

SPEKTROSKOPİNİN TEMEL İLKELERİ



DOÇ.DR. GÖZDE GİRGİN

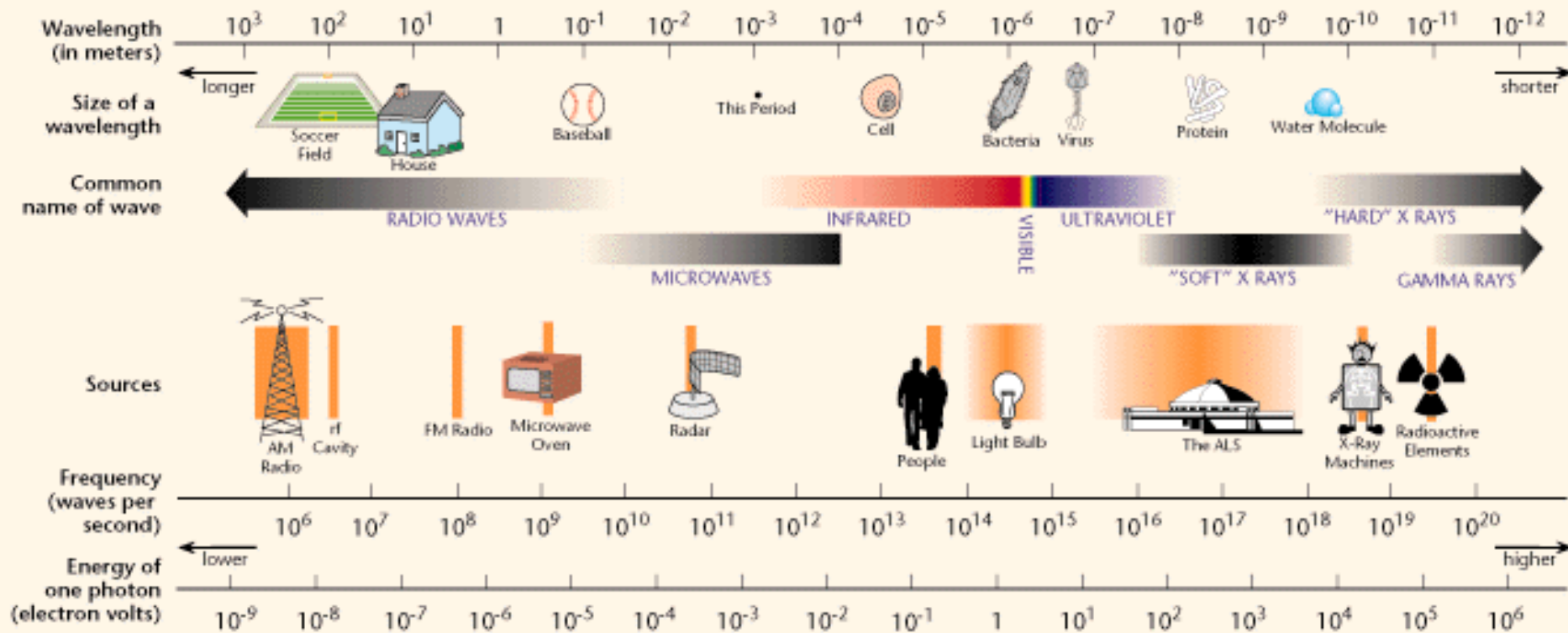
SPEKTROSKOPİ



- Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi tekniğidir.
- Spektroskopi, elektromanyetik ışıma (radyasyon) ile atom ve moleküller arasındaki etkileşmeyi inceler.

- Elektromanyetik ışıma, uzayda çok büyük hızla hareket eder.
- En çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlarıdır.

THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM



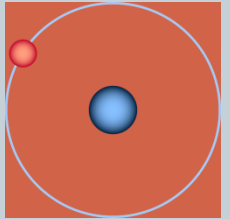


- Elektromanyetik radyasyon (ışırma) radyan enerjisinin bir şeklidir, yani maddenin temel yapısını oluşturan atomdan kaynaklanan bir enerji türüdür.
- Elektromanyetik ışımanın hem dalga, hem parçacık özelliğı vardır.

Bohr Modeli



- Elektronların uyarılma-temel düzeye geçme durumunu açıklamak için Danimarkalı bir fizikçi olan Niels Bohr'un (1885-1962) geliştirdiği model kullanılır.
- 1913 yılında Bohr, en basit atom olan (sadece 1 elektronu olduğundan dolayı) hidrojen atomuna dayalı bu atomik modeli öne sürmüştür.

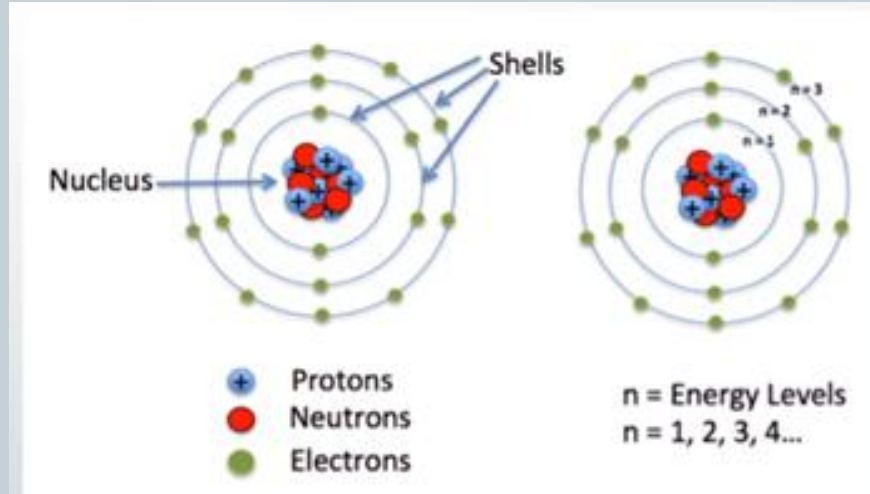


Bohr Modeli



Bu modele göre bir elektron, atom çekirdeği etrafında sadece “orbital” adı verilen özel dairesel yollarda bulunabilir.

Her elektronun sabit bir enerjisi, dolayısıyla bir enerji düzeyi vardır.

