

## از کالیبراسیون اسپکتروفوتومتر چه میدانید؟

طیف سنج نوری یا اسپکتروفوتومتر Spectrophotometer یکی از دستگاههای آزمایشگاهی بسیار مهم است که به وسیله آن نتایج آزمایشهای end point مشخص می شود و پس از آن متخصص آزمایشگاه با استفاده از آن به تفسیر آزمایش می پردازند.

### نحوه عملکرد دستگاه:

اسپکتروفوتومتر میزان جذب یا عبور طول موجهای مشخصی از انرژی تابشی (نور) از یک محلول را اندازه گیری می کند بیشترین کاربرد آن در آزمایشگاه، در بخش بیوشیمی است. اساس کار اسپکتروفوتومتر همانند بسیاری از دستگاههای آزمایشگاهی، بر اندازه گیری میزان نور جذب شده توسط یک محلول رنگی است که طبق قانون بیر-لامبرت میزان جذب نور (OD) متناسب با غلظت ماده حل شده در محلول است.

### اسپکتروفوتومتر Spectrophotometer



### کووت

کووتها محفظه‌های شفاف‌ی هستند که محلول مورد آزمایش در آن ریخته شده و در جایگاه خاص خود که در مسیر نور تکرنگ تعبیه شده است قرار می‌گیرد. کووتها با توجه به نوع مصرف، جنس، شکل و حجم متفاوتی دارند. برای محلول‌های اسیدی و قلیایی از کووت‌های مخصوص شیشه‌ای و برای طول موج‌های زیر ۳۲۰ نانومتر از لوله کوارتز یا پلاستیک استفاده می‌شود.

## کالیبراسیون

کالیبراسیون اسپکتروفتومتر، فرایندی است که در آن مراحل جهت تضمین صحت کار دستگاه به کار گرفته می‌شود. این روش تضمین می‌کند که اندازه گیری‌های به دست آمده توسط وسیله مورد نظر دقیق هستند. روش کالیبراسیون برای مدل‌های مختلف متفاوت است با این حال اکثر تولیدکنندگان کتابچه راهنمایی را که شامل جزئیات کالیبراسیون و نحوه کار با دستگاه است، برای استفاده کاربران فراهم می‌کنند.

اسپکتروفتومتر قادر است تا به عنوان فرستنده و گیرنده نور عمل کند. این وسیله برای آنالیز نمونه‌هایی از ماده تست، توسط عبور نور از درون نمونه و خواندن شدت طول موج‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. نمونه‌های مختلف نور را به روش‌های مختلف فشرده می‌کنند و به محقق اجازه می‌دهند تا توسط بررسی رفتار نور هنگام عبور از نمونه مورد نظر، با ساختار آن بیشتر آشنا شوند. در کالیبراسیون این وسیله، از یک محلول مرجع جهت تنظیم صفر دستگاه استفاده می‌شود. در اسپکتروفتومتر تک پرتویی، یک پرتو نور تولید و دستگاه باید بعد از هر بار استفاده، کالیبره شود. در نوع دو پرتویی، پرتوها از طریق نمونه تست فرستاده می‌شوند و نمونه مرجع در همان زمان، دو مجموعه از نتایج را که می‌تواند به عنوان مرجع و کالیبراسیون استفاده شود، تولید می‌کند. کالیبراسیون می‌تواند در آزمایشگاه توسط افراد باتجربه نیز صورت گیرد. البته اگر دستگاه دچار آسیب یا مشکل جدی شود، باید جهت تعمیر و تنظیمات اولیه به کارخانه سازنده یا نمایندگی‌های معتبر ارجاع داده شود.

۱- دستگاه را روشن کنید و ۱۰ دقیقه منتظر بمانید تا دستگاه گرم و آماده به کار شود.

۲- نور محفظه را تغییر دهید تا به طول موج مورد نظر برسید.

۳- کووت را تا نیمه با محلول واکنش پر کنید. کووت نباید حاوی نمونه ناشناخته باشد.

۴- دو طرف کووت را با دستمال پاک کنید.

۵- آن را در محفظه قرار دهید و درب آن را ببندید.

۶- منتظر بمانید تا اندازه گیری تمام شود.



ارزیابی صحت طول موج به منظور ارزیابی ادعای سیستم در تاباندن طول موجی است که دستگاه برای آن تنظیم شده است.

راحت‌ترین و قابل‌دسترس‌ترین روش برای اسپکتروفتومترهایی که با نور مرئی کار می‌کنند، استفاده از محلول سیان مت هموگلوبین (۲۰ میکرولیتر خون و ۵ میلی‌لیتر درابکین) بوده که دارای حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر است. ابتدا با محلول درابکین به عنوان بلانک دستگاه را صفر کرده و سپس جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰، ۵۳۵، ۵۴۰، ۵۴۵ و ۵۵۰ نانومتر قرائت می‌شود. براساس طول موج و میزان جذب، یک منحنی رسم می‌شود که در صورت وجود صحت طول موج، حداکثر جذب نوری را در ۵۴۰ نانومتر نشان خواهد داد.

### آزمون رانش فوتومتری

یکی از منابع اصلی خطا در اسپکتروفتومتری، که به علت فرسودگی شدید منبع نوری رخ می‌دهد، عدم پایداری مقدار جذب خوانده شده در طول زمان است. برای بررسی، ابتدا دستگاه را با درابکین صفر کرده و پس از ریختن محلول سیان مت هموگلوبین در کووت و بستن درب آن با پارافیلیم، جذب نوری این محلول هر ۵ تا ۱۵ دقیقه یکبار (به مدت یک ساعت) قرائت کنید. حداکثر تغییر مجاز در جذب‌های نوری قرائت شده طی این مدت  $\pm 0.005$  است. به عنوان مثال اگر جذب محلولی در ابتدا  $1/259$  باشد، در مدت یک ساعت می‌تواند در محدوده  $\pm 0.005$  تغییر کند.

### نحوه کار با اسپکتروفتومتر D 20/20

- ۱- دستگاه را روشن کنید. اجازه دهید تا به مدت ۱۵ دقیقه گرم شود.
  - ۲- طول موج مورد نظر را با دکمه قرار گرفته در کنار محفظه نمونه تنظیم کنید.
  - ۳- محفظه نمونه را بررسی کنید تا از خالی بودن آن مطمئن شوید. دکمه مربوط به تنظیم صفر را که در جلو و سمت چپ اسپکتروفتومتر است، بچرخانید تا مقدار صفر را نمایش دهد.
  - ۴- برای اطمینان از پاکیزگی و کاهش اشتباه در نتایج اندازه‌گیری، از دستکش استفاده کنید.
  - ۵-  $3/4$  کووت را با آب مقطر پر کنید و آن را در نگه‌دارنده قرار دهید. کووت را به سمت پایین فشار دهید تا در جای خود تراز شود. دقت کنید که خارج کووت تمیز و خشک باشد.
  - ۶- دکمه کنترل نور را که در جلو و سمت راست دستگاه قرار دارد، بچرخانید تا مقدار عبوری یا جذب را بخواند.
  - ۷- سپس کووت نمونه را در محفظه قرار دهید. مقدار نشان داده شده را ثبت کنید.
- کالیبراسیون اسپکتروفتومتر مادون قرمز
- اسپکتروفتومتر مادون قرمز از پلی‌استایرن به عنوان یک استاندارد کالیبراسیون استفاده می‌کند. A-Scan ابزار با یک قطعه از پلی‌استایرن در نگه‌دارنده نمونه، حضور قله‌های دیده شده روی طیف IR و شدت نسبی قله‌ها را بازبینی می‌کند.
- ۱- اسپکتروفتومتر را روشن کرده و جهت ثبات دستگاه، اجازه دهید تا ۱۰ دقیقه گرم شود. بدون وجود منبع پایدار، نمی‌توان بر طیف به دست آمده اعتماد کرد.
  - ۲- استاندارد کالیبراسیون را توسط قراردادن نمونه‌ای از فیلم پلی‌استایرن در نگه‌دارنده نمونه انجام دهید. بدون اجرای آزمون با استفاده از یک نمونه از طیفی شناخته شده که استاندارد نامیده می‌شود، نمی‌توانید در مورد درستی و صحت کار دستگاه به یقین برسید.

۳- طیف را برای نمونه پلی استایرن بازیابی کنید. طیف را با یکی از مراجع استاندارد طیف IR مقایسه کنید تا مطمئن شوید که همه قله‌های مورد انتظار روی طیف آزمون وجود دارد.

