

راهنمای دفع زائدات اتیدیوم برماید

معرفی ماده اتیدیوم بروماید

اتیدیوم بروماید از ترکیبات آروماتیک است که دارای خاصیت فلورسانس می باشد که معمولاً در آزمایشگاه های زیست شناسی ملکولی استفاده می شود. این ماده عموماً بعنوان شناساگر غیر رادیواکتیو جهت مشخص کردن باندهای اسید نوکلئیک در روشهای الکتروفورز و سایر روشهای جداسازی اسید نوکلئیک که بر پایه ژل می باشد، استفاده می شود.^{1 و 2}

اتیدیوم بروماید با فرمول ملکولی $C_{21}H_{17}BrN_3$ ، وزن مولکولی 394.4 گرم بر مول، با ظاهر ارغوانی رنگ و در حالت جامد قرمز، نقطه ذوب 260-262 درجه سانتیگراد، محلول در آب (40 g/l)، نقطه گدازش¹ 100 درجه سانتیگراد می باشد که دارای نامهای دیگری نظیر 2 و 7 دی آمینو 10 اتیل 6 فنیل فنان تریدینیوم برماید، 2 و 7 دی آمینو 10 اتیل 9 فنیل فنان تریدینیوم برماید، 3 و 8 دی آمینو 1 اتیل 6 فنیل فنان تریدینیوم برماید، همیدیوم برماید²، **EtBr** است.³ اتیدیوم برماید یک موتاژن قوی با خاصیت سمی متوسط بعد از یک تماس حاد است و ممکن است باعث آسیب ژنتیکی قابل وراثت شود و در آزمایشگاه بویژه آزمایشگاههای تحقیقاتی تولید و می تواند از طریق پوست جذب شود بنابراین ممانعت از تماس با این ماده شیمیایی بسیار مهم است. این ماده همچنین محرک پوست، چشم، بینی و دستگاه تنفس فوقانی می باشد. به همین دلیل جزء مواد زائد خطرناک محسوب شده و مدیریت آن تابع قوانین مدیریت مواد زائد خطرناک است و نباید بصورت تصفیه نشده در لوله فاضلاب ریخته شود و یا در سطل زباله قرار داده شود.⁴



این راهنما برای دفع مناسب و مطمئن اتیدیوم برماید (ژل ها و محلولها) تهیه شده است که معمولاً در الکتروفورز برای شناسایی DNA استفاده می شود. دیگر رنگهای فلورسانس عمومی که در الکتروفورز استفاده می شود، یدید پروپیدیوم، SYBR سبز و غیره. زائدات این مواد همانند راهنمای زائدات اتیدیوم برماید مدیریت می شوند.⁵

توجه: زائدات الکتروفورز شامل اکریلامید یا پلی اکریلامید باید مانند زائدات خطرناک، مطابق سیاست و روش دفع زائدات خطرناک آزمایشگاهها مدیریت شوند.

¹ Flash Point
² Homidium Bromide

بر پایه این ملاحظات، مدیریت بهداشتی و ایمنی دفع پسماندهای مختلف حاوی اتیدیوم برماید از جمله:

Ø ژلهای الکتروفورز و بقایای غیر تیز آلوده شده

Ø محلولهای اتیدیوم برماید

Ø دستکشها، تجهیزات و باقیمانده ها⁴ و⁵

روش های زیر را توصیه می کند:

دفع ژلهای الکتروفورز

مقادیر زیاد اتیدیوم برماید در ژلها برای مثال غلظتهای بالا نباید در دسترس باشد. وقتی رنگ ژل، صورتی تیره یا قرمز شود نباید در سطل زباله آزمایشگاه قرار گیرد. مدیریت بهداشتی و ایمنی آن به شرح زیر می باشد:

دفع زائدات با غلظت کمتر از 0/1 درصد اتیدیوم برماید

غلظتهای کمتر از 0/1 درصد اتیدیوم برماید، در سطل زباله آزمایشگاه قرار گیرد.⁴ ژلهای عادی که غلظت کمتر از 0.1 درصد اتیدیوم برماید دارند جزء زائدات ویژه محسوب نمی شوند. ولی بعلمت اینکه آنها هنوز از لحاظ بهداشتی و ایمنی دارای خطر بالقوه هستند، این ژلها باید مشابه جریان زائدات پزشکی دفع شوند. ژلهای زائد بایستی در بسته های زائدات پزشکی نارنجی (زرد) رنگ همراه با سایر زائدات پزشکی ریخته شوند و همانند آن زائدات با آنها رفتار شود.³ کلیه بسته های حاوی این نوع زائدات باید برچسب گذاری شوند.⁷

دفع زائدات با غلظت بیش از 0/1 درصد یا مساوی 0/1 درصد

بیش از 0.1 درصد یا مساوی 0.1 درصد: در سطلهای مواد زائد خطرناک برای سوزاندن قرار گیرد.⁴

ژل الکتروفورز که شامل سرسوزن نباشد

- جمع آوری: ژل های الکتروفورز و بقایای آزمایشگاهی که شامل سرسوزن نباشد (برای مثال دستکش، پد، حوله ها، تیوپها و غیره) در یک سطل 20 لیتری حاوی یک کیسه پلاستیکی (به رنگ سفید یا قهوه ای) است جمع آوری شود. ظروف مذکور باید دارای درپوش محکم باشد که در همه زمانها بجز هنگامیکه زائدات اضافه یا برداشته می شود، بسته باشد.
- برچسب گذاری: سطلهای محتوی زائدات را برچسب بزنید. هیچ نوع سرسوزنی نباید در سطل های فوق ریخته شود.

^۳- در دستورالعمل های ملی، پسماند های شیمیایی باید در کیسه های سفید یا قهوه ای جمع آوری گردد.

- دفع: وقتی 3/4 سطل پر شد آن را به سایت ویژه دفع مواد زائد آلوده تحویل دهید و با سطلهای خالی جایگزین کنید.^{3 و 5}

محلولهای ایتی‌دیوم برماید

دفع محلول حاوی غلظت کمتر از 10 mg/lit ایتی‌دیوم برماید

محلول حاوی غلظت کمتر از 10 mg/lit ایتی‌دیوم برماید می تواند در فاضلاب ریخته شود.^{5,7,4}

نکته: دفع این محلول در فاضلاب در جاییکه یک سیستم سپتیک استفاده می شود، مجاز نمی باشد. همه محلولهای ذخیره الکتروفورز که توسط این مکانها تولید می شوند باید توسط مراکز دفع زائدات خطرناک جمع آوری و دفع شوند.⁵

دفع محلول حاوی غلظت بیش از 10 mg/lit ایتی‌دیوم برماید

الف- محلول فوق باید به سایت ویژه دفع مواد زائد آلوده فرستاده شود .

نکته: در سایت تحقیقات کشاورزی یا ایستگاه های تحقیق دریایی که الکتروفورز تولید می کنند دفع، محلولهای تصفیه شده در فاضلاب امکانپذیر نمی باشد، در این مکانها باید آنها را جمع آوری و به سایت ویژه دفع مواد زائد آلوده تحویل دهند.⁵

ب- باید بوسیله سیستم های فیلتراسیون فیلتر شوند و خروجی آن در فاضلاب ریخته شود .

ج- غیر فعال شود (خنثی سازی شیمیایی).^{4,5}

الف - برای دفع باید به سایت ویژه دفع مواد زائد آلوده فرستاده شود

- تمام محلولهای اولیه ذخیره الکتروفورز را در یک محفظه با اندازه مناسب به روش صحیح جمع آوری کنید. درب محفظه زمانهایی که در حالت استفاده نیست باید محکم بسته شود.
- تمام محلولهای الکتروفورز ذخیره را برچسب زائدات الکتروفورز بزنید. بر روی برچسب مایع بودن ضایعات مشخص شود، و ماده متشکله محفظه بر روی برچسب قید شود.
- تمام محلولهای الکتروفورز ذخیره شده از طریق زباله سوز⁴ های مواد زائد سایتوتوکسیک و زائدات پزشکی دفع شوند و یا به سایت ویژه دفع مواد زائد خطرناک تحویل گردند.⁷ و محفظه جدید دریافت شود.^{5 و 6}

⁴ - زباله سوز استاندارد مطابق ضوابط و روشهای مدیریت اجرایی پسماندهای پزشکی و پسماندهای ویژه

در مدیریت بهداشتی و ایمنی مواد فوق تاکید بر استفاده از فیلتراسیون کربن فعال یا غیرفعال سازی شیمیایی می باشد. 4

ب - فیلتراسیون کربن فعال

فیلتر کردن محلولهای زائد ایتیودیوم برماید، بوسیله زغال فعال یک روش نسبتاً ساده و موثر برای حذف ایتیودیوم برماید است. برای استفاده بهینه از فیلتر از دستورات کارخانه سازنده استفاده کنید. کیت‌های فیلتری زیر نمونه هایی از محصولات موجود هستند:

نام کمپانی	نام محصول	کد محصول	وب سایت
Amresco, Inc.	Destaining Bags	E۷۳۲	www.amresco-inc.com
BD Biosciences-Clontech	BondEX Detoxification Cartridges	K۳۰۸۰-۱	www.clontech.com
Qbiogene	Green Bag Diposal Kit	۲۳۵۰-۲۰۰	http://www.qbiogene.com/
VWR International	Extractor WasteReduction System	۲۸۱۶۵-۵۰۰	http://www.vwrsp.com

محلول فیلتر شده می تواند همراه با مقادیر فراوان آب در فاضلاب ریخته شود. کارتریجهای فیلتر استفاده شده یا رزینها را در مخزنهای 20 لیتری الکتروفورز جهت دفع نهایی جمع آوری کنید. 4 و 5 از طریق زباله سوز 5 های مواد زائد سایتوتوکسیک همراه با زائدات پزشکی دفع کنید. 7

دو نوع کیت ساده برای فیلتراسیون کربن موجود است:

- کیت‌های کیفی (کیت‌های کیفی مانند) 6
- کیسه سبز 4 (Green bag)

کیت‌های کیفی Funnel Kit

- § محلول ایتیودیوم برماید را از میان فیلتر زغال کربن عبور دهید.
- § پساب فیلتر را در فاضلاب بریزید.
- § کربن فعال استفاده شده را در کیسه در بسته قرار داده و به همراه سایر پسماندهای خطرناک بسوزانید. 4

۴ - زباله سوز استاندارد مطابق ضوابط و روشهای مدیریت اجرایی پسماندهای پزشکی و پسماندهای ویژه

۱ funnel kit



کیسه سبز

این فیلترها شبیه کیسه های چای نپتون هستند که داخل محلول آلوده قرار داده می شوند و بعد از مدتی آن را از درون محلول خارج کرده و داخل زیاله سوز⁷ ها سوزانده می شوند. یک کیت توانایی حذف 500 mg ایتی‌دیوم برماید از محلول را دارد (1 • mg EtBr/bag)

مراحل کاربرد

- § کیسه سبز را داخل محلول ایتی‌دیوم برماید قرار دهید
- § اجازه دهید که زمان لازم بگذرد.
- § پساب فیلتر را در فاضلاب بریزید.
- § کیسه سبز را در سطل مواد زائد خطرناک برای سوزاندن قرار دهید.^{4 و 8}



ج - خنثی سازی شیمیایی (chemical neutralization)

محلولهای حاوی ایتی‌دیوم برماید می توانند غیر فعال و خنثی شود و با مقادیر زیادی آب در شبکه جمع آوری فاضلاب ریخته شود. روش تایید غیر فعال شدن EtBr با استفاده از نور UV و عدم وجود فلورسانس می باشد.

نکته: کلیه پساب های تصفیه شده از ایتی‌دیوم برماید لازم است قبل از تخلیه به فاضلاب توسط اشعه UV بررسی شود تا از عدم وجود ایتی‌دیوم برماید اطمینان حاصل شود.

⁷ - زیاله سوز استاندارد مطابق ضوابط و روشهای مدیریت اجرایی پسماندهای پزشکی و پسماندهای ویژه
 8

سه روش برای غیر فعال سازی شناسایی شده است:

روش 1 - روش آرمور Armour

این روش ساده ترین روش است، اما تا اندازه ای بحث انگیز است.

