

کالیبراسیون پیپت در آزمایشگاه

مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعائی سازندگان میکرو پیپت‌ها نیز بسیار کاهش یافته است. حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت $CV = 2\%$ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت $Bias = 3\%$ پیشنهاد می‌شود. در برخی از انواع سمپلرها که حجم ثابتی را برداشت می‌کنند (سمپلرهای Fixed Volume) در صورت وجود Bias غیر قابل قبول، می‌توان با استفاده از اطلاعات مندرج در راهنمای سمپلر، حجم برداشتی را تصحیح کرد.

پایداری صحت و دقت

برای حفظ صحت و دقت، پیپت باید در فواصل دوره‌ای کالیبره شود. این دوره به عوامل متعددی بستگی دارد. از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- مهارت و آموزش اپراتورها و مراقبت‌های لازم در زمانی که پیپت مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- نوع مایع مکش شده توسط پیپت نیز مهم است. بخارات ناشی از محلول‌های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خوردندگی، ممکن است در تماس با پیستون، اتصالات و حلقه پلاستیکی قرار گرفته و صدماتی را ایجاد کنند. بنابراین باید بخش نگه دارنده، پیستون و حلقه به خوبی با آب مقطر شسته شوند.

کالیبراسیون پیپت، یکی از کارهای اساسی در آزمایشگاه است. پیپت‌ها ابزارهایی آزمایشگاهی هستند که در طرح‌ها و اندازه‌های مختلف ساخته می‌شود، و برای جابجایی و رقیق سازی حجم ویژه‌ای از مایعات به کار می‌رود. تعداد زیادی دفترچه راهنما توسط شرکت‌های سازنده ارائه شده که در آنها دستورکار و شیوه‌ی کالیبراسیون آمده است. پیپت، فضای خلأئی را برای کشیدن مایع ایجاد می‌کند. ابزار متداولی است که در آزمایشگاه‌ها، شرکت‌های دارویی، مراکز درمانی و موسسات مراقبت بهداشتی استفاده می‌شود. از آنجا که پیپت برای اندازه‌گیری و انتقال مواد، ضروری است، کالیبراسیون آن هر چند ماه یک بار اجباری می‌باشد. بسیاری از پیپت‌های مورد استفاده در آزمایشگاه، پیپت جابه‌جایی هوا هستند که از طریق اندازه‌گیری و انتقال محلول کار می‌کنند. مکانیسم استفاده شده، یک پیستون است که توسط انگشت شست کاربر فعال می‌شود. نوک پیپت در محلول مورد نظر قرار گرفته و حجم مشخصی از آن را دربرمی‌گیرد.

ارزیابی دقت و صحت

نخستین معیار مقایسه برای کنترل کیفیت سمپلرها، میزان ادعا شده توسط سازندگان سمپلر برای Inaccuracy (Bias) و CV (Imprecision) است. چرا که به دنبال ارتقای فناوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار،

● صحت و دقت بالا از موارد ضروری در هر پیپت است. مخصوصاً در کاربردهایی که نیاز به دقت فوق‌العاده‌ای دارند، کالیبراسیون دستگاه باید بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد.

● فاصله زمانی مشخصی برای کالیبراسیون وجود ندارد اما هر شرکتی موظف است تا روال کالیبراسیون و نکات مربوط به دستگاه خود را شرح دهد.

● تحت شرایط نرمال، بهتر است که پیپت‌ها هر شش ماه یک بار کالیبره شوند تا عملکرد رضایت‌بخشی را به ارمغان آورند. برخی کاربردهای ضروری به کالیبراسیون ماهانه نیاز دارند. حتی در بعضی آزمایشگاه‌های تخصصی بررسی روزانه پیپت نیز صورت می‌گیرد.

حجم اسمی

بزرگ‌ترین حجم قابل انتخاب برای کاربر است که توسط سازنده تعیین می‌شود. برای حفظ صحت و دقت، پیپت باید در فواصل دوره‌ای کالیبره شود.