۴- طیف را بررسی کنید تا مطمئن شوید که قدرت سیگنال درون ۹۵٪ از حداکثر قوی‌ترین قله است.

۵- میرایی را تنظیم کنید تا به سیگنال صحیح و مورد نظر تان دست یابید.

### توجه

ممکن است فیلترهای نوری خاصی برای تعدادی از دستگاه‌ها نیاز باشد که با طول موج ویژه‌ای کار می‌کنند.

اگر طول موج تغییر کرده است یا بعد از هر نمونه‌گیری، باید صفر دستگاه تنظیم شود.

اطمینان حاصل کنید که کووت‌ها خالی از هرگونه ذرات، لکه یا اثر انگشت است. این مورد می‌تواند محاسبات دستگاه را تحت تاثیر قرار دهد.

اسپکتروفتومترها گران هستند. مراقب باشید تا به آن‌ها صدمه‌ای وارد نشود.

بررسی های روزانه

اتصالات الکتریکی را به طور کامل بازرسی کنید تا هیچ گونه ساییدگی نداشته باشند.

تحت هیچ شرایطی کارکنان مجاز به بازکردن دستگاه نیستند.

هرگونه مایعات خارجی و مواد شیمیایی ریخته شده را از روی دستگاه و قسمت‌های مجاور آن، پاک کنید.

نگه دارنده نمونه را مخصوصا بعد از به کار بردن محلول‌های نمکی یا خورنده به دقت تمیز کنید.

کووت‌ها را بلافاصله بعد از استفاده بشوید. سپس آن‌ها را برعکس کنید تا کاملا خشک شوند. اجازه ندهید نمونه در کووت خشک شود.

### انواع اسپکتروفتومتر

#### ۱- اسپکتروفتومتر تک پرتو و دو پرتو

اسپکتروفتومترها به دو دسته تقسیم می‌شوند: تک پرتو و دو پرتو. اسپکتروفتومترهای تک پرتو اولین نسل اسپکتروفتومترها بوده و تمام نور از بین نمونه عبور می‌کنند. در این نوع برای اندازه‌گیری شدت نور تابشی باید به این نکته توجه داشت. این اسپکتروفتومترها ارزان تر هستند چرا که بخش‌های کمتری داشته و سیستم آن‌ها پیچیدگی کمتری دارند. نسل جدیدتر اسپکتروفتومترها نوع دو پرتو است. در این نوع نور قبل از اینکه به نمونه برسد به دو پرتو مجزا تفکیک می‌شود که این مسئله یک امتیاز تلقی می‌شود زیرا خواندن منبع و نمونه به صورت همزمان انجام می‌شود. در برخی از اسپکتروفتومترهای دو پرتوی، دو آشکارساز وجود دارد بدین ترتیب امکان اندازه‌گیری همزمان پرتوهای نمونه و مرجع فراهم می‌شود. سایر اسپکتروفتومترهای دو پرتوی که تنها یک آشکارساز دارند از برشگر پرتو استفاده می‌کنند که این وسیله در هر لحظه یک پرتو را سد کرده و آشکارساز اندازه‌گیری پرتو نمونه و مرجع را به صورت یک در میان انجام می‌دهد.

#### ۲- اسپکتروفتومتر نور مرئی

در آزمایشگاه‌ها، بخش گسترده‌ای از اندازه‌گیری‌ها بر اساس واکنش‌های جذب سنجی صورت می‌پذیرد. فعالیت اکثر آنزیم‌ها، تری گلیسیرید، کلسترول، لیپو پروتئین‌ها، قند، کراتینین، اوره و . . . طیف وسیعی از آنالیت‌ها با کاربردهای بالینی و تحقیقاتی، طیف وسیعی از داروها و بخش گسترده‌ای از متابولیت‌ها با اسپکتروفتومتری قابل سنجش است. بررسی ساختمان مولکولی، شناسایی

ترکیبات، مقایسه ساختمان‌ها، یافتن طول موج ماکزیمم جذب و . . . از دیگر کاربردهای اسپکتروفوتومتری در مسائل تحقیقاتی است. محدوده نور مرئی حدود ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر است. اسپکتروفوتومترهای ناحیه مرئی دقت و صحت متغیری دارند. برخی از آنها آشکارساز CCD با پیکسل‌های کافی برای قرائت هر 10nm را دارند، درحالی‌که برخی دیگر می‌توانند در هر نانومتر چندین قرائت انجام دهند. این اسپکتروفوتومترها می‌توانند از منابع نور سیمایی، هالوژن، LED یا ترکیبی از این منابع مثل LED تقویت شده با رشته‌های تنگستن استفاده کنند.



### ۳- اسپکتروفوتومتر نور ماوراء بنفش

اسپکتروفوتومتر UV علاوه بر اینکه در طیف سنجی مایعات بسیار متداول است، برای گازها و همچنین جامدات نیز استفاده می‌شود. نمونه را در محفظه مستطیلی مخصوص که معمولاً یک سانتی متر پهنا دارد قرار می‌دهند. این محفظه که کاوت (cuvvette) نامیده می‌شود می‌تواند شکل پلاستیک، شیشه یا کوارتز داشته باشد. پلاستیک و شیشه، UV را جذب می‌کنند از اینرو تنها می‌توان آن‌ها را برای اسپکتروفوتومتری نور مرئی استفاده کرد.



#### ۴- اسپکتروفتومتر نور مادون قرمز

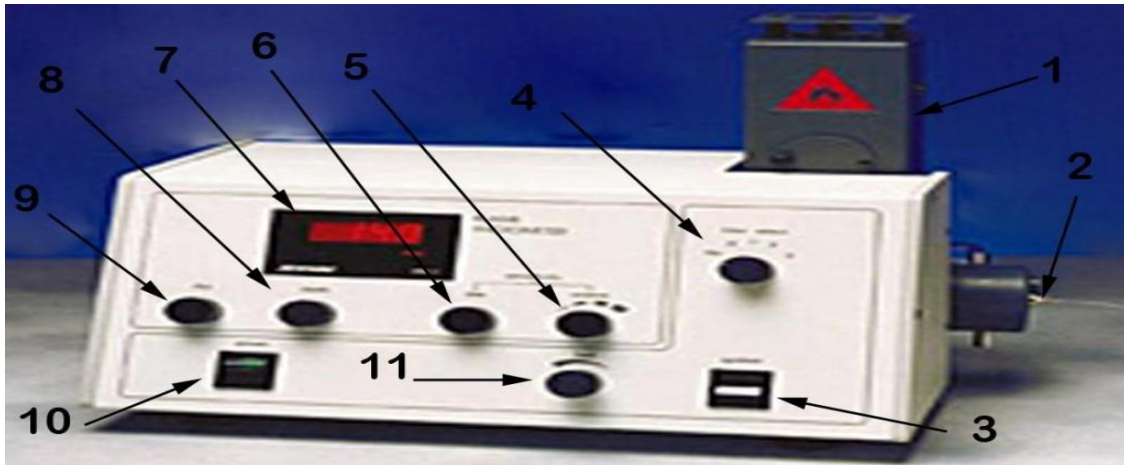
اسپکتروفتومتر مادون قرمز در شناسایی مولکولی و ارتعاشات وابسته به ساختار آن استفاده می شود. ساختارهای شیمیایی متفاوت، به دلیل تفاوت در انرژی های مربوط به هر طول موج، راه های مختلفی در پاسخ به طول موج های مختلف دارند. به عنوان مثال مادون قرمزهای برد متوسط، تمایل به لرزش دورانی دارد، درحالیکه مادون قرمز نزدیک (با انرژی بالاتر) تمایل به لرزش هارمونیک مولکولی مانند جنبش دارد.

