

کالیبراسیون و بررسی عملکرد اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراء بنفش

سارا زالی* و علی اسحاقی

موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: 1399/9/18 تاریخ پذیرش: 1401/1/20)

دستگاه اسپکتروفتومتر از جمله دستگاه‌هایی است که به طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌ها جهت آزمون‌های مختلف شیمیایی و بیوشیمیایی استفاده می‌گردد. صحت عملکرد این دستگاه و نیز تکرارپذیری آن می‌تواند اثر زیادی بر نتایج آزمون‌های مختلف داشته باشد. معتبرسازی یا احراز کیفیت یک دستگاه عملیاتی است که طی آن عملکرد صحیح دستگاه و انطباق آن با انتظارات مورد نظر به صورت مکتوب اثبات می‌شود. کالیبراسیون یک دستگاه از مهمترین قسمت‌های احراز کیفیت آن می‌باشد. کالیبراسیون اسپکتروفتومتر فرایندهایی شامل چندین مرحله می‌باشند که میزان دقت و صحت و خطای احتمالی دستگاه و نحوه عملکرد آنرا ارزیابی می‌کنند. این مقاله نحوه کالیبراسیون دستگاه اسپکترومتر را با بررسی آزمون‌های کنترل طول موج، میزان جذب خوانده شده، میزان نورهای سرگردان و یکسان بودن سلها بیان می‌کند. مهمترین پارامترها در کالیبراسیون دستگاه اسپکترومتر مرئی-ماوراء بنفش، کنترل میزان جذب قرائت شده و نیز کنترل طول موج ایجاد شده توسط دستگاه می‌باشند این کنترل بوسیله سلها و یا مواد مرجع و مقایسه مقادیر ایجاد شده توسط دستگاه با مقادیر مرجع انجام می‌گردد.

کلید واژه: احراز کیفیت، اسپکتروفتومتر، کالیبراسیون، کنترل طول موج، کنترل میزان جذب**مقدمه**

- کنترل میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه

- کنترل مقدار نورهای سرگردان

- قدرت تفکیک طیفی

- یکسان بودن سلها

اصول کلی

تخمین عدم قطعیت و قابلیت ردیابی از پارامترهایی هستند که در مورد دستگاهها و تجهیزات به ویژه در صنایع داروسازی باید مشخص گردند. هر اندازه‌گیری که با دستگاه صورت می‌گیرد در صورتی قابل اطمینان است که حاوی مستندات مربوط به کالیبراسیون دستگاه باشد تا قابلیت ردیابی و اتصال به زنجیره استاندارد جهانی مرتبط را داشته باشد. از سویی دیگر تخمین عدم قطعیت دستگاه، کاربر را در ارزیابی دقت و صحت پارامتر اندازه‌گیری شده یاری می‌کند. این اطلاعات با بررسی اسناد مربوط به هر دستگاه حاصل می‌گردند. اسناد کالیبراسیون یکی از اسناد مهم مربوط به هر دستگاه می‌باشد که اطلاعات زیادی را در اختیار کاربر قرار می‌دهد. کالیبراسیون طبق تعریف ایزو 10012 مجموعه عملیاتی است که تحت شرایط مشخصی برقرار می‌شود و رابطه بین مقادیر نشان داده شده توسط وسیله اندازه‌گیری کننده و مقادیر متناظر آن کمیت توسط استاندارد مرجع را مشخص می‌کند. در واقع کالیبراسیون مقایسه دو سیستم یا وسیله اندازه‌گیری است، (یکی با عدم قطعیت معلوم و دیگری با عدم قطعیت نامعلوم) به منظور محاسبه عدم قطعیت وسیله‌ای که عدم قطعیت آن نامعلوم است.

دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراء بنفش از اجزا و قسمت‌های مختلفی ساخته شده است، بنابراین در کالیبراسیون این دستگاه بیش از یک فاکتور باید کالیبره گردد. اکثر منابع و مراجع جهت کالیبراسیون این دستگاه راه‌های مشابه را پیشنهاد می‌کنند. در فارماکوپه ایالات متحده آمریکا و انگلیس نیز مطالبی جهت کنترل عملکرد این دستگاه ذکر شده است که در اصول مشابه می‌باشند [2-3]. کنترل میزان جذب، کنترل میزان طول موج، حد نورهای سرگردان، کنترل یکسان بودن سلها و قدرت

در صنایع داروسازی کیفیت محصول از اساسی‌ترین مسائلی است که مورد توجه قرار می‌گیرد. جهت دستیابی به کیفیت مطلوب و نیز تضمین کیفیت، استانداردها و قوانین مختلفی در تمام مراحل تولید باید رعایت گردند. یکی از مهمترین این قوانین و استانداردها عملیات خوب ساخت می‌باشد. عملیات خوب ساخت مجموعه عملیات و قوانینی می‌باشد که رعایت آنها منجر به اطمینان از کیفیت فرآورده می‌گردد. این عملیات کلیه مراحل تولید، کنترل، آنالیز، بسته‌بندی، نگهداری، توزیع و ... را شامل می‌شود و در برگیرنده تمام جزئیات اعم از مواد، تجهیزات، مستندات و بهداشت کارکنان می‌باشد. یکی از اصول مهم در عملیات خوب ساخت معتبرسازی تجهیزات و دستگاهها می‌باشد. کالیبراسیون بخشی از فرایند معتبرسازی می‌باشد که جهت ارزیابی صحت و دقت عملکرد دستگاه به کار می‌رود.

دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراء بنفش یکی از دستگاه‌های پرکاربرد در آزمایشگاه می‌باشد. در صنایع داروسازی این دستگاه به طور گسترده‌ای در کنترل کیفیت مواد اولیه، برخی آزمون‌های کنترل کیفیت محصولات و همچنین به عنوان قسمتی از دستگاه‌هایی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به کار می‌رود. از این رو کالیبراسیون این دستگاه ضروری می‌باشد. این مقاله به نحوه کالیبراسیون و کنترل دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-ماوراء بنفش می‌پردازد. مراجع مختلفی به بیان مطلب در این باره پرداخته‌اند. این مقاله عمدتاً با توجه به الزامات بیان شده در فارماکوپه ایالات متحده آمریکا و انگلیس در مورد کالیبراسیون اسپکتروفتومتر، تهیه گردیده است.

با توجه به اینکه این دستگاه از اجزاء مختلفی تهیه شده است، در کالیبراسیون آن بیش از یک فاکتور مد نظر قرار گرفته و کالیبره می‌گردد [1]. این عوامل شامل پارامترهای زیر می‌باشند:

- کنترل طول موج تولید شده توسط دستگاه

را در دمای 130 درجه سانتی گراد خشک نمود تا به وزنی ثابت برسد. سپس 57 الی 63 میلی گرم از این نمک را در یک لیتر سولفوریک اسید 0/005 مولار حل نمود. محلول حاصل جهت کنترل میزان جذب در طول موجهای 235، 257، 313، 350 نانومتر بکار می‌رود. محلول مشابهی با غلظت 10 برابر، برای بررسی میزان جذب در طول موج 430 نانومتر تهیه می‌گردد، به این صورت که 57 الی 63 میلی گرم از نمک پتاسیم دی-کرومات در 100 میلی لیتر سولفوریک اسید 0/005 مولار تهیه می‌گردد. جذب ویژه این محلولها در طول موجهای مشخص شده باید به مقدار تعریف شده در جدول 1 باشد. جذب ویژه، جذب محلولی با غلظت 1 درصد وزنی جمعی می‌باشد.

برای تبدیل جذب ویژه به مقدار جذبی که توسط دستگاه خوانده می‌شود، کافی است مقدار جذب ویژه را در غلظت ماده بر حسب درصد وزنی جمعی (یا مقدار ماده حل شده بر حسب گرم در 100 میلی لیتر حلال) ضرب نماییم. به طور مثال محلول 57 میلی گرم از پتاسیم دی-کرومات در 1000 میلی لیتر سولفوریک اسید دارای جذب ویژه 124/5 می‌باشد و میزان جذب آن $0/709 (0/0057 \times 124/5)$ می‌باشد.

مقدار مجاز انحراف در این مقدار جذب $0/01 \pm$ می‌باشد. یعنی در مثال فوق جذب محلول از 0/699 الی 0/719 مجاز می‌باشد. در ستون سوم جدول 1 میزان جذب برای محلول 0/0057 %w/v محلول پتاسیم دی-کرومات در طول موجهای 235، 257، 313، 350 و میزان جذب برای محلول 0/0057 %w/v این محلول در طول موج 430 نانومتر ذکر شده است. همچنین در ستون چهارم محدوده میزان جذب آورده شده است. قابل ذکر است تعداد اعشار بعد از ممیز (جهت میزان جذب) بستگی به دقت دستگاه و قابلیت آن در قرائت میزان جذب دارد.