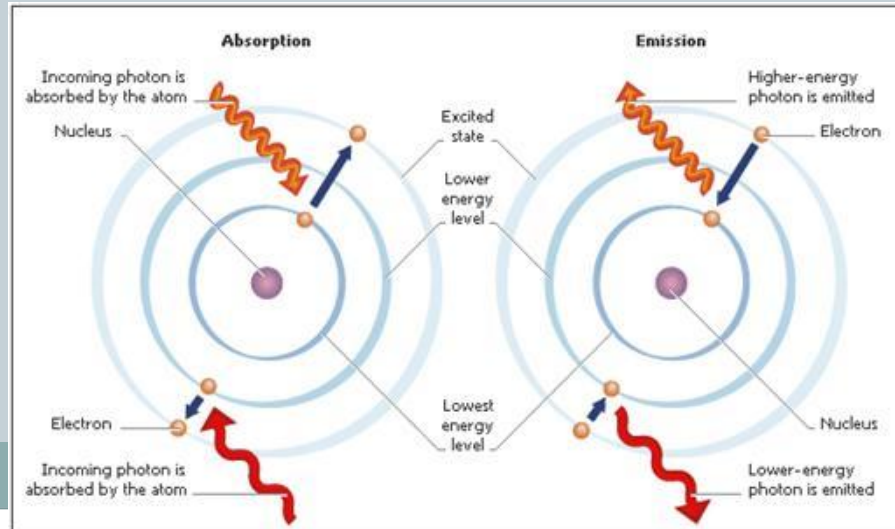


Bohr Modeli



Elektronlar bir enerji düzeyinden diğerine atlayabilirler fakat iki enerji düzeyi arasında bulunamazlar.

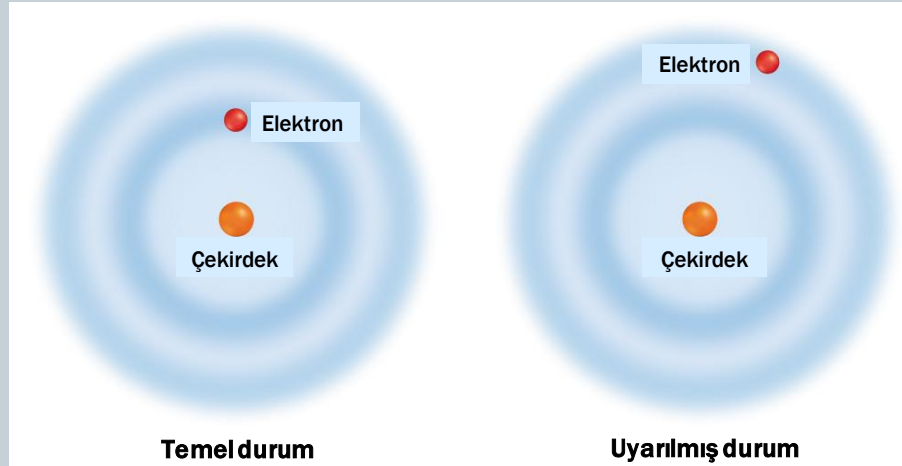
Bir enerji düzeyinden diğerine geçmek için elektronun doğru miktarda enerji alması veya vermesi gereklidir.



Bohr Modeli



Enerji düzeyi yükseldikçe orbital çekirdekten uzaklaşır. Elektronun çekirdekten daha uzak, daha yüksek enerji düzeyine geçmesi için enerji alması; çekirdeğe daha yakın, daha düşük enerji düzeyine geçmesi için enerji vermesi gereklidir.

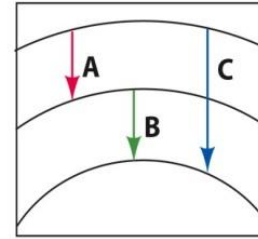
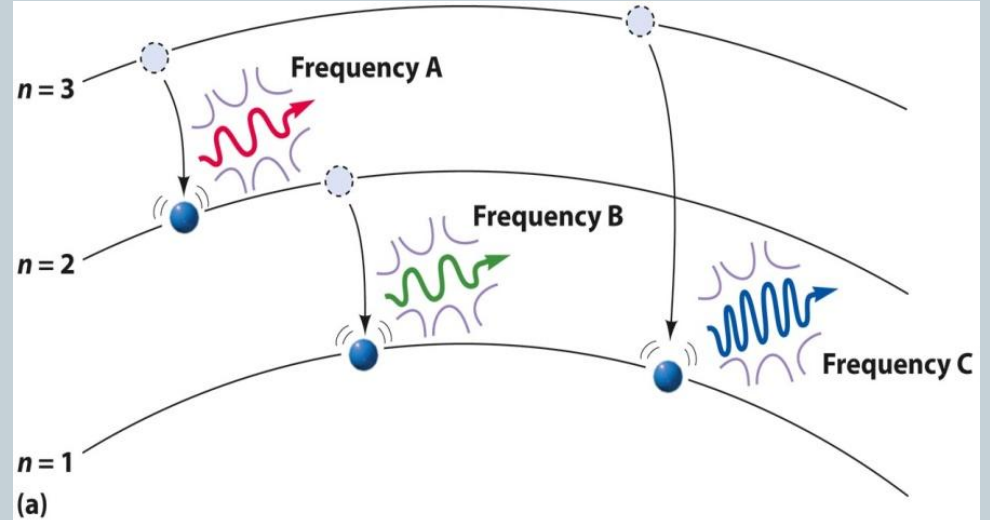




- Elektronun bulunduğu mümkün olan en düşük ve en kararlı olduğu enerji düzeyi “temel düzey”dir.
- Atomlar enerji absorbe ettiğinde elektronlar daha üst enerji düzeyine çıkar. Fakat bu durum kararlı değildir. Çok kısa bir sürede aldıkları enerjiyi vererek temel düzeye, yani kararlı düzeye geri dönerler.

Temel düzeye geçerken elektronlar fazla enerjiyi ışık formunda yayarlar. Buna **emisyon** adı verilir.