مراحل کار:

- § مخلوط کردن مقادیر مساوی از محلول اتیدیوم برماید و سفید کننده خلگی
- § همزدن مخلوط به مدت 4 ساعت یا قرار دادن آن به مدت 2 یا 3 روز
- § رساندن PH به 4-9 با استفاده از هیدروکسید سدیم
- § اگر در خروجی اتیدیوم برماید موجود بود، تصفیه مجدد
- § در صورت اطمینان از عدم وجود اتیدیوم برماید ریختن محلول در فاضلاب با مقادیر زیادی آب⁴

نکته: برای محلولهای حاوی 0/5 mg/lit اتیدیوم برماید به ازای هر 100 میلی لیتر محلول 440 میلی لیتر مایع سفید کننده اضافه نموده و بعد از 2 ساعت می توان محلول را با اطمینان وارد شبکه جمع آوری نمود. یا می توان محلولهای آلوده را تا غلظت 34 میلی گرم در 100 میلی لیتر ابتدا رقیق نموده سپس به ازای هر میلی گرم اتیدیوم برماید 10 میلی لیتر مایع سفید کننده اضافه نموده و به آرامی به مدت 4 ساعت هم زده و یا بگذارید یک شب مانده و در نهایت به ازای هر قسمت از محلول 20 قسمت آب اضافه کرده و وارد شبکه جمع آوری فاضلاب کنید.⁹

روش 2 - روش لون و سانسون Lunn and Sansone

برای هر 100 میلی لیتر از محلول اتیدیوم برماید مراحل زیر انجام شود:

- § 20 میلی لیتر اسید هیپو فسفروس 5% اضافه کنید
- § 12 میلی لیتر از نیترات سدیم 0.5 مولار اضافه کنید
- § برای یک مدت زمان کوتاه هم بزنید و مدت 20 ساعت اجازه دهید در دمای اتاق بماند
- § رساندن PH به 4-9 با هیدروکسید سدیم (بیکربنات سدیم)

نکته: اگر اتیدیوم برماید در حلالهای آلی مثل ایزو پروپانول و بوتانول باشد، برای هر حجم از محلول 4 حجم محلول خنثی کننده استفاده کنید- 2 و 4 گرم نیترات سدیم، 20 میلی لیتر اسید هیپو فسفروس در 300 میلی لیتر آب که مدت 20 ساعت هم میزنیم⁹

- § در صورت اطمینان از عدم وجود اتیدیوم برماید ریختن محلول در فاضلاب با مقادیر زیادی آب^{4 و 8}

اگر غلظت ایتی‌دیوم برمایید زیاد باشد آب کافی اضافه کنید تا غلظت ایتی‌دیوم برمایید به 0.5 mg/ml یا کمتر کاهش یابد سپس مراحل را ادامه دهید.⁸

روش تهیه اسید هیپو فسفروس 5% :

10 ml از اسید هیپو فسفروس را با 90 ml از آب مخلوط کرده و به آرامی بهم بزنید. این محلول را به علت بخارات گازی در زیر هود آماده سازی نمایید.

مهم: اسید هیپو فسفروس معمولاً بصورت محلول 50% آماده می شود که بسیار خورنده است. در طی کارکردن با این محصولات شیمیایی، از تجهیزات حفاظت فردی استفاده نمایید (عینک، دستکش، روپوش آزمایشگاهی)⁸

نیتрат سدیم 0.5 مولار: 3.45 گرم از نیترات سدیم را با آب به حجم 100 ml برسانید. این محلول را به علت بخارات گازی در زیر هود آماده سازی نمایید.⁸

روش 3 - روش کویلاردت و هافناگ (Quillardet and Hoffnug)

در این متد از پرمنگنات سدیم 0/5 مولار و اسید هیدروکلریک 2/5 مولار استفاده می شود. اما چون در این روش احتمال انتشار گاز کلر وجود دارد، این روش توصیه نمی شود.⁴

دستکشها، تجهیزات و باقیمانده ها

دستکشها، تیوپهای آزمایش، کاغذها و غیره که بطور واضح با ایتی‌دیوم برمایید آلوده شده باشند باید در محل زائدات پزشکی برای سوزاندن قرار داده شوند. در صورت آلوده شدن مستقیم این وسایل غیر فعال سازی آنها به کمک ماده سفیدکننده قبل از دفع، انجام شود.⁴

بقایای نوک تیز آلوده آزمایشگاهی

انواع گوناگون بقایای نوک تیز آلوده آزمایشگاهی (برای مثال، تیغها، پیپتهای پلاستیک سخت و غیره) ممکن است با محصولات شیمیایی طی فرآیندهای تشخیص آلوده شوند. بقایای نوک تیز آلوده آزمایشگاهی باید به شکل مناسب جمع آوری و دفع شوند.

