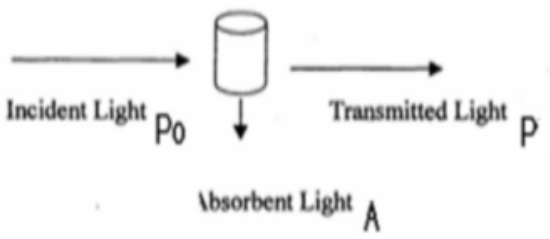
قانون لامبير-بير Lambert & beers:

من المعروف أنه عندما نجعل الضوء يجتاز محلولاً لعينة مادة دوائية لها صفات ضوئية فإنها ستمتص جزءاً من الضوء الوارد إليها (الضوء الساقط) محدثاً تنقلات إلكترونية فيها ويبقى جزء من الضوء دون أن يمتص وينفذ من المادة (الضوء النافذ) كما الشكل:



حيث:

- P_0 هو الضوء الساقط أو الوارد (الطاقة الساقطة) Incident Light I_0, P(radiation) or Incident Intensity I_0
- P هو الضوء النافذ أو الطاقة النافذة Transmitted Intensity I, Transmitted Light I(radiation)

فإذا ما أردنا أن نحسب قيمة الامتصاص Absorption (A) فمن المنطق أن يكون مساوياً لناتج طرح الشعاع النافذ من الشعاع الساقط حسب العلاقة:

$$A = P_0 - P$$

وحيث أن قياس هذه القيمة رياضياً كان من الصعوبة بمكان (لأن الأشعة الساقطة قد تنعكس على جدران المحفد) جعلت العلماء يتخذون من القيمة T أي النفاذ والتي اعتبرت أنها تساوي النسبة ما بين P و P_0 سهلة القياس أي:

$$T = \frac{P}{P0}$$

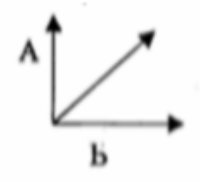
وأمكن بسهولة تحديد القيمة التي اعتبرت قيمة الامتصاص يأخذ اللوغاريتم السالب للنفاذ وفق العلاقة التالية:

$$A = -Log\ T = -Log\ \frac{\text{الضوء النافذ}}{\text{الضوء الساقط}} = -log\frac{P}{P0}$$

بعد أن أمكن قياس قيمة الامتصاص:

1. قام الباحث لامبيير بتثبيت تركيز محلول المادة **C** وجعل سماكة المحفد (العبوة التي توضع فيها العينة) في تزايد مستمر.

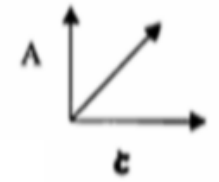
وبدأ بقياس الامتصاص **فوجد أن قيمة الامتصاص تتزايد بزيادة سماكة المحفد**، أي أن الامتصاص يتناسب طرداً مع زيادة عرض المحفد (الخلية)، أي:



$$A \ \alpha \ b$$

2. من ناحية ثانية درس الباحث بييير تأثير تغير التركيز على الامتصاص عندما نقوم بتثبيت سماكة المحفد، **فوجد أنه كلما زاد التركيز ازداد الامتصاص إلى حد معين**، أي أن العلاقة ما بينهما طردية:

$$A \ \alpha \ C$$



وأمكن فيما بعد جمع قانون لامبيير وبييير بعلاقة واحدة ☺ فحصلنا على العلاقة:

$$A \ \alpha \ C \ \alpha \ b$$

ولكي يتم تحويل العلاقة إلى مساواة يجب إدخال ثابت:

الامتصاص= ثابت × التركيز × عرض المحفد

حيث أن عرض المحفد **1** سم و هذا متفق عليه في دساتير الأدوية، و هناك بعض الدساتير التي تطلب قيم عرض للمحفد أكبر من هذه القيمة فيتم ذكر ذلك.
أما في حال لم يحدد عرض المحفد فهو **1** سم.

الثابت يمكن أن يكتب بأحد الأشكال الثلاث، ولا بد من الإشارة إلى تناسب هذا الثابت مع طريقة التعبير عن التركيز:

الامتصاصية المئوية A (1٪,1 cm):

وهي كمية الامتصاص التي نحصل عليها عند حل 1 غ من المادة الدوائية في 100 مل من المحل فيكون تركيزها 1g/100ml ويتم الامتصاص بمحفد عرضه 1 سم عند طول موجة معينة.
ويكتب قانون لامبيير بيير بالشكل التالي:

$$A = A(1\%, 1cm) \times c \times b$$

وهنا يكون التركيز معبراً عنه بالطريقة المئوية غ٪.
وتستخدم هذه الطريقة في تحليل الأدوية.

الامتصاص الجزيئي a:

وهو الامتصاص الذي نحصل عليه عند حل 1 غ من المادة في 1 ل من المحل وذلك بمحفد 1 سم وطول موجة محددة ويعطى القانون بالعلاقة:

$$A = a \times c \times b$$

حيث أن $a = \frac{A\ (1\%,1\ cm)}{10}$

ويعطى التركيز بالواحدة غ/ل.

الامتصاصية المولية ε:

وهي كمية الامتصاص التي نحصل عليها عند حل مول من المادة في 1 ل من المحلول بمحفد 1سم وبطول موجة محدد ويعطى القانون بالعلاقة:

$$A = \varepsilon\ C\ b$$

فيعطى التركيز هنا دوماً بالواحدة مول/ل:

يسمى الثابت ε :

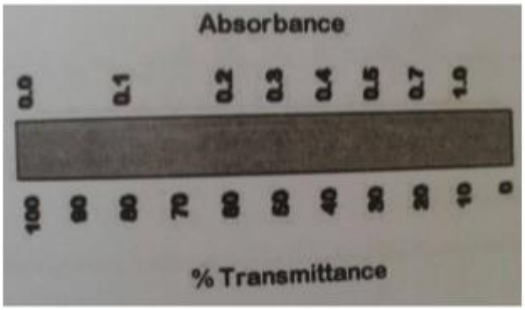
إما قيمة الامتصاص المولي molar absorptive وهي التسمية المتعارف عليه في دساتير الأدوية.

