**15. اسپکتروفتومتر**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل فنی و کنترل کیفی اسپکتروفتومتر** | |
| **کد سند:** | D-002-0015 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی دستگاه ها و تجهیزات | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

شرح دستورالعمل فنی، تشریح روش کار، نگهداری و کنترل کیفی دستگاه اسپکتروفتومتر.

**(2) دامنه كاربرد:**

واحدهای میکروب شناسی، بیوشیمی و هماتولوژی**.** کاربرد دستگاه در بخش میکروب شناسی برای سنجش کدورت استاندارد نیم مک فارلند و همچنین تعیین کدورت مایع تلقیح میکروبی برای انجام آنتی بیوگرام یا استفاده از آن برای دستگاه کشت اتومات می باشد.

**(3) مسئولیت ها:**

در دستورالعمل کلی دستگاهها و تجهیزات آمده است.

**(4) تعاریف و اصطلاحات:**

**اسپکتروفتومتری** روشی برای اندازه گیری میزان جذب نور توسط یک ماده شیمیایی با اندازه گیری شدت نور هنگام عبور پرتو نور از محلول نمونه است. اساس این روش بر مبنای این است که هر ترکیب، نور را در محدوده طول موجی خاصی جذب کرده یا عبور می دهد.

**اسپکتروفتومتر** ابزاری است که مقدار فوتون (شدت نور) جذب شده را پس از عبور از محلول نمونه اندازه گیری می کند. این دستگاه همچنین می تواند برای اندازه گیری مقدار یک ماده شیمیایی شناخته شده بر اساس سنجش کدورت (turbidimetry) استفاده شود. اساس این سنجش مبتنی بر تعداد نوری است که به وسیله ذرات معلق از عبورشان جلوگیری شده است. مقدار نور متوقف شده نسبت مستقیم با غلظت ماده مورد آزمایش دارد.

**انواع اسپکتروفتومتر**

اسپکتروفتومتر‌ها بر اساس بازه طول موج نور و زمینه کاربردشان به چند دسته تقسیم می‌شوند:

- **اسپکتروفتومتر مرئی (VIS):** این نوع اسپکتروفتومتر برای اندازه‌گیری و تحلیل طیف‌های نوری در بازه طول موج مرئی (400-700 نانومتر) استفاده می‌شود. این بازه معمولاً برای مطالعه و تجزیه و تحلیل رنگ‌ها و ترکیبات مختلف در علوم شیمی، فیزیک و بیولوژی استفاده می‌شود.

- **اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (UV-VIS)** :این نوع اسپکتروفتومتر قادر به اندازه‌گیری و تحلیل طیف‌های نوری در بازه طول موج مرئی و فرابنفش (200-800 نانومتر) است. برای مطالعه جذب نور توسط ترکیبات شیمیایی و آنالیز ماده در علوم شیمی، فیزیک، بیوشیمی و علوم دارویی استفاده می‌شود. اسپکتروفتومتر UV-VIS معمولاً در تعیین غلظت ترکیبات، بررسی واکنش‌های شیمیایی و تشخیص تغییرات در ساختار مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

- **اسپکتروفتومتر مادون قرمز (IR):** این نوع اسپکتروفتومتر برای تحلیل و اندازه‌گیری طیف‌های نوری در بازه طول موج مادون قرمز (780-25000 نانومتر) به کار می‌رود. این بازه طول موج برای مطالعه ترکیبات آلی و غیرآلی در علوم شیمی، بیوشیمی، فیزیک و مهندسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسپکتروفتومتر IR برای تعیین ساختار مولکولی، تحلیل ترکیبات شیمیایی و کنترل کیفیت مواد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

**کووت (**Cuvatt**):** کووت ها لوله هایی هستند که از شیشه یا پلاستیک و کوارتز ساخته شده و برای اندازه گیری شدت رنگ محلولها و شاهدها در دستگاه اسپکتروفتومتر به کار می روند.

**(5) شرح دستورالعمل:**

**روش اجرایی**

**نکات استفاده از اسپکتروفتومتر**

قبل از روشن کردن دستگاه، باید موارد زیر را رعایت کنید:

* اطمینان حاصل کنید که جریان برق شهری در سیستم برقرار است. بررسی کنید که دستگاه به درستی به پریز وصل شده است و جریان برق در حال عبور است.
* مطمئن شوید که سل کوارتزی دستگاه از هر گونه آلودگی و ذرات خارجی پاک است. این مورد بسیار مهم است زیرا هر گونه آلودگی می‌تواند با دقت و صحت نتایج تداخل داشته باشد.

**آماده‌سازی دستگاه:** ابتدا، اسپکتروفتومتر را روشن کنید و به مدت زمان مورد نیاز برای گرم شدن دستگاه صبر کنید (معمولاً 15 دقیقه). سپس، از منوی دستگاه، حالت مورد نظر خود را انتخاب کنید (مانند UV-Vis یا NIR).

* مشاهده کنید که پارامترهای طول موج، جذب، غلظت و غیره بر روی صفحه نمایشگر دستگاه نمایش داده می‌شود. اگر این اطلاعات نمایش داده نمی‌شوند، با دستگاه چک کنید و اطمینان حاصل کنید که درست کار می‌کند.
* اولین پارامتری که بر روی دستگاه نشان داده می‌شود، طول موج است. با استفاده از چهار دکمه پایین صفحه نمایشگر، می‌توانید عدد طول موج را به دلخواه تنظیم کنید.
* بعد از وارد کردن عدد مورد نظر، کلید Enter را فشار دهید تا تغییرات بر روی دستگاه اعمال و طول موج به مقدار دلخواه تنظیم شود.
* پارامتر دوم، جذب (Abs) است. برای تنظیم دستگاه، هنگامی که نمونه‌ای در دستگاه قرار ندارد، دکمه Zero را فشار دهید تا دستگاه عدد صفر را نشان دهد.
* پارامتر سوم، غلظت (cons) است. این پارامتر در مواردی که نیاز به کالیبره کردن دستگاه با استفاده از فاکتور cons دارید استفاده می‌شود. این پارامتر به تنظیم دستگاه کمک می‌کند.

**کالیبراسیون**:

قبل از شروع اندازه‌گیری، دستگاه را کالیبره کنید. برای این کار، از یک استاندارد کالیبراسیون استفاده کنید و طبق دستورالعمل تولید کننده، دستگاه را به طور صحیح تنظیم کنید.

**نحوه خوانش اسپکتروفتومتر**

1. ابتدا، طول موج مربوط به نمونه را در دستگاه تنظیم کنید. این طول موج باید با ویژگی‌های نمونه مطابقت داشته باشد.
2. مطمئن شوید که دستگاه اسپکتروفتومتر در وضعیت تمیز و سالم است. این موضوع بسیار مهم است تا نتایج قرائت صحیح و دقیقی به دست آید.
3. بر اساس روش کار مربوطه، دستگاه را با استفاده از نمونه “Blank” صفر کنید. این کار به منظور تعیین مقدار پایه قرائت و کمک به اصلاح هرگونه تداخل ورودی است.
4. نمونه را در سل قرار داده و اطراف سل را به دقت تمیز کنید. سپس سل را در مسیر پرتو نور قرار دهید تا قرائت نمونه انجام شود.
5. در صورتی که نمونه‌ها دارای غلظت مشخصی هستند، ترتیب قرارگیری نمونه‌ها را از غلظت کم به غلظت زیاد رعایت کنید. این کار به دقت قرائت‌ها کمک می‌کند.
6. جذب هر نمونه را یادداشت کنید. این اطلاعات برای تحلیل و تفسیر نتایج بسیار مفید هستند.
7. در فواصل بین نمونه‌ها، سل را با آب مقطر شستشو دهید تا از تداخل بین نمونه‌ها جلوگیری شود.
8. همچنین، در فواصل بین نمونه‌ها، نمونه “Blank” را در مسیر نور قرار داده و قرائت جذب صفر را کنترل کنید. این کار به تعیین قرائت دقیق و صحیح نمونه‌ها کمک می‌کند.
9. در پایان کار، سل دستگاه را چندین بار با آب مقطر شستشو دهید و در محفظه مخصوص خود قرار دهید.
10. در نهایت، دکمه Power دستگاه را در حالت Off قرار داده و دو شاخه پریز را از برق خارج کنید.

**تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر:**

برای شروع، قبل از هر چیز باید مواد مزاحم را از محلول مورد نظر حذف کنیم. این کار به ما کمک می‌کند تا نتایج آزمایش توسط مواد بیگانه تحت تأثیر قرار نگیرند. بهترین روش برای حذف مواد مزاحم، استفاده از ترکیبات مختلفی است که باعث رسوب پروتئین‌های خون یا پلاسما می‌شوند و محلول را بی‌رنگ می‌کنند.

