



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۱۶۰۶۰

چاپ اول

فروردین ۱۳۹۲

INSO

16060

1st. Edition

Apr.2013

خطی بودن سیستم‌های اندازه‌گیری
فلورسانس - روش آزمون

**Linearity of Fluorescence Measuring
Systems- Test Method**

ICS:17.180.30

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

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

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

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

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد
« خطی بودن سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانس - روش آزمون »

رئیس:

احمدی، حاجی رضا
(کارشناسی ارشد شیمی کاربردی)

دبیر:

افتخاری دافچاهی، سمیه
(کارشناسی ارشد شیمی فیزیک)

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اداره کل استاندارد استان همدان
اعتضاد زاده، پرناز
(کارشناسی مهندسی مکانیک)

اداره کل استاندارد استان همدان
ایزدی، حسین
(کارشناسی فیزیک)

شرکت کاوش خاک آریا
پیری، احسان
(کارشناسی مهندسی معدن)

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهار
پیری، جمشید
(کارشناسی ارشد ژئوفیزیک)

اداره کل استاندارد استان همدان
ردائی، احسان
(کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)

سازمان ملی استاندارد ایران
رضوی، رخساره
(کارشناسی فیزیک)

آزمایشگاه مرجع شیمی تجزیه
عندلیبی، مریم
(کارشناسی شیمی)

اداره کل استاندارد استان همدان
هاشمی، محمد
(کارشناسی فیزیک)

دانشگاه بوعلی سینا همدان

هاشمی، مهدی
(دکتری شیمی تجزیه)

فهرست مندرجات

| صفحه | عنوان |
|------|--------------------------------------|
| ب | آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران |
| ج | کمیسیون فنی تدوین استاندارد |
| و | پیش‌گفتار |
| ۱ | ۱ هدف و دامنه کاربرد |
| ۲ | ۲ اصول آزمون |
| ۲ | ۳ وسایل |
| ۲ | ۴ محلول‌های استاندارد |
| ۳ | ۵ روش انجام آزمون |
| ۴ | ۶ محاسبات و بیان نتایج |
| ۵ | ۷ دقت و اریبی |

پیش‌گفتار

استاندارد " خطی بودن سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانس- روش آزمون " که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط توسط شرکت رویان پژوهان سینا تهیه و تدوین شده و در یک صد نود و هشتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد اندازه‌شناسی، اوزان و مقیاس‌ها مورخ ۱۳۹۱/۱۲/۲۰ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

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

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

ASTM E 578:2007, Standard Test Method for Linearity of Fluorescence Measuring Systems

خطی بودن سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانس – روش آزمون

هشدار – در این استاندارد تمام موارد ایمنی و بهداشتی نوشته نشده است. در صورت وجود چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط ایمنی و سلامتی مناسب و اجرای آن به عهده کاربر این استاندارد است.

۱ هدف و دامنه کاربرد

۱-۱ هدف از تدوین این استاندارد تعیین روشی برای ارزیابی حدود خطی بودن پاسخ با شدت فلورسانس سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانسی، تحت شرایط عملکردی، با توجه خاص به پهناهای شکاف، صافی‌ها و ظروف نمونه، می‌باشد. این استاندارد برای آزمون خطی بودن کل در گستره‌ی وسیعی از شرایط نمونه‌برداری و دستگاهی کاربرد دارد.

نتایج بدست آمده فقط برای ترکیب آزمون شده‌ای از پهناهای شکاف و صافی‌ها و اندازه و نوع تابش‌دهی کووت^۱ نمونه به کار می‌رود، که همه‌ی آن‌ها باید در گزارش آزمون ذکر شوند. از منابع غیر خطی شدن می‌توان به سیستم الکترونیکی اندازه‌گیری، جذب بیش از حد تابش برانگیختگی یا نشری، یا هر دو، و فنون جابجایی نمونه به بویژه در غلظت‌های کم اشاره کرد.

۱-۲ این روش آزمون برای سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانس با منابع تحریک کم انرژی و پیوسته (برای مثال، یک منبع برانگیختگی با خروجی الکتریکی ۴۵۰ W یا کمتر) به کار برده شده است. هیچ‌گونه تضمینی که تابش خیلی شدید سبب تجزیه نوری ترکیبات پیشنهاد شده در این روش آزمون نشود، وجود ندارد. به همین دلیل، پیشنهاد می‌شود که این روش آزمون بدون تشخیص با منابع نوری با شدت بالا بکار گرفته نشود. این استاندارد روش آزمونی جهت اندازه‌گیری خطی بودن پاسخ سایر مواد نیست. اگر این روش آزمون برای سایر مواد شیمیایی توسعه یابد، اصول کلی در آن را می‌توان بکار برد، اما پارامترهای مواد جدید از قبیل گستره غلظتی خطی بودن باید ایجاد شود. توصیه می‌شود کاربر از امکان اینکه سایر مواد ممکن است متحمل تجزیه یا جذب داخل ظروف شوند، آگاهی داشته باشد.

۱-۳ این روش آزمون برای سیستم‌های اندازه‌گیری فلورسانسی به کار می‌رود که از یک آشکارساز تکی، که می‌تواند یک لوله تکثیرکننده نوری^۲ یا یک دیود حساس به نور تکی باشد، بهره می‌برند. قابل اجرا بودن این روش آزمون برای دستگاه‌های با آرایه نوری^۳ از قبیل آن‌هایی که از آشکارساز CCD با یک آرایه دیودی استفاده می‌کنند، مشخص نشده است.

1- Cuvette
2- Photomultiplier tube
3- Photo-array instruments

۱-۴ این روش آزمون برای قالب‌های کووتی با طول مسیر ۱۰ میلی‌متر و دستگاه‌هایی با گستره‌ی طول موجی ۱۹۰ nm تا ۹۰۰ nm دارای کاربرد می‌باشد. استفاده از دیگر قالب‌های نمونه با این روش آزمون تعیین نشده است.

۲ اصول آزمون

۱-۲ این روش برای آزمون خطی بودن سیستم اندازه‌گیری فلورسانس با استفاده از محلول کینوئین سولفات دی‌هیدرات در سولفوریک اسید به عنوان محلول‌های آزمون استاندارد، استفاده می‌شود. سایر محلول‌های پایدار را که ممکن است برای کاربر مناسب‌تر باشند، نیز قابل استفاده هستند. (به یاد آوری مراجعه کنید). توصیه می‌شود استاندارد مورد استفاده جهت اندازه‌گیری خطی بودن، در گزارش آزمون بیان شود. فلورسانس محلول آزمون در سیستم اندازه‌گیری با کووت‌ها، شکاف‌ها و یا صافی‌هایی که طبق کاربرد طراحی شده برای آن‌ها به کار برده می‌شوند، اندازه‌گیری می‌شود.

یادآوری - استانداردهای جایگزین باید دارای خصوصیات زیر باشند: ۱- باید دارای بهره کوانتومی بالا در رقت خیلی بالا باشند ۲- باید در طی اندازه‌گیری‌های طیفی نسبت به تابش محرک پایدار باشند ۳- همپوشانی طیف جذبی و فلورسانس آنها با هم کم باشد. ۴- بهره کوانتومی نباید وابستگی شدید به غلظت داشته باشد. ۵- باید طیف نشری گسترده‌ای داشته باشند، طوری که در هنگام استفاده از شکاف‌های پهن، خطای کمی وارد شود.

۲-۲ **حد بالای خطی بودن** - شدت فلورسانس یک مجموعه از محلول‌های استاندارد اندازه‌گیری می‌شود، سپس لگاریتم نتایج بدست آمده از دستگاه در برابر لگاریتم غلظت رسم و خط مستقیمی از میان نقاط بدست آمده رسم می‌شود. نقطه‌ای (غلظتی) که انتهای بالایی منحنی از خط مستقیم (که از ناحیه‌ی مرکزی منحنی تعیین می‌شود) بیش از ۵٪ سیگنال منحرف شود، به عنوان حد بالای خطی بودن در نظر گرفته می‌شود. این حد بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر کینوئین سولفات دی‌هیدرات بیان می‌شود.

یادآوری - جذب تابش برانگیخته کننده در غلظت‌های جسم حل شونده بالا، به هندسه دستگاه و طول مسیر بستگی دارد و می‌تواند روی غیرخطی شدن سیگنال فلورسانس تاثیر گذار باشد.

۲-۳ **حد پایین خطی بودن** - حد پایین خطی بودن نقطه‌ای (غلظت) است که انتهای پایینی منحنی از خط مستقیم تعیین شده به وسیله‌ی بخش مرکزی منحنی، از ۲ برابر انحراف درصدی میانگین نقاط تعیین کننده‌ی خط مستقیم، بیشتر شود.

۳ وسایل

سیستم اندازه‌گیری فلورسانس، به طور کامل برای کاربرد طراحی شده مجهز بوده و دارای یک منبع UV مناسب برای پوشش طول‌موج‌های تحریک کینوئین سولفات و آشکارساز نوری حساس در طول موج ۴۵۰ nm.

۴ محلول‌های استاندارد

۱-۴ محلول ذخیره کینوئین سولفات دی هیدرات: 0.100 g کینوئین سولفات دی هیدرات بلوری $(\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ به یک بالن حجمی 100 میلی‌لیتری منتقل و بالن را با سولفوریک اسید 0.1 N به حجم برسانید. این محلول حاوی $10^3 \mu\text{g/ml}$ کینوئین سولفات دی هیدرات می‌باشد.

۲-۴ با رقیق‌سازی‌های متوالی بخش‌هایی از محلول ذخیره را تا 10 برابر حجم آن با سولفوریک اسید 0.1 N رقیق کنید. طوری که محلول‌هایی با غلظت‌های $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-5} \mu\text{g/ml}$ و $10^{-6} \mu\text{g/ml}$ را آماده کنید.

۵ روش اجرایی آزمون

۱-۵ ترکیبی از پهنای یا دهانه‌های شکاف، صافی‌ها و اندازه، نوع و تابش‌دهی کووت مناسب برای آزمون را انتخاب کنید.

۲-۵ طول موج تابش برانگیختگی را تا 350 nm بوسیله‌ی صافی‌ها یا یک تکفام ساز تحریک، هر کدام که با سیستم اندازه‌گیری فلورسانس فراهم است، تنظیم کنید.

یادآوری - دستگاه‌های مجهز به لامپ بخار جیوه باید برای مجزا کردن خط جیوه 365 nm تنظیم شوند.

۳-۵ طول موج مرکزی نوار عبوری سیستم اندازه‌گیری تابش فلورسانس را با استفاده از صافی‌ها یا تکفام سازهای نشری، در طول موج تقریبی 450 nm تنظیم کنید.

۴-۵ کووت را دست کم سه بار آبکشی کنید و با واکنشگر شاهد (سولفوریک اسید 0.1 N) پر کنید با تنظیم مناسب گستره دستگاه، داده‌های خوانده شده را ثبت کنید.

یادآوری - زمانی که تغییر تنظیمات اندازه‌گیری ضرورت داشته باشد، توصیه می‌شود داده‌های مربوط به واکنشگر شاهد نیز با استفاده از تنظیمات جدید اندازه‌گیری شوند.

۵-۵ محلول شاهد مورد استفاده در بند ۴-۵ را دور ریخته، کووت را دست کم سه بار با رقیق‌ترین محلول استاندارد مذکور در بند ۴ آبکشی کنید، کووت را با این محلول پر و شدت فلورسانس خوانده شده را ثبت کنید.

۶-۵ رقیق‌ترین محلول را دور ریخته و کووت را دست کم سه بار با محلول استاندارد غلیظ‌تر بعدی آبکشی کنید. کووت را با این محلول پر و شدت فلورسانس خوانده شده را ثبت کنید. به طور مشابه این کار را با دیگر محلول‌های استاندارد تا نهایت محلول $10^2 \mu\text{g/ml}$ انجام دهید.

یادآوری - محلول ذخیره $10^3 \mu\text{g/ml}$ به دلیل جذب بالای آن $A > 10$ ، برای طول مسیر یک سانتی‌متری در طول موج 450 nm توصیه نمی‌شود چراکه روی داخلی‌ترین صافی تاثیر می‌گذارد و موجب تصحیحات بی‌اثر می‌شود (به یادآوری بند ۶-۳ مراجعه کنید).

۶ محاسبات و بیان نتایج

۱-۶ مقدار شدت فلورسانس خوانده شده منهای مقدار خوانده شده برای محلول شاهد برابر است با سیگنال، S (با استفاده از ضرایب ضرب مناسب مطابق با گستره‌های تقویت). لگاریتم این مقادیر S را در برابر لگاریتم غلظت رسم و خط مستقیمی را از میان نقاط رسم کنید.

۲-۶ فقط نقاطی را استفاده کنید که در بخش خطی منحنی قرار دارند، این نقاط برای بیشتر دستگاه‌ها در غلظت‌های $1 \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ می‌باشند، انحراف درصدی میانگین نقاط را از خط تعیین کنید.

یادآوری - توصیه می‌شود داده‌هایی که در بخش خطی منحنی قرار دارند با رگرسیون خطی تحلیل شوند. با این کار شیب خط، انحراف استاندارد شیب و انحراف استاندارد نقاط در اطراف خط حاصل می‌شوند. برای تعیین نقاطی که در گستره‌ی خطی واقع شده‌اند، می‌توان خط اتصالی نقاط $1 \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ ، $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ را در نمودار log-log رسم کرد.

۳-۶ غلظتی که در آن انتهای بالایی منحنی بیش از ۵٪ سیگنال از خط مستقیم تعیین شده طبق ناحیه‌ی مرکزی منحنی، انحراف دارد، را ثبت کنید. این غلظت را به عنوان حد بالایی خطی بودن بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر کینوئین سولفات دی هیدرات گزارش کنید.

یادآوری - جذب تابش برانگیختگی توسط نمونه قبل از رسیدن به ناحیه آشکارسازی، به طول معمول بزرگترین اثر صافی درونی است که در غلظت‌های بالاتر مشاهده می‌شود. برای تابش برانگیختگی موازی شده و هندسه آشکارسازی 90° ، تصحیحی برای جذب تابش برانگیختگی زیر پیشنهاد شده است:

$$F_o / F = (2.303 D_X (X_2 - X_1)) / (10^{-D_X X_1} - 10^{-D_X X_2})$$

که در آن:

F_o شدت فلورسانس تصحیح شده؛

F شدت فلورسانس مشاهده شده؛

D_X چگالی نوری بر حسب cm نمونه در طول موج برانگیختگی؛

X_2 , X_1 فاصله بر حسب سانتی‌متر، حدود ناحیه آشکارسازی از وجه تابش‌دهی شده‌ی سلول نمونه می‌باشد.

یک اثر صافی درونی ثانوی، به دلیل جذب نشر قبل از تحریک نمونه نیز می‌تواند رخ دهد. برای هندسه آشکارسازی 90° ، تصحیحی برای جذب نشر پیشنهاد شده است:

$$F_o / F = (2.303 D_m (Y_2 - Y_1)) / (10^{-D_m Y_1} - 10^{-D_m Y_2})$$

که در آن:

D_m چگالی نوری بر حسب سانتی‌متر نمونه در طول موج نشری؛

Y_1 و Y_2 فاصله بر حسب سانتی‌متر، حدود ناحیه آشکارسازی از وجه تابش‌دهی تحریک شده‌ی سلول نمونه می‌باشد.

۴-۶ اگر داده‌های ترسیم شده برای غلظت‌های پایین‌تر از خط راست بیش از ۲ برابر انحراف درصد میانگین نقاط به وجود آورنده‌ی خط راست (تعیین شده از ناحیه مرکزی منحنی)، انحراف داشته باشند، حد پایین‌تر خطی بودن را به اندازه‌ای که این انحراف در پایین غلظت به وجود آورنده‌ی انحراف قرار می‌گیرد، گزارش

کنید. بنابراین برای مثال، با میانگین انحراف ۱٪ بالای $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ و بیش از ۲٪ انحراف زیر این مقدار، در گزارش باید عبارت "خطی به اندازه‌ی ۲٪ پایین غلظت $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ " بیان شود.

۷ دقت و اریبی

۱-۷ این روش آزمون به تعیین دقت نتایج آزمون به عنوان بخشی از تفسیر نتایج نیازمند می‌باشد. دقت بدست آمده در هر کاربرد از آزمون به خصوصیات محلول آزمون استاندارد مورد استفاده (که با گونه‌های شیمیایی استفاده شده تغییر خواهد کرد)، به تکنیک جابجایی دستی و به عملکرد دستگاه بستگی دارد.

۲-۷ چون این روش آزمون برای مقایسه عملکرد دستگاه‌های اندازه‌گیری فلورسانس مختلف و برای مقایسه عملکرد سیستم‌های داده شده برای محلول‌های تجزیه‌ای از گونه‌های شیمیایی مختلف نمی‌باشد، برای این روش آزمون اریبی قابل انجام نیست.