طیف سنجی فلورسانس (اسپکتروفلوریمتری)

طیف سنجی فلورسانس یکی از حساس‌ترین و گزینش‌پذیرترین روش‌های آنالیز نوری است که برای مطالعه ترکیبات فلورسانس‌کننده (fluorophores) به کار می‌رود. این تکنیک بر اساس اندازه‌گیری شدت فوتون‌های گسیل شده از یک نمونه پس از جذب فوتون‌های برانگیزنده عمل می‌کند.

---

۱ .اصول عملکرد(Working Principle)

فلورسانس زمانی رخ می‌دهد که یک مولکول فلورسانس‌کننده (fluorophore) با جذب یک فوتون به تراز الکترونی برانگیخته وارد می شود و سپس با گسیل فوتون به تراز پایه بازمی‌گردد .از آنجا که بخشی از انرژی جذب شده به صورت گرما تلف می شود، فوتون گسیل شده انرژی کمتری نسبت به فوتون جذب شده دارد. بنابراین، **طول موج گسیل فلورسانس همواره از طول موج جذب بیشتر است**)انتقال به سمت قرمز.(Stokes shift -

مراحل فرآیند فلورسانس:

مرحله	توضیح
جذب(Absorption)	مولکول فوتونی با انرژی مناسب جذب کرده و به تراز برانگیخته می‌رود
آرامش ارتعاشی(Vibrational Relaxation)	انرژی ارتعاشی اضافی بدون گسیل فوتون تلف می‌شود
گسیل(Emission)	مولکول به تراز پایه بازگشته و فوتون گسیل می‌کند

---

۲ .کاربردها(Applications)

طیف سنجی فلورسانس به دلیل حساسیت فوق‌العاده بالا (قابل تشخیص تا تک مولکول) و گزینش‌پذیری مناسب، در حوزه‌های مختلف علمی کاربرد گسترده دارد:

زمینه	کاربرد
بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی	مطالعه دینامیک پروتئین‌ها، برهمکنش-DNA پروتئین، اتصال لیگاند-گیرنده، آشکارسازی اپتودها
پزشکی و تشخیص	تشخیص بیماری‌ها، ایمونواسی، توالی‌یابیDNA ، آنالیز سلولی فلوسایتومتری
علوم محیط زیست	اندازه‌گیری آلاینده‌ها، مطالعه مواد هیومیک، آنالیز کیفیت آب
علوم مواد و نانوتکنولوژی	بررسی نقاط کوانتومی، نانوذرات نیمه‌رسانا، مطالعه پلیمرها
کشاورزی و صنایع غذایی	تعیین ویتامین‌ها، آنالیز روغن‌ها، بررسی آفت‌کش‌ها

موارد استفاده تحقیقاتی خاص:

- تعیین موقعیت تریپتوفان در پروتئین‌ها (طول موج بلندتر = محیط آبی، طول موج کوتاه‌تر = مدفون در پروتئین)
- مطالعه تحرک مولکول‌ها با استفاده از فلورسانس پلاریزاسیون(Fluorescence Polarization)

---

۳ .اجزای اصلی دستگاه(Instrumentation)

یک اسپکتروفلوریمتر (Spectrofluorometer) از اجزای اصلی زیر تشکیل شده است:

الف) منبع نور(Light Source)

نوع منبع	ویژگی‌ها
لامپ زنون پرفشار(Xenon Arc Lamp)	رایج‌ترین منبع در اسپکتروفلورومترها – شدت بالا در محدوده ۱۳۰۰-۳۰۰ نانومتر
لامپ جیوه کم فشار(Low Pressure Mercury Lamp)	خطوط گسیل گسسته – مناسب فلورومترهای ساده
LED	تک رنگ، طول عمر بالا، مناسب برای طول موج‌های خاص

ب) انتخابگر طول موج(Wavelength Selectors)

- **تک‌رنگ‌ساز – (Monochromator)** دارای توری پراش برای انتخاب طول موج دلخواه. در اسپکتروفلورومترها دو تک‌رنگ‌ساز وجود دارد: یکی برای طول موج برانگیختگی (Excitation) و دیگری برای طول موج گسیل(Emission)
- **فیلترهای تداخلی – (Interference Filters)** در فلورومترهای ساده برای جداسازی طول موج‌های خاص

ج) سل نمونه(Sample Cell)

- **جنس :**کوارتز (محدوده ۱۵۰۰-۲۰۰ نانومتر) برای اندازه‌گیری در ناحیهUV
- **نوع :**سل چهاروجه شفاف با مسیر نوری ۱×۱ سانتی‌متر
- **آرایش نوری :**آ شکار ساز معمولاً در زاویه ۹۰ درجه نسبت به منبع نور قرار دارد تا نور گسیل شده از نور برانگیخته جدا شود

- **د) آشکارساز(Detector)**

- **لامپ فتومالتی‌پلایر – (Photomultiplier Tube - PMT)** رایج‌ترین آشکارساز به دلیل حساسیت بالا
- **آرایه دیود و – CCD** در دستگاه‌های پیشرفته و پرتابل

ه) محدوده طول موج و مشخصات فنی (مطابق دستگاه(Fluorolog-3, IIT Bombay

- **محدوده طول موج :**۲۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر
- **توان لامپ :**۴۵۰ وات زنون
- **سرعت اسکن :**۱۵۰ نانومتر بر ثانیه
- **دقت طول موج :**۰,۵ نانومتر
- **آشکارسازهای موجود PMT :**برای ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر و InGaAs سرد شده با نیتروژن مایع برایNIR

---

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

این روش بر اساسSOP های استاندارد آزمایشگاهی و مستندات دستگاه‌های معتبر تدوین شده است.

♡مرحله ۰: ایمنی(Safety)

خطر	نکته ایمنی
لامپ زنون پرفشار	حاوی جیوه – در صورت شکستن، اتاق را تخلیه کرده و به مسئول اطلاع دهید. لامپ داغ – قبل از تعویض کاملاً خنک شود
حلال‌ها و مواد شیمیایی	نمونه‌های سمی یا قابل اشتعال باید در هود آماده شوند. از دستکش نیتریل و عینک ایمنی استفاده کنید
اشعه ماوراء بنفش(UV)	در هنگام کار با نور UV از محفظه بسته دستگاه استفاده کنید – به چشم آسیب می‌رساند

تجهیزات حفاظت فردی (PPE) اجباری:

- ✅دستکش نیتریل
- ✅روپوش آزمایشگاهی
- ✅عینک ایمنی

مرحله ۱: آماده‌سازی نمونه(Sample Preparation)

الزامات مهم نمونه:

برای جلوگیری از اثر فیلتر داخلی(Inner Filter Effect) ، جذب نمونه در طول موج برانگیختگی نباید از **۰,۱** تجاوز کند.

آماده‌سازی محلول فلورسئین استاندارد (برای کالیبراسیون):

۱. محلول مادر فلورسئین $۸,۲\times۱۰^{-۴}$ M را در اتانول اسپکتروسکوپی تهیه کنید
۲. محلول کاری $۴,۱\times۱۰^{-۶}$ M را با رقیق‌سازی تهیه کنید (۱ قسمت مادر + ۱۹۹ قسمت حلال)
۳. ۳ میلی‌لیتر از محلول را با پیپت برداشته و به سل کوارتز منتقل کنید

سل نمونه‌گیری:(Cuvette Handling)

- سل کوارتز باید چهار وجه شفاف داشته باشد (تمام اضلاع صیقلی)
- از تماس انگشت با اضلاع شفاف خودداری کنید – اثر انگشت فلورسانس می‌دهد و باعث خطا می‌شود
- قبل از استفاده، سل را با حلال یا آب دیونیزه شستشو دهید
- برای اطمینان از حذف آلودگی، سل را در اسید HCl ۱:۱ خیس کنید و با DI آبکشی کنید