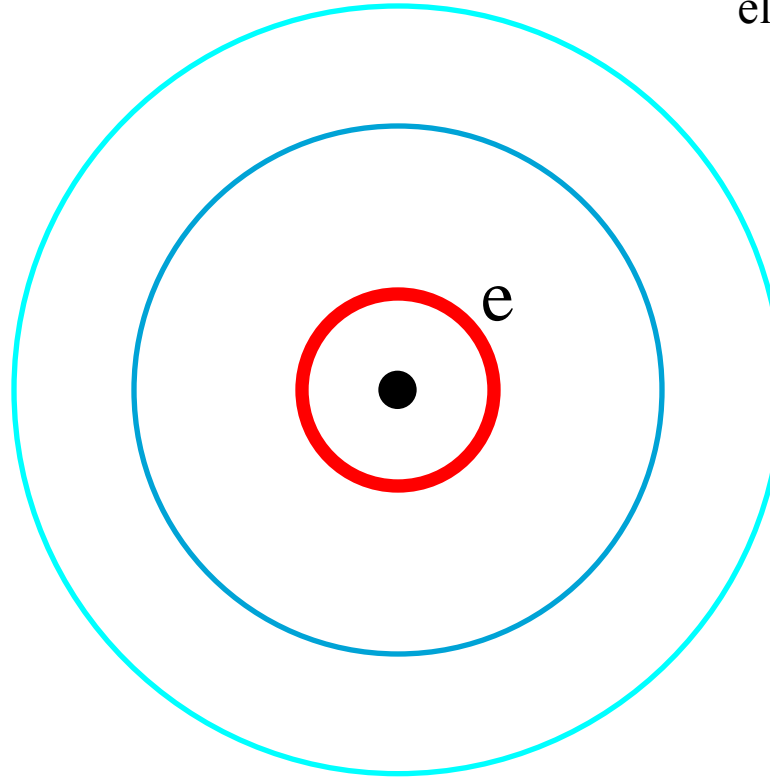
Geçiş yapılan enerji düzeyleri arasındaki fark, yaydıkları ışığın frekansını belirler.



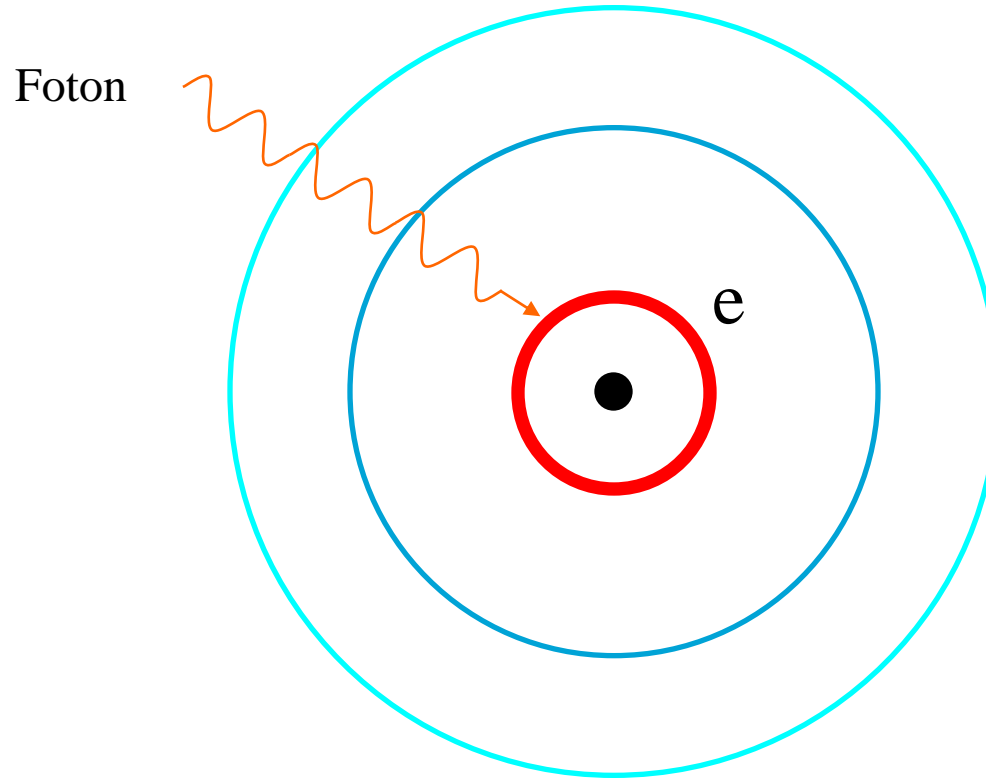
(b) $A + B = C$

Çekirdek

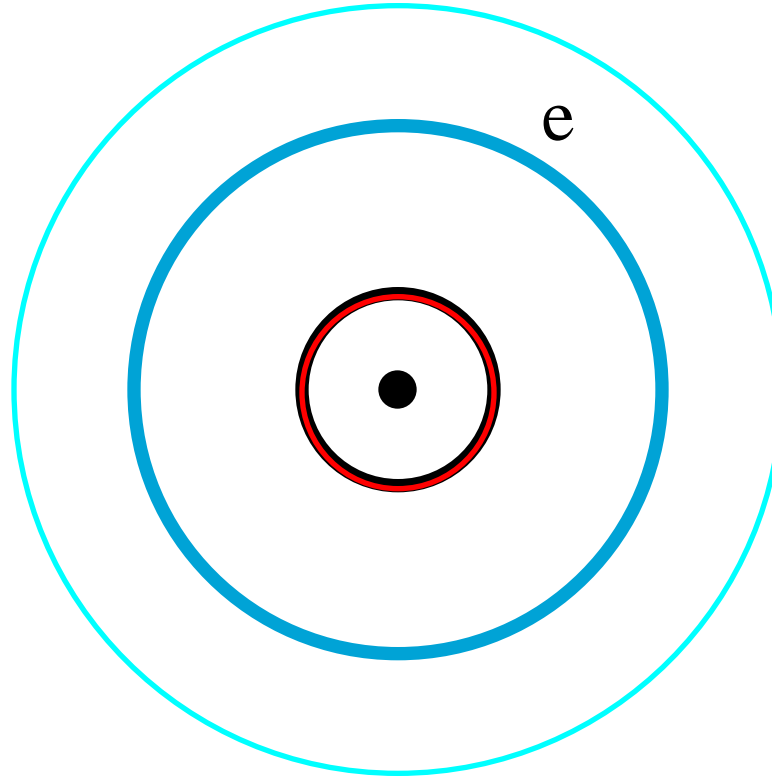
elektronlar için olası enerji
düzeyleri (orbitaller)



