جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آزمون های کنترل کیفی سرمهای درمانی:

در موسسه واکسن و سرم سازی رازی آزمون های مختلفی جهت تعیین سلامت و ایمنی سرمهای درمانی تصفیه شده و ارزیابی دقیق عیار سرمها انجام می دهند که این آزمون ها به طور کلی به دو گروه فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی تقسیم می شوند.

آزمون های گروه اول شامل: اندازه گیری PH، وزن خشک، نیتروژن پروتئین (به دو روش کجلدال و بیوره) و غیره می باشد.

آزمون های گروه دوم شامل: آزمون پیروژنی، سلامت و ایمنی، پوتنسی و غیره می باشد.

در این بخش ما به دلیل مقایسه نمونه به دست آمده و تصفیه شده توسط دستگاه دیالیز با نمونه ای که موسسه به روش سنتی دیالیز می کند آزمون های فوق را در شرایطی یکسان برای هر دو نمونه انجام دادیم و نتایج را با هم مقایسه کردیم که پاره ای از این آزمون ها و نحوه اجرای آنها را شرح داده ایم.

به دلیل اینکه آزمون های گروه اول (فیزیکو شیمیایی) در حوصله این پایان نامه و موضوع ارائه شده است لذا به ذکر این آزمون ها و نحوه اجرای آنها بسنده شده است و آزمون های گروه دوم که بیشتر جنبه پزشکی دارند را فقط به ذکر یکی از آنها که پوتنسی می باشد اکتفا کرده‌ایم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

غلظت یون هیدروژن PH:

غلظت یون هیدروژن با پارامتر PH بیان می گردد و در همه موارد به کمک PH متر الکترونیکی[1] اندازه گیری می شود. لازم به ذکر است که حدود قابل قبول PH برای سرمهای درمانی 7/2-6/4 می باشد.

وزن خشک: Total Solid

اساس آزمایش بر پایه قرار دادن 1 میلی‌لیتر سرم در شرایط خلاء درون آون در دمای $37^{\circ C}$ برای مدت 24 ساعت و سپس توزین آن می باشد.

نیتروژن پروتئین: (به روش کجلدال) Protein Nitrogen Content

نیتروژن در مواد گوناگون تحقیقاتی، صنعتی، کشاورزی یافت می شود. مثلا این عنصر را می توان در آمینواسیدها، پروتئین ها، داروهای سنتزی، کودها، مواد منفجره، خاکها، آبهای آشامیدنی و رنگها یافت. بنابراین روش های تجزیه ای برای تعیین نیتروژن خصوصاً در مواد آلی از اهمیت زیادی برخوردارند.

1 - PH متر الکترونیکی Radiometer مدل 29- دانمارک

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

معمولترین روش برای تعیین نیتروژن مواد آلی، روش کجلدال است. این روش بر پایه تتراسیونهای خنثی شدن استوار است. این روش، روشی ساده بوده و به تجهیزات خاصی نیاز ندارد و نیز می توان آن را به سهولت برای تجزیه معمولی تعداد زیادی نمونه به کار برد.

روش کجلدال، روش استانداردی برای تعیین مقدار نیتروژن در پروتئین، غلات، گوشت و سایر مواد زیستی است، چون پروتئین ها تقریباً حاوی درصد یکسانی از نیتروژن هستند، لذا با ضرب این درصد در یک عامل مناسب (6/25 برای گوشتها، 6/38 برای لبنیات، 5/7 برای حبوبات) می توان درصد پروتئین نمونه را به دست آورد.

این آزمایش روی نمونه های پلاسما و فرآورده نهایی به روش کجلدال انجام شده و مقدار نیتروژن نمونه به دست می آید.

این آزمایش روی نمونه های پلاسما و فرآورده نهایی به روش کجلدال انجام شده و میزان نیتروژن نمونه به دست می آید.

از آنجا که هر یک میلی گرم نیتروژن از 6/25 میلی‌گرم پروتئین از 6/25 میلی گرم پروتئین فراهم می شود. پس از اندازه گیری نیتروژن پروتئین می توان مقدار پروتئین را معلوم نمود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در این روش 1^{cc} نمونه سرم ضد مار یـا عقـرب را برداشـته و آن را بـا 17^{cc} سـرم فیزیولوژی (کلرور سدیم) 2^{cc} تری کلرواستیک 100% مخلوط کـرده و درون یـک لوله آزمایش ریخته و برای مدت 15 دقیقه با آژیناتور با فاصله به هم می زنیم. بعد آن را درون دستگاه سانتریفیوژ قرار می دهیم با دور 2000 دور در دقیقه برای مـدت 15 دقیقه، تا رسوب آن کاملا ته نشین شود بعد رسوب را با چند قطره سود 40% یـا 10 نرمال حل کرده و در یک بالن ژوژه 25 ریختـه و بـا آب مقطـر آن را بـه حجـم مـی رسانیم.

بعد 2^{cc} از این محلول را در فیول ریختـه و بـه آن 6^{cc} از محلـول منیرالیزاتـور مـی افزاییم. سپس فیولها را درون زنبیل گذاشته و روی هیتر قرار می دهیم. برای مدت 2 تا 3 روز در روی هیتر می ماند. اول به رنگ تیره در می آید و بعد هنگامی که بـه رنـگ سبز تبدیل شد آن را بر می داریم (به صورت سبز غلیظ) بعد این محلـول غلـیظ سـبز رنگ را برداشته و درون یک ارلن مـی ریـزیم و بـه آن 8^{cc} محلـول NaOH، 40% اضافه می نماییم که در این حالت ازت به آمونیاک تبدیل می شود.

درون یک بشر 100^{cc}، ما 10^{cc} اسید بوریک 2% می ریزیم و 3-2 قطره اندیکاتور به آن می افزاییم و می گذاریم تا بماند و سپس این محلول را قطره قطره به درون ارلن اضافه کرده تا به حجم 80 برسد و بعد توسط اسید سولفوریک $\frac{N}{70}$ تیتر کـرده تـا بـه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

رنگ صورتی تبدیل شود. و از روی میزان مصرف اسید طبق فرمول زیر می توان میزان ازت را به دست آورد که اگر در 6/25 ضرب شود میزان پروتئین به دست می آید.

$$x' = x - T$$

T: میزان شاهداست (هرسانتی متر مکعب H_2SO_4، $\frac{N}{70}$ با حدود 0.2 gr ازت ترکیب می شود و سولفات آمونیوم می دهد)

x: میزان اسید مصرفی H_2SO_4 در زمان تیتراسیون

$$N.P = \frac{x' \times 0.2 \times 25}{2}$$

Total protein= N.P * 6.25

به عنوان مثال اگر ما محلولی را با ^{cc} 4 مصرف اسید سولفوریک تیتر نماییم میزان کل پروتئین به صورت زیر محاسبه می شود.

$$x' = 4 - 0.2 = 3.8$$

$$N.P = \frac{3.8 \times 0.2 \times 25}{2} = 9.5$$

Total protein= 9.5 * 6.25 = 59.375

طرز تهیه محلول منیرالیزاتور:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

105gr سولفات پتاسیم به اضافه 6gr سولفات مس را با هم مخلوط کرده و ^{cc} 150 اسید سولفوریک غلیظ را به آهستگی به آن افزوده و سپس آنها با آب مقطر بـه حجـم 900 می رسانیم.

طرز تهیه اندیکاتور:

83mgr برموکروزول را با 17mgr متیل قرمز مخلوط کرده و با الکل 96% به حجم ^{cc} 100 می رسانیم.

$$NH_4^+ + OH^- \Leftrightarrow NH_3(aq) + H_2O$$

$$NH_3(aq) \Leftrightarrow NH_3(g)$$

$$H_3BO_3 + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

$$H_2BO^-{}_3 + H_3O^+ \rightarrow NHH_2BO_3 + H_2O$$

روش کجلدال به حضور سولفات آمونیـوم حسـاس اسـت. لـذا نمونـه هـا بایـد فاقـد سولفات آمونیوم باشد که این کیفیت با آزمایش کلرور باریم قابل بررسی است.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آزمون کلرور باریم جهت بررسی سولفات آمونیوم:

هدف این آزمایش تأیید عدم حضور مقادیر قابل توجه سولفات آمونیوم پس از دیالیز است. به عبارت دیگر کامل بودن دیالیز با منفی بودن نتیجه این آزمایش معلوم می شود.

انجام این آزمایش از آنجا که غلظت پروتئین یا نیتروژن پروتئین فرآورده نهایی تصفیه به روش بیوره یا کجلدال انجام می گیرد و هر دو روش به حضور یون آمونیوم حساس هستند حائز اهمیت است. نتیجه آزمایش مذکور اگر منفی باشد نشانه حضور مقادیر بسیار ناچیز یون آمونیوم (حدود چند میکروگرم در لیتر) در نمونه است.

