

## طیف سنج مرئی-فرابنفش (UV-Vis Spectrophotometer)

طیف سنجی مرئی-فرابنفش (Ultraviolet-Visible Spectrophotometry) یکی از رایج ترین و پرکاربردترین تکنیک های آنالیز دستگاهی در آزمایشگاه های شیمی، بیوشیمی، داروسازی و علوم محیطی است. این دستگاه بر اساس جذب نور توسط مولکول ها در ناحیه فرابنفش (UV, 190-380 nm) و مرئی (Visible, 380-1100 nm) کار می کند و اطلاعات ارزشمندی درباره غلظت، خلوص و ساختار نمونه ارائه می دهد.

### ۱. هدف و کاربرد (Purpose and Applications)

طیف سنج UV-Vis برای تعیین میزان جذب نور توسط یک نمونه در طول موج های مختلف طراحی شده است. رابطه بین جذب نور و غلظت توسط قانون بیر-لامبرت (**Beer-Lambert Law**) توصیف می شود که اساس آنالیزهای کمی را تشکیل می دهد.

کاربردهای اصلی در آزمایشگاه:

- آنالیز کمی (**Quantitative Analysis**): تعیین غلظت ناشناخته یک ماده با استفاده از منحنی کالیبراسیون
- آنالیز کیفی (**Qualitative Analysis**): شناسایی ترکیبات بر اساس طیف جذبی منحصر به فرد آنها
- مطالعات سینتیکی (**Kinetic Studies**): بررسی سرعت واکنش های شیمیایی با اندازه گیری تغییرات جذب در طول زمان
- کنترل کیفیت (**Quality Control**): اطمینان از خلوص و غلظت صحیح مواد اولیه و محصولات نهایی
- تعیین ثابت های تعادل (**Equilibrium Constants**): مانند بررسی برهمکنش DNA با پروتئین ها یا داروها
- آزمایشات آنزیمی (**Enzymatic Assays**): اندازه گیری فعالیت آنزیم ها از طریق تغییرات جذب سوبسترا یا محصول

### ۲. اصول عملکرد و اجزای اصلی (Working Principle & Components)

اجزای اصلی و عملکرد آنها

جزء (Component)	توضیح و عملکرد
منابع نور (Light Sources)	ترکیبی از دو لامپ: دوتریوم (Deuterium) برای ناحیه UV (190-350 nm) و تنگستن (Tungsten/Halogen) برای ناحیه مرئی (۳۵۰-۱۱۰۰ nm). تعویض خودکار بین این دو منبع معمولاً در طول موج ۳۲۳ نانومتر اتفاق می‌افتد.
تک رنگ‌ساز (Monochromator)	شامل توری پراش (Diffraction Grating) است که نور پلی کروماتیک (چند رنگ) را به طول موج‌های مجزا تفکیک می‌کند و تنها طول موج مورد نظر را به سمت نمونه هدایت می‌نماید.
محفظه نمونه (Sample Compartment)	جایی که کووت‌ها (Cuvettes) حاوی محلول نمونه و مرجع (بلانک) قرار می‌گیرند. در دستگاه‌های دو پرتوی (Double Beam)، دو جایگاه مجزا برای نمونه و مرجع وجود دارد. در دستگاه‌های تک پرتوی (Single Beam)، جایگاه نمونه و مرجع یکی است و به صورت متوالی اندازه‌گیری می‌شوند.
آشکارساز (Detector)	فوتون‌های عبوری از نمونه را به سیگنال الکتریکی تبدیل می‌کند. رایج‌ترین نوع، فوتودیود سیلیکونی (Silicon Photodiode) است.
نرم‌افزار (Software)	برای کنترل دستگاه، جمع‌آوری داده، پردازش طیف (مانند تعیین پیک‌ها، مشتق‌گیری، محاسبه سطح زیر منحنی) و ذخیره‌سازی نتایج استفاده می‌شود.

### ۳. کووت‌ها - (Cuvettes) نکات حیاتی

انتخاب و استفاده صحیح از کووت برای دقت اندازه‌گیری بسیار مهم است.

