

Ογκομέτρηση
Φασματοφωτομετρία

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πιπέτα

Η πιπέτα (pipette - σιφώνιο στα ελληνικά) ονομάζεται ένα όργανο με το οποίο μεταφέρεται και απελευθερώνεται συγκεκριμένος όγκος υγρού σε ένα δοχείο. Είναι βασικό εργαλείο σε Χημικά Βιολογικά και Ιατρικά Εργαστήρια.



Εικόνα 1. Γυάλινη πιπέτα ογκομέτρησης όγκου 0-10 ml με διαβάθμιση ανά 0,2 ml (<https://lazosmedical.gr>)

Στην αρχική της μορφή, η πιπέτα, ήταν ένας γυάλινος σωλήνας με ενδείξεις ογκομέτρησης για διάφορα εύρη όγκων, ανάλογα με το μήκος και τη διάμετρο του (Εικ. 1). Σήμερα, στα εργαστήρια όπου απαιτούνται μικροί όγκοι και μεγαλύτερη ακρίβεια, η γυάλινη πιπέτα έχει αντικατασταθεί από μια πολύπλοκη κατασκευή, την αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου (Εικ. 2). Και για τους δύο τύπους πιπετών δημιουργείται κενό στην κορυφή τους του οποίου η σταδιακή εκτόνωση προκαλεί τη σταδιακή είσοδο συγκεκριμένης ποσότητα υγρού.



Εικόνα 2. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (κόκκινη: 2-20 μl, κίτρινη 20-200 μl, μωβ: 100-10.000 μl)

(<https://www.achema.gr>)

Η πρόσληψη του υγρού σε μια αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου, γίνεται με τη χρήση πλαστικών ακρορυγίων (tips) μιας χρήσης, τα οποία τοποθετούνται στο στόμιο εισόδου (Εικ. 3). Στη συνέχεια ρυθμίζεται ο όγκος που απαιτείται να μεταφερθεί και γίνεται η πρόσληψη και η απόρριψη του υγρού. Κάθε πιπέτα έχει ένα έμβολο το οποίο μπορεί να πιεστεί σε δύο θέσεις (σκάλες).



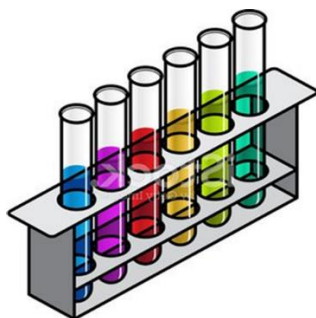
Εικόνα 3. Βασικά μέρη αυτόματης πιπέτας μεταβλητού όγκου (<https://ionidiagnostiki.gr/>)

Οδηγίες χρήσης της πιπέτας

- ρυθμίζουμε τον κατάλληλο όγκο
- τοποθετούμε το κατάλληλο tip στο στόμιο της πιπέτας
- πιέζουμε το έμβολο στην πρώτη σκάλα
- βυθίζουμε το tip μέσα στο υγρό (2-3 mm κάτω από την επιφάνεια του) και αφήνουμε το έμβολο απαλά να επανέλθει, καθώς το υγρό εισρέει μέσα στο tip
- μεταφέρουμε προσεκτικά την άκρη της πιπέτας στο δοχείο που θέλουμε να απορρίψουμε τη συγκεκριμένη ποσότητα υγρού
- πιέζουμε το έμβολο μέχρι την πρώτη και στη συνέχεια μέχρι και τη δεύτερη σκάλα
- απομακρύνουμε την πιπέτα και αφήνουμε το έμβολο να επανέλθει στην αρχική του θέση
- απορρίπτουμε το tip

Φασματοφωτόμετρο

Το φασματοφωτόμετρο είναι ένα ηλεκτρονικό όργανο το οποίο μετράει την ένταση του χρώματος ενός υγρού σε οποιασδήποτε απόχρωση (Εικ. 4, 5). Είναι σε θέση, για παράδειγμα, να προσδιορίσει πόσο πράσινο είναι το χρώμα ενός διαλύματος ή πόσο κόκκινο είναι το χρώμα ενός άλλου διαλύματος.



Εικόνα 4. Στατώ με διαλύματα διαφόρων χρωμάτων (<https://www.freeimages.com/premium/test-tubes-430415>)

Το μέγεθος με το οποίο προσδιορίζεται η ένταση του χρώματος ενός υγρού ονομάζεται οπτική πυκνότητα (optical density - OD). Για να γίνει αυτό, ρυθμίζεται το όργανο στο κατάλληλο μήκος κύματος (λ) που απορροφά αυτό το χρώμα. Αυτό σημαίνει ότι διαλύματα μιας χρωστικής με ίδια OD έχουν την ίδια συγκέντρωση σε αυτή τη χρωστική. Το φασματοφωτόμετρο είναι βασικό εργαλείο σε Χημικά, Βιολογικά και Ιατρικά Εργαστήρια. Στα βιοχημικά εργαστήρια με φασματοφωτομετρία γίνεται ο προσδιορισμός μεταβολιτών και ενζύμων στον ορό του αίματος, σε αυτόματους αναλυτές, π.χ. γλυκόζη, ουρία, κρεατινίνη χοληστερόλη, τρανσαμινάση του ασπαραγινικού, κινάση της κρεατίνης κ.α.



Εικόνα 5. Βασικά μέρη φασματοφωτομέτρου (<https://www.quirumed.com/>)

Αρχή λειτουργίας φασματοφωτομέτρου

Για να γίνει μια φωτομέτρηση, τοποθετείται ποσότητα υγρού (συνήθως 1 ml) σε ειδικό σωληνάριο (κυβέτα). Η κυβέτα τοποθετείται σε κατάλληλη θέση στο φασματοφωτόμετρο, όπου διαπερνάται από φως με συγκεκριμένο μήκος κύματος και έντασης I_0 . Ακολουθεί καταγραφή της έντασης του φωτός I που εξέρχεται τελικά από το δείγμα (Εικ. 6). Η OD_λ του δείγματος εμφανίζεται αμέσως στη οθόνη του φασματοφωτομέτρου υπολογισμένη ως εξής:

$$OD_\lambda = \log(I/I_0)$$

Η OD_λ του δείγματος σχετίζεται με την ποσότητα της διαλυμένης έγχρωμης ουσίας και συνδέεται με τη συγκέντρωση της σύμφωνα με το νόμο των Lambert-Beer

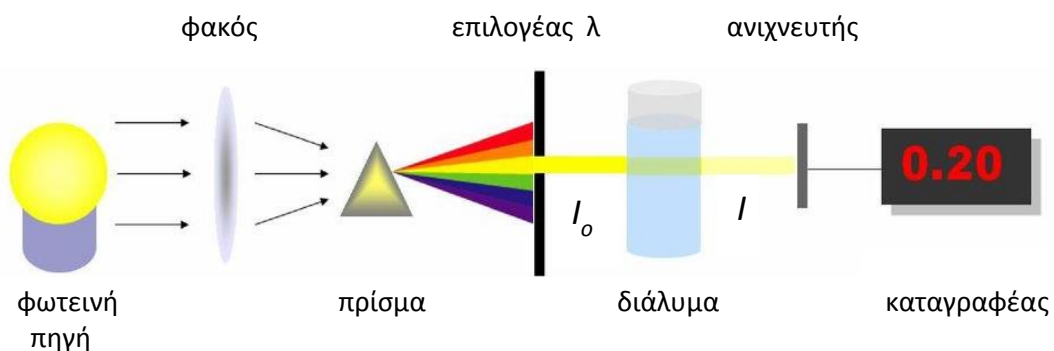
$$OD_\lambda = a \cdot b \cdot c$$

Όπου a η απόσταση που διαλύει το φως μέσα στο διάλυμα (ουσιαστικά το πλάτος της κυβέτας)

Όπου b ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, συγκεκριμένος για το έγχρωμο μόριο

Όπου c η συγκέντρωση του έγχρωμου μορίου στο διάλυμα

Αυτό σημαίνει ότι διπλάσια συγκέντρωση θα δώσει και διπλάσια OD. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παραπάνω σχέση είναι μεν γραμμική της μορφής $Y=aX$, αλλά μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση, από την οποία και πάνω η ένδειξη OD του οργάνου παραμένει σταθερή, λόγω κορεσμού. Να σημειωθεί ότι και σε πάρα πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις η ένδειξη του οργάνου δεν είναι αξιόπιστη λόγω ανιχνευσιμότητας της μέτρησης. Και στις δύο ακραίες αυτές περιπτώσεις ο διπλασιασμός της συγκέντρωσης δεν έχει ως αποτέλεσμα και το διπλασιασμό της OD.

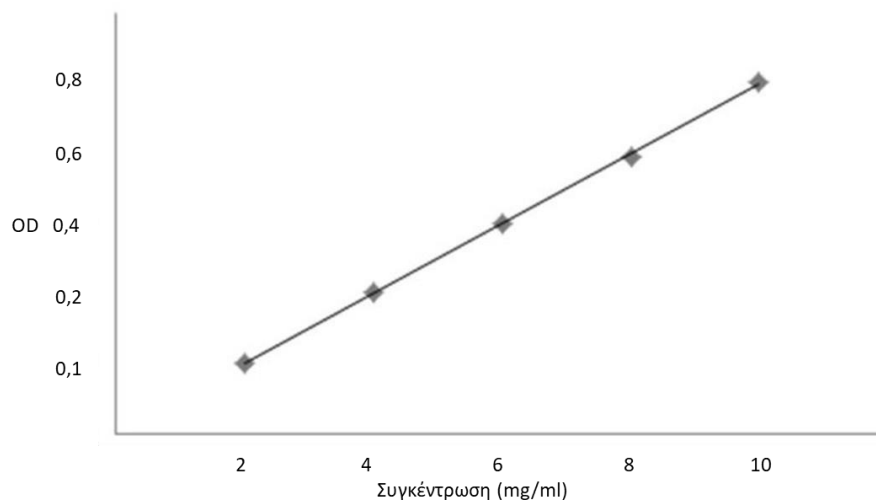


Εικόνα 6. Βασικά διάταξη της λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου

(<https://docplayer.gr/13441985-Kef-8-fasmatofotometria-yperiodoys-oratoy-uv-vis-m-koypparis-paradoseis-analytikis-himeias-ii.html>)

Πρότυπη καμπύλη

Για να γίνει ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας έγχρωμης ουσίας σε ένα διάλυμα απαιτείται η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης. Για το λόγο αυτό φτιάχνουμε διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις, συνήθως διπλασιαζόμενες, φωτομετρούμε στο κατάλληλο μήκος κύματος και καταγράφουμε την OD_{λ} για καθένα από αυτά. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται τοποθετώντας στον άξονα των X (ανεξάρτητη μεταβλητή) τις τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα των Y (εξαρτημένη μεταβλητή) τις αντίστοιχες τιμές OD_{λ} (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Τυπική πρότυπη καμπύλη εξίσωσης του τύπου $Y=\alpha X$

Γνωρίζοντας την OD οποιουδήποτε άγνωστου διαλύματος μιας έγχρωμης ουσίας μπορούμε, με αντιστοίχιση στην πρότυπη καμπύλη, να βρούμε τη συγκέντρωσή της.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Παρασκευή διαλυμάτων

Σας δίνεται διάλυμα χρωστικής Amidoblack με συγκέντρωση 100 mg/ml. Θα προετοιμάσετε 4 διαλύματα με διπλασιαζόμενες συγκεντρώσεις.

Πορεία

- αριθμήστε 4 σωληνάκια (χωρητικότητας 4 ml): 1, 2, 3, 4.
- ετοιμάστε αραιωμένα διαλύματα χρωστικής σύμφωνα με τον πίνακα 1
- αναμείξτε με ισχυρή ανάδευση (vortex)
- υπολογίστε στις συγκεντρώσεις στο κάθε σωληνάκι

Πίνακας 1. Παρασκευή διαλυμάτων χρωστικής

	1	2	3	4
H ₂ O (μl)	980	960	920	840
Χρωστική (μl)	20	40	80	160

Υπολογισμός συγκεντρώσεων

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων ακολουθεί τον τύπο των αραιώσεων διαλύματος όγκου V_0 και συγκέντρωσης C_0 , όπου το γινόμενο $V_0 \times C_0$ το οποίο μας δίνει τη ποσότητα του διαλυμένου μορίου, παραμένει σταθερό. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αν θέλουμε να αραιώσουμε το διάλυμα σε τελικό όγκο V_t και τελική συγκέντρωση C_t αυτό θα γίνει σύμφωνα με την ισοδυναμία:

$$V_0 \times C_0 = V_t \times C_t$$

Φωτομέτρηση

Έχετε φτιάξει 4 σωληνάκια με διπλασιαζόμενες συγκεντρώσεις χρωστικής Amidoblack. Θα φωτομετρήσετε κάθε σωληνάκι για να βρείτε την οπτική του πυκνότητα OD.

Πορεία

- ανοίξτε το φασματοφωτόμετρο
- ρυθμίστε το μήκος κύματος στα 620 nm
- σε μια κυβέτα προσθέστε 1 ml H₂O (τυφλό)
- τοποθετείστε την κυβέτα στο φασματοφωτόμετρο και μηδενίστε
- αδειάστε το περιεχόμενο της κυβέτας και προσθέστε 1 ml από το σωληνάκι 1
- τοποθετείστε την κυβέτα στο φασματοφωτόμετρο και σημειώστε την ένδειξη OD
- αδειάστε το περιεχόμενο της κυβέτας , προσθέστε το περιεχόμενο από το σωληνάκι 2
- τοποθετείστε την κυβέτα στο φασματοφωτόμετρο και σημειώστε την ένδειξη OD
- επαναλάβετε και σημειώστε την ένδειξη OD για τα σωληνάκια 3 και 4
- φτιάξτε την πρότυπη καμπύλη των OD σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις