

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΑ

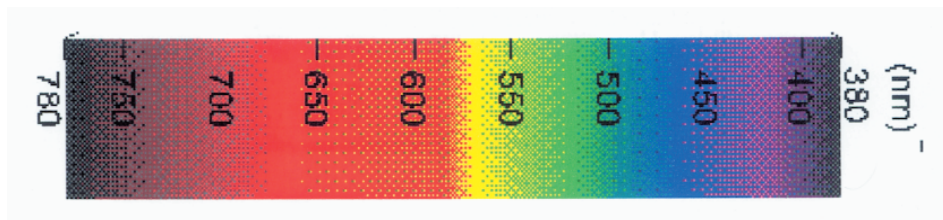
9.1. Γενικά περί φάσματος

Με τον όρο φωτομετρία εννοούμε τη μέτρηση της ικανότητας ενός διαλύματος να επιτρέπει τη διέλευση φωτός, με στόχο τη μέτρηση της συγκέντρωσης φωτο-απορροφητικών ουσιών (δηλ. ουσιών που απορροφούν φως) μέσα στο διάλυμα. Το φάσμα του φωτός διαιρείται σε τρεις περιοχές:

- Στην **υπεριώδη** περιοχή (ultraviolet), που είναι αόρατη στο μάτι, με μήκος κύματος ακτινοβολίας 185 - 380 nm.
- Στην **ορατή** περιοχή (visible), που είναι ορατή στο μάτι, με μήκος κύματος ακτινοβολίας 380 -780 nm.
- Στην **υπέρυθρη** περιοχή (infrared), που είναι αόρατη στο μάτι, με μήκος κύματος ακτινοβολίας 800 - 1500 nm.

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνεται, για την περιοχή του ορατού, το χρώμα του φωτός για διαφορετικά μήκη κύματος.

Μήκος κύματος λ (nm)	Χρώμα Απορροφούμενου Φωτός
390-435	Ιώδες
435-490	Μπλε
490-580	Πράσινο
580-595	Κίτρινο
595-650	Πορτοκαλί
650-780	Κόκκινο



Σχήμα 9.1. Τα χρώματα της ορατής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος

Το φως της ημέρας είναι μείγμα ή φάσμα διαφόρων μηκών κύματος. Στη φωτομετρία, για τους προσδιορισμούς προτιμάμε να έχουμε απομονώσει ορισμένες περιοχές του φάσματος. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνουμε καλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια μετρήσεων.

9.2. Αρχή λειτουργίας φασματοφωτομέτρου

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στο ότι πολλές χημικές ουσίες κλινικού ενδιαφέροντος επιλεκτικά απορροφούν ή εκπέμπουν φως διαφορετικών μηκών κύματος (δηλ. χρωμάτων). Οι ουσίες αυτές σε ένα διάλυμα, αντιδρώντας με άλλες ουσίες, παίρνουν συγκεκριμένο χρώμα και χρωματίζουν το διάλυμα. Η ένταση του χρώματος σ' αυτά τα διαλύματα είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας στο διάλυμα. Έτσι, ένα διάλυμα που έχει μικρή ποσότητα της ουσίας είναι ωχρο, ενώ, αν περιέχει μεγάλη ποσότητα, το χρώμα είναι πιο έντονο.

Αυτά τα διαλύματα μπορούν να απορροφήσουν φως ορισμένου μήκους κύματος της ορατής περιοχής που περνά μέσα από αυτά. Η ακτινοβολία (το φως) που απορροφάται είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας. Αν η συγκέντρωση της ουσίας είναι μικρή, η ένταση του χρώματος θα είναι και αυτή μικρή και το φως που θα απορροφηθεί λίγο. Αντίθετα, αν η συγκέντρωση είναι μεγάλη, το χρώμα θα είναι έντονο και το φως που θα απορροφήσει το διάλυμα περισσότερο.

Η μέτρηση της έντασης του προσπίπτοντος προς το εξερχόμενο φως σε ένα διάλυμα, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας στο διάλυμα. Η συγκέντρωση αυτή υπολογίζεται βάσει του νόμου του Lambert, που συνδέει την απορρόφηση με το μήκος της διαδρομής του φωτός, και το νόμο του Beer, που συνδέει την απορρόφηση με τη συγκέντρωση της ουσίας. Ο συνδυασμός αυτών των δύο νόμων εκφράζει τη σχέση προσπίπτουσας

προς εξερχόμενη ένταση φωτός. Ο λόγος της προσπίπτουσας προς εξερχόμενη ένταση φωτός είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας που απορροφάται στο διάλυμα και την απόσταση που διανύει το φως σε αυτό. Τα παραπάνω συνοψίζονται στην ακόλουθη σχέση:

$$A = a L C (I)$$

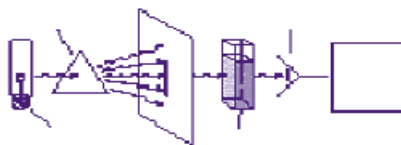
όπου **A** = απορρόφηση
a = συντελεστής απορρόφησης (σταθερός για κάθε ουσία)
L = μήκος διαδρομής φωτός
C = συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά

Η σχέση (I) είναι πολύ σημαντική, γιατί πάνω της βασίζεται η λειτουργία των φασματοφωτόμετρων. Ο συντελεστής απορρόφησης *a* αποτελεί σταθερά για κάθε ουσία, ενώ το μήκος της διαδρομής του φωτός καθορίζεται από τη διάσταση του μικρού δοχείου (κυβέττα), στο οποίο βρίσκεται το διάλυμα. Έτσι η απορρόφηση του φωτός από την ουσία μεταβάλλεται μόνο με τη συγκέντρωσή της, δηλαδή η απορρόφηση για ορισμένη διαδρομή φωτός είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα. Πρέπει να τονιστεί ότι ο νόμος των Lambert-Beer ισχύει αυστηρά και μόνο για μονοχρωματικό φως, δηλαδή για φως με συγκεκριμένο μήκος κύματος (π.χ. 525 nm - πράσινο), και μόνο στην περίπτωση που το διάλυμα είναι έγχρωμο. Όταν δεν είναι, πρέπει να γίνει έγχρωμο με την προσθήκη ανάλογων αντιδραστηρίων, τα οποία οδηγούν στη δημιουργία προϊόντος που παρουσιάζει απορρόφηση στην περιοχή του ορατού. Η χρήση αντιδραστηρίων είναι συνήθως απαραίτητη, γιατί τα συστατικά του αίματος και των ούρων δεν παρουσιάζουν στη φυσική τους μορφή τα επιθυμητά οπτικά χαρακτηριστικά.

9.3. Περιγραφή φασματοφωτόμετρου

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι όλα τα φωτόμετρα των κλινικών εργαστηρίων δουλεύουν με βάση την παραπάνω αρχή. Μια βασική διαφορά μεταξύ τους είναι στον τρόπο που επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος (δηλ. το επιθυμητό χρώμα) για την κάθε εξέταση. Αυτό γίνεται είτε με απλά φίλτρα, οπότε πρόκειται για φωτόμετρα, είτε με μια διάταξη που ονομάζεται μονοχρωμάτορας, οπότε πρόκειται για φασματοφωτόμετρα, που καλύπτουν ευρεία περιοχή του φάσματος. Στη συνέχεια, περιγράφονται τα βασικά τμήματα ενός συνηθισμένου φασματοφωτόμετρου.

- **Φωτεινή Πηγή.** Ο ρόλος της φωτεινής πηγής είναι η παροχή φωτός ικανοποιητικής λαμπρότητας και εύρους φάσματος για την πραγματοποίηση

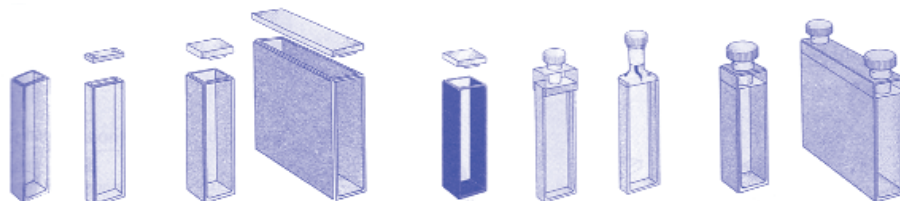


Σχήμα 9.2. Τα βασικά μέρη ενός φασματοφωτόμετρου, όπου διακρίνονται από τα αριστερά: ο λαμπτήρας, ο μονοχρωμάτορας, η κυβέττα, ο ανιχνευτής και η συσκευή ανάγνωσης αποτελεσμάτων

