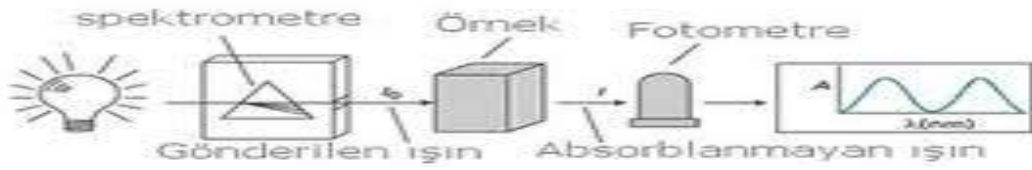


## Spektrofotometre'nin çalışma prensibi

İncelenecek örnek spektrometre ile fotometre arasına ve kuvvet olarak adlandırılan, genellikle sert plastikten ya da quartz'dan yapılan özel tüp içine yerleştirilir. Farklı örnekler farklı dalga boylarını absorbladıkları için öncelikle bu aralığın bulunması gerekir.

- Örneğin DNA'nın bilinen spektrum aralığı 260 nm'dir. DNA miktarı incelenirken bu aralık kullanılır. Bu aralığın bulunması için spektrometre ile tüm aralıklarda örneğe ışın gönderilir. Elde edilen sonuçlardan elde edilen grafik incelendiğinde incelenen maddenin hangi aralıkta ışığı absorbladığı anlaşılabilir (Grafik 1).
- Grafik 1: Grafikte klorofillerin absorblama aralıkları gözükmemektedir. Bilindiği gibi klorofiller fotosentez için 700 nm dalga boyundaki ışığı soğururlar.

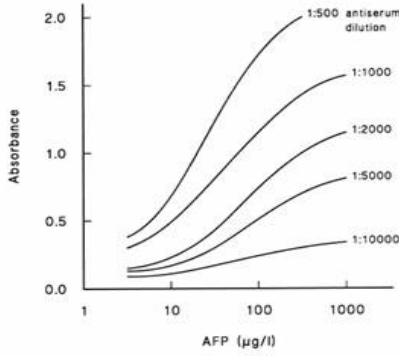


- Bu absorpsiyon aralığı bulunduktan sonra spektrometre ile bu aralıkta örneğe monokromatik -belirli bir dalga boyuna ait- bir ışın gönderilir. Spektrofotometreler gönderdiği ışığın dalga boyuna göre çeşitlidir. Gönderilen ışık, kuvvet'in içindeki örnekten geçtikten sonra fotometreye ulaşır. Spektrometre'den gönderilen ışık ile fotometreye ulaşan ışık arasındaki fark bize absorblanma miktarını verir. Absorblanma terimi absorbans'tır ve Beer-Lambert teoreminden hesaplanır. (Formül 1)

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I_1} \right)$$

Formül 1: Beer-Lambert Teoreminden absorbans hesabı

- Formülde, A absorbansı, I<sub>0</sub> Spektrometre'den gönderilen ışığın yoğunluğunu, I<sub>1</sub> ise kuvvetten geçtikten sonraki ışığın yoğunluğunu temsil eder
- Diyagram 2: Küvette absorblanma
- Spektrofotometre ile yapılan ölçümler sonucunda derişim-absorbans grafiği çizilebilir (grafik 2). Burada dikkat edilmesi gereken husus derişim-absorbans fonksiyonunun belirli bir değere kadar lineer daha sonra da negatif artış göstererek sabit bir değere yaklaşmasıdır. Bunun sebebi çözeltideki madde miktarının belirli bir seviyeden sonra ışığın geçeceği aralıkların moleküller tarafından dolması, dolayısıyla da maddenin tüm ışığı absorblamasıdır.



Grafik 2: Örnek bir derişim-absorbans grafiği.

- Absorbans değerinin bir süre sonra sabit bir değere yaklaştığı görülebilir.
- Ölçümün yapılması için öncelikle referans –blank- olarak, içinde incelenecek maddenin olmadığı bir çözelti hazırlanması gerekir. Standart bir referans çözelti, su, indikatör ve varsa tampon çözelti içermelidir. Referans çözeltilerin amacı spektrofotometrenin ölçüm değerinin daha hassas olmasını sağlamaktır. Referans çözeltiler ile ölçüm yapıldığında spektrofotometrenin ölçeği sıfırlanır. (diğer bir deyişle yapılan ölçümün absorbansının 0 -%100 geçiş- olduğu belirtilir.)
- Örnek çözelti ile referans çözelti arasındaki absorbans farkı az olduğundan spektrofotometre daha kesin sonuçlar verecektir. Referans çözeltinin yerine saf su konulması bu farkı çok açacağından daha az hassas sonuçlar verir. Dolayısıyla spektrofotometre analizlerinde referans olarak saf su kullanılmaz.
- Referans çözelti, farklı spektrofotometre çeşitlerinde farklı olarak kullanılsa da işlevi aynıdır.
- Spektrometre ile protein ölçümü yapılabilmesi için de örneklerin önce belirli belirteçler ile renklendirilmesi gerekir.
- Örneğin Bradford belirtecini örnek alalım. Bradford çözeltisi protein belirtecidir ve standart olarak BSA (bovine serum albumin) işaretlemede kullanılır. İşaretlendiğinde oluşan kompleks 595 nm dalga boyunda ışığı absorblar. Bu dalga boyunda ölçümler yapılır.

