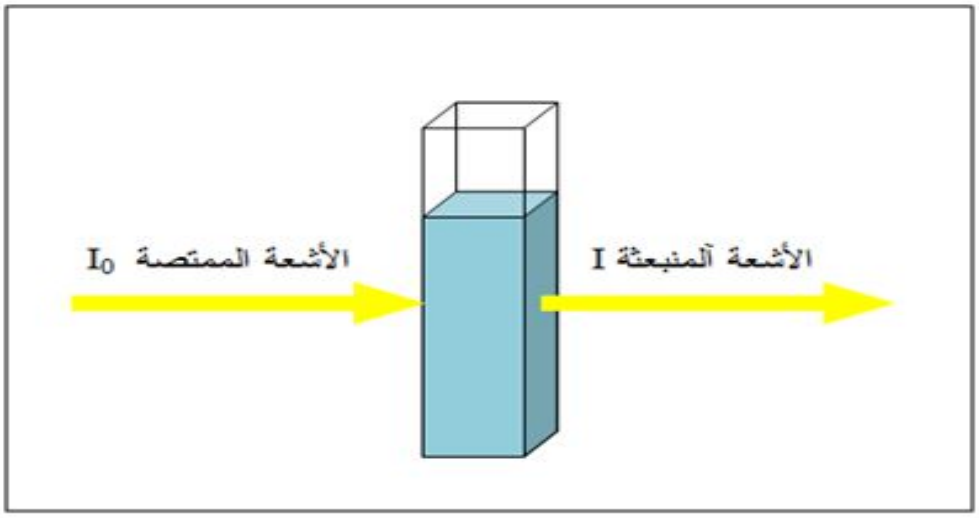
2 – مطيافية الامتصاص الجزيئي (Spectrophotométrie d' absorption moléculaire):

1- تعاريف و مبدأ: تعتمد التحليلات الكمية الطيفية على القانون العام لامتصاص الطاقة الإشعاعية للعالمين Lambert و Beer و هو نتيجة إدماج قانونين أحدهما لـ Lambert و الآخر لـ Beer.

أ- قانون Lambert : عندما تقطع حزمة ضوئية أحادية اللّون (Monochromatique) شدتها I_0 إناء قاعدته مربعة الشكل طول ضلعه l مملوء بمحلول تركيزه ثابت C كما في الشكل (رقم: 02) الآتي:



شكل (رقم: 02): مرور ضوء Monochromatique خلال محلول تركيزه C ثابت.

يعبر هذا القانون على أنّ امتصاصية (Absorbance) المحلول تتناسب طردا مع طول المسافة المقطوعة l أي أنّ:

$$Abs = a \times l$$

بحيث:

Abs: الامتصاصية

a: ثابت الامتصاص

l : طول المسافة المقطوعة (سم)

ب- قانون Beer: عندما تقطع حزمة ضوئية أحادية اللون (Monochromatique) شدتها I_0 إناء قاعدته مربعة الشكل طول ضلعه l ثابت مملوء بمحلول تركيزه C، تكون امتصاصية (Absorbance) المحلول تتناسب طردا مع تركيزه C أي أنّ:

$$Abs = a \times C$$

بحيث:

Abs: الامتصاصية

a: ثابت الامتصاص

C : تركيز المحلول (مول × لتر$^{-1}$)

ج- قانون Beer - Lambert: بدمج القانونين السابقين نحصل على:

$$Abs = \varepsilon \times l \times C$$

بحيث:

Abs: الامتصاصية

l : طول المسافة المقطوعة (سم)

C : تركيز المحلول (مول × لتر$^{-1}$)

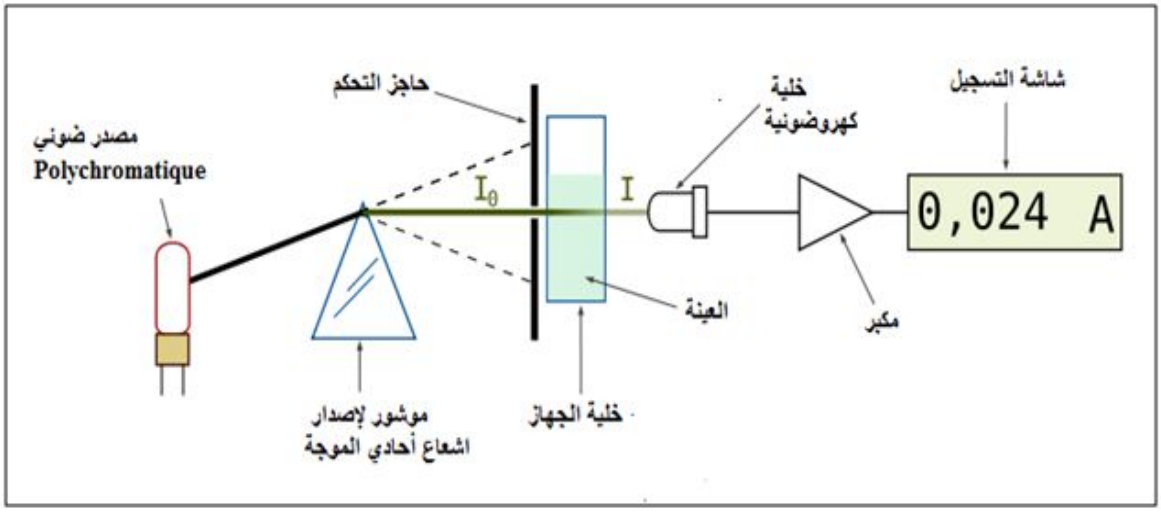
ε : معامل الامتصاص المولاري (وحدته هي: لتر× مول$^{-1}$ × سم$^{-1}$)

د- الشروط العملية لقانون Beer - Lambert: يعتبر قانون العالمين Lambert و Beer علاقة تجريبية تربط الامتصاصية الضوئية بخصائص العيّنة التي تقطعها، كما يحقّق تناسب طردي بين تركيز مكوّنات كيميائية لمحلول و امتصاصيته مع طول المسار المقطوع خلال العيّنة ويتطلب تطبيق هذا القانون تحقيق الشروط الآتية:

- الأشعة الضوئية يجب أن تكون أحادية الموجة (Monochromatique) أي أنّ: (λ= ثابتة).
- تركيز المحلول المراد معايرته يكون برتبة: (10^{-4} مول/لتر).
- يجب المحاليل أن تكون متجانسة.

- يجب عدم تفاعل المكوّن المنحل مع الأشعة الممتصة.

التطبيق العملي لمبدأ قانون Beer - Lambert لقياس الطيف الناتج عن تأثرات امتصاص شعاع كهرومغناطيسي أو انبعاثه أو تشتته بأجهزة تدعى المطياف (Spectrophotomètre)، الذي يسجّل على شاشته قيمة رقمية لقيمة امتصاصية العيّنة عند طول موجي λ(nm) محدّد أي Abs_λ يوضح بالمخطط التجريبي لمبدأ القياس المخبري المبيّن في الشكل (رقم: 03) الآتي:



Abs_λ: الامتصاصية عند طول موجي محدّد λ(nm)

شكل (رقم: 03): مخطط مبدأ قياس Abs_λ بجهاز المطياف (Spectrophotomètre).

عمليا يمكن أن يسجل المطياف على شاشته قيمة قياس كل من النفاذية (T: Transmission) أو الكثافة الضوئية (DO: Densité optique) وهي ترتبط بالامتصاصية كما يلي:

$$(DO = Abs) \text{ ، } (Abs = 1/T) \text{ و } (T = I / I_0)$$

- **النفاذية:** تساوي حاصل قسمة قيمة شدة الشعاع النافذ على قيمة شدة الشعاع الوارد ($T= I / I_0$)، يعبر عنها عموما بـالنسبة المئوية (%).
- **الامتصاصية:** تساوي مقلوب النفاذية ($Abs = 1/ T$).
- **الكثافة الضوئية:** تساوي الامتصاصية ($DO = Abs$).

يلاحظ أنّ:

- إذا كانت $I_0 = I$ يعني أنّ المحلول شفاف لا يوجد أي امتصاص بواسطة المحلول أي أنّ ($1 = I / I_0$) وتكون النفاذية 100% بينما الكثافة الضوئية تكون مساوية للصفر.
- المحلول عكر I تؤول إلى 0 و تكون النفاذية كذلك تؤول إلى 0 بينما الكثافة الضوئية تصبح $\log \infty$ إذا ما لا نهاية.
- إذا كانت I_0 طاقة الضوء الوارد وطاقة الضوء النافذ I يكون قانون Beer - Lambert حسب مبدأ التخفيض (Atténuation) لتداخل الفوتونات مع المادة على الشكل الآتي:

$$I = I_0 \, e^{-\varepsilon \, c \, l}$$

ه- الإنحراف عن قانون Beer - Lambert:

ينحرف بيان العلاقة الخطية ($Abs_\lambda = f([C])$ ويكون غير خطي، فيسمى الانحراف باتجاه محور العينات **بالانحراف الإيجابي** بينما يسمى الانحراف باتجاه محور السينات **بالانحراف السلبي**، و من أهم مسبباته نذكر:

- **ظروف التجربة:** (درجة الحرارة، الضغط، المذيب والزمن)
- **الأخطاء الآلية:** تنشأ نتيجة بعض عيوب الآلة المستخدمة (الخلية الكهروضوئية، جهاز اختيار الطول الموجي والأجزاء البصرية) التي تؤدي إلى (ضياع الأشعة، عدم استقرار المصدر الضوئي، وعدم إمكانية الحصول على أشعة ضوئية أحادية الموجة بصورة عملية).
- **التغيرات الكيميائية:** تشمل تغيرات (الاتزان الكيميائي، الـ pH، الكواشف والصيغة الكيميائية للجسيمات الممتصة عند تخفيف العيّنة).

❖ **معامل انكسار العينة:** يعتمد على معامل الامتصاص المولاري و معامل انكسار المادة ويتغيّر نتيجة تغيير تركيز المحلول.

2 – طيف الامتصاص:

يعطي التمثيل البياني لقياس تغير الكثافة الضوئية (DO) الناتجة عن تعديل طول الموجة الضوئية λ(nm) الصادرة لمحول ازرق المثيلين في الماء الشكل (رقم: 04) الذي يبين تواجد قمم بحيث تكون كل ذروة موافقة لطول موجي مقابل للامتصاص الأعظمي الذي يقيس معامل الامتصاص الجزيئي للمادة المدروسة مثلا:

بفرض أنّ الكثافة الضوئية (DO = 0.400) لمحلول تركيزه (C = 20 mmoles/1litre) و تم القياس بخلية ذات بعد (1cm) بالتعويض في قانون Beer - Lambert:

$$DO = Abs = \varepsilon \times l \times C$$

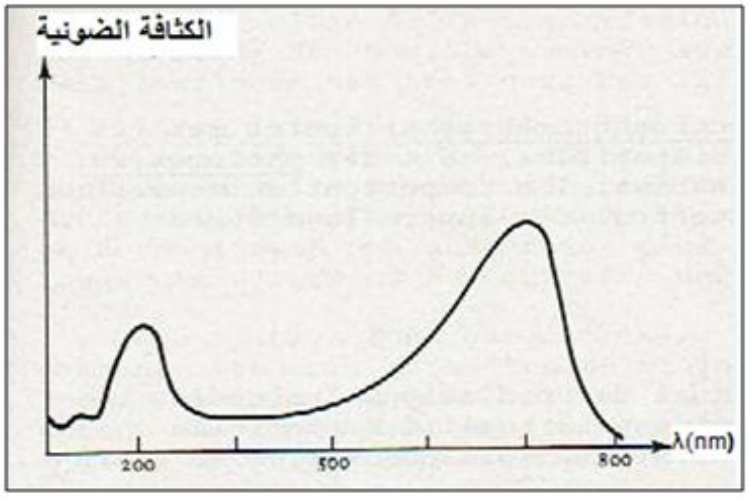
يمكن حساب معامل الامتصاص الجزيئي لهذا المحلول كما يلي:

$$\varepsilon = DO / l \times C \Longrightarrow \varepsilon = 0,4 / 20 \,.\, 10^{-3} \text{ mole. } l^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon = 20 \,.\, 10^{3} \text{ cm}^{2} \text{ mole}^{-1}$$

يلاحظ أنّ:

- ترسم أطياف الامتصاص دائما في المجال فوق بنفسجي (UV) أو في الضوء المرئي (Visible) .
- انتقال طول الموجة الاعظمية (λ) يختلف باختلاف العوامل الثلاثة: (تحديد المذاب، درجة الحرارة و الـ pH).
- تختلف كذلك معاملات الامتصاص الجزيئية التي تقاس في نفس الأطوال الموجية باختلاف العوامل الثلاثة الذكورة أعلاه.



شكل (رقم: 04): قمم تحدّد خصائص الجزيء المنحل

3 – تطبيـــقات مطيافية الامتصاص الجزيئي:

3 – 1 – صفات العيّنات المستعملة: هي محاليل متجانسة ملوّنة يجب أن يكون التفاعل ذو انتقائية عالية و يتميّز لونها بما يلي:

- أن لا يتأثر نسبيا بتغيير الـ pH و T°.
- ذو شدة λ كافية تسمح بتقدير كميات ضئيلة ولا يضمحل بسرعة.
- الناتج الملوّن مذابا في المحلول المائي أو في مذيب عضوي غير ممزوج.
- يتبع الناتج الملوّن قانون Beer (ليعطي دقة أعلى من الناتج الملون الذي لا يتبعه).
- لا يظهر بسرعة و يكون الكاشف الكيميائي غير ملوّن (أو أن لا يعطي امتصاصا شبيها بالمركب الملوّن).
- يمتص المحلول الملوّن بقوة في منطقة الطيف المرئية أفضل من امتصاصه في المنطقة فوق البنفسجية (لأن هناك عددا كبيرا من المواد التي من المحتمل أن يتداخل امتصاصها في المنطقة فوق البنفسجية).

3 – 2 – تطبيـــقات بيولوجية: يكون طول الخلية l ثابت لكل مطياف و تستعمل للدّراسة قيمتي معامل الامتصاص الجزيئي للمادة ε و تركيزها C :

❖ **قياس ε :** تمثل ε معامل الامتصاص الجزيئي للمادة عند تركيز C معطى و لتقييمها نستعمل طول الموجة التي تملك الكثافة الضوئية الأكثر شدة (ذروة الامتصاص الأعظمية).

❖ **قياس C :** يعتبر تطبيقيا جد مفيد في معايرة المادة في وسط بسيط أو مركب بواسطة قراءة ضوئية بسيطة من هنا ينتج احتمالين:

- الوسط بسيط ولا يحتوي إلا على المادة المراد معايرتها (احتمال نادر) فيكفي فقط معرفة معامل ε لطول الموجة والحساب يسمح بتحديد التركيز C للمادة في الوسط والأكثر استعمالا هو ذروة الامتصاص في المجال (UV)
- أحيانا الوسط معقد لكن المادة المعايرة تملك ذروة امتصاص مميزة نوعا ما.

من الطريقة العامة نستخلص مثلا:

- معايرة هيموغلوبين الدم بدقة عالية نتيجة لتركيزه المرتفع (150 g/l) عند طول موجة (540 nm) و طيف امتصاص يكون أعظمي عند (270 nm) بسبب وجود الأحماض الأمنية العطرية حيث القراءة تسمح بتقييم تركيز البروتين في المحلول خصوصا في كروماتوغرافيا العمود.

- الوسط المعقد المادة المعايرة لا تملك طيف امتصاص خاص وتركيزها في الوسط منخفض نسبيا حيث تعتمد على تطور اللّون في وجود الكواشف الكميائية .

- يمكن معايرة تسمح بالحصول على المعامل ε عند (440 nm) للمواد الملونة باستخدام المحاليل المائية من اليوريا المستقبلة في ظروف تجريبية محددة بالكاشف diacétylmonoxime بتصفير الجهاز على أنبوب ماء بدل محلول اليوريا لكن يحتوي على الكاشف diacétylmonoxime (يسمى كذلك هذا الأنبوب بالأبيض: Blanc).

هناك نوع آخر من الأجهزة المستخدمة في معايرة اليوريا في البلازما عند (293 nm)، هذه التقنية ترتكز على قياس الامتصاصية عند هذا الطول الموجي ثم هدم حمض اليوريا باستعمال انريم Uricase بحضنها عند 25 أو 37 درجة مئوية فعند الهدم الكلي لحمض اليوريا بالانزيم يتم قياس الامتصاصية مرة أخرى، انخفاض الكثافة الضوئية يتناسب بشكل مباشر مع كمية حمض اليوريا الموجودة في الوسط.

.