کنترل طول موج

نومین پارامتر مهم در مورد عملکرد صحیح دستگاه اسپکتروفتومتر، صحت طول موج نشان داده شده توسط دستگاه می باشد. برای بررسی این پارامتر نیز فیلترها و محلولهای استاندارد و مواد مرجع موجود می‌باشند که مهمترین و رایجترین آنها سل هولمیوم و یا محلول هولمیوم اکساید در پرکلریک اسید می‌باشد، که برای بررسی صحت طول موج در گستره طول موجهای 240 الی 640 نانومتر کاربرد دارند. از دیگر فیلترها یا سل‌های رایج، فیلتر دیدیمیوم می‌باشد که شامل مخلوطی از پاراسنودیومیوم و نئودیومیوم می‌باشد و در بازه 400 الی 750 نانومتر به کار می‌رود. قابل

تفکیک طیفی فاکتورهایی هستند که فارماکوپه انگلیس در مورد دستگاه اسپکتروفتومتر مرونی- ماوراء بنفش به تفکیک به آنها اشاره کرده است، که البته دو پارامتر آخر در صورت استفاده از دستگاه جهت آنالیزهای کیفی کاربرد دارند. همچنین فارماکوپه انگلیس جهت بررسی این فاکتورها دستور ساخت محلولهایی را ذکر کرده است که در ادامه به آنها اشاره می‌گردد. فارماکوپه ایالات متحده آمریکا به صورت کلی‌تری به کنترل این دستگاه پرداخته است. این فارماکوپه اعتبار نتایج حاصل از این دستگاه را به آگاهی کاربر از محدودیتهای، منابع ایجاد خطا و انحراف در دستگاه منوط نموده است. در نتیجه رعایت و آگاهی نکات ذکر شده در کتابچه راهنما دستگاه، امری ضروری است. نظافت و نگهداری دستگاه، کالیبراسیون و نحوه جابجایی و بررسی سل‌های دستگاه نکاتی هستند که طبق مرجع فارماکوپه ایالات متحده آمریکا باید مطابق مطالب ذکر شده در کتابچه راهنما پیگیری شوند. این مرجع جهت کنترل دستگاه به طور کلی به فاکتورهای کنترل طول موج و میزان جذب اشاره کرده است و استفاده از محلولها یا سل‌های استاندارد را پیشنهاد کرده است که در ادامه ذکر خواهند شد.

کنترل میزان جذب

مهمترین مرحله در کالیبراسیون اسپکتروفتومتر بررسی صحت میزان جذب یا عبور خوانده شده توسط دستگاه می‌باشد. صحت میزان جذب باید توسط مواد یا محلولهایی بررسی گردد که با تغییر طول موج، میزان جذب آنها تغییر قابل توجهی نداشته باشد و یا اینکه حداقل در طول موجهای معینی دارای میزان جذب تعریف شده باشند. به این منظور می‌توان از فیلتر یا محلولهای استاندارد خاصی استفاده کرد [4]. این فیلترها یا محلولها به صورت تجاری جهت کنترل میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مرونی- ماوراء بنفش موجود می‌باشند. در برگ مشخصات این محصولات، میزان جذب در طول موج‌های خاص ذکر شده است. با مقایسه این مقادیر جذب با مقادیر خوانده شده توسط دستگاه، می‌توان صحت میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه را مورد بررسی قرار داد. بعضی از این محلولها را می‌توان به راحتی در آزمایشگاه تهیه نمود. رایجترین محلول مورد استفاده، محلول پتاسیم دی-کرومات می‌باشد. فارماکوپه ایالات متحده آمریکا استفاده از محلول استاندارد پتاسیم دی-کرومات یا فیلترهای شیشه‌ای غیر آلی را پیشنهاد کرده است، در حالی که فارماکوپه انگلیس علاوه بر پیشنهاد استفاده از مواد مرجع با ذکر جزئیات به نحوه تهیه این محلولها پرداخته است. جهت تهیه این محلول در آزمایشگاه باید ابتدا نمک پتاسیم دی-کرومات

جدول 1. میزان جذب ویژه محلول پتاسیم دی-کرومات در طول موج مشخص

طول موج (nm)	جذب ویژه (1 cm و 1%)	جذب برای محلول 0/0057 %w/v	محدوده مجاز میزان جذب
235	124/5	0/70965	0/66965-0/71965
257	144/5	0/82365	0/81365-0/83365
313	48/6	0/27702	0/26702-0/28702
350	107/3	0/61161	0/60161-0/62161
430	15/9	0/9063*	0/8963-0/9163

