اسپکتروفتومتری

تهیه کننده: محمدرضا یزدانی، کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

کلیات:

اکثر آزمایش‌هایی که در آزمایشگاه شیمی بالینی انجام می‌شوند برمبنای اندازه‌گیری میزان نور جذب‌شده توسط ترکیب موردنظر می‌باشد. این میزان به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. معمولاً اندازه‌گیری‌ها در طیف نور مرئی (Visible Range) صورت می‌گیرد. با استفاده از قانون Beer که غلظت یک ترکیب مستقیماً بستگی به میزان نور جذب‌شده یا به‌طور معکوس بستگی به نور بازتاب (Transmittance) دارد، غلظت این مواد را می‌توان محاسبه نمود.

قسمت‌های مختلف اسپکتروفتومتر معمولی:

منبع نوری: برحسب تابش نور با طول‌موج مناسب به درون محلول موردنظر، منبع نوری انتخاب می‌گردد. لامپ تنگستن منبع قابل‌استفاده‌ای برای تهیه طیف کامل نور می‌شود، البته لامپ تنگستن هالوژنه (Tungsten iodide) هم برای نور مرئی و هم UV به کار می‌رود. از لامپ هیدروژنی و دیوتریوم برای اندازه‌گیری در طیف ماوراء بنفش استفاده می‌کنند. در انتخاب اسپکتروفتومتر باید توجه نمود که در چه آزمایش‌هایی کاربرد دارد، به‌طور مثال لامپ هیدروژنی برای آزمایش‌هایی که طول‌موج لازم برای آن‌ها بالای 340nm باشد ضعیف و غیرقابل استفاده است.

شیار ورودی (Entrance Slit): کار آن متمرکز کردن شعاع‌های نوری جداشده از ورود نور پراکنده (Stray light) به درون سیستم منوکروماتور است.

منوکروماتور (Mono chromator): سیستمی که نور با طول‌موج مشخص را جدا و انتخاب می‌کند. مونوکروماتور وسیله‌ای است که طیف طول‌موج نور را با استفاده از منشور یا Grating جدا می‌کند (در فتومترها معمولاً از فیلتر تداخلی استفاده می‌شود).

منشور – یک شیشه با لبه‌های تیز و به شکل هرم می‌باشد که به علت تفاوت در ضریب شکست بر اساس طول‌موج نور، نور سفید وارد شده به درجات مختلف پخش می‌شود. بر اساس طول‌موج نور، نور قرمز کمتر از ناحیه آبی یا بنفش طیف شکسته می‌شود. هر چه طول‌موج کمتر باشد شکست آن بیشتر است.

Grating –وسیله‌ای است به‌صورت یک صفحه که دارای ۳۰۰۰ یا بیشتر شیار کوچک می‌باشد. هر شیار مانند یک منشور عمل می‌کند و یک طیف رنگی ایجاد می‌کند. طیف‌های هم‌فاز یکدیگر را تقویت می‌کنند و شدت نور بیشتری دارند.

محدوده طول‌موج (Spectra band width) SBW: به غیر از نور لیزر، بقیه نورها به‌صورت واقعی مونوکروم نیستند؛ یعنی فقط یک طول‌موج نبوده و متشکل از طیفی از طول‌موج‌ها می‌باشند. میزان مونوکروماتیک بودن را با اصطلاحات زیر تعریف می‌کنند:

Spectral Band Width (SBW): عبارتست از طیفی از طول‌موج که از شیار خروجی سیستم Wavelength Selector می‌گذرد. طول‌موج اسمی (Nominal): این شعاع نور، طول‌موجی است که در آن ماکزیمم شدت نور وجود دارد و طول‌موج اسمی در مرکز کل طیف خارج‌شده قرار می‌گیرد.

برای فیلتر فتومتر، طول‌موج اسمی، طول‌موج ذکرشده بر روی فیلتر است و برای اسپکتروفتومتر طول‌موج اسمی، طول‌موجی است که بر روی دستگاه انتخاب می‌شود، مثلاً در اسپکتروفتومتر با SBW ۲۰ نانومتر در صـــورت انتخاب طول‌موج 540nm طیف نوری تولیدشده بین ۵۵۰–۵۳۰ نانومتر خواهد بود، ولی ماکزیمم شدت تابش در طول‌موج

۵۴۰ می‌باشد. SBW نشانه مرغوبیت یک مونوکروماتور است، مثلاً Grating از نوع مرغوب دارای SBW برابر با ۵ نانومتر می‌باشد. هر چه SBW یک مونوکروماتور کمتر باشد، شدت نور ایجادشده و تعداد جذب نوری بیشتر است. برای جذب نوری در طول‌موج خاص به میزان 0.99% باید SBW کمتر از 10nm باشد.

هر ماده شیمیایی دارای طیف جذب نوری خاصی است. برای اندازه‌گیری هر ماده شیمیایی باید از اسپکتروفتومتری استفاده کرد که SBW آن ۰/۱ طیف جذبی ماده موردنظر (Natural Band Width =NBW) باشد.

شیار خارجی (Exit Slit): کار آن متمرکز کردن شعاع‌های نوری جداشده بر روی کووت است.

کووت: وظیفه کووت نگه داشتن محلول در دستگاه است تا جذب نوری آن اندازه‌گیری شود. کووت‌ها از جنس Soft glass، بروسلیکات، کوارتز و پلاستیک می‌باشند. کووت‌های شیشه‌ای مخصوص برای طول‌موج 320-950nm مناسب هستند. از کووت کوارتز برای طول‌موج کمتر از 320nm استفاده می‌شود. کووت‌ها در سطوح مقطع دایره‌ای و مربع موجود می‌باشند. کووت‌های مربع از جذب بیشتری برخوردارند.

دتکتور: کار آن تبدیل انرژی نوری به الکتریکی است.

عقربه کالوانومتر: کار آن نشان دادن مقدار جذب یا عبور نور است.

توصیه‌های کلی:

همیشه نیم ساعت قبل از خواندن تست‌ها، اسپکتروفتومتر را روشن کنید.

از یک پایدارکننده ولتاژ در مسیر برق و اسپکتروفتومتر استفاده کنید.

نظافت و تمیز کردن اسپکتروفتومتر الزامی است؛ سالی دوبار بدنه‌ی اسپکتروفتومتر را باز کرده و گرد و غبار موجود را تمیز نمایید. روغن‌کاری چرخ‌دنده‌ها در فواصل سه‌ماهه ضروری است. لامپ اسپکتروفتومتر را با Lens paper ماهی یک بار تمیز نمایید. مسیر کووت‌ها و شیارها را در فواصل هفتگی تمیز نمایید.

در موقع عدم استفاده از اسپکتروفتومتر، حتماً روکش آن را بکشید.

اسپکتروفتومتر را از جای خود حرکت ندهید. به آن ضربه وارد نشود.

حداقل خطای نسبی T٪ در ۳۶۸٪ و جذب (Absorbance) در 0.439 می‌باشد. درصورتی که جذب نوری محلول بیشتر از 0.7 باشد یا T کمتر از ۲۰٪، محلول موردنظر را رقیق کنید تا جذب نوری در محدوده 0.7-0.1 قرار گیرد.

درصورتی که جذب محلول کمتر از 0.1 یا T بیشتر از ۸۰٪ باشد، خطای زیادی حاصل می‌شود، لذا توصیه می‌شود حجم نمونه را برحسب نیاز ۲ تا ۳ برابر بردارید تا جذب در محدوده (0.1-0.7) قرار گیرد و ضریب مربوطه را در محاســـــــبه دخالت دهید. بهترین محدوده برای خواندن جذب OD= 0.1-0.7 و برای T ۲۰-۱۰٪ می‌باشد.

حجم محلول در کووت باید بالاتر از قسمتی باشد که نور از آن عبور می‌کند. اگر حجم محلول نهایی کم است، مقدار نمونه و راژنت را دو برابر کنید.

شستشوی متناوب کووت با محلول‌های سود، پتاس و اسید کلریدریک رقیق، وایتکس(۱ به ۱۰ رقیق شده) اسید سولفوکرومیک و غیره توصیه می‌شود. کووت را به همراه سایر لوله‌ها نشویید چون ممکن است خش‌دار شوند.

هرگز کووت را با دست لمس نکنید.

کووت باید به‌آرامی در محل خاص خود قرار گیرد و محلول درون آن فاقد حباب باشد. ضمناً باید در خوانش طولانی درب کووت بسته شود تا تبخیر صورت نگیرد.

اسپکتروفتومتر پس از تحویل، مطابق دستور کار بروشور و توسط کارشناس مربوطه نصب و راه‌اندازی شود. به نظافت و کنترل کیفی دستگاه توجه کنید. لیست اقدامات انجام شده ضبط و نگهداری شوند.

کنترل کیفی اسپکتروفتومتر

تست‌های زیادی جهت کنترل کیفی اسپکتروفتومتر وجود دارد که شامل موارد زیر می‌باشد:

صحت طول‌موج

خطی بودن

صحت فتومتریک

کنترل تعویض لامپ

رانش فتومتری

کدورت محلول‌ها

طیف ناخواسته

یکسانی کووت‌ها

کنترل SBW

برای اطمینان از صحت طول‌موج جداشده روش‌های زیر متداول است:

راه چشمی: هر طول‌موج نور دارای رنگ خاصی است. برای کنترل، طول‌موج اسپکتروفتومتر را بر روی طول‌موج موردنظر تنظیم کرده و رنگ نور را با قرار دادن یک مقوای سفید در جلو شیار خارجی مشاهده می‌کنیم، مثلاً در ۵۸۵ نانومتر رنگ باید زرد باشد. صحت کالیبراسیون طول‌موج در آزمایشگاه‌های آنزیمی اهمیت زیادی دارد.

جایگزینی منبع نوری: صحیح‌ترین راه بررسی صحت طول‌موج، جایگزینی منبع نوری معمولی اسپکتروفتومتر با منبع نوری دیگری است که دارای ماکزیمم تابش نوری در طول‌موج مشخص باشد، مثلاً لامپ دوتریوم دارای خطوط تابشی ناپیوسته در طول‌موج 486nm و 656nm است.

استفاده از فیلترهای شیشه‌ای نظیر Holmium oxide و Didymium: این فیلترها دارای پیک‌های جذبی مشخصی در طول‌موج‌های خاصی می‌باشند. فیلتر دیدیمیوم در 530 و 585nm حداقل T٪ را دارد. دستگاه را روشن می‌کنیم و طول‌موج را روی ۵۳۰ تنظیم می‌کنیم. فیلتر دیدیمیوم را در محفظه کووت قرار می‌دهیم. T را بین ۶۰-۵۰٪ تنظیم می‌کنیم. طول‌موج را روی ۵۲۰ تنظیم می‌کنیم و به‌آرامی طول‌موج را به سمت 540nm زیاد می‌کنیم. هر کجا کمترین درصد T را مشاهـــــده کردیم، طول‌موج را یادداشت می‌کنیم. حداقل T باید در محدوده ۱±۵۳۰ به دست آید؛ اگر این‌طور نشد باید طول‌موج تنظیم شود؛ به‌این‌ترتیب که پیچ تنظیم طول‌موج، اگر 1nm کمتر باشد

(529nm) برخلاف جهت حرکت عقربه‌های ساعت به تعداد ۸ کلیک می‌چرخانیم. برای هر nm, ۸ کلیک می‌چرخانیم و از فیلتر Holmium oxide برای اسپکتروفتومترهای با SBW کمتر از ۸nm استفاده می‌کنیم؛ به عبارت دیگر:

Narrow SBW Holmium filter

Broad SBW Didymium filter

d) محلول رنگی:

محلول دی کرومات پتاسیم (۵۰میلی گرم دی کرومات پتاسیم در یک لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال حل گردیده) باید دارای ماکزیمم جذب نوری در ۲۵۷ و ۳۵۰ نانومتر باشد.

محلول پارانیتروفنل (0.04mmol/lit در سود ۰.۰۱نرمال) باید دارای ماکزیمم جذب نوری در ۴۰۱ نانومتر باشد.

محلول سولفات آمونیوم کبالت(0.0735mmol/lit دراسید سولفوریک 0.18M) باید دارای ماکزیمم جذب نوری در 512 نانومتر باشد.

محلول سیان‌مت هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی لیتر درابکین) . میزان جذب نوری این محلول را در طول‌موج‌های متفاوت اندازه می‌گیریم از ۴۹۰ نانومتر شروع کرده و هر ۵ نانومتر (با بلانک درابکین) می‌خوانیم. باید ماکزیمم جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر باشد.

کنترل طول‌موج اسپکتروفتومتر باید در فواصل هفتگی و پس از هر تغییر یا تعمیر دستگاه صورت پذیرد.

خطی بودن (Linearity): عبارتست از قدرت اسپکتروفتومتر برای ثبت یک سیگنال به‌صورت متناسب با مقدار نور. خطی بودن به روش‌های زیر مورد آزمایش قرار می‌گیرد:

محلول رنگی: شامل:

پارانیترو فنل در ۴۰۵ نانومتر

سولفات آمونیوم کبالت در ۵۱۲ نانومتر

سولفات مس در ۶۵۰ نانومتر

سیان‌مت هموگلوبین در ۵۴۰ نانومتر

محلول دی کرومات پتاسیم

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 دی‌کرومات 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 g/l ۱۷۰ به ۵ میلی لیتر درابکین ، محلولی با جذب نوری حدود ۲/۰۹ بدست می آید .) اگر میزان هموگلوبین نمونه کم باشدحجم 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 و۱/۱۶) و جذب

نوری محلول ذخیره و رقتهای تهیه شدهدر 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 می‌شود .

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 :

رقت	جذب نوری
۱/۴	۰/۴
۱/۲	*x*

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 می گردد .

$$Bias = \frac{\exp ected - obsereved}{\exp ected} * 100$$

مثال زیر ، میزان عدم صحت جذب نوری رقتهای مختلف نمونه سیان مت هموگلوبین در یک دستگاه فتومترا نشان می دهد .

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

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.

0.0111288 = 0.08 × 0.13911 = گرم 11.11288 میلی گرم 11.1 ~ میلی گرم

این محلول جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در سود(Na OH) ۰/۰۱ نرمال می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در طول موج ۴۰۵نانومتر و در مقابل بلانک سود، بررسی نمودبطور 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*

غلظت محلول پارانیتروفنل µmol/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %
0.08	1.852	1.908	3
0.06	1.389	1.418	2
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 درطول موج ۳۴۰نانومتر از محلول دی کرومات پتاسیم استفاده می‌شود.

برای تهیه محلول، پودر دی‌کرومات پتاسیم را در oven با حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت خشک کرده و 200 میلی‌گرم آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال به حجم ۱ لیتر برسانید. این محلول را بعنوان ذخیره در شیشه تیره نگهداری نمائید. محلول ذخیره جذبی در حدود ۲ خواهد داشت و با تهیه رقتهای مختلف در اسید سولفوریک ۰/۰۱

نرمال، می‌توان خطی بودن در محدوده جذب 0.1 تا 2 را در مقابل بلانک اسید سولفوریک، درطول 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.

غلظت محلول دی کرومات پتاسیم mg/L	جذب نوری مورد انتظار	جذب نوری بدست آمده	Bias %

غلظت	جذب نوری
50	0.493
25	*x*

200	1.972	2.007	1.8
150	1.479	1.486	0.5
100	0.986	0.991	0.5
50	–	0.493	-
25	0.247	0.245	0.8
10	0.099	0.095	4

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

در صورت امکان، استفاده از فیلترهای شیشه‌ای solid glass filter مانند دیدمیوم، جایگزینی برای روش قبل میباشد.

Didymium Filter در 550 nm جذب را در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر با هوا صفر می‌کنیم، بعداً جذب فیلتر دیدیمیوم را اندازه می‌گیریم به همین ترتیب جذب را با هوا روی۰.۲۵ تنظیم می‌کنیم و فیلتر دیدیمیوم را گذاشته و جذب را می‌خوانیم. سپس جذب را با هوا روی ۰.۵۰ تنظیم کرده و فیلتر دیدیمیوم را گذاشته و جذب را می‌خوانیم. درصورتی‌که اسپکتروفتومتر خطی باشد، باید تفاوت جذب‌ها در مراحل متوالی با فیلتر دیدیمیوم مساوی باشد. خطی بودن اسپکتروفتومتر باید در فواصل هفتگی و پس از هر تغییر و تعمیر دستگاه بررسی شود.