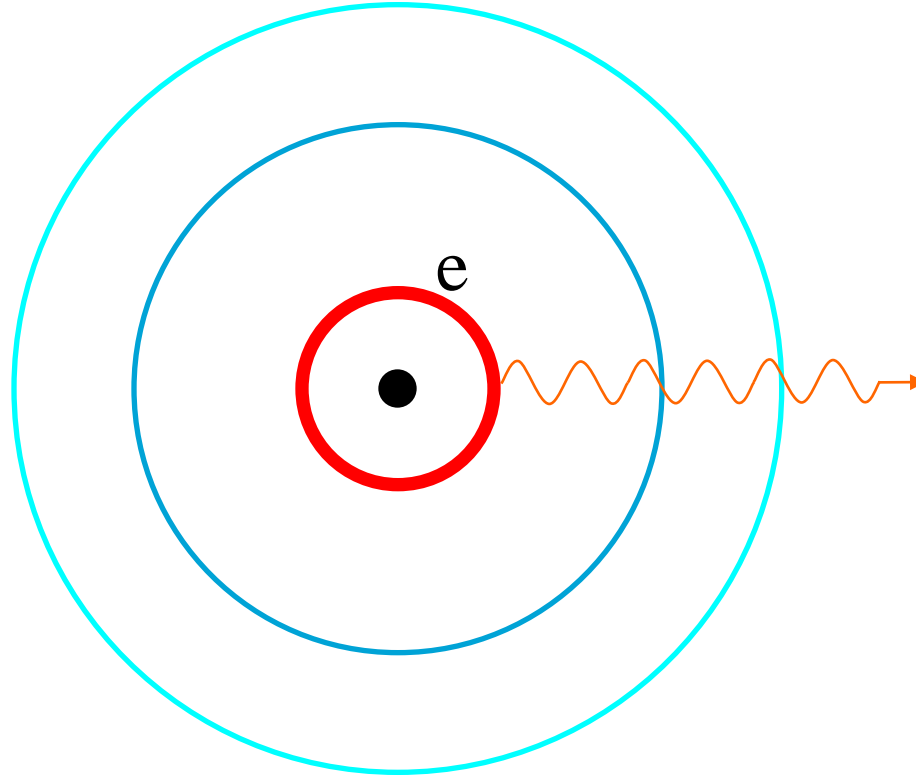
Uyarılmamış bir atom, elektron temel durumda



Uyarılmamış bir atom, elektron temel durumda



Uyarılmış atom
elektron temel düzeyden daha üst bir enerjilerinde.

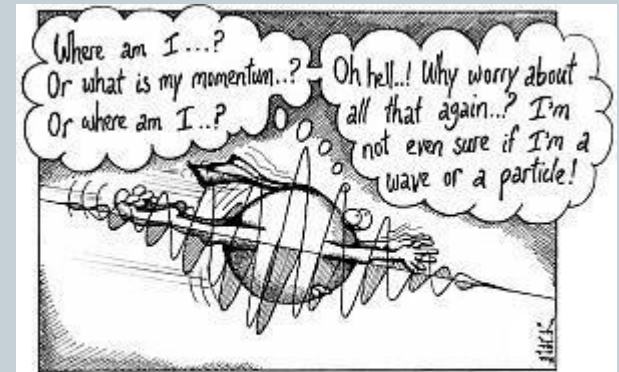


Atom tekrar temel durumda.

Elektron orbital değiştirerek temel düzeye geerirken ışıma yaparak enerjisini verdi.



- Spektroskopi, elektromanyetik ışıma (radyasyon) ile atom ve moleküller arasındaki etkileşmeyi inceler.
- Elektromanyetik ışımının hem dalga, hem parçacık özelliği vardır.
- İnterferans (girişim) ve difraksiyon (kırılma) dalga özelliğiyle açıklanır.
- Işıma enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu ve emisyonu ışımının parçacık özelliği (foton) ile açıklanır.



Photon self-identity problems.

Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler



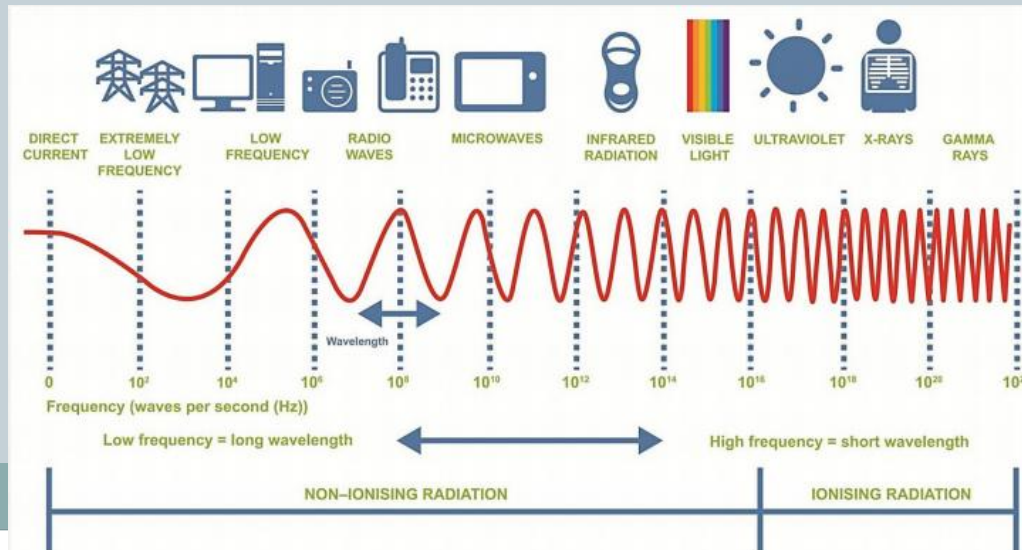
- Dalga Boyu (λ) : nm, Å, mμ.
- Frekans (ν) : devir / sn.
- Periyot (t) : sn / devir.
- Dalga Sayısı (τ)