روش کار بدین صورت است که 1ml از نمونه محلول حاصل دیالیز را در لوله آزمایش ریخته و به آن 8ml سرم فیزیولوژی و 1 ml کلرو باریم 10% اضافه می شود.

اگر محلول حاصل کدر شود نشانه ایجاد رسوب $BaSO_4$ است و در غیر این صورت اگر محلول شفاف بود می توان نتیجه می گرفت که غلظت یون سولفات در نمونه بسیار ناچیز و کمتر از $4\mu g/Lit$ است. (این مقدار با توجه به ثابت حاصلضرب حلالیت سولفات باریم محاسبه گردیده است که چیزی در حدود ($ksp = 1/3 \times 10^{-13}$ است)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در این شرایط غلظت یون آمونیوم نمی تواند خطای قابل ملاحظه ای در سنجش غلظت پروتئین با روش های بیوره یا کجلدال ایجاد نماید.

www.kandoocn.com
www.kandoocn.com
www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

تعیین غلظت پروتئین به روش بیوره: Biuret Method

اساس این روش مبتنی بر این واقعیت است که در یک محیط قلیایی املاح مس دو ظرفیتی (Cu^{2+}) می توانند با بیوره کمپلکس رنگی ایجاد کنند. چنین واکنشی با کلیه مواد پروتئینی که حداقل دارای دو پیوند پپتیدی هستند نیز قابل اجرا است.

این محلول عبارت است از محلول سولفات مس در یک قلیای قوی، که رنگ آبی-ارغوانی این محلول به اطلاعاتی در مورد عدد کئوردیناسیون کمپلکس بستگی دارد. بین Cu^{2+} و چهار اتم نیتروژن دو پپتید یک همسایگی و مجاورت بوجود می آید. دی پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد نمی توانند این واکنش را صورت دهند.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

این صفحه برای رسم واکنش ها است.

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کمپلکس حاصل بیشترین جذب را در طول موج 540-560nm دارد.

غلظت کمپلکس حاصل با افزایش غلظت پروتئین بیشتر شده و متناسب با آن شدت جذب در این طول موج افزایش می یابد.

بدین ترتیب به کمک اسپکتروفتومتری[1] جذبی در طول موج 540-560nm غلظت پروتئین محلول در نمونه تخمین زده می شود.

واکنشگر بیوره محلولی است محتوی 1/5gr سولفات مس ($CuSO_4$-$5H_2O$) و 6gr سدیم پتاسیم تارتارت در 500ml آب که محلول ($\frac{w}{v}$) 10٪ هیدروکسیدسدیم به آن اضافه شده و حجم آن با آب به 1 lit افزایش می یابد. برای ذخیره سازی طولانی مدت و حفظ قدرت واکنشگر، 1gr یدید پتاسیم به آن افزوده شده و در ظرف پلاستیکی و در محل تاریک و سرد ($8^{\circ C}$) نگهداری می شود.

نحوه آزمایش به این صورت است که:

ما یک نمونه Blank می سازیم که محتوی 0/5ml سرم فیزیولوژی و 2/5ml محلول بیوره است و با این نمونه نخست دستگاه را تنظیم کرده (صفر می نماییم) البته قبل از این کار نمونه را برای مدت 15 دقیقه در دمای $37^{\circ C}$ قرار می دهیم. سپس در 8 لوله آزمایش نمونه های زیر را می سازیم.

---

1 ـ اسپکتوفتومتر Jonior مدل coleman Instrument, 16A – آمریکا specto

1 – photometry

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

Additions (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8
Standard BSA (2mg/ml)	-	0.1	0.2	0.4	0-6	0.8	1.0	1.2
H_2O (deionized)	1.5	1.4	1.3	1.1	0.9	0.7	0.5	0.3
Biuret reagent	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

و برای مدت 15 دقیقه در دمای $37^{\circ C}$ درون آن قرار می دهیم.

بعد با نمونه اول که آن هم یک نمونه Blank است دستگاه UV را کـه در 540 nm جذب، تنظیم شده صفر می نماییم.