جذب در 550 nm	0	۰.۲۵	۰.۵۰	۰.۷۵
جذب فیلتر دیدیمیوم	۰.۰۹۶	۰.۳۴۶	۰.۵۹۶	۰.۸۴۶

صحت فتومتریک: هدف از صحت فتومتریک این است که آیا حداکثر جذب نوری به تعداد مشخص در طول‌موج خاصی صورت می‌گیرد یا خیر

برای این کنترل، مقدار جذب نوری محلولی با غلظت مشخص در طول‌موج خاصی تعیین می‌شود. محلول‌های متفاوتی برای این کار مورداستفاده قرار می‌گیرند:

الف) محلول دی کرومات پتاسیم (K2Cr2O7) : حدود 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 اسپکتروفوتومتر 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 ۰/۰۰۵ ± ۰/۵۳۶ نشاندهنده صحت فتومتریک دستگاه می‌باشد.چون NBW محلول دی کرومات 63nm است باید برای خوانش از اسپکتروفتومتری استفاده شود که SBW آن 6nm یا کمتر باشد.

ب) محلول سولفات آمونیوم کبالت (So4, 6H2O [NH44]CoSo4)؛ ۱۴.۴۸۱ گرم از این ماده در 10 ml اسید سولفوریک غلیظ حل شده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده می‌شود. جذب نوری این محلول در طول‌موج‌های مختلف عبارتست از:

طول‌موج	جذب نوری
400 nm	۰.۰۱۲
450 nm	۰.۰۷۷
500 nm	۰.۱۶۳
550 nm	۰.۰۷۷

توصیه می‌شود صحت فتومتریک به‌صورت ماهانه کنترل شود. اگر صحت فتومتریک کنترل شد و در محدوده قابل‌قبول بود، یعنی همه قسمت‌های اسپکتروفتومتر تنظیم است.

کنترل تعویض لامپ: لامپ‌ها به‌صورت آرام و پیوسته در معرض فرسودگی قرار دارند، در نتیجه باید در فواصل زمانی مرتب آن‌ها را کنترل و بررسی کرد. بعد از نصب لامپ جدید باید سیستم نوری دستگاه تنظیم شود تا حداکثر میزان نور پس از عبور کووت به فتوسل برسد.

روش کنترل با استفاده از آب مقطر

یک کووت پر از آب مقطر در دستگاه قرار دهید و طول‌موج مناسب (۵۵۰ نانومتر) را انتخاب کنید.

عقربه گالوانومتر در وسط صفحه تنظیم شود.

لامپ و دیگر اجزاء نوری به‌نوبت، کمی تغییر داده شوند و اثر آن‌ها بر روی T یا A بررسی شود.

محلی که حداکثر T به دست آید بهترین موقعیت هر یک از اجزاء سیستم نوری است.

رانش فتومتری (Drift): یک منبع اصلی خطا در اسپکتروفتومتری، عدم پایداری کمیت اندازه‌گیری شده (A یا T) نسبت به زمان یا Drift می‌باشد. این رانش ممکن است به علت فرسودگی شدید منبع نور باشد. ازآنجاکه مقیاس جذب نور لگاریتمی است، رانش عقربه از صفر در طول زمان موجب خطا در تعیین غلظت می‌شود، بنابراین باید پس از خواندن هر ۱۰-۵ تست، رانش را کنترل کرده و دستگاه را مجدداً صفر کنید. صفر را با کووت خالی یا کووت محتوی آب مقطر یا محلول بلانک تنظیم کنید. اگر اسپکتروفتومتر به مدت طولانی روشن باشد، دستگاه گرم شده و عملکرد اولیه آن از دست می‌رود و Drift ایجاد می‌شود. درانجام تست‌هایی که از فاکتور استفاده می‌شود، اگر دستگاه Drift داشته باشد، خطای فاحشی ایجاد می‌شود. Drift، ثابت‌قدم بودن اسپکتروفتومتر را کنترل می‌کند.

روش کنترل:

به ازای هر ۲۰-۱۰ خوانش، یک‌بار بلانک را به دستگاه می‌دهیم که نباید تغییر کند و در صورت وجود Drift در فواصل کوتاه، دستگاه را صفر کنیم یا مقدار بالا یا پائین‌رفته را از عدد خوانده شده تست‌ها کم یا زیاد می‌کنیم.

راه دیگر بررسی رانش فتومتری این است که ابتدا دستگاه را با درابکین صفر کرد و سپس محلول سیانومت هموگلوبین را در کووت ریخته و سر آن را با پارافیلم محکم نمود وجذب نوری این محلول هر ۵-۱۵ دقیقه بمدت یکساعت اندازه گیری نمود. حداکثر تغییر مجاز در جذب های نوری قرائت شده طی این مدت ۰.۰۰۵± می باشد.

