

جزوه کنترل کیفی

شستشوی وسایل در آزمایشگاه

پی پت و بورت و بالن حجم سنجی باید کاملاً تمیز و بدون چربی باشند. در غیر این صورت، نتایج غیرقابل اعتماد خواهند بود. سایر وسایل شیشه‌ای نیز مانند ارلن مایر، بشر و... باید کاملاً تمیز باشند. برای اینکه از تمیز بودن وسایل شیشه‌ای مطمئن شوید آنها را با آب مقطر پر و سپس خالی کنید، اگر یک لایه یکنواخت آب باقی ماند ظرف تمیز است ولی اگر آب بصورت قطرات جمع شود، ظرف کثیف است و باید تمیز شود. روشی که غالباً بکار می‌رود شامل پر کردن وسیله مورد نظر با محلول تمیز کننده و گذاشتن آن به مدت چند ساعت است. سپس محلول را خالی می‌کنند و وسیله را با آب معمولی چندین مرتبه شستشو داده و پس از سه تا چهار بار آبکشی با آب مقطر در جایی قرار می‌دهند تا خشک شود.

طرز تهیه محلول تمیز کننده:

۱- محلول تقریباً اشباع دی کرومات پتاسیم در اسید سولفوریک غلیظ: در یک بالن ۵۰۰ میلی لیتری مقاوم در برابر حرارت، ۱۰ تا ۱۵ گرم دی کرومات پتاسیم ($K_2Cr_2O_7$) را با حدود ۱۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کنید. سپس به آرامی اسید سولفوریک غلیظ بیفزائید و در همین حال بالن را کاملاً بچرخانید. با افزودن اسید، محتوی بالن بصورت یک توده قرمز نیمه جامد در خواهد آمد. اسید سولفوریک را به اندازه‌ای بیفزائید که این توده را کاملاً حل کند. بگذارید محلول تا اندازه‌ای خنک شود سپس آن را به داخل یک بطری ذخیره منتقل کنید. محلول را میتوان چندین بار مورد استفاده قرار داد تا اینکه به رنگ سبز (Cr^{3+}) درآید که در این حال باید دور ریخته شود.

۲- تهیه محلول KOH الکلی: مقدار ۱۰۰ گرم هیدروکسید پتاسیم (KOH) در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و پس از سرد کردن و رسیدن به دمای محیط، با اتانول به حجم یک لیتر برسانید.

توجه: محلول تمیز کننده شدیداً خورنده است و ترکیب خطرناکی است و باید با نهایت دقت بکاربرده شود و اگر با پوست بدن تماس پیدا کرد محل مورد نظر را با آب فراوان بشوئید.

نحوه شستشوی وسایل شیشه‌ای مانند بشر، ارلن مایر (بجز بورت، پی پت و بالن ژوژه):

بشر، ارلن مایر و سایر وسائل شیشه ای که جهت آزمایش از آنها استفاده می شود باید کاملاً تمیز و بدون چربی باشد. برای تمیز کردن آنها ابتدا ظروف را با مایع ظرفشویی و آب معمولی شسته و سپس با آب مقطر کر دهید و اگر آب بصورت قطرات جمع شود ظرف کثیف است و از محلول تمیز کننده استفاده نمائید. سپس ظروف را در محلی قرار دهید تا خشک شود. (می توانید برای خشک کردن ظروف شیشه ای از گرم کن یا اون استفاده نمائید).

شستشو پی پیت، بورت و بالن حجم سنجی (بالن ژوژه):

برای شستشو بالن حجم سنجی (بالن ژوژه) ابتدا با مایع ظرفشویی و آب معمولی شستشو داده و سپس با آب مقطر کر دهید و اگر آب بصورت قطرات جمع شود ظرف کثیف است و از محلول تمیز کننده استفاده نمائید.

برای شستشوی بورت، حدود یک لیتر از محلول را داخل مخزن بورت ریخته و بورت را از محلول پر نموده و پس از چند دقیقه خالی نمائید. این عمل را چندین بار تکرار نموده تا کاملاً تمیز شود سپس در مخزن آب مقطر ریخته و بورت را چندین بار پر و خالی کنید و در مرحله بعد با محلولی که تیتراسیون را انجام می دهید، بورت را کر دهید.

برای شستشوی پی پت، چندین بار با محلول تمیز کننده پر و خالی کنید و سپس با آب مقطر کر دهید.

یادآوری: حرارت دادن بورت، پی پت و بالن حجم سنجی (بالن ژوژه)، حجم آنها را تغییر میدهد و ایجاد خطا می کند بنابراین از شستشو با آب گرم یا حرارت دادن آنها خودداری نمائید.

معرف کالکون: یک گرم از معرف کالکون را با ۱۰۰ گرم کلرور سدیم مخلوط نموده و در یک هاون بسائید.

معرف اریو کرم بلک تی: یک گرم از معرف را با ۱۰۰ گرم کلرور سدیم مخلوط نموده و بسائید.

معرف مخلوط: ۰.۲ گرم برومو کروزل گرین و ۰.۲ گرم متیل رد در ۴۰۰ میلی لیتر اتانول حل نمائید.

معرف باریم دی فنیل آمین سولفانات: ۰.۳ گرم از معرف را به یک بشر ۴۰۰ میلی لیتری منتقل نموده و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه نمائید و کاملاً بهم بزنید و در شیشه تیره رنگ نگهداری کنید. می توانید بجای محلول از جامد آن نیز استفاده نمائید.

معرف متیل رد: ۰/۲ گرم متیل رد را در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول حل کرده و محلول را صاف نمائید.

معرف فنل فتالئین: ۰/۵ گرم فنل فتالئین را در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول حل نمائید.

معرف تیمول فتالئین: ۰.۴ گرم تیمول فتالئین را در ۶۰۰ میلی لیتر اتانول حل نموده و سپس ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نموده و محلول را هم بزنید تا یکنواخت شود و اگر رسوبی در محلول وجود داشت آنرا صاف نمائید.

معرف متیل اورانژ: ۰.۵ گرم معرف را در یک لیتر آب مقطر حل نمائید.

اسید کلریدریک ۰.۱ نرمال : ۸.۲۸ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ را به حجم یک لیتر برسانید. یا یک عدد تیترازول ۰.۱ نرمال به حجم یک لیتر برسانید.

اسید کلریدریک ۱ نرمال : ۸۲.۸ میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ را به حجم یک لیتر برسانید یا یک عدد تیترازول ۱ نرمال به حجم یک لیتر برسانید.

محلول آب مقطر اسیدی : ۲۰ میلی لیتر اسید کلریدریک را با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط نمائید.

اسید کلریدریک ۵ درصد : به ازای هر ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک، ۹۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه نمائید.

اسید کلریدریک ۱+۹۹ : به ازای هر یک میلی لیتر اسید کلریدریک، ۹۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه نمائید.

محلول اسید نیتریک ۰.۱ نرمال : ۶.۹ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ را به حجم یک لیتر برسانید.

محلول ۰.۱ نرمال سود : ۱ گرم NaOH جامد را در آب مقطر حل نموده و در یک بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری به حجم برسانید.

محلول ۱۰ گرم در لیتر سود : ۱۰ گرم سود جامد را در آب مقطر حل نموده و به حجم یک لیتر برسانید.

محلول ۴ نرمال KOH : مقدار ۲۵۰ گرم KOH جامد را در آب مقطر حل نموده و به حجم یک لیتر برسانید.

محلول کلرور استانو : مقدار ۵ گرم $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ را در ده میلی لیتر اسید کلریدریک غلیظ حل نموده و حجم را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول را جوشانده تا رنگ آن شفاف شود، سپس مقداری قلع فلزی به آن اضافه کنید.

محلول دی کرومات پتاسیم ۰.۰۵ نرمال : یک عدد تیترازول ۰.۱ نرمال را به حجم دو لیتر برسانید یا جامد آن را بمدت ۲ ساعت در اون در حرارت ۱۲۰ خشک نموده و ۲.۴۵۱۶ گرم را در آب مقطر حل کرده و حجم را به یک لیتر برسانید.

محلول نیترات نقره (جهت شناسائی حضور کلر و برای اطمینان از شستشوی رسوبات) : ۱۷ گرم نیترات نقره را در آب مقطر حل نموده و حجم را به یک لیتر برسانید.

محلول نیترات آمونیوم ۲۰ گرم در لیتر (NH_4NO_3) : مقدار ۲۰ گرم نیترات آمونیوم را در آب مقطر حل نموده و حجم را به یک لیتر برسانید. محلول باید در حضور معرف متیل رد با آمونیاک تا پیدایش رنگ زرد خنثی شده باشد.

محلول ۰.۰۱ نرمال EDTA : یک عدد تیترازول ۰.۱ نرمال EDTA را به حجم ده لیتر برسانید. یا ۳۷.۲۲۴ گرم از نمک ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) خالص را که در اون در حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد خشک شده است وزن نموده و به حجم ده لیتر برسانید.

محلول بافر : (PH=10) مقدار ۵۰ گرم کلرور آمونیوم را در آب مقطر حل نموده و ۵۵۰ میلی لیتر NH_3 غلیظ اضافه نموده و به حجم یک لیتر برسانید.

کلرور باریم ۱۰۰ گرم در لیتر : مقدار ۱۰۰ گرم $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ را در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر برسانید.

محلول نیترات نقره ۰.۰۵ نرمال : ۸.۴۹۳۸ گرم نیترات نقره را که قبلا در اون در حرارت ۱۰۵ درجه سانتیگراد حداکثر بمدت یک ساعت قرار داده شده را در آب مقطر حل نموده و حجم را به یک لیتر برسانید. همچنین می توانید یک عدد تیترازول ۰.۱ نرمال را به حجم ۲ لیتر برسانید.

محلول ۵ درصد کرومات پتاسیم : مقدار ۱۲.۵ گرم کرومات پتاسیم را در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمائید.

اسید فسفریک ۱+۱ : ۵۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک غلیظ (H_3PO_4) را با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط نمائید.

محلول کلرور جیوه اشباع : یک محلول اشباع از جامد کلرور جیوه ($HgCl_2$) تهیه کنید.

محلول آمونیاک ۱+۱ : حجم مساوی از آب مقطر و آمونیاک غلیظ مخلوط نمائید.

محلول Na_2O ppm ۱۰۰۰ : مقدار ۱.۸۸۵۹ گرم از کلرور سدیمی که قبلا بمدت ۲ ساعت در اون و در حرارت ۱۰۵ تا ۱۱۰ درجه سانتیگراد گذاشته شده است در آب مقطر حل نمائید و حجم را به یک لیتر برسانید.

محلول K_2O ppm ۱۰۰۰ : مقدار ۱.۵۸۲۹ گرم از کلرور پتاسیمی که قبلا بمدت ۲ ساعت در اون و در حرارت ۱۰۵ تا ۱۱۰ درجه سانتیگراد گذاشته شده است را در آب مقطر حل نمائید و حجم را به یک لیتر برسانید.

محلول Na_2O ppm ۵ و K_2O ppm ۱۰ : مقدار ۵ میلی لیتر از محلول Na_2O ۱۰۰۰ ppm و ۱۰ میلی لیتر از محلول K_2O ۱۰۰۰ ppm را در یک بالن ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.
مخلوط کربنات سدیم و پتاسیم : مقدار مساوی از کربنات سدیم و پتاسیم را وزن کرده و با هم مخلوط نمائید.

محلول ۰.۰۵ نرمال کلرور سدیم : مقدار ۲.۹۲۲۲ گرم از کلرور سدیمی که قبلا در اون در حرارت ۱۰۵ درجه سانتیگراد بمدت یک ساعت خشک شده است، در آب مقطر حل نموده و به حجم یک لیتر برسانید.

محلول ۰.۰۵ نرمال کلرور پتاسیم : مقدار ۳.۷۲۷۷ گرم از کلرور پتاسیمی که قبلا در اون در حرارت ۱۰۵ درجه سانتیگراد بمدت یک ساعت خشک شده است، در آب مقطر حل نموده و به حجم یک لیتر برسانید.

محلول نیترات آلومینیوم $Al(NO_3)_3$: مقدار ۲۰۸.۵ گرم نیترات آلومینیوم را در آب مقطر حل نموده و به یک بالن ژوژه یک لیتری منتقل نمائید و پس از رسیدن به دمای محیط به حجم برسانید.

کنترل کیفیت تجهیزات آزمایشگاهی

اولین قدم برای استفاده صحیح از تجهیزات آزمایشگاهی، مطالعه کامل کاتالوگها و عمل به دستورالعملهای نگهداری و کنترل کیفیت مندرج در آن می باشد. مطالبی که در ذیل آمده است، جنبه عام داشته و جایگزین دستورالعمل سازنده نمی باشد.

میکرو پیپت / سمپلر

چگونگی کاربری

پس از محکم کردن نوک سمپلر مناسب به سمپلر، ابتدا دکمه کنترل / فشار (Control button/Push button) سمپلر را به آرامی تا توقف اول دکمه، پائین می آوریم، در همان حال نوک سمپلر را چند میلیمتر (حدود ۳ میلی متر وبسته به حجم سمپلر) در مایع فرو برده و دکمه فشار را به آرامی رها می کنیم تا مایع وارد نوک سمپلر شود، برای تخلیه در لوله یا ظرف مورد نظر، با فشار مجدد دکمه تا توقف اول، محلول را با تماس به جداره ظرف به آرامی خارج کرده و پس از ۳-۱ ثانیه با فشار تا توقف دوم، باقیمانده محلول را نیز کاملاً خارج می نمائیم.

جهت رسیدن به حداکثر دقت و صحت برای سمپلرهای با حجم ۱۰ میکرولیتر و بیشتر، توصیه می شود قبل از انتقال حجم نمونه، ۲ الی ۳ بار عمل برداشت و تخلیه از نمونه تکرار شده تا کاملاً جدار داخلی نوک سمپلر به نمونه آغشته شود و سپس حجم مورد نظر از نمونه منتقل شود.

برای حجم های کمتر از ۱۰ میکرولیتر بهتر است، فقط یکبار برداشت با نوک سمپلر Unwetted Tip که خشک و بدون آغشتگی به نمونه باشد، انجام شده و پس از تخلیه در محل مورد نظر، جهت اطمینان از تخلیه کامل تمامی حجم درون نوک سمپلر، با محلول موجود در ظرف شسته شود.

باید در نظر داشت، عملکرد مطلوب سمپلر فقط با استفاده از سر سمپلر های نو و یکبار مصرف بدست می آید و از شستشو و استفاده مجدد از سر سمپلرها، می بایست خودداری نمود.

نکات مهمی که در کار با سمپلر می بایست رعایت شود، عبارتند از :

- ۱ - اطمینان از اتصال کامل نوک سمپلر به سمپلر
- ۲ - عمود نگهداشتن سمپلر در زمان مکش
- ۳ - تخلیه محلول با تماس نوک سمپلر به جداره ظرف تحت زاویه ۱۰ تا ۴۰ درجه
- ۴ - رها کردن آرام دکمه در زمان پر یا خالی کردن محتویات نوک سمپلر
- ۵ - کشیدن کناره های خارجی نوک سمپلر پس از انجام مکش به جداره های فوقانی لوله به منظور حذف قطرات خارجی نوک سمپلر یا در صورت نیاز خشک کردن قطرات باقی مانده در بخش خارجی آن به کمک پارچه ای بدون پرز (البته باید مطمئن شد که پارچه چیزی از محتویات داخل نوک سمپلر را به خود جذب نکند)
- ۶ - هنگام تخلیه محلول پس از توقف اول (پائین آوردن دکمه کنترل تا مرحله اول) باید کمی تامل کرد (۳-۱ ثانیه) و سپس دکمه را تا توقف دوم پائین آورد.
- ۷ - در سمپلرهای متغیر (قابل تنظیم برای حجم های مختلف) توصیه می شود برای کاهش حجم و تنظیم حجم مورد نظر، دکمه کنترل به آرامی تارسیدن به حجم انتخابی، چرخانده شود. برای افزایش حجم بهتر است دکمه کنترل را تا کمی بیش از حجم مورد نظر پیچاند و بعد در خلاف جهت با کم کردن حجم به مقدار مورد نظر رسید.

کنترل کیفیت سمپلر (میکروپیپت):

اطمینان از کالیبراسیون صحیح میکرو پیپتها که از طریق بررسی دقت و صحت عملکرد میکرو پیپت در برداشت حجم مورد انتظار حاصل میشود، نقش مهمی در برنامه های تضمین کیفیت ایفا میکند. اگرچه این ارزیابی به دو روش توزین و رنگ سنجی قابل انجام است، ولی تحت شرایط موجود و به علت عدم دسترسی اغلب آزمایشگاهها به الزامات استفاده از روش توزین مانند ترازوهای با درجه تفکیک (Resolution) مناسب برای کنترل سمپلر (درجه تفکیک ۰/۰۱ میلی گرم) و کالیبراسیون منظم ترازو، استفاده از روش رنگ سنجی، توصیه می گردد. بررسی دقت و صحت سمپلر بهتراست ۳ تا ۴ بار در سال انجام شود.

ارزیابی سمپلر (میکروپیپت) به روش رنگ سنجی

در این روش با استفاده از یک محلول رنگی با جذب پایدار، مثل رنگ سبز خوراکی در طول موج ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر و یا پارانیتروفنل در طول موجهای ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر، صحت عملکرد سمپلر ونیز قابلیت تکرار آن کنترل می شود.

مواد و ابزار مورد نیاز :

۱- ماده رنگی :

- رنگ سبز خوراکی

یا

- پارانیتروفنل (Paranitrophenol (C₆H₅NO₃), indicator PH(5.4-7.5) MERCK Art. 6798

(جذب نوری بدست آمده از پودر پارانیتروفنل (اندیکاتور) استفاده شده در این دستورالعمل با مقادیر قید شده برای Paranitrophenol High purity- NIST SRM 938 مندرج در کتاب Tietz 1999 قابل انطباق است).

۲ - هیدروکسید سدیم ۰ / ۰۱ نرمال، محلول کاری برای رقت سازی پارانیتروفنل .

Sodium hydroxide(NaOH) , Pure ... MERCK Art. 6462.

۳- لوازم شیشه ای کلاس A با توجه به حجم مورد نیاز در تهیه غلظت محلول رنگی(از قبیل بالن ژوژه و پیپت)

۴- فتومتر دارای طول موجهای ۴۰۱ یا ۴۰۵ برای پارانیتروفنل و ۶۲۰ یا ۶۳۰ نانومتر برای رنگ سبز خوراکی

۵- لوله آزمایش

۶- ترازو (کالیبره و تحت کنترل)

۷- نوک سمپلر مناسب

۸- آب مقطر

نکته : طول موج انتخابی برای قرائت محلول پارانیتروفنل ۴۰۱ نانومتر است ولی امکان قرائت در ۴۰۵ نانومتر نیز وجود دارد.

روش کار :

همانطور که گفته شد انجام روش رنگ سنجی با استفاده از پودررنگ سبز خوراکی و نیز پارانیتروفنل امکانپذیر میباشد، لذا نحوه تهیه هر دو محلول ذخیره (stock) ذیلا بیان شده است. قابل ذکر است در سالهای اخیر رنگ سبز خوراکی بعضا بصورت ناهمگون و یا محلول عرضه شده که در این موارد، دستورالعمل زیر کاربرد نداشته و بهتر است از پارانیتروفنل استفاده شود.

بطور معمول سمپلرها به سه گروه (الف) ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر، (ب) ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر (پ) حجمهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر، تقسیم می شوند.

برای هریک از گروههای فوق میبایست باید یک محلول ذخیره از "رنگ" تهیه نمود. از آنجایی که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۰/۴ نشان میدهند محلول های ذخیره رنگی با غلظتی تهیه میشوند که پس از مرحله رقیق شدن دارای جذبی در حدود ۰/۴ باشند.

۱- طرز تهیه محلول رنگی ذخیره رنگ سبز خوراکی برای هر گروه از سمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر): ۱۵/۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵/۵ میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۱۵۵ میلی گرم پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۱۵۵ میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر): ۱/۵۵ گرم از پودر رنگ سبز در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه ۱/۵۵ گرم درصد یا ۱۵۵۰ میلیگرم درصد است)

۲- طرز تهیه محلول رنگی ذخیره پارانیتروفنل برای هر گروه از سمپلرها :

سمپلرهای گروه الف (۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در یک لیتر آب مقطر، حل می شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲ میلی گرم در لیتر است)

سمپلرهای گروه ب (۱۰-۱۰۰ میکرولیتر): ۴۲ میلی گرم پودر پارانیتروفنل، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می شود. (غلظت رنگ در محلول ذخیره این گروه، ۴۲ میلی گرم درصد است)

سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر): ۴۲۰ میلی گرم پودر پارانیتروفنل ، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، حل می‌شود. (غلظت رنگ ذخیره این گروه، ۴۲۰ میلی گرم درصد است)

ارزیابی دقت

برای بررسی دقت عملکرد سمپلر و بعبارتی سنجش مقدار عدم دقت یا قابلیت تکرار، ابتدا محلول ذخیره رنگی مناسب طبق روش ذکر شده و با توجه به حجم سمپلر مورد کنترل، تهیه می گردد سپس ده لوله در جالوله ای چیده و با استفاده از پی پت کلاس A و بر مبنای جدول (۱-۱) مقدار مشخص آب مقطر(در صورت استفاده از رنگ سبز) و یا سود ۰/۰۱ نرمال (در صورت استفاده از پارانیتروفنل) ، با دقت بسیار زیاد در هر لوله ریخته می شود. سپس با استفاده از سمپلر مورد کنترل ، از محلول ذخیره رنگی برداشت شده و به هر لوله اضافه می شود . پس از مخلوط کردن، میزان جذب نوری لوله ها در مقابل بلانک مناسب(آب مقطر برای سبز خوراکی و سود برای پارانیتروفنل) قرائت می گردد . همانگونه که قبلا ذکر شد طول موج انتخابی برای قرائت جذب نوری رنگ سبز خوراکی ۶۲۰ یا ۶۳۰ نانومتر و برای پارانیتروفنل ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر میباشد.

توجه : در صورت استفاده از محلول ذخیره پارانیتروفنل ، رقتهای مورد نیاز طبق جدول ۱ میباید در سود ۰/۰۱ نرمال تهیه شود . در حالیکه برای رنگ سبز خوراکی از آب مقطر استفاده می‌شود.

جدول (۱-۱)

گروه سمپلر	حجم سمپلر مورد کنترل بر حسب میکرولیتر	آب مقطر یا سود ۰/۰۱ نرمال برداشتی توسط پی پت بر حسب میلی لیتر	حجم رنگ برداشتی از محلول ذخیره توسط سمپلر بر حسب میکرولیتر	رقت حاصله
گروه پ	۵	۵	۵	۱/۱۰۰۱
گروه ب	۱۰	۱	۱۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۰	۲	۲۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۲۵	۲/۵	۲۵	۱/۱۰۱
گروه ب	۵۰	۵	۵۰	۱/۱۰۱
گروه ب	۱۰۰	۱۰	۱۰۰	۱/۱۰۱

گروه الف	۲۰۰	۲	۲۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۵۰۰	۵	۵۰۰	۱/۱۱
گروه الف	۱۰۰۰	۱۰	۱۰۰۰	۱/۱۱

سپس میانگین و انحراف معیار خواننده های جذب نوری (OD) ۱۰ لوله ، محاسبه و ضریب انحراف خواننده ها (CV%) بدست می آید.

$$mean = \frac{\sum x_i}{n} \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - mean)^2}{n - 1}}$$

$$CV\% = \frac{SD * 100}{mean} \quad \text{CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)}$$

SD: انحراف معیار

mean: میانگین جذب نوری لوله ها

n: تعداد خواننده ها

x_i : جذب نوری هر لوله

در صورت انتقال صحیح حجم آب و یا سود ، اختلاف در جذب نوری لوله های حاوی محلول رنگی به اختلاف در حجم برداشت شده توسط سمپلر، نسبت داده شده و درصد ضریب انحراف خواننده ها (CV%) معرف قابلیت تکرارپذیری و مقدار عدم دقت سمپلر خواهد بود.

ارزیابی صحت

جهت کنترل صحت عملکرد سمپلر و تهیه معیار سنجش صحت در روش رنگ سنجی ، باید با استفاده از ابزار شیشه ای کالیبره، محلولی دارای رقت مشابه با رقت تهیه شده توسط سمپلر تهیه شود. (۱/۱۰۰۱) یا (۱/۱۰۱) ویا (۱/ ۱۱)

بدین منظور با پی پت کلاس A، مقداری از محلول رنگی ذخیره (متناسب با گروه حجمی سمپلرو طبق روش ذیل)، به بالن ژوژه کلاس A ای که تا خط نشانه از آب مقطر پر شده اضافه میشود .

روش تهیه محلولهای کنترل صحت :

کنترل صحت گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) رقت ۱/۱۰۰:

بالن ژوژه یک لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه پ) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

کنترل صحت گروه ب (سمپلرهای ۱۰- ۱۰۰) رقت ۱/۱۰۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ، ۱ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه ب) به آن اضافه و مخلوط نمائید .

کنترل صحت گروه الف (سمپلرهای ۱۰۰-۱۰۰۰) رقت ۱/۱۱ :

بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده سپس با پی پت کلاس A ، ۱۰ میلی لیتر از رنگ ذخیره (گروه الف) به آن اضافه و مخلوط نمائید.

نکته : هرگاه برای اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر رنگ، در بالای خط نشانه فضای خالی وجود نداشته ، تاجائیکه امکان دارد از حجم ۱۰ میلی لیتر به بالن اضافه نموده و بقیه را به داخل بشر منتقل میکنیم . پس از مخلوط نمودن کامل محتویات بالن ژوژه ، همه حجم را به بشر اضافه نموده و با محتویات بشر ، بالن ژوژه را چند بار شستشو میدهیم.

پس از اطمینان از یکنواختی محلول صحت تهیه شده ، محلول حداقل در سه لوله ریخته و جذب نوری هر سه لوله قرائت می شود . میانگین خوانده ها بعنوان معیار مقایسه صحت دربررسی صحت عملکرد سمپلر استفاده میشود .

شاخصه صحت (Bias) است که از فرمول زیر بدست می آید:

$$Bias\% = \frac{expected - observed}{expected} \times 100$$

expected: میانگین جذب نوری ۳ خوانده از محلول تهیه شده در بالن ژوژه

observed: میانگین جذب نوری ۱۰ لوله که در مرحله ارزیابی عدم دقت بدست آمده است.

توجه: به منظور به حداقل رساندن عوامل ایجاد خطا بهتر است بررسی دقت و صحت در یک روز انجام گیرد.

مقادیر مجاز عدم دقت و عدم صحت:

اولین معیار مقایسه برای کنترل کیفیت سمپلرها، میزان ادعا شده توسط سازندگان سمپلر برای **Inaccuracy (Bias)** و **Imprecision (CV%)** میباشد. چرا که بدنبال ارتقای فنآوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار، مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعائی سازندگان میکرو پیپتها نیز بسیار کاهش یافته است.

با توجه به مختصات کیفیتی بسیاری از میکرو پیپتها، حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت $CV\% = 0.2\%$ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت $Bias\% = 0.3\%$ پیشنهاد میشود.

نکته: معیارهای یاد شده که با توجه به تنوع سمپلرهای مورد استفاده آزمایشگاهها انتخاب شده است، اگرچه از معیارهای مجاز اعلام شده قبلی کوچکتر میباشد ولی هنوز با میزان قابل قبول برخی مراجع بین المللی فاصله زیادی دارد.

تنظیم

در برخی از انواع سمپلرها که حجم ثابتی را برداشت می نمایند (سمپلرهای Fixed Volume) در صورت وجود Bias غیر قابل قبول، می توان با استفاده از اطلاعات مندرج در راهنمای سمپلر، حجم برداشتی را تصحیح نمود.

در مورد تنظیم سمپلرهای متغیر باید توجه داشت که هرگونه تغییر در حجمهای مختلف، به میزان ثابت اعمال میشود. بدین معنی که تغییر ۱ میکرو لیتر در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر (۱٪ تغییر)، در حجم ۱۰ میکرو لیتر نیز باعث ۱ میکرو لیتر تغییر، (یعنی ۱۰٪ تغییر) خواهد شد. لذا بهتر است عمل تنظیم کالیبراسیون توسط شرکت معتبر انجام شود.

نحوه نگهداری سمپلر:

نگهداری سمپلر بر اساس دستورالعمل سازنده انجام می‌پذیرد ولی مطالب ذیل در موردبیشتر انواع سمپلر صادق می‌باشد.

- کلیه قسمت های خارجی اغلب سمپلرها را می توان با محلول صابون تمیز کرد و پس از آبکشی با آب مقطر در دمای اتاق خشک نمود.
- برای ضد عفونی کردن ، محلول ۶۰٪ ایزوپروپانل توصیه می شود. برخی از انواع سمپلر نیز قابل اتوکلاو هستند.
- پس از شستشوی سطوح خارجی و تمیز کردن بخش نگهدارنده نوک سمپلر "Tip holder" (که به کمک میله همراه یا با سوآب آغشته به اتانل ۷۰ درجه انجام می گیرد) باید پیستون با مقدار کمی از روغن همراه سمپلر، که اغلب Silicone grease میباشد ، روغن کاری شود.
- برای تمیز کردن قسمت های داخلی سمپلر باید به راهنمای همراه سمپلر مراجعه شود.

نکات مهم :

- ۱ - ضربه به سمپلر می تواند این وسیله را از کالیبراسیون خارج نماید.
- ۲ با انتخاب سر سمپلر مناسب، حجم محلول برداشتی باید در حدی باشد که مایع وارد قسمت های داخلی نگردد.
- ۳ تماس دست با نوک سمپلر آلوده ممنوع است.
- ۴ در صورت مکش محلول های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خوردندگی باید بخش نگهدارنده نوک سمپلر (Tip-holder) باز شده و پیستون و حلقه پلاستیکی (O-ring) بخوبی با آب مقطر شسته شود.
- ۵ هرگز نباید سمپلر حاوی محلول به پهلوی میز گذاشته شود.
- ۶ هرگز نباید سمپلرهای متغیر را بر روی حجمی خارج از محدوده حجم ادعائی آن تنظیم کرد.

اسپکتروفتومتر و فتومتر

مهمترین مواردی که در اسپکتروفتومترها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند عبارتند از خطی بودن ، صحت فتومتریک، صحت طول موج ، رانش و نورهای ناخواسته

۱ - خطی بودن Linearity

هدف از این آزمون تعیین محدوده ای است که در آن ارتباط خطی بین نور جذب شده و خوانش فتومتر وجود دارد. در این آزمایش میزان عدم صحت جذب نوری در هر رقت بررسی می شود.

برای این ارزیابی از محلولهای مختلفی می توان استفاده نمود که می بایست تا حد امکان پایدار باشند. بعلت تاثیر متغیرهایی از قبیل خطای رقت ، کاهش پایداری ، تغییرات pH و تاثیرات دما در محلولها، باید در استفاده از این روش ، عوامل یاد شده را تحت کنترل گرفت.

در صورت امکان، استفاده از فیلترهای شیشه‌ای solid glass filter مانند دیدمیوم، جایگزینی برای روش قبل میباشد (این فیلترها از طریق شرکتهای پشتیبان قابل دستیابی است)

بررسی خطی بودن با استفاده از محلول در طول موجهای مختلف :

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۵۴۰ نانومتر از محلول HiCN ، در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر و در طول موج ۳۴۰ نانومتر از محلول دی کرومات پتاسیم استفاده می گردد.

جهت بررسی خطی بودن طول موج ۵۴۰ نانومتر ، می بایست با مخلوط نمودن خون با درابکین ، ذخیره ای (Stock) از محلول سیان مت هموگلوبین با جذب نوری حدود ۲ تهیه شود . (بطور مثال از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر خون با هموگلوبین ۱۷۰ g/l به ۵ میلی لیتر درابکین ، محلولی با جذب نوری حدود ۲/۰۹ بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشد حجم بیشتری از خون ، می بایست به درابکین اضافه شود. سپس از این محلول ذخیره ، حداقل ۴ رقت تهیه می شود (بطور مثال ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸ و ۱/۱۶) و جذب نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شده در طول موج یاد شده در مقابل بلانک درابکین، قرائت می گردد تا ۵ خوانده بدست آید . جذبهای نوری قرائت شده به عنوان مقدار مشاهده شده (Observed) در نظر گرفته می شود .

برای محاسبه میزان خطا در هر رقت ، جذب نوری (OD) رقتی از محلول که در حدود ۰/۴ باشد به عنوان مبنا انتخاب و میزان خطای سایر رقتها با توجه به آن محاسبه می شود تا جذب مورد انتظار بدست بیاید .

بطور مثال اگر جذب نوری نمونه با رقت ۱/۴ ، حدود ۰/۴ باشد. جذب نوری مورد انتظار برای رقت ۱/۲ بصورت زیر محاسبه می شود :

جذب نوری رقت

۰/۴ ۱/۴

x ۱/۲

مقدار X بدست آمده ، مقدار مورد انتظار (Expected) جذب نوری نمونه در رقت ۱/۲ می باشد. بدین ترتیب پس از محاسبه جذب نوری مورد انتظار برای رقت‌های مختلف ، میزان عدم صحت هر رقت با استفاده از فرمول Bias تعیین می‌گردد .

$$Bias = \frac{expected - observed}{expected} * 100$$

مثال زیر ، میزان عدم صحت جذب نوری رقت‌های مختلف نمونه سیان مت هموگلوبین در یک دستگاه فتومتر را نشان می‌دهد .

جدول ۱-۲

(OD expected) جذب مورد انتظار	(OD observed) جذب نوری بدست آمده	%Bias
2.075	2.094	0.91
1.66	1.663	0.18
1.245	1.259	1.12
1.037	1.017	1.97
0.83	0.826	0.48
-	0.415	-
0.207	0.212	2.1

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۴۰۵ نانومتر از محلول پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در

لیتر استفاده می گردد . طرز تهیه این محلول:

وزن یک مول پارانیتروفنل = ۱۳۹/۱۱ گرم

یک میلی مول = ۰/۱۳۹۱۱ گرم

برای تهیه پارانیتروفنل ۰/۰۸ میلی مول در لیتر ، با استفاده از محاسبه زیر ، می بایست

۱۱/۱۱۲۸۸ پارانیتروفنل (بطور تقریبی ۱۱/۱ میلی گرم) در یک لیتر هیدروکسید سدیم (Na OH) ۰/۰۱ نرمال حل شود.

$$\text{میلی گرم } 11.1 \sim \text{میلی گرم } 11.11288 = \text{گرم } 0.0111288 = 0.13911 \times 0.08$$

این محلول جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در سود (Na OH) ۰/۰۱ نرمال می توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در طول موج ۴۰۵ نانومتر و در مقابل بلانک سود، بررسی نمود. بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 0.06 ، 0.04 ، 0.02 ، 0.01 و 0.005 میلی مول در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

همانطور که قبلا گفته شد جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

غلظت

جذب نوری

0.02 0.463

0.04 x

جدول ۳-۱

Bias %	جذب نوری بدست آمده	جذب نوری مورد انتظار	غلظت محلول پارانیتروفنل $\mu\text{mol/L}$
3	1.908	1.852	0.08
2	1.418	1.389	0.06

0.04	0.926	0.937	1.2
0.02	-	0.463	-
0.01	0.231	0.225	2.6
0.005	0.116	0.113	2.6

برای بررسی خطی بودن در طول موج ۳۴۰ نانومتر از محلول دی کرومات پتاسیم استفاده می شود.

برای تهیه محلول، پودر دی کرومات پتاسیم را در oven با حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت خشک کرده و 200 میلی گرم آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال به حجم ۱ لیتر برسانید. این محلول را بعنوان ذخیره در شیشه تیره نگهداری نمایید. محلول ذخیره جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال، می توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در مقابل بلانک اسید سولفوریک، در طول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی نمود. بطور مثال با تهیه محلولهایی با غلظت 200 ، 150 ، 100 ، 50 ، 25 و 10 میلی گرم در لیتر نتایج زیر بدست آمده و Bias محاسبه گردیده است.

مشابه مثال قبل جذب نوری حدود 0.4 را ملاک قرار داده و با تناسب مانند مثال زیر جذب نوری مورد انتظار هر غلظت را محاسبه نمایید.

جذب نوری غلظت

جدول ۴-۱

0.493 50

x 25

Bias %	جذب نوری بدست آمده	جذب نوری مورد انتظار	غلظت محلول دی کرومات پتاسیم mg/L
1.8	2.007	1.972	200
0.5	1.486	1.479	150
0.5	0.991	0.986	100
-	0.493	-	50
0.8	0.245	0.247	25
4	0.095	0.099	10

میزان عدم صحت مجاز در هر رقت حداکثر ۵٪ پیشنهاد می‌شود. ولی بهتر است این مقدار را براساس دستورالعمل سازنده تعیین نمود.

۲- صحت فتومتریک

بررسی صحت فتومتری با استفاده از محلول دی کرومات پتاسیم : بیش از ۵۰ میلی گرم از دی کرومات پتاسیم را به مدت یکساعت در درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرارداده تا خوب خشک شود. سپس با ترازوی کالیبره، دقیقاً ۵۰ میلی گرم از ماده فوق برداشته و در یک لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال حل می‌گردد. سپس اسپکتروفتومتر توسط بلانک اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال در طول موج ۳۵۰ نانومتر صفر شده و جذب نوری محلول دی کرومات پتاسیم در اسید سولفوریک قرائت می‌گردد. جذب نوری در محدوده 0.005 ± 0.536 نشاندهنده صحت فتومتریک دستگاه می‌باشد.

نکته : بررسی صحت فتومتری با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد(بعلت عدم دسترسی به طول موج ۳۵۰ نانومتر). این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکتهای پشتیبان ، انجام گردد.

(مواد استاندارد مرجع SRM جهت کالیبراسیون و تأییدیه عملکرد اسپکتروفتومتر و فتومتر توسط انستیتوی مواد مرجع و روشها در اروپا IRMM و انستیتوی ملی استاندارد و تکنولوژی امریکامعرفی شده است . www.nist.gov/bcwww.irmm.jrc/)

۳- صحت طول موج

ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم در تاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن تنظیم شده است .

راحتترین و قابل دسترس ترین روش برای اسپکتروفتومترهایی که با نور مرئی کار می کنند، استفاده از محلول سیان مت هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی لیتر درابکین) بوده که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر است. ابتدا با محلول درابکین به عنوان بلانک دستگاه را صفر کرده و سپس جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ ، ۵۳۵ ، ۵۴۰ ، ۵۴۵ و ۵۵۰ نانومتر قرائت می‌گردد.(لازم بذکر است پس از هر تغییر طول موج ، باید جذب نوری دستگاه با محلول بلانک صفر گردد.) بر اساس طول موج و میزان

جذب، یک منحنی رسم می‌گردد که در صورت وجود صحت طول موج، حداکثر جذب نوری را در ۵۴۰ نانومتر نشان خواهد داد.