⚙مرحله ۲: راه‌اندازی دستگاه(Instrument Startup)

بر اساس روش استاندارد:Virtual Labs

۱. **دستگاه را روشن کنید**
   - کلید پاور اسپکتروفلوریمتر را فشار دهید

- **حداقل ۳۰ دقیقه** برای گرم شدن و پایدار شدن لامپ و الکترونیک صبر کنید

۲. **نرم‌افزار را اجرا کنید** و به دستگاه متصل شوید

۳. **محفظه نمونه را باز کنید**)کلیک روی(lid

۴. **سل حاوی نمونه را در نگهدارنده قرار دهید**

- اطمینان حاصل کنید سل به درستی در جای خود قرار گرفته است
- جهت سل باید ثابت باشد (سل دارای جهت مشخصی است)

۵. **محفظه نمونه را ببندید**

مرحله ۳: تنظیم پارامترها و اجرای اسکن

انواع اسکن در اسپکتروفلوریمتری:

نوع اسکن	طول موج ثابت	طول موج متغیر	کاربرد
طیف گسیل Emission) Spectrum)	برانگیختگی (Excitation)	گسیل(Emission)	مطالعه ساختار و محیط فلوروفور
طیف برانگیختگی (Excitation Spectrum)	گسیل(Emission)	برانگیختگی (Excitation)	شناسایی طول موج بهینه برای برانگیختگی – مشابه طیف جذبی

تنظیمات شکاف (Slit Width) و سرعت اسکن:

نوع اندازه‌گیری	شکاف برانگیختگی	شکاف گسیل	سرعت اسکن	زمان پاسخ (Response)
طیف گسیل (کیفی)	باریک(Narrow)	پهن(Wide)	۶۰-۱۲۰ nm/min	NORM
طیف برانگیختگی	پهن(Wide)	باریک (Narrow)	۶۰-۱۲۰ nm/min	NORM
آنالیز کمی	پهن(Wide)	پهن(Wide)	nm/min۳۰-۶۰	SLOW
آنالیز نمونه‌های حساس به نور	باریک(Narrow)	پهن(Wide)	سریع	FAST

تنظیمات پیشنهادی برای شروع:

- پهنای شکاف: ۵ نانومتر برای هر دو تک‌رنگ‌ساز

- سرعت اسکن: ۶۰ نانومتر بر دقیقه
- زمان یکپارچه‌سازی :(Integration Time) ۱ ثانیه
- ولتاژ :PMT متوسط (۶۰۰-۴۰۰ ولت)

اقدامات اجرایی:

۱. **طیف برانگیختگی:(Excitation Scan)**

- طول موج گسیل را ثابت قرار دهید (برای فلورسئین: ۵۲۰ نانومتر)
- طول موج برانگیختگی را از ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر اسکن کنید
- طیف حاصل باید دو قله در حدود ۲۶۰ و ۴۹۰ نانومتر نشان دهد (شبیه طیف جذبی)

۲. **طیف گسیل:(Emission Scan)**

- طول موج برانگیختگی را روی مقدار بهینه (برای فلورسئین: ۴۹۰ نانومتر) تنظیم کنید
- طول موج گسیل را از ۵۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اسکن کنید
- قله گسیل در حدود ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر ظاهر می‌شود

مرحله ۴: کالیبراسیون و استانداردسازی(Calibration)

به دلیل تغییرات روزانه در شدت لامپ و حساسیت آشکارساز، کالیبراسیون روزانه ضروری است.