$$1 \text{ nm} = 1 \text{ m}\mu = 10 \text{ Å} = 10^{-9} \text{ m}$$

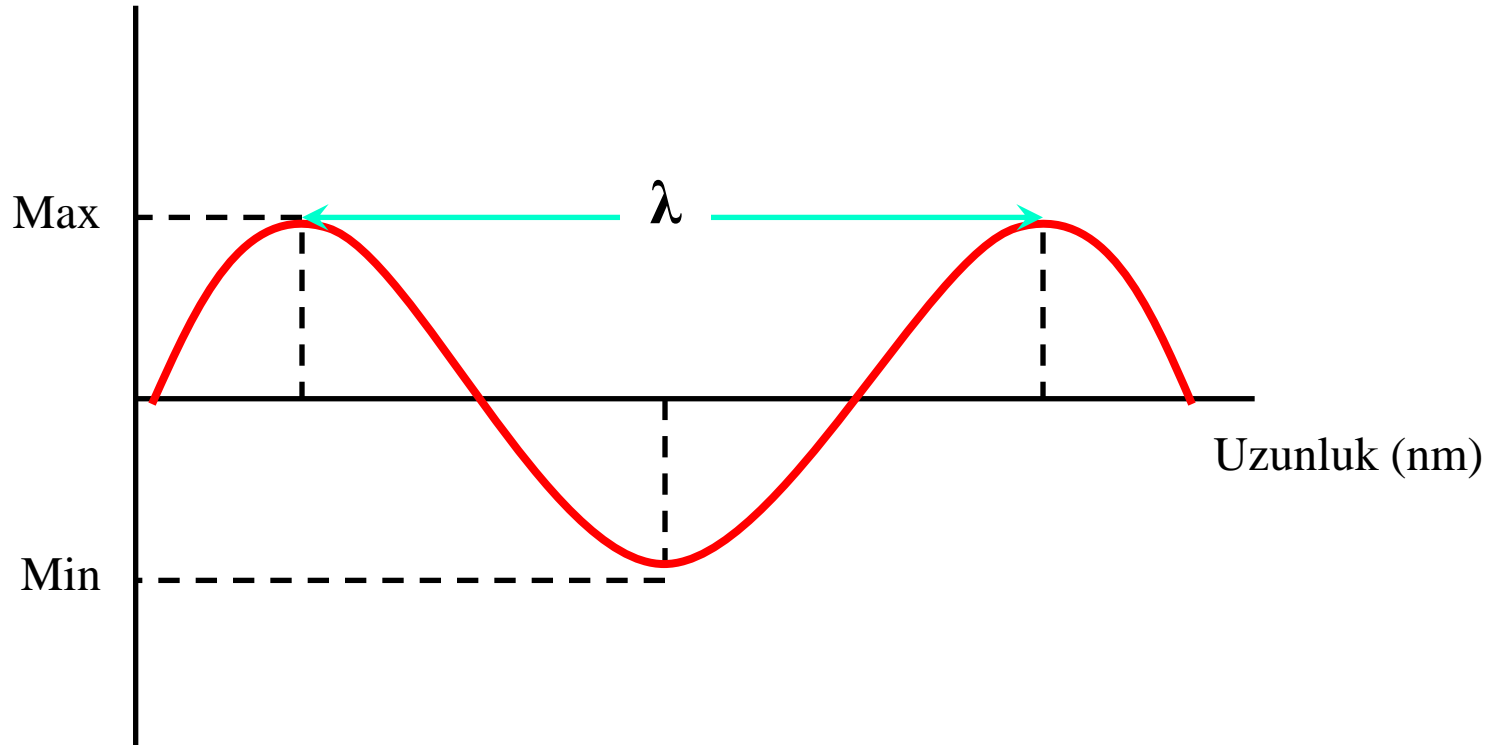
Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler



- Dalga Boyu (λ) : Ardarda gelen iki maksimum, ya da iki minimum arasındaki uzaklığa “Dalga Boyu” denir. Birimi uzunluk birimi olarak belirtilir. En çok nanometre olarak verilir. Ayrıca Å, milimikron gibi birimler de kullanılabilir (nm, Å, mμ) ($1 \text{ m}\mu = 1 \text{ nm} = 10 \text{ Å} = 10^{-7} \text{ cm}$).



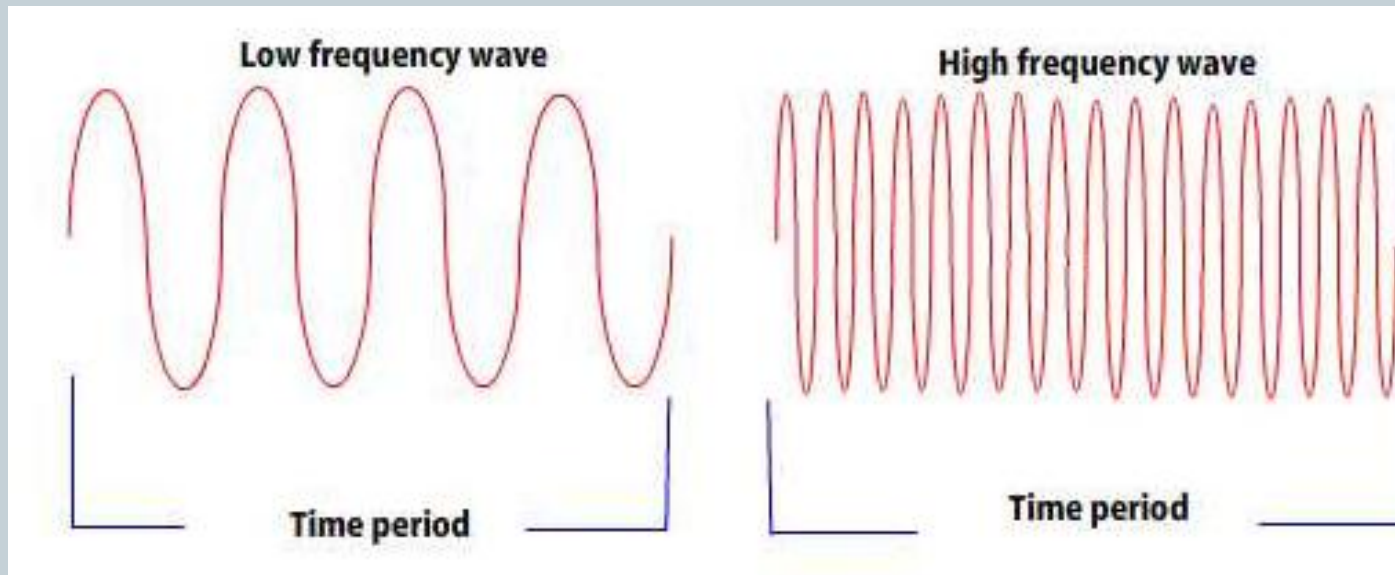
Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler



Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler



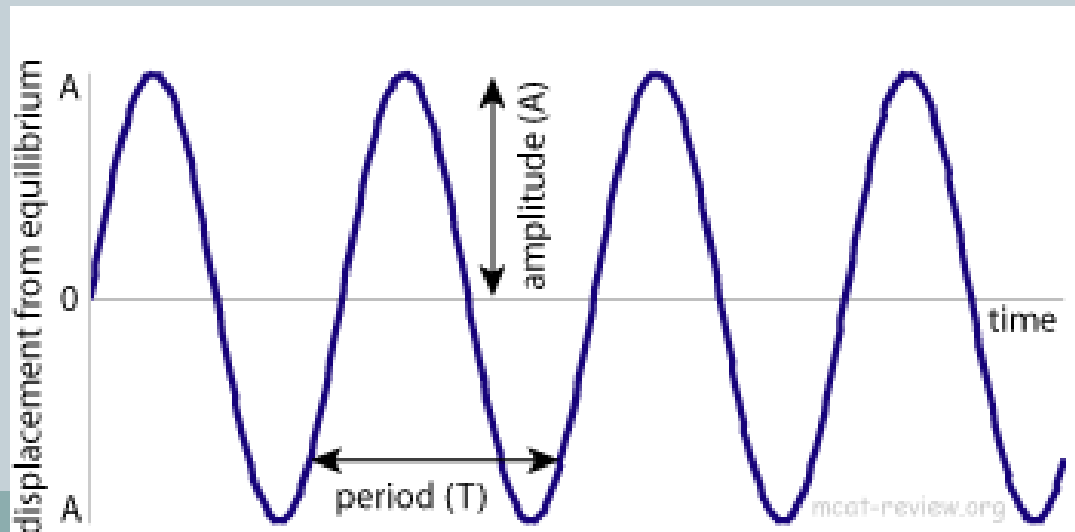
- Frekans (ν) :Belli bir noktadan belli zamanda geçen dalga sayısıdır. Birimi devir/sn=hertz olarak verilir.

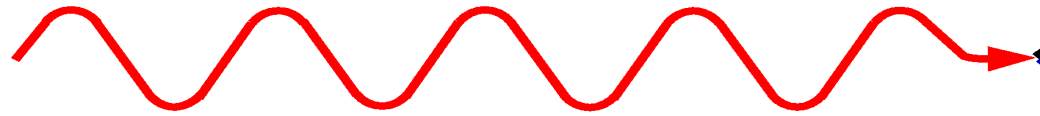


Elektromanyetik Radyasyonu Karakterize Eden Nicelikler (II)



- Periyot (t) : Tam bir devir için gerekli süredir. Birimi sn/devir'dir. Frekansla ters orantılıdır. $\gamma = 1/\nu$
- Dalga Sayısı (τ) : Birim uzunluktaki (1 cm'deki) dalga sayısıdır. Birimi 1/cm'dir. Dalga boyu ile ters orantılıdır. $\tau = 1/\lambda$





- Foton enerji taşıyan, hızla hareket eden parçacıktır.

$$E = h \times \gamma$$

E= Fotonun enerjisi

h= Planck sabiti(6.63×10^{-34} joule.sn/partikül)

γ = Frekans

- Moleküller parçacığın taşıdığı radyan enerjinin bir kısmını tutarak, temel halden bir üst enerji düzeyine, yani uyarılmış hale çıkarlar. Buna **“absorpsiyon”** denir.
- Uyarılmış durumdaki maddenin absorbe ettiği enerjiyi verip, eski haline geri dönmesine ise, **“emisyon”** denir. Bu iki esasa da dayalı ölçümler yapılabilir.

Absorbe edilen radyasyonun cinsi ve miktarı

- Molekülün yapısına
- Radyasyonla etkileşen molekül sayısına

bağlıdır.

Absorpsiyon

Maddenin içerdği;

- Sigma (δ) elektronları
- Pi (π) elektronları
- N elektronları (non-bonding)



- Her molekül kendi yapısına özgü bir şekilde belli dalga boyundaki ışığı absorplar. Bu durum, her molekülün kendi içinde yapmış olduğu bağların farklı olmasından kaynaklanır.
- Bir molekülde 3 tip valans elektronu (ışığı absorplayan elektronlar) bulunabilir:
 - Sigma (σ) elektronları: Tek bağlar, doymuş hidrokarbonlardaki C-C bağları
 - Pi (π) elektronları: Çift bağlar, doymamış hidrokarbonlardaki sigma bağlarıyla birlikte bulunan etilenik bağlar.
 - n-elektronları (non-bonding): Heteroatom içeren moleküllerde sigma bağlarının yanında bağ yapmayan elektronlar.

Elektron Tipi

Eksite Durum

n

n^* , π^* , σ^*

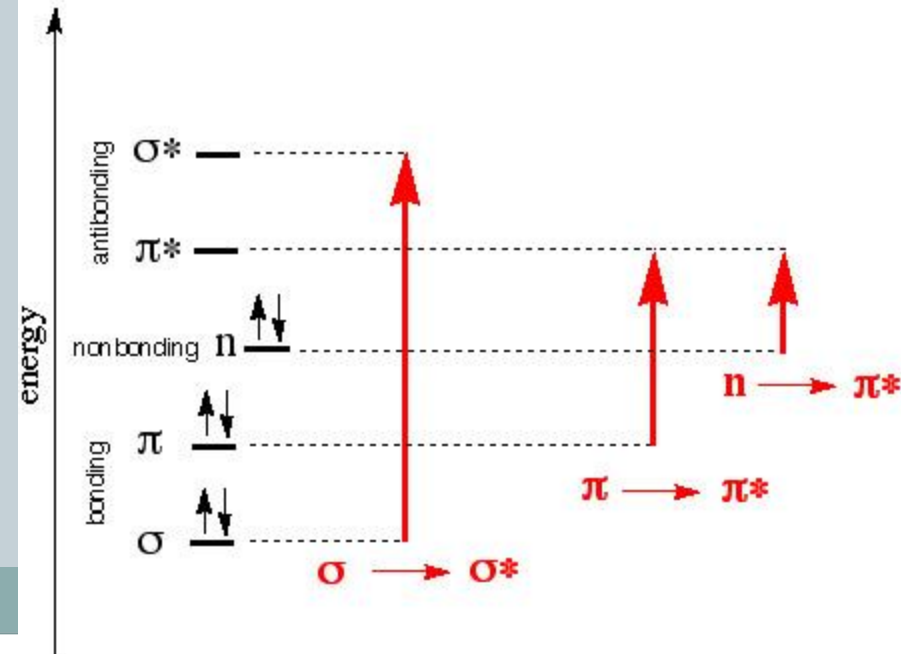
π

π^*

σ

σ^*

UV'de $\pi - \pi^*$, $n - \pi^*$ incelenir



Elektromanyetik ışıma ile maddenin etkileşimleri

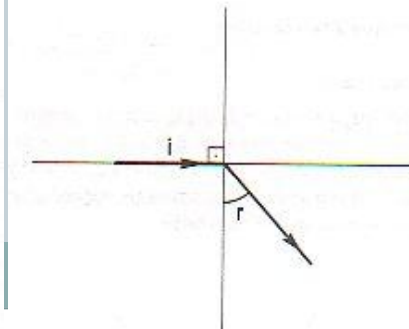
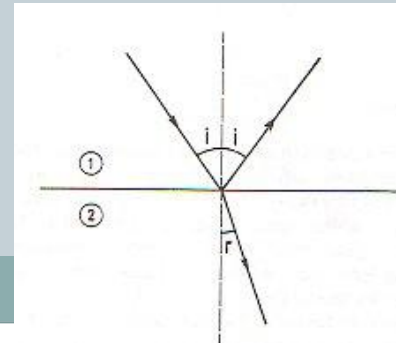


