Al-Mustaqbal University
Department of Medical Instrumentation Techniques Engineering
Stage: 2nd
Subject: Clinical Chemistry Instrumentations
Lecturer: Prof.Salih H.Kadhim
Lecture 3& 4

Spectrophotometer Instruments and Uses

A **spectrophotometer**: is a laboratory equipment that can measure the number of photons (the intensity of light) absorbed after passing through the solution of the sample. It can also detect the concentration of the solution by measuring the intensity of detected light.

مقياس الطيف الضوئي: هو جهاز مختبري يمكنه قياس عدد الفوتونات (شدة الضوء) الممتصة بعد مرورها بمحلول العينة. ويمكنه أيضًا اكتشاف تركيز المحلول عن طريق قياس شدة الضوء المكتشف.

The light : The light is a source of illumination, whether a natural one (like the sun) or an artificial one (like lamp) consists from a set of photons propagate in the medium as waves and it is a part of electromagnetic spectrum.

الضوء: الضوء

هو مصدر للإضاءة سواء كان طبيعياً (مثل الشمس) أو صناعياً (مثل المصباح) ويتكون من مجموعة من الفوتونات تنتشر في الوسط على شكل أمواج (شكل 1) وهو جزء من الطيف الكهرومغناطيسي.

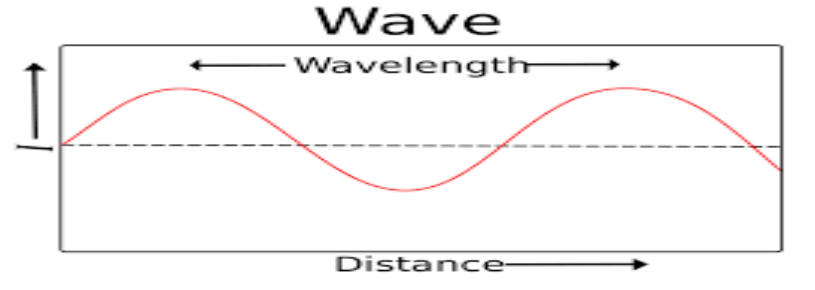
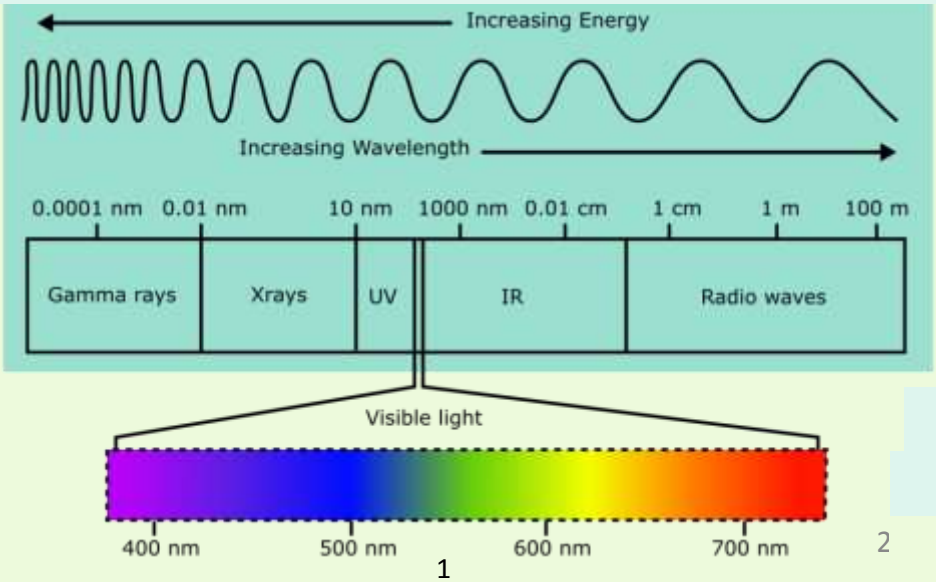
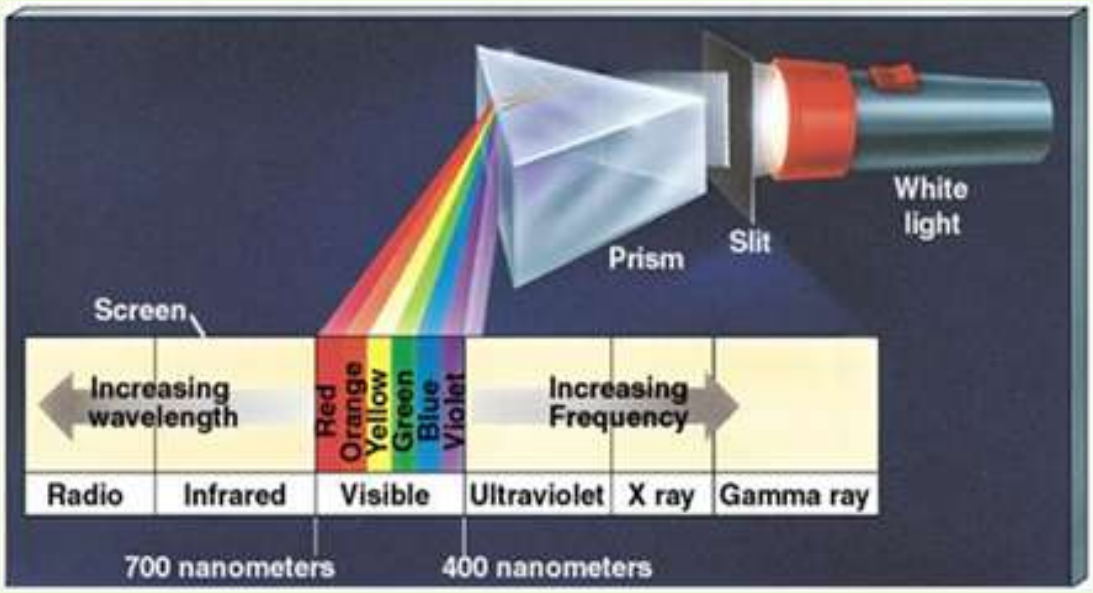


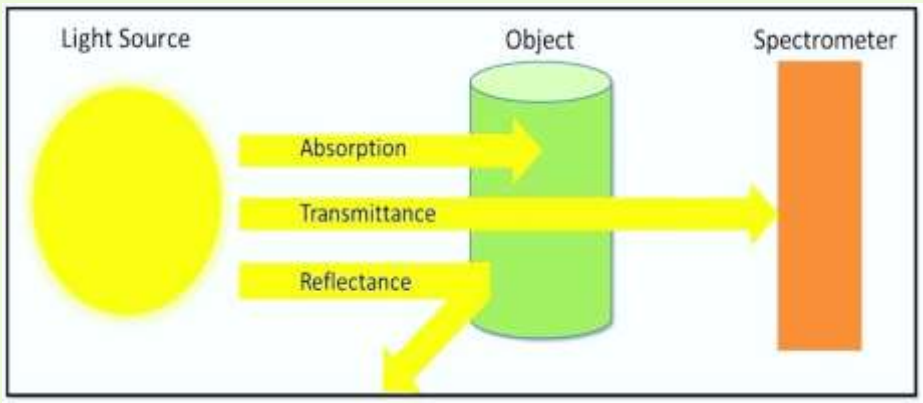
Figure1: Shape of wave of the light





Interaction of EM radiation with materials:

When radiation fall or pass through the matter, they are either absorbed, transmitted, or reflected as in figure 2:

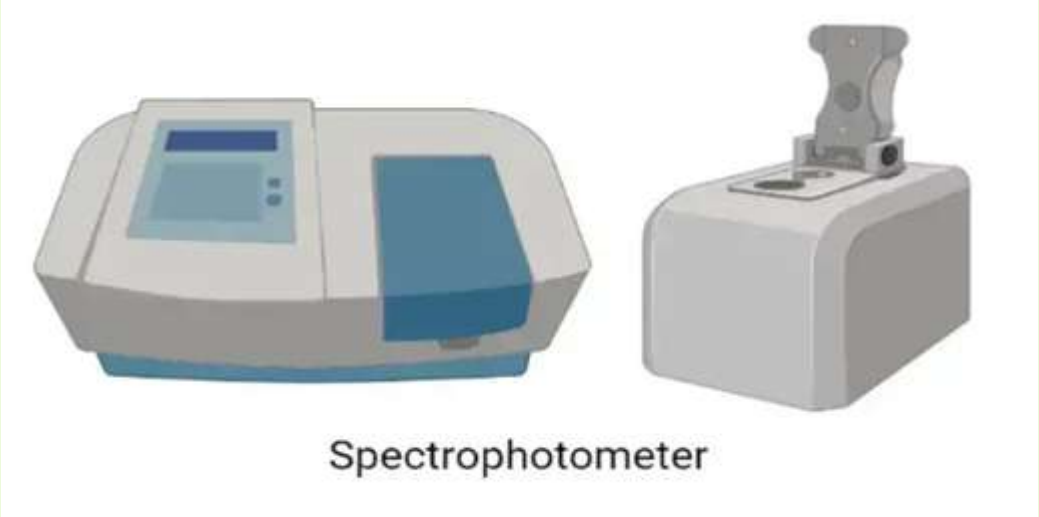


Spectrophotometry: is the **method** used by the spectrophotometer for **measuring the amount of light absorbed** by any chemical substance when a light beam passes through it.

القياس الطيفي: هي الطريقة التي يستخدمها مقياس الطيف الضوئي لقياس كمية الضوء التي تمتصها أي مادة كيميائية عند مرور شعاع ضوئي من خلالها.

The spectrophotometer: generally consists of two different devices: spectrometer and photometer. The spectrometer emits light of the desired wavelength, and the photometer detects the amount of light absorbed by the solution.

مقياس الطيف الضوئي: يتكون عمومًا من جهازين مختلفين؛ **المطياف** يبعث الضوء بالطول الموجي المطلوب و**المقياس الضوئي** ويكتشف كمية الضوء التي يمتصها المحلول



Spectrophotometer

Principle of Spectrophotometer:

A spectrophotometer is based on the Beer-Lambert law, which states that absorbance (amount of light absorbed) of the solution has a linear relationship with the length of light and the concentration of a sample.

يعتمد مقياس الطيف الضوئى على قانون بير لامبرت، الذي ينص على أن الامتصاص (كمية الضوء الممتصة) للمحلول له علاقة خطية مع طول الضوء وتركيز العينة

That is; $A \propto Cl$, Where; A= Absorbance, C= concentration of the sample

l= path length of light in sample

or, $A = \varepsilon cl$, where ε= molar extinction coefficient, the value of which is constant for a specific molecule. والتي تكون قيمتها ثابتة بالنسبة لجزيء معين

Here, A= -log (T)

Where T= Transmittance; the fraction of light passing through the sample, expressed as:

$T = I_t/I_o$

Here, I_t= transmitted light, and I_o= incident light.

Therefore, $A = -\log (I_t/I_o)$

Now, we know that a standard spectrophotometer uses a cuvette of the width of 1 cm, which is the path length of light in the sample. Since path length of light(L), absorbance (A), and molar extinction coefficient (ε) are known, the concentration of the solution (C) can now be calculated.

الآن، نحن نعلم أن مقياس الطيف الضوئى القياسى يستخدم حاوية نموذج(كيوفيت) عرضها 1 سم، وهو طول المسار. معروفان، فيمكن الآن حساب تركيز (ε) ، ومعامل الانقراض المولي(A) ، والامتصاص(L) وبما أن طول المسار (C) المحلول

Parts of Spectrophotometer: اجزاء مقياس الطيف الضوئي

A spectrophotometer consists of four general parts; light source, an optical system (monochromator), sample holder, and detector (photometer).

يتكون مقياس الطيف الضوئي من أربعة أجزاء عامة: مصدر الضوء، ونظام بصري (موحد اللون)، وحامل العينة، وكاشف (مقياس الضوء).