نکته: بررسی صحت طول موج با استفاده از روش گفته شده برای فتومتر امکانپذیر نمی‌باشد. این بررسی می‌بایست با استفاده از محلولها یا فیلترهای مناسب و توسط شرکت‌های پشتیبان، انجام گردد.

۴-آزمون رانش فوتومتری (Drift)

یکی از منابع اصلی خطا در اسپکتروفوتومتری، که به علت فرسودگی شدید منبع نوری رخ می‌دهد، عدم پایداری مقدار جذب خوانش شده در طول زمان می‌باشد.

برای بررسی، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر نموده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیل، جذب نوری این محلول هر ۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (بمدت یکساعت) قرائت می‌گردد. حداکثر تغییر مجاز در جذبهای نوری قرائت شده طی این مدت $0.005 \pm$ می‌باشد.

بعنوان مثال اگر جذب محلولی در ابتدا 1.259 باشد در مدت یکساعت می‌تواند در محدوده 1.259 ± 0.005 تغییر نماید.

۵-نورهای ناخواسته (Stray light)

نورهای ناخواسته، نورهایی هستند که غیر از نور عبور داده شده از منوکروماتور، به نمونه تابیده می‌شوند. برای اینکار محلولی که نور را بطور کامل جذب می‌کند (مثل استن یا نیتريت سدیم در طول موجهای خاص) در مسیر عبور نور قرار داده می‌شود. در این حالت می‌بایست ترانس میتانس 0٪ (جذب بی‌نهایت و غیر قابل خوانش) باشد زیرا نور از محلول عبور نکرده و به دتکتور نمی‌رسد.

برای بررسی انوار ناخواسته محلول آبی ۵۰ گرم در لیتر سدیم نیتريت تهیه و در مقابل بلانک آب مقطر در طول موج ۳۰۰ تا ۳۸۵ نانومتر خوانش می‌شود. ترانس میتانس میباید $T=0\%$ باشد.

توجه: آزمایشگاههایی که از فتومتر استفاده می‌نمایند، از بین پارامترهای گفته شده تنها می‌توانند خطی بودن، رانش فوتومتری و انوار ناخواسته را بررسی نمایند. سایر موارد ذکر شده و همچنین دمای محفظه باید از طریق شرکت پشتیبان بررسی شود.

سانتریفوژ

سانتریفوژ نمودن یکی از روشهای جدا سازی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز، قسمت‌های سبکتر یک محلول، مخلوط و یا سوسپانسیون، از قسمت‌های سنگینتر آن جدا میشود.

اساس عمل سانتریفوژ، حرکت دورانی حول یک محور ثابت است. نیروی سانتریفوژ یا Relative Centrifugal Force (RCF) بستگی به شعاع و سرعت دوران داشته، با فرمول زیر محاسبه و واحد آن نیز بر اساس ضربی از g (gravity) بیان میشود. (بطور مثال $500 \times g$)

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$$

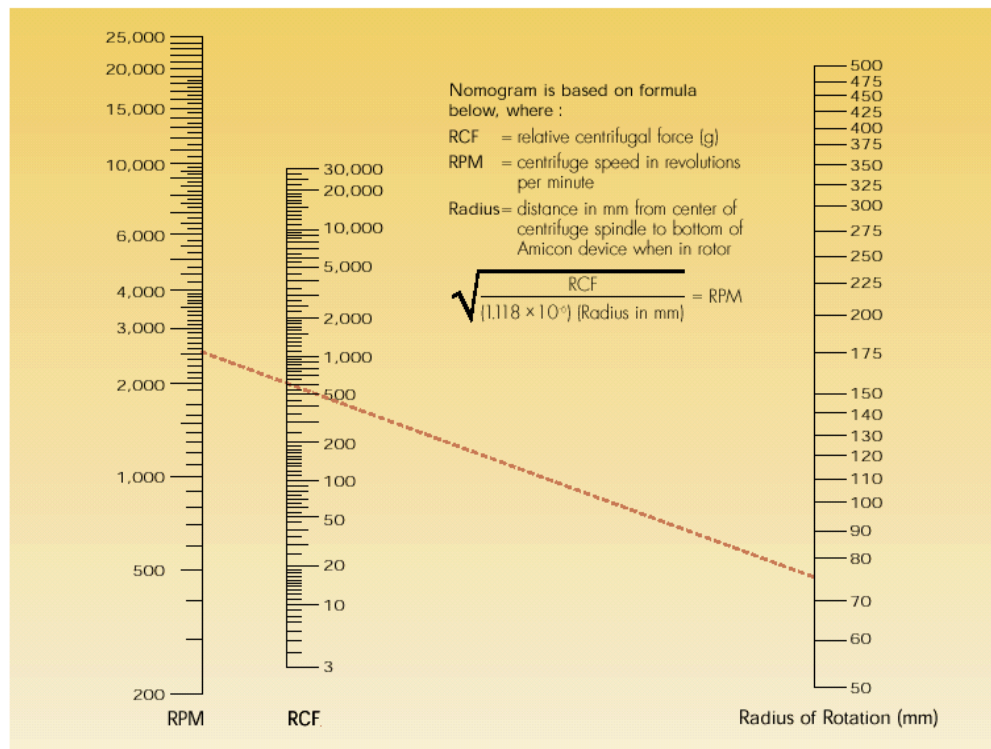
مقدار تجربی قراردادی 1.118×10^{-5}

شعاع سانتریفوژ بر حسب سانتیمتر $r =$

مقدار شعاع، از مرکز چرخش سانتریفوژ (محور) تا انتهای لوله درون سانتریفوژ اندازه گیری میشود

سرعت چرخش بر حسب دور در دقیقه $\text{rpm} =$

نیروی سانتریفوژ RCF را میتوان به وسیله نمودگرام نیز تعیین نمود



در این حالت با کشیدن خطی که از شعاع سانتریفوژ و g مورد انتظار عبور می کند و ادامه آن، سرعت بدست می آید. بعنوان مثال در شکل فوق برای بدست آوردن قدرت 500g در سانتریفوژی که شعاع آن ۷۵ میلی متر است، لازم است سرعت روی ۲۵۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردد.

انواع سانتریفوژ :

سانتریفوژ های شناور (Horizontal- head /Swinging- bucket) و سانتریفوژ های زاویه ثابت ، انواعی از سانتریفوژ هستند که بیشتر در آزمایشگاههای تشخیص طبی استفاده میشوند .

در سانتریفوژ های شناور، لوله ها در حالت توقف وضعیت عمودی و در حال حرکت وضعیت افقی دارند.

در سانتریفوژهای زاویه ثابت ، لوله ها در همه حال دارای زاویه ثابت نسبت به محور سانتریفوژ می باشند. سرعت این نوع سانتریفوژ ، می تواند نسبت به مورد قبلی بیشتر باشد ولی در زمان چرخش بعلت مقاومت به هوا ، درون آن گرمای بیشتری ایجاد شده و دما بالا می رود.

انتخاب سانتریفوژ در آزمایشگاه باید با توجه به نوع مصرف (مانند سرعت مورد نیاز، حداکثر دمای قابل قبول و...) و نیز مختصات فنی مندرج در کاتالوگ دستگاه صورت گیرد.

نکات مهم در استفاده از سانتریفوژ :

- در کار روزانه نباید سانتریفوژ را با درب باز به کار انداخت .
- استفاده از لوله های مناسب و توصیه شده سازنده و رعایت توازن لوله ها و حجم نمونه ها هنگام استفاده از سانتریفوژ از نکات اساسی در استفاده صحیح سانتریفوژ میباشد . بطور معمول وزن لوله های حاوی نمونه که مقابل هم قرار گرفته اند نباید بیش از ۱٪ متفاوت باشند. وزن مجموع لوله های حاوی نمونه نباید از وزن تعیین شده سازنده برای سرعت خاص ، تجاوز نماید .
- لازم است درب لوله های حاوی خون قبل از سانتریفوژ بسته شود تا از پخش آئروسول در محیط جلوگیری گردد . از استفاده از اپلیکاتورهای چوبی جهت خارج کردن لخته قبل از عمل سانتریفوژ به علت افزایش احتمال همولیز باید خودداری شود .