1. Işımanın kırılması ve yansıması
2. Işımanın saçılması
3. Işımanın polarizasyonu
4. Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu

Işımanın kırılması ve yansımaları



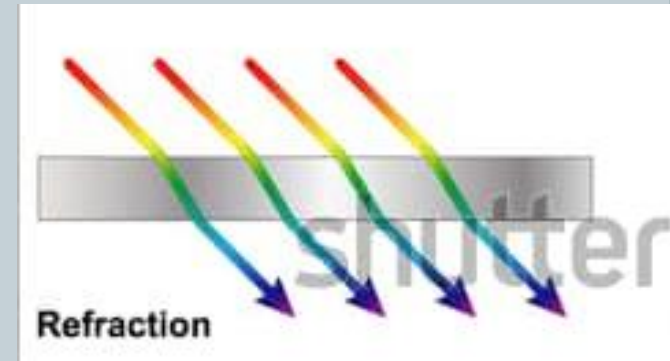
- Işıma bir ortamdan ikinci bir ortama geçtiğinde kısmen yansır, kısmen de ikinci ortama geçer. İkinci ortamda ilerleyen ışımının frekansı değişmez, ilerleme yönü ve hızı değişir.
- Işık demetinin bir ortamdan yoğunluğu farklı başka bir ortama geçerken yön değiştirmesine kırılma (refraksiyon) adı verilir.
- Kritik açının ölçülmesiyle her madde için farklı kırılma indisi belirlenmiştir.





Kırılma indisi değerleri, maddelerin belirgin özelliklerinde biri olarak tanımlanmıştır.

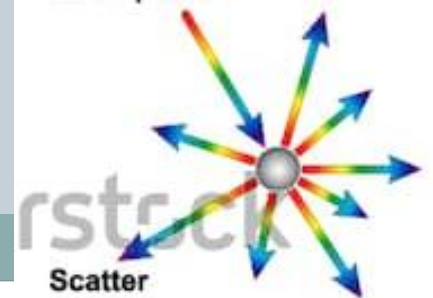
Kırılma indisinin ölçülmesine dayanan **refraktometri** yönteminde maddelerin kırılma indisi değerleri; maddenin nitel analizinde, saflık derecesinin belirlenmesinde ve karışımların nicel analizinde kullanılmaktadır.



Işımanın saçılması



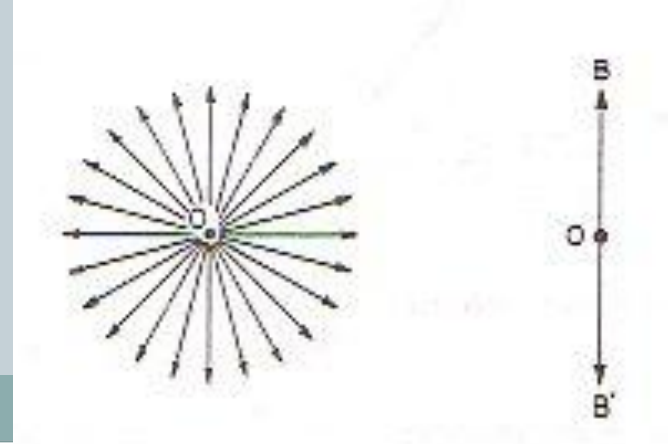
- Fotonun örnekteki parçacıklara çarparak yön değiştirmesine saçılma adı verilir.
- Görünür bölge ışması kullanıldığında, kolloidal ve bulanık çözeltilerde gözlenen saçılma, Tyndall saçılmasıdır.
- Çözünmüş moleküller veya çok atomlu iyonlardan saçılması Rayleigh saçılmasıdır.
- Parçacıklarla etkileşen dalga boyunun, ışığı saçan moleküllerin titreşim enerji düzeylerine göre değiştiği saçılma türü Raman saçılmasıdır.



Işımanın polarizasyonu



- Işık dalgası, genellikle her düzlemde ilerleyen dalgaların karışımıdır. Tek bir düzlemde ilerleyen ışık dalgasına düzlemsel polarize ışık denir.
- Düzlemsel polarize ışık ile asimetric ve ışığı absorplamayan maddeler etkileştiği zaman, polarize ışığın düzlemi sağa (+) veya sola (-) açı değiştirir.



Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu



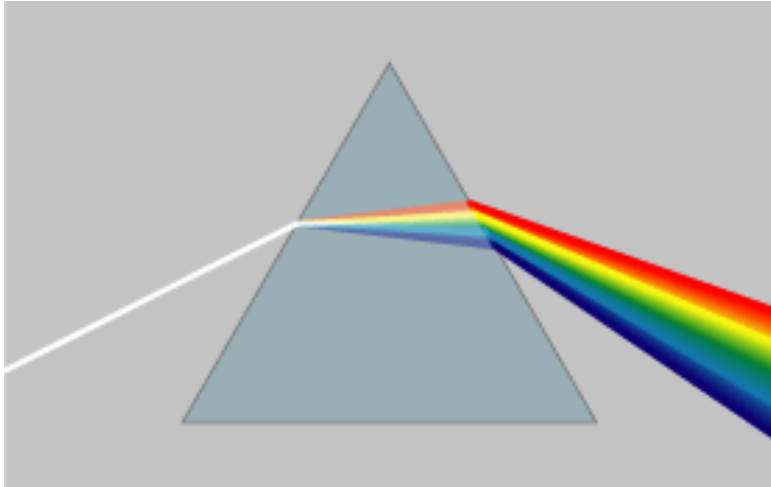
Atomlar, elektron konfigürasyonuna ve dış elektronlarının belirli enerji düzeyleri arasındaki geçişlerine bağlı belirli potansiyel enerji düzeylerinde bulunabilirler.