Light source:

Any spectrophotometer requires light of various wavelengths. Commonly tungsten lamp provides a visible spectrum of light in a spectrophotometer. Likewise, hydrogen and deuterium lamps provide ultraviolet radiation, and Nernst filament or globar provide IR (infrared) radiation, The emitted radiation from Nernst lamps lies in the **near infrared** range, from wavelengths (800 to 2,500 nm), **mid IR**(2500–25,000nm), **far IR** between(15000 - 10^6nm).

near-infrared region (12500 ~ 4000 cm^{-1}), mid-infrared region (4000 ~ 200 cm^{-1}) and far-infrared region (200 - 10 cm^{-1}).

$1nm=10^{-9}m=10^{-7}$ cm

يتطلب أي مقياس طيفي ضوئي ،ضوء بأطوال موجية مختلفة. عادةً ما يوفر مصباح التنكستن طيفًا مرئيًا من الضوء في مقياس الطيف الضوئي. وبالمثل، توفر مصابيح الهيدروجين والديوتريوم كمصدر للأشعة فوق البنفسجية، ويوفر خيوط نيرنست أو غلوبار الأشعة تحت الحمراء (الأشعة تحت الحمراء)

Optical system (monochromator): (النظام البصري (موحد اللون

An optical system of spectrophotometer consists of the following parts:

1- **Lenses**: It collects the radiation from the source and directs it into the slit.
2- **Entrance slit**: It provides a narrow image of the radiation.
3- **Collimator lens**: It depicts the light from the entrance slit parallel.
4- **Exit slit**: An aperture through which the emitted spectrum of the desired wavelength passes.

يتكون النظام البصري لجهاز قياس الطيف الضوئي من الأجزاء التالية:

- **العدسات:** تجمع الإشعاع من المصدر وتوجهه إلى الشق.
- **شق المدخل**: يوفر صورة ضيقة للإشعاع.
- **عدسات لامة** : تمرر الضوء بشكل متوازي من فتحة المدخل.
- **فتحة الخروج**: فتحة يمر من خلالها اختيار الطيف المطلوب للضوء المنبعث.

5- **Dispersive device**: A prism and grating function as dispersive devices. جهاز التشتيت
6- **Sample holder**(Cuvette) حامل العينة

The sample solution is placed in the cuvette (glass tubes) directly before the detector and after the dispersive device. Cuvette varies from test tubes because it has uniform thickness and optical path length. Usually, the cuvette is made up of glass or quartz.

يتم وضع محلول العينة في الكيوفيت (الأنابيب الزجاجية) مباشرة قبل الكاشف وبعد جهاز التشتيت. يختلف الكيوفيت عن أنابيب الاختبار لأنه يتميز بسماكة موحدة وطول مسار بصري. عادةً ما يتكون من الزجاج أو الكوارتز.

Detector (photometer): كاشف (مقياس ضوئي)

After the desired light passes through the sample solution in the cuvette, the photometer detects the photons and gives the signals to the galvanometer for digital display

بعد مرور الضوء المطلوب عبر محلول العينة في الكيوفيت، يكتشف مقياس الضوء الفوتونات ويعطي الإشارات إلى الكلفانوميتر للعرض الرقمي

Working Mechanism of Spectrophotometer: آلية عمل جهاز المطياف الضوئي

- Using the spectrophotometer requires calibration of the machine using standard solutions of known concentration.
- Depending on the solution, a specific wavelength of light is selected for the test. The ray of light passes through the diffraction grating, prism and mirror before reaching the solution.
- The mirror is for light navigation in the spectrophotometer, and the prism splits the light into different wavelengths.

-يتطلب استخدام مقياس الطيف الضوئي معايرة الجهاز باستخدام المحاليل القياسية ذات التركيز المعروف.
- اعتمادا على المحلول، يتم اختيار طول موجي معين من الضوء للاختبار. يمر شعاع الضوء عبر محزوز الحيود والموشور والمرآة قبل أن يصل إلى المحلول.
-المرآة مخصصة للتنقل الضوئي في مقياس الطيف الضوئي، ويقوم المنشور بتقسيم الضوء إلى أطوال موجية مختلفة

- The light diffraction grating allows only the desired wavelength of light to pass through it.
- Then the light reaches the cuvette with solution (test/standard). When monochromatic light reaches the cuvette, some are absorbed, some are reflected, and the remaining parts are transmitted.

- محزز حيود الضوء يسمح فقط للطول الموجي المطلوب للضوء بالمرور عبرها.

- ثم يصل الضوء إلى الكيوفيت مع المحلول (اختبار/قياسي). عندما يصل الضوء أحادي اللون إلى الكيوفيت، يتم امتصاص بعضه، وينعكس البعض الآخر، وتنفذ الأجزاء المتبقية

- After that, the photodetector system detects the transmitted light, which measures its intensity and converts it into the electrical signals sent to the galvanometer.

- Now the galvanometer measures the received signal and displays it in digital form; it is the absorbance of the solution.

بعد ذلك يقوم نظام الكاشف الضوئي بكشف الضوء المرسل، والذي يقوم بقياس شدته وتحويله إلى إشارات كهربائية مرسلة إلى الكلفانوميتر.

الآن يقيس الكلفانوميتر الإشارة المستقبلة ويعرضها في شكل رقمي. إنها امتصاصية المحلول •

- The concentration of the solution is calculated after determining the absorbance by using the formula; C= A/εL, where A is absorbance, C is the concentration of the solution, L is path length, and ε is the molar extinction coefficient.
- A simple exception in a double beam spectrophotometer is that the monochromatic light splits into two beams, one for the standard solution and another for the test solution. In this type of spectrophotometer, the processing of the test and the standard solution occurs together.

الاستثناء البسيط في مقياس الطيف الضوئي ذي الشعاع المزدوج هو أن الضوء أحادي اللون ينقسم إلى شعاعين، أحدهما للمحلول القياسي والآخر لمحلول الاختبار. في هذا النوع من مقياس الطيف الضوئي، تتم معالجة الاختبار والمحلول القياسي معا

Types of Spectrophotometer:

Depending on the range of wavelength of the light spectrophotometer is of two types, that are:

أنواع مقياس الطيف الضوئي:

اعتمادًا على مدى الطول الموجي لجهاز قياس الطيف الضوئي هو نوعان هما

1-UV-visible spectrophotometer:مقياس الطيف الضوئي المرئي فوق البنفسجي

It uses light over the ultraviolet range (185-400 nm) and visible range (400-700 nm) of the electromagnetic radiation spectrum.

2-IR spectrophotometer:

It uses the wavelength of light over the infrared range (700-1500 nm) of the electromagnetic radiation spectrum.

Single beam spectrophotometer:

It operates between 325-1000 nm wavelength using only a light beam. The light travels in a single direction, and the test solution and the blank solution are read in the same cuvette one after another.

يعمل بطول موجي يتراوح بين 325-1000 نانومتر باستخدام شعاع ضوئي فقط. ينتقل الضوء في اتجاه واحد، ويتم قراءة محلول الاختبار ومحلول البلانك في نفس الكيوفيت واحدًا تلو الآخر

Double beam spectrophotometer :

It works between 185-1000 nm wavelength. The two photocells split the light from the monochromator into two beams. A beam is used for reference, and another is used for the reading samples.

يعمل بين الطول الموجي 185-1000 نانومتر. تقوم الخليتان الكهروضوئيتان بتقسيم الضوء الصادر من جهاز موحد اللون إلى شعاعين. يتم استخدام شعاع للمرجع، ويتم استخدام الآخر لعينات القراءة

Double Beam UV-VIS Spectrophotometer:

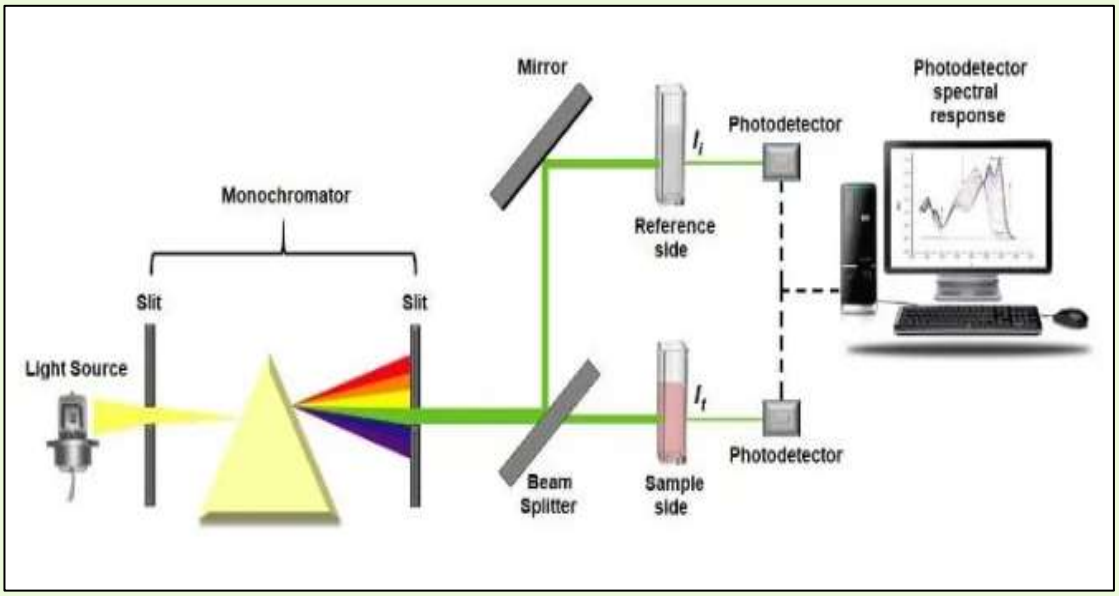
A double beam UV visible spectrophotometer is somewhat the same as the double beam spectrophotometer in working. A typical double beam UV-visible spectrophotometer consists of :

إن مقياس الطيف الضوئي المرئي و فوق البنفسجي ذو الشعاع المزدوج يشبه إلى حد ما مقياس الطيف الضوئي مزدوج الشعاع في العمل. يتكون مقياس الطيف الضوئي النموذجي مزدوج الشعاع للأشعة المرئية و فوق البنفسجية من:

A light or energy source, which is typically a lamp.
A filter or a monochromator that is attached to the device for the selection of the wavelength of light.
A place for cuvettes to read the measurements

- مصدر الضوء أو الطاقة، والذي يكون عادةً مصباحًا.
- مرشح أو موحد اللون متصل بالجهاز لاختيار الطول الموجي للضوء.

مكان للكيوفيت لقراءة القياسات ·



Uses of Spectrophotometer استخدامات جهاز المطياف الضوئي

The uses of a spectrophotometer are as follows:

- A spectrophotometer is used for the quantitation of nucleic acid (DNA or RNA).
- It determines the concentration of color and colorless compounds by measuring the absorbance of the solution. It can also determine the concentration of biological materials like nucleic acid and proteins.
- Similarly, it determines the phase of reaction by measuring the formation and disappearance rate of the light-absorbing compounds in the range of the visible and UV region of the electromagnetic spectrum.
- It also identifies compounds by determining the absorption spectrum in the visible region of the light and the UV region of the electromagnetic spectrum.

• يتم استخدام مقياس الطيف الضوئي لتقدير كمية الحمض النووي (DNA أو RNA).

• يحدد تركيز المركبات الملونة وعديمة اللون عن طريق قياس امتصاص المحلول. ويمكنه أيضًا تحديد تركيز المواد البيولوجية مثل الحمض النووي والبروتينات.

• وبالمثل، فإنه يحدد مرحلة التفاعل عن طريق قياس معدل تكوين واختفاء المركبات الممتصة للضوء في نطاق المنطقة المرئية والأشعة فوق البنفسجية من الطيف الكهرومغناطيسي.

• كما أنه يتعرف على المركبات عن طريق تحديد طيف الامتصاص في المنطقة المرئية للضوء ومنطقة الأشعة فوق البنفسجية للطيف الكهرومغناطيسي

