



بسم الله الرحمن الرحيم

دستگاه اسپکتروفتومتر

تهیه و تنظیم :

افشین سیفی جمادی

Novin-damparvaran

پاییز ۹۱

تعریف :

اسپکتروفتومترها، تجهیزاتی هستند که جذب یا عبور طول موج‌های مشخصی از انرژی تابشی (نور) از یک آنالیت را در یک محلول تعیین می‌کنند.

- به طور کلی نور با طول موج و انرژی خاص به نمونه تابانده شده و مقدار مشخصی از انرژی آن جذب می‌شود.
- سپس با اندازه‌گیری انرژی رد شده از نمونه توسط یک دتکتور، مقدار جذب تعیین می‌شود.



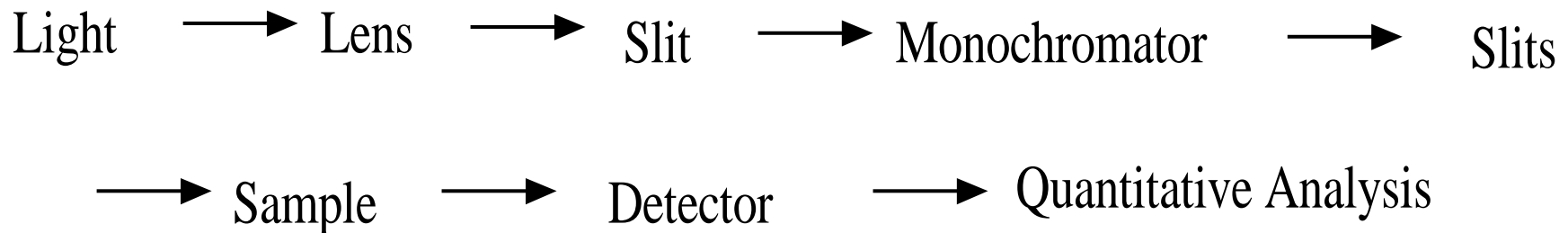
دستگاه اسپکتروفوتومتر



دستگاه اسپکتروفتومتر

تعریف :

- در حقیقت این روش با استفاده از میزان جذب نور، تعیین غلظت می کند.
- خروجی اسپکتروفتومتر همیشه نموداری از شدت نور نسبت به طول موج است. (جذب)



تعریف :

- طبق قانون بیر، هر گاه یک اشعه نور تک رنگ از درون محلولی با رنگ مکمل عبور کند، مقدار نور جذب شده توسط محلول، با غلظت آن نسبت مستقیم دارد.
- بر اساس قوانین بیر و لامبرت رابطه بین غلظت محلول و نور جذب شده به صورت خطی است و معمولاً در محدوده ای که جذب با غلظت رابطه خطی دارد، تعیین غلظت مواد انجام می شود.
- اگر غلظت نمونه و استاندارد به هم نزدیک باشد و غلظتها هم در محدوده خطی باشند، می توان با استفاده از تناسب محاسبات را

انجام داد .

شدت نور تابانده شده _____ جذب _____

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A$$

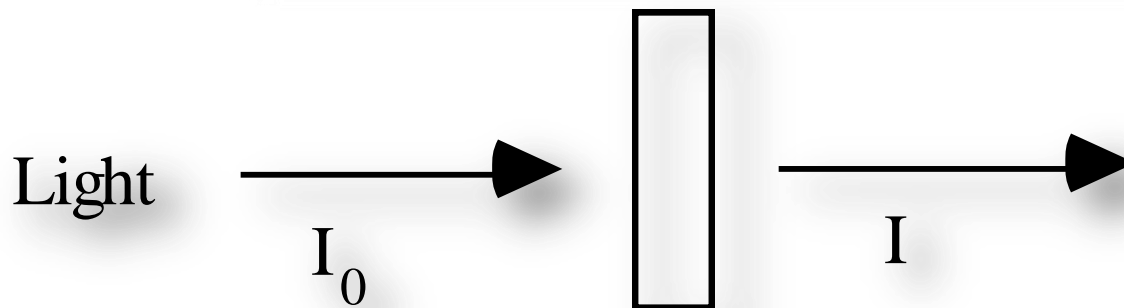
شدت نور عبوری _____

$$A = ecl$$

ضخامت کووت _____

ضریب جذب ماده

غلظت ماده مورد نظر



Glass cell filled with
concentration of solution (C)

مفاهیم پایه :

اسپکتروفوتومتر (spectrophotometer) متشکل از دو قسمت است :

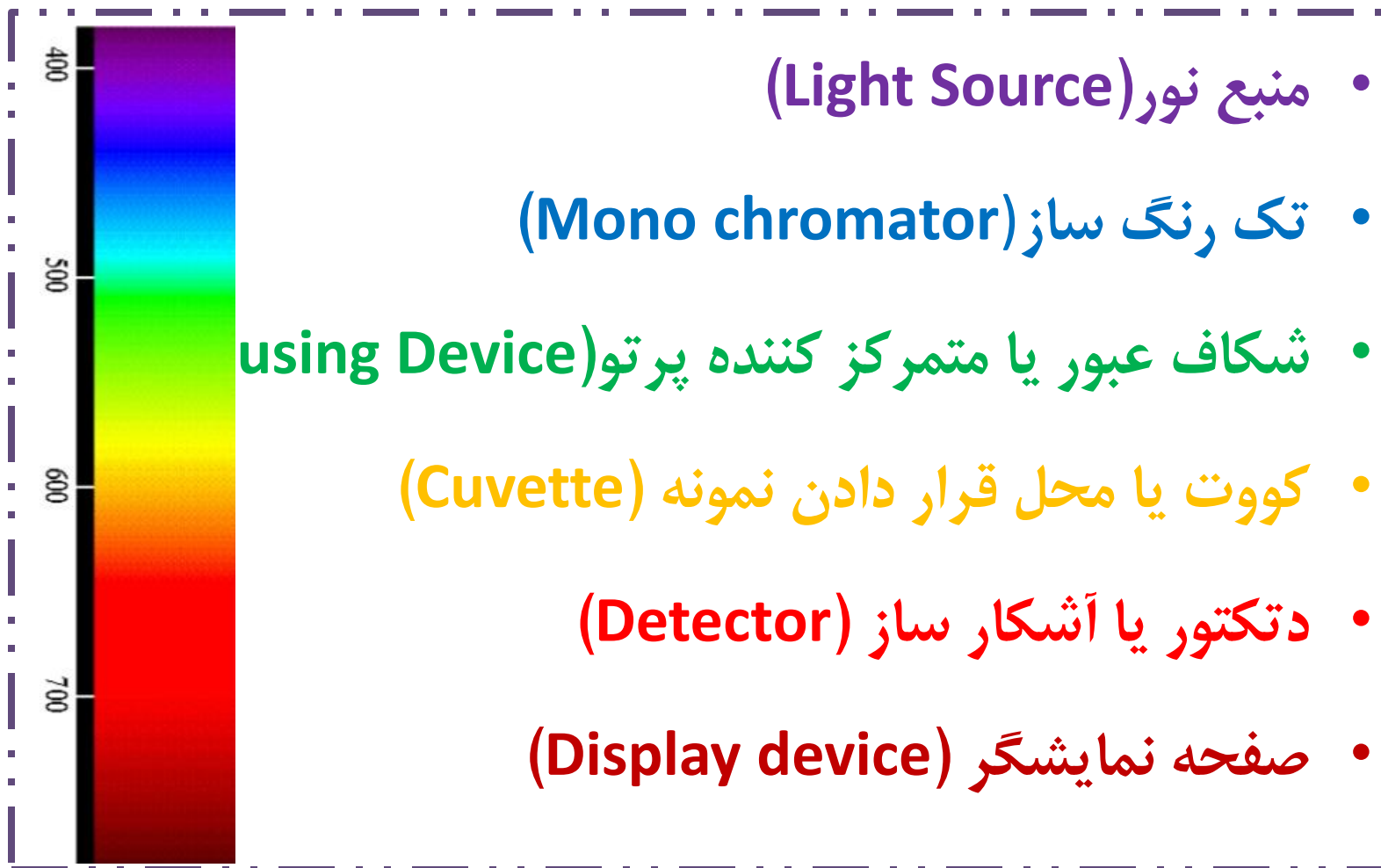
photometer
(نور سنج)

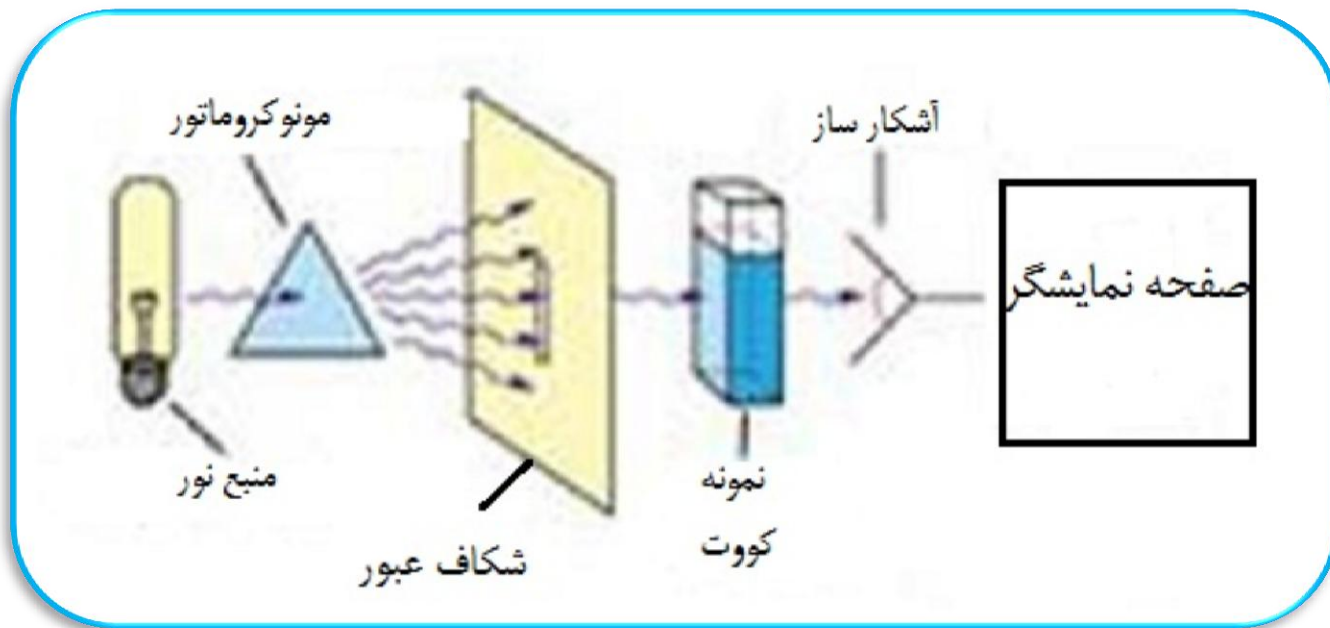
Spectro
(طیف سنج)

ادامه

- **اسپکترومتر** بخشی است که نور منوکروم را ایجاد کرده و دارای منبع نور، عدسی، شکافها، منوکروماتور (صافی یا منشور) می باشد.
- بخش **فتومتر** دارای وسایل سنجش نور است.

اجزاء اسپكتروفوتومتر:





اجزاء اسپکٹروفوٹومتر:

منبع نور

- منبع نور می تواند نور مرئی، مادون قرمز یا ماورا بنفش تولید کند .

