

1. Derinlik eşitleme yöntemi: Nessler tüpü kullanılır. Konsantrasyonu ölçülecek numune, işaret çizgisine dek doldurulur. Konsantrasyonu tayin edilecek maddenin farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanır ve bu standartlar tüplere aynı seviyede olacak şekilde konur.

Konsantrasyonu belli çözeltilerden hangisi, numune rengine yakınsa ona uygun konsantrasyonda olduğu kabul edilerek hesaplanır.

2. Çözelti konsantrasyonunu sabitleyip derinlik değiştirme

Mukayese çözeltisinin konsantrasyonu sabit tutulurken, çözelti derinliği değiştirilir. $I_1C_1=I_2C_2$ eşitliği ele geçinceye kadar kuvvetler mikrometrik vidalarla indirilip, kaldırılır.

ULTRAVİYOLE (UV) VE GÖRÜNÜR BÖLGE MOLEKÜLER ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRESİ

SPEKTROFOTOMETRE

- Temel mantığı, hazırlanan çözeltilerden belirli spektrumlarında ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözelti tarafından absorblandığını bulunması esasına dayanır.
- Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözelti tarafından soğurulur.
- Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen -çözelti tarafından absorblanmayan- ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.
- Örneğin, farklı sıcaklıklarda bakterilerin gelişiminin gösterilmesi için; çeşitli ortamlara bırakılan bakteriler daha sonra çözeltiler içinde teker teker spektrofotometre ile ölçüldüğünde bakterilerin fazla olduğu örnekte daha fazla absorblanma gözlenecektir. Dolayısıyla bu da bize ortamdaki sıcaklığa bağlı bakteri büyüme hızı ile ilgili bilgi verir. Sonuçta, daha fazla bakteri daha fazla madde demektir ve bu da absorpsiyonun daha fazla olması anlamına gelir.

NİTEL VE NİCEL ANALİZLER

- UV ve görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler nitel ve nicel analizde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir.

Nitel analiz: Saf maddelerin yapılarının saptanmasında fonksiyonel grubun bulunup bulunmadığının incelenmesinde bir fonksiyonel grubun bileşikteki yerinin saptanmasında kullanılır.

Nicel analiz: Saf bir maddenin ya da bir karışımındaki bileşenlerin derisimlerinin saptanmasında kullanılır.

- Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılırlar.
- Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir.

UV-görünür alan absorpsiyon ölçme cihazlarının başlıca kısımları

1- Işıma kaynağı

2- Monokromatör (Dalga Boyu seçicisi)

3- Çözelti ve çözücü koymaya yarayan şeffaf kaplar ve

bunların yerleştirildiği bölme (Quartz)

4- Işıma enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren dedektör

5- Dedektörde dönüştürülen enerjinin değerini gösteren cihazı (ışık şiddeti & dalga boyu grafiği, yani spektrum)

- UV-görünür bölgede D2, W, H2, Xe, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba tungsten- halojen lambası olarak adlandırılır.

Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, hidrojen ve döteryum elektriksel boşalım lambalarıdır. Bu lambalar 180-380 nm arasında ışık yayar. Daha pahalı ve daha uzun ömürlü olan D2 lambasının yaydığı ışığın şiddeti H2 lambasına göre çok daha fazladır.

Xe ark lambası, UV-görünür bölgenin tümünde (150-700 nm) kullanılabilir şiddetli ve sürekli ışık kaynağıdır.

Civa buhar lambası, her iki bölgede ışımaya yapabilen bir ışık kaynağıdır; sürekli spektruma ek olarak kesikli hatlar da içerir.

Dalga boyu seçicileri (monokromatörler)

- Işık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir.
- Monokromatör, filtreli fotometrelerde ışık filtresidir; spektrofotometrelerde ise ışık prizmasıdır.
- Örnek üzerine gönderilen ışığın daha monokromatik olmasını sağlamak için bazı spektrofotometrelerde çift monokromatör kullanılır.
- UV, GB, ve IR için kullanılan monokromatörler olarak
 1. mercekler,
 2. pencereler,
 3. optik ağ,
 4. Prizmalar kullanılmaktadır.

Işık filtreleri

- Camdan yapılmış ve uygun boya ile boyanmış filtrelerdir. Portatif olup kullanıcı istediği zaman uygun dalga boyundaki filtreyi cihaza takar. Filtrelerin üzerinde geçirdikleri dalga boyu yazılıdır. Filtrenin rengi, ölçüm yapılacak çözeltinin rengine göre seçilir; örneğin, mavi ışığı tutan (sarı) bir maddenin ölçümünde sadece mavi ışığı geçiren filtre kullanılır.

Işık prizmaları

- Cam veya kuartz olabilir. Özellikle düşük UV ışınları iyi geçirmediğinden cam prizma görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR'e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar pahalı spektrofotometrelerde bulunur.

Spektrofotometrelerde dedektör

- Maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzenektir. UV-görünür bölgede kullanılabilen üç tür dedektör vardır.

- 1- Fotovoltaik dedektörler
- 2- Fototüp
- 3- Fotoçoğaltıcı tüp

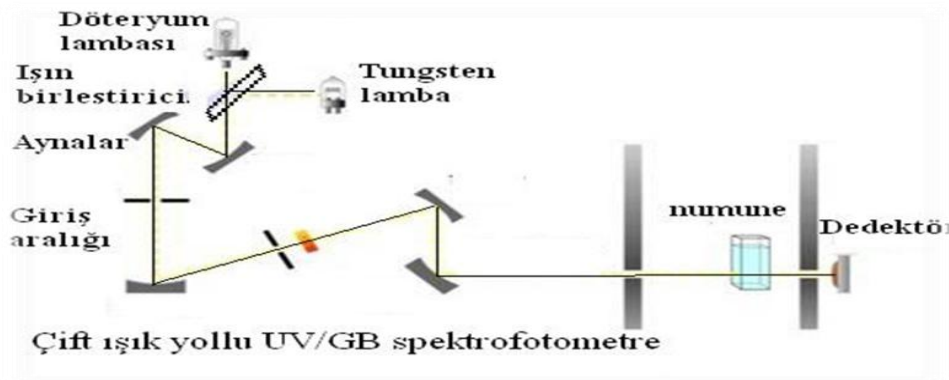
Tek ışık yollu spektrofotometreler

- Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir.
Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi vardır: Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. İkinci düğme, ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre “sıfır” geçirgenlik ayarını yapmak içindir. Üçüncü düğme, ışığın geçtiği aralığın enini değiştirir.

Ölçümün yapılacağı dalga boyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile “sıfır” ayarı yapılır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilir. Sıfır ve 100 ayarları her dalga boyunda yeniden yapılmalıdır.

Çift ışık yollu spektrofotometreler

- Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir.
Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür.
Örnekten ve çözücünden geçen ışık demetleri dedektör üzerine art arda gelir ve alternatif türden sinyal oluşturur. Işık şiddetleri eşit ise dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz; örnek bölmesinden gelen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır.
- Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir başka türü çift dalga boyulu spektrofotometrelerdir. Çift dalga boyulu spektrofotometrelerde iki farklı monokromatör vardır; iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle art arda etkileştirilir.
Bulanık çözeltilerde dalga boylarından biri çözeltideki maddenin absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkilidir.



Ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek, ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar,

ışık bölücüleri, giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir.