنظیم بهینه به دست می‌آید. تنظیم خیلی پایین منجر به نسبت سیگنال به نوفه بسیار پایین شده و با تنظیم بیش از حد بالا، طیفی به دست می‌آید که در آن قله و دره مشخص نیست.

۵-۵-۳-۹ ثابت زمانی: ۰/۰۳ تا ۰/۵ ثانیه

ثابت زمانی، مدت زمان پاسخ تقویت کننده^۲ در حال قفل را نشان می‌دهد. زمان پاسخ طولانی‌تر باعث کمتر شدن نوفه می‌شود ولی پاسخ خوبی تلقی نمی‌شود.

ثابت زمانی براساس این که به چه ظرفیتی بخش‌های سیگنال از هم جدا می‌شوند، تنظیم می‌شود و توصیه می‌شود به دقت انتخاب شود. توصیه می‌شود در هنگام مشاهده جداسازی فوق‌ظریف، زمان اندازه‌گیری به اندازه کافی کند شود، در غیر این صورت سیگنال پاسخ خوبی نخواهد داد و شکل موج تغییر (شکل) خواهد کرد. همچنین اگر ثابت زمانی روی مقادیر بالا تنظیم شود که برای حذف نوفه مؤثر است، پاسخ سیگنال کندتر خواهد بود و متعاقباً ثابت زمانی طولانی‌تر نیاز است. بنا بر آنچه ذکر شد، توصیه می‌شود، زمان روبش

1 - Amplifier

2 - Lock- in amplifier

که وابسته به شرایط و پیچیدگی سیگنال و ثابت زمانی است، در هر اندازه‌گیری به‌طور مجزا انتخاب شده و تنظیم شود.

۹-۳-۵-۶ فرکانس مدوله‌سازی: ۱۰۰ kHz

فرکانس مدوله‌سازی بیانگر فرکانس مدوله‌سازی میدان مغناطیسی است.

مدوله‌سازی میدان مغناطیسی برای دستگاه ESR به منظور مشاهده طیف ESR با حساسیت بالا ضروری است. شدت مدوله‌سازی میدان مغناطیسی به نسبت سیگنال به نوفه وابسته است و شدت سیگنال متناسب با افزایش در پهنای مدوله‌سازی افزایش می‌یابد، بنابراین حساسیت نیز افزایش می‌یابد.

۹-۳-۵-۷ پهنای مدوله‌سازی (یا دامنه مدوله‌سازی): ۰٫۴ mT تا ۰٫۲۵ mT

پهنای مدوله‌سازی، شدت مدوله‌سازی میدان مغناطیسی را نشان می‌دهد. در محدوده ۰٫۰۰۰۲ تا ۲ متغیر بوده، اگرچه با بسامد مدوله‌سازی محدود می‌شود.

یادآوری - اگر پهنای مدوله‌سازی بسیار زیاد باشد (بیشتر از پهنای سیگنال EPR) سیگنال EPR ای که آشکارسازی شده است عریض‌تر شده و از شکل طبیعی خارج می‌شود. هرچند پهنای مدوله‌سازی کم نیز می‌تواند منجر به نسبت سیگنال به نوفه ضعیف و غیر قابل قبول برای سیگنال شود [29-32].

۹-۳-۵-۸ مد (حالت کاری) گیرنده: اولین

مشتق اول معمولی طیف جذبی ارائه خواهد شد. اگر طیف دارای نسبت سیگنال/نوفه خیلی خوبی باشد و همچنین در برخی نواحی تفکیک‌پذیری مطلوب‌تری داشته باشد، مشتق دوم طیف حاصل، می‌تواند مفید باشد.

۹-۳-۵-۹ فاز: صفر درجه

فاز، بیانگر فاز (تنظیمات ریز و درشت) تقویت‌کننده قفل‌شده است. به‌طور معمول روی صفر درجه تنظیم می‌شود.

۹-۳-۵-۱۰ توان: ۱ mW تا ۴۰ mW

توان ریزموج را روی مقدار اندازه‌گیری تنظیم کنید.

توان خروجی ریزموج مورد نیاز برای اندازه‌گیری، متناسب با هر نمونه مورد اندازه‌گیری متغیر خواهد بود و تنظیم آن ضروری است. با مشاهده سیگنال ESR در حالی که توان خروجی ریزموج تغییر می‌کند، توان خروجی بهینه تعیین می‌شود. اگرچه شدت سیگنال متناسب با ریشه خروجی ریزموج تغییر می‌کند که در بعضی نمونه‌ها با افزایش خروجی ریزموج، اشباع شدت سیگنال و تغییر شکل موج مشاهده شده است. همواره خروجی ریزموج‌ها (توان) را برای نمونه‌هایی که اشباع شده‌اند و همچنین نمونه‌هایی که ناشناخته هستند (چه اشباع باشند یا نباشند)، از کمترین مقدار شروع نموده و طی چند مرحله تا بیشینه مقدار افزایش

می‌دهند، در حالی که همواره شدت سیگنال و تغییر شکل موج مورد بررسی قرار می‌گیرد. تنظیم توان حین آزمایش پایه انجام شده و برای آزمایش‌های بعدی از همان مقادیر استفاده می‌شود.

۶-۳-۹ اندازه‌گیری را شروع کنید.

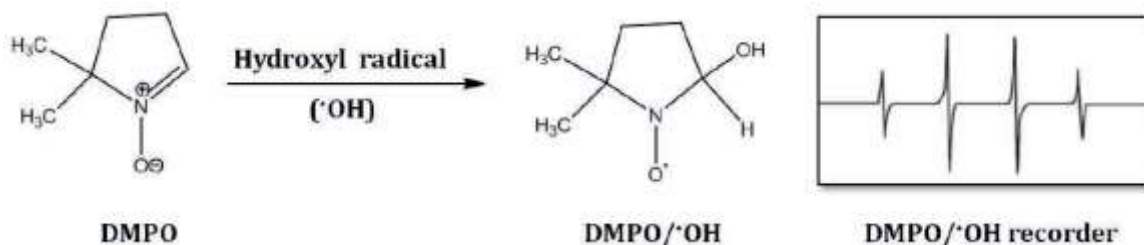
۷-۳-۹ سیگنال را صحه‌گذاری کنید.

اگر سیگنال در مرکز پرده واقع نشده باشد و یا کلاً روی پرده قرار نگرفته باشد، سیگنال را روی مرکز تنظیم کنید.

۸-۳-۹ ثبات را تنظیم کنید.

۱-۸-۳-۹ تشکیل DMPO/OH به وسیله رادیکال هیدروکسیل [33] [34].

به شکل ۵ مراجعه شود.



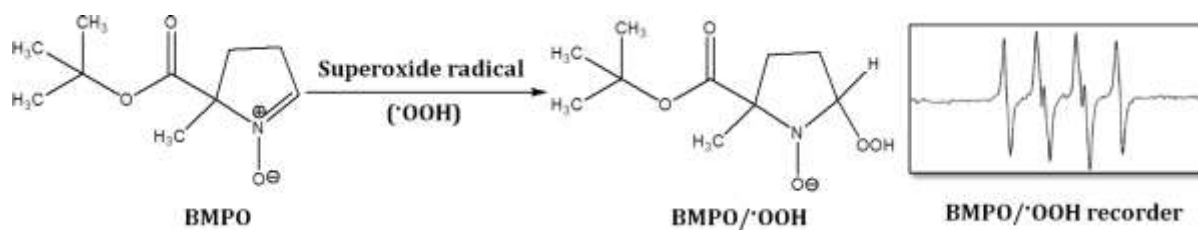
یادآوری ۱- سیگنال چهاربخشی با نسبت شدت ۱:۲:۲:۱

یادآوری ۲- در داخل آب یون‌زدایی شده $G = 15,0$ تا $G = 14,9$ $a_H = a_N$.

شکل ۵- تشکیل محصول افزایشی DMPO (DMPO/OH)

۲-۸-۳-۹ تشکیل BMPO/OOH به وسیله رادیکال آنیون سوپراکسید [9]، [35].

به شکل ۶ مراجعه شود.

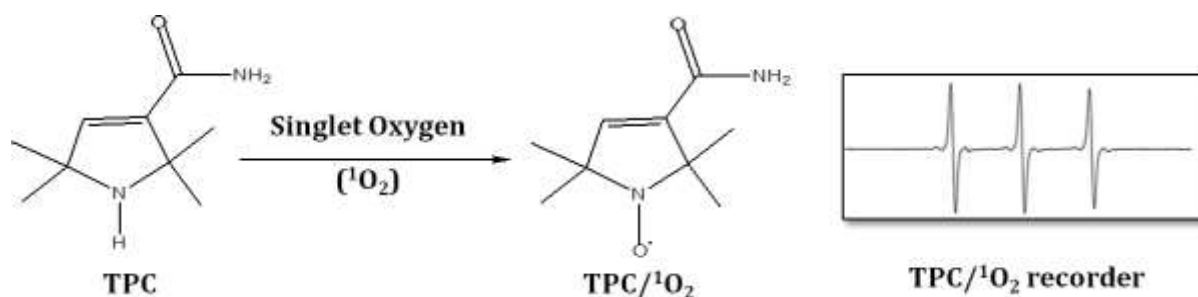


یادآوری - در بافر فسفات: $a_N = 13.4 \text{ G}$ و $a_H = 11.8 \text{ G}$.

شکل ۶ - تشکیل محصول افزایشی رادیکال BMPO (BMPO/•OOH)

۳-۸-۳-۹ تشکیل $\text{TPC}/^1\text{O}_2$ به وسیله اکسیژن منفرد [10].

به شکل ۷ مراجعه شود.

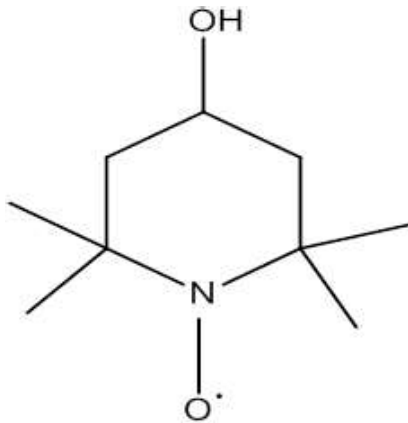


یادآوری - سیگنال سه گانه با نسبت شدت ۱:۱:۱

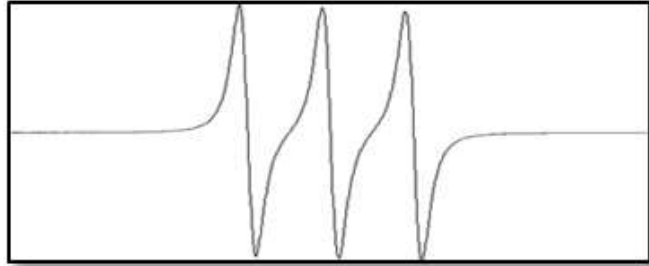
شکل ۷ - تشکیل محصولات افزایشی رادیکال TPC ($\text{TPC}/^1\text{O}_2$)

۳-۸-۴-۹ استاندارد TEMPOL [36]

به شکل ۸ مراجعه شود.



TEMPOL



TEMPOL recorder

یادآوری ۱- سیگنال سه‌گانه با نسبت شدت ۱:۱:۱

یادآوری ۲- در آب یون‌زدایی شده a_N برابر ۱۶٫۸ G.

شکل ۸ - استاندارد TEMPOL

۹-۳-۹ مقدار ROS را با استفاده از رابطه ۱ کمی‌سازی کنید.

$$X = (B/A) \times (D/C) \times (3.0 sp \times 10^{14} sp) \quad (1)$$

که در آن

A بیانگر مساحت قله جذب با یک نمونه استاندارد است $1.0 \text{ mM} \times 10^{-3} \text{ mM}$ TEMPOL.

B بیانگر مساحت قله جذب با یک نمونه آزمون است.

C بیانگر مساحت قله جذب نشانه‌گذار Mn^{2+} با یک نمونه استاندارد است.

D بیانگر مساحت قله جذب نشانه‌گذار Mn^{2+} با آزمایش است.

X بیانگر تعداد رادیکال آزمایش است.

Sp اسپین است.

غلظت‌های رادیکال آزمایش (نانومواد) به‌وسیله مقایسه با مساحت قله جذب نمونه‌ها با یک نمونه استاندارد (TEMPOL) تعیین می‌شود. تعداد رادیکال $3.0 \text{ sp} \times 10^{14} \text{ sp}$ در $1.0 \text{ mM} \times 10^{-3} \text{ mM}$ TEMPOL است. توصیه می‌شود نمونه استاندارد و آزمایش به ترتیب و در شرایطی مورد اندازه‌گیری قرار گیرند که پارامترهای طیف ESR (به جدول ۲ مراجعه شود) یکسان تنظیم شده باشند. کمی‌سازی‌ها با استفاده از مساحت قله جذب نشانه‌گذار Mn^{2+} و سیگنال با استفاده از انتگرال دوگانه طیف ESR تعیین و محاسبه می‌شود [38] [37]. تعداد رادیکال آزمایش می‌تواند به‌وسیله مقایسه با مساحت نسبی نمونه‌های استاندارد محاسبه شود.

یادآوری - روش ESR دارای حد آشکارسازی تقریباً $\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$ است (۱۰^{-۹} M) [39] [40].

۱۰-۳-۹ سیگنال را روی ثبات ثبت کنید.

۱۱-۳-۹ سیستم را خاموش کنید.

۱-۱۱-۳-۹ توان ریزموج را روی صفر میلی‌وات تنظیم کنید.

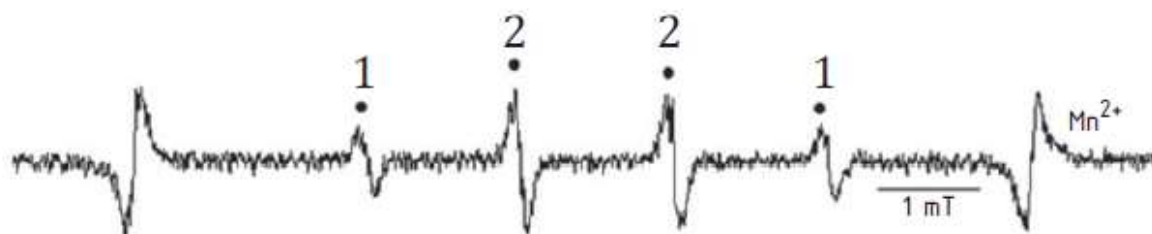
۲-۱۱-۳-۹ خروج را انتخاب کنید.

۳-۱۱-۳-۹ دکمه روشن و خاموش طیف‌سنج را خاموش کنید.

۱۰ مثال‌هایی از نتایج

DMPO/OH ۱-۱۰

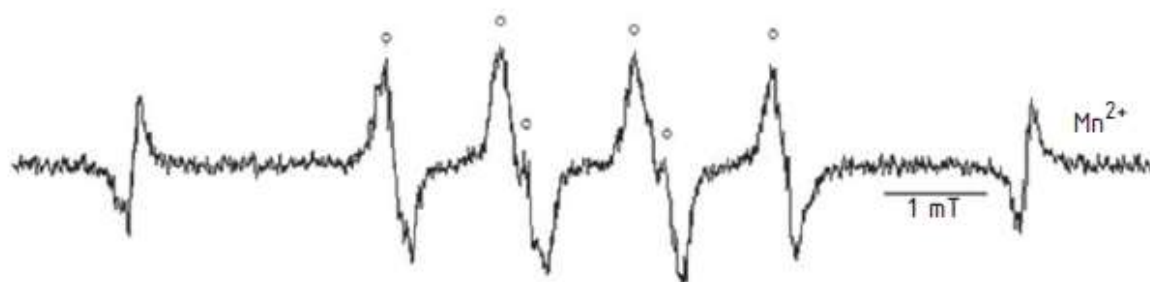
به شکل ۹ مراجعه شود.



شکل ۹- طیف ESR محصولات افزایشی رادیکال DMPO (DMPO/OH)

BMPO/OOH ۲-۱۰

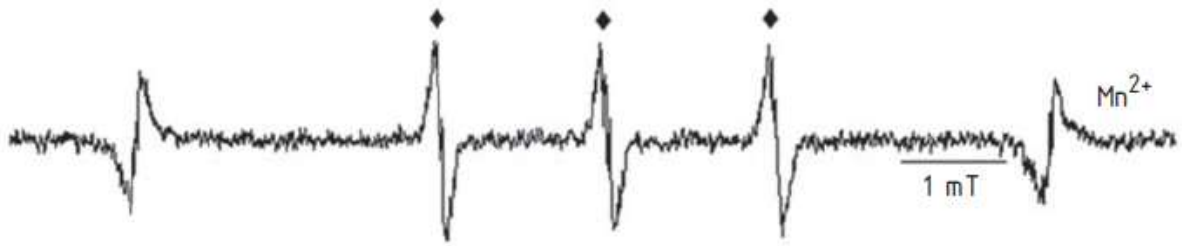
به شکل ۱۰ مراجعه شود.



شکل ۱۰- طیف ESR محصولات افزایشی رادیکال BMPO (BMPO/OOH)

TPC/¹O₂ ۳-۱۰

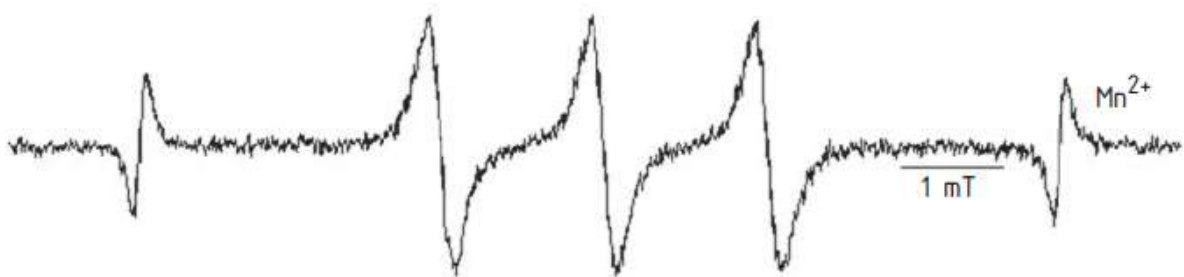
به شکل ۱۱ مراجعه شود.



شکل ۱۱- طیف ESR محصولات افزایشی رادیکال TPC (TPC/O_2)

۴-۱۰ TEMPOL

به شکل ۱۲ مراجعه شود.



شکل ۱۲- طیف ESR استاندارد TEMPOL

کتابنامه

- [1] Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* 2014, **22** (1) pp. 64–75
- [2] Isaksen I.S.A., & Dalsoren S.B. Getting a better estimate of an atmospheric radical. *Science.* 2011, **331** (6013) pp. 38–39
- [3] Hirota K., Sugimoto M., Kato M., Tsukagoshi K., Tanigawa T., Sugimoto H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. *Ceram. Int.* 2010, **36** pp. 497–506
- [4] ZAVOISKY E. Spin-magnetic resonance in paramagnetics. *J. Phys. USSR.* 1945, **9** pp.245
- [5] Li G.R., Hu T., Pan G.L., Yan T.Y., Gao X.P., Zhu H.Y. Morphology-function relationship of ZnO: polar planes, oxygen vacancies, and activity. *J. Phys. Chem. C.* 2008, **112** pp. 11859–11864
- [6] Zhao H.T., Joseph J., Zhang H., Karoui H., Kalyanaraman B. Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, **3** pp. 599–606
- [7] Hawkins C.L., & Davies M.J. Detection and characterization of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, **1840** pp. 708–721
- [8] Mitchell D.G., Rosen G.M., Tseitlin M., Symmes B., Eaton S.S., Eaton G.R. Use of rapid-scan EPR to improve detection sensitivity for spin-trapped radicals. *Biophys. J.* 2013, **105** pp. 338–342
- [9] Keszler A., Kalyanaraman B., Hogg N. Comparative investigation of superoxide trapping by cyclic nitron spin-traps: the use of singular value decomposition and multiple linear regression analysis. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, **35**(9):pp. 1149–1157
- [10] Nakamura K., Ishiyama K., Ikai H., Kanno T., Sasaki K., Niwano Y. Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011, **49** (2) pp. 87–95
- [11] Ishiyama K., Nakamura K., Ikai H., Kanno T., Kohno M., Sasaki K., Niwano Y. Bacterial Action of Photogenerated Singlet Oxygen from Photosensitizers Used in Plaque Disclosing Agents. *PLoS One.* 2012, **7** (5) p. e37871m
- [12] Mizukawa H., & Okabe E. Inhibition by singlet molecular oxygen of the vascular reactivity in rabbit mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 1997, **121** (1) pp. 63–70
- [13] Robit B., Bernd G., Martin S. Calculations of Isotropic Hyperfine Coupling Constants of Organic Radical. An Evaluation of Semiempirical, Hartree-Fock, and Density Functional Methods. *J. Phys. Chem.* 1996, **100** pp. 18371–18379
- [14] Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 2007, **79** (12) pp. 2325–2338
- [15] Okuno T., Kawai H., Hasegawa T., Ueno H., Nakamura K. Enhancement of hydroxyl radical formation from superoxide anion radical in the presence of organic selenium compounds. *J. Health Sci.* 2001, **47** (3) pp. 240–247
- [16] Allen M., Lynch M., Lagos A., Remond R., Kochevar I.E. A wavelength dependent mechanism for rose Bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991, **1075** pp. 42–49
- [17] Rozanowska M., Ciszewska J., Korytowski W., Sarna T. Rose-bengal photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1995, **29** pp. 71–77

- [18] Keisuke M., Magdi M.M., Peter R. Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions. Evidence for. OH and. H by spin trapping. J. Am. Chem. Soc. 1982, **104** (12) pp. 3537–3539
- [19] OECD. 2012. Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. (No. 36), Paris, France, pp. 93
- [20] Lynch S.M., & Frei B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human density lipoprotein. J. Lipid Res. 1993, **34** pp. 1745–1753
- [21] Singh R.J., Karoui J., Gunther M.R., Beckman J.S., Mason R.P., Kalyanaraman B. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familiar amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu, Zn superoxide dismutase mutants and H₂O₂. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998, **95** (12) pp. 6675–6680
- [22] Deterding L.J., Ramirez D.C., Dubin J.R., Mason R.P., Tomer K.B. Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidinyl radical. J. Biol. Chem. Mar 19; 2004, **279**(12):11600-7,
- [23] He W., Kim H.K., Wamer W.G., Melka D., Callahan J.H., Yin J.J. Photogenerated charge carriers and reactive oxygen species in ZnO/Au hybrid nanostructures with enhanced photocatalytic and antibacterial activity. J. Am. Chem. Soc. 2014, **136** pp. 750–757
- [24] Weihua L., Monhua W., Zhe X., Guozhong W. The free radical species in polyacrylonitrile fibers induced by g-radiation and their decay behaviors. Radiat. Phys. Chem. 2012, **81** pp. 33–39
- [25] Chen Z., Yin J.J., Zhou Y.T., Zhang Y., Song L., Hu S. Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. ACS Nano. 2012, **6** pp. 4001–4012
- [26] Dodd A.C., McKinley A.J., Saunders M., Tsuzuki T. Effect of particle size on the photocatalytic activity of nanoparticulate Zinc Oxide. J. Nanopart. Res. 2006, **8** pp. 43–51
- [27] Grela M.A., Coronel M.E.J., Colussi A.J. Quantitative spin-trapping studies of weakly illuminated titanium dioxide sols. Implications of the mechanism of photocatalysis. J. Phys. Chem. 1996, **100** pp. 16940–16946
- [28] Kim Y.C., Choi H.M., Lee B.Y., Abduriyim A. Identification of irradiated south sea cultured pearls using electron spin resonance spectroscopy. Notes & New Techniques. 2012, **48** (4) pp. 292–299
- [29] Bender C.J., & Berliner L.J. *EPR: Instrumental Method*. New York: Spring Science+ Business LCC (ISBN 978-1-4613-4733-0), 2004
- [30] Ikeya M. *New applications of Electron spin resonance Dating, Dosimetry and Microscopy*. London: World Science Publishing Co. Pte. Ltd. (ISBN 981-02-1199-6)
- [31] Eaton G.R., Eaton S.S., Barr D.P., Weber R.T. *Quantitative EPR*. Germany. Springer-Verlag, Wien, 2010
- [32] Riger P.H. *Electron Spin Resonance Analysis and Interpretation*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2007
- [33] Sankarapandi S., & Zweier J.L. Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper, zinc superoxide dismutase and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 1999, **274** pp. 34576–34583
- [34] Kagan V.E., Tyurine Y.Y., Tyurin V.A., Konduru N.V., Potapovich A.I., Osipov A.S., Kisin E.R., Schwegler-Berry D., Mercer R., Castanova V., Shvedova A.A. Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. Toxicol. Lett. 2006, **1;165**(1): pp.88–100
- [35] Pristov J.B., Jovanovic S.V., Mitrovic A., Spasojevic I. UV-irradiation provokes generation of superoxide on cell wall polygalacturonic acid. Physiol. Plant. 2013, **148** (4) pp. 574–581

- [36] Dhas M.K., Jawahar A., Benial A.M. Electron spin resonance spectroscopy studies on reduction process of nitroxyl radicals used in molecular imaging. *EJB*. 2014, **2** (1) pp. 1–6
- [37] Keiichi M., Yukio M., Masahiro K., Midori H., Akitane M. The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1990, **63** pp. 187–191
- [38] Nam S.N., Han S.K., Kang J.W., Choi H. Kinetics and mechanisms of the sonolytic destruction of non-volatile organic compounds: investigation of the sonochemical reaction zone using several OH. Monitoring techniques. *Ultrason. Sonochem.* 2003, **10** (3) pp. 139–147
- [39] Nam S.N., Han S.K., Kang J.W. OH radical monitoring technologies for AOP advanced oxidation process. *Water Sci. Technol.* 2002, **46** (11-12) pp. 7–12
- [40] Cai H., Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. Detection of reactive oxygen species and nitric oxide in vascular cells and tissues: comparison of sensitivity and specificity. *Methods Mol. Med.* 2007, **139** pp. 293–311
- [41] ISO/TS 80004-1:2015, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms*
- [42] ISO/TS 10993-5:2009, *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*
- [43] ISO/TS 10993-12:2012, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*