UV Spectrophotometer

- Hydrogen Gas Lamp
- Mercury Lamp

Visible Spectrophotometer

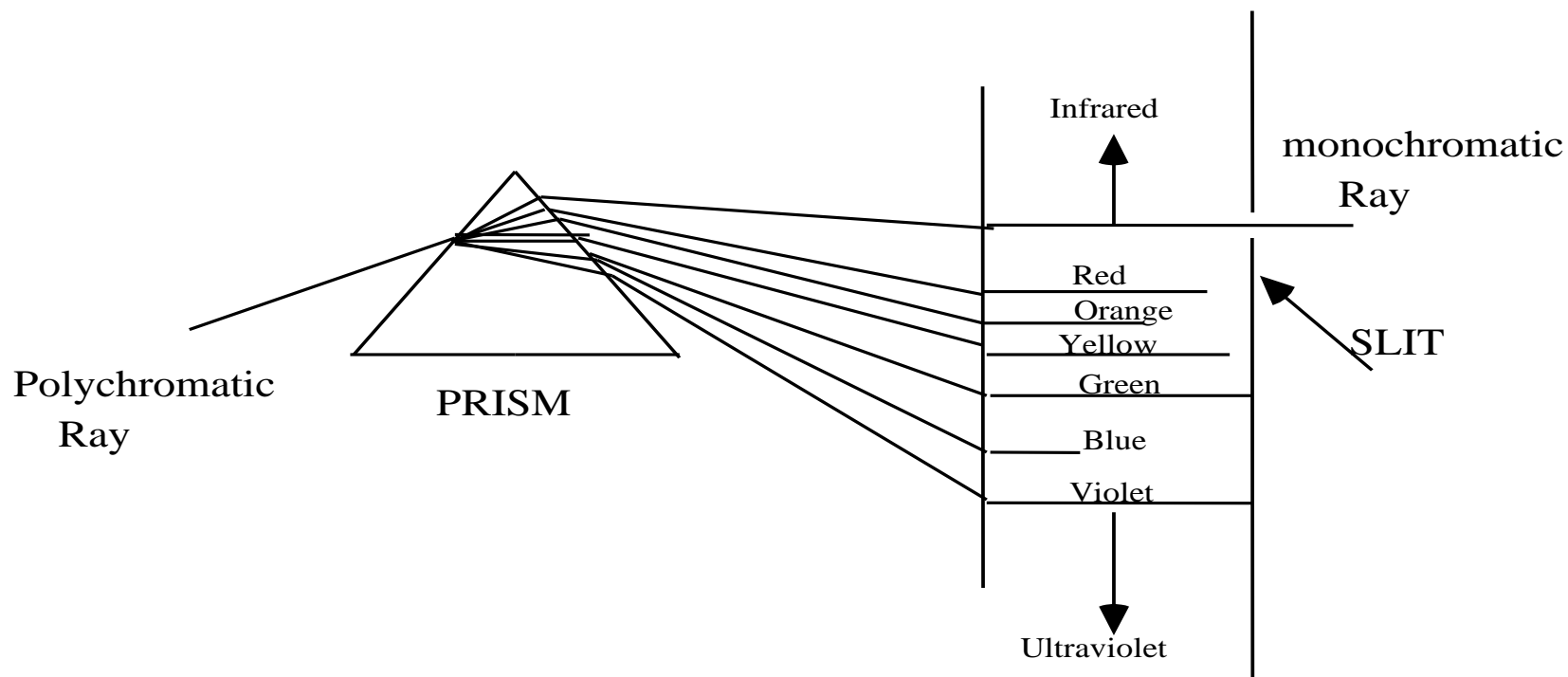
- Tungsten Lamp

اجزاء اسپکتروفتومتر:

تکفام
ساز

- تکفام ساز (Monochromator)

این قسمت دستگاه، نور مخلوط را به پرتوهای تک رنگ تجزیه می کند. این عمل ممکن است توسط منشور یا سیستم گریٹینگ انجام شود. فیلترها شیشه‌های رنگی است که بخش وسیعی از پرتوها را جذب کرده و فقط طول موج‌های محدودی را عبور می‌دهد.



Polychromatic Ray \longrightarrow Monochromatic Ray

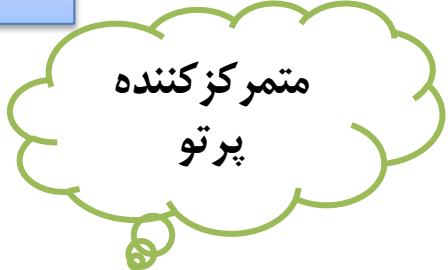
اجزاء اسپکتروفوتومتر:

محل
نمونه

• محل نمونه (Cuvette)

کووت‌ها قسمتی از دستگاه است که نمونه مورد نظر یا بلانک در آن قرار می‌گیرد. این بخش معمولاً به صورت استوانه یا مستطیل بوده و از شیشه، کوارتز یا پلاستیک ساخته می‌شود. کووت‌های پلاستیکی و شیشه‌ای برای محدوده مرئی به کار می‌روند.

اجزاء اسپکٹروفوٹومتر:



متمرکز کننده
پرتو

- **متمرکز کننده پرتو (Focusing Device)**

با ترکیبی از عدسی‌ها، شکاف بین دو تیغه باریک فلزی و آئینه‌ها در مسیر پرتو تابش، پرتوها موازی می‌شود و با تنظیم عرض شکاف می‌توان عرض پرتو را تنظیم کرد. هر چقدر عرض شکاف نور به کار رفته کمتر باشد، کیفیت پرتوها بهتر خواهد بود.

اجزاء اسپکٹروفوتومتر:

آشکار
ساز

• آشکار ساز

در انتهای مسیر نور، آشکار ساز وجود دارد که وظیفه آن اندازه گیری شدت نور تابیده شده و انتقال اطلاعات به کنتوری است که آنها را ثبت و مقدار را بر روی LCD به اپراتور نمایش دهد. امروزه دو نوع آشکار ساز در اسپکٹروفوتومتر UV / VIS متداول است :