در اسپکتروفتومترهای IR متداول یک پرتو مادون قرمز مستقیماً به نمونه می تابد و تمام طول موج های طیف نسبت به پرتو مرجع اندازه گیری می شود. به منظور تولید طیفی با کیفیت بالا، باید پهنای طیف ورودی به آرامی اسکن شود. اسپکتروسکوپی IR با روش بسط تبدیل فوریه اصلاح می شود. قلب اسپکتروفتومترهای IR تداخل سنج میشلسون است. و تابش شده از منبع IR به سمت سلول های نمونه هدایت می شود. نیمی از پرتو تابشی از آینه ثابت باز تابیده شده و نیم دیگر آن از آینه ای که مرتباً در فاصله ای حدود دو و نیم میکرومتر حرکت می کند منعکس می شود. هنگامی که دوباره دو پرتو در آشکارساز با هم ترکیب می شوند و تداخل به وجود می آید، حدود دو ثانیه یک اسکن از فاصله ورودی گرفته شده و در کامپیوتر ذخیره می شود. به همین ترتیب چندین اسکن دیگر نیز به طور همزمان به آن اضافه می شود. با توجه به نوسانات و ارتعاشات حرارتی در آزمایشگاه بدیهی است که این امر نا ممکن است. پس به منظور حل این مشکل از لیزر هلیم - نئون برای تاباندن به تداخل سنج میشلسون استفاده می شود و تداخل لیزر به عنوان فرکانس مرجع به کار گرفته می شود. کارائی FTIR از دستگاه های معمولی بیشتر است که می توان تنها با مقدار کمی از نمونه و در زمانی کوتاه به طیفی عالی دست یافت.



#### ۵- اسپکتروفتومتر نشر شعله Flame

ساختمان این دستگاه شبیه اسپکتروفتومتر یا فتومتر ساده است با این تفاوت که در فتومتر، لامپ الکتریکی و در این دستگاه نور حاصل از سوختن ماده مورد آزمایش در درون شعله به عنوان منبع نوری در نظر گرفته می شود. در طیف سنجی نشر شعله، نور حاصل مستقیماً اندازه گیری می شود.

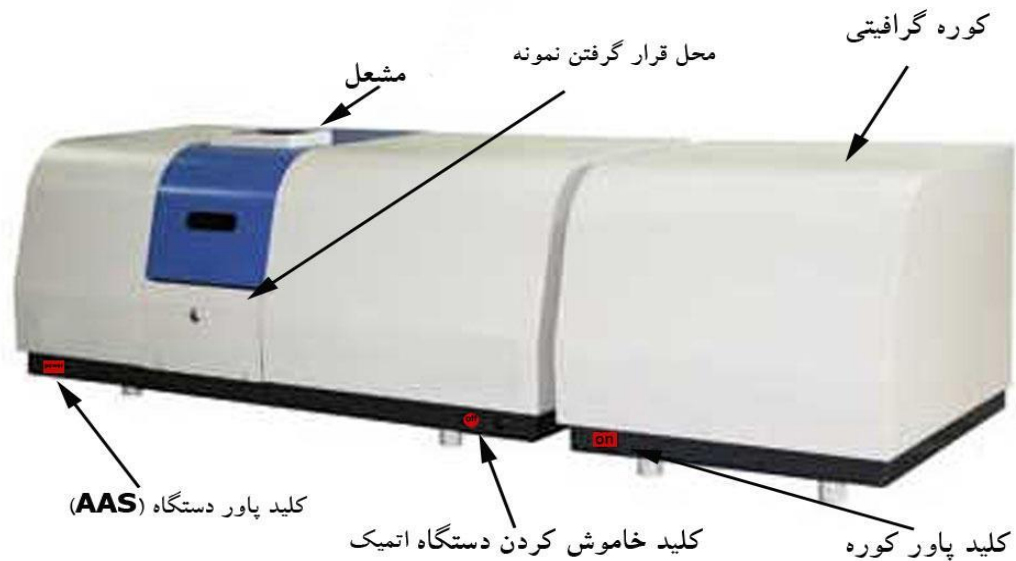


۱. مشعل ۲. محل ورود نمونه ۳. فندک (برای روشن کردن مشعل) ۴. تعیین عنصر مورد اندازه گیری  
 ۵. تعیین نشر استاندارد (برای تغییر مقادیر بزرگ) ۶. تعیین نشر استاندارد (برای تغییر مقادیر کم) ۷. نمایشگر  
 ۸. کالیبراسیون (نشر آب را صفر میکنیم) ۹. تغییر واحد نشر ۱۰. کلید پاور دستگاه ۱۱. تنظیم سوخت

#### ۶- اسپکتروفتومتر جذب اتمی Atomic Absorption

اسپکتروفتومترهای جذب اتمی (AAS) غلظت عناصر فلزی که از نظر پزشکی برای حفظ سلامتی مهم است را اندازه گیری می کند. در خصوص این عناصر می توان به کلسیم، منیزیم، مس، روی و آهن اشاره نمود. اسپکتروفتومترهای جذب اتمی همچنین برای تعیین اینکه آیا سطح درمانی داروهای نظیر لیتیم در خون، تامین شده است یا خیر و همچنین برای آشکارسازی و تعیین کمیت سموم فلزی مورد استفاده قرار می گیرد.