یکی از عوامل مهم در تنظیم اسپکتروفتومتر، طول موج است. طول موج‌های مختلف، رنگ‌های متفاوتی را تولید می‌کنند و اسپکتروفتومتر از طریق انتخاب طول موج مناسب، رنگ محلول رنگی را تعیین می‌کند. در واقع، طول موج مکمل رنگ محلول رنگی را باید در نظر بگیریم.

به عبارت دیگر، اگر نوری از یک محلول رنگی عبور دهیم، بخشی از این نور توسط محلول جذب می‌شود و رنگ جذب شده، رنگ محلول رنگی است. این جذب نور به غلظت محلول رنگی بستگی دارد. بنابراین، با استفاده از فیلترها و منشورها، دستگاه اسپکتروفتومتر نور تک رنگ تولید می‌کند تا بتوانیم غلظت محلول رنگی را به‌درستی محاسبه کنیم. محلول‌های رنگی در رنگ مکمل خود بیشترین جذب نور را دارند و قدرت جذب بستگی به مقدار ماده موجود در محلول دارد.

**ملاحظات فنی:**

**این نکات را باید درباره کووت ها رعایت کرد:**

1. هرگز قسمت پائین کووت را با دست نمی گیرند چون نور از این قسمت عبور می کند.

2. کووت را دو بار با محلول مورد آزمایش آبکشی نمائید.

3. موقع استفاده از کووت آنها را با پارچه نرمی که پرز ندهد پاک کنید.

4. محلول داخل کووت باید عاری از حباب هوا باشد.

5. کووت ها را با محلول تمیز کننده قوی نشوئید.

6. در صورت اجبار داخل کووت ها را با سوآپ پنبه دار تمیز کنید.

**(6) کنترل کیفی و کالیبراسیون:**

**کالیبراسیون** به طور سالانه دستگاه توسط شرکت پشتیبان انجام می شود اما اگر در آزمایشگاه انجام می شود (که کار سختی است)، به صورت زیر می باشد:

کالیبراسیون و کنترل کیفی اسپکتروفتومتر شامل ارزیابی صحت طول موج، خطی بودن (Lienearity)، صحت فتومتریک، کنترل تعویض لامپ، رانش فتومتری (آزمون پایداری نسبت به زمان)، یکسانی کووت ها و کنترل پهنای نوار طیفی (SBW) است.

**صحت طول موج**

ارزیابی صحت طول موج به منظور اثبات ادعای سازنده سامانه در تاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن کالیبر گردیده است.

بررسی صحت طول موج از طریق جایگزینی منبع نوری معمولی اسپکتروفتومتر با منبع نوری دارای حداکثر تابش (مثل لامپ جیوه یا دوتریوم) یا استفاده از فیلترهای شیشه ای یا از طریق محلول های رنگی به شرح زیر است:

* محلول دی کرومات پتاسیم mg/lit 50 در اسید سولفوریک 01/0 نرمال که دارای بیشینه جذب نوری در 257 و 350 نانومتر است.
* محلول پارانیتروفنل mmol/lit 04/0 در سود 01/0 نرمال که دارای بیشینه جذب نوری 401 نانومتر است.
* محلول سولفات آمونیوم کبالت mmol/lit 735/0 در اسید سولفوریک M 18/0 که دارای بیشینه جذب نوری در 562 نانومتر است.
* محلول سیان متهموگلوبین (20 میکرولیتر خون و ml 5 محلول درابکین) که دارای بیشینه جذب نوری در 540 نانومتر است.
* محلول اکسی هموگلوبین (V/V % 5 محلول آمونیاک در آب + خون) که دارای جذب نوری در 540 و 576 نانومتر است.  
  کنترل طول موج پس از هر سه تا شش ماه یک بار یا پس از هر تغییر و تعمیر بر روی دستگاه صورت می گیرد. همچنین بنا به ضرورت، استفاده از یک یا چند نوع محلول فوق پیشنهاد می گردد.
* **روش کار:** برای کالیبراسیون محدوده نور UV ابتدا 50 ميلي گرم دي كرومات پتاسيم خشك شده را با ترازوي كاليبره وزن نموده و در يك ليتر اسيد سولفوريك 01/0 نرمال حل مي كنيم. سپس دستگاه را با محلول 01/0 نرمال اسيد سولفوريك در طول موج 350 نانومتر صفر كرده و محلول دي كرومات پتاسيم حل شده در اسيد سولفوريك را در كووت ريخته و جذب آن را در دماي اتاق قرائت مي كنيم. تا 3 مرتبه خوانش انجام می دهیم. محدوده OD قابل قبول برای محلول دی پتاسیم کرومات 531/0تا 541/0 می باشد. اگر از محلول سولفات آمونیوم کبالت در ناحیه مرئی طول موج nm500 استفاده شود محدوده OD قابل قبول آن 158/0تا 168/0 می باشد.