عوامل موثر بر عملکرد میکروپیپت

✓ اپراتور باید برای استفاده درست از پیپت آموزش دیده باشد و گاهی چند عملکرد آن را با استانداردهای تعیین شده مقایسه کند تا از صحت کار خود مطمئن شود.

✓ بیشتر کاربران باید آگاه باشند که درجه حرارت و رطوبت نسبی می‌تواند عملکرد پیپت را تحت تاثیر قرار دهد.

✓ در پیپت‌های اولیه، انتقال گرما از دست‌های اپراتور سبب تغییرات کوچکی در حجم پیپت می‌شود. گرما از طریق ابزار مورد استفاده، جذب و به درون آن منتقل می‌شود. پیپت‌های جدیدتر فضاهای هوایی دارند در نتیجه کمتر رسانای دما هستند. استفاده از آن‌ها بهترین تکنیک برای افزایش دقت است.

✓ یکی از علل شایع بی‌دقتی و اشتباه، خستگی اپراتور است. حتی بهترین اپراتورهای آموزش دیده نیز ممکن است در کار خود با کاهش صحت و دقت مواجه شوند.

✓ طراحی بسیاری از پیپت‌ها به گونه‌ای است که نیروی مورد نیاز وارد شده توسط انگشت شست کاربر را کاهش می‌دهند و علاوه بر این برای کاربردهای طولانی مدت وزن کمتری نیز دارند که خستگی دست و در نتیجه میزان خطا را کاهش می‌دهد.

✓ در هر دستگاه یا ابزار مکانیکی، مولفه‌های متعددی از جمله اصطکاک، سائیدگی، شکستگی و از دست دادن مقاومت، در حرکت تاثیرگذار است. در پیپت که هدف، ایجاد یک خلاء دقیق با استفاده از پیستون، انتقالات مکانیکی

و سایر اتصالات لاستیکی یا پلیمری است نیز تمامی موارد فوق می‌توانند عملکرد ابزار ما را تحت تاثیر قرار دهند. علاوه بر این اثرات خوردندگی مایع یا محلول مورد استفاده نیز می‌تواند به اجزای خارجی صدمه وارد کند یا سبب مشکلاتی در تنظیم حجم مورد نیاز کاربر شود.

نوک پیپت

نگه دارنده نوک‌ها را با دستمال تمیز کنید. نوک پیپت را به طور درست در نگه دارنده قرار دهید به گونه‌ای که ثابت بماند. نوک را ۳ مرتبه در همان محلولی که در آزمایش استفاده شده، بشویید. این عمل با نگه داشتن نوک پیپت در مایع، کشیدن و سپس رها کردن پیستون انجام می‌شود. برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر، از شست و شو و استفاده مجدد از آن‌ها خودداری کنید. اگر در سطح خارجی نوک، قطراتی از مایع وجود دارد، آن را با دستمال بدون پرز پاک کنید و در صورتی که مایع درون آن خشک شده یا قابل تمیز کردن نیست، از یک نوک جدید استفاده کنید.

کالیبراسیون

اطمینان از کالیبراسیون درست میکرو پیپت‌ها، از راه بررسی دقت و صحت عملکرد میکرو پیپت در برداشت حجم دلخواه بدست می‌آید، که نقش مهمی در برنامه‌های تضمین کیفیت دارد. اگرچه این ارزیابی به دو روش وزن سنجی و رنگ سنجی قابل انجام است، ولی در نبود ترازوهای با رزولوشن مناسب برای کنترل سمپلر و کالیبراسیون منظم، استفاده از روش رنگ‌سنجی، توصیه می‌شود. رنگ سنجی به عنوان روشی مقرون به صرفه شناخته می‌شود که بیشتر آزمایشگاه‌های معتبر آن را به کار می‌برند.

در این روش با استفاده از یک محلول رنگی با جذب پایدار، مثل رنگ سبز خوراکی در طول موج ۶۲۰-۶۳۰ نانومتر یا پارانیتروفنل در طول موج های ۴۰۱ یا ۴۰۵ نانومتر، صحت عملکرد سمپلر و نیز قابلیت تکرار آن کنترل می‌شود. از آنجا که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۰/۴ نشان می‌دهند محلول‌های ذخیره رنگی با غلظتی تهیه می‌شوند که پس از مرحله رقیق شدن دارای جذبی در حدود ۰/۴ باشند.