### Ultraviyole (morötesi) / Görünür Bölge

#### (UV-GB) Spektroskopisi

Çalışma ilkesi:

- Moleküler absorpsiyon spektroskopisi 160-780 nm dalga boyları arasındaki ışığın *b* ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümüne dayanır.
- Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır; sonuç olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi ile bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır.
- UV/GB spektroskopisi çok sayıda organik ve inorganik bileşiğin analizinde kullanılmaktadır.

UV-görünür bölge cihazları 200-900 nm arasında çalışır.

N<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> molekülleri, 160 ve 200 nm'de absorpsiyon yaptıkları için 200 nm altındaki dalgaboylarında yakumlu UV cihazları kullanılır.

UV ve görünür bölgede kullanılan spektrofotometreler ;

- 1- Tek ışına demetli spektrofotometreler,
- 2- Çift ışına demetli spektrofotometreler,

olarak ikiye ayrılır.

### **Tek ışın yollu ve çift ışın yollu spektrofotometrelerin farkı**

Tek ışın yollu spektrofotometrelerde aynı dalga boyunda çözücüye karşı ışın yolu kapatılarak sıfır geçirgenlik ayarı ve ışın yolu açılarak %100 geçirgenlik ayarı yapılır. Veya, bilgisayar kontrollü cihazlarda çözücünün spektrumu alınır ve analitin spektrumundan çıkarılarak, çözücünden kaynaklanan absorbansın girişimi önlenir.

Çift ışın yollu cihazlarda her dalga boyu için ayrı ayrı 0 ve 100 ayarları yapmak yerine, monokromatörden çıkan ışık eşit şiddete iki demete bölünerek birinin ölçülecek örneğe, diğerinin çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesiyle ölçüm süresi azaltılır. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur.

### **Işıma kaynağının özellikleri**

- 1- Enerjisi büyük olmalı
  - 2- Sürekli bir spektrum vermeli
  - 3- Enerjisi sabit olmalı
- UV bölgede döteryum lambaları kullanılır.  
160-360 nm arasındaki bütün ışınları verir.

Görünür bölgede tungsten halojen lambalar ya da ksenon ark lambaları kullanılır.  
320-2500 nm dalgaboyu aralığındaki ışınları verir.

### **Monokromatörler**

Monokromatörler spektral taramaları yapabilmek için tasarlanmıştır.

UV, GB, ve IR için kullanılan monokromatörler olarak

1. mercekler,
  2. pencereler,
  3. optik ağ,
  4. Prizmalar,
- kullanılmaktadır.

Başlıca üç kısımdan meydana gelir:

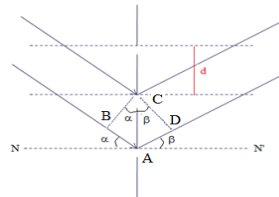
- Işıma demetinin giriş ve çıkış aralıkları
- Mercek sistemi
- Dispersiyon sistemleri (prizma veya optik ağ)

### **Optik ağlar (grating)**

#### **1- Geçirgen optik ağlar**

Düz bir cam veya geçirgen düz bir levha üzerine eşit olarak çizilen geçirgen olmayan çizgilerden oluşur.

Geçirgen ve geçirgen olmayan aralıkların birbirine eşit ve birkaç cm boyunca çizilmiş olması gerekir.

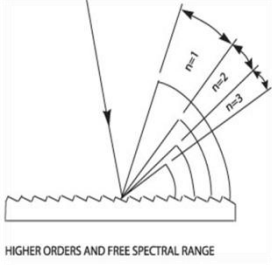


İyi optik ağlar cm'de 6000'e yakın çizgi içerir.

## 2- Yansıtma optik ağı

Çalışma prensibi geçirgen optik ağına benzerdir.

Parlak ve cilalı bir metal yüzeyi eşit aralıklarla oluklu hale getirilirse yansıtmalı bir optik ağı elde edilir.



$$\lambda = d (\sin\alpha + \sin\beta) / n$$

Geliş açısı  $\alpha$ , sabit kabul edilirse;  $\beta$  açısının değerine göre  $n$ 'in 1,2,3 gibi çeşitli mertebeden değerleri için değişik dalgalı boyları elde edilir.