1- محلولهای مازاد⁸: ریختن همه محلول های مازاد در یک محلول تامپون یا ذخیره آن در بطری محلول استوک

⁸ decant

نکته: محلولهای استوک به دلیل دارا بودن غلظت بسیار بالاتری از مواد سمی، نباید به روشهای ذکر شده در بالا مورد تصفیه قرار بگیرند بلکه این محلولها را باید در بطریهای غیر قابل نشت ذخیره نموده و مستقیماً به سایت مواد زائد خطرناک منتقل شوند.

2- جمع آوری کردن: بقایای تیز آزمایشگاهی آلوده داخل یک محفظه بادیوارهای سخت جمع آوری شود تا از سوراخ شدن جلو گیری شود. درب محفظه باید در کلیه مواقع بجز هنگامیکه زائدهات اضافه یا برداشته می شود، بسته باشد.

3- برچسب گذاری " زائدهات تیز و برنده ": برچسب گذاری کنید (برچسب زرد رنگ مورد استفاده برای زائدهات خطرناک را استفاده کنید) ذخیره کنید و یا کانتینرهای حاوی این مواد را مطابق با دستورالعملهای مربوط به زائدهات تیز و برنده و خطرناک مدیریت کنید.

مطمئن شوید برچسب "حاوی تیز و برنده" چسبانده شده است.

4- دفع: وقتی پر شد، آن را به سایت ویژه دفع مواد زائد آلوده تحویل دهید.⁶

پودر/شکل کریستالی

همه زائدهات اتیدیوم برماید به شکل پودر/شکل کریستالی (شامل: جاهاییکه ریخته شده و همه مواد آغشته شده به پودر؛ ظرفهای اتیدیوم برماید با باقیمانده جلمدهات در آنها) زائدهات ویژه هستند. این نوع از زائدهات باید در یک ظرف زرد سخت با درپوش آبی/مشکی محکم ریخته شود و از طریق زباله سوز⁹ های مواد زائد سایتوتوکسیک و زائدهات پزشکی دفع شوند و یا به سایت ویژه دفع مواد زائد خطرناک تحویل داده می شوند.

به علت افزایش خطرات این نوع ماده شیمیایی و هزینه بر بودن و مشکل بودن دفع مناسب آن، شدیداً توصیه می شود که از شکل پودر آن استفاده نشود.⁷

⁹ - زباله سوز استاندارد مطابق ضوابط و روشهای مدیریت اجرایی پسماندهای پزشکی و پسماندهای ویژه

References

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/۱۲۴۰۹۴۵۲>
2. Lunn G, Sansone EB (May ۱۹۸۷). "Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions". Anal. Biochem. ۱۶۲ (۲): ۴۵۳-۸. PMID ۳۶۰۵۶۰۸.
3. Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Ann Arbor, Michigan
4. Ethidium Bromide Disposal-James Boehlert or Robin Izzo -EHS Web Site Survey, ۱۹۹۸ (<http://web.princeton.edu/sites/ehs/chemwaste/etbr.html>)
5. ETHIDIUM BROMIDE WASTE DISPOSAL GUIDANCE- (http://rehs.rutgers.edu/lswaste_EB.htm (Version ۱ – ۲/۲۳/۰۹))
6. Disposal of Electrophoresis Gels and Solutions - Armour, Margaret-Ann. Hazardous Laboratory Chemicals Disposal Guide, ۳rd Edition- November ۲۰۰۳ (http://www.med.cornell.edu/ehs/updates/electrophoresis_gel_sol.htm)
7. New Guidance Governing Ethidium Bromide Disposal – with revisions -The University of Edinburgh – Estates & Buildings-۲۰۰۷ (<http://www.eso.ed.ac.uk/pdfs/EthidiumBromide.pdf>)
8. Ethidium Bromide: Safe Handling and Proper Disposal-Columbia University, ethidium bromide safe handling and proper disposal, ۲۰۰۸. (<http://www.ehs.columbia.edu/etbr.html>)
9. kaufman j.A ۱۹۹۰, Waste disposal in Academic Institutions, Lewis publishere.