تهیه کننده: حسین پیری

آشنایی با اصول طیف سنجی
«Spectrophotometry»

نور :

شکلی از انرژی تشعشعی می‌باشد که متشکل از دو میدان الکتریکی و مغناطیسی می‌باشد. یعنی از جنس الکترومغناطیس می‌باشد. اشکال دیگر آن شامل اشعه گاما؛ اشعه ماوراء بنفش؛ اشعه مادون قرمز؛ امواج کوتاه؛ امواج رادیویی و ... می‌باشد. حرکت نور و تمام تشعشعات الکترومغناطیس به صورت موج می‌باشد و نور به صورت بسته‌های انرژی (فوتون) بوده ودارای انرژی است ولی فاقد جرم می‌باشد.

طول موج: به فاصله بین قله‌های امواج متوالی گفته می‌شود (λ) و عموماً برحسب nm(نانومتر) بیان میشود.

تواتر(فرکانس): به تکرار سیکل موج در ثانیه گفته می‌شود. تواتر با انرژی نورانی رابطه مستقیم و با طول موج رابطهٔ معکوس دارد.

طیف سنجی(Spectrometry):

به شاخه ای از علوم برمی‌گردد که در آن نور، به طول موجهای تشکیل دهنده خود جهت تولید طیف تجزیه می‌شود. طیف سنجی ابزاری قوی برای بررسیهای کمی و کیفی است. امروزه مفهوم آن وسیعتر شده است و علاوه بر نور مرئی مطالعاتی برروی دیگر تشعشعات الکترومغناطیس صورت می‌گیرد. محدوده طول موج مرئی بین $380\text{-}750_{nm}$ می‌باشد. طیف نور خورشید و نور حاصل از فیلامان تنگستن، طیفی از انرژی نورانی با طول موجهای مختلف می‌باشد که چشم انسان آن را به صورت نور سفید می‌بینید. وقتی یک محلول در برابر نور سفید، سبز به نظر می‌رسد، بدین معنی است که طول موجهای بین $540\text{-}580_{nm}$ از خود عبور می‌دهد ولی سایر طول موجهای نور را جذب می‌کند.

اصول رنگ سنجی یا جذب سنجی:

از روش رنگ سنجی یا جذب سنجی در آزمایشگاههای بالینی و تحقیقاتی استفاده فراوانی می‌شود. اصول این روش بر مبنای ترکیب ماده مورد اندازه‌گیری با یک معرف خاص و ایجاد رنگ می‌باشد که رنگ حاصل اندازه‌گیری شده و در مقایسه با محلول استاندارد، میزان ماده مورد نظر محاسبه می‌گردد و اندازه‌گیری میزان جذب نور، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(Spectrophotometer) صورت می‌گیرد.

جذب انرژی نورانی :

هنگامیکه یک گروه اشعه نورانی با شدت I_0 وارد محلول یک جسم می‌گردد، سه حالت ممکن است وجود داشته باشد:

1) اشعه نورانی بدون هیچگونه جذب نوری از داخل محلول عبور نماید و شدت اشعه خروجی برابر با اشعه ورودی باشد ($I_0 = I$). در نتیجه چنین محلولی را محلول شفاف می‌نامند.
2) اشعه نورانی به طور کامل توسط محلول جذب گردیده و شدت نور خروجی برابر با صفر باشد ($I = 0$)، در نتیجه چنین محلولی را محلول کدر می‌نامند.
3) فقط قسمتی از اشعه نورانی توسط محلول جذب گردیده و شدت نور خروجی از نور ورودی کمتر باشد ($I_0>I$). که چنین محلولی برای اشعه مربوطه محلول نیمه شفاف نامیده می‌شود.

یک محلول نیمه شفاف مقداری از نور ورودی را جذب و مقداری را عبور می‌دهد. از نظر رنگ سنجی یا جذب فقط این دسته از محلول‌ها حائز اهمیت می‌باشند.

www.ShimiPedia.ir

تعیین مقدار یک ماده : تعیین مقدار یک ماده از دو روش می‌توان استفاده نمود:

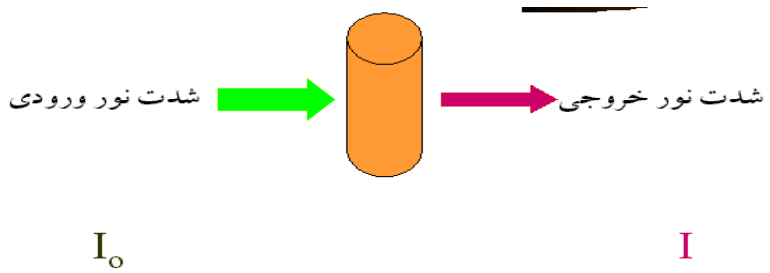
1) تعیین مقدار با استفاده از مقدار نوری که جذب محلول رنگی می‌شود و به آن جذب (Absorbance) می‌گویند که اگر طول مسیر عبور نور برابر با یک سانتیمتر باشد(L=1cm) در این صورت به آن دانسیتهٔ اپتیک (Optical Density) گفته می شود.

2) تعیین مقدار ماده با استفاده از مقدار نوری که از محلول رنگی عبور می نماید و به آن ترانسمیتانس (Transmittance) و یا عبور نور می‌گویند.

قانون بیر و لامبرت (Beer & Lambert) :

قانون بیر : هنگامیکه نور تک رنگی از داخل محلول عبور نماید، میزان نور جذب شده متناسب با غلظت ملکولهایی که در مسیر اشعه نورانی قرار گرفته و نور را جذب می‌کنند.

قانون لامبرت : طبق این قانون، تحت شرایط مساوی، شدت نور خارج شده با افزایش طول مسیری که نور از محلول عبور می‌کند کاهش می‌یابد. با استفاده از دو قانون مذکور می‌توان روابط پایین را نوشت :



$$I = I_0 \div 10^{-\varepsilon dc}$$

$$\frac{I}{I_o} = 10^{-\varepsilon dc}$$

$$\log \frac{I}{I_o} = \log (10^{-\varepsilon dc})$$

$$\log \frac{I}{I_o} = -\varepsilon dc$$

$$\log \frac{I_o}{I} = \varepsilon dc$$

$$OD = A = \varepsilon dc$$

$$OD = A = \log \frac{I_o}{I}$$

$$\Downarrow$$

$$OD = A = \log \frac{100}{T}$$

$$OD = A = ۲ - \log \%T$$

c = غلظت ، d = طول قسمتی از محلول که در مسیر نور قرار گرفته است، ε = ضریب جذب یا ضریب خاموشی.

هنگامیکه $c = 1_M$ ، $d = 1_{cm}$ باشد آنگاه A برابر با ε و برای یک ترکیب مشخص در طول موج معینی ثابت است. عوامل موثر بر ضریب جذب یک ماده عبارتند از : طول موج نور ، درجه حرارت ، نوع جسم ، نوع حلال و pH .

اگر I_0 شدت نوری که از محلول خارج می‌شود باشد، I/I_o مقدار ترانسمیتانس است که با T نمایش داده می‌شود. اگر I_0، 100 در نظر گرفته شود، I درصد جذب را نشان می‌دهد. مقدار A (جذب) و یا تراکم نوری (OD) به صورت زیر بیان می‌شود:

www.Shimipedia.ir

$$A = \log \frac{I_\circ}{I} = \log \frac{100}{T} = 2 - \log \%T$$

انحراف از قانون بیر – لامبرت : اگر غلظت ماده مورد اندازه‌گیری در محلول، بالا باشد، باعث ایجاد تجمع (aggregation) و در نتیجه باعث خطا در اندازه‌گیری می‌گردد، پس باید در این حالت، سنجش آنالیت در محدوده غلظتهای پایین صورت گیرد.

نکات مورد توجه در رنگ سنجی :

1) **جداکردن عوامل مزاحم**: برای تعیین مقدار یک ماده باید سعی کنیم حتی المقدور مواد مزاحم را از محیط آزمایش دور کنیم تا از پیدایش رنگهای بیگانه و مزاحم جلوگیری گردد. برای این منظور در اغلب اندازه‌گیری‌ها به کمک ترکیبات مختلف، پروتئین‌های خون یا پلاسما را رسوب داده و واکنش را بر روی محلول صاف شده انجام می‌دهند. یا اینکه بعضاً به کمک حلالهای مناسب، ماده مورد اندازه‌گیری را از سرم جدا می‌کنند.

2) **واکنش رنگی**: اکثر ترکیبات موجود در مایعات بیولوژیک در اثر اضافه کردن معرف مناسب ایجاد ترکیب یا کمپلکس رنگی می‌نماید. برای انتخاب واکنش رنگی 2 نکته را باید در نظر داشت :

الف) خصوصیت واکنش : واکنش باید مخصوص ماده شیمیایی مورد اندازه‌گیری باشد و با ترکیبات دیگر ایجاد رنگ نکند، به عبارت دیگر معرفی که برای ایجاد ترکیب یا کمپلکس رنگی با ماده مورد اندازه‌گیری به کار می‌رود، حتی‌المقدور باید فقط با ماده مورد اندازه‌گیری واکنش دهد نه با ترکیبات دیگر موجود در محیط.

ب) حساسیت واکنش : واکنش‌هایی باید انتخاب نمود که عواملی مانند pH ، حرارت و نور بر آنها بی اثر و یا کم اثر باشند و بتوان آنها را در شرایط ساده‌ای انجام داد.

ارتباط طول موجهای مختلف (λ) با رنگ محلول رنگی :

طول موجهای مختلف، تولید رنگهای مختلفی را می‌نمایند و در اسپکتروفتومتری انتخاب طول موج براساس رنگ محلول رنگی صورت می‌گیرد. یعنی باید طول موجی را انتخاب نمود که رنگ آن مکمل رنگ محلول باشد. به عنوان مثال اگر یک محلول رنگی داشته باشیم و نوری از آن عبور دهیم مقداری از این نور جذب می‌شود که این نور جذب شده دارای رنگ مکمل رنگ محلول می‌باشد که این مقدار بستگی به غلظت محلول رنگی دارد. لذا در دستگاه اسپکتروفتومتری بوسیله فیلتر و یا منشور و ... نور تکرنگ ایجاد می‌نمایند، تا بتوان غلظت یک محلول رنگی (خاصی) را محاسبه کرد. محلولهای رنگی در رنگ مکمل خود حداکثر جذب نور را دارند و بر حسب همین خاصیت مواد را در طول موجهای (λ) مربوط به خود مورد مطالعه قرار می‌دهند. و شدت و ضعف این رنگ بستگی به مقدار ماده موجود در محلول دارد.

محلولهای مورد استفاده در جذب سنجی:

الف- محلولهای استاندارد (Standard) : در جذب ابتدا باید واکنش رنگی را با محلولهای دارای غلظت معین (محلول St) انجام داده و منحنی تغییرات دانسیته اپتیک (OD) را نسبت به غلظت‌های مختلف رسم نمود. در صورتیکه منحنی تغییرات خطی باشد (یعنی جذب نوری محلول رنگی از قوانین جذب نوری تبعیت نماید) می‌توان هنگام اندازه‌گیری یک ماده در مایع بیولوژیک با روش رنگ سنجی فقط از یک دو محلول استاندارد (استاندارد رقیق و غلیظ) استفاده نموده و مقدار ماده را در مایع بیولوژیک با استفاده از رابطه زیر محاسبه نمود:

$$C_T = \frac{OD_T}{OD_{st}} * C_{st}$$

ب- محلولهای شاهد (Blank): محلولی است محتوی تمام مواد بکار برده شده در آزمایش، به جز ماده مورد اندازه‌گیری. در تعیین مقدار یک ماده در مایعات بیولوژیک، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر باید ابتدا با محلول شاهد، عقربه گالوانومتر را روی عدد صفر در

www.ShimiPedia.ir

دستگاههایی که بر حسب OD مدرج شده‌اند و عدد 100 در دستگاهی که بر حسب T% مدرج شده‌اند، میزان نموده و سپس مقدار جذب برای محلولهای تست (t) و استاندارد (st) قرائت نمود.

ج- محلولهای مجهول(Test) : محلولی است که هدف ما تعیین مقدار یک ماده در آن محلول است. به عبارت دیگر، محلول تست یا مجهول محتوی تمام مواد بکار برده شده در آزمایش است به اضافه مقداری از ماده مورد اندازه گیری که هدف ما تعیین مقدار آن، می باشد. میزان جذب این محلول با میزان جذب محلول استاندارد مقایسه می‌شود. سپس با استفاده از رابطهٔ ذکر شده در بالا می توان غلظت یک ماده را در یک محلول دقیقاً تعیین مقدار نمود.

دستگاه اسپکتروفتومتر

شامل بخشهای زیر می باشد: منبع نور ، موازی ساز(عدسی) ، تک فام ساز (منوکروماتور) ، گزینشگر طول موج ، جایگاه کووت یا سل، سل فتوالکتریک (photocell) یا دتکتور و مانیتور .

خصوصیات منبع انرژی:

1) منبع انرژی باید پرتو تولید شده اش دارای انرژی کافی باشد تا در مراحل بعد بتواند دتکت شود (مورد سنجش قرار گیرد).
2) تولید طیف پیوسته نماید (یعنی حاوی تمام طول موجها باشد).
3) پایدار باشد (یعنی قدرت امواج در طول کار تغییر نکند).

انواع منبع انرژی:

لامپ تنگستن: که تولید طول موج 320-2500nm را می‌نماید.

لامپ هیدروژن یا دوتریوم: تولید طول موج بین 165-375nm می‌نماید.

لامپ جیوه ای: تولید اشعه UV (به اضافه مقداری از دامنه مرئی) می‌نماید.

منوکروماتور (تک فام ساز):

تجزیه کننده اشعه نوری می باشد و باعث ایجاد نور تک رنگ می گردد. دارای انواع زیاد می‌باشد که فیلترها، منشورها، گراتینگ ها (grating) از آن جمله‌اند. فیلترها م منشورها اکنون کابرد چندانی ندارند. گراتینگ ها یک سری صفحات شیشه ای شفاف‌اند و یا غیر شیشه‌ای ممکن است باشند. بوسیله دستگاههای تراش حدود 15000 تا 30000 شیار در هر اینچ بر روی آنها قرار می‌دهند (حدود 10000 در هر cm). وقتی نور به آنها برخورد می‌نماید هر کدام از آنها مانند یک منشور عمل می کند و نور را تجزیه می کند.

سلول نمونه یا کووت (Sample cell):

خصوصیاتی که یک کووت باید داشته باشد به شرح زیر است:

1) باید نور تابشی را جذب نکند.
2) برای ناحیه ماوراءبنفش(UV) باید جنس آن از کوارتز یا سیلیکا باشد (برای امواج مرئی از کووت شیشه‌ای می توان استفاده کرد).

قطر آن بستگی به دستگاه دارد ولی معمولاً 1cm است و شکل آن عموماً استوانه‌ای یا مکعبی می‌باشد.

www.ShimiPedia.ir

دتکتور (Detector):

برای اندازه‌گیری شدت امواج بکار می روند و دارای خواص فتوالکتریک‌اند که انرژی نورانی را به الکتریکی تبدیل می کنند.

خصوصیات دتکتور:

1) حساس به دامنه وسیعی از طول موجها باشد.
2) حساسیت نسبت به تابشهای کم انرژی (یعنی اگر I کم باشد باید به اندازه کافی حساس باشد).
3) عکس العمل آنی نسبت به تشعشع‌های مختلف داشته باشد (سریع عمل کنند).
4) عکس‌العمل الکتریکی که در دتکتور ظاهر می‌شود مستقیماً متناسب با انرژی تابش شده باشد.

انواع اسپکتروفتومتر:

1) اسپکتروفتومتر تک کووتی (Single bean): یک Sample cell دارد و یک پرتو به نمونه می‌تابد.
2) اسپکتروفتومتر دوکووتی (Double bean): یکی از کووتها، مربوط به بلانک و دیگری مربوط به Sample می‌باشد.

اهداف :

1) تعیین طول موج مناسب(طول موج ماکزیمم) برای اندازه‌گیری مقدار یک ماده .
2) رسم منحنی استاندارد ماده مورد اندازه گیری یا اثبات قانون بیر و لامبرت.

www.ShimiPedia.ir