*میزان جذب برای محلول 0/0057 %w/v پتاسیم دی کرومات

محلوهایی مرجع موجود می‌باشند [5-6]. جهت کنترل نورهای سرگردان هتروکروماتیک، منو کروماتور روی طول موج مد نظر مثل λ تنظیم شده سپس یک فیلتر که λ را کامل جذب نماید در محفظه نمونه قرار داده می‌شود و میزان عبور در λ خوانده می‌شود. از آنجا که عبور در λ باید صفر باشد هر عددی که به عنوان میزان عبور خوانده شود نشان دهنده انرژی نورهای سرگردان در محدوده فیلتر و یا λ می‌باشد. جهت کنترل نورهای سرگردان ایزوکروماتیک یک فیلتر که مانع عبور تمام طول موجها باشد، یکبار در محفظه نمونه و بار دیگر در مقابل دتکتور قرار می‌گیرد. اختلاف میزان عبور دستگاه در این حالت معیاری از میزان نورهای سرگردان ایزوکروماتیک می‌باشد.

در فارماکوپه انگلیس جهت کنترل میزان نورهای سرگردان علاوه بر امکان استفاده از مواد مرجع، استفاده از محلول 1/2 درصد وزنی حجمی پتاسیم کلرید نیز پیشنهاد شده است. برای این منظور باید این محلول را در سل یک سانتی‌متری نمونه ریخته و جذب آن در طول موجهای 200 الی 220 nm (در مقابل آب به عنوان شاهد) خوانده شود. در این حالت جذب دستگاه باید عددی بزرگتر از 2/0 باشد.

نورهای سرگردان هتروکروماتیک و اشتباهات ناشی از آن می‌توانند باعث بروز خطاهای جدی گردند. این نورها می‌توانند ناشی از آلودگی شبکه مونوکروماتور باشند و به مرور زمان نیز افزایش پیدا می‌کنند. البته فناوری ساخت دستگاههای جدیدتر، احتمال بروز اینگونه خطاها را نسبت به دستگاههایی با مدل قدیمی‌تر بسیار کاهش داده است.

کنترل سلها

یکسان بودن سلها در دستگاههای دو پرتوی و یا دستگاههایی که بیش از یک محفظه سل دارند مساله‌ای ضروری است. بنابراین در اینگونه موارد حتماً باید از سلهایی با جنس و طول یکسان استفاده گردد. اختلاف طول دو سل نباید از $0/005 \text{ cm} \pm$ بیشتر باشد. جهت کنترل می‌توان سلها را با محلول یکسان پر نموده و جذب آنها را قرائت نمود که در این حالت باید جذب یکسانی داشته باشند.

قدرت جداسازی

در فارماکوپه انگلیس به پارامتر قدرت جداسازی به طور جداگانه‌ای اشاره شده است. این آزمون در برخی از آنالیزهای کیفی کاربرد دارد و تنها در صورتی کنترل می‌گردد که در مونوگراف (فارماکوپه انگلیس) مربوط به آن ماده به طور خاص به این آزمون اشاره شده باشد. در این صورت محلول 0/02 در صد وزنی حجمی تولون در هگزان را جاروب نموده و نسبت جذب در طول موج 269 nm (که دارای بیشترین میزان جذب است) را به جذب در طول موج 266 nm (که دارای حداقل میزان جذب است) محاسبه می‌نماییم. میزان عددی این نسبت با آنچه در مونوگراف مربوطه ذکر شده است مقایسه می‌گردد. این تست تنها در تست‌های کنترل کیفیت تعداد محدودی از مواد در فارماکوپه انگلیس آورده شده است.

نتیجه‌گیری

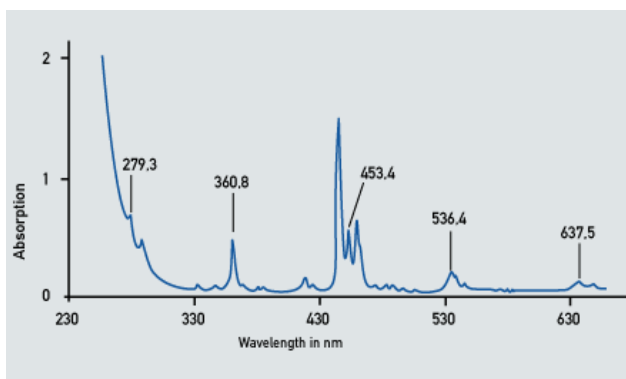
صحت داده‌های بدست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر بستگی به