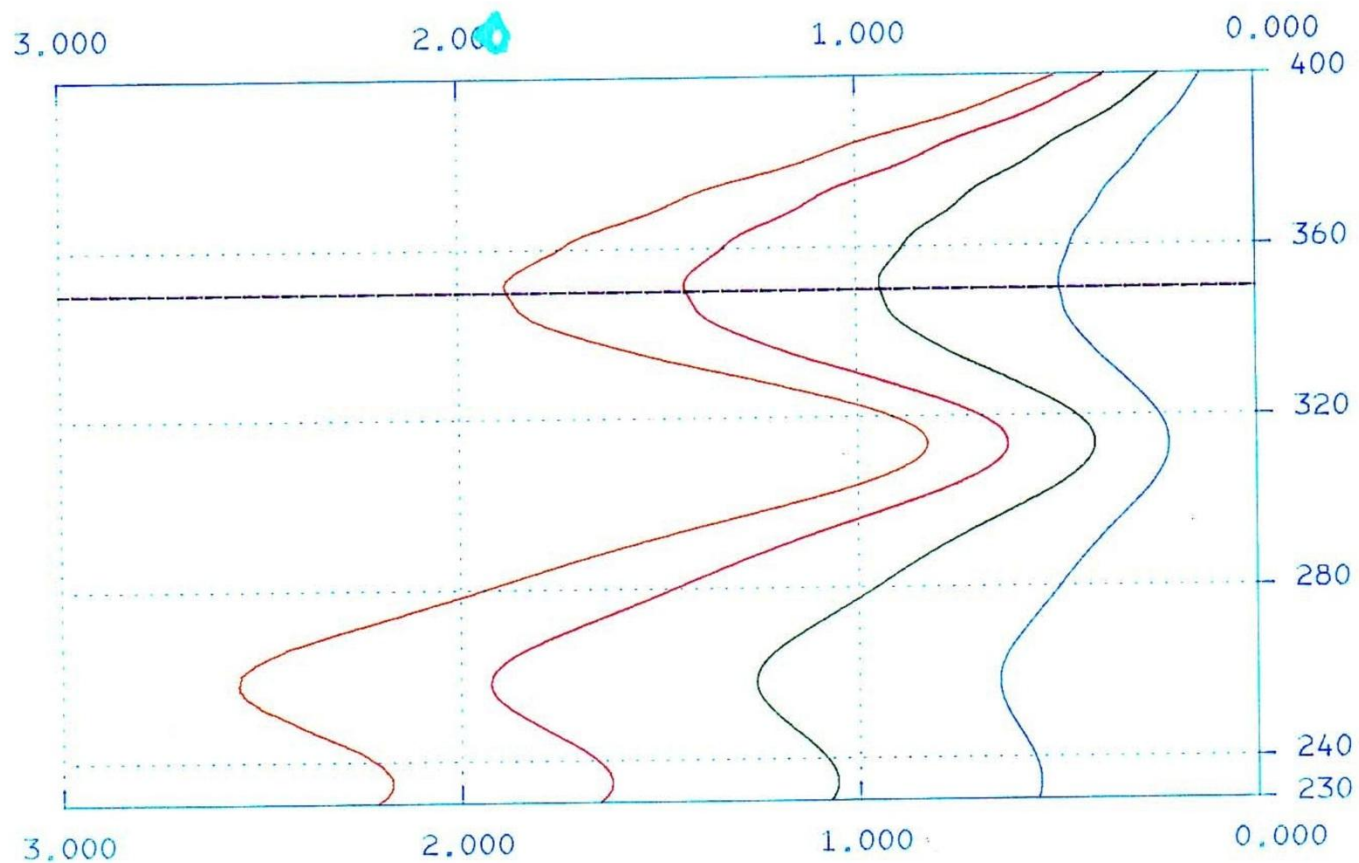
• فتوتیوب

• فتومالتی پلایر تیوب

*** STANDARD SAMPLE ***

LAMBDA ; 350.0nm
SLIT ; 2.0nm

SAMPLE NAME ; Potassium Dichromate
DATE ; 18:33:29 -2/-4 ' -2



STD
NO.

CONC
(PPM)

Abs

[CONC]= 31.769*[Abs]

اجزاء اسپکتروفتومتر:

مفسر

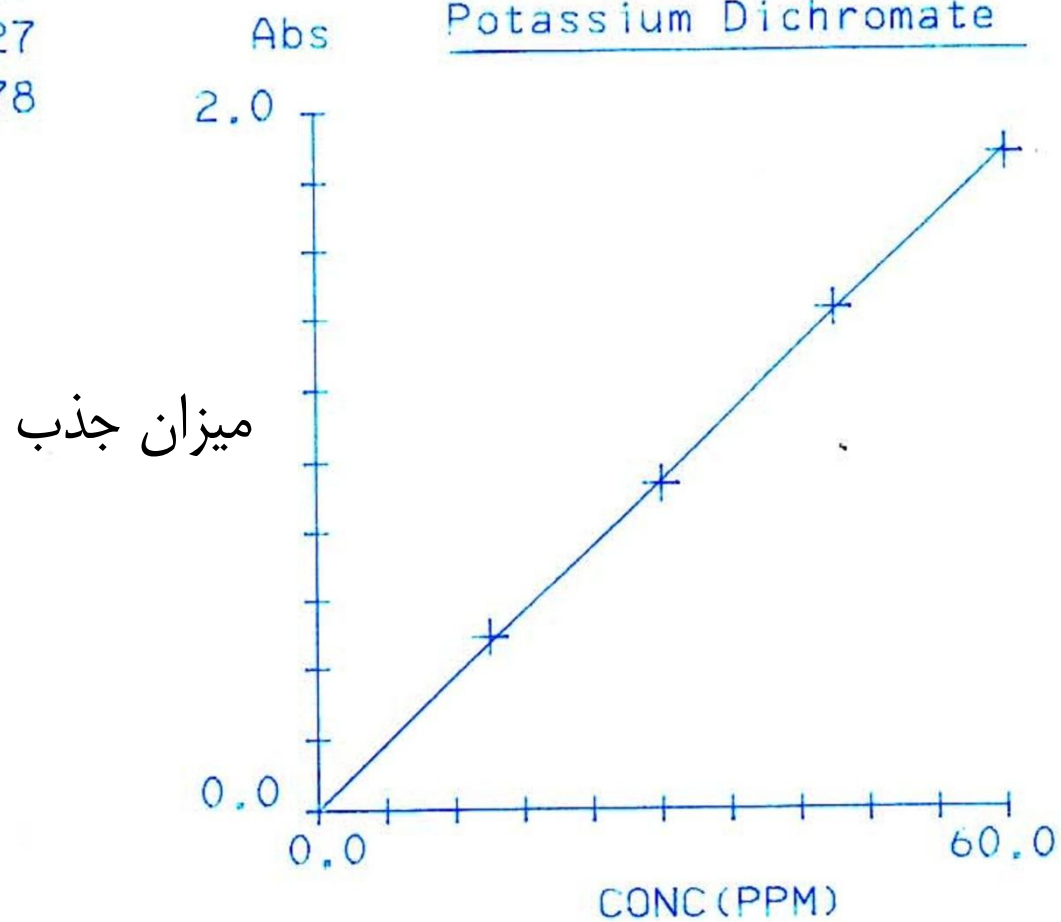
• مفسر

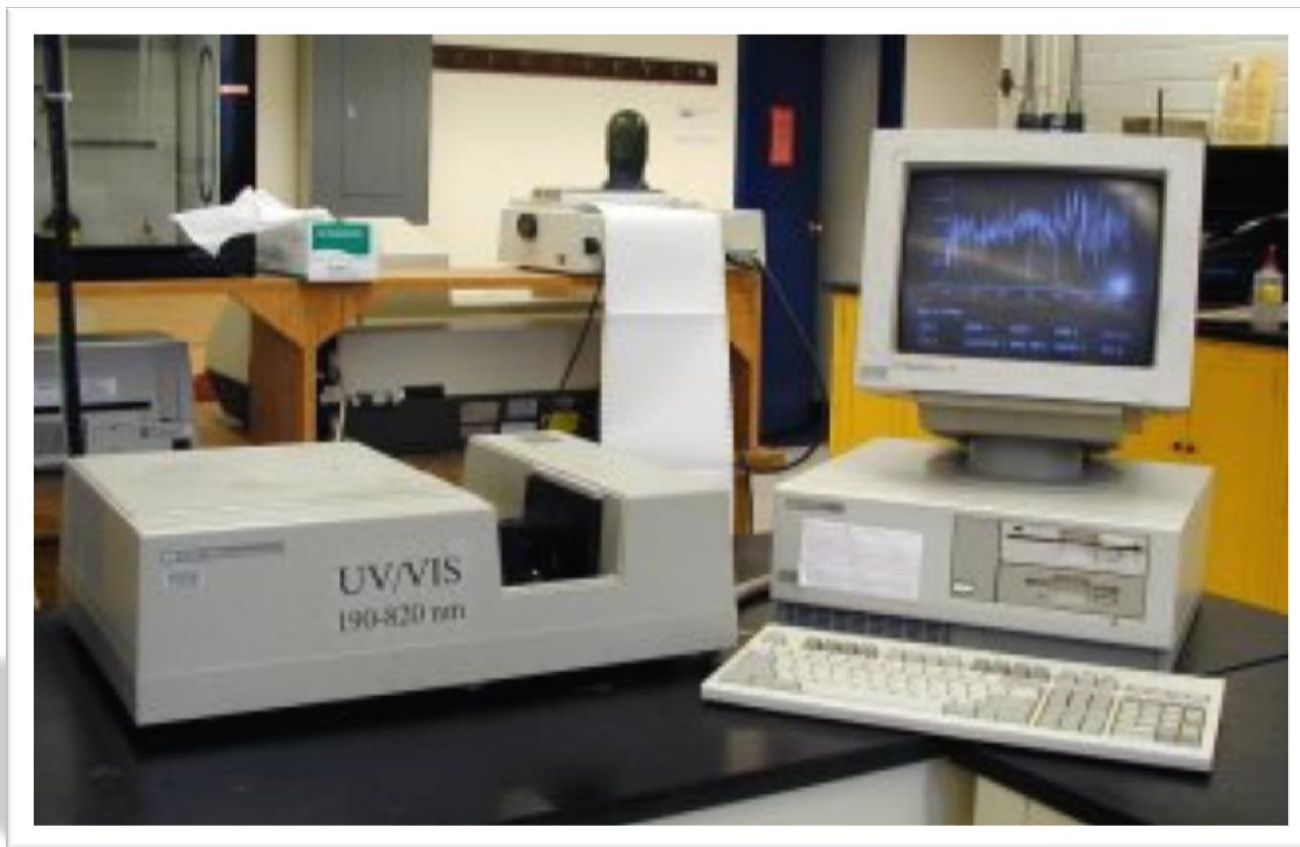
اسپکتروفتومتر ها می توانند خروجی خود را به صورت های مختلف نمایش دهند، اما متداول تر است که آن را به کامپیوتر وصل کرده و برای آنالیز داده ها از نرم افزار استفاده کنند و آن را به صورت کاربردی مانند نموداری از مقدار عبور یا مقدار جذب بر حسب طول موج نمایش می دهند.

1	15.0	0.491
2	30.0	0.940
3	45.0	1.427
4	60.0	1.878

ORDER = 1

Potassium Dichromate





انواع مختلف دستگاه اسپکتروفتومتر :

اسپکتروفتومتری مرئی و ماوراء بنفش (UV/Vis)

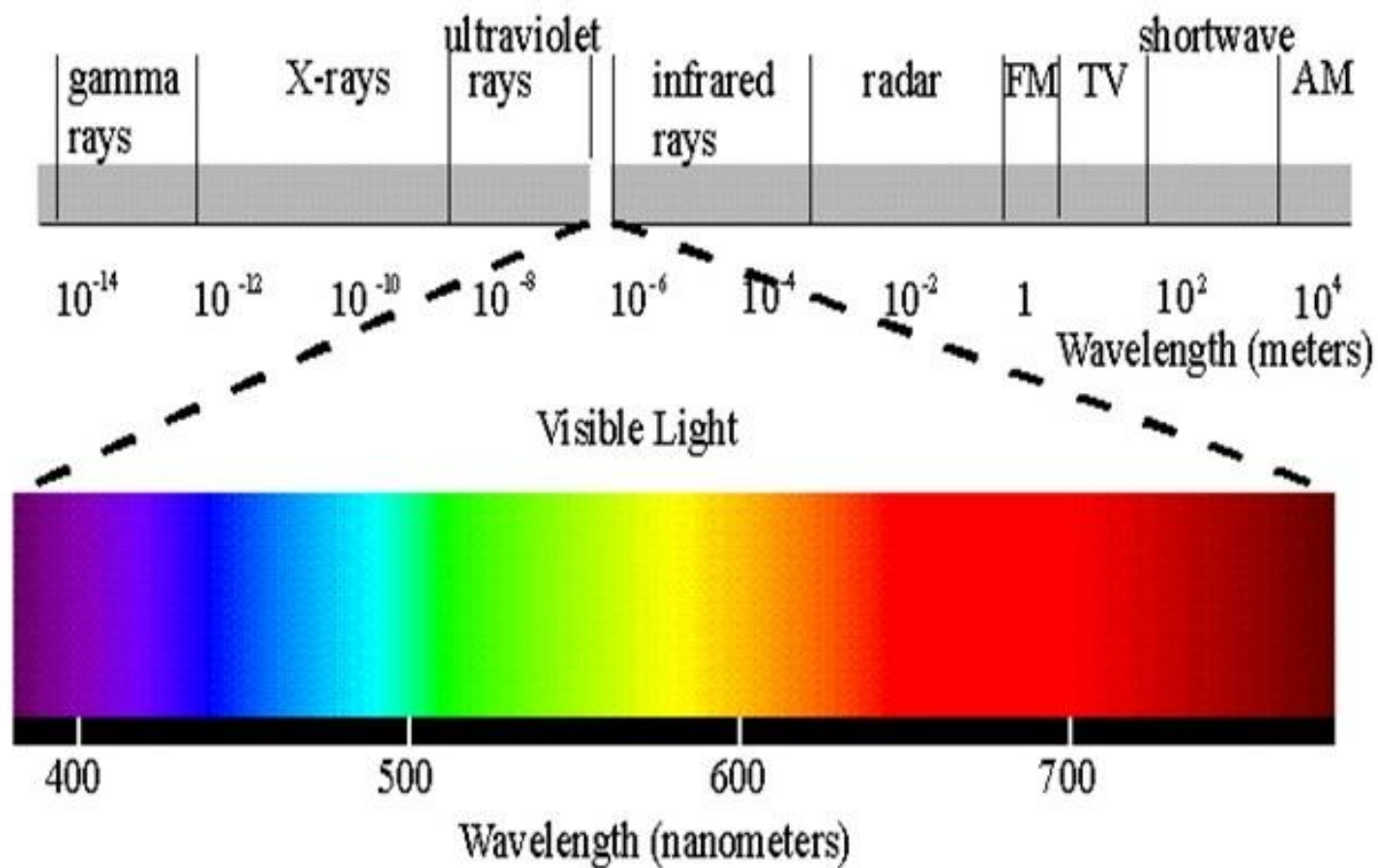
اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی-مادون قرمز نزدیک (Uv/Vis/NIR)

اسپکتروفتومتر نشر شعله (Flame)

اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Atomic Absorption)

اسپکتروفتومتری مرئی و ماوراء بنفش (UV/Vis):

محدوده نور مرئی حدود ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر است. اسپکتروفتومتر های ناحیه مرئی دقت و صحت متغیری دارند. برخی از آنها آشکارساز CCD با پیکسل های کافی برای قرائت هر 10 nm را دارند، در حالیکه برخی دیگر می توانند در هر نانومتر چندین قرائت انجام دهند. این اسپکتروفتومتر ها می توانند از منابع نور سیمایی، هالوژن، LED یا ترکیبی از این منابع مثل LED تقویت شده با رشته های تنگستن استفاده کنند.



ادامه

- کاوت (Cuvette) می تواند از جنس پلاستیک، شیشه یا **کوارتز** باشد. پلاستیک و شیشه، **UV** را جذب می کنند از اینرو تنها می توان آنها را برای اسپکتروفتومتر های نور مرئی استفاده کرد .



استفاده از اسپکتروفتومتر در فیزیولوژی:

- قند خون، انواع چربی ها، اسید اوریک، اوره و غیره از جمله موادی هستند که باعث بروز بیماری های مختلف برای افراد می شوند. اندازه گیری غلظت این مواد توسط اسپکتروفتومتر امکان پذیر است.

UV Spectrometer

Protein

Amino Acids (aromatic)

Pantothenic Acid

Glucose Determination

Enzyme Activity (Hexokinase)

Visible Spectrometer

Niacin

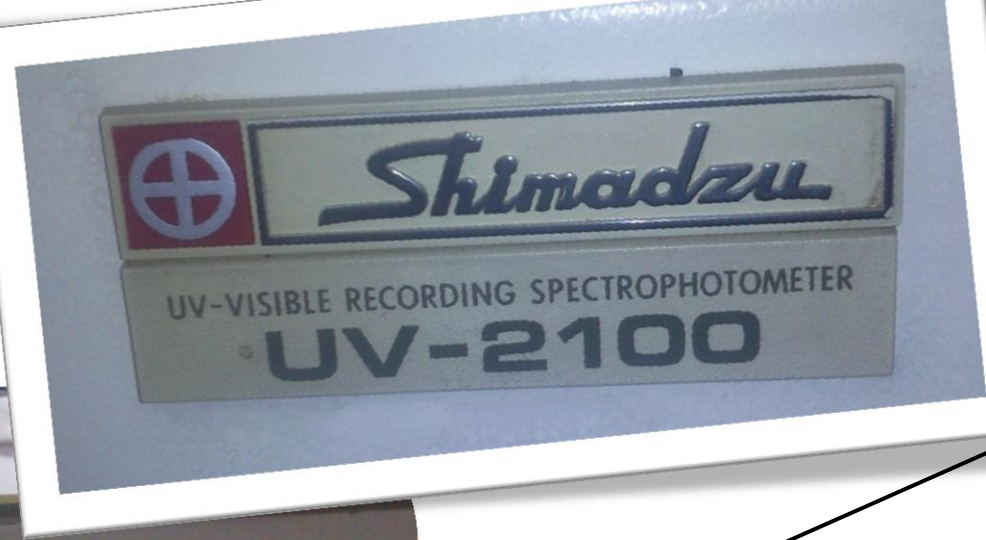
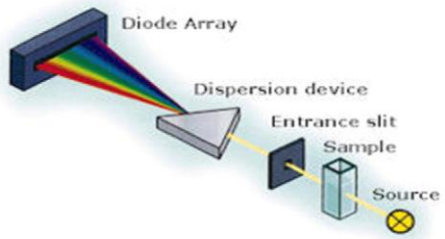
Pyridoxine

Vitamin B12

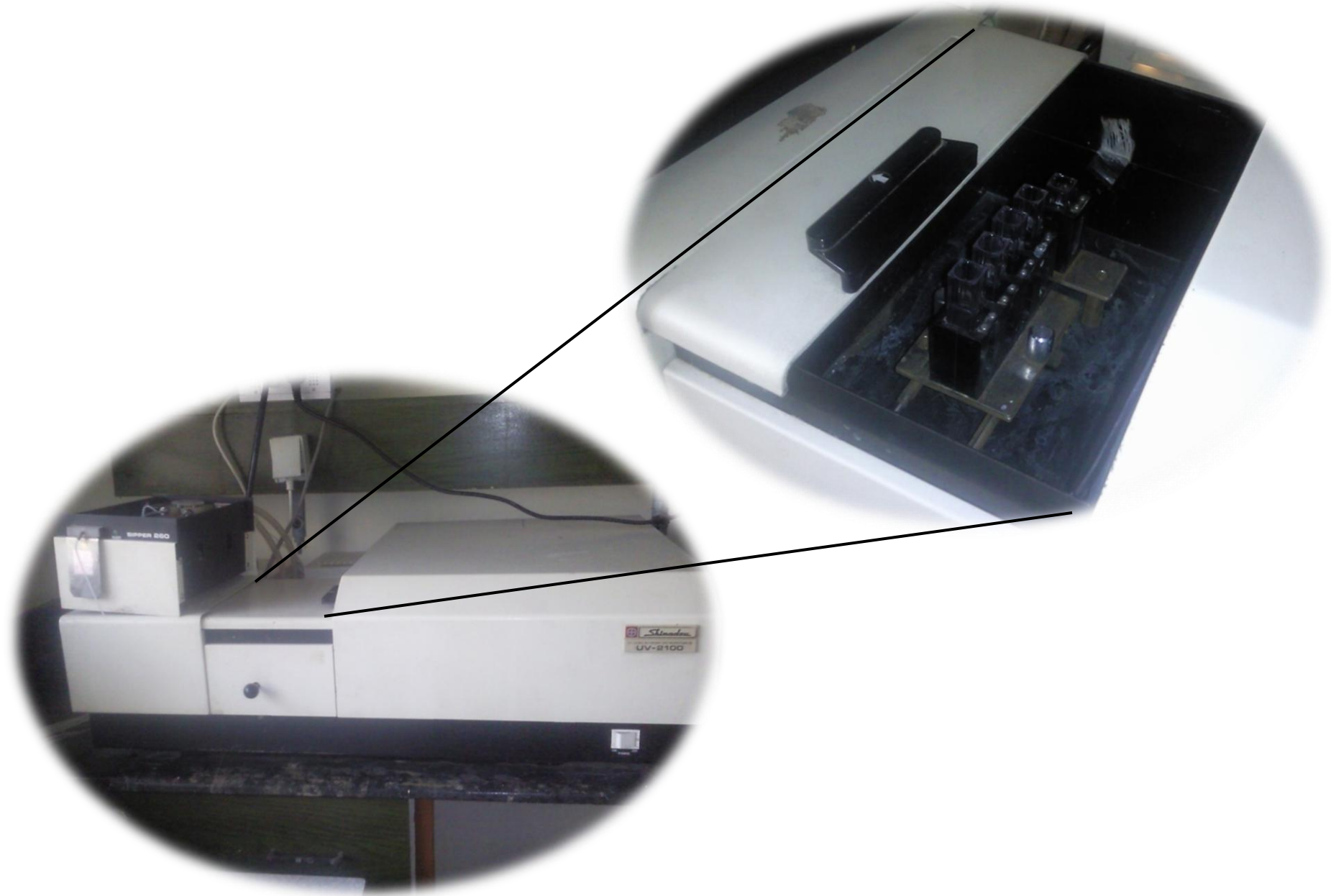
Metal Determination

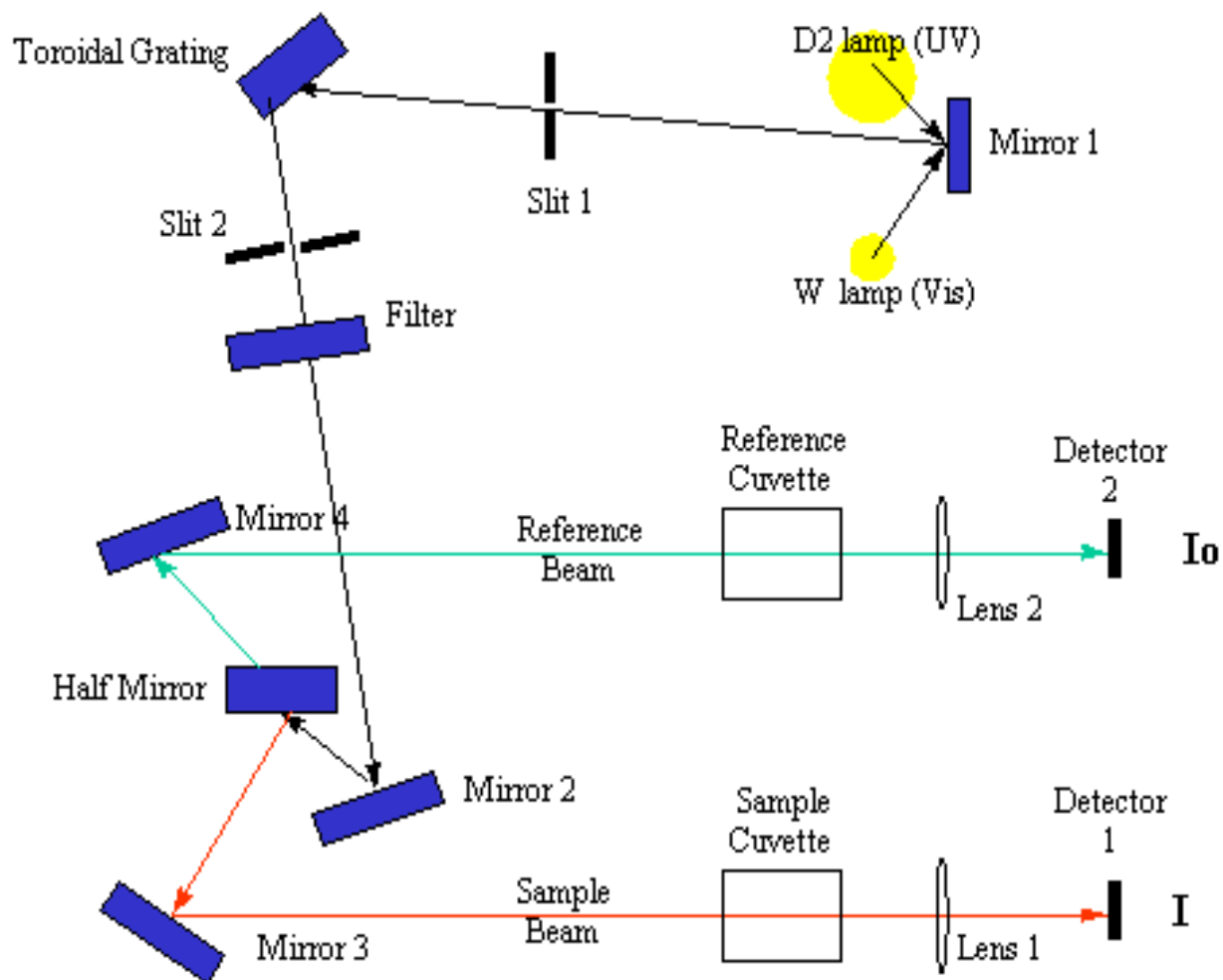
Fat-quality Determination

Enzyme Activity



دستگاه اسپکتروفتومتر



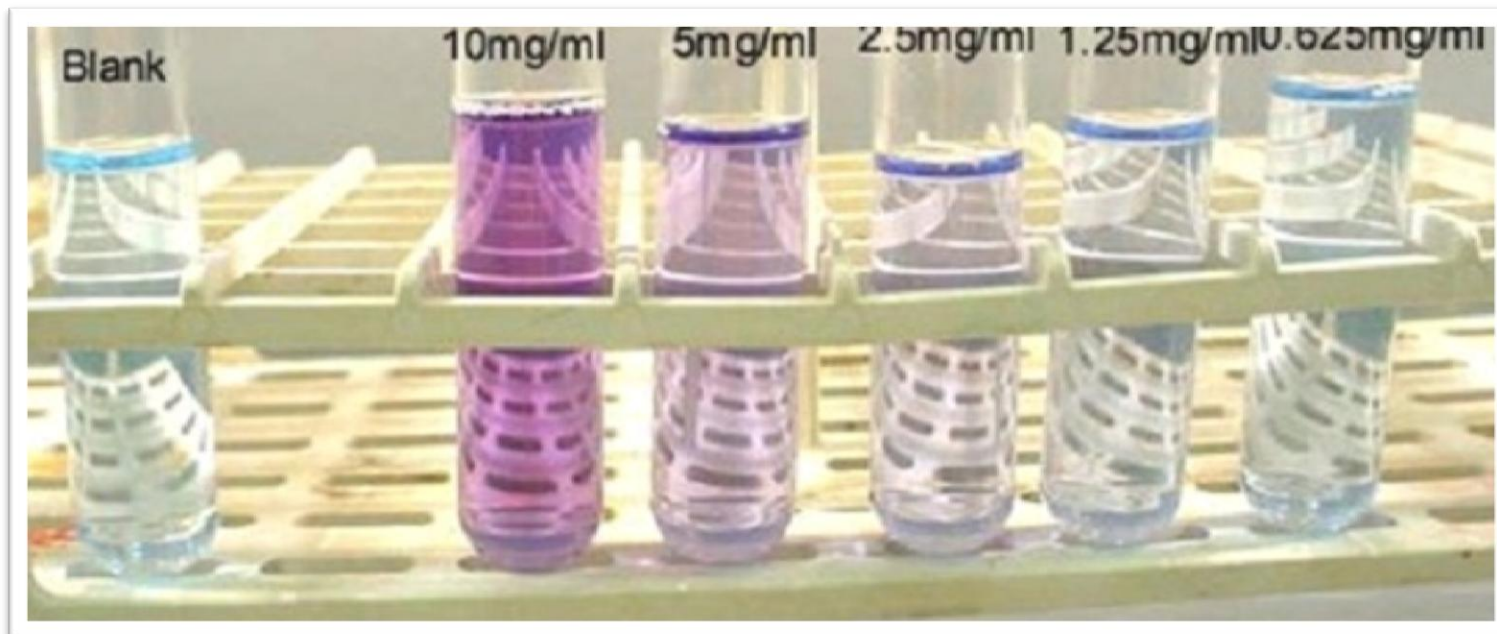


کار با اسپکتروفتومتر:

- پس از اتصال به برق دستگاه را روشن می کنیم حدود ۱۰ دقیقه صبر می کنیم تا به اصطلاح دستگاه گرم شود
- طول موج مورد نظر را انتخاب می کنیم (طول موجی که هر ترکیب خاص در آن بیشترین جذب نوری را دارد)
- با استفاده بالانک دستگاه را صفر میکنیم .
- استاندارد آزمایش و نمونه به ترتیب به کووت منتقل نموده و جذب آن را می خوانیم .
- با یک محاسبه غلظت نمونه بدست می آوریم .

کار با اسپکتروفتومتر:

- تعیین استاندارد برای اکسید کروم :
- مقدار مشخصی اکسید کروم خالص را در محلول هضمی حل کرده و این غلظت مشخص را در دستگاه ثبت کرده و دستگاه را run میکنیم ، این کار را چندین بار با غلظت های مختلف انجام میدهیم ، براساس جذب نوری که توسط محلولهای مورد نظر صورت میگیرد دستگاه یک منحنی استاندارد تشکیل داده و پس از آن به راحتی میتوان غلظت نمونه های مختلف را تعیین کرد .



کار با اسپکتروفتومتر:

بدست آوردن غلظت اکسید کروم برای محاسبه ی قابلیت هضم :