**خطی بودن:**

خطی بودن عبارت از قدرت اسپکتروفتومتر برای ثبت یک سیگنال متناسب با مقدار نور است. خطی بودن را باید با استفاده از رقت های مختلف محلول هایی نظیر دی کرومات پتاسیم در طول موج 350 نانومتر، پارانیتروفنل (محلول mmol/lit 04/0) در طول موج 405 نانومتر، محلول سولفات مس در طول موج 650 نانومتر، محلول سولفات آمونیوم کبالت در طول 512 نانومتر، محلول سیان متهموگلوبین در طول موج 540 نانومتر و محلول سبز خوراکی در طول موج 630 نانومتر و سولفات نیکل در طول موج 550 نانومتر و رسم نمودار غلظت در مقابل جذب نوری مشخص نمود و پس از آن فاصله خطی بودن ویا میزان شیب را برای هر رقت محاسبه می کنیم. عدم خطی بودن نشانه خرابی دستگاه یا اشتباه در تهیه رقت است. خطی بودن اسپکتروفتومتر باید در فواصل منظم و پس از هر تغییر یا تعمیر دستگاه صورت پذیرد.

**صحت فتومتریک:**

منظور از صحت فتومتریک این است که آیا حداکثر جذب نوری به مقدار مشخص در طول موج خاص صورت می گیرد یا خیر؟ صحت فتومتریک به توانایی لامپ در ارائه حداکثر تابش، SBW، نوع و کیفیت منو کروماتور بستگی دارد.

می توان یکی از موارد زیر را در این خصوص به کار برد:

محلول دی کرومات پتاسیم (mg/lit50) در اسید سولفوریک 01/0 نرمال در طول موج 350 نانومتر، باید جذب نوری معادل 005/0±536 در مقابل بلانک اسید سولفوریک 01/0 نرمال داشته باشد.   
محلول های تجاری آماده از جمله preciset BM در طول موج 405 نانومتر را نیز می توان مورد استفاده قرار دارد.

**کنترل تعویض لامپ:**

با توجه به طول عمر لامپ در صورت ناپایداری میزان جذب نوری باید لامپ تعویض گردد. پس از تعویض لامپ به هر علتی باید سامانه نوری دستگاه به نحوی کالیبر گردد تا حداکثر میزان نور پس از عبور از کووت به فتوسل برسد که معمولاً این کار با پر کردن کووت از آب مقطر و تغییر دادن موقعیت لامپ و دیگر اجزای نوری در محلی که حداکثر خطای نسبی یا T به دست آید، بهترین موقعیت جهت استقرار لامپ است.

**کنترل رانش (drift) فتومتریک:**

رانش فتومتریک با قرار دادن کووت در بسته با کاغذ پارافیلم حاوی محلول سیان متهموگلوبین در دستگاه و خوانش جذب نوری در فواصل هر 15-5 دقیقه به مدت یک ساعت کنترل می گردد. البته این آزمایش را می توان با کووت خالی یا حاوی آب مقطر نیز انجام داد. وجود رانش نشانگر عدم پایداری میزان جذب نوری یا عبور نور است که می تواند به علت فرسودگی منبع نور باشد. در صورت وجود رانش باید دستگاه تعمیر گردد و در غیر این صورت باید در فواصل کوتاه معمولاً هر 20-10 بار خواندن نمونه، با گذاشتن بلانک دستگاه را صفر کنیم. حداکثر اختلاف جذب نوری قابل قبول 005 /0± در طول یک ساعت است.

**نورهای ناخواسته (Stray light):**

نورهای ناخواسته نورهایی هستند که غیر از نور عبور داده شده از منو کروماتور به نمونه تابیده می شوند. برای این کار محلولی که نور را به طور کامل جذب می کند (مثل استن یا نیتریت سدیم در طول موج های خاص) در مسیر عبور نور قرار داده می شود. در این حالت می بایست ترانس میتانس صفر درصد (جذب بی نهایت و غیر قابل خوانش) باشد زیرا نور از محل عبور نکرده و به دتکتور نمی رسد. برای بررسی نورهای ناخواسته محلول آبی 50 گرم در لیتر سدیم نیتریت تهیه و در مقابل بلانک آب مقطر در طول موج 300 تا 385 نانومتر خوانش می شود. ترانس میتانس می بایست صفر درصد باشد.