استاندارد رایج: کینین سولفات(Quinine Sulfate)

پارامتر	مقدار
غلظت استاندارد	~10^{-5} M در ۰٫۱ M H_2SO_4
طول موج برانگیختگی	۳۵۰ نانومتر
طول موج گسیل (قله)	۴۵۰ نانومتر
بازده کوانتومی(Quantum Yield)	۰٫۵۴

کالیبراسیون طول موج:

کالیبراسیون تک‌رنگ‌ساز برانگیختگی:

۱. طول موج گسیل را روی ۳۵۰ نانومتر تنظیم کنید
۲. طول موج برانگیختگی را از ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر اسکن کنید
۳. قله مرجع باید در ۴۶۷ نانومتر مشاهده شود (ناشی از پراکندگی از لامپ زنون)

کالیبراسیون تک‌رنگ‌ساز گسیل:

۱. طول موج برانگیختگی را روی ۳۵۰ نانومتر تنظیم کنید
۲. از آب مقطر به عنوان نمونه استفاده کنید
۳. طیف رامان آب را از ۳۶۵ تا ۴۵۰ نانومتر ثبت کنید
۴. قله باید در ۳۹۷ نانومتر متمرکز شود

● مرحله ۵: پایان کار و جمع‌آوری (Shutdown)

۱. نرم‌افزار را ببندید
۲. دستگاه را خاموش کنید
۳. سل نمونه را خارج کنید
۴. سل را بلافاصله با حلال مناسب بشویید:

- پس از استفاده با اتانول یا آب دیونیزه شستشو دهید
- در صورت نیاز، در اسید HCl ۱:۱ خیس کنید
- با آب دیونیزه کاملاً آبکشی کنید

۵. سل را در جای خشک و دور از گرد و غبار نگهداری کنید
۶. محفظه نمونه را بسته نگه دارید تا از ورود گرد و غبار جلوگیری شود
۷. **لاگ‌بوک را تکمیل کنید**)تاریخ، کاربر، نمونه، طول موج‌ها، نتایج(

---

۵ .عیب‌یابی مشکلات رایج (Troubleshooting)

مشکل	علت احتمالی	راه‌حل
شدت فلورسانس بسیار پایین است	غلظت نمونه خیلی کم، حلال نامناسب، تجزیه نوری نمونه	غلظت را افزایش دهید، حلال را عوض کنید، شدت نور را کاهش دهید
نویز پس‌زمینه بالا	شکاف خیلی باریک، نمونه کثیف، پراکندگی از ذرات	شکاف را افزایش دهید، نمونه را فیلتر کنید، از سل تمیز استفاده کنید
طیف اعوجاج دارد	اثر فیلتر داخلی – (IFE) جذب بیش از حد در طول موج برانگیختگی	نمونه را رقیق کنید تا جذب به کمتر از ۰٫۱ برسد
تغییرات روزانه در شدت	ناپایداری لامپ و آشکارساز	روزانه با استاندارد کینین سولفات کالیبره کنید
قله جابجا شده	کالیبراسیون طول موج نامناسب	کالیبراسیون طول موج را انجام دهید
نویز در طول موج کوتاه	جذب توسط اکسیژن	نمونه را با گاز نیتروژن دیگاز کنید
کاهش شدت در طول زمان (Photobleaching)	نمونه حساس به نور	از شکاف باریک استفاده کنید، نوردهی را کوتاه کنید
قله ثانویه در نصف طول موج (Second Order)	پراش توری	از فیلتر cut-off استفاده کنید

---

۶ .اثر فیلتر داخلی(Inner Filter Effect - IFE)

این اثر یکی از مهمترین منابع خطا در فلورسانس است و زمانی رخ می‌دهد که نمونه خود بخشی از نور برانگیختگی یا گسیل را جذب کند.

