

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 پیست / 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 بسته 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 ۱-۳ 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- درسمپلرهای 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 می‌گردد. 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 و نیز قابلیت تکرار آن کنترل می‌شود.

مواد و ابزار مورد نیاز:

۱- ماده رنگی:

• رنگ سبز خوراکی

یا

• پارانیتروفنل

Paranitrohenol (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 1999 Tietz 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 تقسیم می شوند:

الف) ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر

ب) ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر

پ) حجمهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر

برای هریک از گروههای فوق میبایست یک محلول ذخیره از " رنگ "تهیه نمود . از آنجایی که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۴ / ۰ 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 (۱۰۰-۱۰ 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 می شود. (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 باتوجه 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 پارانیتر و فنل ، رقتهای مورد نیاز طبق جدول ۱ میباید در سود ۰/۰۱ نرمال تهیه شود . در حالیکه برای رنگ سبز خوراکی از آب مقطر استفاده می شود.

جدول (۱-۱)

رقت حاصله	حجم رنگ برداشتی از محلول ذخیره توسط سمپلر بر حسب میکرولیتر	آب مقطر یا سود ۰/۰۱ نرمال برداشتی توسط پی پت بر حسب میلی لیتر	حجم سمپلر مورد کنترل بر حسب میکرولیتر	گروه سمپلر
۱/۱۰۰۱	۵	۵	۵	گروه پ
۱/۱۰۱	۱۰	۱	۱۰	گروه ب
۱/۱۰۱	۲۰	۲	۲۰	گروه ب
۱/۱۰۱	۲۵	۲/۵	۲۵	گروه ب
۱/۱۰۱	۵۰	۵	۵۰	گروه ب
۱/۱۰۱	۱۰۰	۱۰	۱۰۰	گروه ب
۱/۱۱	۲۰۰	۲	۲۰۰	گروه الف
۱/۱۱	۵۰۰	۵	۵۰۰	گروه الف
۱/۱۱	۱۰۰۰	۱۰	۱۰۰۰	گروه الف

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

$$mean = \frac{\sum x_i}{n}$$

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

$$CV\% = \frac{SD * 100}{mean}$$

CV : ضریب انحراف (Coefficient of variation)

SD : انحراف معیار

mean : میانگین جذب نوری لوله ها

n : تعداد خوانده 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 خوانده 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) و یا (۱/۱۱) بدین منظور با پی پت کلاس A، مقداری از محلول رنگی ذخیره (متناسب با گروه حجمی سمپلر و 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 ۱/۱۰۰۱:

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 ۱۰۰-۱۰ 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 ۱۰۰۰-۱۰۰ 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.

۲۰ _____ کنترل کیفیت در آزمایشگاههای پزشکی

پس از اطمینان از یکنواختی محللول صحت تهیه شده ، محللول حداقل در سه لوله ریخته و جذب نوری هر سه لوله قرائت می شود . میانگین خوانده ها بعنوان معیار مقایسه صحت در بررسی 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 محللول 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 فناوری 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 $CV\% = 2\%$ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت $Bias\% = 3\%$ 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 می‌نمایند (سمپلرهای Fixed Volume) در صورت وجود Bias غیرقابل قبول، می‌توان 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 مورد بیشتر انواع سمپلر صادق می‌باشد.

- کلیه قسمت های خارجی اغلب سمپلرها را می‌توان 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 می‌شود. 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 می‌گیرد) 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 می‌تواند این وسیله را از کالیبراسیون خارج نماید.
- ۲- با انتخاب سر سمپلر مناسب، حجم محلول برداشتی باید در حدی باشد که مایع وارد قسمتهای داخلی نگردد.