دستگاه جذب اتمی (atomic absorption spectrophotometer)



## استفاده از اسپکتروفوتومتر

اسپکتروفوتومترها مستقیماً برای اندازه‌گیری شدت نور در طول موج‌های مختلف استفاده می‌شود و می‌تواند نماینده درصد نور تابشی مخبره شده یا جذب شده باشد. با استفاده از این اطلاعات و مقایسه آن با دانسیته‌ها و داده‌های به دست آمده می‌توان اسپکتروسکوپی را به عنوان یک ابزار استفاده کرد. مقایسه طیف‌ها برای تعیین غلظت جسم حل شده موجود در حلال مثال خوبی است. بدین ترتیب که با ثبت نور ارسال و دریافت شده در طول موجی خاص و بررسی طول موج جذب شده توسط حلال می‌توان به غلظت آن پی برد. سپس آنالیز محلول با غلظت ناشناخته، با داده‌های معلوم مقایسه شده و به کمک تناسب غلظت محاسبه می‌شود. این عمل برای محلول‌هایی که در آن‌ها چندین نوع حلال وجود دارد نیز قابل استفاده است و البته به دقت بیشتری در آنالیز طول موج‌ها احتیاج دارد. با توجه به حساسیت اسپکتروفوتومتر FTIR مناسب‌ترین و رضایت‌بخش‌ترین روش آماده‌سازی نمونه، تبخیر ساده محلول نمونه در صفحه‌ای از نمک KBr و دست‌یافتن به طیف‌های فیلم نازک باقی‌مانده است. این روش طیفی بسیار خوب با خط‌مبداء مسطح به وجود می‌آورد.

اسپکتروفوتومترهایی که منبع نور ندارند اما طیف‌های مبنی بر نور وارده را تولید می‌کنند می‌توانند با روشی مشابه برای تعیین منبع نور استفاده شوند. می‌توان منحنی طیف‌های به دست آمده از منبع نوری نامعلوم (یا ترکیبی از منابع) را با اطلاعات منحنی‌های منبع نور مشخصی مقایسه کرد و منبع نور ناشناخته را شناسایی کرد.

از دیگر کاربردهای اسپکتروفوتومتر می‌توان به تعیین ثابت موازنه واکنش‌های یونی که در محلول‌های آبی انجام می‌شود اشاره کرد. در ابتدا طیف‌های محلولی که تنها شامل یک واکنش دهنده است اندازه‌گیری می‌شود. سپس دیگر واکنش‌دهنده‌ها به آن اضافه می‌شود و پس از هر بار افزایش، طیف سنجی صورت می‌گیرد. این روش در صورتی که طول موج جذب شده توسط محصول مقداری مشخص باشد، از آنجاکه بیشتر محصولات از اضافه کردن چندین واکنشگر به دست می‌آیند، زمانی که محلول اشباع شده و واکنش موازنه می‌شود نورهای بیشتری جذب شده و افزایش نور جذب شده برابر ثابت موازنه است.

### در هنگام نصب دستگاه اسپکتروفوتومتر باید به نکات زیر توجه داشت:

- ۱- اسپکتروفوتومتر باید روی سطحی سفت و در محیطی خشک و تمیز نصب شود.
- ۲- به جهت امکان جریان هوا در اطراف اسپکتروفوتومتر، باید بین دستگاه و دیوارهای اطراف ۵۰ میلی‌متر فاصله باشد.
- ۳- کابل برق دستگاه به پریز گراند شده با ولتاژ مناسب وصل شود.
- ۴- پس از اتصال آداپتور AC به برق، خروجی آن باید به گونه‌ای به دستگاه وصل شود که منبع ذخیره DC در مسیر آن قرار گیرد.
- ۵- در صورتی که خود دستگاه فاقد پرینتر است، باید از طریق پورت مخصوص آن‌را به پرینتر وصل کرد.
- ۶- پس از روشن کردن دستگاه مدتی صبر کرده تا دستگاه گرم شده و به پایداری حرارتی و الکترونیکی برسد.