της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Μια πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη πηγή, για την περιοχή του ορατού, είναι ο λαμπτήρας βολφραμίου (tungsten) που παρέχει φως συνεχούς φάσματος και παρουσιάζει ευκολία στην αντικατάσταση. Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα έχουν δύο λαμπτήρες, για να καλύπτεται τόσο η υπεριώδης (με λαμπτήρες υδραργύρου, δευτερίου ή υδρογόνου) όσο και η ορατή περιοχή του φάσματος. Η τοποθέτηση του λαμπτήρα στο όργανο είναι τέτοια, ώστε το παραγόμενο φως να κατευθύνεται προς την επακόλουθη διάταξη επιλογής του μήκους κύματος και από εκεί προς την κυβέττα, μέσω μιας ειδικής σχισμής.

- **Μονοχρωμάτορας.** Είναι το σύστημα που απομονώνει ακτινοβολία ενός ορισμένου μήκους κύματος και που αποκλείει το πέρασμα του φωτός με άλλα μήκη κύματος. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι μονοχρωμάτορας είναι τα φίλτρα, τα πρίσματα και τα πλέγματα. Τα φίλτρα είναι συνήθως κατασκευασμένα από γυαλί ορισμένου χρώματος, ανάλογα με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που πρέπει να περάσει. Δεν είναι μονοχρωμάτορες με την αυστηρή σημασία του όρου, αφού επιτρέπουν να περνά ακτινοβολία όχι μόνο ενός μήκους κύματος αλλά ενός σχετικά μεγάλου εύρους μηκών κύματος. Τα φίλτρα χρησιμοποιούνται από τα περισσότερα φωτόμετρα στη ρουτίνα και από πολλούς μεγάλους αυτόματους αναλυτές για την απομόνωση τμημάτων του φάσματος. Τα πρίσματα αναλύουν το φως που παράγεται από την πηγή (λευκό φως) στα χρώματά του, δηλ. κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο, πράσινο, μπλε, ιώδες, απ' όπου το επιθυμητό μήκος κύματος μπορεί να επιλεγεί. Τα πλέγματα αποτελούνται από μια επιφάνεια που έχει επιστρωθεί με μια λεπτή γυαλιστερή μεταλλική στιβάδα πάνω στην οποία έχουν χαραχθεί αυλάκια. Το φως, πέφτοντας πάνω στα αυλάκια, κάμπτεται και η γωνία κάμψης (διάθλασης) καθορίζει το μήκος κύματος του εξερχόμενου φωτός.
- **Κυβέττα.** Οι κυβέττες είναι μικρά, ορθογωνικής, τετραγωνικής ή κυλινδρικής διατομής δοχεία που παρεμβάλλονται στην πορεία της δέσμης του μονοχρωματικού φωτός και μέσα στις οποίες βρίσκεται το προς εξέταση

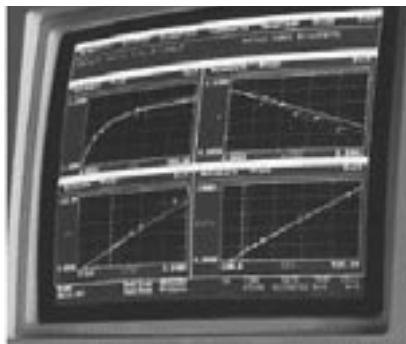
διάλυμα. Σε ιδανικές συνθήκες, το υλικό της κυβέττας πρέπει να παρουσιάζει πλήρη διαπερατότητα στο χρησιμοποιούμενο φως, δηλαδή να έχει τέτοια συμπεριφορά, ώστε να μην αλλάζει τα χαρακτηριστικά της φωτεινής δέσμης. Οι κυβέττες κατασκευάζονται συνήθως από γυαλί, χαλαζία ή πλαστικό και η επιλογή τους σε κάθε εφαρμογή εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που θα χρησιμοποιηθεί. Επίσης, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της διαδρομής του φωτός που παρέχει η κυβέττα (το L στον νομο των Lambert-Beer), τόσο πιο ακριβής θα είναι και η μέτρηση της συγκέντρωσης. Στην πράξη, έχει καθιερωθεί να είναι συνήθως 1 cm το μήκος αυτό.



Σχήματα 9.3. Κυβέττες φασματοφωτόμετρων

- **Ανιχνευτής.** Ως ανιχνευτής της εξερχόμενης από το διάλυμα ακτινοβολίας χρησιμοποιείται η φωτοδίοδος, το φωτοτρανζίστορ, οι φωτολυχνίες ή οι φωτοπολλαπλασιαστές. Το βασικό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω είναι ότι έχουν μια φωτοευαίσθητη επιφάνεια, από την οποία ελευθερώνονται ηλεκτρόνια, όταν εκτεθεί σε ακτινοβολία, δηλ. σε φως, και ο αριθμός αυτών των ηλεκτρονίων είναι ανάλογος με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι παράγεται ρεύμα ανάλογο με τη συγκέντρωση του διαλύματος. Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα σήμερα χρησιμοποιούν φωτοπολλαπλασιαστές.
- **Συσκευές ανάγνωσης αποτελεσμάτων.** Το ηλεκτρικό ρεύμα που δημιουργείται στον ανιχνευτή πηγαίνει στη συσκευή ανάγνωσης αποτελεσμάτων. Η μέτρηση γίνεται άμεσα μετά την ενίσχυση του σήματος. Σε πολλά σύγχρονα φασματοφωτόμετρα έχουν ενσωματωθεί μικροεπεξεργαστές, που κάνουν μετατροπή των τιμών της απορρόφησης σε τιμές συγκέντρωσης. Επίσης μπορούν να διατηρούν στη μνήμη τους δεδομένα που αφορούν στην τεχνική, όπως ο χρόνος επώασης ή οι συντελεστές και τιμές από καμπύλες βαθμονόμησης. Ο καταγραφέας που είναι συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο επιτρέπει την εκτύπωση των αποτελεσμάτων και τη διατήρησή τους σε αρχείο. Μια άλλη σπουδαία χρησιμότητα του

καταγραφέα, σε ορισμένα φασματοφωτόμετρα, είναι η ανίχνευση ουσιών, π.χ. φάρμακα, όπου γίνεται συνεχής καταγραφή της απορρόφησης σε σχέση με το μήκος κύματος. Η καμπύλη που προκύπτει ονομάζεται φάσμα απορρόφησης και είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία.



Σχήμα 9.4. Οθόνη ανάγνωσης αποτελεσμάτων

9.4. Φωτομέτρηση

Η φωτομέτρηση αρχίζει από τη στιγμή που προστεθούν τα κατάλληλα αντιδραστήρια στο διάλυμα που περιέχει την προς εξέταση ουσία, ώστε να γίνει έγχρωμο και να απορροφά ορισμένα μήκη κύματος (χρώματα) και να εκπέμπει άλλα.

9.4.1. Διαλύματα

Τα διαλύματα που συμμετέχουν σε μια φασματοφωτομετρική μέτρηση είναι:

- **Εξεταζόμενο διάλυμα.** Είναι το διάλυμα που περιέχει την ουσία της οποίας την συγκέντρωση θέλουμε να μετρήσουμε.
- **Τυφλό διάλυμα.** Είναι το διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια και έχει υποστεί όλη τη διαδικασία της εξέτασης, αλλά δεν περιέχει το εξεταστέο δείγμα.
- **Πρότυπο (Standard).** Είναι το διάλυμα που περιέχει ορισμένη ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας, συνήθως όση είναι ο μέσος όρος των φυσιολογικών τιμών της.

9.4.2. Εκτέλεση

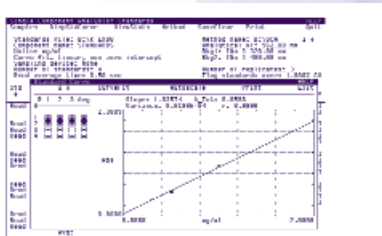
Η διαδικασία που ακολουθείται σε μια φασματοφωτομετρική μέτρηση αποτελείται από τα παρακάτω βήματα:

1. Ανάβουμε το φασματοφωτόμετρο αρκετή ώρα πριν από τη χρήση του, για να σταθεροποιηθεί το ρεύμα. Διαλέγουμε το κατάλληλο φίλτρο, ανάλογα με το χρώμα του εξεταστέου διαλύματος. Ελέγχουμε το μηδενισμό του οργάνου είτε με άδεια κυβέττα ή με νερό ή standard, ανάλογα με τις εξετάσεις.
2. Φωτομετρούμε το τυφλό στην ειδική θέση και μηδενίζουμε για το τυφλό, γιατί συνήθως παρατηρείται μια μικρή ή και μεγάλη απόκλιση.
3. Φωτομετρούμε το πρότυπο (standard) της εξεταζόμενης ουσίας και σημειώνουμε την ένδειξη της απορρόφησης.
4. Φωτομετρούμε το εξεταζόμενο διάλυμα και σημειώνουμε την ένδειξη της απορρόφησης. Αν έχουμε πολλά δείγματα ορών, συνεχίζουμε τη φωτομέτρηση και των άλλων δειγμάτων σημειώνοντας κάθε φορά την ένδειξη του φωτόμετρου για το κάθε δείγμα χωριστά. Στο διάστημα των φωτομετρήσεων αυτών ελέγχουμε συχνά το μηδενισμό του οργάνου δοκιμάζοντας ενδιάμεσα με το τυφλό και μηδενίζοντας το όργανο, αν χρειαστεί, ανάλογα πάντα με το τι μετράμε.
5. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση.

9.4.3. Υπολογισμός

Ο υπολογισμός γίνεται συνήθως με δυο τρόπους,

- Με σύγκριση προς το πρότυπο διάλυμα. Εφαρμόζεται στις περισσότερες εξετάσεις και πάντα σε προσδιορισμούς που δε γίνονται καθημερινά ή που γίνονται μεμονωμένα ή που επηρεάζονται από αστάθμητους παράγοντες. Βασίζεται στη σύγκριση του χρώματος του πρότυπου διαλύματος (standard) με το χρώμα του εξεταζόμενου. Προϋποθέτει αριθμητικές πράξεις.
- Με ανάγνωση της αντίστοιχης τιμής σε καμπύλη. Εφαρμόζεται σε φωτομετρικούς προσδιορισμούς που γίνονται καθημερινά, για να αποφύγουμε τη χρήση κάθε φορά πρότυπου διαλύματος, καθώς και τις αριθμητικές πράξεις για κάθε δείγμα. Η τεχνική της παρασκευής της καμπύλης περιλαμβάνει τις εξής φάσεις:
 - Παρασκευή πρότυπου διαλύματος γνωστής περιεκτικότητας.
 - Παρασκευή αραιώσεων του πρότυπου διαλύματος.
 - Προσδιορισμό της ουσίας.
 - Φωτομέτρηση.
 - Σχεδιασμό της καμπύλης.
 - Ανάγνωση.



Σχήμα 9.5. Καμπύλη υπολογισμού αποτελεσμάτων

9.5. Σωστή χρήση

Για κάθε καινούργιο φωτόμετρο που θα μπει στο εργαστήριο πρέπει να γίνουν προσδιορισμοί με διαλύματα των κατασκευαστών. Επίσης, να γίνουν καμπύλες με τα αντιδραστήρια του εργαστηρίου και να μη χρησιμοποιούμε τις καμπύλες που δίνει έτοιμες ο κατασκευαστής. Σε κάθε αλλαγή λυχνίας ή αντιδραστηρίων πρέπει να γίνονται νέες καμπύλες. Πρέπει να ελέγχεται συχνά η σταθερότητα των προτύπων διαλυμάτων με νέες καμπύλες. Τέλος, κάποια ακόμη σημεία που χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή είναι:

- Τα οπτικά στοιχεία του οργάνου (φίλτρα, κυβέττες κτλ.) δεν πρέπει να πιάνονται από τις επιφάνειες διέλευσης του φωτός.
- Μετά από κάθε μέτρηση, οι κυβέττες να καθαρίζονται με απαλό απορρυπαντικό και δις αποσταγμένο νερό. Πρέπει βέβαια να αποθηκεύονται σε κλειστό κουτί και να μην εκτίθενται σε σκόνη.
- Να σβήνει ο λαμπτήρας, όταν δεν πραγματοποιείται μέτρηση.
- Να μην αφήνονται χρησιμοποιημένες κυβέττες στο φωτόμετρο.
- Το όργανο πρέπει να τοποθετείται σε στερεό πάγκο, να μην εκτίθεται άμεσα σε ηλιακή ακτινοβολία, όπως κοντά σε παράθυρο.

Ειδική προσοχή πρέπει να δίνεται σε σκόνες και καπνούς (π.χ. τσιγάρα), γιατί μπορεί να επηρεάσουν τα οπτικά χαρακτηριστικά του.



Σχήμα 9.6. Εργαστηριακό φασματοφωτόμετρο

9.6. Φασματοφωτομετρία υπέρυθρης ακτινοβολίας

Η φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στη χρήση του υπέρυθρου φωτός ονομάζεται φασματοφωτομετρία υπέρυθρης ακτινοβολίας.

9.6.1. Γενικά

Η μέτρηση της απορρόφησης με τη μέθοδο αυτή γίνεται στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ουσιών και των στερεοϊσομερών τους, με ακρίβεια και ασφάλεια. Η μέτρηση γίνεται ως απορρόφηση ή διαπερατότητα σε σχέση με το μήκος κύματος. Οι ουσίες που εξετάζονται μπορεί να είναι σε οποιαδήποτε μορφή, δηλαδή στερεές, διάλυμα ή αέριο και, ανάλογα την περίπτωση, η εξέταση γίνεται με τους παρακάτω τρόπους:

- Αν είναι υγρές, σε ειδικές κυψελίδες ορισμένου πάχους.
- Αν είναι στερεές, οι ουσίες διασπείρονται σε παραφίνη ή δισκία βρωμιούχου καλίου.
- Αν είναι σε αέρια κατάσταση, τοποθετούνται σε ειδικούς σωλήνες.

Η αρχή του οργάνου είναι η ίδια, όπως και στα φασματοφωτόμετρα απορρόφησης, με διαφορές όμως στη φωτεινή πηγή (εδώ παρέχει υπέρυθρη και όχι ορατή υπεριώδη ακτινοβολία), τον ανιχνευτή και την οπτική κατασκευή. Ένα ακόμη γνώρισμα είναι ότι το όργανο είναι πάντα εφοδιασμένο με θερμοστάτη. Αλλιώς, επηρεάζεται η ακρίβεια της μέτρησης του μήκους κύματος.

9.6.2. Σωστή χρήση

Υπάρχει μια σειρά από οδηγίες, που αφορούν κυρίως τις κυψελίδες, και που πρέπει να ακολουθούνται για τη λήψη σωστών μετρήσεων:

- Επειδή οι κυψελίδες είναι συνήθως φτιαγμένες από κλωριούχο νάτριο, δεν πρέπει ποτέ να πλένονται με νερό, γιατί διαλύονται. Αντίθετα, πλένονται με διθειάνθρακα ή τετρακλωράνθρακα και στεγνώνονται με αέρα. Σε γενικές γραμμές, δε χρησιμοποιούμε νερό, γιατί απορροφά και δημιουργεί σφάλματα στα φάσματα που παίρνουμε.
- Οι κυψελίδες δεν πρέπει να αγγίζονται με γυμνό χέρι, γιατί μπορεί να μείνουν πάνω τους δακτυλικά αποτυπώματα ή υγρασία. Έτσι χρησιμοποιούμε λαβίδα.

Οι κυψελίδες διακρίνονται, ανάλογα με τη χρήση τους, σε: αποσυνδεόμενες (για παχύρρευστα υγρά), σταθερές (για πολύ πτητικά υγρά), μεταβλητού πάχους (για πειραματικούς σκοπούς) και αερίων.

Σχετική υγρασία πάνω από 50% δημιουργεί προβλήματα στο πρίσμα του οργάνου και στις πλάκες του χλωριούχου νατρίου. Επίσης, η παρουσία διοξειδίου του άνθρακα και υδρατμών στην πορεία του φωτός μπορεί να επηρεάσει το φάσμα που παίρνουμε. Τέλος, για την αποφυγή σφαλμάτων θα πρέπει πάντα να υπάρχει αφυγραντικό υλικό (πυριτικό μείγμα) τόσο στο όργανο όσο και στη θήκη των εξαρτημάτων.



Ανακεφαλαίωση

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στο ότι πολλές χημικές ουσίες κλινικού ενδιαφέροντος επιλεκτικά απορροφούν ή εκπέμπουν φως διαφορετικών μηκών κύματος. Οι ουσίες αυτές σε ένα διάλυμα, αντιδρώντας με άλλες ουσίες, παίρνουν συγκεκριμένο χρώμα και χρωματίζουν το διάλυμα. Η ένταση του χρώματος σε αυτά τα διαλύματα είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας στο διάλυμα. Αυτά τα διαλύματα μπορούν να απορροφήσουν φως ορισμένου μήκους κύματος της ορατής περιοχής που περνά μέσα από αυτά. Η ακτινοβολία (το φως) που απορροφάται είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της ουσίας. Η μέτρηση της έντασης του προσπίπτοντος προς το εξερχόμενο φως σε ένα διάλυμα δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας

Ένα σύνθηες φασματοφωτόμετρο αποτελείται από τη φωτεινή πηγή, το μονοχρωμάτορα, την κυβέττα, τον ανιχνευτή και τη συσκευή ανάγνωσης αποτελεσμάτων. Η φωτομέτρηση αρχίζει από τη στιγμή που προστίθενται τα κατάλληλα αντιδραστήρια στο διάλυμα που περιέχει την προς εξέταση ουσία, ώστε να γίνει έγχρωμο και να απορροφά ορισμένα μήκη κύματος (χρώματα) και να εκπέμπει άλλα.

Η διαδικασία της μέτρησης περιλαμβάνει εκτός από το εξεταζόμενο διάλυμα και δυο ακόμη διαλύματα, το τυφλό και το πρότυπο, καθώς και μια σειρά ιδιαίτερα προσεκτικών χειρισμών για την εκτέλεση και για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ουσιών.



Ερωτήσεις



1. Τι εννοούμε με τον όρο φωτομετρία;
2. Σε ποιες περιοχές διαιρείται το φως;
3. Σε ποιο νόμο βασίζεται η λειτουργία του φασματοφωτόμετρου;
4. Ποια είναι η βασική προϋπόθεση για να ισχύει ο νόμος των Lambert-Beer;
5. Ποιος ο ρόλος των αντιδραστηρίων στη φωτομέτρηση;
6. Ποιες είναι οι διαφορές του φωτόμετρου από το φασματοφωτόμετρο;
7. Ποια είναι τα κύρια μέρη ενός φασματοφωτόμετρου απορρόφησης ορατής - υπεριώδους;
8. Ποια είναι τα διαλύματα που συμμετέχουν σε μια φασματοφωτομετρική μέτρηση;
9. Ποια είναι η διαδικασία που ακολουθείται σε μια φασματοφωτομετρική μέτρηση;
10. Ποιούς τρόπους γνωρίζετε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μιας ουσίας που προσδιορίζεται με τη φασματοφωτομετρία;
11. Πού κυρίως χρησιμοποιείται η υπέρυθη φασματοφωτομετρία;
12. Πώς γίνεται η εξέταση στερεών, υγρών και αέριων ουσιών στην υπέρυθη φασματοφωτομετρία;
13. Τι πρέπει να προσέχουμε για τη λήψη σωστών μετρήσεων στην υπέρυθη φασματοφωτομετρία;
14. Γιατί πρέπει να αποφεύγουμε όσο το δυνατόν την υγρασία στα δείγματα που έχουμε για ανάλυση;



Ασκήσεις

1. Να αναγνωρίσετε τα βασικά μέρη των φασματοφωτόμετρων που υπάρχουν στο εργαστήριό σας.
2. Σε ποια μήκη κύματος μετρά το φασματοφωτόμετρο του εργαστηρίου σας;
3. Να ακολουθήσετε τα σωστά βήματα για την προετοιμασία ενός δείγματος για φωτομέτρηση.
4. Να προετοιμάσετε το φωτόμετρο που υπάρχει στο εργαστήριό σας για μέτρηση, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.
5. Να φωτομετρήσετε το τυφλό και το standard.
6. Να φωτομετρήσετε το εξεταζόμενο δείγμα και να σημειώσετε την ένδειξη της απορρόφησης.
7. Να υπολογίσετε τη συγκέντρωση.
8. Να εντοπίσετε στο φωτόμετρό σας τα σημεία από τα οποία πιθανώς να δημιουργηθούν σφάλματα στις μετρήσεις σας.
9. Να ακολουθήσετε τα βήματα που προτείνει ο κατασκευαστής για τη σωστή προληπτική συντήρηση του οργάνου.