مقادیر مرجع برای جلوگیری از:IFE

نوعIFE	علت	محدوده قابل قبول
Primary IFE (pIFE)	جذب در طول موج برانگیختگی	**جذب <۰٫۱**)ترجیحاً <۰٫۰۵(
Secondary IFE (sIFE)	جذب مجدد نور گسیل شده	بستگی به همپوشانی طیف جذب و گسیل دارد

راه‌های کاهش:IFE

- رقیق‌سازی نمونه تا رسیدن به جذب <۰٫۱
- استفاده از روش‌های تصحیح محاسباتی) تصحیحLakowicz(

- استفاده از روش) AddAbs افزودن ماده جاذب(

---

۷ .نکات کلیدی برای موفقیت

قانون	توضیح
نمونه شفاف و عاری از ذرات	نمونه را فیلتر کنید یا سانتریفیوژ کنید تا از پراکندگی جلوگیری شود
سل کاملاً تمیز	اثر انگشت و آلودگی باعث فلورسانس پارازیتی می‌شود. سل را با حلال مناسب شستشو دهید
گرم کردن کامل دستگاه (≥۳۰ دقیقه)	شدت لامپ زنون برای تثبیت نیاز به زمان دارد
روزانه کالیبره کنید	با استاندارد کینین سولفات (λ_ex=350nm, λ_em=450nm) برای اطمینان از دقت روزانه
جذب نمونه را چک کنید	در طول موج برانگیختگی باید ۰,۱> باشد تا از IFE جلوگیری شود
نمونه را در یخ/تاریکی نگهداری کنید	نمونه‌های حساس به نور ممکن است Photobleach شوند
لاگ‌بوک را تکمیل کنید	ثبت پارامترها و نتایج برای تکرارپذیری
از حلال مناسب استفاده کنید	برخی حلال‌ها (مانند استون، کلروفرم) خود فلورسانس دارند
نمونه شاهد (Blank) همیشه همراه باشد	برای تصحیح فلورسانس پس‌زمینه حلال

---

۸ .چک‌لیست سریع برای کاربران

مرحله	اقدام	انجام شد؟
۱	دستگاه روشن و حداقل ۳۰ دقیقه گرم شده است؟	☐
۲	نمونه آماده و جذب در طول موج برانگیختگی ۰,۱> است؟	☐
۳	سل کوارتز تمیز و عاری از اثر انگشت است؟	☐
۴	سل با محلول نمونه شستشو داده شده (rinsed) است؟	☐
۵	سل در نگهدارنده قرار گرفته و محفظه بسته است؟	☐
۶	پارامترهای اسکن (طول موج‌ها، شکاف، سرعت) تنظیم شده است؟	☐
۷	کالیبراسیون روزانه با استاندارد کینین سولفات انجام شده است؟	☐
۸	نمونه شاهد (Blank) نیز اندازه‌گیری شده است؟	☐
۹	داده‌ها ذخیره و لاگ‌بوک تکمیل شده است؟	☐
۱۰	سل تمیز و دستگاه خاموش شده است؟	☐

✨جمع‌بندی نهایی

طیف سنجی فلور سانس یکی از ح ساس‌ترین و گزینش‌پذیرترین روش‌های آنالیز نوری ا ست .با رعایت ا صول زیر می‌توانید نتایج قابل اعتماد و تکراری به دست آورید:

۱. **آماده سازی صحیح نمونه** –نمونه باید شفاف، عاری از ذرات با شد و جذب آن در طول موج برانگیختگی < ۰,۱ باشد

۲. **سل کاملاً تمیز** –سل کوارتز چهار وجه شفاف، بدون اثر انگشت و آلودگی

۳. **کالیبراسیون روزانه** –با استاندارد کینین سولفات ,λ_ex=350nm, λ_em=450nm) بازده کوانتومی ۰,۵۴(

۴. **تنظیمات بهینه** –شکاف ۵ نانومتر برای شروع، سرعت اسکن ۶۰nm/min

۵. **ثبت اطلاعات** –تکمیل لاگ‌بوک و ذخیره داده‌ها برای تکرارپذیری

۶. **محافظت از نمونه** –نمونه‌های حساس به نور را در تاریکی و روی یخ نگهداری کنید