نوع کووت	جنس	محدوده طول موج	کاربرد
Quartz (کوارتز)	سیلیکا	۱۹۰ - ۱۱۰۰ nm UV و Vis	برای اندازه‌گیری در ناحیه UV ضروری است. بسیار گران‌قیمت. فقط سطوح مات (Frosted) آن را لمس کنید.
Glass (شیشه)	شیشه معمولی	۳۳۰ - ۱۱۰۰ nm فقط (Vis)	مناسب برای اندازه‌گیری در ناحیه مرئی. مقرون به صرفه.
Plastic (پلاستیک)	پلی مرهای نوری	۳۴۰ - ۱۱۰۰ nm فقط (Vis)	یکبار مصرف، ارزان. برای ناحیه UV مناسب نیست.

قوانین طلایی استفاده از کووت:

- جنس مناسب: همیشه از کووت کوارتز برای اندازه‌گیری در ناحیه UV استفاده کنید.
- جهت‌دهی صحیح: کووت‌ها دارای دو سطح شفاف (Clear) و دو سطح مات (Frosted) یا (Opaque) هستند. پرتو نور باید از سطوح شفاف عبور کند. اکثر کووت‌ها یک فلش یا علامت راهنما برای نشان دادن جهت صحیح دارند.
- تمیزی: قبل از استفاده، کووت را با محلول نمونه چندین بار شستشو دهید. (Rinse) از لمس سطوح شفاف خودداری کنید.

۴. حجم مناسب: کووت را تا حدود نصف تا دو-سوم حجم آن پر کنید (حدود ۲-۲,۵ میلی‌لیتر برای کووت‌های استاندارد).

۵. عدم استفاده از استون: (Acetone) هرگز از استون برای تمیز کردن کووت‌های کوارتز استفاده نکنید، زیرا جاذب قوی UV در ۲۶۸ نانومتر است و آلودگی ایجاد می‌کند.

## ۴. روش کار گام به گام (Step-by-Step Procedure)

این روش بر اساس دستگاه‌های شیمادزو (Shimadzu) که رایج‌ترین برند در دانشگاه‌ها هستند، تهیه شده است. برای سایر برندها، اصول کلی مشابه است.

### مرحله ۰: تجهیزات حفاظت فردی (PPE) و ایمنی

قبل از شروع کار، حتماً از دستکش نیتریل، روپوش آزمایشگاهی و عینک ایمنی استفاده کنید. تمام مواد شیمیایی را در هود مواد شیمیایی (Chemical Fume Hood) آماده کنید و قبل از استفاده دستگاه را از نظر سلامت ظاهری بررسی کنید.

### مرحله ۱: راه‌اندازی و گرم کردن (Startup & Warm-up)

- دستگاه را با استفاده از سوئیچ اصلی (معمولاً در سمت راست یا پایین دستگاه) روشن کنید.
- کامپیوتر متصل را روشن کرده و نرم‌افزار مربوطه مانند (UVProbe) را اجرا کنید.
- نرم‌افزار را به دستگاه متصل کنید (دکمه **Connect**).
- حداقل ۱۵ تا ۳۰ دقیقه به دستگاه فرصت دهید تا گرم شود. (Warm-up) این کار برای تثبیت منابع نور و الکترونیک ضروری است.

### مرحله ۲: تنظیم روش (Method Setup)

- در نرم‌افزار، پنجره تنظیمات روش (Method) یا (Edit Method) را باز کنید.
- تب: **Measurement**

  - Wavelength Range** (محدوده طول موج): محدوده مورد نظر را وارد کنید. توجه داشته باشید که نرم‌افزار معمولاً مقدار **Start** را به عنوان طول موج بالا و **End** را به عنوان طول موج پایین در نظر می‌گیرد. مثال: اگر می‌خواهید از ۸۰۰ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر اسکن کنید، **Start: 800**، **End: 200** وارد کنید.
  - Scan Speed** (سرعت اسکن): معمولاً روی **Medium** قرار دهید.

- تب: **Instrument Parameters**

  - Measuring Mode** (حالت اندازه‌گیری) **Absorbance (A)**: را برای جذب انتخاب کنید. گزینه دیگر **Transmittance (T)** یا %T است.
  - سایر پارامترها مانند **Slit Width** (پهنای شکاف) معمولاً روی مقادیر پیش‌فرض یا توصیه شده توسط مسئول دستگاه تنظیم می‌شوند.

### مرحله ۳: تهیه و استفاده از محلول مرجع بلانک (Blank) -

محلول مرجع (Reference) یا (Blank) محلولی است که همه اجزای نمونه به جز ماده مورد نظر (Analyte) را دارد (مانند حلال یا بافر).

۱. محلول مرجع را در یک کووت مناسب بریزید.
۲. در دستگاه‌های دو پرتوی (Double Beam):
  - کووت حاوی محلول مرجع را در جایگاه مرجع (Reference) که معمولاً عقبی است قرار دهید.
  - یک کووت دیگر (یا همان کووت خالی) را نیز در جایگاه نمونه (Sample) جلو قرار دهید.
۳. سپس دکمه **Auto Zero** را بزنید تا دستگاه میزان جذب مرجع را صفر کند.
۴. در دستگاه‌های تک پرتوی (Single Beam):
  - کووت مرجع را درون محفظه قرار دهید.
  - دکمه  $0\% / 100\%$  را بزنید تا دستگاه تنظیم شود.
  - سپس کووت مرجع را خارج کرده، کنار بگذارید و کووت حاوی نمونه را جایگزین کنید.

### مرحله ۴: تصحیح خط زمینه (Baseline Correction)

این مرحله برای حذف اثرات جذبی ناشی از حلال، کووت و خود دستگاه بر روی طیف نهایی انجام می‌شود.

۱. از صحیح بودن قرارگیری کووت‌های مرجع (در جایگاه عقب) و خالی (در جایگاه جلو) اطمینان حاصل کنید.
۲. در نرم‌افزار، دکمه **Baseline** را کلیک کنید.
۳. دستگاه فرآیند تصحیح را انجام می‌دهد. معمولاً یک خط صاف (Flat Line) در محدوده طول موج انتخاب شده مشاهده خواهید کرد.

### مرحله ۵: آماده‌سازی و اندازه‌گیری نمونه (Sample Measurement)

۱. محلول مرجع را از جایگاه نمونه خارج کنید (در دستگاه‌های دو پرتوی، جایگاه نمونه همان جایگاه جلویی است).
۲. کووت را با محلول نمونه مورد نظر شستشو دهید. (Rinse with sample)
۳. کووت را تا نصف از محلول نمونه پر کرده، بیرون آن را با دستمال کیموپ (Kimwipe) تمیز کنید.
۴. کووت حاوی نمونه را در جایگاه نمونه (Sample) در دستگاه قرار دهید.
۵. درب محفظه نمونه را ببندید.
۶. در نرم‌افزار، دکمه **Start** یا **Measure** را کلیک کنید.
۷. پس از اتمام اسکن، یک پنجره برای ذخیره فایل باز می‌شود. یک نام مناسب برای طیف خود انتخاب کنید و آن را ذخیره نمایید.

نکته فنی: اگر جذب نمونه خیلی زیاد بود ( $A > 2$ ) یا ( $A > 2.5$ )، محلول را رقیق کنید و دوباره اندازه بگیرید. جذب بالاتر از ۲ به معنی جذب ۹۹ درصد نور است و خطای اندازه‌گیری را افزایش می‌دهد.

## مرحله ۶: خاموش کردن دستگاه (Shutdown)

۱. پس از اتمام کار، در نرم‌افزار دکمه **Disconnect** را بزنید.
۲. نرم‌افزار را ببندید.
۳. کامپیوتر را خاموش کنید.
۴. کووت‌ها را خارج کرده و کاملاً بشویید.
۵. دستگاه اسپکتروفتومتر را با سوئیچ اصلی خاموش کنید.