أو بعامل الانطفاء الجزيئي Molar Extinction coefficient K وهي التسمية المستخدمة في فرنسا.

ونحن في سوريا نعتمد الدستور الأمريكي غالباً أو الأوروبي ولذلك نسميها الامتصاصية المولية ☺

ودائماً عندما يكون النفاذ 100٪ يكون الامتصاص صفراً.

ويوضح الشكل العلاقة ما بين الامتصاص والنفاذ:



وجدير بالذكر أنه يستخدم ثلاثة مصطلحات عالمية برموز مختلفة للتعبير عن النفاذ وهي على الشكل التالي:

Transmittance T, Optical density D, Extinction E

وبالحقيقة نجد تسميات عديدة منها القديم ومنها الجديد للرموز في معادلة لامبيير بيير فمثلاً:

Lambert-Beer Law

$$- \log P/P_o = \varepsilon\, c\, b$$

- ✓ P = transmitted light الضوء النافذ (Radiation),Power=Transmitted Intensity، الكثافة الضوئية النافذة I

  P_o = Incident light الضوء الساقط أو الوارد (radiation), Power=Incident Intensity , I_o الكثافة الضوئية الواردة

- ✓ C = concentration in moles/l التركيز مقدراً بالمول/ل

- ✓ ε = molar absorptive= Molar extinction coefficient ,k الامتصاصية المولية, عامل الانطفاء الجزيئي.

- ✓ b (L، d) = Path length (thickness) length of cell through which light passes

أي عرض المحفد ويرمز له بأحد الأحرف السابقة وهو يعبر عن عرض الخلية التي يوضع ضمنها المحلول المراد قياس امتصاصيته.

وتكون المعادلات التالية جميعها صحيحة:

$$-\log \frac{P}{P_o} = abc$$

$$\log \frac{P_o}{P} = abc$$

$$-\log(T) = abc$$

$$-\log(T) = A$$

$$A = abc$$

$$A = \varepsilon bc$$

مثال (1): احسب امتصاص محلول نفاذه المئوي T٪ هو 89 عند الموجة 400 نم.

الجواب: النفاذ المئوي = النفاذ × 100

ومنه: النفاذ = 0.89

الامتصاص=_ لغ النفاذ = _ لغ 0.89 = 0.051 (ليس للامتصاص واحدة)

مثال(2): إذا كان نفاذ محلول 90٪ عند الموجة 310 نم، ما هو الامتصاص عند طول الموجة نفسها.

الجواب: النفاذ= 0.90

ومنه: الامتصاص= _ لغ0.9 =0.05

التحليل الكمي:

أثناء إجراء التحاليل الكمية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية والمرئية لا بد من تثبيت كافة الشروط التالية سواء للعينة أو للمحلول العياري:

1. عدم التبديل بالمحلات.
2. ثبات الحرارة (فالعياري والعينات المراد فحصها تُحفظ بالدرجة نفسها).
3. ثبات الـ PH (وإلا تتغير المادة من الشكل المبرتن إلى الشكل غير المبرتن أو بالعكس فتتغير قيمة λ_{max}
4. ثبات زمن التفاعل (فنتذكر أننا كنا دوماً نقيس جميع العينات أو السلسلة التي يتم تحليلها بالوقت نفسه وذلك بعد إضافة الكاشف، وأحياناً يمكن أن تتأثر نتائج بعض الاختبارات بتغير الزمن ولو لبضع ثواني O.o) وبعض الأجهزة تتطلب أن يتم تصفيرها على الشاهد في كل مرة نبدل فيها العينة وبعضها يصفر لمرة واحدة فقط.
5. تثبيت العوامل الأخرى الضرورية لتحضير العينة والتي يمكن أن تغير تركيب المعقد ومكان امتصاصه وكيفيته.
6. كافة الشروط الجهازية يجب أيضاً أن تكون واحدة سواء بالنسبة للعياري وكذلك للعينة المجهولة التركيز، مثل عرض المحفد ونوعه، طول الموجة، عرض الشق الضوئي، .....

أولاً: التحليل الكمي بوجود مادة عيارية:

مثل هذه التحاليل تكون بأن ننسب المعطيات الخاصة بعينة ما إلى المعطيات الخاصة بالعياري المعلوم التركيز لنفس المادة، وهي الطريقة المتبعة في التحاليل الحيوية:

$$A\ (\text{مجهول}) = \varepsilon\ b\ C\ (\text{مجهول})$$

$$A\ (\text{معلوم}) = \varepsilon\ b\ C\ (\text{معلوم})$$

وبما أن المادة نفسها فالثابت ε نفسه فإذا نسبنا هاتين العلاقتين لبعضهما سنحصل على العلاقة:

$$\frac{A(\text{مجهول})}{A(\text{معلوم})} = \frac{\varepsilon\ b\ C(\text{مجهول})}{\varepsilon\ b\ C(\text{معلوم})}$$

وبعد الاختصارات نجد :

$$\frac{A(\text{مجهول})}{A(\text{معلوم})} = \frac{C(\text{مجهول})}{C(\text{معلوم})}$$

أي أن تركيز المحلول المجهول = $\frac{\text{امتصاص المجهول}}{\text{امتصاص المعلوم}}$ × تركيز المعلوم (العياري)

والواقع هذا القانون يمكن استخدامه فقط بحالة توفر مادة عيارية نقية من المادة المراد معايرتها وهذا سهل جداً بحال معايرة العوالم الحيوية بالجسم كالغلوكوز، الكولسترول، الشحوم الثلاثية ....

حيث أن المواد العيارية هذه متوفرة ورخيصة الثمن.

ومثال على ذلك معايرة الغلوكوز[1]:

للغلكوز عدة طرق لمعايرته والطريقة الأكثر استخداماً هي الطريقة الأمريكية.

وكما نعلم فإن قيمة تركيز الغلكوز الطبيعية في الدم 60-110 ملغ/دسل.

وعندما يزيد سكر الدم على 180 ملغ/دسل تعجز الكلية عن إعادة امتصاصه إلى الدم فيطرح عن الطريق البول ونكون أمام حالة مرض السكري .

للقيام بالتحليل نسحب عينة دم من المريض ونضعها في أنبوب جاف (وهنا لا نحتاج لمضاد تخثر) ونقوم بتثفيله للحصول على المصل (السائل الطافي) serum.

تتم التجربة كما يلي: تؤخذ 3 أنابيب

- الأنبوب الأول وهو الشاهد Blank: نضع فيه 10 مكل مصل فيزولوجي أو ماء مقطر و 1 مل كاشف.
- الأنبوب الثاني وهو العياري Standard: نضع فيه 10 مكل من المصل العياري و 1 مل كاشف.
- الأنبوب الثالث وهو أنبوب العينة Sample: نضع فيه 10 مكل من مصل المريض و 1 مل كاشف

وبما أن الغلكوز لا يمتص الأشعة الضوئية فنقوم بعمل اشتقاق كيميائي Chemical Derivation:

فنضيف له كاشف هو خميرة البيروكسيدات التي تحرر H_2O_2 فتعمل على أكسدة الغلكوز إلى الحمض الغلكوروني ويتم وضع الأنابيب في حمام مائي بدرجة 37° م لمدة 5 دقائق فيعطي الأنبوب الثاني والثالث لوناً أحمراً بينما يبقى أنبوب الشاهد بلا لون.

نضبط الجهاز على الشاهد فيجب أن تنفذ الأشعة بالكامل 100٪ وهذا الأمر نادر حدوثه لذلك نلغي الامتصاص الضئيل للشاهد عن طريق تصفير الجهاز على قيمة الشاهد ليصبح النفاذ 100٪ والامتصاص 0 وبالتالي فإن الامتصاص الذي سيبديه المحلول العياري أو العينة سيكون تابعاً للمادة المُعايرة (الغلكوز) فقط.

ونحسب تركيز العينة من العلاقة:

$$\text{تركيز العينة} = \frac{\text{امتصاص العينة}}{\text{امتصاص العياري}} \times \text{تركيز العياري}$$

ونتذكر دوماً أن المحفد المستخدم عند القياس بالأشعة فوق البنفسجية مصنوع من الكوارتز حصراً لأن البلاستيك يمتص مقدار من الـ UV.

فمثلاً:

أثناء معايرة غلوكوز المصل لأحد المرضى، تبين أن قيمة امتصاص عينة المريض تساوي 0.85 عند الموجة 500 نم، وامتصاص عينة العياري التي خضعت لنفس المعاملة 0.36.

فإذا علمت أن تركيز المحلول العياري 100ملغ/دل فما هو تركيز الغلوكوز؟

الجواب:

$$\text{التركيز} = \frac{0.85}{0.36} \times 100 = 236 \text{ ملغ/دل}$$

والجواب يدل على إصابة المريض بالسكري ☹

ثانياً: التحليل الكمي بغياب المادة العيارية:

عندما نقوم بإجراء المعايرات للمواد الدوائية سواء أكانت مواد أولية أو بأشكالها الصيدلانية، ففي كثير من الأحيان يصعب توفر مواد عيارية لها إما بسبب عدم توفرها أو بسبب ثمنها الغالي جداً.

وهنا نجد أن دساتير الأدوية العالمية وخاصة الدستور البريطاني والأمريكي (الدساتير المعتمدة في وزارة الصحة السورية) تعطينا قيمة الثابتة (A (1٪,1cm للمادة العيارية حيث يتم استخدامها في قانون لامبير بيير للوصول إلى تحديد تركيز المادة المطلوبة.

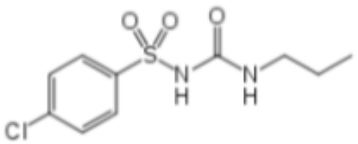
والقدرة على معايرة المادة الدوائية بغياب العياري صفة تميز طرائق التحليل الطيفي.

نحتاج في حالة واحدة إلى شراء العياري، عندما لا تكون المادة دستورية وبالتالي قيمة A غير موجودة بالدساتير فهنا نضطر لشراء عياري لهذه المادة ☹

لأخذ العلم:

عياري الباراسيتامول يحوي أقل من 500 ملغ وغالباً ما يأتي بمقدار 300 أو 400 ملغ ويكون نقي مئة بالمئة، يبلغ سعره 600 دولار

مثال: معايرة الكلوربروباميد Chlorpropamide في شكلها الصيدلاني مضغوطات (100ملغ) باستخدام طيف الأشعة فوق البنفسجية.



يلاحظ من الصيغة الكيميائية للكلوربروباميد أعلاه وجود عدد من حاملات اللون الذي تجعله يمتص الضوء بسهولة.

ولهذا نجد أن الدستور البريطاني2007 اعتمد طريقة تحليلية لمعايرته تعتمد على الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية كما يلي:

1. قم بوزن وسحق 20 مضغوطة، ثم خض كمية من البودرة تكافئ 0.25 غ من الكلوربروباميد مع 40 مل ميتانول لمدة 20 دقيقة، أضف كمية كافية من الميثانول لإتمام الحجم ل 50 مل، ثم امزج ورشح.
2. مدد 5 مل من الرشاحة لـ 100 مل بحمض كلور الماء 0.1 مول.
3. مدد 10 مل من هذا المحلول لـ 250 مل بحمض كلور الماء 0.1 مول.
4. ثم قم بقياس امتصاص المحلول الناتج عند الموجة 232 نم ثم احسب كمية الكلوربروباميد مستخدماً العينة 598 لقيمة الثابتة (1٪,1cm) A عند الموجة 232 نم.

هنا نلاحظ عدم توفر عياري، لذلك أعطانا الدستور قيمة الثابتة (1٪,1cm)A للاستفادة منها في عملية الحساب.

فبفرض أن قيمة الامتصاص كان 0.61 وأن الوزن الوسطي للمضغوطة=300 ملغ فالمطلوب:

- ما هو وزن العينة المأخوذة التي تكافئ 0.25 غ من الكلوربروباميد ؟
- احسب كمية الكلوربروباميد (المحتوى الفعلي) مستخدماً الامتصاص 598 لقيمة الثابتة A(1٪, 1cm) عند الموجة 232 نم.

الحل:

طريقة أخذ كمية العينة تعتمد على الوزن الوسطي للمضغوطة وعلى محتواها النظري من المادة الدوائية فيكون:

كل 300 ملغ بودرة تحتوي 100 ملغ كلوربروباميد

كل X ملغ بوردة تحتوي 250 ملغ كلوربروباميد ومنه X =750 mg

أي يجب أخذ 750 ملغ من مسحوق المضغوطات وهو حاوي على 250 ملغ من الكلوربروباميد.

تعتمد طريقة حساب النسبة المئوية للمحتوى الفعلي على ثلاث مراحل وهي:

a) حساب التركيز النظري.

b) حساب التركيز العملي.

c) حساب النسبة المئوية.

التمديد الأول	التمديد الثاني	التمديد الثالث	
أخذنا ما يعادل 250 ملغ من الكلوربروباميد	الحجم المأخوذ من الرشاحة 5 مل	الحجم المأخوذ من المحلول الذي حُضر هي 10 مل	**الامتصاص A= 0.61**
التمديد حتى 50 مل	التمديد حتى 100 مل	التمديد حتى الحجم 250 مل	

a) حساب التركيز النظري Theoretical Concentration :

$$T.C = \frac{250}{50} \times \frac{5}{100} \times \frac{10}{250} \times \frac{100}{1000} = 0.001 \frac{g}{100ml} (g\%)$$

b) حساب التركيز العملي Practical Concentration :

ونقوم بحسابه لنتأكد فيما إذا كان المحلول الذي تركيز المادة الفعالة نظرياً فيه 0.001 g٪ سيعطي عند القياس المقدار نفسه أم لا؟

حسب قانون لامبيير بيير:

$$P.C = \frac{A}{A\ (1\%\ ,\ 1cm)} \times \text{تركيز العياري}$$

$$P.C = \frac{0.61}{598} \times 1 = 0.00102\ g\%$$

c) حساب النسبة المئوية:

النسبة المئوية للمحتوى ٪102= $\frac{0.00102}{0.001}$ = $\frac{PC}{TC}$

فعملياً كل مضغوطة تحوي 102 ملغ من المادة الفعالة وليس 100 ملغ.

ولو كانت المضغوطة الواحدة تحوي نظرياً 300 ملغ من الكلوربروباميد فإن:

كل 100 ملغ تحوي فعلياً 102 ملغ

كل 300 ملغ تحوي فعلياً X ملغ

ومنه X= 306 mg وهو المطلوب ☺

ومن من الشائع الصناعية الصيدلانية أن نزيد كمية المادة الفعالة لكي نضمن الثبات الكيميائي للمركب وحصول المريض على الجرعة كاملة.

وهذا يتم لبعض المواد الدوائية وبنسب مختلفة، وهناك **Chapter** خاص بالدستور للمعايير المقبولة.

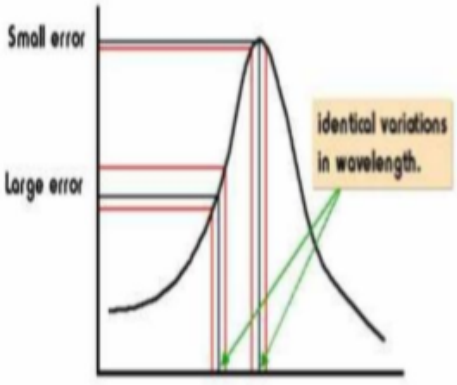
- فالفيتامينات مثلاً يسمح أن يكون محتواها 165٪ بدلاً من 100 ٪
- أما الهرمونات مثلاً والديجوكسين فهذا الأمر غير مقبول بتاتاً، حيث تكون الأدوية الهرمونية حاوية على المادة الفعالة بتركيز يتراوح بين النانوغرام و الميكروغرام وسعرها غالي الثمن جداً وبالتالي لا يمكننا هدر ولو اي مقدار ضئيل جداً من المادة الفعالة.

ولكن لم قمنا بكل هذا التمديد عند معايرة الكلوربروباميد؟

نحن دوماً نقوم بعملية تثبيت القياس على طول موجة الامتصاص الأعظمي λ_{max} بدقة لأن الامتصاص عند هذه الموجة يكون أعظمياً

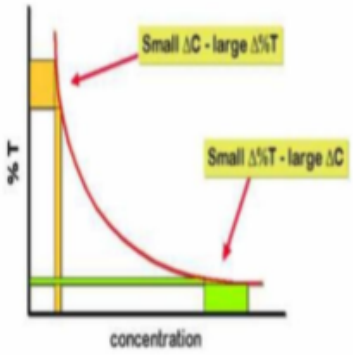
- ونحصل على أفضل حساسية للطريقة
- وكذلك على أقل حدود كشف ممكنة
- وكذلك لتخفيف الأخطاء في المعايرة إلى حدها الأقصى.

وكلما ابتعدنا عن λ_{max} ازداد الخطأ المرتكب كما يوضح الشكل:



لذلك عندما نريد تطوير طريقة تحليلية فنختار التراكيز التي يكون نفاذها ضمن المجال ٪80-٪20 حيث تكون العلاقة خطية وبعد هذا المجال لا يعود التركيز يتناسب طرداً مع الامتصاص، مما يتسبب لنا بأخطاء عديدة وتنعكس على الخط البياني.

ونستنتج من الشكل:



← عند Low C: فالتغير الصغير في التراكيز يسبب تغيرات كبيرة في ٪T.

← أما عند High C: فالتغيرات في ٪T صغيرة جداً.

فيفضل دوماً البقاء ضمن المجال ٪80-20 للتقليل من أخطاء القياس ☺

مثلاً: خطية تحليل الغلكوز الضوئي Linearity تقع بين المجال 40-400 mg

- ففي التراكيز الأقل من 40 يكون الامتصاص مساوياً لقيمة الامتصاص عند القيمة 40
- و بالنسبة للتراكيز الأعلى من 400 يكون امتصاصها مساوياً لقيمة الامتصاص عند 400

فعندما نقوم بإجراء تحليل للغلكوز من عينة دم لمريض ونتج لدينا قيمة امتصاص تعادل التركيز 40 وحتى نعرف إذا كان التركيز هو حقاً 40 أم أقل نلجأ إلى إضافة كمية معلومة التركيز من

الغلكوز العياري إلى عينة المريض، ولفرضاً أضفنا 100 ملغ/دسل للعينة، فإذا نتج لدينا امتصاص يقابل التركيز 135 نستنتج أن عينة المريض تركيزها 35 ملغ/دسل.

أما لو نتج لدينا قيمة امتصاص تعادل التركيز 400 وحتى نعرف إذا كان التركيز هو حقاً 400 أم أعلى نلجأ إلى تمديد العينة بالمصل الفيزيولوجي بمقدار معلوم ومحدد ونقيس الامتصاص مجدداً لنتأكد من قيمة تركيز الغلكوز في عينة المريض.

ففي الكلوربروباميد نحاول الوصول لأصغر تركيز ممكن لكي يبقى التركيز متناسباً بشكل طردي مع الامتصاص وهذا هو سبب التمديد.

معايرة أكثر من مادة بآن واحد :

يعاب على طريقة التحليل بالطيف الآلي وفوق البنفسجي القدرة على معايرة أكثر من مادة معاً بعكس طرق الكروماتوغرافيا كالـHPLC وغيرها.

ومع ذلك يمتد قانون لامبيير بيير ليغدو صالحاً لمعايرة أكثر من مادة دوائية بآن واحد شرط أن يكون لكل مادة موجة امتصاص أعظمي مستقلة عن الأخرى بحيث ألا يتداخلا مع بعضهما فإذا أردنا معايرة المادة x والمادة Y معاً فإن:

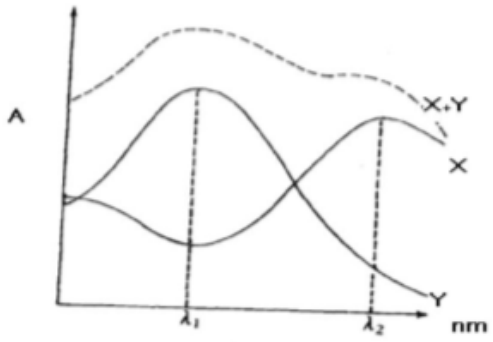
الامتصاص الكلي = امتصاص X (عند طول موجة امتصاصها الأعظمي) + امتصاص Y (عند طول موجة امتصاصها الأعظمي)

$$A_{Total} = \varepsilon_x \times C_x \times b + \varepsilon_y \times C_y \times b = (\varepsilon_x \times C_x + \varepsilon_y \times C_y)b$$

ومن خلال تطبيق هذه العلاقة عند طول موجة الامتصاص الأولى ثم الثانية وقياس الامتصاص الكلي بالطريقة نفسها نحصل على معادلتين بمجهولين، وبحلها نحصل على التركيز لكل من المادتين.

إذا الشرط الرئيسي لمعايرة المادتين معاً أن يكون λ_{max} للمادة الأولى بعيدة عن λ_{max} للمادة الأخرى.

ويتم تحديد λ_{max} لكل منهما بإجراء Scan لعياري من كل منها.



محدودية قانون لامبير بيير:

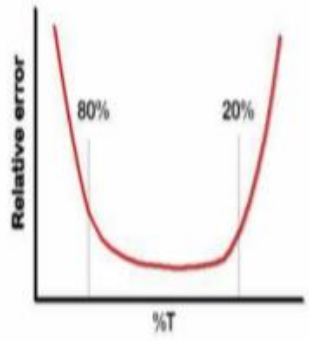
هناك بعض الأمور تؤدي لتحديد استخدام قانون لامبير بيير ضمن شروط محددة حيث أن تجاوز هذه الشروط سوف يؤدي إلى الحيود عن الخطية ← وبالتالي تصبح العلاقة ما بين التركيز والامتصاص علاقة غير طردية ← وبالتالي تطبيق علاقة لامبيير ستؤدي للحصول على نتائج غير دقيقة.

فلا بد لنا قبل اعتماد أي طريقة تحليلية لمعايرة أي مادة دوائية كانت أو غير دوائية بالاعتماد على تقنية الطيف فوق البنفسجي والمرئي من أن تخضع هذه الطريقة لما يسمى **التحقق من الصلاحية** Validation ولعل أهم خطوة في هذا هو **التحقق من الخطية**، بمعنى أنه لا بد من إنشاء رسم يوضح العلاقة الخطية ما بين الامتصاص والتركيز ضمن مجال القياس الذي نعمل به.

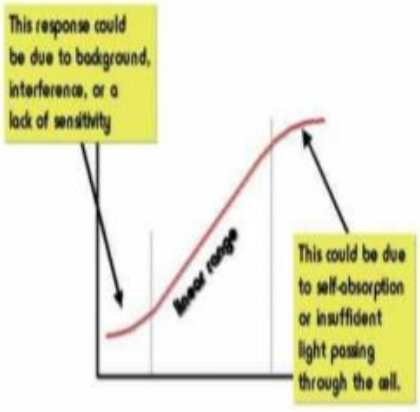
ولعل أولى الأسباب التي تؤدي إلى محدودية قانون لامبير بيير هو:

1. ارتفاع التركيز للمادة بالمحلول، ولهذا لكي يتحقق قانون لامبير بيير بشكل صحيح يجب ألا يزيد تركيز المحلول عن 0.01 مول لتفادي تأثير الظواهر الضوئية الأخرى.
2. يفضل دائماً أن تكون القياسات ضمن مجال النفاذ 80-20٪ للتقليل قدر الإمكان من الأخطاء، فعندما يكون التركيز عالياً فأي تغير بالنفاذ يكون صغيراً، وعندما يكون التركيز منخفضاً جداً نلاحظ أن أي تغير بالتركيز يؤدي إلى تغير كبير في النفاذ.

والشكل التالي يوضح ما ذكرناه:



3. ومن ثم فإن الطريقة التحليلية يجب أن يكون مجالها ضمن الخطية الظاهرة أعلاه وبحال تجاوز هذه الخطية لابد من تمديد العينة للرجوع لمجال الخطية، والأمر مسحوب أيضاً بحالة التركيز المنخفض إذ لا بد من اللجوء لطريقة إعادة القياس لضمان الخطية مثل زيادة التركيز ثم طرحه من النتيجة.



ففي المحلول عالي التركيز تتدخل الإشعاعات التالية:

1- الضوء الساقط I_0 Incident Light

2- الضوء المنكسر I_n Refracted Light

3- الضوء المنعكس I_r Reflected Light

4- الضوء المبعثر I_s Scattered Light

5- الضوء النافذ I_t Transmitted Light

6- الضوء الممتص I_a Absorbed Light

وعموماً فإن المحلول مؤلف من المادة المنحلة مع المذيب.

فعندما يكون المذيب لوحده (الشاهد Blank) فإننا نتعامل فقط مع الضوء المنكسر I_n والمنعكس I_r ويلغى دورهما أثناء ضبط صفر الامتصاص.

وفي المحلول الممدد أقل من 0.01 مول نتعامل مع الإشعاعات الثلاثة (الساقط I_0، النافذ I_t و الممتص I_a) ولا يتدخل المبعثر على عكس المحلول عالي التركيز.

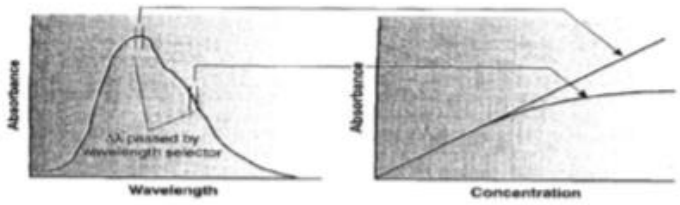
الحيود الكيميائي Chemical Limitation:

وهذا يحدث عندما تتغير درجة الـPH التي تؤدي إلى جعل المادة المراد تحليلها بحالة توازن Equilibirium reaction مما يؤدي للانزياح في طول موجة الامتصاص الأعظمي.

الحيود الآلي Instrumental deviation :

حيث أنه من المطلوب أن يوفر لنا الجهاز:

1. إمكانية استخدام حزمة ضوئية ذات طول موجة محدد عن طريق مستفرد اللون Monochromatic radiation وفي حال كان الجهاز ذو صناعة سيئة ولا يحقق هذا الأمر وإنما يعطينا عدة حزم Polychromatic radiation فإننا سنحصل على حيود سلبي.
2. كما أن الجهاز الجيد هو الجهاز الذي لا يحصل فيه ما يسمى بـ Stray radiation وهي تلك الأشعة التي تصل للمتحري دون المرور بالمسار المخصص للأشعة التي تمر عبر العينة حيث أن هذه الأشعة أيضاً تعطي انحرافاً سلبياً عن الخطية.



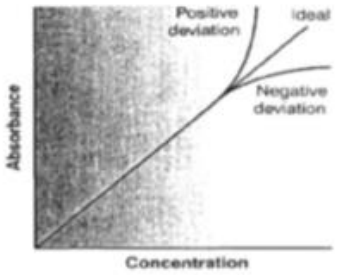
وبهذه نعرف الـ Stray Radiation

الأشعة التي تصل للمتحري دون المرور بالمسار المخصص للأشعة التي تمر عبر العينة وبالتالي ستصل كمية من الضوء إلى المتحري لم تمر بالعينة مما يؤدي للحصول على قيمة امتصاص خاطئة للعينة، وسبب ظهورها مشكلة في قطع الجهاز نفسه كالموشور مثلاً.

← وحتى يكون الجهاز جيداً يجب ألا تظهر هذه الأشعة، وأن تكون كل الأشعة الصادرة من المنبع مارة بالعينة لتصل بعدها للمتحري.

Stray Radiation → Less absobance → Negative deviation

لذلك فإن جهاز السبيكتروفوتومتر من الأجهزة التي لا يمكن التهاون عند شرائها والشكل التالي يوضح الحيود الإيجابي والسلبي عن قانون لامبيير بيير:



الأجهزة المستخدمة:

عموماً نستطيع القول إن كافة الأجهزة الطيفية تتألف من نفس الأجزاء (الأقسام) نفسها وهي:

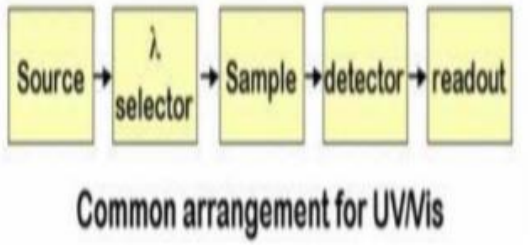
1- المنبع الضوئي Source

2- محدد (ناخب) طول الموجة Selector λ

3- خلية العينة Sample أو المحفد.

4- المتحري Detector

5- القارىء Readout



Common arrangement for UV/Vis

ولكن قد يختلف تركيبها حسب طبيعة العينة المستخدمة بالنسبة للترتيب في أجهزة الأشعة فوق البنفسجية والمرئية يكون كما يلي:

المصدر (المنبع) الضوئي ← محدد (ناخب) طول الموجة ← خلية وضع العينة ← المتحري ←القارىء

ولدينا نوعان من الأجهزة الطيفية:

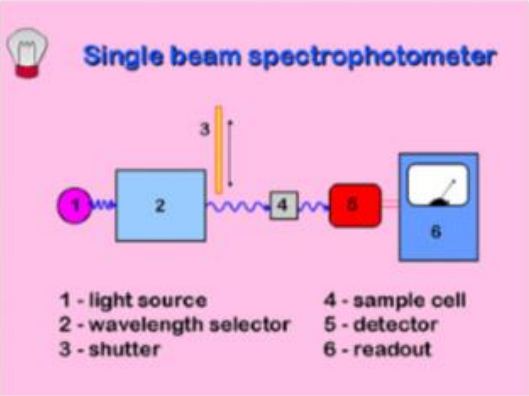
أولاً: جهاز التحليل الطيفي أحادي الحزمة الضوئية Single beam Spectrophotometer:

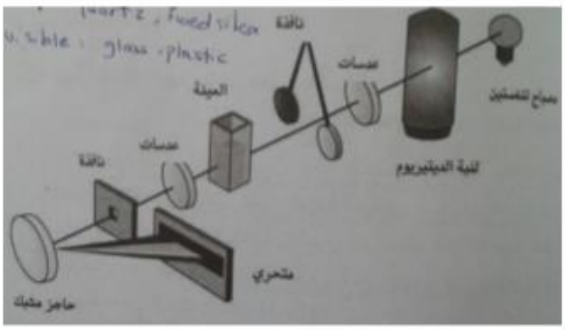
في هذا النوع من الأجهزة تسير الأشعة من المنبع الضوئي إلى المتحري مباشرة وفي مسار واحد.

× وهنا لا بد من وضع العينة العمياء (الشاهد) في كل مرة لجعل امتصاصها صفراً ونفاذها 100٪ ومن ثم تزال العينة العمياء وتوضع عينة المادة المراد تحديد تركيزها، بحيث أننا لا نستطيع أن نقيس العينة بآن واحد مع وجود الشاهد.

وهذا الجهاز مفضل لإجراء التحاليل الفردية.

والأشكال التالية توضح الرسم التخطيطي لهذا الجهاز :

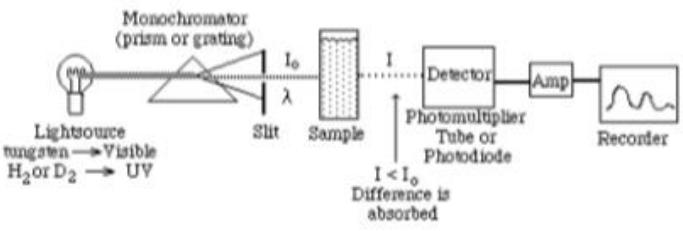


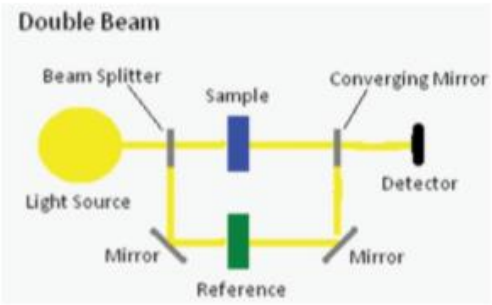


وكما سلف فإن المعايرة الكمية تعتمد على قياس الأشعة قبل وبعد مرورها عبر محفد العينة لذلك فإن احتمال الخطأ يكون كبيراً في حال عدم ثبات شدة الحزمة الضوئية ولهذا نجد أن هذا النوع من الأجهزة قد انحسر استخدامه بشكل كبير وتم استبداله بالجهاز ثنائي الحزمة.

ثانياً: جهاز التحليل الطيفي ثنائي الحزمة الضوئية Double beam Spectrophotometer:

هذا الجهاز استخدم نظاماً تم من خلاله التغلب على مشكلة شدة الحزمة الضوئية وذلك من خلال شطر الحزمة لحزمتي متساويتين الأولى تمر خلال العينة العمياء (الشاهد) والأخرى تمر خلال العينة حيث تلتقي الحزمتان بعد عبورهما للخلايا أعلاه ويفاضل بينهما لكي يستبعد ما تم امتصاصه من الشاهد وتتمتع هذه الأجهزة ثنائية الحزمة الضوئية بدقة عالية، ويوضح الشكل الرسم التخطيطي لهذا الجهاز:





وكون انشطار الأشعة إلى قسمين متساويين غير محقق عملياً فوجد جهاز آخر يعتمد على تقسيم الأشعة زمنياً وليس عينياً، وبعض العلماء اعتبروا أن هذا الجهاز أكثر دقة من سابقته حيث عندما نمرر الأشعة نفسها على الشاهد والعينة بالتناوب سيكون توزيع الأشعة حتماً متساوي.

فيتم تمرير الأشعة على الشاهد لمدة زمنية معينة ثم نقوم بتمريرها على العينة لنفس المدة.

× وفي هذه الحالة نُبقي الشاهد في الجهاز ونبدل العينات فقط.

While a double beam in time instrument can reduce much of our noise and make it possible to obtain entire spectra, there are still problems.

The major one is that you can't look at anything that changes at a rate near of faster that the chopper rate.

With a typical instrument- no kinetic studies are possible.

المصدر (المنبع) الضوئي Light Source:

تتألف منابع الطاقة الإشعاعية من مواد تتهيج بفعل التفريغ الكهربائي ذي فرق الكمون العالي أو بالتسخين الكهربائي إلى حالات طاقة عالية، عندما تعود إلى حالتها المستقرة فإنها تبعث فوتونات ذات طاقات مميزة تساوي ΔE ، وبعض المواد لها مستويات طاقة متعددة وتكون متقاربة بعضها مع بعض بحيث أن الأطوال الموجية للإشعاع الصادر تأخذ هيئة إشعاع مستمر يمتد فوق منطقة واسعة.

ومن صفات المصدر الإشعاعي المثالي أنه يبعث طيفاً:

❶ مستمراً ❷ذا شدة عالية ❸ومنتظماً

وذلك كي تغطي مدى أطوال الأمواج المطلوبة وتزيد.

منابع الأشعة فوق البنفسجية Sources of Ultraviolet radiation

يعد مصباح الهيدروجين ومصباح الديتيريوم من أهم المصادر الإشعاعية المستخدمة في المجال فوق البنفسجي القريبة.

ويتألف كل منهما من زوج من الأقطاب الموجودة في أنبوب زجاجي محكم الإغلاق ومجهز بنافذة من الكوارتز ومملوء بغاز الهيدروجين أو الديتيريوم (حسب نوعه) تحت ضغط منخفض.

فعندما نطبق فرق كمون عالي وثابت على القطبين، يحدث تفريغ الكتروني يؤدي إلى إثارة الكترونات أخرى في جزئيات الغاز إلى حالة طاقوية عليا، وعند عودة الالكترونات لحالتها العادية يبعث إشعاعاً مستمراً من 200-380 نم.

منابع الأشعة المرئية Sources of Visible Radiation:

يعد مصباح سلك التنغستين Tungeston من أكثر المصادر استخداماً في المجال المرئي وكذلك للأشعة تحت الحمراء القريبة ويعد هذا المصدر رخيص الثمن يفي بالغرض، ويعتمد على تسخين سلك التنغستين بتيار مستمر ومستقر مما يؤدي إلى أن هذا السلك سوف يبعث إشعاعاً مستمراً يمتد من 380 نم إلى 2200 نم و هذا المصباح شبيه جداً بالمصباح العادي.

هل تعلم؟

أن مصباح الديتيروم له عمر حوالي 600 ساعة عمل أي 25 يوم عمل.

وعندما نشتري جهاز السبيكترو عندما يكون مصمم بحيث يعمل كلا المصباحين للضوء المرئي (التنغستين) وفوق البنفسجي (الديتيروم) معاً بمجرد كبس جهاز التشغيل، أي سواء أردنا أن نحلل بالطيف المرئي أو فوق البنفسجي تكون كلا اللمبتين مضاءتين مما يؤدي إلى هدر كبير.

وكما ذكرنا فإن مصباح الديتيروم غالي الثمن فهو يبلغ حوالي 800$

أما مصباح التنغستين فهو نفسه المستعمل في فلاش الكاميرات ذو حجم صغير جداً وسعره سابقاً كان بحوالي 800 ل.س فقط.

لهذا السبب تم إيجاد برامج حاسوبية يتم إدخالها للجهاز لفصل عمل المصباحين عن بعضهما.

موحد طول الموجة (ناخب الضوء أحادي اللون) Monochromators

من أجل الحصول على إشعاع أحادي اللون لا بد من فصل الأشعة الساقطة حسب طول موجتها وذلك:

1. لزيادة الحساسية للطريقة من جهة
2. ولمنع حدوث حيود عن قانون لامبير-بيير من جهة أخرى

وللوصول إلى ذلك يمكننا استخدام ثلاث تقنيات (المراشح، الموشور، شبكة الانحراف).

المراشح Filters:

تحضر من مواد خاصة لا تسمح بالنفوذ إلا لمناطق ذات أطوال موجية محدودة في حين تمتص معظم الإشعاع ذي الأطوال الموجية الأخرى.

المواشير Prism:

تستخدم لتبديد اللون ومن خلال تدوير الموشور بزوايا محددة نستطيع تحديد الموجة المحددة.

شبكة الانحراف Diffraction Grating:

وتستخدم هذه الطريقة بالأجهزة الحديثة حيث يستخدم لوحة زجاجية أو معدنية مملوءة بالأخاديد حيث تتبع نظاماً خاصاً بها يعتمد على قوانين الانحراف على هذه الأخاديد.

حجرة العينة Sample Cell

يجب أن تسمح المادة التي تُصنع منها الحجرة بأن تمرر الأشعة عبرها وهو أمر بديهي.

ولا يجوز استخدام وعاء مصنوع من الزجاج في المجال فوق البنفسجي لأن الزجاج يمتص هذه الأشعة.

← ولذلك لابد أثناء العمل بمجال الأشعة فوق البنفسجية من استخدام أوعية مصنوعة من الكوارتز أو السيلكا المصهورة.

← في حين نستطيع استخدام الوعاء المصنوع من الزجاج في الأشعة المرئية.

Cell materials	
UV	quartz, fused silica
Visible	glass, plastic (UV cells can be used)

وتسمى عادة هذه العبوات بالمحفد Cuvette ومحافد الكوارتز تبقى مدى الحياة.

وفيما يلي جدول يبين مجال طول الموجة الموافقة لكل نوع من أنواع حجرات العينة:

Material	nm range
Silica	150-3000
Glass	375-2000
Plastic	380-800