



中华人民共和国国家标准

GB/T 41917—2022/ISO/TS 18827: 2017

纳米技术 电子自旋共振(ESR) 法检测金属氧化物纳米材料 产生的活性氧(ROS)

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

(ISO/TS 18827:2017, IDT)

2022-10-12 发布

2023-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
3.1 术语和定义	1
3.2 缩略语	1
4 原理	2
4.1 概述	2
4.2 自旋捕获方法	2
4.2.1 概述	2
4.2.2 DMPO	2
4.2.3 BMPO	2
4.2.4 TPC	2
4.3 自由基阳性对照	3
4.3.1 芬顿反应 ^[17]	3
4.3.2 次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系 ^[18]	3
4.3.3 孟加拉红光敏作用 ^[19,20]	3
5 试剂	3
6 仪器	4
7 样品制备	4
7.1 测试样品制备(金属氧化物纳米材料悬浮液)	4
7.2 产生羟基自由基的溶液制备	4
7.2.1 FeSO ₄ 溶液	4
7.2.2 H ₂ O ₂ 溶液	4
7.3 产生超氧阴离子的溶液制备	4
7.3.1 磷酸缓冲液	4
7.3.2 次黄嘌呤溶液	4
7.3.3 黄嘌呤氧化酶溶液	5
7.4 产生单线态氧溶液的制备	5
7.5 自旋捕获剂的制备	5
7.5.1 概述	5
7.5.2 DMPO 储备液	5

7.5.3	BMPO 储备液	5
7.5.4	TPC 储备液	5
7.6	测试样品和自旋捕获剂之间的反应	5
7.6.1	概述	5
7.6.2	DMPO 的反应	6
7.6.3	BMPO 的反应	6
7.6.4	TPC 的反应	6
7.7	阳性对照和自旋捕获剂的反应	6
7.7.1	DMPO 自由基加合物的形成(DMPO/ \cdot OH)	6
7.7.2	BMPO 自由基加合物的形成(BMPO/ \cdot OOH)	6
7.7.3	TPC 自由基加合物的形成(TPC/ $^1\text{O}_2$)	6
7.8	用于自旋计算的标准物质的制备	6
8	影响因素	7
8.1	采样	7
8.2	采样时间	7
9	操作步骤	7
9.1	概述	7
9.2	样品注入	8
9.3	ESR 测试	8
10	测试结果举例	13
10.1	DMPO/ \cdot OH	13
10.2	BMPO/ \cdot OOH	14
10.3	TPC/ $^1\text{O}_2$	14
10.4	TEMPOL	14
	参考文献	15

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件等同采用 ISO/TS 18827:2017《纳米技术 电子自旋共振(ESR)法检测金属氧化物纳米材料产生的活性氧(ROS)》。文件类型由 ISO 的技术规范调整为我国的国家标准。

本文件做了下列最小限度的编辑性改动：

——参考文献重新排序。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国科学院提出。

本文件由全国纳米技术标准化技术委员会(SAC/TC 279)归口。

本文件起草单位：国家纳米科学中心、许昌学院。

本文件主要起草人：吴晓春、纪英露、樊慧真、何伟伟。

引 言

近年来,金属和金属氧化物纳米材料在生物医学和工业中的应用急剧增加。然而,大多数人造纳米材料的细胞毒性和遗传毒性的科学原理尚不完全清楚。活性氧(ROS)的产生是纳米毒性的一个重要机制。金属氧化物纳米材料的危害效应研究尚处于起步阶段。ROS的产生能力是金属氧化物纳米材料毒性的主要来源之一。过量的ROS可引起氧化应激,导致细胞不能维持正常的生理氧化还原调节功能,进而可能导致DNA损伤、细胞信号通路失调、细胞迁移变化、细胞毒性、细胞凋亡和肿瘤的发生。ROS的产生取决于诸多关键因素,包括尺寸、形状、颗粒表面、表面正电荷、表面官能团、颗粒的溶解性、纳米金属和纳米金属氧化物释放的金属离子、紫外光激活、团聚、与细胞的作用方式、炎症以及介质的pH^[4]。因此,为了检测并定量金属氧化物纳米材料表面产生的ROS,本文件提出了电子自旋共振(ESR)法。

在ROS中,最具生物学相关性且被广泛研究的有羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子(O_2^-)、单线态氧($^1\text{O}_2$)和过氧化氢(H_2O_2)。

然而,在室温下直接检测溶液中的某些自由基(如超氧阴离子和羟基自由基)是非常困难或不可能的^[5]。ESR自旋捕获技术是研究瞬态自由基的一种非常有用的工具^[6]。发展于20世纪60年代末的自旋捕获技术,是利用硝酮或硝基化合物(自旋捕获剂)与目标自由基反应,形成稳定的、可识别的自由基(自旋加合物),再使用ESR波谱仪检测的一种技术。

自旋加合物可被ESR波谱仪直接检测。自旋加合物的ESR波谱具有特异性,可以提供ROS存在的指纹特征。

本文件规定了利用ESR检测金属氧化物纳米材料产生的5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO)和羟基自由基的加合物、5-叔丁氧羰基-5-甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(BMPO)和超氧阴离子的加合物,以及2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-3-氨甲酰胺(TPC)和单线态氧的加合物的方法。本文件提供了一种在非细胞环境下评估金属氧化物纳米材料产生ROS的方法。该方法可为处在理化性质评估阶段还未进行细胞毒性测试的纳米材料,提供有价值的ROS介导的细胞毒性预测信息。

纳米技术 电子自旋共振(ESR) 法检测金属氧化物纳米材料 产生的活性氧(ROS)

1 范围

本文件描述了一种利用电子自旋共振(ESR)检测金属氧化物纳米材料在水溶液中产生的活性氧(ROS)($\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和 $^1\text{O}_2$)的方法。

本文件不适用于未使用 ROS 特异性自旋捕获剂的 ESR 检测方法。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

纳米材料 nanomaterial

任一外部维度、内部或表面结构处于纳米尺度的材料。

注 1: 本通用术语包括纳米物体和纳米结构材料。

注 2: 见 ISO/TS 80004-1:2015, 2.8-2.10。

[来源: ISO/TS 80004-1:2015, 2.4]

3.1.2

试验样品 test sample

用于生物学试验、化学试验或评价的材料、器械、器械的一部分、组件、浸提液或其中一部分。

[来源: GB/T 16886.5—2017, 3.5]

3.1.3

零基线对照 zero baseline control

相当于未检测到自由基时的阳性对照。

注: 例如, 芬顿反应阳性对照的零基线对照为不含铁的 H_2O_2 和 DMPO 的混合溶液; 次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶(HX-XO)体系为不含 HX-XO 的次黄嘌呤和 BMPO; 孟加拉红光敏化体系为无光条件的孟加拉红和 TPC。

3.1.4

阳性对照 positive control

经充分表征的材料和/或物质。该材料和/或物质当用于某一规定试验方法评价时, 证实该试验程序对于在试验系统中得出具有重复性的、适当阳性或反应性应答是适宜的。

[来源: GB/T 16886.12—2017, 3.12]

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。