## ۵. کالیبراسیون و نکات کنترلی (Calibration & Quality Control)

کار	توضیح	تعداد دفعات
تنظیم صفر (Auto Zero)	قرار دادن محلول مرجع در مسیر نور و صفر کردن دستگاه.	قبل از هر بار اندازه‌گیری نمونه و همچنین پس از هر بار تغییر طول موج.
تصحیح خط زمینه (Baseline Correction)	حذف اثر جذبی حلال و کووت از طیف نهایی.	حداقل یک بار در ابتدای هر نشست کاری.
کنترل طول موج (Wavelength Calibration)	اطمینان از صحت طول موج خوانده شده توسط دستگاه. معمولاً با استفاده از فیلترهای استاندارد (مانند دیدیمیم اکسید (Didymium) - انجام می‌شود.	سالانه یا پس از جابجایی/ضربه شدید به دستگاه.
بررسی با نمونه شاهد (Quality Control Sample)	اندازه‌گیری یک نمونه با غلظت مشخص و مقایسه با مقدار تئوری.	روزانه یا در هر سری اندازه‌گیری.

## ۶. عیب‌یابی مشکلات رایج (Troubleshooting)

مشکل	علت احتمالی	راه حل
جذب منفی (Negative Absorbance)	خط زمینه (Baseline) به درستی انجام نشده است. محلول مرجع غلظت بیشتری نسبت به نمونه دارد.	دوباره تصحیح خط زمینه را انجام دهید. از تازه بودن محلول مرجع اطمینان حاصل کنید.
نویز بالا (Noisy Spectrum)	دستگاه سرد است (کافی گرم نشده). شدت نور لامپ کم است. پهنای شکاف (Slit Width) خیلی باریک است.	اجازه دهید دستگاه بیشتر گرم شود. با مسئول آزمایشگاه برای تعویض لامپ مشورت کنید. پهنای شکاف را افزایش دهید.
پیک‌های کاذب یا ناهمواری در ابتدا/انتها (یعنی در ۱۹۰ و ۱۱۰۰ نانومتر)	تعویض خودکار منبع نور (از دوتریوم به تنگستن) در میانه طیف.	محدوده اسکن را کمی کوتاه کنید (مثلاً ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر) یا طول موج تعویض را تغییر دهید.
دستگاه وصل نمی‌شود	کابل USB مشکل دارد. درایور نصب نیست. دستگاه روشن نیست.	کابل را عوض کنید. نرم‌افزار و درایورها را دوباره نصب کنید.

## ۶. الزامات ثبت اطلاعات (Documentation)

برای رعایت استانداردهای (GLP) (Good Laboratory Practice)، پیشنهاد می‌شود برای هر دستگاه یک دفترچه راهنما یا فرم آنلاین شامل اطلاعات زیر تهیه شود:

مقدار نمونه	فیلد
۱۴:۳۰ - ۱۴:۰۵/۴/۱	تاریخ و زمان
	نام اپراتور
Shimadzu UV-1800	مدل دستگاه و کد دستگاه
۲۰۰-۸۰۰ nm	طول موج‌های مورد استفاده (Range)
Quartz, 10mm	نوع و جنس کووت
S-987	شناسه نمونه (Sample ID)
Distilled Water	نوع محلول مرجع
۴۵۰ nm	بیشینه جذب ( $\lambda_{max}$ )
_____	امضا و تاریخ

## ۷. چک‌لیست سریع برای کاربران

مرحله	اقدام	انجام شد؟
۱	روپوش، عینک و دستکش پوشیده شده؟	<input type="checkbox"/>
۲	دستگاه و کامپیوتر روشن شده و حداقل ۱۵ دقیقه گرم شده؟	<input type="checkbox"/>
۳	کووت کوارتز تمیز و عاری از گرد و غبار است؟	<input type="checkbox"/>
۴	محلول مرجع (بلانک) تهیه شده و کووت مربوطه آماده است؟	<input type="checkbox"/>
۵	روش (Method) شامل محدوده طول موج و حالت اندازه‌گیری (A) تنظیم شده؟	<input type="checkbox"/>
۶	خودکار (Auto Zero) و تصحیح خط زمینه (Baseline) انجام شده؟	<input type="checkbox"/>
۷	کووت نمونه به درستی شستشو (Rinse) شده و با نمونه پر شده؟	<input type="checkbox"/>
۸	درب محفظه نمونه بسته شده و اسکن (Start) گرفته شده؟	<input type="checkbox"/>
۹	داده‌ها با نام مناسب ذخیره شده‌اند؟	<input type="checkbox"/>
۱۰	دستگاه طبق روال خاموش شده و کووت‌ها تمیز شده‌اند؟	<input type="checkbox"/>