جامعة دمشق
المعهد التقاني للهندسة الميكانيكية و الكهربائية
قسم التجهيزات الطبية

أجهزة مخابر ٢

السنة الثانية

المهندسة ميساء عبدربه

٢٠١٠-٢٠١١م

الباب الأول

الأجهزة المعتمدة على القياسات الضوئية

الفصل الأول : مقدمة عن الضوء .

الفصل الثاني : مقياس الضوء الطيفي .

الفصل الثالث : مقياس التألق.

الفصل الرابع : مقيـــاس العكر ، ومقياس الكدر .

الفصل الخامس : مقياس الضوء اللهبي .

الفصل السادس : مقياس الضوء الطيفي الإمتصاصي الذري.

الفصل الأول
مقدمة عن الضوء

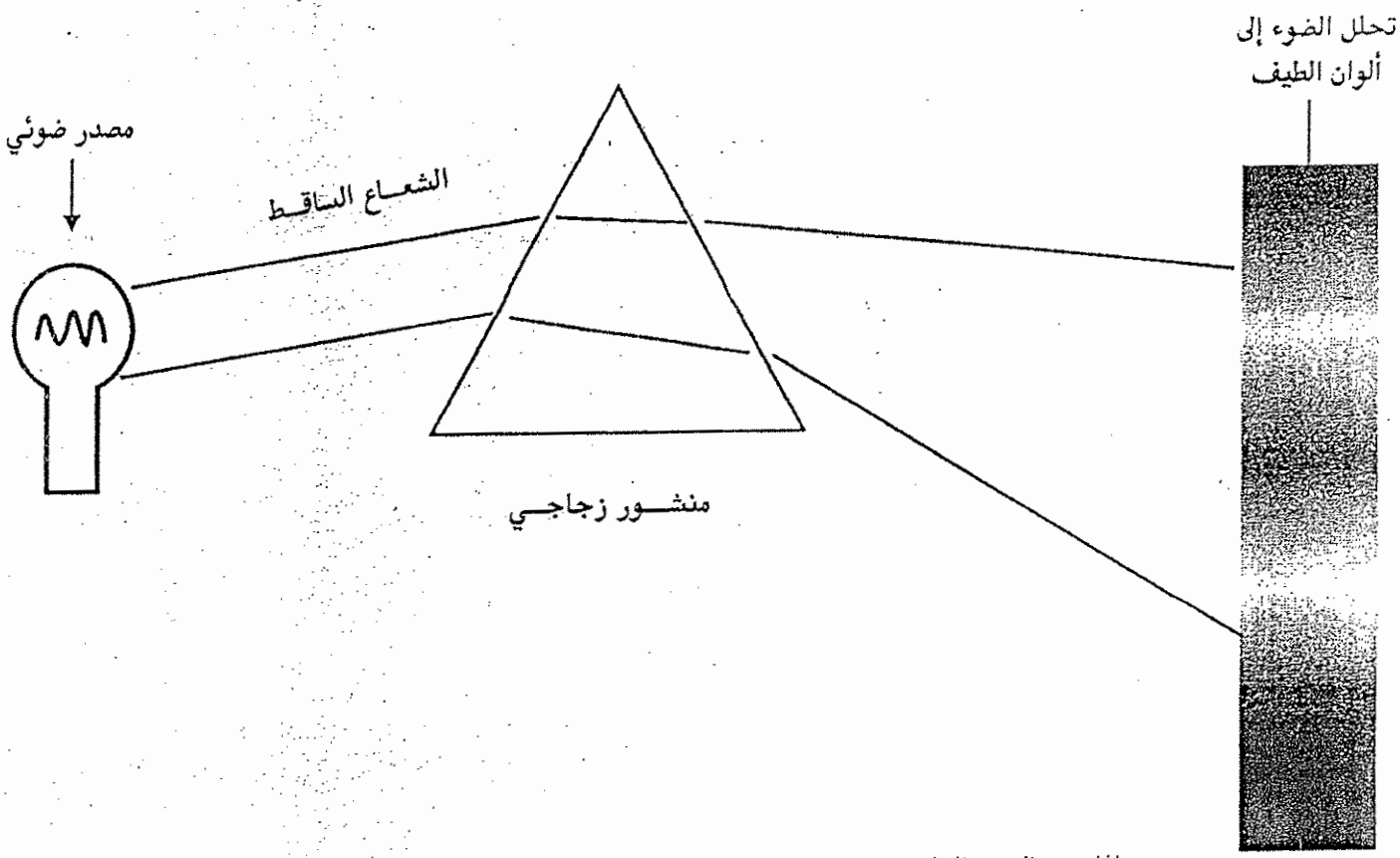
يعرف الفيزيائيون الضوء على أنه طاقة كهرطيسية ذات مجال خاص يمكن تحديده بطول موجي Wave length، وليس المقصود هنا شرح نظريات الضوء، ولكن محاولة ذكر لمحة مختصرة عن بعض الظواهر التي تخص موضوعنا، وهي القياسات الضوئية.

فمن المعروف أن الضوء الذي تشاهده العين الإنسانيه، مثل ضوء الشمس، أو ضوء المصباح العادي، يتكون من مجموعة من الألوان، متمازجة مع بعضها، مكونة هذا الضوء الأبيض، ولكن يمكن فصل هذه الحزم الضوئية الملونة، إذا أسقطنا حزمة أشعة بيضاء على منشور زجاجي (الشكل 1)، وتلقينا الأشعة الخارجة من المنشور على حاجز أبيض، لوجدنا مجموعة من الألوان الزاهية تتتالى من قمة المنشور إلى قاعدته على النحو التالي : الأحمر، البرتقالي، الأصفر، الأخضر، الأزرق، النيلي، البنفسجي، ومن الشكل يظهر أن الأحمر هو الأقل انحرافاً في المنشور، والبنفسجي أشدها انحرافاً، وتسمى هذه الظاهرة بالتبدد الضوئي بالمنشور، وتعليلها أن الألوان المختلفة التي يتكون منها الضوء العادي هي موجات كهرطيسية مختلفة في تواتراتها، وبالتالي يختلف معامل الانكسار في زجاج المنشور، وينفصل كل لون عن الآخر عند خروجه منه.

يطلق على هذه الألوان ألوان الطيف Spectral colors، ويمكن تقسيم هذه الطيوف إلى نوعين رئيسيين، الطيوف الصادرة Emission، والطيوف الممتصة Absorbed.

أ ـ الطيوف الصادرة Emission spectra

لقد سبق وقلنا إنّ ضوء الشمس، أو المصباح، إذا مرر في منشور لحصلنا على طيف تتوالى فيه جميع الألوان من الأحمر حتى البنفسجي، هذا النوع من الطيف الصادر يطلق عليه الطيف المتصّل.



إذا مرر الضوء العادي خلال منشور زجاجي، تحلل هذا الضوء عند خروجه من المنشور إلى مجموعة من الألوان تنتالى من قمة المنشور نحو قاعدته كالتالي: الأحمر، البرتقالي، الأصفر، الأخضر، الأزرق، النيلي، البنفسجي. حيث يكون لكل لون من هذه الألوان مجال لطول موجة خاص به.

ولكن هناك نوع آخر من الطيف يطلق عليه الطَيف المتفرد أو المتقطع، وذلك بإصدار ضوء ذي لون واحد أو لونين من ألوان الطيف، فمثلاً إذا تعرض عنصر الصوديوم للهب، يصدر نتيجة لذلك ضوء أصفر، هذا الطيف الصادر Emmited spectrum ثابت دائما مهما اختلفت أملاح الصوديوم، بمعنى آخر له طول موجة ثابت يميز عنصر الصوديوم، في حين لو استخدمنا أي ملح من أملاح الليثيوم وعرض للهب، لصدر عنه ضوء أحمر، له أيضاً طول موجة معينة، هذه الخاصية ستشرح فيما بعد في الأجهزة التي تعتمد على مقياس الضوء اللهبي. وبالتالي يمكن القول باختصار إن الطيوف الصادرة تنتج من الأضواء التي تصدرها المواد نتيجة الاستثارة Excitation بطاقة معينة (مثل الحرارة، أو شرارة كهربائية...الخ).

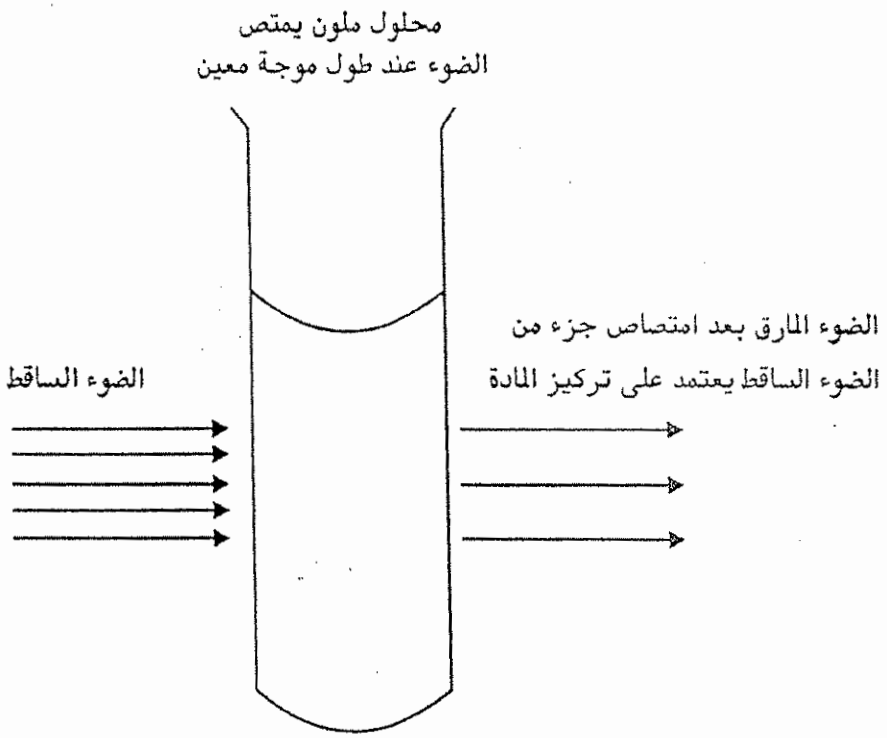
ب - الطيوف الممتصة Absorption spectra

إذا اجتاز ضوء أبيض كوباً زجاجياً يحتوي على محلول أحمر، فإن الضوء الذي يخرج من الكوب وتراه العين يكون لونه أحمر، وتفسير ذلك أن هذا المحلول قد امتص جميع ألوان الطيف المكون منها الضوء الأبيض (الأخضر والأزرق والنيلي والبنفسجي)، تاركاً طيف الأحمر والبرتقالي والأصفر. وكل لون من الألوان ناتج عن مادة أو مركب معين، يمتص أحد ألوان الطيف، أو بمعنى آخر يمتص الضوء عند طول موجة معين (الشكل 2) ومقدار امتصاصه للضوء عند هذه الموجة يعتمد على تركيز هذا المركب الملون في المحلول، هذه الخاصية هي التي استخدمت في القياسات اللونية.

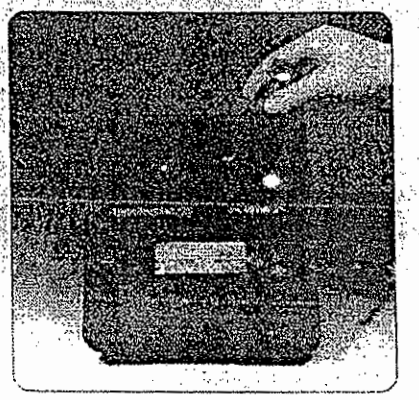
طول الموجة

من الشرح السابق، ذكر أن الضوء عبارة عن موجات كهرطيسية، وأن الضوء المرئي تتراوح طول موجته بين 360 إلى حوالي 750 نانومتر، في حين أن الموجات الكهرطيسية تحت 360 نم تسمى الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet، وتلك التي تكون موجاتها فوق 750 نم تسمى الأشعة تحت الحمراء Infra red light، وكلا النوعين لا تراه العين الإنسانية. وقد ذكر أيضاً أن لكل لون من ألوان الطيف طول موجة خاص به (كما في الجدول 1).

الشكل (2) : ظاهرة امتصاص الضوء بمزوره في المحلول



إذا مرر الضوء من خلال محلول به مادة ملونة، فإن هذه المادة تمتص الضوء المكمل لهذا اللون، بمعنى آخر، كل محلول ملون يمتص الضوء عند طول موجة معينة، وشدة الامتصاص تتناسب مع تركيز المادة في المحلول.



مثال لأحد أجهزة قياس الضوء الطيفي ...
وتوجد مئات الشركات المنتجة لهذه الأجهزة

دول (1): طول موجة كل من ألوان الطيف

لون	طول الموجة (نم)	اللون	طول الموجة (نم)
ق البنفسجية	أقل من 340	الأصفر	600 - 580
بنفسجي	380 - 340	البرتقالي	620 - 600
نيلي	440 - 380	الأحمر	750- 620
لأزرق	500 - 440	تحت الأحمر	فوق 750
لأخضر	580 - 500		

امتصاص الضوء وقانون لامبرت - بير (Lambert-Beer)

لقد ذكر أن معظم المواد تمتص الضوء عند موجة ـــ أو عدة موجات ـــ خاصة بذرات كل مادة (الشكل 3)، فإذا مرر ضوء طيفي ذو موجة معينة خاصة بمحلول يحتوي على المادة التي تمتص الضوء عند هذه الموجة، فإن جزءاً من الضوء سيمتص بكمية تعتمد على ثلاثة عوامل :

1- (a) وهو معامل امتصاص ضوئي ثابت وخاص بكل مادة تحت ظروف ثابتة.

2- (C) وهو تركيز المادة في المحلول الذي يمر فيه الضوء.

3- (1) طول مسار الضوء في المحلول. (ثابت ويساوي واحد سم).

وبالتالي يمكن القول بأن شدة امتصاص الضوء (A) يتبع القانون التالي :

$$\{A \alpha\ alc\}$$

أي أن شدة الامتصاص تتناسب طرداً مع التركيز لأن ((a معامل الامتصاص الضوئي، ومسار الضوء (1) ثابتين.

من أجل ذلك يمكن كتابة القانون السابق بهذا الشكل :

$$\{A = a\,l\,X\,C\}$$

∴ $C = A \times 1/a$ وحيث أن a/1 هو رقم ثابت لكل مادة (K) سنطلق عليه معامل التركيز. ويصبح القانون :

$$C = A \times K.$$

ويمكن الحصول على معامل التركيز C/A= (K).

يمكن اختصار ما سبق:

1 - تركيز أي مادة في محلول ما = معامل التركيز × شدة امتصاص الضوء لهذه المادة.

2 - معامل التركيز = تركيز المادة في المحلول ÷ شدة الامتصاص.

إن معامل التركيز أو ما يسمى بثابت الامتصاص الضوئي للمادة يجب أن يحسب تحت ظروف معينة (ثبات باهاء المحلول، درجة حرارة ثابتة، طول مسار ضوء ثابت، وطول موجة ثابت.)

وإذا عرف هذا المعامل بالنسبة لأي مادة موجودة في محلول ما، فيمكن قياس امتصاص الضوء لهذا المحلول، وتضرب النتيجة في معامل الامتصاص ليعطى التركيز، ولكن بشرط مهمّ هو أن تركيز هذا المحلول يكون ضمن المجال الذي يتبع فيه قانون لامبرت ـــ بير.

قانون لامبرت ـ بير

يقول هذا القانون، أنه تحت ظروف ثابتة، يتناسب امتصاص الضوء في محلول ما طرداً مع تركيز المادة في هذا المحلول في مجال معين. (الشكل 4)، بمعنى أنه في تركيز خارج هذا المجال (زيادة أو نقصاً) لا يكون تطبيق هذا القانون صحيحاً.

القياسات المعتمدة على امتصاص الضوء

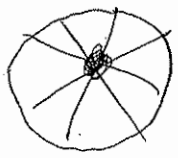
يمكن قياس تركيز كثير من المواد الموجودة في المحاليل بعد معاملتها بطرق مختلفة، إذا عرفت الموجة التي يمتص الضوء عندها بالنسبة لهذه المادة، وذلك بإحدى طريقتين :

1 - قياس شدة امتصاص الضوء Absorption ويرمز لها بالرمز (A).

2 - قياس كمية الضوء النافذ (المارق) Transmission ويرمز لها بالرمز (T).

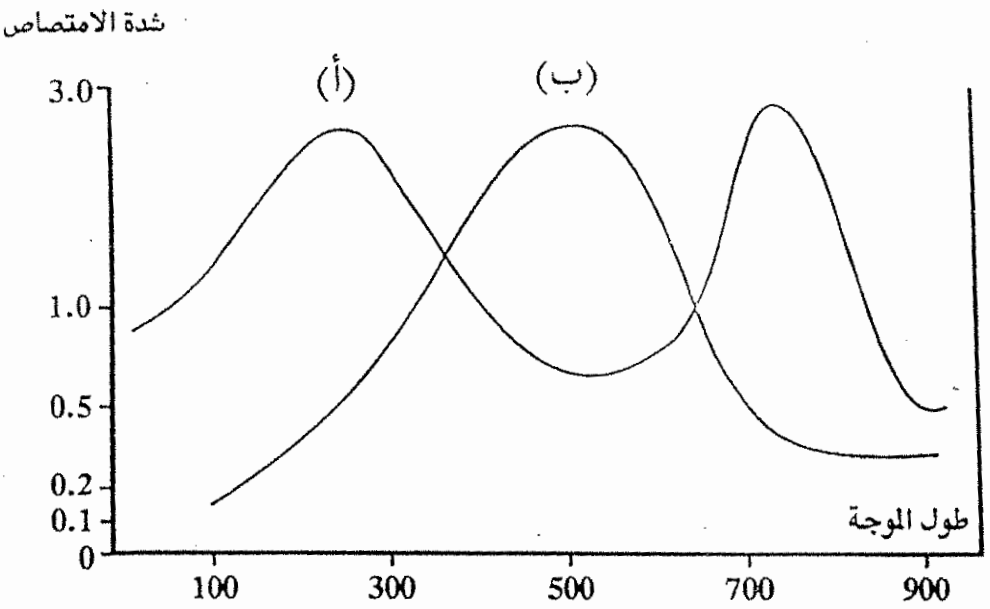
وقد وجد أن العلاقة بين شدة امتصاص الضرء، وكمية الضوء النافذ هي علاقة ثابتة حسب المعادلة التالية :

$$A = 2 - \log T$$

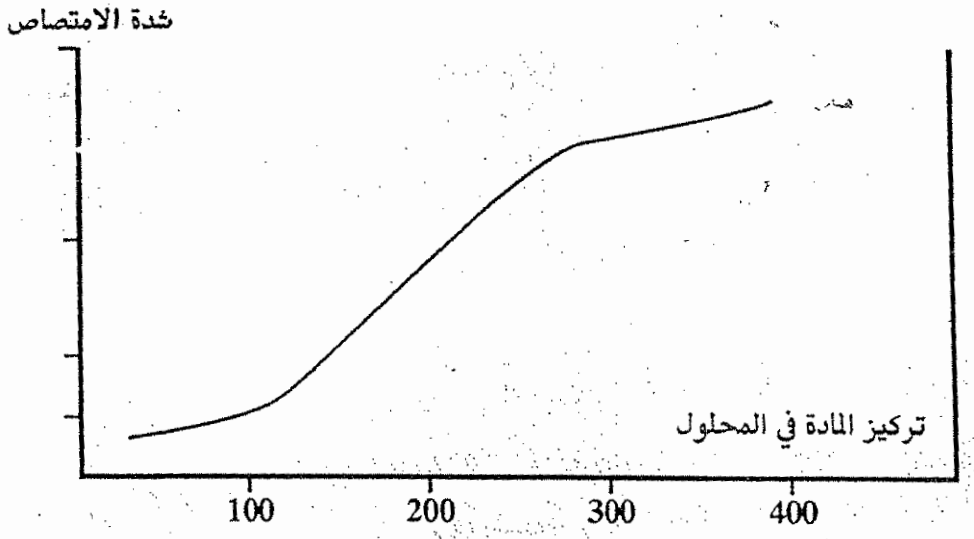


الشكل (3) : امتصاص المواد للضوء عند طول موجة أو أمواج معينة

الشكل (4) : امتصاص الضوء حسب قانون لامبرت ـ بير



يكون امتصاص الضوء لأي مادة على أشده عند طول موجة خاصة (أو عدة موجات)، فمثلاً المادة (أ) تمتص الضوء عند 250° وكذلك 720 °؛ في حين أن المادة (ب) في هذا الشكل يكون أقصى امتصاص للضوء عند 510 °.



يذكر قانون لامبرت ـ بير أن شدة امتصاص الضوء تتناسب طرداً مع تركيز المادة المذابة في المحلول ضمن مجال معين من التركيز، أي لا ينطبق القانون إذا كان التركيز خارج هذا المجال (في هذا الشكل يكون المجال بين 100 -300 مع).

فإذا حضرت مجموعة محاليل متدرجة التركيز من تفاعل قياس الكرياتينين (1، 2، 4، 8، 16 مـــغ/100 مل)، وقسنا شدة امتصاص هذه المحاليل، ورسمنا خطاً بيانياً يمثل الامتصاص ضد التركيز لوجدناه يأخذ خطاً مستقيماً، في حين إذا قيست التراكيز مقابل شدة نفوذية الضوء Transmittance، نتج عن ذلك خطٌ بيانيٌ منحنٍ (الشكل 5).

كيفية حساب التركيز عن طريق القياسات الضوئية

تستطيع أجهزة القياسات الضوئية Photometers قراءة شدة الامتصاص(A) أو النسبة المئوية للنفوذية (T) لكثير من المحاليل الملونة، واعتماداً على هذه القياسات يمكن حساب تركيز تلك المركبات.

واستخراج التركيز يعتمد على أحد الطرق التالية :

1 - استخدام محلول عياري (معروف التركيز).

2 - رسم منحنى المعايرة Standard Curve.

3 - استعمال معامل التركيز Concentration factor .

أولاً : استخدام محلول عياري

إذا أخذنا مثلاً قياس الغلوكوز، يحضر محلول عياري Standard solution من الغلوكوز بمقدار 100 مـــغ/100 مل، تجرى على هذا المحلول نفس خطوات القياس التي تجرى على العينة، مع ملاحظة عمل كفيء Blank. يضبط الجهاز على نفس طول الموجة الخاصة بهذا التفاعل، ولتكن مثلاً 420 نم. يوضع الكفيء في الكيفيت ويضبط الجهاز على الصفر.

يقرأ شدة امتصاص العياري، ولتكن 0.200.

يقرأ شدة امتصاص العينة، ولتكن 0.400.

يطبق القانون التالي :

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

تركيز السكر في العينة = $\frac{,400}{,200} \times 100 = 200$ مـــغ/100 مل

وهكذا فإن القانون العام يقول :

التركيز في المجهول = $\frac{\text{شدة امتصاص المجهول}}{\text{شدة امتصاص العياري}} \times$ تركيز العياري

ثانياً : رسم منحنى المعايرة

يمكن استخدام خط بياني يبين تراكيز متدرجة مقابل شدة الامتصاص، فإذا ما قيست عينة مجهولة، يمكن استخراج تركيزها بسهولة من هذا الخط البياني الذي يسمى منحنى المعايرة، ويمكن تمثيل ذلك بالخط البياني لتركيز اليوريا في محاليل متدرجة التركيز 20، 40، 80، 160، 320 مـــغ/100 مل، فبعد إجراء التفاعل على هذه المحاليل، يقرأ شدة امتصاص كل واحدة منها ـــ بعد تصفير الجهاز على كفيء ـــ يرسم الخط البياني كما في (الشكل 5 أ). ثم تقرأ شدة امتصاص العينات المجهولة، ويستخرج التركيز من منحنى المعايرة.

في بعض الأحيان لا يأخذ الخط البياني العياري Calibration curve شكلاً مستقيماً، لأن التفاعل لا يتبع قانون لامبرت ـــ بير، ومن أجل ذلك يجب عمل أكبر عدد ممكن من المحاليل العيارية، وقياس شدة امتصاصها ورسم المنحنى من هذه النقاط المتعددة كما في (الشكل 5 ب).

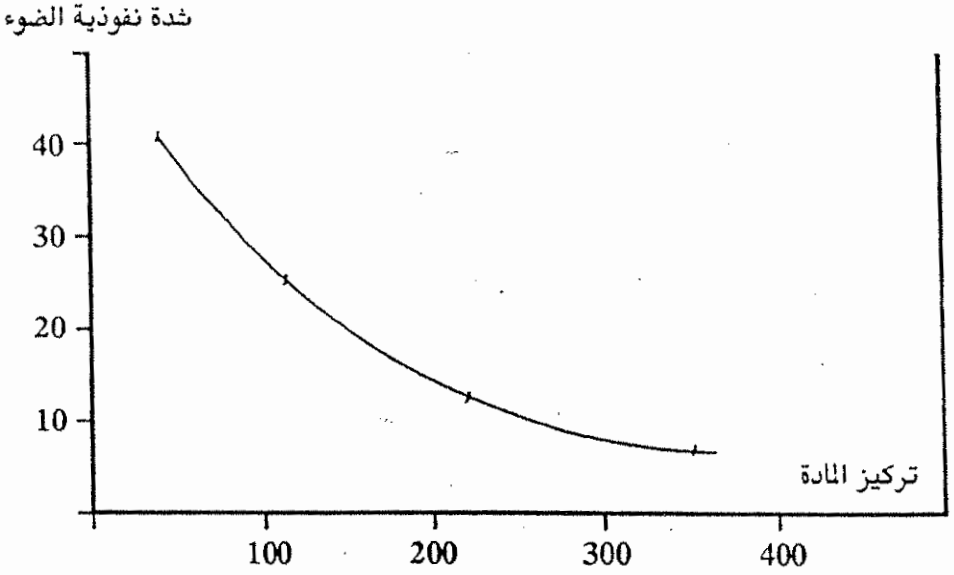
ثالثاً : استعمال معامل التركيز Concentration factor

كثير من المجموعات القياسية التجارية، والتي تستعمل بكثرة جداً هذه الأيام، تستخدم ما يطلق عليه معامل التركيز، فإذا ما أريد معرفة تركيز مادة في أي محلول، يطلب إجراء خطوات الاختبار، ويقرأ شدة امتصاص المحلول، ثم يحصل على التركيز بضرب معامل التركيز في شدة الامتصاص.

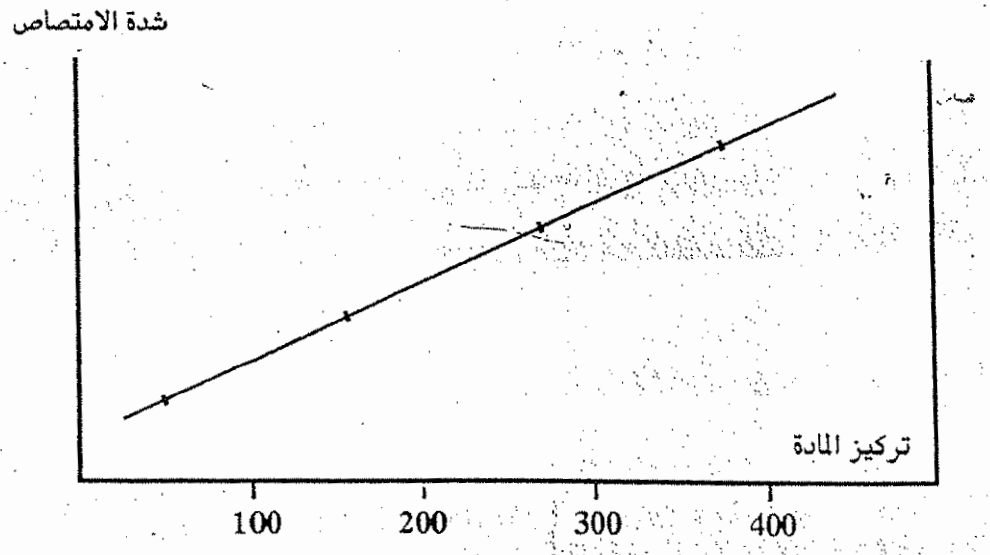
أي باستعمال هذا القانون :

التركيز = شدة الامتصاص × معامل التركيز.

الشكل (5 أ- 5 ب) : الخطوط البيانية لشدة امتصاص الضوء وشدة النفوذية



(أ) يبين هذا المخطط العلاقة بين تركيز المادة وشدة نفوذية الضوء transmission، وكما هو موضح يكون الخط البياني على شكل منحني.



(ب) يبين هذا المخطط العلاقة بين تركيز المادة وشدة الامتصاص الضوئي absorption وغالباً ما يكون الخط مستقيماً.

ولقد سبق وذُكر أن المادة التي يتبع تركيزها في المحلول قانون لامبرت ـــ بير، وذلك عند قياس شدة الامتصاص، يمكن الحصول على معامل التركيز بتطبيق القانون التالي :

$$\text{معامل التركيز} = \frac{\text{تركيز العياري}}{\text{شدة امتصاص العياري}}$$

ومن المهم أن نؤكد أنه إذا استعملت هذه الطريقة،يجب أن يراجع بين الحين والآخر تعيين معامل التركيز والتأكد من ثباته، لأنه قد يتغير بتغير ظروف العمل من تغيير في المحاليل، أو الجهاز...الخ.

مبادىء القياسات التي تستعمل الضوء

هناك أجهزة كثيرة تستعمل الضوء كوسيلة لقياس تركيز المركبات والتعرف عليها في المحاليل المختلفة، ولقد صممت أجهزة كثيرة تختلف في مبدأ عملها، حسب نوع وآلية استخدام الضوء، ويمكن التعرف على الأنواع التالية :

1 - قياس الضوء الطيفي (Spectrophotometry).

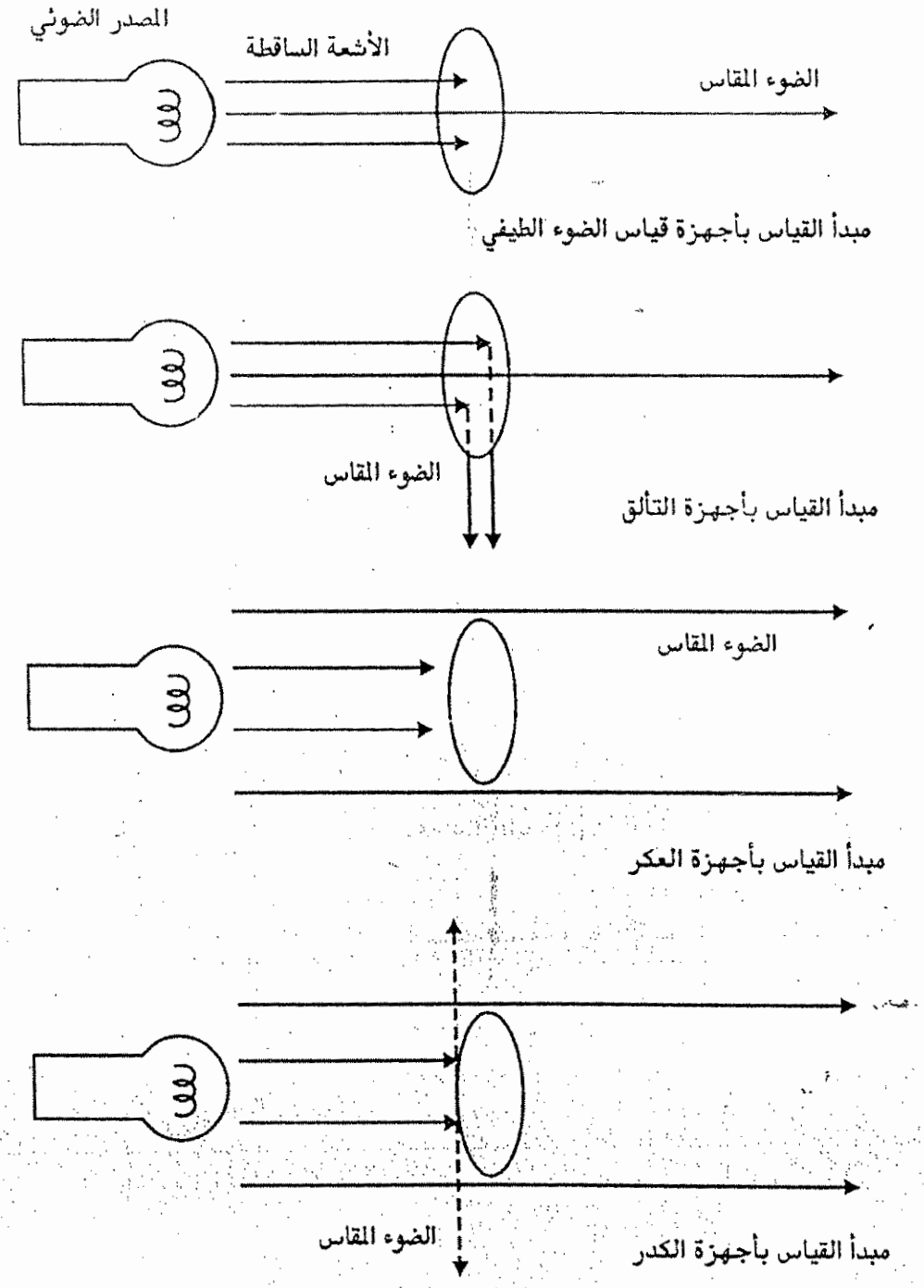
2 - قياس التألق ((Fluorometry .

3 - قياس العكر (Turbidimetry).

4 - قياس الكدر (Nephlometry)... الخ.

وسيتم الشرح التفصيلي لكل من هذه التقنيات، ولكن (الشكل 6) يوضح بشكل مبسط مبدأ كل نوع من هذه القياسات.

الشكل (6) : مبادئ تعامل ذرات المواد للضوء الساقط عليها



يبين هذا الشكل المبادئ المختلفة التي تتعامل بها ذرات المواد المذابة في المحلول تجاه الضوء الساقط عليها، وبالتالي مبادئ أجهزة قياس الضوء الطيفي.

الفصل الثاني
مقياس الضوء الطيفي
SPECTROPHOTOMETERS

يتم القياس الطيفي Spectrometry بوساطة مجموعة من الأجهزة يطلق عليها أجهزة قياس الضوء الطيفي، وتعمل على قياس شدة الضوء المنبعث من محلول يراد قياس تركيز مادة معينة توجد به عند طول موجة معينة. وتختلف هذه الأجهزة في تطورها وتصميمها، من أجهزة بسيطة جداً، إلى أجهزة شديدة التعقيد في تكوينها الميكانيكي والإلكتروني، ولكن إن اختلفت هذه الأجهزة في مدى تعقيدها، فكلها تعمل على نفس المبدأ، والذي سيشرح بشكل مبسط ومختصر في هذا الفصل، مع سرد بعض الاختلافات التي تميز بعض أنواع الأجهزة حسب تطورها.

المكونات الأساسية لمقياس الضوء الطيفي

معظم أجهزة قياس الضوء الطيفي تتكون من أجزاء أساسية، مهما اختلفت أنواع هذه الأجهزة، وهذه الأجزاء هي :

1- مصدر ضوئي Light source.

2- مستفرد الضوء الأحادي Monochromator.

3- الكيفيت Cuvette.

4- مكشاف شدة الضوء Detector.

5- قارئة أو مسجلة Recorder , meter.

والاختلاف بين جهاز وآخر من أجهزة قياس الضوء الطيفي يختلف في الحقيقة في تفاصيل، وتطور وعمل كل من الأجزاء المختلفة السابقة، وبالتالي سيورد فيما يلي بعض التفصيلات عن كل منها. (والشكل رقم 7) يوضح مخططاً مبسطاً لمكونات جهاز قياس الضوء الطيفي.

1 - المصدر الضوئي

المصابيح المستعملة كمصدر ضوئي في أجهزة قياس الضوء الطيفي كثيرة ومختلفة، ولكن أهمها وأكثرها استعمالاً نوعان :

أ - مصباح التنغستين Tungsten lamp.

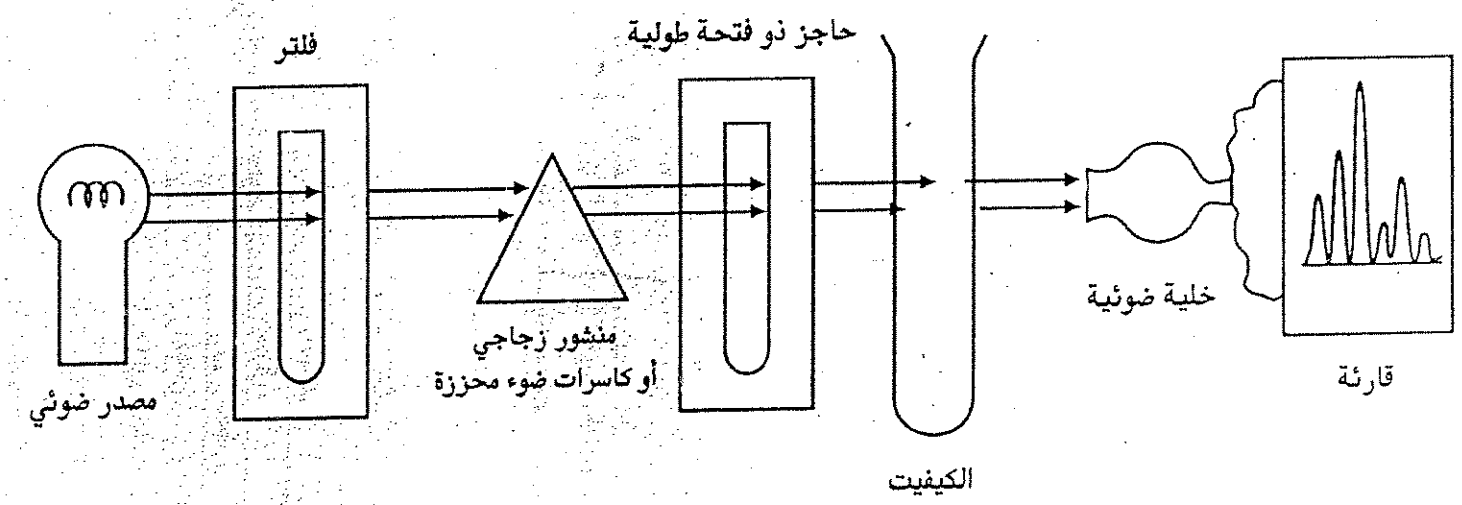
ب - مصباح الدوتريوم Deutrium lamp.

أ - مصباح التنغستين

ويستعمل هذا المصباح كمصدر ضوئي في المجال بين موجة 360 ـــ 750 نم، إلا أن الضوء المنبعث من هذا المصباح ليس ذا طاقة كافية للقياس في موجة تحت 360 نم، إلا إذا كان الجهاز مزوداً بمضخم فولط، حتى يزيد من توهج المصباح، ولكن يكون ذلك على حساب عمره، وهذا النوع من المصابيح تقل طاقته، وتجانس الضوء المنبعث منه، وذلك لترسب الذرات المنبعثة من خيط التنغستين على سطح زجاج المصباح من الداخل، مما يسبب عتامة غير متجانسة، ومن أجل ذلك ينصح الكشف الدوري على هذه المصابيح، واستبدالها عند الضرورة.

ب - مصباح الدوتريوم

هذا المصباح يصدر ضوءاً ذا طاقة عالية، يمكن استخدامها في المجال الطيفي فوق البنفسجي Ultraviolet region، أي في الموجات التي طولها 360 وحتى 200 نم، وكثير من الأجهزة التي تستعمل على نطاق واسع في مختلف المخابر، تحتوي على النوعين من المصابيح، ويُستعمل مصباح التنغستين في حال القياس في المجال المرئي (360 ـــ 700 نم)، وتستعمل الثانية في حال القياس في المجال فوق البنفسجي (360 ـــ 200 نم).



يوضح هذا الشكل مكونات مقياس الضوء الطيفي (انظر الشرح في النص)

2 - مستفرد اللون الأحادي Monochromator

وظيفة هذا الجزء من أجهزة مقياس الضوء الطيفي، هو الحصول على حزمة ضوئية أحادية اللون، أو بمعنى آخر لها طول موجة معين، ويمكن الحصول على ذلك بإحدى ثلاث وسائل :

أ - المرشحات Filters.

ب - المنشور الزجاجي Glass prism.

جـ - كاسرات الضوء المخززة Diffraction gratings.

أ - المرشحات

يتكون المرشح Filter من قطعة من الزجاج الملون، وكل مرشح يخرج ضوءاً ملوناً له طول موجة معين، ولكن غالباً ما يكون ذا مجال متسع، ومبدأ عمل هذه المرشحات الملونة، أنها تمتص جميع ألوان الطيف ما عدا طيفاً واحداً له طول موجة معين. ومن أمثلة هذه المرشحات تلك التي تصنعها شركة إلفورد Ilford filters، (والجدول رقم 2) يبين ألوان هذه المرشحات وطول الموجة للطيف أحادي اللون الذي تستعمل عنده هذه المرشحات. والتي يطلق عليها مرشحات الامتصاص Absorption filters.

الجدول (2) ألوان المرشحات وطول الموجة التي تستعمل عندها هذه المرشحات :

(مجموعة مرشحات إلفورد Ilford Filters)		
رقم المرشح	لونه	طول موجته
621	بنفسجي	455
622	أزرق	465
623	أزرق مخضر	495
624	أخضر	520
625	أصفر مخضر	540
626	أصفر	570
607	برتقالي	600
608	أحمر	700 أو أكثر

ولكن هناك نوع آخر يطلق عليه المرشحات التداخلية Interference filters، وهي عبارة عن رقيقتين من الزجاج المصفح بطبقة من الفضة، وبينهما يوجد مادة ملونة، وأهم ميزة لهذا النوع عن سابقه، أن الطيف الذي يحصل عليه ذو مجال ضيق من طول الموجة يصل أحياناً إلى 4 نم، وميزة أخرى لهذه المرشحات أنها تمرّر حتى 90% من الضوء الساقط عليها، بعكس النوع السابق الذي يمتص جزءاً كبيراً من الضوء الساقط عليه.

ب ـ المنشور الزجاجي Glass prism

يتكون هذا النوع من مستفرد اللون من منشور من الزجاج العادي يستعمل من أجل الحصول على الطيف في المجال المرئي (360 ـــ 700 نم)، ولكن يستعمل منشور من مادة الكوارتز (Quartz) في حال الرغبة في الحصول على المجال فوق البنفسجي حيث أن الزجاج يمتص جزءاً كبيراً من الأشعة فوق البنفسجية.

ج ـ كاسرات الضوء المحززة Diffraction Gratings

هذه وسيلة أخرى للحصول على حزمة ضوئية أحادية اللون، وتتكون من شريحة شفافة أو عاكسة للضوء، ويوجد على سطحها عدد كبير جداً من الحزوز الطولية المتوازية، وحينما يسقط الضوء على سطحها تقوم هذه الحزوز مقام المنشور الزجاجي بإحداث مجموعة من الإنكسارات الضوئية Diffractions، وبالتالي يتحلل الضوء العادي إلى مكوناته، وبشكل أكثر انتظاماً واتساعاً عن المنشور الزجاجي. بهذه الوسيلة يمكن الحصول على عصابة ضيقة من طول الموجة Narrow band of wave length تصل إلى واحد نانومتر، ويساعد على انتقاء هذه الموجة المحددة حاجز ذو فتحة طولية ضيقة Narrow slit exit، ومجموعة من العدسات، توجه بشكل مناسب، حتى تسمح بمرور مثل هذه الحزمة الضوئية ذات المجال الضيق من طول الموجة (الشكل 8).

3 ـ الكيفيت Cuvette

الكيفيت هو الوعاء المستعمل لاحتواء السائل المراد قياس المادة الموجودة فيه، وهي في الغالب مصنوعة من الزجاج أو مادة بلاستيكية شفافة في حال القياسات في طول موجة 340 نم أو أكثر، ولكن لا بد أن تكون هذه الأوعية من مادة الكوارتز في حال ما إذا كانت القياسات في المجال فوق البنفسجي (تحت 320 نم).

أما عن شكل الكيفيت، فهو أسطواني في أغلب الأحيان وبقطر داخلي (1) سم، ولكن قد يكون مربعاً، وأيضاً بمسار ضوئي مقداره (1) سم، ويفضل هذا النوع، لأن سقوط الضوء على السطح الدائري يسبب التشتت، وبالتالي يقلل إلى حد ما فعالية القياس. ويوجد أيضاً أنواع كثيرة وأشكال مختلفة من الكيفيتات، حسب الوظيفة المرجوة منها، ونوع الجهاز المستخدمة فيه، ومن أمثلتها (الشكل 9) .

أ - كيفيت لأخذ مقادير صغيرة من المحلول Microcuvette.

ب - كيفيت يستعمل في نظام الجريان المستمر Continuous flow cell.

جـ - كيفيت يتم الرشف الآلي لمحتواه Outflow cuvette.

ومهما كان نوع الكيفيت، وخاصة الأنواع التي تستعمل في القياسات اليدوية، فيجب أخذ الاحتياطات التالية أثناء الاستعمال، وإلا أدت إلى أخطاء قياسية، أحياناً تكون كبيرة :

أ - يجب أن يكون الكيفيت نظيف السطح، ويجب غسله بعد الاستعمال مباشرة، وعدم تجفيفه في أي فرن كهربائي.

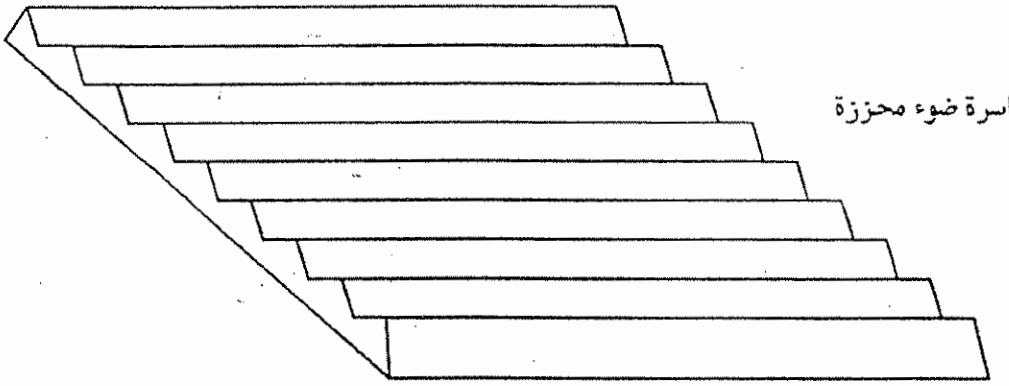
ب - يجب عدم مسك الجزء السفلي من الكيفيت ـــ الذي يمر منه الضوء أثناء القياس ـــ حتى لا تترك الأصابع أي بصمات على سطح الأنبوب، مؤثرة على شدة الامتصاص.

جـ - الاستعمال المتواصل للكيفيت أثناء إدخاله وإخراجه في المكان المخصص له من الجهاز، غالباً ما يؤدي إلى بعض الخدوش في سطح الزجاج، وبالتالي يجب الاستغناء عن مثل هذه الكيفيتات بعد فترة زمنية من الاستعمال.

د - الكيفيتات المصنوعة من مادة بلاستيكية، والتي قصد منها الاستعمال لمرة واحدة، يجب أن لا يعاد استعمالها، أو في حالة الضرورة، يجب أن يكون الاستعمال لفترة زمنية قصيرة.

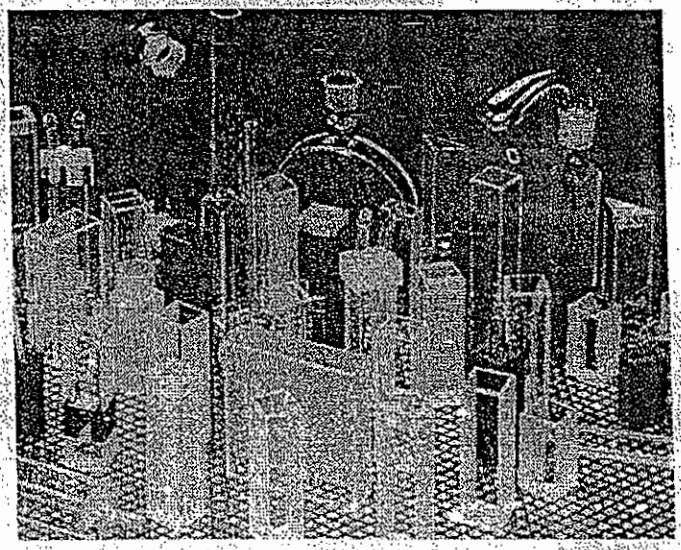
هـ - الأنبوب الأسطواني، يجب أن يكون على سطحه من الأعلى علامة طولية، وأن يكون وضع هذه العلامة ثابتاً عند إدخالها في المكان المخصص لها من الجهاز، فهذا يقلل من خطأ القياس.

الشكل (8) : كاسرات الضوء المحززة
الشكل (9) : أشكال مختلفة من الكيفيتات



كاسرة ضوء محززة

كاسرات الصوء المحززة: هي وسيلة للحصول على حزمة ضوئية أحادية اللون، أو ذات طول موجة محددة، تقوم الحزوز بإحداث مجموعة من الانكسارات الضوئية، أي يتحلل الضوء إلى مكوناته.