- ۱ گرم از نمونه (خوراک یا مدفوع) را در کوره سوزانده و خاکستر آن را با **محلول هضمی اکسید کروم** مخلوط میکنیم .
- روی هیتر تا زمانی که رنگ آن از سبز به زرد تبدیل شود قرار میدهیم .
- بعد از ۱۵ دقیقه برداشته و به آرامی سرد میکنیم .
- محلول بدست آمده را به حجم ۲۰۰ میلی لیتر میرسانیم .
- سپس حدود ۱ تا ۲ سی سی در کووت ریخته و توسط اسپکتروفتومتر تعیین غلظت میکنیم .

کار با اسپکتروفتومتر:

• مراحل کلی استفاده از اسپکتروفتومتر :

- ۱) آماده کردن محلول بلانک و محلولهای استاندارد .
- ۲) بدست آوردن غلظت استاندارد ها
- ۳) تشکیل معادله ی خط (با ترسیم نمودار غلظت ، جذب نور)
- ۴) استفاده از دستگاه برای بدست آوردن غلظت محلولهای مورد نظر

منابع

- *Hinna Hamid (2007) ,Ultraviolet and Visible Spectrophotometry , Dept. of Chemistry Faculty of Science ,Jamia Hamdard ,Hamdard Nagar , New Delhi- 110062*
- *Thomas Klink ,(1995) , Calibration and validation of spectrophotometers , Luminescence and Colour ,Science and Compliance , Elsevier Science B.V*
- *Franz-Xaver Schmid (2001) , Biological Macromolecules ,UV-visible Spectrophotometry University of Bayreuth, Germany*