**ارزیابی یکسانی کووت ها:**

لازم است کووت ها میزان جذب نوری یکسانی داشته باشند تا در تکرار اندازه گیری کمیت ها در صورت استفاده از چندین کووت اشکالی مشاهده نگردد. با کمک آب مقطر (خواندن جذب نوری در طول موج 550 نانومتر) کووت هایی که بیش از 01/0± اختلاف جذب داشته باشند کنار گذاشته می شوند. با استفاده از محلول سیان متهموگلوبین در طول موج 540 نانومتر کووت هایی که بیش از 015/0 اختلاف جذب داشته باشند کنار گذاشته می شوند. توصیه می گردد حتی المقدور با یک کووت، اندازه گیری بلانک، استاندارد و آزمایش ها انجام گیرد تا از این خطا جلوگیری گردد.

**کالیبره نمودن کووتها:** مخلوطی را که نسبتاً پایدار است مثل هموگلوبین با غلظت 50 میلی گرم در صد میلی لیتر تهیه نمایند. حداقل خطای نسبی یا T این محلول در طول موج 540 نانومتر برابر 3/0± 50 باشد.

**(7)** **نگهداری:**

نظافت و تمیز کردن اسپکتروفتومتر الزامی است:

مسیر کووت‌ ها و شیارها را در فواصل هفتگی تمیز نمایید.

لامپ اسپکتروفتومتر را با کاغذ لنز ماهی یک بار تمیز نمایید. باید توجه داشته باشید که به هیچ وجه دست شما با لامپ تماس پیدا نکرده باشد چون طول موج اشتباه تولید خواهد کرد.

روغن‌ کاری چرخ‌ دنده‌ ها در فواصل سه‌ ماهه ضروری است.

سالی دو بار بدنه‌ اسپکتروفتومتر را باز کرده و گرد و غبار موجود را تمیز نمایید.

**(8) سرویس و تعمیرات:**

در دستورالعمل کلی دستگاهها و تجهیزات آمده است.

**(9) ملاحضات ایمنی:**

* دستگاه باید بر روی سکوی صاف بدون شیب و بالاتر از سطح زمین قرار گیرد.
* دستگاه را نباید در نزدیکی دستگاه هایی که امواج الکترومغناطیسی یا امواج الکتریکی شدید تولید می‌کنند، قرار داد.
* در هنگام راه اندازی دستگاه اسپکتروفتومتر و وصل آن به برق باید از ups یا ثابت کننده جریان و محافظ برق استفاده نمود.
* بعد از روشن شدن دستگاه، حداقل زمان لازم برای پایداری دستگاه 15 دقیقه می‌باشد. پس از این مدت دستگاه گرم شده و به پایداری حرارتی و الکترونیکی می‌رسد و برای استفاده آماده می‌باشد.
* از ریختن نمونه در داخل سل هولدر و روی دستگاه خودداری کنید. همچنین پس از استفاده از دستگاه، باید دستگاه و سل‌های مربوطه را تمیز کرده و روی دستگاه را با کاور بپوشانید.

**(10) محدوديت ها و تداخلات:**

* برخی از اسپکتوفتومترها دارای طول موج با محدوده های ثابت هستند و نمی توان از آنها برای خوانش هر نمونه ای استفاده نمود.
* در اسپكتروفتومترها باید از كوت مخصوص خود دستگاه استفاده نمود و استفاده  از كوت ديگر با قطر متفاوت دارای محدودیت است.

**(11) مستندات و سوابق:**

فرم سوابق یاLog book نگهداری روزانه و تمیزکاریوهمچنینسوابق کنترل کیفی و کالیبراسیون.

**(12) منابع**

1. مهری علی اصغر پور، مهناز صارمی، راهنمای نگهداشت تجهیزات آزمایشگاهی، انتشارات سازمان بهداشت جهانی، ویرایش دوم (2008).
2. CLSI C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions.2016.
3. CLSI QMS01: A Quality Management System Model for Laboratory Services. 2019.
4. CLSI QMS14: Quality Management System: Leadership and Management Roles and Responsibilities. 2024.
5. ISO 15189:2022: Medical laboratories — Requirements for quality and competence. Edition 4, 2022.
6. ISO/IEC 17025:2017: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Edition 3, 2017.