نگهداری و کنترل کیفیت سانتریفوژ :

تمیز نگهداشتن سانتریفوژ در کاهش انتشار آلودگی ها بسیار مهم است و باید در فواصل زمانی مشخص انجام شود .

برای کنترل کیفیت سانتریفوژ لازم است موارد زیر بررسی گردد:

سرعت سانتریفوژ : ابزار سنجش سرعت سانتریفوژ، تاکومتر است .سرعت سانتریفوژ باید حداقل هر سه ماه یکبار بررسی شده و میزان سرعت اندازه گیری شده نباید بیش از ۵٪ با سرعت مورد انتظار (سرعت انتخابی هنگام کار با سانتریفوژ) متفاوت باشد . برای بررسی سرعت سانتریفوژ با تاکومتر مراحل زیر انجام میشود :

- قفل سانتریفوژ را در حالتی قرار دهید که در حال باز بودن در ، چرخش انجام شود.
- کاغذ مخصوص همراه تاکومتر را نزدیک مرکز محور سانتریفوژ (نه در روی مرکز محور) بچسبانید. این کار باعث می شود در هر بار چرخش ، نور یکبار از کاغذ مخصوص به تاکومتر باز تابیده شود.
- سانتریفوژ را با دور مورد نظر تنظیم نموده و روشن کنید.
- تاکومتر را در فاصله مناسب نسبت به کاغذ نشاندار نگهداشته و آنرا روشن کنید.
- هنگامیکه عدد نمایش داده شده روی تاکومتر ثابت ماند ، آن را یادداشت نموده با سرعت انتخاب شده اولیه مقایسه نمایید .

زمان سنج سانتریفوژ: بهتر است زمان سنج بصورت هفتگی در مقابل زمان سنج کالیبره مورد بررسی قرار گیرد. برای این امر زمان سنج را در زمانهای مختلف تنظیم وبا کروномتر مقایسه کنید . اعداد حاصله نباید بیش از ۱۰٪ با زمان مورد انتظار متفاوت باشد.

کنترل دما: برخی سانتریفوژ ها هنگام کار ایجاد حرارت زیاد در محفظه داخل سانتریفوژ مینمایند و این دما میتواند بر کیفیت نمونه و غلظت کمیت های آن تاثیر گذار باشد لذا هنگامی که اندازه گیری کمیتی مورد نظر است که به دما حساس میباشد، بهتر است از سانتریفوژ یخچال دار استفاده شود . برای کنترل دما ، می توان در لوله آزمایش ، آب مقطر ریخته و دمای آنرا تعیین نمود. سپس لوله در سانتریفوژ قرار گرفته و دستگاه با دور مشخص روشن می شود . پس از مدت مقرر ، دمای آب داخل لوله مجددا اندازه گیری می شود . دمای سانتریفوژهای یخچال دار میباید هر ماه بررسی شده و میزان دمای اندازه گیری شده نباید بیش از ۲ درجه سانتی گراد با دمای مورد انتظار متفاوت باشد .

بن ماری

برای انجام آزمایش در محیط مرطوب و دمای خاص از بن ماری استفاده می شود. برای استفاده مناسب از بن ماری باید به موارد زیر توجه داشت.

- ۱- سطح آب در بن ماری باید بالاتر از سطح مایعات انکوبه شده باشد.
- ۲- آب بن ماری باید مرتبا تعویض گردد تا از رشد میکروبها جلوگیری بعمل آید.
- ۳- برای جلوگیری از ایجاد رسوب بهتر است از آب مقطر برای پر کردن بن ماری استفاده شود. در صورت ایجاد رسوب می توان از اسید کلریدریک رقیق برای از بین بردن رسوبها استفاده نمود.
- ۴- برای اطمینان از دمای بن ماری می بایست دمای آب، روزانه بوسیله دماسنجی غیر از دماسنج درون بن ماری، کنترل گردد.
- ۵- در مورد بن ماری هایی که فاقد سیرکولاتور آب می باشند ، لازم است در چهار گوشه بن ماری دماسنجهای دقیق قرار گرفته و نتایج آن با دماسنج درون بن ماری مقایسه گردد.
- ۶- میزان خطای مجاز دما برای آزمایشهای نقطه پایانی (end point) ± 0.5 می باشد.

یخچال

برای استفاده صحیح از یخچال باید به موارد زیر توجه داشت :

- ۱ - یخچالها باید طوری قرار گیرند که هوای کافی از مبرد که عموما در پشت یخچال است ، عبور نماید.

- ۲ - دمای یخچال باید روزانه دو بار در ساعات مشخص، اندازه‌گیری و ثبت شود. با توجه به امکان وجود اختلاف دما، درجه حرارت بخشهای مختلف یخچال باید بررسی گردد.
- ۳ - محفظه یخ باید همراه بررسی و در صورت وجود یخ تمیز شود.
- ۴ - غبار روی مبرد ماهانه پاک شود.
- ۵ - لاستیک دور در، مرتباً بررسی شود.

ترازو

عواملی مانند دما، رطوبت، نیروی جاذبه و هوا می‌توانند در اندازه‌گیری صحیح وزن مواد تداخل نمایند.

برای نگهداری و برای استفاده صحیح از ترازو باید به موارد زیر توجه داشت :

- ۱ - ترازو باید در محلی دور از جریان هوا، دقیقاً در وضعیت افقی و در مکانی ثابت و بدون ارتعاش قرار گیرد.
- ۲ - ترازو باید پیش از هر اندازه‌گیری صفر شود.
- ۳ - ظرفی که برای توزین استفاده شود باید تا حد امکان کوچک باشد (با توجه به حجم ماده مورد توزین). از بکار بردن ظروف پلاستیکی باید خودداری شود.
- ۴ - ظرف و ماده مورد توزین باید قبل از توزین به حرارت اتاق رسانده شوند.
- ۵ - دست را نباید وارد محفظه توزین نمود زیرا باعث گرم شدن محفظه می‌شود. بهتر است از پنس استفاده شود.
- ۶ - ماده مورد توزین را باید وسط کفه قرار داد.
- ۷ - ترازو باید تمیز نگه داشته شود. در صورت ریختن مواد شیمیایی باید سریعاً محل را تمیز نمود. برای پاکسازی عوامل بیولوژیک از الکل ۷۰ درصد استفاده می‌شود.
- ۸ - برای اطمینان از صحت اندازه‌گیری لازم است علاوه بر کالیبراسیون داخلی، در فواصل زمانی مشخص با استفاده از وزنه‌های کالیبره با وزن معین، صحت عملکرد را بررسی کرد یا از طریق مراجع کالیبراسیون معتبر، اقدام به کالیبراسیون دستگاه نمود.

سیستم‌های تخلیص آب

آب خالص یکی از ارکان ضروری بسیاری از فعالیتهای آزمایشگاهی می‌باشد. درجه خلوص مورد نیاز آب به مورد مصرف آن بستگی دارد.

برای تهیه آب از روشهای تقطیر، اسموز معکوس و دیونیزه کردن استفاده می‌شود. از آنجائیکه هیچیک از این روشها به تنهایی، معیارهای NCCLS (کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی امریکا که به CLSI

تغییر نام داده است) برای آب نوع ۱ را تامین نمی‌نمایند، در صورت نیاز به این نوع آب باید دو روش تخلیص را با هم استفاده نمود.

توانایی روشهای مختلف تخلیص آب در برداشت ناخالصیها به تفکیک نوع روش براساس دستورالعمل NCCLS در جدول ۱-۵ آمده است.

جدول ۱-۵

Purification Process	Major Classes of Contaminants					
	Dissolved Ionized Solids	Dissolved Ionized Gases	Dissolved Organics	Particulate Matter	Micro-organisms	Pyrogens/ Endotoxins
Distillation	E	G/P	G	E	E	E
Deionization	E	E	P	P	P	P
Reverse osmosis	G	P	G	E	E	E
Carbon adsorption/absorption	P	P	E/G	P	P	P
Filtration (0.22)	P	P	P	E	E	P
Ultrafiltration	P	P	P	E	E	P

E : Excellent G : Good P : Poor

موارد استفاده از انواع آب بشرح زیر می‌باشد.

نوع III : برای شستشوی ظروف شیشه‌ای و آزمایشهای کیفی مانند تجزیه ادرار

نوع II : در روشهای معمول آزمایشگاهی که به آب نوع I احتیاج ندارد .

نوع I : مواردی که کمترین تداخلات و بیشترین صحت مورد نیاز است مانند اندازه‌گیری عناصر

کمیاب

جدول ۱-۶

TABLE 1-9 NCCLS Specifications for Reagent Grade Water

	Type I	Type II	Type III
Microbiological content,* colony forming units per mL, cfu/mL (maximum)	10	10 ³	N.A.
pH	N.A.	N.A.	5.0-8.0
Resistivity,† MΩ per centimeter (MΩ-cm), 25 °C	10 (in line)	2.0	0.1
Silicate, mg SiO ₂ /L (maximum)	0.05	0.1	1.0
Particulate matter‡	Water passed through 0.2-μm filter	N.A.	N.A.
Organics	Water passed through activated carbon	N.A.	N.A.

From National Committee for Clinical Laboratory Standards: Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. 3rd ed. Approved Standard. NCCLS Document C03-A3. Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

*Microbiological content. The microbiological content of viable organisms, as determined by total colony count after incubation at 36 ± 1 °C for 14 hr, followed by 48 hr at 25 ± 1 °C, and reported as colony forming units per mL (cfu/mL).

†Specific resistance or resistivity. The electrical resistance in ohms measured between opposite faces of a 1-cm cube of an aqueous solution at a specified temperature. For these specifications, the resistivity will be corrected for 25 °C and reported in MΩ/cm. The higher the amount of ionizable materials, the lower the resistivity and the higher the conductivity.

‡Particulate matter. When water is passed through a membrane filter with a mean pore size of 0.2 μm, it is considered to be free of particulate matter.

Organic material. When water is passed through a bed of activated carbon, it is considered to contain minimum organic material.

نگهداری انواع آب : آب نوع I امکان نگهداری نداشته و باید بلافاصله بعد از تهیه مصرف گردد. آب نوع II و III را می توان در ظروف بوریسیلیکات یا پلی اتیلن با درب محکم برای مدت کوتاهی نگهداری نمود.

پیشنهاد می گردد برای اطمینان از کیفیت آب حداقل ۳ شاخص مقاومت آب ، آلودگی میکروبی و در مورد آب نوع III ، PH بررسی گردد.

برای بررسی مقاومت آب از هدایت سنج یا کنداکتومتر استفاده می شود که میزان هدایت آب را اندازه می گیرد. هدایت با مقاومت نسبت عکس دارد (Conductivity = 1/ resistance). مقاومت برای آب نوع I ، II و III به ترتیب ۱۰ MΩ/cm ، ۲ و ۰/۱ می باشد پس هدایت به ترتیب معادل ۰/۵ ، ۰/۱ و ۱۰ خواهد بود. اندازه گیری هدایت آب باید پس از اندازه گیری دما با دماسنج کالیبره و براساس دستورالعمل هدایت سنج صورت گیرد.

برای بررسی آلودگی میکروبی می بایست اجازه داد آب برای حداقل یک دقیقه براحتی از دستگاه خارج شود. سپس در یک ظرف استریل ۱۰ میلی لیتر آب جمع آوری می شود. آزمایش باید در مدت یکساعت از جمع آوری آب انجام شود در صورت عدم امکان کشت در مدت یکساعت، نگهداری برای ۶ ساعت در دمای ۸-۲ درجه امکانپذیر است. بعد از مخلوط کردن آب (که با ۱۰ بار سروته کردن بدست می آید) ، ۱ میلی لیتر از آب در پتری دیش ریخته می شود. سپس محیط کشت ذوب شده تا دمای ۴۶-۵۰ درجه سرد و در پتری دیش ریخته می شود (از محیط کشت های TSA، BHI یا هر محیط کشتی که از رشد باسیلهای گرم منفی پشتیبانی کند، می توان استفاده نمود). با چرخاندن پتری دیش، آب را با محیط کشت مخلوط نمائید . پس از

سرد شدن و جامد شدن آگار، دیش بطور وارونه و بمدت ۲۴ ساعت در دمای 36 ± 1 درجه سانتی گراد و سپس ۲۴ ساعت در دمای 23 ± 3 درجه سانتی گراد قرار می گیرد (مدت انکوباسیون مجموعاً ۴۸ ساعت می باشد) رشد میکروبی بصورت cfu/mL گزارش می شود.

استفاده از لوپ برای کشت آب مجاز نمی باشد.

اندازه گیری pH برای آب نوع ۳ با استفاده از pH meter و بر اساس دستورالعمل pH meter انجام می شود.

در صورت خرید آب ، می بایست مشخصات آب از طرف تولیدکننده ارائه گردد. پیشنهاد می شود آزمایشگاه در فواصل معین نسبت به کنترل آب خریداری شده اقدام نماید.

باید در نظر داشت انواعی از آب استریل که بصورت ویال عرضه می شود، الزاماً از کیفیت مورد نیاز آزمایشگاه برخوردار نبوده و باید قبل از استفاده ، میزان هدایت آن بررسی شود.

نکته: حجم ادعا شده ویالهای آب، نباید مبنایی برای به حجم رساندن کنترلها، کالیبراتورها، معرفها و... باشد. آزمایشگاه می بایست صرف نظر از حجم مندرج روی ویال، با استفاده وسایل حجمی مناسب مانند پیپت اقدام به انتقال حجم مورد نیاز نماید.

میکروسکوپ

برای حفظ کیفیت عملکرد میکروسکوپ آگاهی از نحوه صحیح نگهداری آن از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد که در زیر به نکاتی در این مورد اشاره می شود:

۱- هنگامی که از میکروسکوپ استفاده نمی شود، لامپ آن خاموش و با روکش مناسب پوشانده شود.

۲- بلافاصله پس از استفاده، روغن ایمرسیون از روی عدسی های شیئی پاک شود.

۳- قبل و بعد از استفاده از میکروسکوپ، قسمتهای نوری با دستمال مخصوص لنز، کاغذهای جاذب یا پارچه نرم آغشته به محلولی متشکل از یک حجم اتر و یک حجم ایزوپروپیل الکل، پاک شود.

۴- برای پاک کردن لنزها نباید از گریل استفاده شود. لنزها نمی بایست در الکل خیسانده شوند.

۵- در حال مشاهده لام ، برای وضوح تصویر ، هیچگاه عدسی های شیئی را خیلی پائین نبرید زیرا ممکن است منجر به خراشیدگی اسلاید و صدمه به لنز شود.

۶- عدسی های شیئی نباید از میکروسکوپ جدا شوند.

۷- در هوای گرم و مرطوب به منظور جلوگیری از رشد قارچ بر روی لنزها ، می‌توان میکروسکوپ را هر عصر در محفظه‌ای که با یک یا دو لامپ ۴۰ وات گرم شده و محیط خشکی فراهم آورده ، قرار داد. باید توجه داشت دمای آن محفظه نمی‌بایست بیش از ۵ درجه از دمای آزمایشگاه بالاتر باشد.

۸- در هوای گرم و خشک که مشکل اصلی گرد و غبار است ، علاوه بر پوشاندن میکروسکوپ در ساعات غیر کاری، در پایان روز می‌بایست گرد و غبار لنزها را با دمیدن هوا از وسیله‌ای مانند پوار یا با استفاده از برس مخصوص لنز یا قلم موی نقاشی و در صورت لزوم کاغذ مخصوص لنز (Lense paper) تمیز نمود.

رفرانس:

paramedicine.kaums.ac.ir/library/raves-con.pdf
edc.recent.ir/default.aspx?item=7797