کالیبراسیون به روش رنگ سنجی

انجام روش رنگ سنجی با استفاده از پودررنگ سبز خوراکی و نیز پارانیتروفنل امکان پذیر است که تهیه هر دو محلول ذخیره (stock) نوشته شده است. یادآوری

می شود که در سالهای واپسین رنگ سبز خوراکی گاهی بصورت ناهمگون و یا محلول عرضه شده که در این موارد ، دستورکار زیر، کاربرد نداشته و بهتر است از پارانیتروفنل استفاده شود.

به طور معمول سمپلرها به سه گروه با حجم های

الف) ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر (ب) ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر (پ) کمتر از ۱۰ میکرولیتر، تقسیم می شوند.

برای هر یک از گروه های فوق باید یک محلول ذخیره از " رنگ " تهیه نمود. از آنجایی که اغلب فتومترها بهترین عملکرد خود را در محدوده جذبی ۰/۴ نشان می دهند محلول های ذخیره رنگی با غلظتی تهیه می شوند که پس از مرحله رقیق شدن دارای جذبی در حدود ۰/۴ باشند.

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 در صد 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 در صد است).

✓ سمپلرهای گروه پ (سمپلرهای

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

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 در صد 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 در محلول ذخیره این گروه ۴۲۰ میلی گرم در صد است).

ارزیابی دقت

برای بررسی دقت عملکرد سمپلر و به عبارتی سنجش مقدار عدم دقت یا قابلیت تکرار، ابتدا محلول ذخیره رنگی مناسب طبق روش ذکر شده در بالا و با توجه به حجم سمپلر مورد کنترل تهیه می شود، سپس ده لوله در جا لوله ای چیده و با استفاده از پیست 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 شود. 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 است.

توجه: در صورت استفاده از محلول ذخیره پارانیتروفنل، رقت های مورد نیاز طبق جدول ۱ می باید در سود ۰/۰۱

رقت حاصله	حجم رنگ برداشتی از محلول ذخیره توسط سمپلر بر حسب میکرولیتر	آب مقطر یا سود ۰/۰۱ نرمال برداشتی توسط پیست 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

جدول (۱) میزان حجم محلول مورد نیاز و رنگ برداشتی از محلول ذخیره و رقت حاصله بر حسب حجم سمپلر

۱۰۰-۱۰۰۰) رقت ۱/۱۱ :

بالن ژورنه ۱۰۰ میلی لیتری را برای سبز خوراکی با آب مقطر و برای پارانیتروفنل با سود ۰/۰۱ نرمال به حجم رسانده، سپس با پیپت کلاس A، ۱۰ میلی لیتر از رنگ ذخیره

(گروه الف) به آن اضافه و مخلوط نمایید.

نکته: هرگاه برای اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر رنگ، در بالای خط نشانه فضای خالی وجود نداشت، تا جاییکه 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 ژورنه، همه حجم را به بشر اضافه نموده و با محتویات بشکر بالن ژورنه را چند بار شست و شو می

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

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 به عنوان معیار مقایسه صحت در بررسی صحت عملکرد سمپلر استفاده می شود.

شاخصه صحت Bias است که از این فرمول بدست می آید:

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

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

نرمال تهیه شود. درحالیکه برای رنگ سبز خوراکی باید از آب مقطر استفاده شود.

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 تکرار پذیری 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) یا (۱/۱۱) بدین منظور با پیپت کلاس A، مقداری از محلول رنگی ذخیره (متناسب با گروه حجمی سمپلر و طبق روش ذیل)، به بالن ژورنه کلاس A ای که تا خط نشانه از آب مقطر پر شده اضافه می شود.

روش تهیه محلول های کنترل صحت

✓ کنترل صحت گروه پ (سمپلرهای کمتر از ۱۰ میکرولیتر) رقت ۱/۱۰۰۱ :

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

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

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

✓ کنترل صحت گروه الف (سمپلرهای کمتر از

را می توان با محلول صابون تمیز کرد و پس از آبکشی با آب مقطر در دمای اتاق خشک نمود.

▪ برای ضدعفونی کردن ، محلول ۶۰٪ ایزوپروپانل توصیه می شود. برخی از انواع سمپلر نیز قابل اتوکلاو است.

▪ پس از شست و شوی 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 است، روغن کاری شود.

▪ برای تمیز کردن قسمت های داخلی سمپلر باید به راهنمای همراه سمپلر مراجعه شود.

نرم افزار کالیبراسیون

این نرم افزار، عضو مهمی در هر آزمایشگاه کالیبراسیون است. بسیاری از آزمایشگاه ها با خرید این نرم افزار و نوشتن برنامه های مورد نیاز در اکسل، کالیبراسیون پیپت را به عهده می گیرند. خرید نرم افزار مناسب امری پیچیده بوده و استفاده از آن نیازمند گذراندن دوره آموزشی مربوطه است. قبل از خرید، سیستم عامل کامپیوتر خود را بررسی کنید تا از اجرای نرم افزار بر روی آن مطمئن شوید. علاوه بر این از فروشنده، ضمانت نامه نیز بخواهید.

منابع

[۱] www.pipettecalibration.net

[۲] www.ehow.com

[۳] www.mums.ac.ir

۴- جان ویستر، مترجمین: نجاریان سیامک ، جعفری مقدم پوریا، قاسمی کیانی نازیلا، تجهیزات پزشکی

، میزان ادعا شده توسط سازندگان سمپلر برای Imprecision (CV %) و Inaccuracy (Bias) است. چرا که بدنبال ارتقای فناوری ابزار آزمایشگاهی و بهبود کیفیت عملکرد ابزار، مقادیر عدم صحت و عدم دقت ادعایی سازندگان میکروپیپتها نیز بسیار کاهش یافته است. با توجه به مختصات کیفیتی بسیاری از میکروپیپتها، حداکثر میزان قابل قبول عدم دقت $CV\% = 2\%$ و حداکثر میزان قابل قبول عدم صحت $Bias\% = 3\%$ پیشنهاد می شود.

نکته: معیارهای یاد شده که با توجه به تنوع سمپلرهای مورد استفاده آزمایشگاه ها انتخاب شده است، اگر چه از معیارهای مجاز اعلام شده قبلی کوچکتر می باشد ولی هنوز با میزان قابل قبول برخی مراجع بین المللی فاصله زیادی دارد.

تنظیم و کالیبراسیون

در برخی از انواع سمپلرها که حجم ثابتی را برداشت می نمایند (سمپلرهای Fixed Volume) در صورت وجود Bias غیرقابل قبول ، می توان با استفاده از اطلاعات مندرج در راهنمای سمپلر، حجم برداشتی را تصحیح کرد. در مورد تنظیم سمپلرهای متغیر باید توجه داشت که هرگونه تغییر در حجمهای مختلف ، به میزان ثابت اعمال می شود. بدین معنی که تغییر ۱ میکرولیتر در حجم ۱۰۰ میکرولیتر (۱٪ تغییر) ، در حجم ۱۰ میکرولیتر نیز باعث ۱ میکرولیتر تغییر، (یعنی ۱۰٪ تغییر) خواهد شد. لذا بهتر است عمل تنظیم کالیبراسیون توسط بخش کالیبراسیون یا شرکت معتبر انجام شود.

نحوه نگهداری سمپلر

▪ نگهداری سمپلر بر اساس دستورالعمل سازنده انجام می پذیرد ولی مطالب زیر در مورد بیشتر انواع سمپلر صادق است و تمامی قسمت های خارجی اغلب سمپلرها

آماده به کار

تکنسین تجهیزات آزمایشگاهی با سابقه کار آماده همکاری به صورت نیمه وقت در استان البرز

شماره تماس: ۰۹۳۰۵۹۰۱۵۲۹

ایمیل: saeed.july@yahoo.com