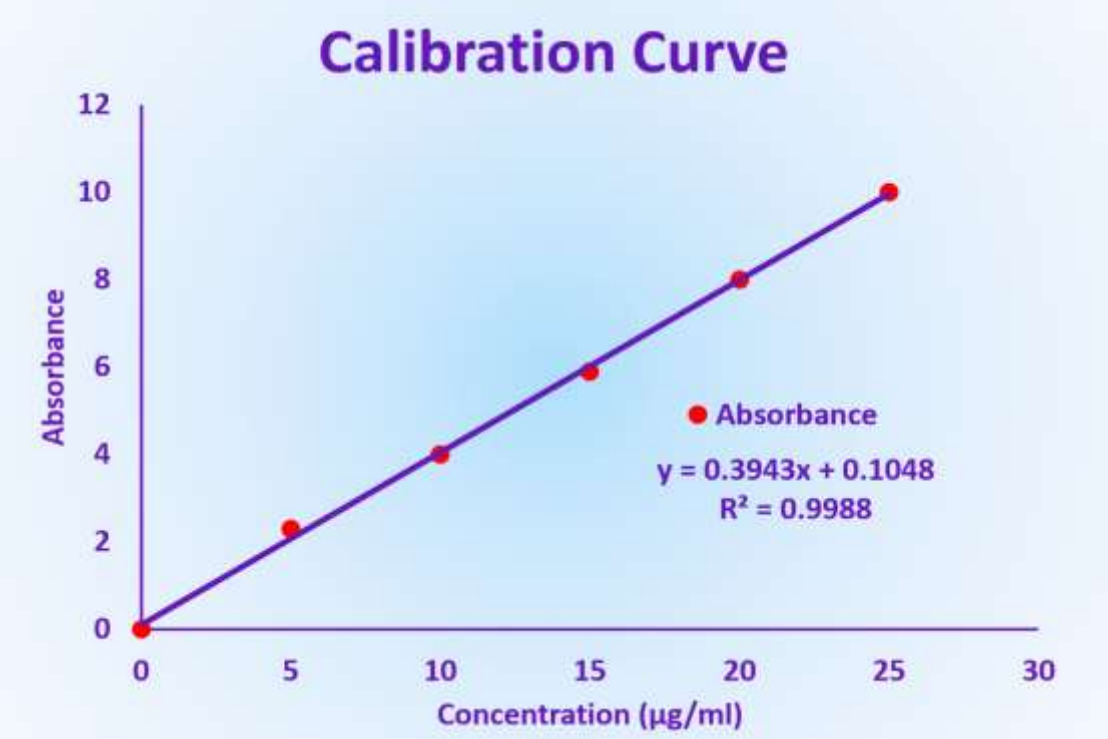
The calibration curve:

The calibration curve is a plot of instrumental signal vs. concentration. The plot of the standards should be linear, and can be fit with the equation y=mx+b ,where m is the slope of the line and b is the intercept. x and y represent the distance of the line from the x-axis and y-axis, respectively.

The non-linear portions of the plot should be discarded, as these concentration ranges are out of the limit of linearity.

منحنى المعايرة عبارة عن رسم لإشارة الجهاز مقابل التركيز. يجب أن يكون الرسم خط مستقيم، ويمكن أن يتوافق مع المعادلة y=mx+b، حيث m هو ميل الخط وb هو التقاطع. تمثل x وy مسافة الخط من المحور x والمحور y على التوالي.

وينبغي التخلص من الأجزاء غير الخطية للرسم، حيث أن نطاقات التركيز هذه خارج حدود الخطية



Preventive Measures: اجراءات وقائية

- The spectrophotometer should be turned on 10 to 15 minutes before use.
- The device should be calibrated each time.
- The selected wavelength should be the maximum wavelength that the solution can absorb.
- The sample used should not contain any substance which can dissociate, react or change during the measurement.
- Since the absorbance depends on the concentration, sample preparation should be within the acceptable concentration range.

- يجب تشغيل مقياس الطيف الضوئي لمدة 10 إلى 15 دقيقة قبل الاستخدام.
- يجب معايرة الجهاز في كل مرة.
- يجب أن يكون الطول الموجي المحدد هو الحد الأقصى للطول الموجي الذي يمكن للمحلول امتصاصه.
- يجب ألا تحتوي العينة المستخدمة على أي مادة يمكن أن تتفكك أو تتفاعل أو تتغير أثناء القياس.
- بما أن الامتصاص يعتمد على التركيز، يجب أن يكون تحضير العينة ضمن نطاق التركيز المقبول.