ذکر است سل هولمیوم اکساید از سل دیدمیوم رضایتبخش‌تر می‌باشد. در صورتی که این فیلترها (که معمولاً به صورت سل می‌باشند) و یا محلول آنها به صورت تجاری تهیه گردند، در برگ گواهی آنها طول موجهایی که باید دارای قله جذبی (حداکثر جذب) باشند ذکر می‌گردد و یا حتی شکل طیف جذبی آنها می‌تواند پیوست گردد. نحوه عمل به این صورت است که سل یا محلول استاندارد در محل سل یا سل نمونه قرار می‌گیرد و دستگاه در محدوده تعریف شده جاروب می‌شود. سپس طیف حاصل از دستگاه با طیف گزارش شده در برگ گواهی مقایسه می‌گردد. طول موجهایی که دارای حداکثر مقدار جذب هستند باید یکی باشند.

در صورتی که سل یا محلول تجاری در دسترس نباشد می‌توان محلول هولمیوم پر کلرات را در آزمایشگاه تهیه نمود. به این منظور باید محلول 4 در صد وزنی حجمی از هولمیوم اکساید را در پر کلریک اسید 1/4 مولار تهیه کرد. این محلول در طول موجهای 241/1، 287/15، 361/5 و 536/3 نانومتر دارای مقدار جذب بیشینه می‌باشد.

در دستگاههایی که لامپ کم فشار شارژی دارند می‌توان از خطهای طیفی این لامپها جهت کنترل طول موج استفاده نمود. به طور مثال لامپهای جیوه در خطوط زیر خط جذبی دارند: 253/7، 302/25، 313/16، 334/15، 365/48، 404/66، 404/66، 435/83، 546/07، 576/96 و 579/07 نانومتر.

حد مجاز انحراف از مقدار طول موج معین طبق فارماکوپه انگلیس جهت ناحیه ماوراء بنفش $1 \text{ nm} \pm$ و جهت ناحیه مرئی $3 \text{ nm} \pm$ می‌باشد. در شکل 1 طیف حاصل از سل هولمیوم اکساید نمایش داده شده است.



شکل 1. نمونه طیف حاصل از سل هولمیوم اکساید.

کنترل نورهای سرگردان

نورهای سرگردان یا نورهای ناخواسته نورهایی به جز نور عبور داده شده از مونوکروماتور هستند که به نمونه تابیده می‌شوند و یا بدون تابیده شدن به نمونه به آشکارساز می‌رسند. این نورها دو دسته می‌باشند؛ دسته اول نورهای سرگردان هتروکروماتیک هستند که دارای طول موج متفاوت از طول موج انتخاب شده می‌باشند و دسته دیگر نورهای سرگردان ایزوکروماتیک هستند که دارای طول موج یکسان با طول موج انتخاب شده هستند اما از محفظه نمونه عبور نمی‌کنند. هر دو دسته باید جداگانه بررسی شوند.

جهت ارزیابی وجود نورهای سرگردان نیز سلها یا فیلترها و یا

- 2) British Pharmacopeia, Appendix II B, A169. Ultraviolet and Visible Absorbance Spectrophotometry, 2020.
- 3) United State Pharmacopeia 41, <857>Spectrophotometry and light scattering, 6660, 2018.
- 4) A.G. Reule, J. Res. Natl. Bur. Stand A Phys. Chem. 80A (1976) 609.
- 5) Th. Klink, Analytical Spectroscopy Library 6 (1995) 195.
- 6) R.W. Burke, E.R. Deardorff, O. Menis, Journal Of Research of the National Bureau of Standards- A. Physics and Chemistry 14 (1972) 469.

صحت عملکرد این دستگاه در پارامترهای مختلف آن دارد. کالیبراسیون دستگاه می‌تواند بیانگر صحت عملکرد دستگاه باشد. کنترل طول موج و کنترل میزان جذب، دو پارامتر مهم در کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفتومتر می‌باشند. عواملی مثل میزان نورهای سرگردان، یکسان بودن سلها و ... دیگر پارامترهایی هستند که در بعضی منابع به آنها اشاره شده است. به طور کلی جهت کالیبراسیون دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده از مواد استاندارد و یا سلها و فیلترهای مرجع پیشنهاد می‌گردد. همچنین می‌توان بعضی محلولهای مرجع را طبق دستورالعمل در آزمایشگاه تهیه نمود و از آنها در کالیبراسیون اسپکتروفتومتر استفاده نمود.

مراجع

- 1) Y. Wang, D.J. Veltkamp, B. Kowalski, Anal. Chem. 63 (1991) 2750.