سپس لوله های 2 تا 8 را یکی پس از دیگری درون دستگاه قرار می دهیم و جذبشـان را می خوانیم و در دستگاه ثبت می نماییم و نمودار گراف آن را رسم مـی نمـاییم کـه اگر به صورت یک خط راست بود، نمونه های ما قابل قبول هستند و بعد نمونه سـرم اصلی را درون دستگاه قرار داده و آن نمونه را آنقدر رقیق کـرده کـه جـذبش در روی

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

خط راست قرار می گیرد. (در محدوده جذب باشد) بعد عدد جذب نشان داده شده را در مقداری که رقیق کرده ایم ضرب کرده و میزان پروتئین حاصل به دست می آید.

روش دیگری هم وجود دارد که به صورت زیر می باشد. سه لوله آزمایش مطابق زیر آماده می شود.

لوله شماره 1 (Test): محتوی 0/5ml نمونه مورد آزمایش به علاوه 2/5ml واکنشگر بیوره

لوله شماره 2 (Standard): محتوی 0/5ml از محلول پروتئین استاندارد (6mg/ml) به علاوه 2/5ml واکنشگر بیوره.

لوله شماره 3 (Blank): محتوی 0/5ml سرم فیزیولوژی بعلاوه 2/5ml واکنشگر بیوره

تمامی لوله ها را در دمای $37^{\circ C}$ برای مدت 30 دقیقه قرار می دهیم. ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر را با بلانک صفر کرده و سپس میزان جذب لوله های 1 و 2 در طول موج 540-560nm اندازه گیری می شود.

برای محاسبه غلظت پروتئین از رابطه:

$$\text{غلظت پروتئین نمونه مورد آزمایش (mg/ml)} = \frac{\text{مقدار جذب لوله شماره 1}}{\text{مقدار جذب لوله شماره 2}} * 6$$

به دست می آید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

غلظت پروتئین نمونه مورد آزمایش به روش بیـوره (حساسـیت روش بیـوره mg/ml 1-6) هنگامی به مقدار واقعی نزدیک است که بین 1-6 mg/ml باشـد، در غیـر ایـن صورت می توان با غلیظ یا رقیق کردن، غلظت آن را در حدود دامنه مذکور قرار داد.

www.kandoocn.com
www.kandoocn.com
www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آزمون پوتنسی:

Potency

این آزمایش به منظور تعیین قدرت سرمهای درمانی ضد سم در خنثی سازی سم صورت می گیرد. هنگامی که مقدار معینی سم استاندارد، با رقتهای مختلف سرم ضد سم مخلوط شود و به حیوان تزریق گردد. واکنش بدن حیوانات در برابر سم با بعضی رقتهای ضد سم سرکوب می شود. بدین ترتیب حداقل مقدار سرم ضد سم برای خنثی کردن اثر سم تعیین می شود.

اساس این آزمایش بدین صورت است که تعدادی موش را انتخاب کرده و آنها را برای تزریق سم آماده می نماییم. دزهای مختلفی از سم را درست کرده و سپس آن را به بدن حیوان همراه با پادزهر تزریق کرده که تزریق از ناحیه دم موش صورت می گیرد. سپس موشها را برای مدت 24 ساعت به حال خود می گذاریم و پس از این مدت به سراغ موش ها رفته و تعداد تلفات را مشاهده کرده و حداقل دزی را که سرم توانسته سم را خنثی نماید مشخص می نماییم.

بدین ترتیب که در دزهای 0.1 , 0.2 , 0.3.... عمل تزریق صورت می گیرد که نحوه تهیه سم به صورت زیر است.

برای سم 0.1 ml ما به میزان 0.1 سم مار را به حجم 1^{cc} می رسانیم و بعد 1^{cc} سرم فیزیولوژی به آن می افزاییم و سپس عمل تزریق را انجام می دهیم که به هر

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

موش 0.5^{cc} از ناحیه رگ دم موش تزریق می شود. هر دز را به سه عدد موش تزریق می کنیم که در صورتی که حداقل 2 موش سالم باشند سرم ضد مار توانسته آن دز را خنثی نماید و قابل قبول است.

برای اینکه در قفس دزها با هم قاطی نشوند و بتوان فهمید که کدام موش چه دزی بهش تزریق شده است. موش ها را رنگ کرده تا با هم قاطی نشوند، هر دز یک رنگ می شود.

این آزمون موید تاثیر درمانی سرم ضد سم در غلظت های درمانی است.

www.kandoocn.com