کدورت محلول‌ها: برای اندازه‌گیری فتومتری، معرف‌ها و محلول‌های حاصل باید شفاف باشند. در صورت کدورت، واکنش باید تکرار شود. آزمایش را با رقیق کردن نمونه تکرار کنید و یا به‌صورت Sample blank عمل کنید و جذب نوری بلانک نمونه را از سایر لوله‌ها کم کنید.

کنترل SBW (Spectral Band Width): برای کنترل SBW اسپکتروفتومتر از روش‌های زیر استفاده می‌شود:

لامپ بخار جیوه (Mercury Vapor Lamp)

Interference Filter با SBW معادل ۱-۲ نانومتر

اگر SBW به‌دست‌آمده دستگاه با روش فوق با SBW ادعا شده دستگاه تفاوت داشت، هیچ کار نمی‌توان انجام داد، به جز این‌که تست‌های آنزیمی حساس با این دستگاه خوانده نشود.

(Cuvette matching) یکسانی کووت‌ها: میزان جذب نوری تمام کووت‌هایی که برای اندازه‌گیری و کالیبراسیون به کار می‌روند باید یکسان باشند.

روش کنترل کووت:

استفاده از آب مقطر: تمام کووت‌ها را از آب مقطر پر می‌کنیم و دستگاه را با کووت اول صفر می‌کنیم و جذب کووت‌های دیگر را اندازه می‌گیریم. نباید بیش از 0.01± با هم تفاوت داشته باشند.

استفاده از محلول سیان مت هموگلوبین: با محلول درابکین و طول‌موج مناسب دستگاه را صفر می‌کنیم. در کووت اولی محلول سیان‌مت هموگلوبین ریخته و در دستگاه قرار می‌دهیم و T را یادداشت می‌کنیم. همان محلول را با سایر کووت‌ها می‌خوانیم. هر کووت که بیش از 0.015 با سایر کووت‌ها تفاوت داشته باشد را کنار می‌گذاریم.

طیف ناخواسته یا (Stray light):

به معنی وجود طول‌موج‌های ناخواسته در نور خارج‌شده از مونوکروماتور می‌باشد که باعث تداخل و خطا می‌شود. وجود Stray light را به‌وسیله اندازه‌گیری درصد عبور نور از درون ماده‌ای که در طول‌موج مشخصی دارای عبور نوری ۵٪ (جذب نوری ۱۰۰٪) می‌باشد تعیین می‌کنند. میزان عبور نور در این طول‌موج به علت وجود Stray light می‌باشد. عبور نور از محلول‌های زیر در طول‌موج‌های ذکرشده برابر ۵٪ می‌باشد و از محلول‌های زیر برای اندازه‌گیری Stray light استفاده می‌شود.

کلرید پتاسیم (KCl) ۱۲ گرم در لیتر در طول‌موج 175-200 nm

استون در طول‌موج 250-320 nm

سدیم نیتریت ۵۰ گرم در لیتر در طول موج ۳۰۰-۳۸۵ نانومتر

روش کار:

طول‌موج مناسب را بر روی دستگاه انتخاب کرده و دستگاه را روشن می‌کنیم، سپس دستگاه را بر روی صفر و بعد با طول‌موج روی ۱۰۰٪ عبور نور تنظیم می‌کنیم. طول‌موج به مقدار اولیه برگردانده می‌شود و درصد عبور نور در آن طول‌موج قرائت می‌شود. اگر T بالاتر از ۰/۰٪ باشد وجود Stray light را نشان می‌دهد. اگر T بالاتر از ۰/۲٪ باشد Stray light غیرقابل قبول است.

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

منابع:

تکنیک‌های عملی آزمایشگاه تشخیصی جلد ششم، کنترل کیفی مواد و تجهیزات آزمایشگاهی PAS

بیوشیمی تیتز

کنترل کیفیت در آزمایشگاه‌های پزشکی، دکتر فریده رضی، آزمایشگاه مرجع سلامت

بیوشیمی هنری دیویدسون ۲۰۱۱

استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی امریکا CLSI 2006

کتاب جامع تجهیزات آزمایشگاه، حمیدرضا سقا

تضمین کیفیت در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و کنترل کیفی آزمایش‌ها و تجهیزات (سیما ذوالفقاری انارکی، نشر طبیب)

اصول کنترل کیفی و تضمین کیفیت، زهرا خاتمی