أشكال مختلفة من الكيفيتات Cuvettes، تستعمل لاحتواء المحاليل المراد قياس المركبات المختلفة فيها

4 ـ مكشاف شدة الضوء Light detector

مكشاف شدة الضوء هو الجزء الأكثر أهمية في أجهزة قياس الضوء الطيفي، وهو عبارة عن وسيلة تقوم بتحويل الإشارة الضوئية إلى إشارة كهربائية تتناسب طرداً مع شدة الإشارة الضوئية التي يستقبلها هذا المكشاف. وهناك عدة بدائل يمكن أن تؤدي هذا الغرض أهمها وأكثرها استعمالاً الآتي :

أ – الخلية الضوئية ذات الحواجز الطبقية Barrier-layer photocell.

ب – الأنبوب الضوئي البسيط Photocell or phototube.

جـ – الأنبوب المتعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier tube.

أ ـ الخلية الضوئية ذات الحواجز الطبقية

هذا النوع من الكشافات الضوئية Photodetectors، هو أبسطها وأسهلها وأكثرها استعمالا وتحملا، كما أن عمرها العملي طويل، ونادراً ما تحتاج إلى تبديل (الشكل 10).

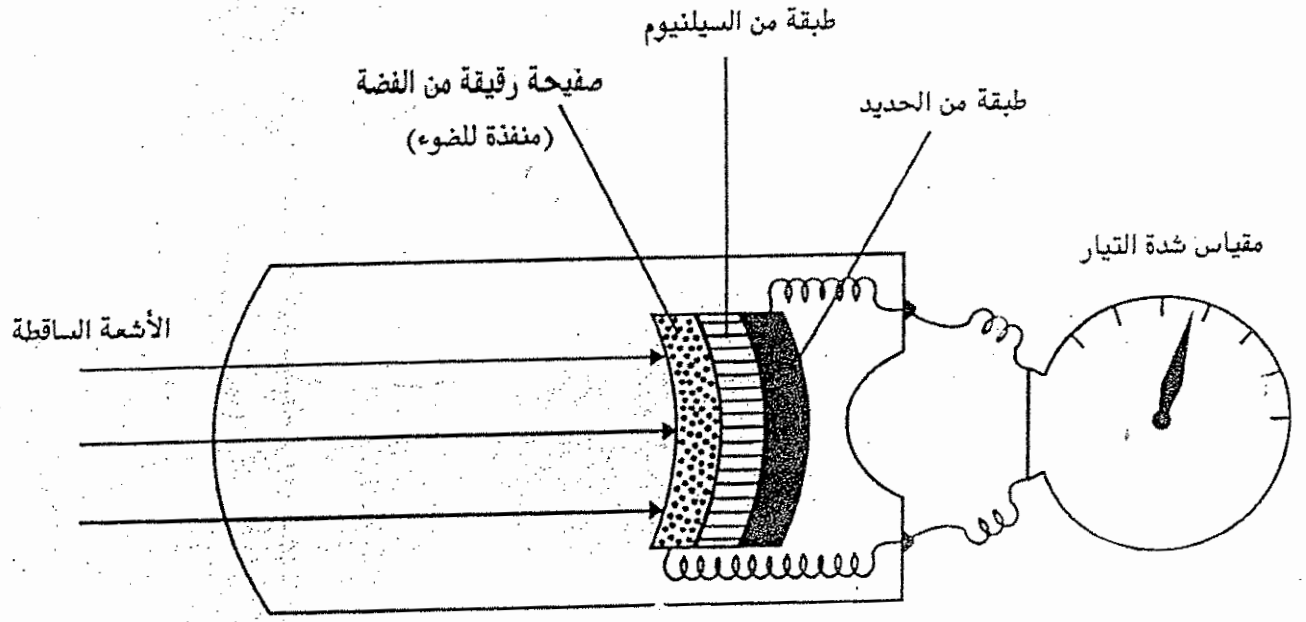
وتتكون هذه الخلية من ثلاث طبقات (حواجز)، الطبقة الأولى هي التي تستقبل الضوء، وتتكون من صفيحة رقيقة من مادة الفضة شبه المنفذة، خلفها الطبقة الثانية المكونة من السيلينيوم Selenium أو الكادميوم Cadmium، وهي مواد حساسة للضوء، يدعم هاتين الطبقتين ويحملهما طبقة ثالثة من مادة الحديد أو أي معدن آخر.

وآلية عمل هذه الخلية تتلخص بأن الضوء إذا وقع على سطح الصفيحة الفضية، نفذ إلى سطح طبقة السيلينيوم، ونتيجة لذلك تنبعث من سطح السيلينيوم إلكترونات تتناسب طرداً مع شدة الضوء، تتجمع هذه الإلكترونات على سطح صفيحة الفضة، ويجعلها سالبة الكهربائية، وتصبح طبقة الحديد هي القطب الموجب، فإذا وصلت طبقة الحديد (القطب الموجب)، وصفيحة الفضة (القطب السالب)، بمقياس كهربائي مناسب، كان بالإمكان قياس شدة الضوء، والذي يتناسب مع شدة التيار الكهربائي.

ومن مساوئ هذا النوع من الخلايا الضوئية :

I – حساسية الخلية ضعيفة، فالتغيرات البسيطة في شدة الضوء الساقط، أو المستويات المنخفضة من الضوء لا تتحسس لها.

II – هذا النوع من الخلايا يتأثر إلى حد كبير بتغيرات الحرارة المحيطة.



الخلية الضوئية ذات الحواجز الطبقية : وتتكون من ثلاث طبقات، الأولى صفيحة رقيقة منفذة للضوء من الفضة، خلفها طبقة من السيلنيوم أو الكادميوم، وهي مواد حساسة للضوء، والطبقة الثالثة من الحديد (انظر الشرح في النص).

ب ـ الأنبوب الضوئي البسيط Simple phototube

هذا النوع من الخلايا الضوئية، أكثر حساسية من النوع السابق، وإشارته الكهربائية يمكن لها أن تتضخم بسهولة. ومبدأ عمل هذه الخلية هو أن الضوء الساقط على صفيحة معدنية مغطاة بمادة حساسة للضوء مثل السيلينيوم، تعمل كمهبط Cathode، وتنبعث الإلكترونات، متجهة نحو صفيحة معدنية أخرى تعمل كمصعد Anode، فائدة هذا المصعد أنه يسرع من انتقال الإلكترونات من المهبط، وبزيادة الفولط عند المصعد، يمكن التحكم في عملية التسريع هذه، وبالتالي فإن انتقال الإلكترونات من المهبط إلى المصعد يسبب تياراً كهربائياً، شدته تتناسب مع شدة الضوء الساقط على المهبط. ويمكن قياسه بمقياس كهربائي مناسب (الشكل 11).

ج ـ الأنبوب المتعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier tube

تعتبر هذه الخلية الضوئية أكثر الأنواع حساسية، كما أنها تستشعر أي تغيير سريع في شدة الضوء مهما كان صغيراً. وتشبه هذه الخلية النوع السابق في مبدئها تماما، ولكن تختلف بوجود مجموعة من الصواعد المتوالية، يطلق عليها الدايْنودات Dynodes، كل واحد منها متصل بفولط أقل من الذي يتبعه، حتى نصل إلى الدايْنود الأخير، وهو أعلى الجميع فولطاً (الشكل 12).

ومبدأ عمل هذه الخلية أن الضوء الساقط على المهبط Cathode، المغطى بطبقة من السيلينيوم، تنبعث منه كمية من الإلكترونات، تصطدم بالدايْنود الأول، فيثير خروج مجموعة ثانية من الإلكترونات مع المجموعة الأولى، وبالتالي يتضخم عدد الإلكترونات، تنجذب هذه إلى الدايْنود الثاني، وتتكرر هذه العملية، وفي كل مرة تزداد الإلكترونات عدة أضعاف، بمعنى آخر تزداد الإشارة بالتوالي من دايْنود إلى آخر. ومن أجل ذلك يجب دائماً حماية هذه الخلايا من التعرض المباشر للضوء إلا أثناء القياس فقط، وذلك لشدة حساسيتها، ومن المفيد أن يذكر أن جميع الأجهزة المتطورة وذات الحساسية العالية، تستعمل هذا النوع من الخلايا الضوئية.

5 ـ القارئة أو المسجلة Recorders, meters

تؤخذ الإشارة الكهربائية الصادرة عن الخلية الضوئية، وتحول إلى قراءة عن طريق أداة تختلف في الشكل والأسلوب، ويطلق عليها "أدوات القراءة Readout devices". وبالنسبة للتحاليل الطبية أو الحيوية، تكون وحدات القراءة في معظم أجهزة قياس الضوء الطيفي هي :

I – النسبة المئوية للنفوذية Transmission %.

الشكل (11) : أنبوب الضوء البسيط

أنبوب الضوء البسيط : يسقط الضوء على صفيحة معدنية مغطاة بمادة حساسة للضوء مثل السيلنيوم والتي تعمل كمهبط Cathode، عند سقوط الضوء على هذه الطبقة تنبعث الإلكترونات منها متجهة نحو صفيحة معدنية تعمل كمصعد Anode، فرق الجهد يعتمد على شدة الضوء الساقط على المهبط.

الشكل (12) : الأنبوب المتعدد التضخيم الضوئي

الأنبوب المتعدد التضخيم الضوئي يشبه تماماً أنبوب الضوء البسيط في مبدئه، ولكن يختلف عنه بوجود مجموعة من الصواعد المتتالية يطلق عليها دايونودات، وتعمل على تضخيم الإشارة الضوئية بشكل متدرج.

II – شدة الامتصاص Absorption.

III – شدة التركيز Concentration.

أما الأسلوب الذي تُشاهد أو تُدون به هذه الوحدات فهي كما يوضحها (الشكل 13):

I – مؤشر يتحرك على تدريج يمثل هذه الوحدات (وغالباً الأول والثاني فقط).

II – قراءة مباشرة بواسطة ديود مشع للضوء Light Emitting Diodes (LEDs) وتظهر القراءة على لوحة على واجهة الجهاز. ومعظم الأجهزة تعمل الآن على هذا المبدأ، وبوساطة مفتاح يمكن التحول من قراءة النسبة المئوية للنفوذية، أو شدة الامتصاص أو قراءة شدة التركيز مباشرة.

III – التدوين بوساطة مسجلة، ترسم خطوطاً بيانية، أو تدون التركيز مباشرة.

وصف لبعض أنواع الأجهزة المختلفة لقياس الضوء الطيفي

1- مقياس الضوء الطيفي البسيط Simple spectrophotometer.

2- مقياس الضوء الطيفي ذو الشعاع المزدوج Double beam spectrophotometer

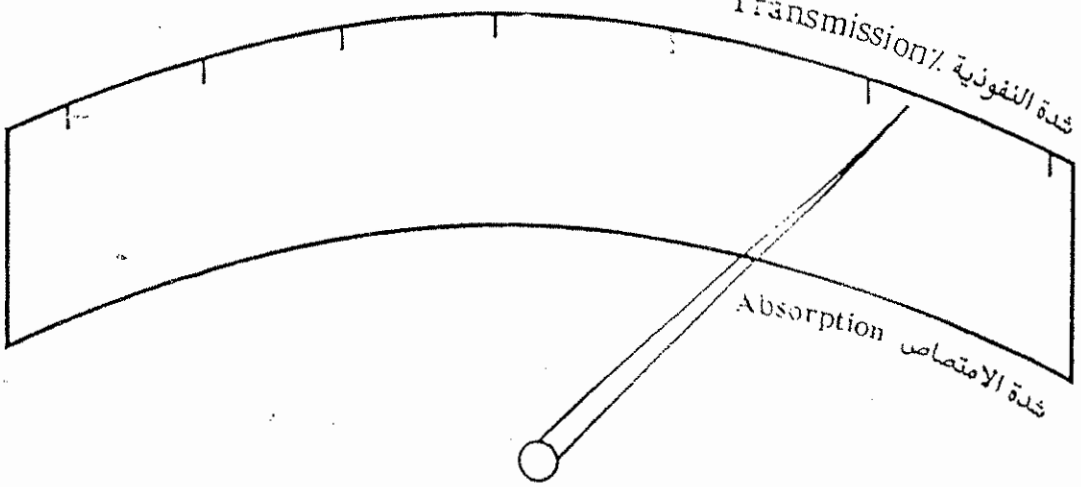
3- أجهزة القياس الضوئي المخصصة للقياسات الحركية Kinetic analysis spectrophotometers.

1 - جهاز قياس الضوء الطيفي البسيط

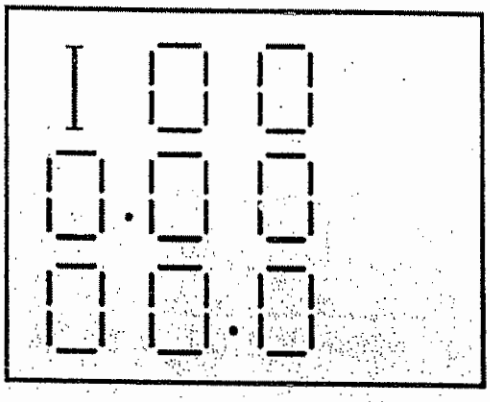
كما هو مبين في (الشكل 14)، يحتوي الجهاز على مصباح تنغستين، وحين تشغيل الجهاز يضاء المصباح، يوجه الضوء بواسطة عدسة أو مرآة على حاجز به فتحة طولية خاصة يمكن التحكم في اتساعها؛ حتى نختار منها حزمة ضوئية مناسبة تمر في مستفرد الضوء الأحادي Monochromator، مثل منشور زجاجي، ومن الطيف الخارج من المنشور يختار اللون (أو طول الموجة)، بإدارة المنشور، حتى يقع هذا الطيف أحادي اللون على حاجز آخر به فتحة طولية، يخرج منها هذا الطيف ذو الموجة المحددة ـــ ويمر في الكيفيت الذي يحتوي المحلول المراد قياس المادة المجهولة فيه، يمتص جزء من الضوء حسب نوع وتركيز المادة في المحلول، ويمرّ الجزء الباقي من الكيفيت ليسقط على مكشاف الضوء Photodetector، هذا الجزء من الجهاز يحول شدة الضوء إلى تيار كهربائي، يمكن قياسه بوساطة قارئة، وقد يحتاج الأمر إلى مضخم تيار كهربائي Amplifier، قبل مرور هذه الإشارة الكهربائية الضعيفة إلى القارئة.

الشكل (13) : طريقة إظهار النتائج على القارئة أو المسجلة

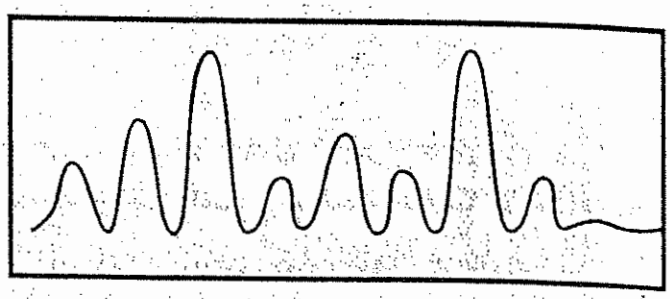
أ ـ قارئة ذات مؤشر يتحرك على تدريج خاص



ب ـ قارئة تستعمل الديود المشع
(LEDs) Light Emitting Diodes

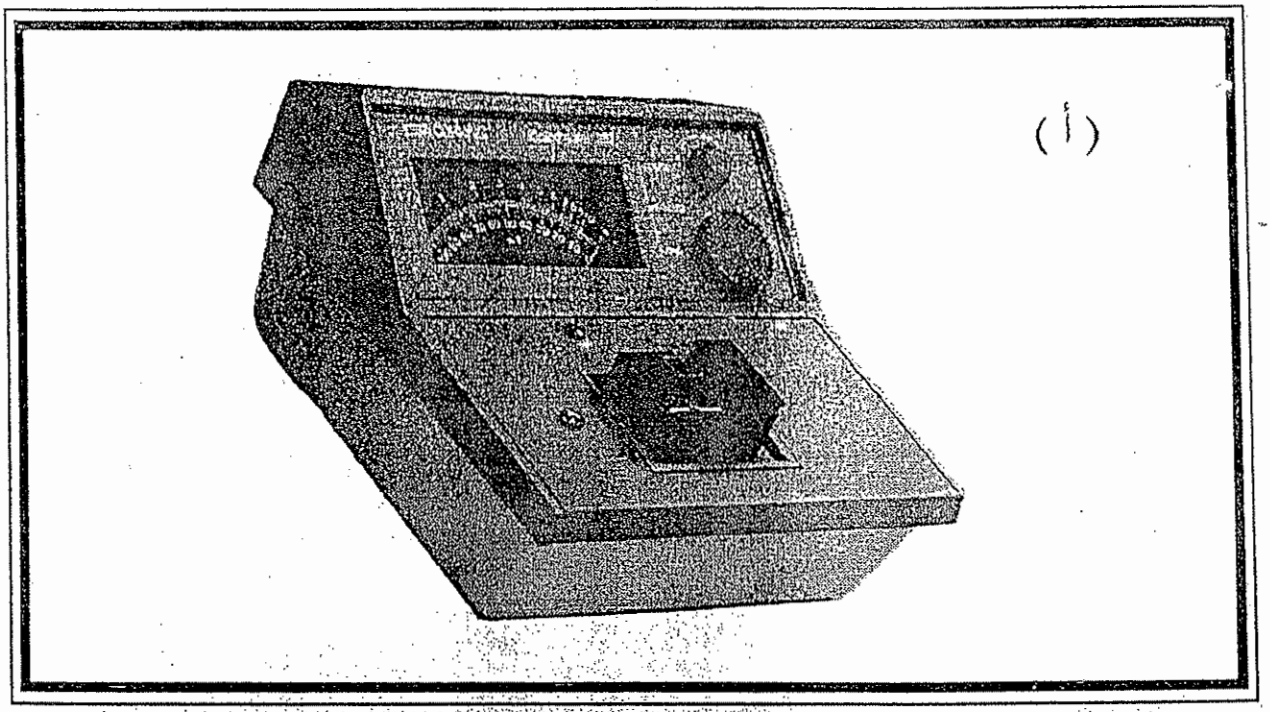


ج ـ مسجلة ترسم أشكالاً بيانية

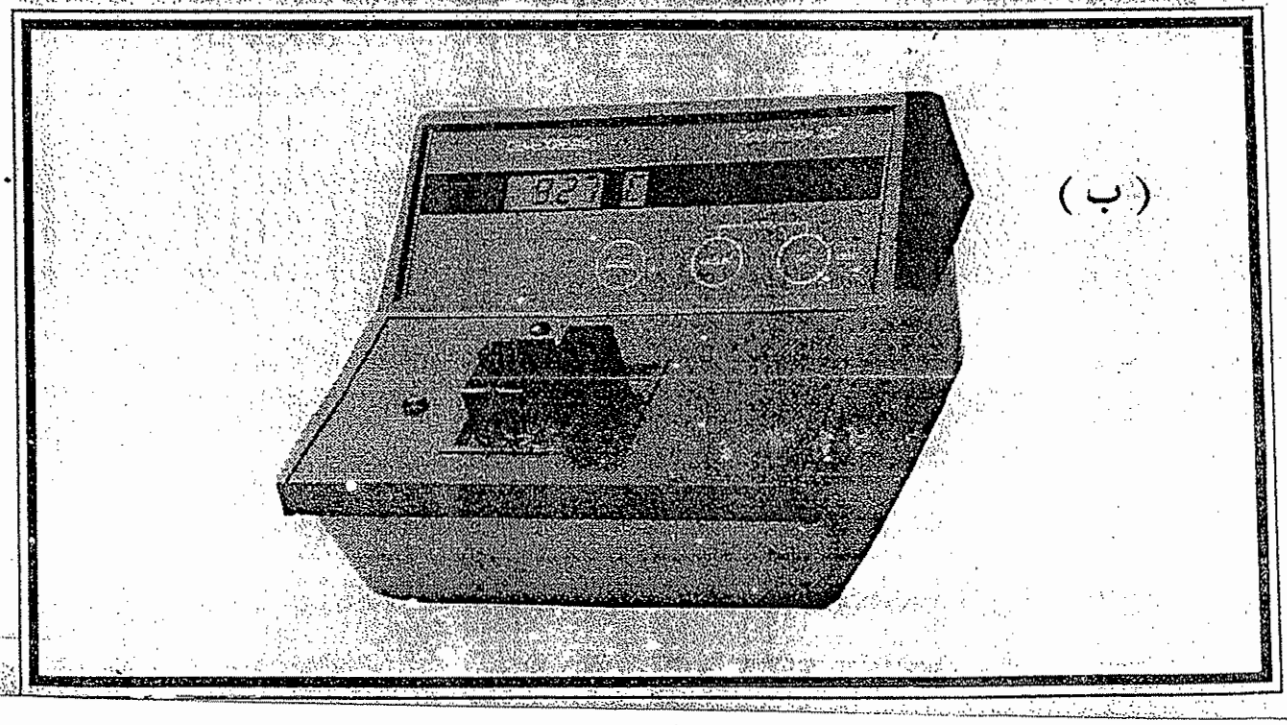


أنواع مختلفة من القارئات : أ ـ قارئة ذات مؤشر يتحرك على تدريج خاص
ب ـ قارئة تستعمل الديود المشع (LEDs).
ج ـ مسجلة ترسم أشكالاً بيانية.

الشكل (14-أ) : مقياس ضوء طيفي يستعمل المؤشر



الشكل (14-ب) : مقياس ضوء طيفي رقمي



وقد صممت أجهزة كثيرة جداً الآن،تقوم بكل هذه العملية آلياً، أي تقوم هي ببدء حساب الامتصاص في الدقيقة صفر، ثم تسجل امتصاص الضوء عن طريق معالج ميكروي microprocessor مبرمج بالمعلومات الخاصة عن كل فترة زمنية محددة (مثلاً 25 ثانية)، ثم يحسب التغير في الامتصاص الضوئي في الدقيقة، وأخيراً يقوم بحساب الفعالية بعد تزويد البرنامج بمعامل التغير، ولقد سهلت هذه الأجهزة كثيراً العمل المخبري، وأهم من ذلك أتاحت الفرصة لقياس عينات كثيرة، وفي وقت قصير.

الشكل (15) : مقارنة بين جهاز قياس الضوء البسيط مع الجهاز ذي الشعاع المزدوج

ولكن الجهاز ذي الشعاع المزدوج، ينقسم الضوء المستقرد إلى قسمين، أحدهما يمر في كيفيت الكفن Blank والآخر في محلول العينة، وبوساطة الكترونية تطرح قراءة امتصاص الكفن من قراءة امتصاص العينة، وبهذه الطريقة لا يحتاج الأمر إلى تصفير الجهاز عند قياس كل عينة.

تتميز المركبات التي لها خاصية التألق بأنها حلقية Cyclic، وتحتوي على روابط مضاعفة Double bonds، وبالتالي فالمواد التي تستعمل فيها هذا المبدأ من القياس لا بد أن تتوفر فيها هذه الشروط، أو تجري عليها بعض الخطوات الكيميائية التي تجعلها ترتبط بمثل هذه المركبات.

المكونات الأساسية لمقياس التألق

يختلف مقياس التألق Fluorometer عن أجهزة القياس الطيفي في بعض التفاصيل، ولكن معظم المكونات الرئيسية واحدة وهي كما في (الشكل 16):

أ - مصدر ضوئي.

ب - مستفرد لون أولي Primary monochromator.

جـ - مستفرد لون ثانوي.

د - كيفيت Cuvette.

هـ - مكشاف ضوء Light detector.

و - أداة قراءة Readout device.

ولكن هناك بعض الاختلافات التفصيلية التي تميز كل هذه الأجزاء عن أجهزة القياسات الطيفية، نمر عليها باختصار شديد حتى نتعرف على أهمها :

أ - المصدر الضوئي عبارة عن مصباح ذي طاقة ضوئية أعلى بكثير من أجهزة الضوء الطيفي، ويستعمل هنا "قوس كهربائي من الزئبق Murcury-arc" أو "قوس كهربائي من الزينون Xenón-arc"، وذلك للحصول على ضوء له طول موجة منخفض (في المجال فوق البنفسجي).

ب - يستعمل في مقياس التألق، مستفرد لون Monochromator من نوع لوح الانكسار المحزز، حتى يمكن الحصول على طول موجة ضيقة جداً، كما أن هذه الأجهزة تحتوي على

جـ - مستفرد لون أولي، وآخر ثانوي. يستعمل مستفرد اللون الأولي لاختيار طول موجة الشعاع الساقط — "شعاع الاستثارة Excitation beam"، وأما مستفرد اللون الثانوي فلاصطفاء طول موجة محددة وضيقة جداً، والخاصة بالشعاع التألقي للمادة المقاسة، ويكون

د - طول الموجة في مستفرد اللون الأولي أقصر من طول الموجة في مستفرد اللون الثانوي.

الفصل الثالث
قياس التألق
FLUOROMETERS

مبدأ التألق

حينما يسقط ضوء أحادي اللون على محلول يحتوي جزيئات مادة ما، فإن جزءاً من طاقة هذا الضوء تمتصها هذه الجزيئات، ومصير هذه الطاقة الممتصة تختلف باختلاف المادة والظروف المحيطة بها :

أ - تتحول هذه الطاقة إلى حرارة، ويكون الضوء النافذ من المحلول، هو نفس الضوء الساقط عليه، ولكن بكمية أقل حسب كمية الضوء الممتص، والتي تعتمد على تركيز جزيئات المادة في المحلول. كان هذا هو مبدأ جميع أجهزة قياس الضوء الطيفي Spectrophotometers، والتي شرحت في الفصل السابق.

ب - في حالة جزيئات بعض المواد الأخرى، فإن الطاقة التي تمتصها تلك الجزيئات بسقوط الضوء عليها، تخرجها مرة أخرى، ولكن ليس في شكل حرارة، بل على صورة طاقة ضوئية جديدة يطلق عليها التألق.

وحيث أن الطاقة المنبعثة تكون على مستوى أقل من الطاقة الممتصة، فإنها حسب القوانين الفيزيائية تكون بطول موجة أكبر (كلما قلت طاقة الضوء ارتفع طول الموجة) كما أن هذه الطاقة المنبعثة والتي يطلق عليها التألق، لها طول موجة خاصة بكل مادة ومميزة لها.

إن انطلاق هذا الضوء التألقي وشدته يتناسب طرداً مع تركيز الجزيئات في المحلول، وحساسية القياس بهذه الطريقة أعلى بكثير من طرق قياس الضوء الطيفي spectrophotometry، والتي قد تصل إلى ألف مرة.

جـ - الكيفيت في مقياس التألق غالباً ما يكون مصنوعا من الكوارتز، ولكن بشكل عام يمكن استعمال كيفيت الزجاج إذا كان طول الموجة الأولي أطول من 360نم.

د - مكشاف الضوء يمكن أن يكون الخلية الضوئية البسيطة Simple photocell، أو الأنبوب المتعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier tube، تماماً مثل أجهزة القياس الطيفي، ولكن ما يميز مقياس التألق، هو أن الخلية الضوئية لا توضع في خط مستقيم مع مسار الشعاع الضوئي الساقط على الكيفيت، ولكن توضع على زاوية قائمة معه (الشكل 16)، هذه الوضعية تتيح فرصة للخلية الضوئية أن تستقبل الشعاع التألقي، دون تداخل من الشعاع الأصلي الذي نفذ في خط مستقيم.

هـ - أما عن القارئة، فلا يوجد خلاف، بينها وبين أجهزة القياس الطيفي، فهي إما مقياس لوحي بمؤشر، أو لوحات الديود المشع الرقمية،... الخ.

الاختبارات التي تستعمل فيها القياسات التألقية

مرت فترة كانت القياسات التي تعتمد على القياسات التألقية مقتصرة فقط على المركبات التي تتواجد بكميات ضئيلة جداً في العينات، أو إذا كانت حساسية القياس بالطرق الأخرى ضعيفة أو غير نوعية non specific.

ولكن حديثاً، وُسمت كثير من المواد بمركبات تألقية، واستعملت القياسات المناعية التألقية Immuno-Fluorescence في كثير من الاختبارات، وصممت كثير من الأجهزة الآلية التي أصبحت كثيرة، وسهلت من قياس عديد من المركبات البيولوجية والكيميائية، وستذكر لمحة عن بعض هذه الأجهزة لاحقاً.

هناك مئات من المواد التي استعمل في قياسها مبدأ التألق، يذكر هنا بعضها :

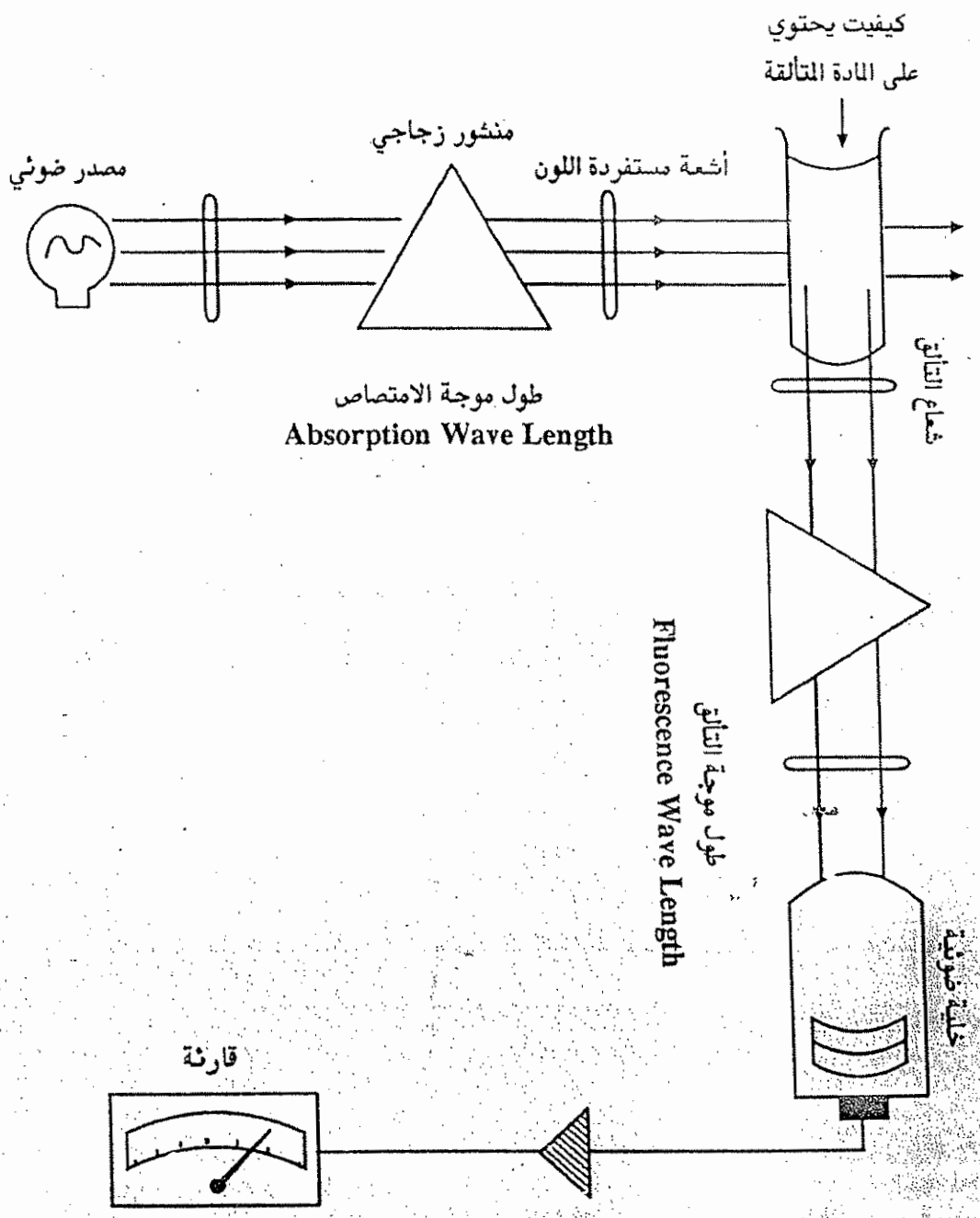
I - قياس مستوى كثير من الأدوية في المصل أو البول.

II - قياس الكاتيكولامينات Catecholamines ومستقلباتها.

III - قياس كثير من المركبات الستيرويدية Steroids.

IV - قياس كثير من أنواع البورفيرينات Porphyrins... الخ.

الشكل (16) : تخطيط لمكونات جهاز قياس التألق



بسقوط الضوء على بعض المواد، تنبعث طاقة ضوئية يطلق عليها التألق Fluorescence ، ويكون لها طول موجة خاصة بكل مادة، وتكون طول موجة التألق أكبر من طول الموجة الممتصة

المحاذير والأخطاء التي قد تنجم عن القياسات التألقية

لقد سبق وذُكر أن أهم ما يميز القياسات التألقية، هي الحساسية الشديدة، وتفردها بالقياسات الشديدة النوعية، ولكن قد تمثل هذه الميزات في نفس الوقت بعض مساوئ القياس التألقي، فشدة الحساسية تجعل ظروف القياس تتأثر بعوامل كثيرة نذكر منها :

I – **درجة الحرارة** :-فقد وجد أن ارتفاع درجة حرارة وسط القياس تقلل من شدة تألق المادة الموجودة بالمحلول.

II – **باهاء المحلول** (PH) : فأي تغيير في باهاء وسط القياس قد يؤثر على درجة تأين المواد، ومن ثم تتأثر شدة التألق.

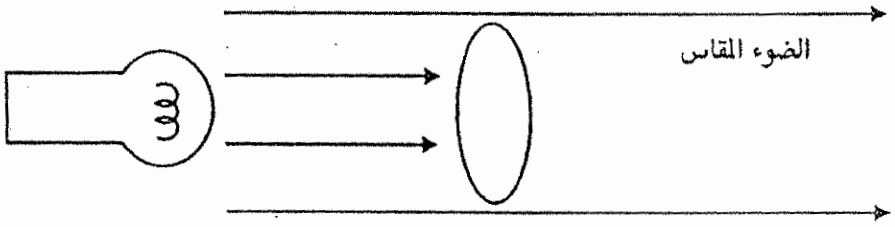
III – **تركيز المحلول** المراد قياسه، فقد وجد أن شدة التألق تتناسب بشكل منتظم (أي يتبع قانون لامبرت بير)، في المحاليل المخففة جداً. وعلى ذلك فالمحاليل المركزة قد تعطي قراءات خاطئة جداً.

IV – **كبح أو قمع التألق Quenching of fluorescence** : قد توجد في وسط القياس بعض المركبات الدخيلة بجانب المادة الأصلية المراد قياسها، هذه المركبات من شأنها أن تمتص جزءاً من ضوء الاستثارة Excitation أو جزء من ضوء التألق، هذه المواد قد تكون بعض المذيبات العضوية مثل البنزين Benzene،والأسيتون، وقد تكون بعض المواد المستعملة في غسل وتنظيف الكيفيت، أو الأوعية الزجاجية المستعملة في التجربة مثل محلول الدايكرومات dichromates.

V – **تضخيم إشارة التألق Potentiation**، فكما أن القمع يقلل من شدة التألق فهناك ظروف أخرى كثيرة تزيد أو تضخم من شدة التألق، أهمها وجود فقاعات غازية، أو وجود شوائب أخرى من المحاليل المستعملة، يكون لها خاصيةالتألق.

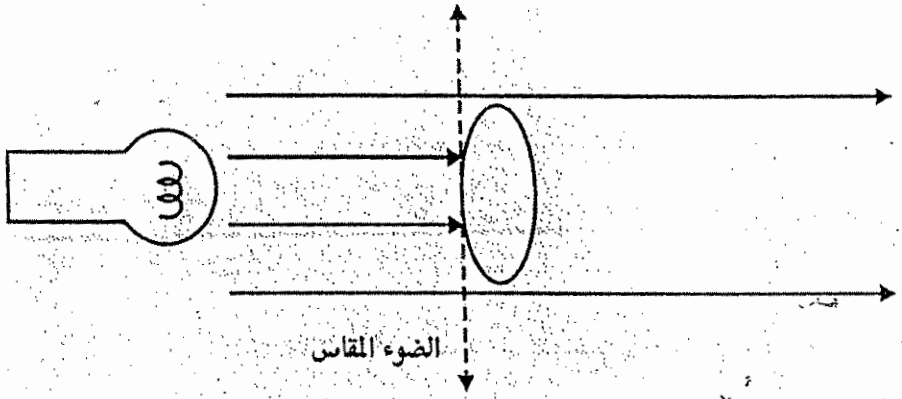
هذه الظروف وغيرها، تلعب دوراً مهمّاً في مدى دقة القياسات التألقية، ومن أجل ذلك فقد روعي في هذه الطرائق شدة النظافة في كل خطوات العمل، واستعمال محاليل ومواد شديدة النقاء، مع ضرورة استعمال كفيء blank لكل الخطوات المستعملة.

الشكل (17) : مبدأ قياس العكر والكدر



مبدأ القياس بأجهزة العكر

حزيئات بعض المواد لا تمتص الضوء الساقط عليها بل تمنع مرور الضوء لكبر الجزيئات (أو العكر)، وكمية الضوء النافذ يعتمد على تركيز المادة من المحلول (شدة العكر).



مبدأ القياس بأجهزة الكدر

الضوء الساقط ينعكس على سطح الجزيئات، وكمية الضوء المنعكس تتناسب مع تركيز المادة في المحلول. (كمية السطوح العاكسة).

الفصل الرابع

مقياس العكر Turbidemeter

ومقياس الكدر Nephelometer

مقياس العكر

إن مبدأ القياس المعتمد على شدة العكر تتمثل في أن بعض المواد توجد في المحاليل في صورة جزيئات كبيرة، وبالتالي لا تذوب تماماً وتكوّن عكراً في هذه المحاليل، وإن شدة هذا العكر تتناسب طرداً مع تركيز هذه المواد.

ويمكن قياس شدة العكر بوساطة أجهزة الطيف العادية، ولكن مبدأ القياس يختلف في حالة قياس العكر، حيث أن جزيئات المادة المقاسة، لا تمتص الضوء الساقط عليها كما في أجهزة قياس الضوء الطيفي ولكنها تمنع جزءاً من هذا الضوء من المرور، والجزء الباقي ينفذ من بين جزيئات المادة. وقد تطورت بشكل واضح هذه التقنية واستخدمت بشكل واسع في أجهزة آلية صممت للقياس على مبدأ العكر.

مقياس الكدر

تتم قياسات الكدر على نفس المحاليل العكرة أي ذات الجزيئات الكبيرة نسبياً كما في الحالة السابقة تماماً، ولكن المبدأ مختلف تماماً، فحينما نسقط حزمة ضوئية على الجزيئات في المحلول العكر، يحدث التالي :

I – تمنع هذه الجزيئات كمية من الضوء من المرور.

II – جزء من الضوء الساقط على هذه الجزيئات ينعكس على سطحها، وينعكس في اتجاهات مختلفة (الشكل 17).

في الحالة الأولى، فإن قياس الأشعة التي سمحت لها الجزيئات بالمرور يطلق عليها قياس شدة العكر Turbidimetry، أما في الحالة الثانية فتقاس الأشعة المنعكسة على سطح الجزيئات، ويطلق على العملية قياس شدة الكدر Nephelometry. وجدير بالذكر أن الجهاز المستعمل في قياس الكدر هو جهاز قياس طيفي عادي، إلا أن الخلية الضوئية توضع على زاوية قائمة مع اتجاه مسار الضوء الساقط على الكيفيت وذلك مشابه لأجهزة قياس التألق، بل من الممكن استعمال جهاز قياس التألق، وفي هذه الحالة تكون طول موجة شعاع الاستثارة مساوٍ لطول موجة الشعاع الخارج من المحلول والساقط على الخلية الضوئية.

ولقد وجد أن قياس شدة الكدر تعطي دقة تكرارية Precision أكثر من شدة العكر، ولكن بشكل عام، فكلتا الطريقتين أقل استعمالاً من الطرق القياسية الضوئية الأخرى، ومن أمثلة القياسات التي تعتمد على هذه الطرائق، قياس كمية البروتين في السائل النخاعي CSF، واختبارات التحوصب Flocculation tests، واختبارات العكر Turbidity tests ...الخ.

بعض مساوئ قياسات الكدر والعكر

توجد بعض المساوىء لهذه القياسات منها عدم وجود درجة عالية من الدقة، كما أن دقة التكرارية Precision ليست جيدة. ومن المحاذير التي يجب الاحتياط لها في هذه القياسات :

I – يجب استعمال طول موجة طويل (بين 620 ــ 660 نم)، لأنه قد يحدث امتصاص للضوء عند الموجات القصيرة بسبب وجود كثير من المركبات في محلول التفاعل تمتص الضوء عند الموجات القصيرة.

II – يجب تثبيت المدة بين إجراء التفاعل ووقت القياس، لكل العينات، حيث أن التغير في الزمن قد يؤدي إلى تجمع أو ترسب للجزيئات العالقة في المحلول.

1 - المرذّة Nebulizer

عمل هذا الجزء من الجهاز هو تحويل المحلول المحتوي على المادة المراد قياسها إلى رذاذ يُضَخُّ في داخل اللهب، حيث يتحول إلى سحابة من الذرات الدقيقة في المحلول المحتوي على عناصر المعادن (مثلاً الصوديوم والبوتاسيوم). وكلما تمت هذه العملية بكفاءة، ازدادت دقة وثبات القراءات.

وعادة، قبل إمرار السائل المراد قياس عناصره في المرذة مثل المصل أو البول ـــ يتم تخفيفه بالماء، إما يدوياً أو آلياً، وتكون درجة التخفيف حسب النوع والتركيز الأولي للسائل المراد قياسه.

بعد تحول السائل في داخل اللهب إلى سحابة من المحلول، تكتسب ذرات العناصر به طاقة اللهب، يخرجها على هيئة طاقة ضوئية، ذلك أن طاقة اللهب أزاحت أحد الإلكترونات من مدار داخلي أقل طاقة إلى مدار خارجي أكثر طاقة، هذه الحالة غير مستقرة، وسرعان ما يعود الإلكترون إلى مداره الأصلي، باعثاً جزءاً من الطاقة التي كان قد اكتسبها من اللهب على هيئة ضوء له مجال طيفي خاص Specific spectrum بكل عنصر، أي أن له طول موجة خاص به، فمثلا الضوء الطيفي للصوديوم لونه أصفر وطول موجته 589 نم في حين الضوء الطيفي للبوتاسيوم لونه أحمر وطول موجته 766 نم... الخ.

2 - الملهب Burner

هذا الجزء من مقياس الضوء اللهبي، يتم بوساطته تنشيط الذرات المعدنية، وبالتالي إصدارها للطاقة الضوئية، وهو من الأجزاء الهامة جداً في الجهاز، وهناك عدة أنواع منه تختلف في شكلها، وشكل اللهب المنبعث منها حسب تصاميم الأجهزة المختلفة، ولكن أهم الشروط الواجب توفرها في أي نوع منها هو أن يكون اللهب منتظماً في شكله، وثابتاً في مقدار الحرارة المنبعثة منه.

وجميع الأجهزة تستخدم غازين للحصول على اللهب، أحدهما غاز الاحتراق، والثاني هو الغاز المؤكسد (الجدول 3)، يخلط هذان الغازان بنسبة ضغط معينة لكل منهما بوساطة صمامات خاصة، لتعطي اللهب المواصفات المطلوبة، ويختار لكل نوع من الأجهزة الغازات المناسبة لعمله، حسب تعليمات الشركة المصنعة. ولكن معظم الأجهزة تستعمل خليطاً من غاز البروبان والهواء propane & air، وهذا الخليط يعطي درجة حرارة في حدود 2000م، وهي كافية لقياس الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم.

الفصل الخامس
مقياس الضوء اللهبي
FLAME PHOTOMETER

مبدأ قياس الضوء اللهبي

لقد وجد أن كثيراً من ذرات العناصر المعدنية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم، إذا عرضت لكمية كافية من الطاقة، كاستخدام لهب مرتفع الحرارة، فإن هذه الذرات تستحوذ على هذه الطاقة، ثم تبعثها سريعاً مرة أخرى على هيئة طاقة ضوئية، وإن كل نوع من هذه الذرات يشع هذه الطاقة الضوئية عند طول موجة خاصة جداً ومميزة لهذا العنصر.

فمثلاً، إذا وجدت ذرات عنصر الصوديوم في لهب مرتفع الحرارة، فإن الطاقة التي تأخذها هذه الذرات تبعثها كطاقة ضوئية عند طول موجة مقداره 589 نم، ومن الجدير بالذكر أن شدة هذه الطاقة الضوئية ـــ والتي يمكن أن تقاس عند هذه الموجة ـــ تتناسب طرداً مع عدد ذرات الصوديوم، أي تركيز الصوديوم في أي محلول يحتويه، وعلى هذا المبدأ صممت جميع الأجهزة التي تقيس الضوء المنبعث من اللهب Flame emission photometry.

مكونات مقياس الضوء اللهبي

يتكون أي جهاز لقياس الضوء المنبعث من اللهب من الأجزاء الأساسية التالية :

1- المرذّة Nebulizer.

2- الملْهَب Burner.

3- مستفردات اللون Monochromators.

4- مكشاف الضوء Light detector.

5- قارئة Readout device.

وصف مبسط لبعض الأنواع المختلفة لأجهزة قياس الضوء اللهبي

1- الأجهزة البسيطة اليدوية.

2- الأجهزة التي تستخدم خط العياري الداخلي.

3- الأجهزة التي تقيس أكثر من عنصر واحد في نفس الوقت.

سيتم إعطاء لمحة مختصرة على الأنواع المختلفة لهذه الأجهزة في الصفحات التالية :

1 - الأجهزة اليدوية المبسطة (الشكل 18)

جميع أجهزة قياس الضوء المنبعث من اللهب تستعمل نفس المبدأ، وتحتوي على نفس الأجزاء الرئيسية ـــ كما سبق شرحه ـــ ولكنها تختلف في كثير من التفاصيل، ومدى التطور في الآلية الميكانيكية والإلكترونية، وبالتالي في ثمنها.

فعن الجهاز البسيط، تُجرى جميع خطوات العمل يدوياً، بدءاً من تخفيف العينة، تنظيم وتحديد نسب الغازات الداخلة إلى الملهب، تغيير المرشحات الخاصة بكل عنصر يراد قياسه، معايرة الجهاز على المحاليل العيارية المختلفة، وأخيراً تدوين القراءات يدوياً.

في حين تعمل الأجهزة المتطورة ـــ وغالية الثمن آلياً ودون أي تدخل يدوي، وكل شيء في هذه الأجهزة يعمل تحت سيطرة معالج ميكروي Microprocessors، ويتم العمل دون أي تدخل خارجي، غير وضع عينات المصل على موزع العينات، والضغط على مفتاح البدء، لتخرج جميع النتائج مدونة في الطرف الآخر.

2 - الأجهزة التي تستخدم خط العياري الداخلي

هذه الأجهزة تمثل تماماً أجهزة قياس الضوء الطيفي ذات الشعاع المزدوج Double beam spectrophotometers، ومبدأ العمل في هذه الأجهزة، أن العينة المراد قياس الصوديوم والبوتاسيوم بها، تُخفف بمحلول ثابت العيارية من الليثيوم ـــ وذلك لعدم وجود هذا العنصر بشكل طبيعي في المصل أو البول ـــ وبوساطة آلية خاصة يقسم الشعاع الخارج من اللهب إلى قسمين (الشكل 19)، أحدهما خاص بقياس الصوديوم، والآخر يذهب إلى خط قياس الليثيوم، وبوساطة معالج ميكرويMicroprocessor تحسب نسبة الصوديوم إلى الليثيوم، ومنها تستخرج النسبة الحقيقية للصوديوم.

الجدول (3) الغازات المستعملة في قياسَ الضوء اللهبي

غاز الاحتراق	الغاز المؤكسد	درجة الحرارة (منوية)
1- غاز استصباح المنزل	الهواء	1700
2- غاز استصباح المنزل	الأكسجين	2700
3- البروبان propane	الهواء	1925
4- البروبان	الأكسجين	2800
5- البيوتان butane	الهواء	1900
6- البيوتان	الأكسجين	2900
7- الأسيتيلين	أكسيد النيتروز	2955

3 - مستفرد اللون Monochromator

يمكن استعمال جميع أنواع مستفردات اللون الطيفي، ولكن معظم الأجهزة – (أكثر من 80%) – تستعمل المرشحات Filters، والقليل منها هو الذي يستعمل المنشور الزجاجي، أو كاسرات الضوء المحززة Diffraction gratings. والمرشحات المستعملة في أغلب الأجهزة ثلاث : الأولى للصوديوم (589 نم)، والثانية للبوتاسيوم (766 نم)، والثالثة من أجل الليثيوم (671 نم). وفي الماضي كانت هذه الأجهزة تستعمل لقياس الكلسيوم بمرشح طول موجته (544 نم) ولكن عُدِلَ عن قياس الكلسيوم على هذه الأجهزة حالياً لعدم دقة النتائج.

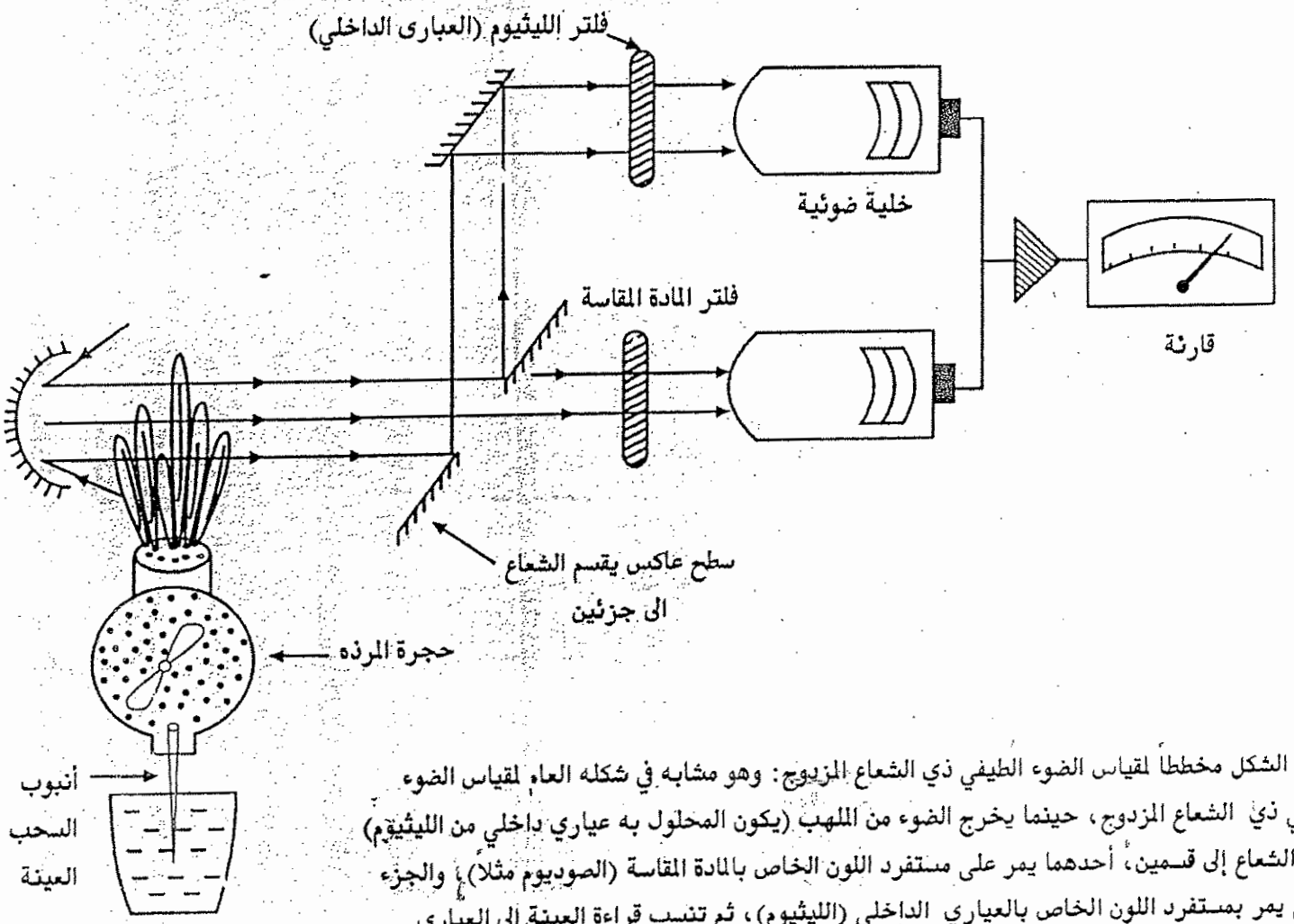
4 - مكشاف الضوء Light detector

تختلف الأجهزة – حسب الشركات المصنعة – في اختيار نوع مكشاف الضوء، فالأجهزة البسيطة تستعمل الخلية الضوئية ذات الحواجز الطبقية Barrier layer photocell، في حين أن الأجهزة الأكثر تطوراً، والأغلى ثمناً تستعمل الأنبوب الضوئي Phototube، أو الأنبوب متعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier tube.

5 - القارئة Readout divice

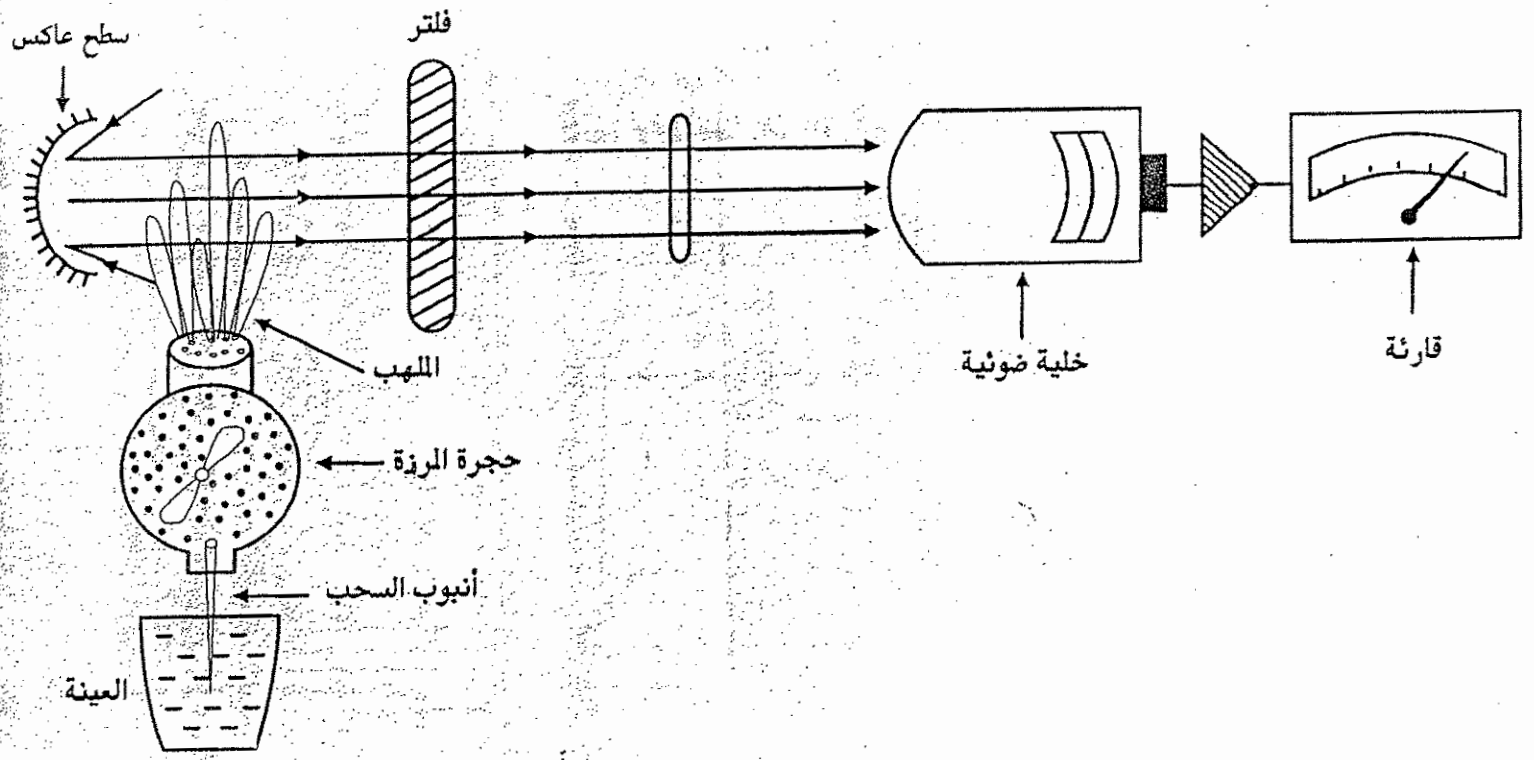
القارئة في هذه الأجهزة مثل جميع أجهزة قياس الضوء الطيفي، إما عن طريق تدريج يتحرك عليه مؤشر ليقرأ التركيز مباشرة، أو استعمال لوحة تظهر عليها القراءات بواسطة الديود للضوء (LED) أو طابعة تدون التراكيز مباشرة.

شكل (٦): مخطط لمقياس الضوء الطيفي ذي الشعاع المزدوج



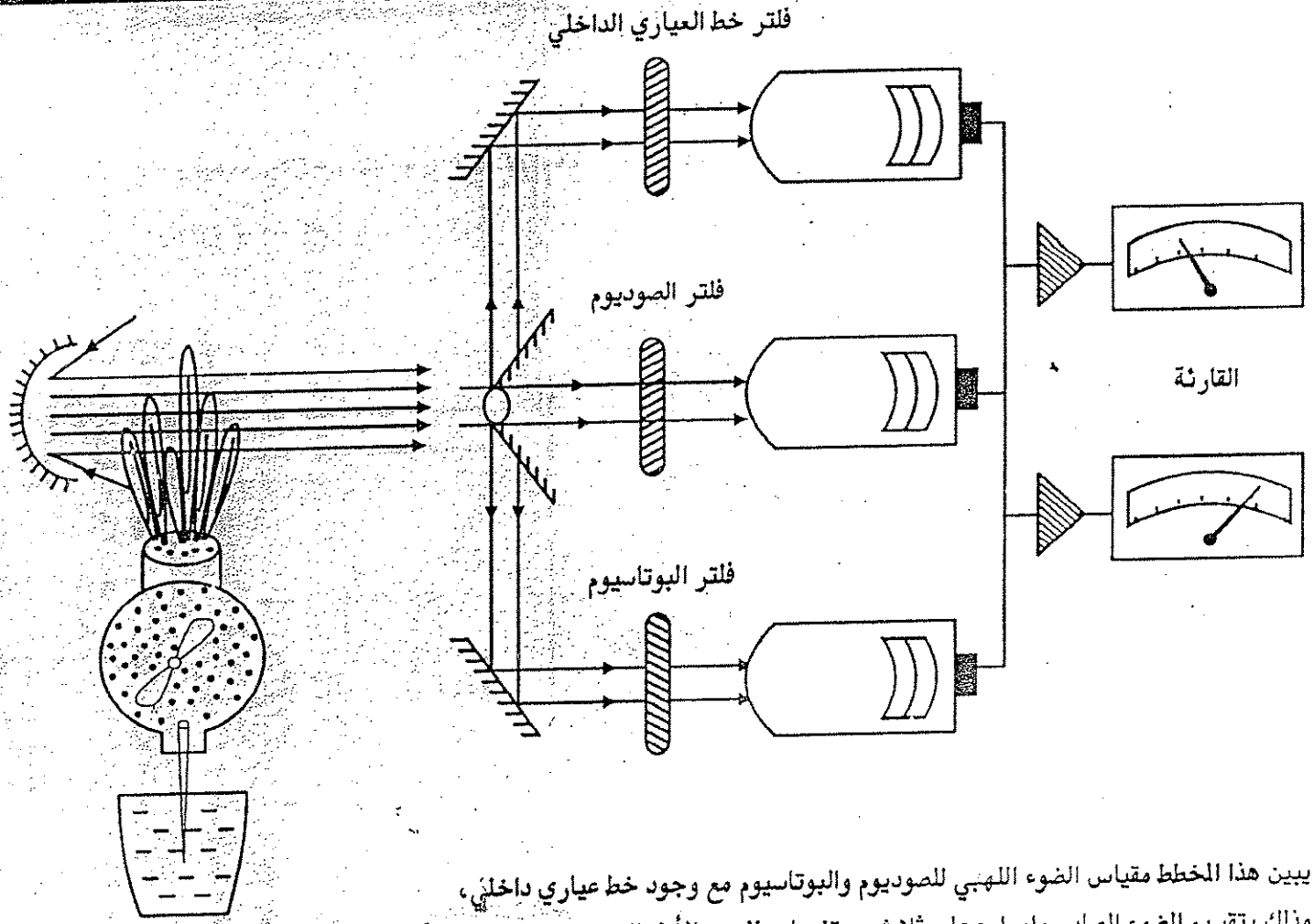
يوضح الشكل مخططاً لمقياس الضوء الطيفي ذي الشعاع المزدوج: وهو مشابه في شكله العام لمقياس الضوء الطيفي ذي الشعاع المزدوج، حينما يخرج الضوء من اللهب (يكون المحلول به عياري داخلي من الليثيوم) يقسم الشعاع إلى قسمين، أحدهما يمر على مستفرد اللون الخاص بالمادة المقاسة (الصوديوم مثلاً)، والجزء الثاني يمر بمستفرد اللون الخاص بالعياري الداخلي (الليثيوم)، ثم تنسب قراءة العينة إلى العياري.

الشكل (18) : مخطط جهاز مقياس الضوء اللهبي



تسحب العينة بعد تخفيفها، لتدخل في حجرة المرزة، حيث تختلط مع الغازات وتتحول الى رذاذ دقيق يمر في اللهب، يعكس الضوء الخارج من اللهب إلى مستفرد اللون الخاص بالمادة المراد قياسها، ثم تنقل الإشارة الضوئية إلى مكشاف الضوء، ومنه إلى القارئة.

الشكل (20): مخطط مقياس الضوء اللهبي للصوديوم والبوتاسيوم مع خط عياري داخلي



يبين هذا المخطط مقياس الضوء اللهبي للصوديوم والبوتاسيوم مع وجود خط عياري داخلي، وذلك بتقسيم الضوء الصادر وإمراره على ثلاث مستفردات للون، الأول الصوديوم (موجة 589°) والثاني للبوتاسيوم (مرجة 766°) والثالث لليثيوم (موجة 671°).

إن استعمال خط العياري الداخلي، يجنب، أو يقلل كثيرا من الأخطاء التي تحدث أثناء القياسات الضوئية اللهبية، وأهم هذه الأخطاء :

أ - التذبذبات التي تحدث في شدة اللهب.

ب - التغيرات التي تحدث في سحابة الرذاذ الخارجة من المرذة ـــ (شدة اندفاع) الرذاذ وحجم ذراته... الخ.

هذه التغيرات المؤثرة على شدة الضوء المنبعث من المادة المقاسة، هي نفسها التي تنبعث من العياري الداخلي - (الليثيوم) - وحيث أن القياس النهائي يعتمد على النسبة بين الصوديوم / الليثيوم، فمهما حدث من ذبذبات فإن النسبة تظل ثابتة بالنسبة لهذه الذبذبات، والفرق يكون بسبب التركيز الحقيقي للصوديوم.

3 - الأجهزة التي تقيس أكثر من عنصر واحد في نفس الوقت

معظم الأجهزة الحالية مصممة على أن تعطي نتيجة قياس الصوديوم والبوتاسيوم في نفس الوقت، مع استعمال خط العياري الداخلي (الشكل 20). والمبدأ بسيط، وهو أن الضوء المنبعث من اللهب يقسم بآلية خاصة إلى ثلاثة أجزاء، أحدهما خط الليثيوم - (العياري الداخلي) - والخط الثاني هو خط الصوديوم أما الخط الثالث فهو خط البوتاسيوم.

بعض المحاذير والاحتياطات في استعمال مقياس الضوء اللهبي

1- يتم تخفيف العينة يدوياً بالماء المقطر في الأجهزة التي لا تستخدم العياري الداخلي أو بمحلول الليثيوم في أجهزة العياري الداخلي.

2- كلما كان التخفيف كبيراً كان أفضل، حيث يقلل من تداخل الإشعاعات المنبعثة من المركبات الموجودة في المصل أثناء وجودها في اللهب وخاصة البروتينات.

3- استعمال المصول العيارية في ضبط الجهاز أفضل من استعمال المحاليل العيارية المحضرة من إذابة أملاح الصوديوم والبوتاسيوم بالماء.

4- غالباً ما تحدث نزعة انحرافية Drift في القراءة، مع مرور الوقت أثناء العمل على هذه الأجهزة، ويحدث الانحراف إما في ضبط الصفر على الماء المقطر، أو أثناء الضبط على المصول أو المحاليل العيارية.

من أجل ذلك يجب مراجعة ضبط الجهاز على الماء المقطر (الصفر)، والمصل العياري، وذلك دورياً كل خمسة أو عشرة عينات حسب الظروف، ومدى ثبات القراءات وعدم انحرافها.

1- المرذّة Nebulizer.

2- الملهب Burner.

3- أنابيب المهبط المفرغة Hollow cathode tubes.

4- مستفرد لون Monochromator.

5- مكشاف ضوء Light detector.

6- قارئة Readout device.

1 - المرذّة Nebulizer

تسحب العينة عن طريق أنبوب رفيع، لتدخل في حجيرة صغيرة حيث تختلط مع الغاز المؤكسد (أكسيد النيتروز مثلاً)، وكذلك غاز الاشتعال (الأسيتلين مثلاً)، ويتحول هذا الخليط إلى سحابة من الرذاذ الناعم جداً يدخل إلى الملهب، حيث يتم الاشتعال (الشكل 21،22).

2 - الملهب Burner

يتميز هذا الملهب عن غيره في أجهزة قياس الضوء اللهبي flame photometer، بأن الفتحة التي يخرج منها اللهب تكون طولية، إما (5) سم أو (10) سم، بحيث يخرج اللهب على شكل صفائحي Laminar. يتيح هذا التصميم الخاص فرصة للشعاع الضوئي الخارج من أنبوب المهبط المفرغ أن يمر عبر (10) سم من اللهب الذي يحتوي على ذرات العنصر، وبالتالي يتيح فرصة أكبر لامتصاص الشعاع الضوئي، ويزيد من حساسية الجهاز.

3 - أنبوب المهبط المفرغ Hollow cathode tube

تنفرد هذه الأجهزة بهذه الوسيلة كمصدر للشعاع الضوئي، ويتميز هذا الضوء بأن له طول موجة محدد جداً، وخاص للعنصر المراد قياسه، ويعني ذلك أن هذا الشعاع الضوئي لا يمتص إلا بالعنصر الخاص به تقريباً، ويتكون أنبوب المهبط المفرغ، من أنبوب زجاجي يحتوي على غاز خامل مثل الأرجون Argon أو النيون Neon، أو الهيليوم Helium تحت ضغط بسيط. في داخل الأنبوب يوجد مهبط cathode بشكل اسطواني، وهذا المهبط مصنوع من نفس العنصر المراد قياسه، وبالتالي فكل عنصر له أنبوب مهبط خاص به، كما يوجد في الأنبوب مصعد Anode (الشكل 23).

الفصل السادس
مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري
Atomic Absorption Spectrophotometer

نُذكّر أن وجود ذرات أي معدن داخل لهب ما يؤدي إلى تنشيط جزء من هذه الذرات، بحيث يتحرك إلكترون من أحد مداراته الداخلية إلى مدار خارجي، وحين عودته يبث الطاقة التي اكتسبها من اللهب على شكل ضوء ذي طول موجة خاص بكل عنصر، وقد ذُكر أن هذا هو المبدأ الذي صممت عليه مقاييس الضوء اللهبي المنبعثة Light emission photometer.

أما مبدأ قياس الطيف الامتصاصي الذري Atomic absorption spectroscopy فيتشابه تماماً مع مبدأ قياس الطيف الامتصاصي الضوئي Light absorption spectroscopy، فالذرات غير المنشطة In the ground state، والموجودة في اللهب، إذا مرت بها حزمة ضوئية، ذات موجة محددة جداً، وضيقة جداً، ومميزة للعنصر المراد قياسه، فإن ذرات هذا العنصر المنتشرة في اللهب، تمتص جزءاً من الحزمة الضوئية، وهذا الامتصاص يعتمد على كثافة أو تركيز الذرات في اللهب. بمعنى آخر، يوجد شرطان أساسيان يعتمد عليهما الامتصاص الذري الطيفي هما :

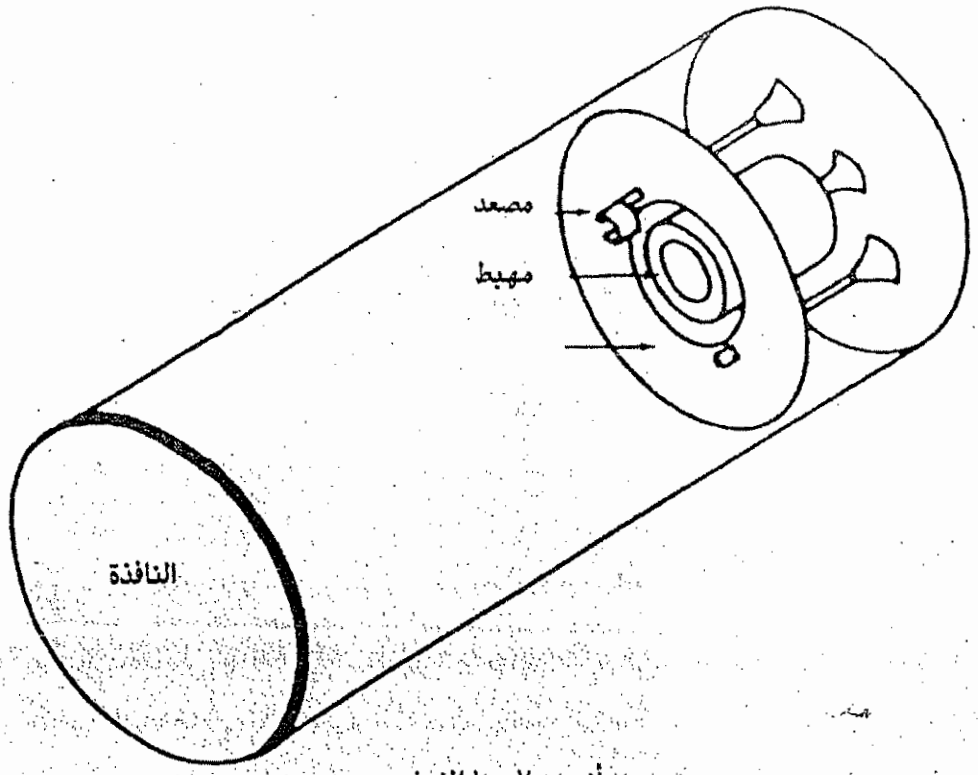
أ – تفكيك المادة المراد قياسها إلى سحابة من ذرات عناصرها، وهذا ما يحققه نوع اللهب المستعمل، وتصميم الملهب في هذه الأجهزة.

ب – الحصول على حزمة ضوئية ذات موجة ضيقة جداً جداً، وهذا ما توفره أداة خاصة في هذه الأجهزة، وتدعى أنابيب المهبط المفرغة Hollow cathode tubes.

مكونات مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري

أجهزة مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري تتشابه في الأجزاء الرئيسية، ولكنها ـــ كمعظم الأجهزة الأخرى ـــ تختلف في التفاصيل، وفي مدى التطور الذي أجري على كل جزء من هذه المكونات الرئيسية والتي تشمل :

الشكل (23) : مخطط لأنبوب المهبط المفرغ

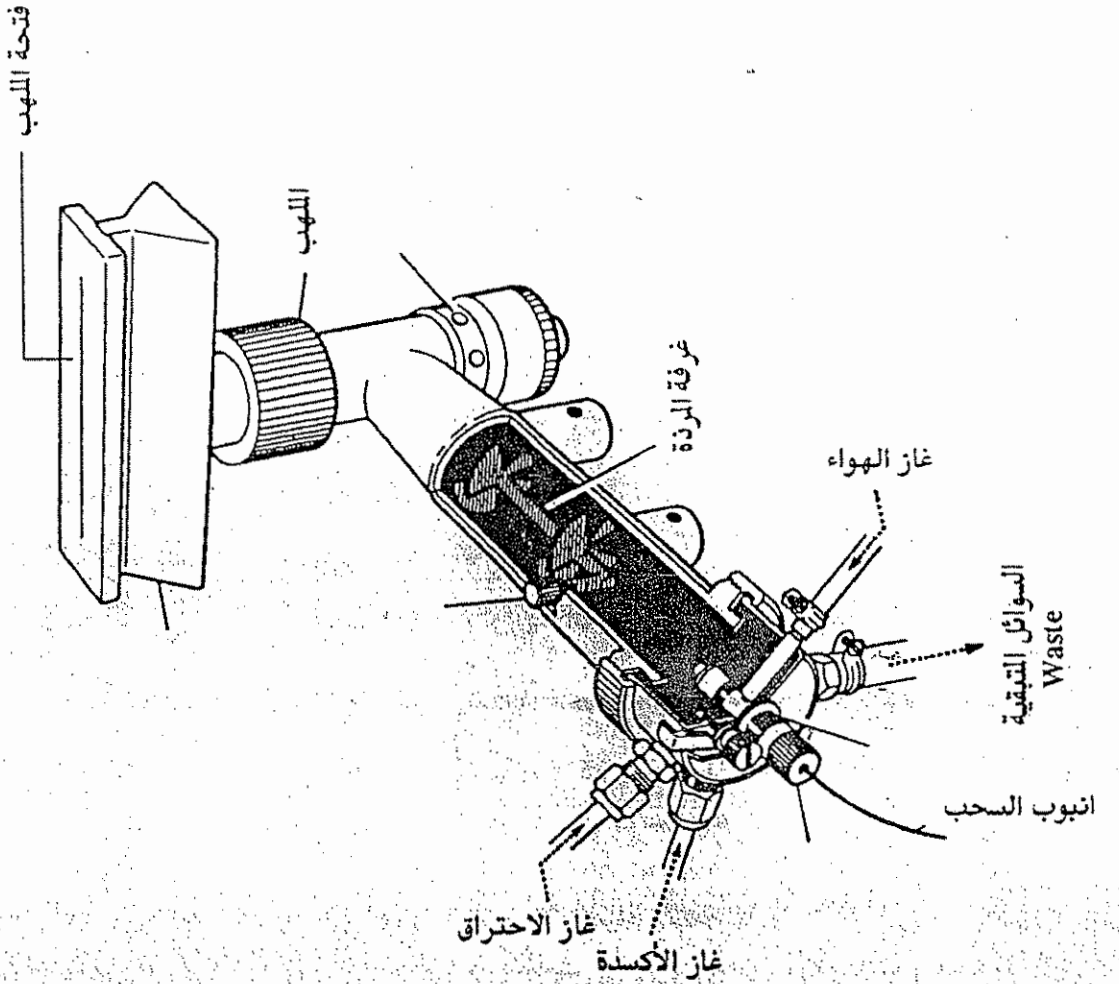


أنبوب المهبط المفرغ

أنبوب المهبط المفرغ : عبارة عن مصدر الشعاع الضوئي في أجهزة مقياس الضوء الطيفي الامتصـــاصي الذري، وهو أنبوب زجاجي يحتوي على غاز خامل (مثل الأرجون) وتحت ضغط منخفض، بداخله مهبط Cathode بشكل أسطواني، وهو مصنوع من نفس العنصر المراد قياسه (وبالتالي فهناك أنبوب مهبط خاص بكل عنصر)، كما يوجد بالأنبوب مصعد Anode. انظر آلية العمل في النص.

الشكل (21 - 22): المرذة واللهب لجهاز قياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري

22 ـ اللهب : يتميز بأن الفتحة التي يخرج منها اللهب تكون طولية (بطول 5 سم أو 10 سم)، اي تعطي لهبا يسمى صفائحي Laminar.



21 ـ المرذة : تسحب العينة عن طريق أنبوب رفيع إلى داخل المرذة، حيث تختلط مع الغاز المؤكسد (مثل أكسيد النتروز)، وغاز الاشتعال (مثل الاسيتيلين)، وتخرج على شكل رذاذ دقيق في اللهب.

بعض المحاذير والمشاكل التي تنجم من قياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري

رغم أن هذه الطريقة حساسة جداً، وساعدت كثيراً في فتح مجال من القياسات المخبرية كان صعباً جداً، غير أن هناك كثير من المحاذير والتداخلات التي قد تؤثر على دقة النتائج، ورغم أن بعض هذه العوامل ستذكر هنا ـــ كأمثلة فقط ـــ لبعض هذه المشاكل، إلا أن استعمال مثل هذه الأجهزة يستوجب الإلمام الكامل بقياس كل عنصر على حدة، حيث أن مشاكل قياس الكلسيوم مثلاً، ليست تماماً مثل مشاكل قياس النحاس، والوسائل التي تستخدم لتلافي هذه المشاكل بالنسبة للكلسيوم قد تختلف جذرياً عن تلك الخاصة بالنحاس، وفي أغلب الأحيان، توفر الشركة المصنعة، كل المعلومات الخاصة بهذا الشأن، والتي يجب فهمها واتباعها حرفياً، ونورد هنا نبذة عن بعض المحاذير والمشاكل التي قد تنجم عن استخدام قياسات الضوء الطيفي الامتصاصي الذري بشكل عام.

1- إن المبدأ الأساسي لقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري ، هو تحويل العنصر المراد قياسه إلى سحابة من الذرات في مسار الضوء المنبعث من أنبوب المهبط المفرغ، فإذا وجد العنصر في شكل ملح ثابت مثل كلوريد الكلسيوم، يكون من الصعب تفكيكه إلى سحابة من الذرات المتفرقة، وذلك باستعمال الحرارة العادية الناجمة عن خليط من الهواء والأسيتلين، وبالتالي يضاف غاز مساعد مثل أكسيد النيتروز لرفع درجة حرارة اللهب بشكل كاف لتفكيك ملح كلوريد الكلسيوم إلى ذرات.

كما توجد عدة طرق أخرى منها إضافة عنصر أكثر ولعاً للاتحاد مع الكلور في محلول القياس مثل التنتال Tantalum أو السترونسيوم Strontium، فتتحد هذه العناصر مع الكلور، محررة الكلسيوم على شكل ذرات في درجة الحرارة العادية للملهب.

2- بعض المشاكل قد تحدث نتيجة بعض الصفات الفيزيائية للمحلول المستعمل، ولنوع اللهب، ونوع الغازات المستخدمة، كذلك لوجود بعض المكونات العضوية التي قد يحتويها المحلول...الخ. ولقد وجدت الحلول لكل مشكلة من هذه المشاكل، إذا اتبعت الطرق والتعاليم لقياس كل عنصر.

3- تداخل بعض الحزم الضوئية المنبعثة من ذرات العنصر نتيجة تنشيطه في اللهب، مما استدعى تصميم الأجهزة ذات الشعاع المزدوج.

وطريقة عمل أنبوب المهبط المفرغ باختصار، هو أن وصل هذا الأنبوب بمصدر كهربائي يحول ذرات الغاز داخل الأنبوب إلى أيونات موجبة، تنجذب نحو المهبط، وتصطدم بسطحه، مؤدية إلى تناثر بعض ذرات صفيحة المهبط، تحرك ذرات المهبط يؤدي إلى إصدار موجات ذات طول محدد وخاص للمعدن المكون منه المهبط (325 نم بالنسبة لعنصر النحاس، 285 نم للمغنزيوم، 214 نم للزنك... الخ). وبهذا الشكل يخرج شعاع ضوئي ذو موجة خاصة جدا بالمعدن المكون للمهبط.

أما بقية أجزاء الجهاز مثل مستفرد اللون، مكشاف الضوء، والقارئة، فلا تختلف هذه الأجزاء عن أي جهاز لقياس الضوء الطيفي.

المجالات السريرية والحيوية لاستعمال هذه الطريقة

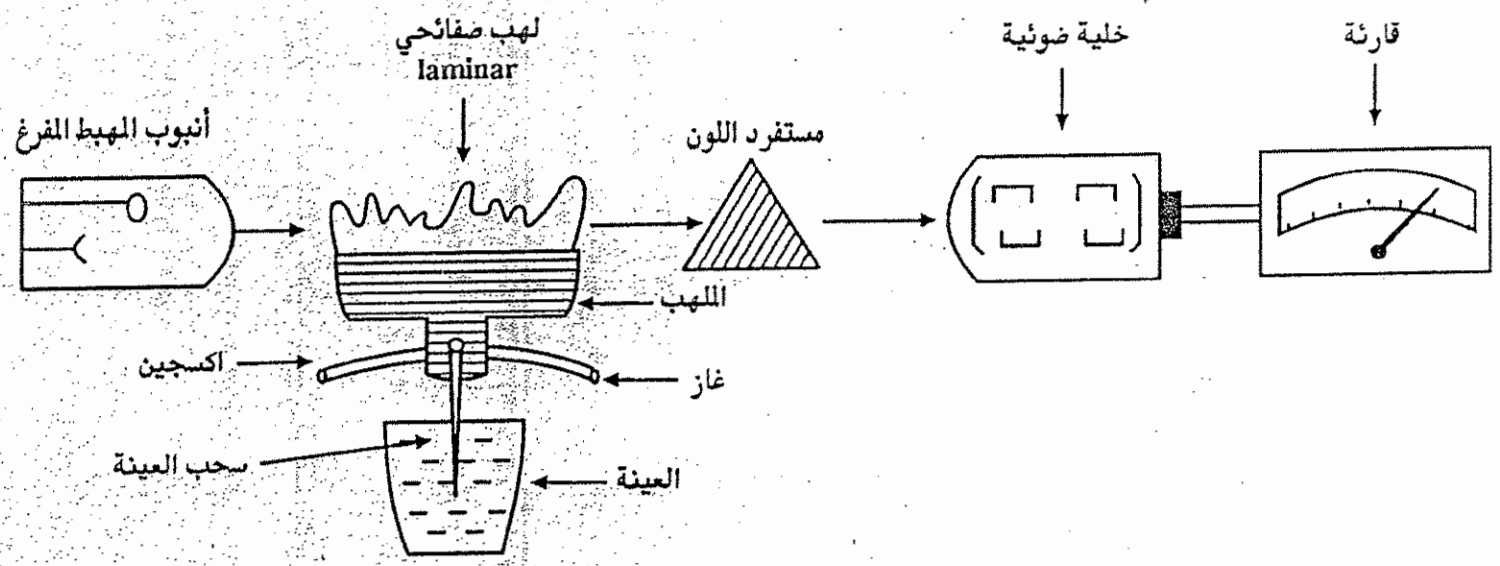
هناك عدة مجالات لاستخدام مثل هذه الأجهزة :

1- قياس الكلسيوم والمغنزيوم، حيث أن، حساسية الجهاز لمثل هذه العناصر أفضل بكثير من الطرق الأخرى المستخدمة.

2- قياس بعض العناصر النادرة Trace elements، والتي توجد بمقادير ضئيلة جداً في سوائل الجسم مثل الزنك، النحاس، الحديد، الكروم...الخ.

3- قياس بعض العناصر التي قد تسبب انسماما في الجسم، إذا وجدت فوق حدود معينة، مثل الرصاص، والزرنيخ، والذهب...الخ.

وأخيراً قد تستخدم هذه الأجهزة في قياس عنصر الليثيوم في المصل، حيث تستعمل بعض أملاح هذا العنصر - (كربونات الليثيوم) - كدواء في معالجة بعض الأمراض النفسية كالاكتئاب، ورغم أن القياس بهذه الأجهزة أكثر دقة لهذا العنصر، فإنّ بالإمكان أيضاً إجراء القياس بوساطة مقياس الضوء اللهبي.



يوضح هذا المخطط مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري، ويبين كيف تسحب العينة لتدخل حجرة المزة لتختلط بالغازات ثم تخرج مشتعلة من فتحة اللهب الصفائحية. يخرج شعاع من أنبوب المهبط المفرغ الخاص بالمادة المراد قياسها حيث يمتص جزء منه حسب تركيز المادة، شدة الامتصاص تقاس عن طريق أنبوب متعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier tube.

الجهاز البسيط والأجهزة المعدلة

أولاً : الجهاز البسيط، وطريقة عمله (الشكل 24)

كما هو موضح في (الشكل 24)، تسحب العينة المراد قياسها بعد إجراء التخفيف المناسب عليها بوساطة أنبوب رفيع، ويدخل في حجيرة المرذة حيث تختلط بغازات الاشتعال - (الهواء والأسيتيلين) - وتخرج من فتحة الملهب الطولية في شكل سحابة من الرذاذ، مكونة لهباً صفائحياً Laminar flame طوله 10سم، هذا اللهب مرتفع الحرارة - حوالى 3000°م - بإمكانه تحويل المادة المراد قياسها إلى سحابة من الذرات.

يخرج شعاع من أنبوب المهبط المفرغ، ويمر باللهب، حيث يمتص جزء منه حسب تركيز الذرات في المحلول، ثم يمر الشعاع إلى أنبوب متعدد التضخيم الضوئي Photomultiplier، وتنتقل الإشارة إلى القارئة بعد تضخيمها. يعتمد حساب تركيز العينة المجهولة على عمل منحنى المُعاوَرة Calibration curve، باستخدام الماء المقطر كنقطة الصفر ومجموعة من المحاليل العيارية للمادة المراد قياسها.

ثانياً : مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري المزدوج الشعاع

صمم هذا التعديل في الجهاز كما في أجهزة قياس الضوء الطيفي مزدوج الشعاع، ومبدؤه أن الشعاع الصادر من أنبوب المهبط، ينشطر إلى جزأين بوساطة مرآة أو أي آلية أخرى، أحد الشعاعين يمر خلال اللهب حيث يحدث الامتصاص، أما الشعاع الآخر فلا يمر في اللهب، بل يحول مباشرة إلى الخلية الضوئية، ويحسب حاصل قسمة الشعاع الأول على الثاني (الشكل 25).

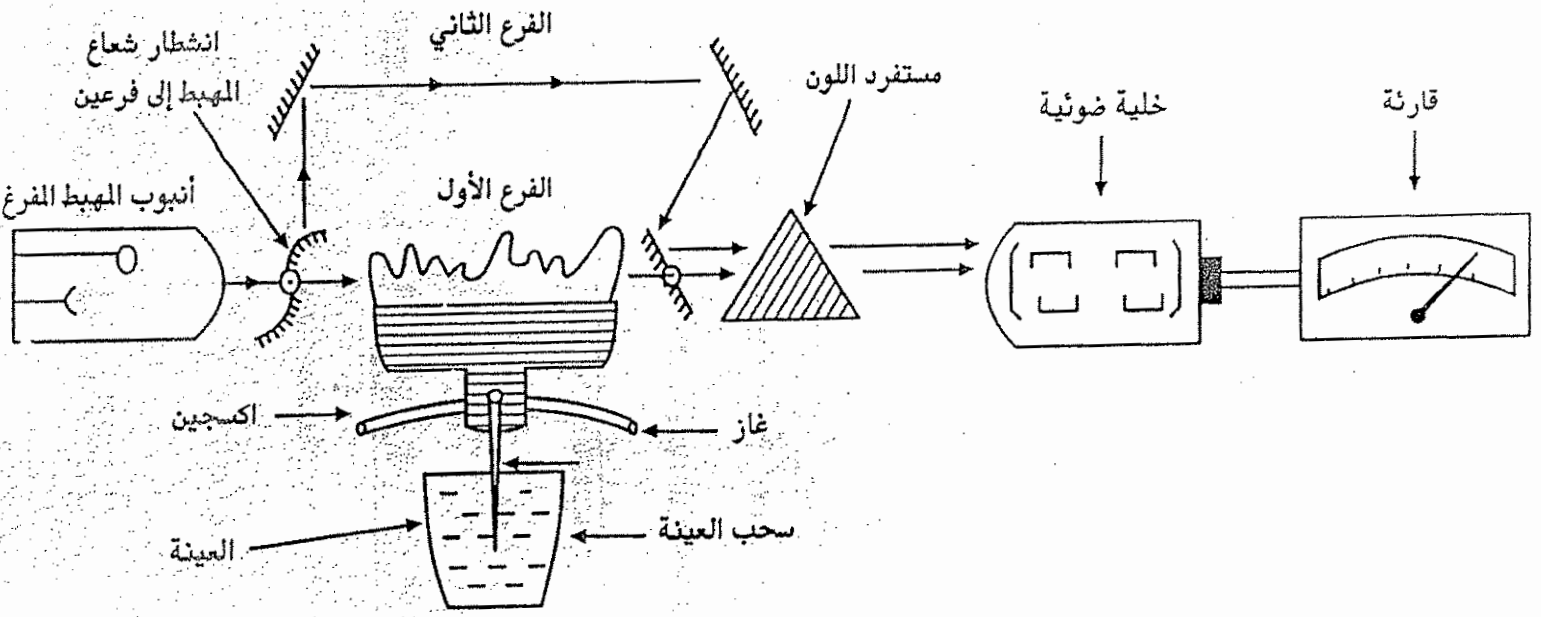
وأهمية هذا التصميم - كما سبق وشرح في أجهزة قياس الضوء الطيفي مزدوج الشعاع - هو محاولة التغلب على أي تذبذبات في شدة اللهب، أو شدة خروج الرذاذ من الملهب، أو التغير في قوة الشعاع الصادر من أنبوب المهبط.

ثالثاً : مقياس الضوء الطيفي الامتصاصي الذري بدون لهب

Flameless atomic absorption

استعيض في هذه الأجهزة عن الملهب العادي، واستعمال الغازات، وبدلاً من كل ذلك، توضع العينة المراد قياسها في حفرة صغيرة في مكعب من الجرافيت أو الكربون، ومتصلة بمصدر كهربائي، يمكن تغيير فولطه تدريجياً، حين يمر تيار بسيط تتبخر العينة، فإذا رفع الفولط تتفحم العينة، وتخرج المواد العضوية على هيئة دخان وأبخرة، حين ذلك يرفع الفولط بشكل سريع إلى مستويات عالية، فيتحول العنصر المراد قياسه إلى سحابة من الذرات، حينئذ يمر الشعاع في العينة حتى يحدث امتصاص الضوء عند طول الموجة المعينة.

إن حساسية هذه الطريقة أكثر بعدة مرات من طريقة اللهب، وبالتالي فهي تساعد على دقة النتائج في حال قياس بعض المعادن الموجودة بكميات ضئيلة في العينة، مثل الرصاص.



صمم هذا الجهاز على مبدأ مقياس الضوء الطيفي مزدوج الشعاع، بمعنى أن الشعاع الصادر من أنبوب المهبط ينشطر الى جزءين، أحدهما يمر خلال اللهب، والآخر يمر مباشرة على الخلية الضوئية، ويستخرج تركيز المادة من حاصل قسمة شدة الامتصاص من الشعاعين.

مقدمة الباب الثاني

في مجال العمل المخبري السريري ، كما في مجالات الصيدلة والعلوم الحيوية والزراعة ... الخ، قد يُحتاج إلى فصل ومعرفة وتقدير كثير من الجزيئات الموجودة في تركيب كثير من السوائل أو النسج أو الخلائط أو الجناسات Homogenates ...الخ.

وقد وضعت كثير من التقنيات التي يمكن استخدامها في عمليات الفصل . تعتمد هذه الطرق على صفات الجزيئات المراد فصلها عن بعضها ، والتي يمكن اختصارها في الصفات التالية :

1- الوزن الجزيئي للجزيئات .

2- حجم الجزيء وشكله الفراغي .

3- وجود شحنة كهربائية على سطح الجزيء .

4- قابلية الذوبان كماً (أي شدة الذوبان) ، ونوعاً (أي نوع المذيب) .

5- خاصية الامتزاز Adsorption ...الخ.

وقد قسمت التقنيات التي تستخدم في فصل الجزيئات ، حسب هذه الصفات إلى :

1- تقنيات تعتمد على حجم الجزيء وشكله ووزنه الجزيئي

أ – الديال والترشيح المستدق Dialysis & ultrafiltration.

ب– الترشيح خلال الهلامة Gel filtration.

ج – التنبيذ الفائق Ultra centrifugation.

2 - تقنيات تعتمد على الشحنة الكهربائية

أ – الرحلان الكهربائي بأنواعه المختلفة .

ب– التبادل الشاردي (الأيوني) Ion exchange.

3- تقنيات تعتمد على آلية الذوبان والامتزاز

أ – الترسيب Precipitation.

ب– الاستشراب Chromatography

الفصل التاسع

الرحلان الكهربائي

ELECTROPHORESIS

مقدمة

تعني كلمة الرحلان الكهربائي بشكل مبسط، تحرك الجزيئات إذا وضعت في مجال كهربائي، نحو القطب الموجب أو السالب، حسب الشحنة التي يحملها الجزيء، وهذا يعني أنه لكي تتم حركة الجزيء فلا بد أن يحمل شحنة كهربائية، أو يستطيع استقبال شحنة كهربائية. من أمثلة الجزيئات التي تستوفي هذا الشرط، البروتينات، وعديدات الببتيد، والحموض الأمينية، والحموض النووية، الخ – أما الجزيئات التي لا تحمل شحنة، مثل المواد الكربوهيدراتية، فيمكن اتحادها مع أيون له شحنة مثل أيون البورات Borate ion.

وهناك عوامل كثيرة تؤثر على حركة الجزيئات في المجال الكهربائي، منها :

1- كمية الشحنة الكهربائية الموجودة على سطح الجزيء.

2- باهاء (PH) المحلول الدارىء Buffer.

3- التركيز الأيوني Ionic concentration للمحلول الدارىء.

4- القوة الدافعة الكهربائية بين القطبين Electromotive force.

5- قوة الامتزاز Adsorption مع الوسط الذي يجرى عليه الرحلان.

6- التناضح الداخلي الكهربائي Electroendosmosis.

وشرح كل هذه العوامل بالتفصيل موجود في كثير من الكتب المتخصصة، ولكن يكفي الإشارة باختصار إلى هذه العوامل، وستؤخذ جزيئات البروتين، كمثل لشرح تأثير هذه العوامل على عملية الرحلان الكهربائي.

فمن المعروف أن جزيء البروتين يتوضّع على سطحه مجموعات NH_2, COOH وأن هذه المجموعات يمكن أن تتأين إلى $-COO^-$ أو $-NH_3^+$، وأن لكل جزيء بروتيني باهاء معين تكون عنده عدد المجموعات الموجبة $(NH_3)^+$، أكبر من الأيونات السالبة (COO^-)، وبالتالي يعمل الجزيء البروتيني كأيون موجب وتتجه نحو المهبط Cathode والعكس صحيح.

وحيث أن لكل جزيء بروتيني نقطة تعادل كهربائي تختلف باختلاف البروتين فهي مثلاً 6.4 بالنسبة للغاما غلوبيولين، وهي 4.7 بالنسبة للألبيومين، وبالتالي إذا وضعا في محلول له باهاء 8.6، فإن الشحنات على كليهما تكون سالبة، وعدد الشحنات على الألبيومين أكثر من الغاماغلوبيولين، فإذا وضعت جزيئات هذين النوعين من البروتينات في مجال كهربائي، فإن سرعة جزيئات الألبيومين نحو المصعد Anode تكون أسرع من جزيئات الغلوبيولين.

وتجدر الإشارة هنا أن الشحنة الكهربائية وحدها ليست هي العامل الوحيد بالنسبة لسرعة حركة الجزيئات، ولكن حجم وشكل الجزيء يلعب دوراً إضافياً، والوسط الذي يجرى عليه الرحلان يلعب دوراً آخر.. الخ.

- هذا من ناحية الشحنة الكهربائية الموجودة على الجزيء، وهي العامل الأساسي حتى تتحرك الجزيئات نحو الأقطاب في مجال كهربائي، وكذلك تأثير باهاء المحلول، أما من ناحية التركيز الأيوني للمحلول الدارىء، فقد وجد أن زيادة التركيز تقلل من تأين الجزيئات، وبالتالي تقلل من حركتها. كما أنها تسبب في رفع درجة الحرارة، ولكنها في نفس الوقت تعطي فصلاً Separation واضح الحدود. وكلما قل التركيز ازدادت سرعة الجزيئات، وتقل الحرارة الناجمة عن المسار الكهربائي، ولكن تقلل أيضاً من حدة العصابات Sharpness of bands، وقد وجد بالتجربة أن أحسن مجال للتركيز بالنسبة للمحلول الدارىء يقع بين (0.025 إلى 0.1) عياري.
- أما من ناحية شدة التيار، فإن حركة الجزيئات تتناسب طرداً مع شدة التيار (بالأمبير)، أو القوة الدافعة الكهربائية (بالفولط). ولكن يتناسب عكساً مع المقاومة (بالأوم).
- وأخيراً يلعب امتزاز Adsorption الجزيئات التي يراد فصلها على وسط الرحلان، دوراً هاماً في سرعة تحرك الجزيئات، والعامل الآخر هو ما يطلق عليه التناضح الداخلي الكهربائي. ويعني تحرك أيونات أملاح المحلول الدارىء Buffer في اتجاه معاكس لرحلان الجزيئات المراد فصلها، وهذه الخاصية قد تؤثر إلى حد ما على سرعة حركة الجزيئات.

المكونات الأساسية لعملية الرحلان الكهربائي

1- مصدر لتيار كهربائي مباشر.

2- حوض يجرى عليه الرحلان الكهربائي.

3- مواد الرحلان :

أ - محلول دارىء.

ب - وسط تتم عليه عملية الرحلان.

جـ - طرق التعرف وإظهار المواد المنفصلة.

4- وسائل لتقدير كمية الجزيئات المفصولة.

1 - مصدر التيار الكهربائي المباشر (المستمر)

إن أول شيء يحتاج إليه في عملية الرحلان الكهربائي هو الحصول على تيار مباشر، ويتم ذلك بواسطة جهاز يحول التيار المتردد الموجود عادة بالمخابر، ويمكن عن طريق هذا الجهاز التحكم في شدة الفولط، وفي العادة هناك مجالان لشدة الفولط من (100 ــ 500)، ومن (500 ــ 10.000 فولط)، ويستعمل المجال المنخفض في فصل الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات، وأنواع الخضاب، والبروتينات الشحمّية Lipoproteins، أما المجال المرتفع من الفولط فيستخدم غالباً لفصل الجزيئات الصغيرة مثل الحموض الأمينية.

إن المسافة التي تنفصل فيها الجزيئات على وسط الرحلان تعتمد على شدة الفولط، وزمن الرحلان، بمعنى كلما ازداد الفولط، قل الوقت المستخدم، والعكس صحيح، ولذلك فإن كل نوع من الرحلان يحدد له شدة الفولط المستخدمة، والوقت اللازم لإجرائه، ويجب التقيد بهذه التعليمات حتى يمكن الحصول على فصل جيد، وبتكرارية ثابتة لسهولة المقارنة.

مع مرور التيار الكهربائي في وسط الرحلان تتولد حرارة، تتناسب مع شدة الفولط، ينتج عن هذه الحرارة مشكلتان، الأولى هي البَخْر الذي يحدث في المحلول الدارىء في الوسط المستعمل، ومن أجل ذلك يُغَطّى حوض الرحلان بشكل تام حتى يمنع البخر قدر الإمكان، والمشكلة الثانية أن الحرارة تغير من سرعة حركة الجزيئات لأسباب مختلفة، وبالتالي فقد صمم، في بعض أنواع أحواض الرحلان، آلية للتبريد، وخاصة حين استعمال شدة فولط عالية.

2 - حوض الرحلان

هناك أنواع كثيرة من أحواض الرحلان، ولكن أكثرها استعمالاً هو الحوض الذي يجرى فيه الرحلان أفقياً (شكل 31)، ويتكون الحوض من جَوْبَتَين Compartments، واحدة على كل جانب، وكل جوبة تحتوي على سلك من البلاتين يعمل كقطب للتيار الكهربائي، ويوضع المحلول الدارىء في الجوبتين اللتين تفصل بينهما قنطرة يوضع عليها وسط الرحلان (أستيات السليولوز)، والذي يوصل ـــ كهربائياً ـــ ما بين الجوبتين.

وتختلف هذه الأحواض في التفاصيل حسب الشركة المصنعة، ولكن المبدأ واحد في كل هذه الأنواع، فإذا وصل القطبان إلى مصدر كهربائي له تيار مباشر، فإن التيار الكهربائي يمر من القطب الموجب، عَبْر وسط الرحلان مؤدياً إلى حركة الجزيئات على هذا الوسط إلى الاتجاه المعاكس لشحنتها وبالتالي تكون الدائرة الكهربائية قد اكتملت.

3 - مواد الرحلان

أ - المحلول الدارىء

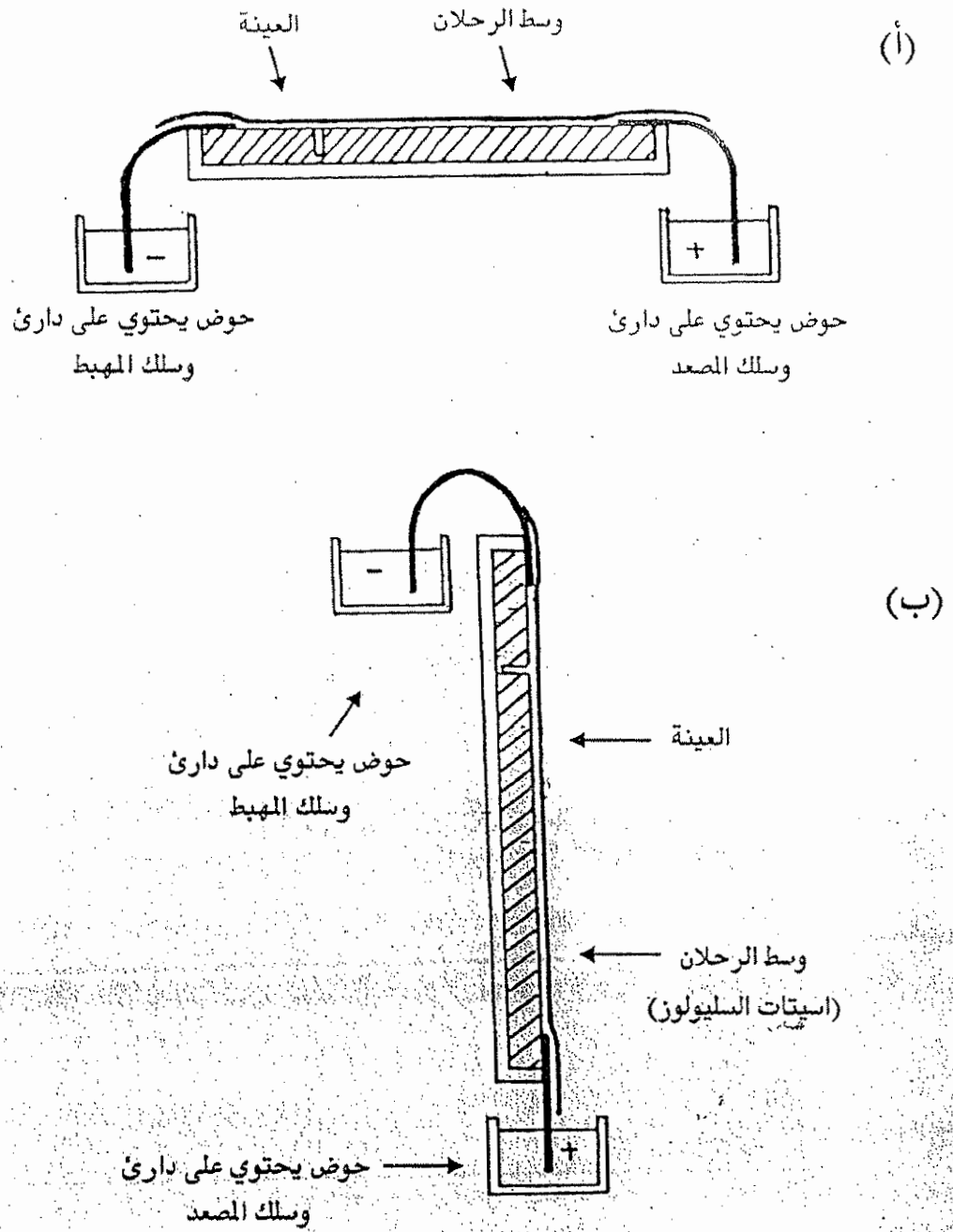
المحلول الدارىء هو وسط يعمل على نقل التيار الكهربائي، كما أنه يؤمن باهاء (PH) معيناً، وبالتالي تأخذ الجزيئات شكلها الأيوني، أي موجبة أو سالبة حسب نقطة التعادل الكهربائي (IEP) لكل منها. كما أن للمحلول الدارىء فائدة مهمة وهي الإبقاء على ثبات باهاء وسط الرحلان، رغم مرور التيار الكهربائي وما يحدثه في الماء من تأين إلى مجموعة OH^- تذهب للمهبط، وبقاء باهاء الوسط ثابتاً مهم جداً حتى تظل شحنات الجزيئات المراد فصلها ثابتاً.

والمحاليل الدارئة المستعملة في الرحلان الكهربائي متعددة جداً، ولكل نوع من الرحلان - (بروتينات، خضابات، حموض نووية، الخ) نوعها الخاص من المحلول الدارىء، وكثير من الشركات تنتجها الآن بشكل مسبق الصنع، على هيئة مساحيق لا تحتاج إلا إذابة في حجم معين من الماء المقطر.

ب - الوسط المستعمل لفصل الجزيئات

I - استعمال ورق الترشيح : في السابق كان استعمال ورق الترشيح هو الأكثر شيوعاً، والأوراق المستعملة في اختبارات الاستشراب Chromatography تصلح للرحلان الكهربائي إذا قطعت بالمقاسات المناسبة، وأهم هذه الأنواع هو المصنع من إحدى الشركات تحت اسم Whatman No I.

الشكل (31) : مبدأ الرحلان الأفقي (أ) والرأسي (ب)



يبين الشكل العلوي طريقة الرحلان الأفقي في حوض الرحلان، وفي الشكل السفلي يبين طريقة الرحلان الرأسي. هناك أفضلية لاستعمال أجهزة الرحلان الأفقي.

في الوقت الحالي يفضل استعمال صفائح اسيتات السليولوز، وذلك لبعض المساوىء التي تنجم من الرحلان على الورق، وأهمها أن الوقت المستعمل في الرحلان على الورق أطول بكثير (10 ــ 20 ساعة)، كما أن عصابات الجزيئات المرتحلة Electrophoretic bands، غير حادة الفواصل أو متداخلة مع بعضها، وأخيراً طريقة حساب كل جزء منفصل أصعب، وأقل دقة بالنسبة للرحلان على الورق.

II - استعمال أسيتات السليولوز : لقد أمكن الحصول على صفائح مسبقة الصنع من أسيتات السليولوز، بأطوال وعروض مختلفة، حسب الحاجة، والجهاز المستعمل، وطريقة العمل... الخ. وقد أمكن تصنيع أنواع مختلفة من هذه الرقائق السليولوزية تختلف حسب المسام الموجودة بين شبكة خيوط السليولوز، والتي تمتلىء بمحلول الدارىء عند نقعها به.

وتتميز رقائق السليولوز عن غيرها كوسط للرحلان، بأن وقت الرحلان قصير (15 ــ 30 دقيقة)، وأن منطقة العصابات Bands واضحة ومحددة، وذلك بسبب قلة امتزاز Adsorption العينة على الوسط، كما أن هذه الرقائق يمكن جعلها شفافة بوسائل مختلفة (مثلاً 95 مل ميثانول + 5 مل حمض الخل الثلجي)، وهذا يسهل من عملية قراءتها على مكثاف متري Densitometer، كما يمكن الاحتفاظ بهذه الرقائق الشفافة لمدة طويلة، هذه الوسيلة هي أكثر الوسائل شيوعاً في الممارسة العملية.

III - **استعمال هلامة الأغاروز Agarose :** إن الأغاروز هو أحد مشتقات الأغار النقية، وإذا أذيب بمقدار 0.5 ــ 1 غ في الماء، كوّن هلامة يمكن فردها بسهولة على سطح زجاجي أو بلاستيكي قبل الاستعمال مباشرة، وحين التبريد تتكون رقيقة متساوية السطح من هلامة الأغاروز المتماسكة، توضع العينة المراد إجراء الرحلان عليها في شق طولي (حوالى 3 مم) في الهلامة، ولا يُحتاج إلى أكثر من (1 ــ 4) ميكرولتر من العينة لملء هذه الحفرة.

إن محاسن استعمال هذه الهلامة كوسط للرحلان، هي نفس محاسن اسيتات السليولوز، أي الوقت القصير، وعدم الامتزاز، وبالتالي الفصل الجيد، وحين تجفيف الهلامة تكون شفافة، وبالتالي يمكن قراءتها على المكثاف المتري. إن أكثر استعمالات هلامة الأغاروز في الممارسة السريرية هي أثناء الرحلان الكهربائي المناعي (سيشرح لاحقاً).

IV - **استعمال هلامة النشاء Starch gel :** لا تختلف هذه الهلامة كثيراً عن هلامة الأغاروز، والنشاء المستعمل هو نوع خاص أجريت عليه عملية حَلْمهة جزئية Partial hydrolysis، وغالباً ما تصنع رقائق النشاء في قوالب خاصة من البيرسبكس Perspex بسماكة 0.6 سم وبمساحة 20×10سم للقوالب المستعملة في الرحلان الأفقي أو 25×12.5 سم

للرقائق المستعملة في الرحلان العمودي، ولكن هذه المساحات قد تختلف حسب الطلب، وتستعمل هلامة النشاء في فصل جزيئات حيوية عديدة، وكذلك بعض الإنظيمات ونظائرها ومركبات لها نشاطات فيزيولوجية مختلفة. إن الفصل على رقائق النشاء يظهر عدداً أكثر من الجزيئات المختلفة عما يظهر على رقائق اسيتات السليولوز.

V ـ **استعمال هلامة عديد الأكريلاميد Polyacrylamide** : تتميز هلامة عديد الأكريلاميد كوسط للرحلان بميزات كثيرة منها، أنه يمكن تصنيع أصناف متعددة تختلف باتساع مسامها حسب نوع الجزيئات المراد فصلها، كما يمكن استعمالها مع مختلف أنواع المحاليل الدارئة، عضوية وغير عضوية، بجانب ذلك فإن ظاهرة الامتزاز تكون أقل ما يمكن، وكذلك ظاهرة التناضح الداخلي Endoesmosis، ويكون هذا الوسط شفافاً جداً بعد تجفيفه، وبالتالي يمكن بسهولة قراءة العصابات على المكثاف المتري. وأكثر استعمالات هذا الوسط في الممارسة العملية هي الرحلان الكهربائي في العمود Column electrophoresis، وخاصة في فصل نظائر الإنظيمات.

جـ ـ طرق التعرف وإظهار المواد المنفصلة

بعد إجراء الرحلان الكهربائي لفصل الجزيئات المختلفة، يجب إظهار كل نوع من أنواع المواد المفصولة بأحد الطرق الرئيسية التالية :

I – صباغة المواد المفصولة بأحد الصبغات.

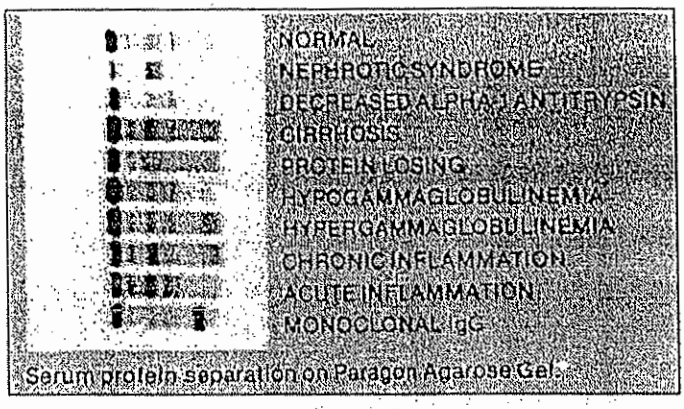
II – عن طريق الامتصاص الضوئي وخاصة في المجال فوق البنفسجي.

III – استعمال مواد مشعة أو ومضانية تعين المناطق المنفصلة، وتحدد كمياتها.

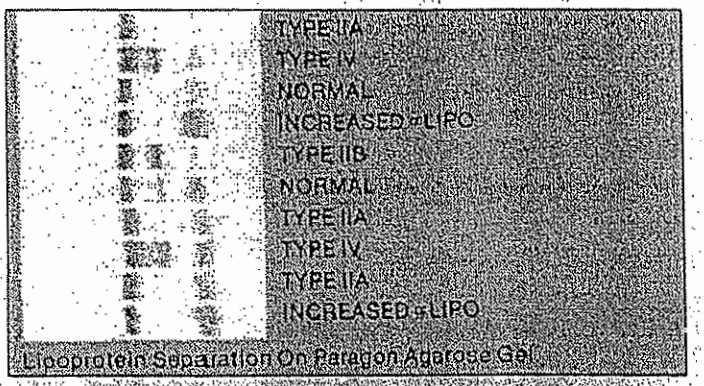
IV – تفاعل إنظيمي على كل منطقة وإعطاء مركبات يمكن الكشف عنها.

I ـ **استعمال المواد الصبغية** : هذه هي أسهل الطرق المستعملة للتعرف على الأجزاء المنفصلة بالرحلان وكذلك تقدير كمياتها، ولنأخذ مثلاً الرحلان الكهربائي لبروتينات المصل على صفيحة من أسيتات السليولوز، فبعد إجراء الرحلان، تصبغ الصفيحة بأحد صبغات البروتين مثل Ponceau S، فتظهر العصابات الممثلة للبروتينات باللون الأحمر وتكون كثافة هذه الخطوط ممثلة لكمية كل بروتين (الشكل 32)، ثم توضع الصفيحة في محلول خاص يجعلها شفافة، وتوضع في مكثاف متري Densitometer ليرسم خطاً بيانياً، ومنه تقدر كمية كل بروتين انفصل في هذا الرحلان، (والجدول رقم 5) يوضح أمثلة لبعض أنواع الصبغات المستعملة في صباغة

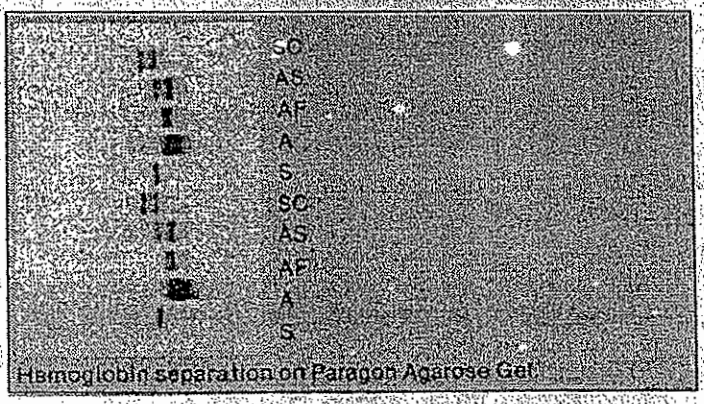
الشكل (32) : صباغة الرحلان الكهربائي للبروتينات والبروتينات الشحمية، والخضاب



رحلان كهربائي للبروتينات
(عينات بعض المرضى)



رحلان كهربائي
للبروتينات الشحمية
(عينات بعض المرضى)



رحلان كهربائي للخضاب
(عينات بعض المرضى)

II - استعمال الامتصاص الضوئي: هذه الطرق غير شائعة الاستعمال، ومبدؤها أن كثيراً من المركبات البيولوجية يمتص الضوء عند طول موجة معينة، فالبروتينات والحموض الأمينية تمتص الضوء في المجال فوق البنفسجي (حوالى 260 نم)، ولهذه الطريقة كثير من الاحتياطات، ولا تجرى في الغالب إلا إذا تم الرحلان في وسط عديد الأكريلاميد. حيث أن هذا الوسط لا يمتص الضوء بكميات كبيرة في المجال فوق البنفسجي، ويمكن استخدام هذه الوسيلة في التعرف وتقدير الأضداد والمستضدات والمعقدات بينهما.

الجدول (5) : الصبغات المستعملة لتلوين المواد المفصولة بالرحلان الكهربائي.

المواد المراد فصلها	الصبغة المستعملة	مذيب الصبغة
البروتينات	أ - بروم فينول أزرق bromphenol blue	حمض الخل
	ب - بنسو أحمر Ponceau red	ثالث كلور الخل
	ج - النجروسين Nigrocin	حمض الخل أو ثالث كلور الخل
الليبوبروتينات	السودان الأسود Sudan black	60 % كحول إتيلي
عديد السكريد	اليود Iodine	الماء + كلوريد البوتاسيوم
البروتين السكري	حمض البيريوديك + كاشف شيف	
الحموض النووية	المثيل الأخضر methyl green	البيرونين pyronine

III - استعمال المواد المشعة : في بعض الحالات يمكن وسم المواد المراد فصلها بنظير مشع، وبعد فصل المركبات عن بعضها، يمكن التعرف وتقدير كمية كل جزء من الأجزاء المحتوية على المادة المشعة إما بواسطة عدادة أشعة غاما Gamma counter، والتي يمكن وصلها بمسجلة ترسم خطاً بيانياً يمثل مقادير كل منطقة، وإمّا بفصل المناطق المشعة، وشطف Elute كل منطقة في مذيب مناسب، ثم قراءة كمية المادة المشعة الموجودة في كل منطقة.

IV - استعمال التفاعلات الإنظيمية: إن أهم استعمال لهذه الطريقة في الممارسة العملية، هو فصل وتقدير نظائر الإنظيمات iso enzymes، بواسطة الرحلان الكهربائي، فمثلاً فصل نظائر النازعة اللبنية Lactic dehydrogenase، أو الفسفتاز القلوية alkaline phosphatase، أو الكرياتين كيناز Creatine kinase...الخ، ومبدأ هذه التقنية هو أن الإنظيم بعد إجراء الرحلان وفصل نظائره، يجري على الصفيحة التي تم عليها الفصل، تفاعلاً كيميائياً يقوم به الإنظيم، وينتج من التفاعل عند كل منطقة يوجد بها النظير مادة

يمكن قياسها لونياً، أو ضوئياً...الخ. كمية المادة الخارجة من التفاعل تتناسب طرداً مع كمية النظير الإنظيمي (الشكل 33).

٧ - **استعمال التفاعلات المناعية**: وهذه الطريقة هي التي بُني عليها مبدأ الرحلان الكهربائي المناعي، وتتلخص هذه التقنية بأن البروتينات التي تنفصل بالرحلان، يمكن مشاهدتها، وتقدير كميتها، إذا أضيف إلى وسط التفاعل أضداد خاصة بالبروتينات أو الجزيئات المنفصلة، تتحد هذه الأضداد مع مستضداتها، مكونة راسباً مناعياً من الضد والمستضد Antigen-antibody complex، يظهر بأشكال مختلفة حسب نوع الرحلان، كما سيشرح لاحقاً.

4 - وسائل التقدير الكمي للجزيئات المفصولة

هناك وسائل كثيرة لتقدير كميات الجزيئات المفصولة بوساطة الرحلان الكهربائي، هذه الوسائل تعتمد على نوعية الجزيئات (مثل بروتينات، حموض نووية، حموض أمينية، كربوهيدرات... الخ)، وكذلك تعتمد على طريقة التعرف. ويمكن اختصار وسائل التقدير الكمي بالطرق التالية :

أ - إذابة كل منطقة منفصلة في المذيب المناسب وقياسها بإحدى الطرق الكيميائية

ب - استعمال أجهزة المكثاف المتري Densitometer.

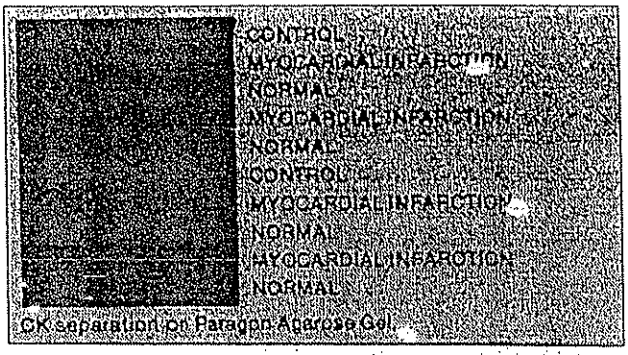
جـ - استعمال مدرج عياري Standard curve ومقارنة المجهول به.

أ - إذابة كل منطقة وإجراء التقدير الكمي عليها

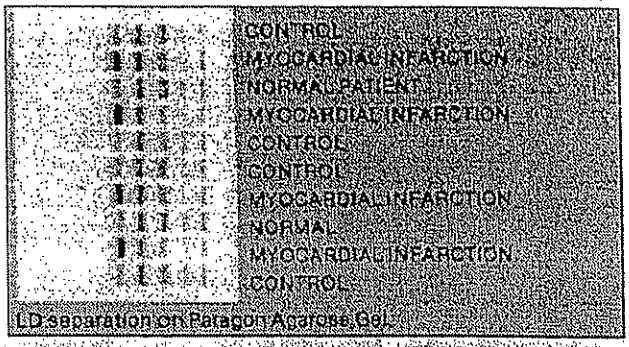
تعتمد هذه الطريقة على تجزئة وسط الرحلان (أسيتات السليولوز مثلاً) إلى أجزاء، كل واحد يحتوي على عصابة تمثل نوعاً من الجزيئات المنفصلة، فلو افترض أن بروتينات المصل فصلت على شريحة من أسيتات السليولوز، تقسم الشريحة حسب الخطوط التي عليها (ألبيومين، $\gamma, \beta, \alpha_2, \alpha_1$ غلوبيولين)، يوضع كل جزء في 5 مل من محلول 0.4 مول هيدروكسيد الصوديوم، يقاس امتصاص الضوء في كل أنبوب، وتحسب النسبة المئوية لكل نوع من هذه البروتينات.

ونفس المبدأ يمكن تطبيقه على جميع المواد المنفصلة بالرحلان، ولكن قد تختلف المادة الملونة، والمحلول المذيب، وطول الموجة التي يقاس عندها المحلول الذي استعمل في الشطافة Elution.

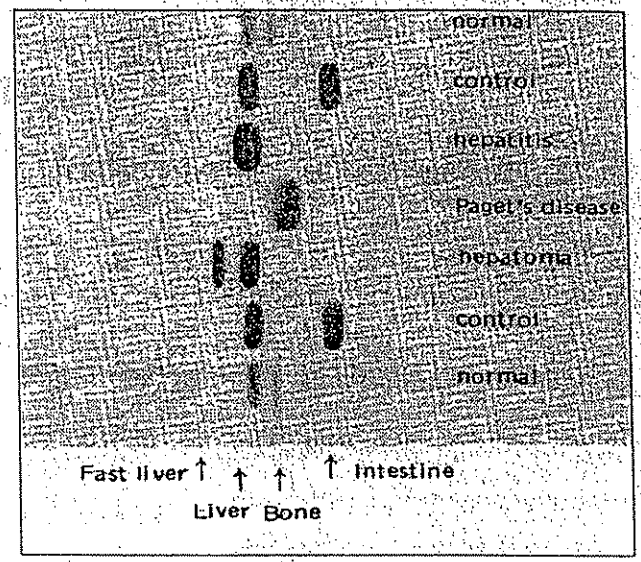
الشكل (33) : مخططات للرحلان الكهربائي لبعض الأنظيمات



الرحلان الكهربائي لأنظيم CK
(عينات بعض المرضى)



الرحلان الكهربائي لأنظيم LD4
(عينات بعض المرضى)



الرحلان الكهربائي لأنظيم
الفسفتاز القلوي
(عينات بعض المرضى)

وقد قل استعمال هذه الطريقة بشكل روتيني، لطول الوقت المستخدم وعدم دقة النتائج، وأهم من كل ذلك لاكتشاف طرق آلية بديلة وسريعة.

ب - استعمال المكثاف المتري Densitometer

هذه الطريقة هي أكثر الطرق المستخدمة في الممارسة العملية، ولقد صممت وأنتجت كثير من الأجهزة، تختلف بتطورها من ناحية الميكانيكية، والتصميم الإلكتروني، وبالتالي بقيمتها المادية، ولكن معظمها يعتمد على نفس المبدأ، فالجهاز عبارة عن مقياس ضوئي، ويعتمد إما على نظرية امتصاص الضوء Light absorption، أو انعكاس الضوء Light reflectence.

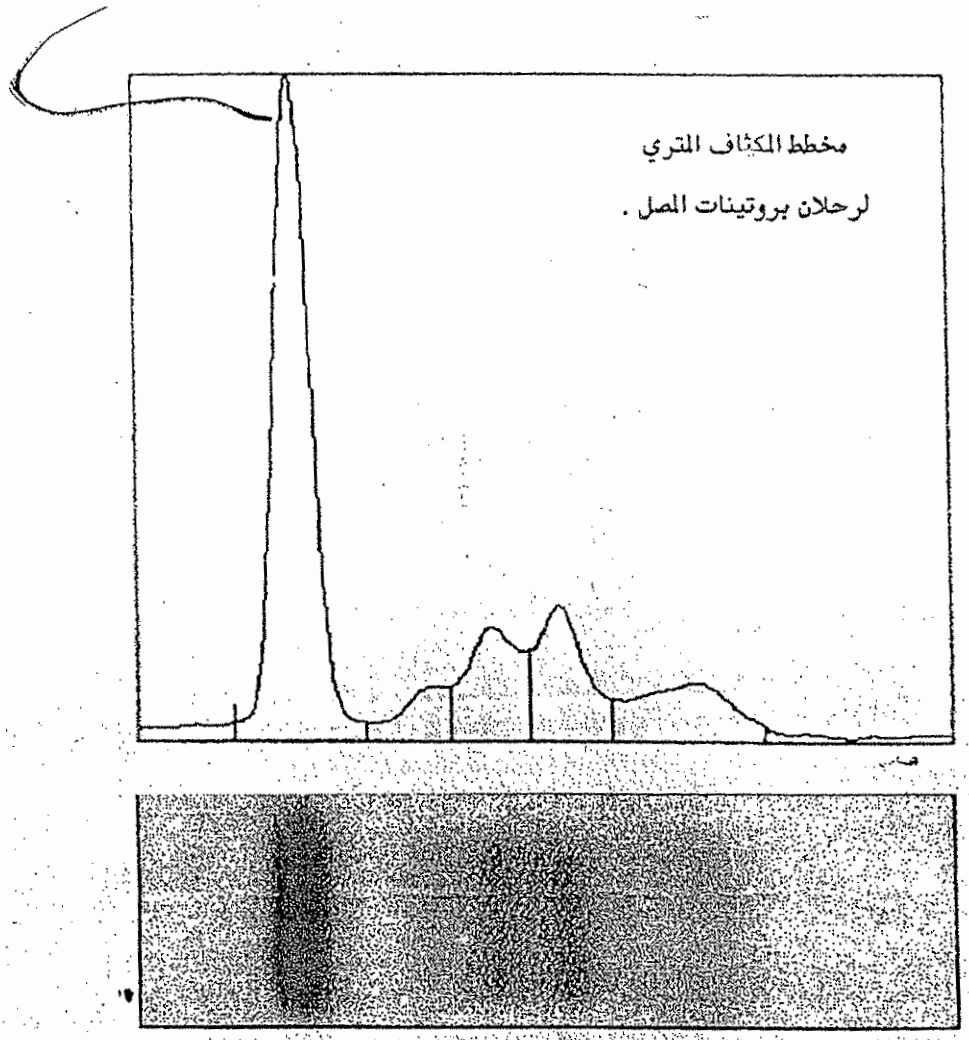
أولاً : أجهزة قياس امتصاص الضوء Absorptiometer

يوضع الوسط الذي أجري عليه الرحلان الكهربائي، ويشترط أن يكون هذا الوسط شفافاً Transparent مثل هلامة عديد الأكريلاميد Polyacrylamide gel أو أسيتات السليولوز بعد معاملتها بأحد المحاليل التي تجعلها شفافة، وبعد صباغة المواد المنفصلة، وظهورها على هيئة عصابات Bands، كل منها يختلف في كثافة لونه حسب تركيزه، فإذا وضعت هذه الشريحة على حامل متحرك فوق مصدر ضوئي أحادي اللون Monochromatic light، يمر الضوء خلال العصابات إلى خلية ضوئية Photocell، وموصولة بمسجلة لترسم خطاً بيانياً يمثل النسب للجزيئات المفصولة. (الشكل 34).

ثانياً : أجهزة قياس إنعكاس الضوء Reflectometer

هذا النوع من المكثاف مشابه تماماً للأجهزة المعتمدة على امتصاص الضوء في كل الأجزاء، ولكن في هذا النوع من الأجهزة، يعتمد القياس على مبدأ انعكاس الضوء من على جزيئات المادة المنفصلة، وتستعمل هذه الطريقة في حالة ما إذا كان وسط الرحلان غير شفاف، مثل الرحلان على الورق.

الشكل (34) : مخطط الكثاف المتري Densimeter لرحلان بروتينات المصل



إذا وضعت شريحة الرحلان على حامل متحرك فوق مصدر ضوئي أحادي اللون، يمر الضوء خلال العصابات إلى خلية ضوئية، موصولة بمسجلة لترسم خطاً بيانياً للجزيئات المفصولة .. ويمكن حساب مقدار كل عصابة عن طريق معالج ميكروي متصل بالجهاز.

بعض الأنواع المختلفة للرحلان الكهربائي

بجانب الرحلان الكهربائيَ العادي والذي سبق شرحه في الصفحات السابقة، هناك بعض الطرق المختلفة التي استعمل فيها نفس مبدأ الفصل، ولكن اختلفت التقنيات بشكل أو آخر لتفي بالغرض المصممة من أجله. وأهم الطرق التي قد تصادف في الممارسات السريرية أو الحيوية هي :

1- الرحلان الكهربائي باستخدام الفولط العالي High voltage electrophoresis.

2- الرحلان الكهربائي القرصي Disc electrophoresis.

3- الرحلان الكهربائي التحضيري Preparative electrophoresis.

4- الرحلان الكهربائي المناعي Immuno electrophoresis.

5- الرحلان الكهربائي المناعي بشكل الصاروخ Rocket-immuno electrophoresis.

6- الرحلان الكهربائي البؤري عند نقطة التساوي الكهربائي Iso electric focusing.

1 - الرحلان الكهربائي باستخدام الفولط العالي

يُستخدَم في هذا النوع من الرحلان فولطاً مرتفعاً يصل إلى حوالي 10.000 فولط، وشدة تيار تصل إلى 100 ميللي أمبير، ويستعمل هذا النوع من الرحلان الكهربائي في فصل الجزيئات الصغيرة الحجم Micromolecules مثل الحموض الأمينية، وعديد الببتيدات ... الخ.

وقد وجد أن استعمال الفولط العالي يرفع كثيراً من درجة الحرارة، وبالتالي فهذه الأجهزة مزودة بآليات مختلفة لخفض درجة الحرارة، أسهلها وضع وسط الرحلان بين لوحين للتبريد.

هذا النوع من الرحلان الكهربائي يفيد كثيراً في فصل حُلامَة Hydrolysate المواد البروتينية، حيث يجرى الرحلان باستخدام الفولط المرتفع، ويتبع ذلك عمل تقنية الاستشراب Chromatography في الاتجاه المعاكس، وهذا مشابه للاستشراب الثنائي الاتجاه على الورق، أو الرحلان الثنائي الاتجاه على الورق أو على الهلامة الرقيقة Two dimensional thin layer.

2 - الرحلان الكهربائي القرصي (أو المتقطع)

يتم هذا النوع من الرحلان الكهربائي في وسط مكون من هلامة من عديد الأكريلاميد، ويوضع في أنابيب زجاجية، تكون غالباً بقطر 0.5سم وطول 7.5سم، توضع الأنابيب بشكل

رأسي بحيث تنفتح من الأعلى في حوض يحتوي على محلول دارىء، وبه القطب السالب، وهو عبارة عن سلك دائري من البلاتين، كما تنفتح من الأسفل في حوض مماثل يحتوي على محلول دارىء آخر، ويحتوي على القطب الموجب مشابه للقطب العلوي.

ومن أجل الاختصار والتسهيل، فقد وجد أن نظام تكوين طبقات هلامة عديد الأكريلاميد داخل العمود، واختلاف المحاليل الدارئة، وتقنيات أخرى تسهل فصل الجزيئات على شكل أقراص فوق بعضها، حسب شحنة هذه الجزيئات، بجانب حجم وشكل هذه الجزيئات، وهذه الطريقة تؤمن فصلاً جيداً شديد الوضوح.

أكثر استخدامات هذه الطريقة في فصل نظائر الإنظيمات Iso-Enzymes ولكن يمكن استخدامها في فصل أنواع الخضابات، عديد الببتيدات...الخ.

3 - الرحلان الكهربائي التحضيري

هذا النوع من الرحلان الكهربائي يستخدم في تحضير كميات كبيرة من الجزيئات المفصولة من خليط موجود فيها، مثال ذلك فصل البروتينات المختلفة الموجودة في كمية كبيرة من المصل.

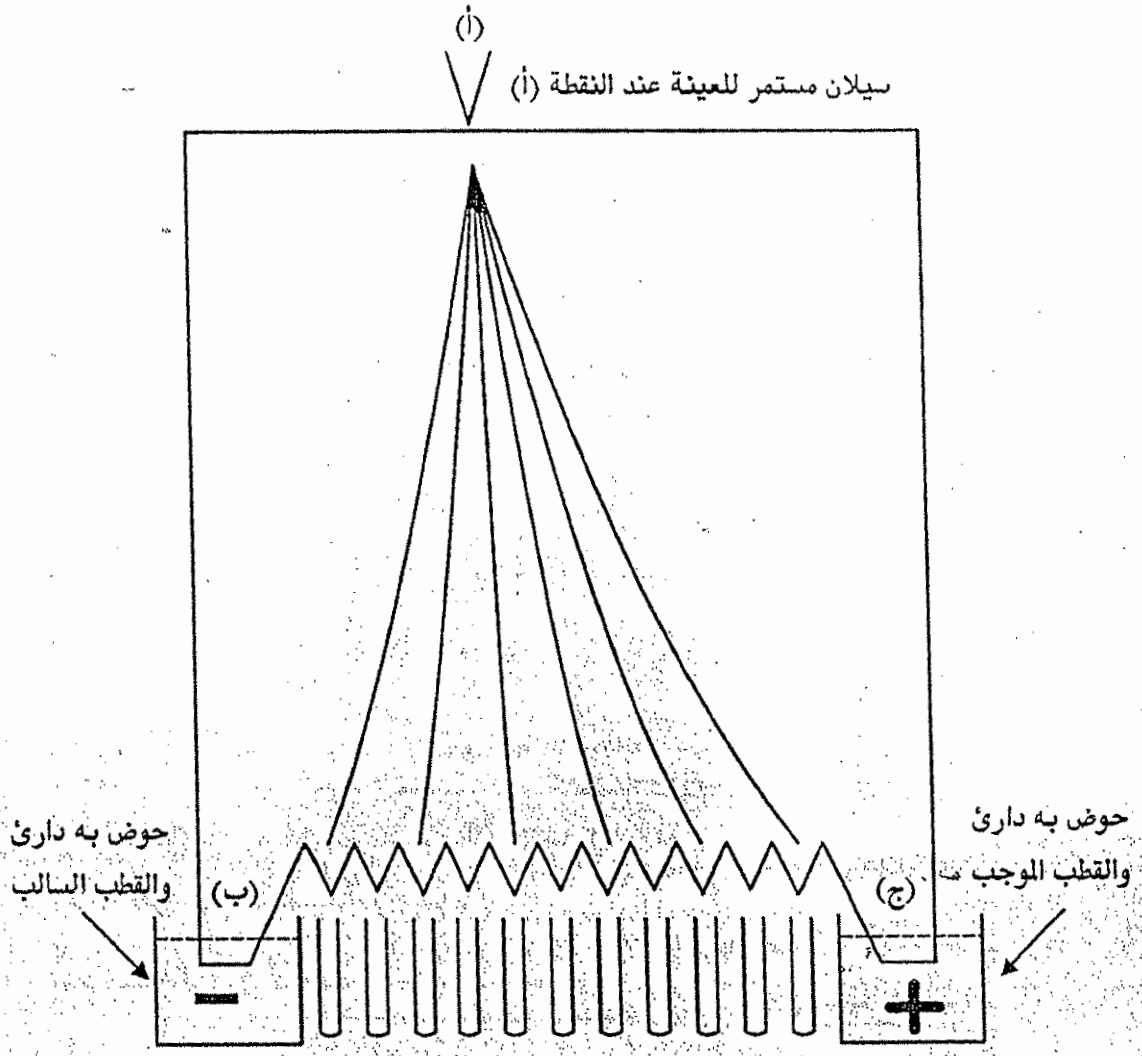
ويوضح (الشكل 35) هذا النوع من الرحلان حيث يتم على ورق ترشيح، حافتها العليا تغمس في حوض يحتوي على دارىء، أما الحافة السفلية فهي مسننة، وكل سن موجه إلى أنبوب، وطرفا الورقة السفليان مغموسان أيضاً في محلول دارىء، وأحد الطرفين يمثل القطب السالب أما الآخر فهو القطب الموجب.

توضع العينة التي يراد فصل الجزيئات فيها في أنبوب به سن رفيع، يدفع بكميات متساوية من المادة في وسط الحافة العليا للورق، وحين إمرار التيار الكهربائي تبدأ الجزيئات في أثناء نزولها على الورق بالانفصال عن بعضها، وعند النهاية السفلى يتم الفصل، ويترل كل نوع من البروتينات المختلفة في الأنابيب أسفل هذه الأسنان.

4 - الرحلان الكهربائي المناعي

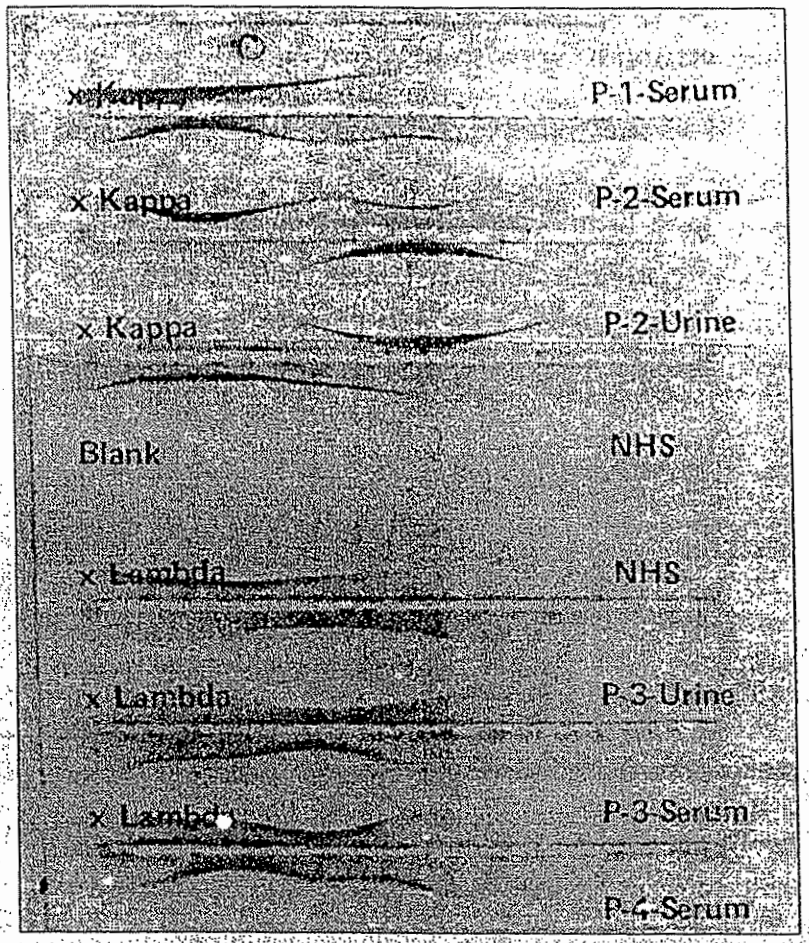
يتم هذا النوع من الرحلان الكهربائي بفصل الجزيئات على وسط الرحلان مثل الأغاروز، ولكي يتم إظهار الجزيئات المنفصلة عن بعضها، تضاف أضداد Antibodies هذه الجزيئات في قناة محفورة في الوسط المستعمل (الشكل 36)، يحدث انتشار لجزيئات الأضداد والمستضدات أحدهما باتجاه الآخر، وعندما يتقابلان، يترسبان، وتتكون نتيجة لذلك أقواس من معقدات من الضد والمستضد Antigen - antibody complex

الشكل (35) : الرحلان الكهربائي التحضيري



توضع العينة عند النقطة (أ)، وأحد طرفي الوسط (ب) الذي يجرى عليه الرحلان يغمس في الحوض المحتوي على المحلول الدارئ Buffer وتكون الشحنة سالبة به، أما الطرف الآخر (ج) فيوضع في الحوض الموجب، تمثل الخطوط الطرق التي تسلكها الجزيئات المختلفة والتي تصب في مجموعة من الأنابيب.

الشكل (36) : أمثلة للرحلان الكهربائي المناعي



P–1 = IgG Monoclonal Gammopathy, Kappa Type
P–2 = Kappa Light Chain Disease
P–3 = Lambda Light Chain Disease
P–4 = IgG Monoclonal Gammopathy, Lambda Type

توضع العينة (مصل أو بول) على وسط الرحلان (مثل الأغاروز)، ثم يُجرى الرحلان بشكل عادي، وبعد الفترة المحددة للرحلان، يضاف أضداد المادة أو المواد المراد الكشف عنها في قناة محفورة في الوسط المستعمل. تنتشر الأضداد والمستضدات باتجاه بعضهم، وحينما يتلاقوا، يحدث الترسيب ويظهر في شكل أقواس أو أهلة.

وهناك أنواع كثيرة من الرحلان الكهربائي المناعي، بعضها عام لجميع بروتينات المصل (وهذا قليل الاستعمال في الحاضر) (الشكل 35). ولكن الأكثر شيوعاً هو ما يستغل لواحد أو عدد محدد من البروتينات، ومن أمثلته الرحلان الكهربائي بشكل الصاروخ Rocket immuno electrophoresis.

5 - الرحلان الكهربائي المناعي بشكل الصاروخ

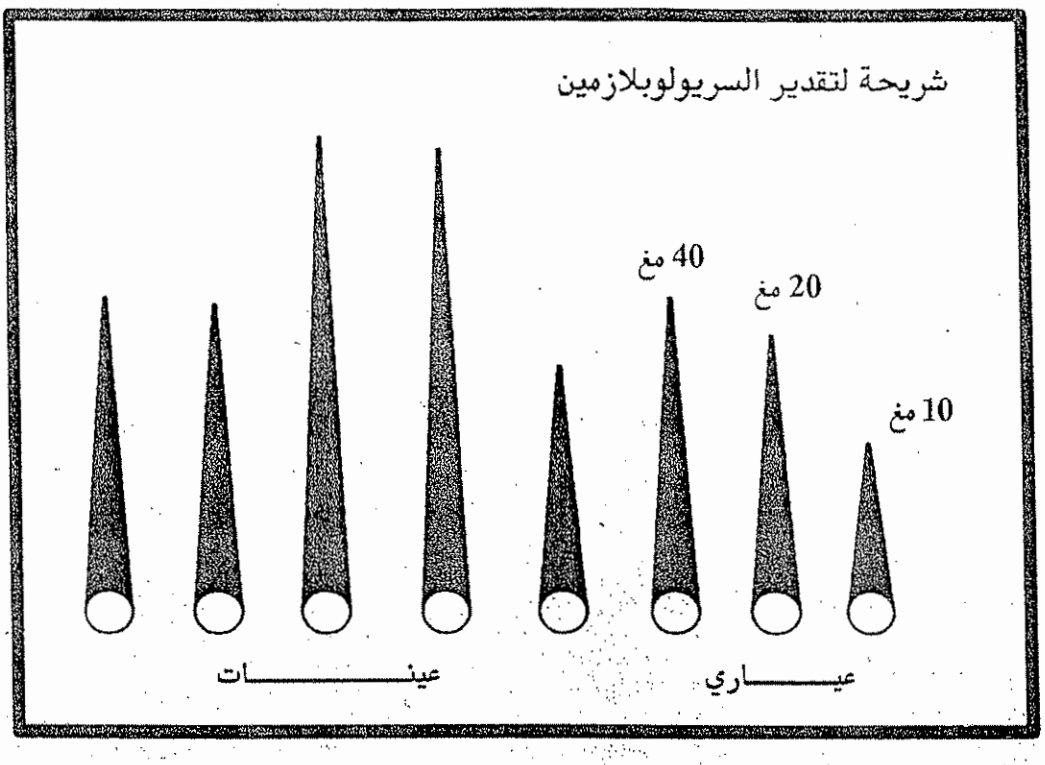
توضع على شريحة زجاجية مربعة (20 × 20 سم) طبقة من هلامة الأغار، المخلوط مع أضداد المادة المراد معرفة مقدارها، حوالي 2سم من الحافة السفلية يوجد صف من الحُفر الدائرية، كل منها يتسع لحوالي 5 ميكرون من العينة، وتترك ثلاث أو أربع حفر لوضع مصول عيارية متدرجة من نفس المادة المراد الكشف عنها (مثلاً السريولوبلازمين)، يجرى الرحلان على هذه الشريحة، فتتحرك جزيئات السريولوبلازمين في هلامة الأجار وتتحد في نفس الوقت مع أضدادها مكونة راسباً على شكل صاروخ ـــ طول هذا الصاروخ يتناسب طرداً مع كمية السريولوبلازمين في العينة أو العياري، كما يظهر في (الشكل 37).

6 - الرحلان البؤري عند نقطة التساوي الكهربائي

تحمل جزيئات البروتين ـــ كما سبق شرحه ـــ شحنات موجبة وسالبة على سطحها، وذكر أن كل نوع من البروتينات عند باهاء معين، تتساوى الشحنات السالبة والموجبة على سطحه، هذا الباهاء يطلق عليه نقطة التساوي الكهربائي Iso electric point (IEP)، وعندها لا تتحرك جزيئات البروتين في المجال الكهربائي، وتبقى في مكانها وترسب.

هذا هو مبدأ الرحلان البؤري عند نقطة التساوي الكهربائي Iso electric focusing، ويجرى هذا النوع من الرحلان إما في عمود يحتوي على هلامة من عديد الأكريلاميد Polycrylamide gel، أو فوق رقائق زجاجية مغطاة بهلامة من عديد الأكريلاميد، ويوجد في هذه الهلامة كَهْرَل مُذَنْذَب Ampholite ذو مجال معين من الباهاء (مثلاً من 5 ـــ 7)، أي أن الباهاء يتدرج في العمود أو على الرقيقة من 5 ـــ 7، وبالتالي فوضع عينة البروتين على هذا الوسط وإمرار التيار الكهربائي، سيحرك الجزيئات عبر هذا المجال من الباهاء، وحينما يصل أي نوع من البروتينات إلى نقطة تعادله الكهربائية، يتوقف عند هذه النقطة ويترسب مكوناً عصابة من هذا البروتين. أي أن كل بروتين سيترسب عند نقطة التساوي الكهربائي الخاصة به، هذا النوع من الرحلان الكهربائي يفيد في فصل كثير من أنواع البروتينات، والخضابات، ونظائر الإنظيمات... الخ.

الشكل (37) : الرحلان الكهربائي المناعي بشكل الصاروخ



يوضح على شريحة من القصدير أو الزجاج، طبقة رقيقة من هلامة الأغار agar المخلوط مع أضداد المادة المراد تقديرها كميتها. وحوالي 2 سم من الحافة السفلية يوجد صف من الحفر الدائرية التي تتسع لحوالي 5 ميكرون من العينة أو العياري ـ يجرى الرحلان فتتحرك جزيئات المادة المقاسة متحدة مع أضدادها، ومكونة ترسبات على شكل صاروخ ـ يمكن معرفة كمية المادة في العينة بمقارنتها بأشكال العياري.