Atomlar, elektromanyetik ışımayı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçerler; bu geçişlerle ilgili olarak söz konusu atomun absorpsiyon spektrumları belirlenmiştir.

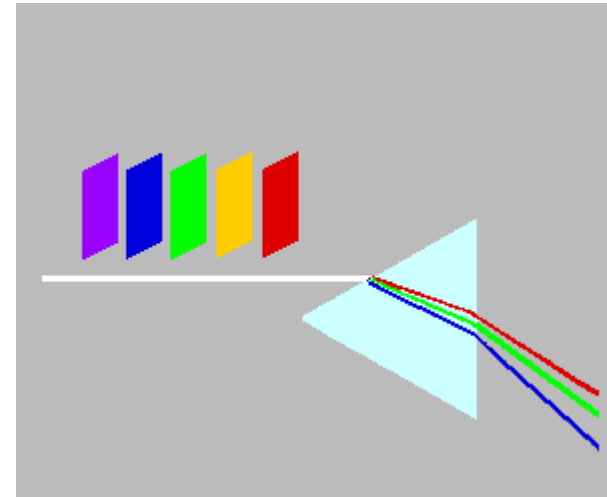


Elektromanyetik ışımı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçmiş olan atomlar, temel düzeye dönüş sırasında ultraviyole veya görünür bölge sınırları içinde ışıma enerjisi yayarlar (emisyon). Her atom için emisyon spektrumu da belirlenir.

Moleküller de uygun enerjideki fotonlarla etkileştiklerinde absorpsiyon sonucu uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış moleküller, bu kararsız durumdan fazla enerjilerini yayarak kurtulurlar (moleküler emisyon). Atom spektrumlarından daha karmaşık olmakla birlikte moleküler spektrumlar da belirlenmektedir.



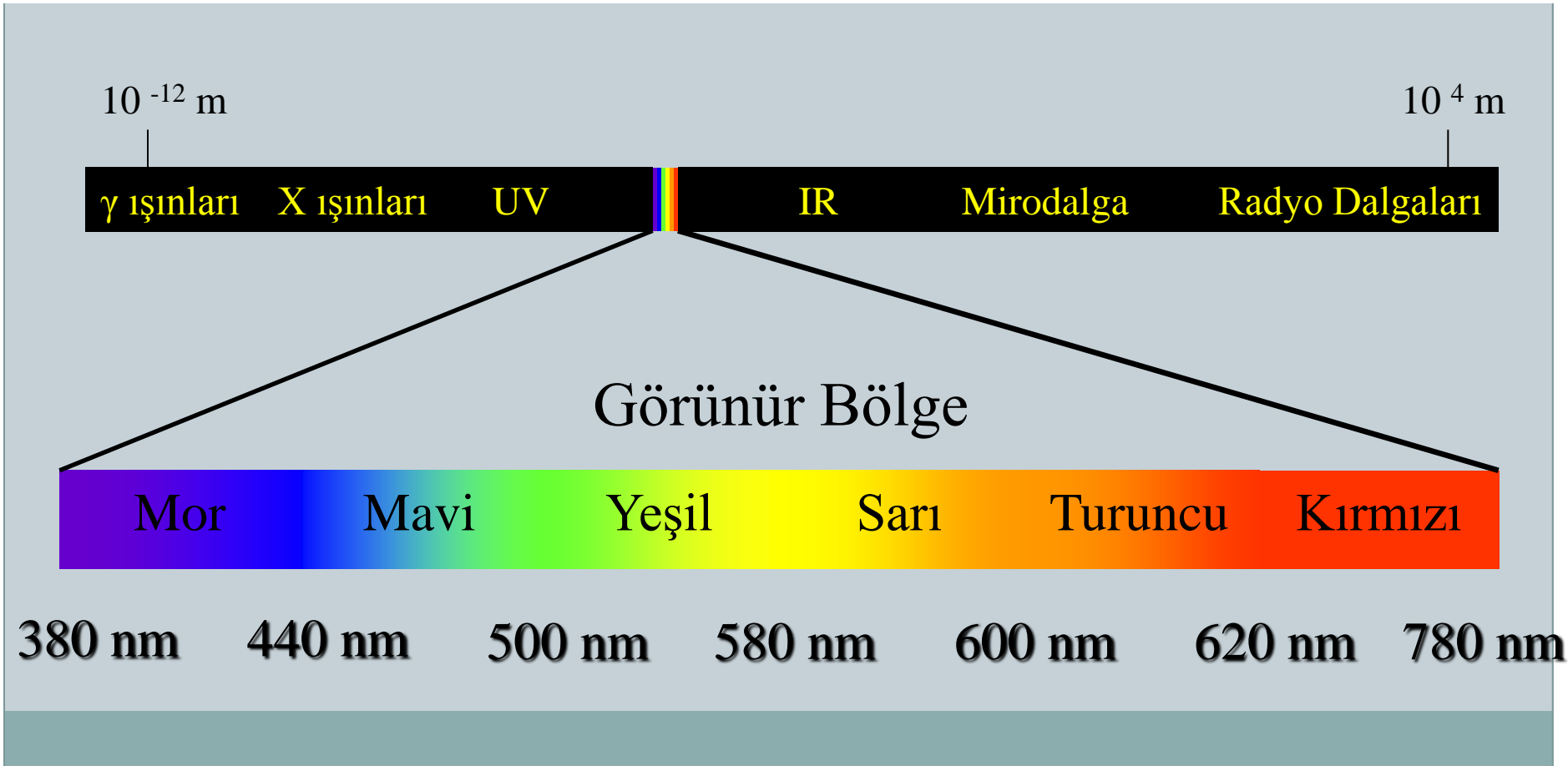
Eksitasyon



Emisyon

Elektromanyetik ışınma, uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür.

Elektromanyetik ışınmanın algılayabildiğimiz türleri, görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlarıdır.



Spektroskopinin Sınıflandırılması



1. **Absorpsiyon spektroskopisi**

- Bir maddenin absorpsiyon yaptığı elektromanyetik spektrum aralığında ölçüm yapılmasıdır. Örn. Kolorimetre, IR spektroskopisi, Atomik Absorpsiyon spektroskopisi, NMR spektroskopisi, ...

2. **Emisyon spektroskopisi**

- Bir maddenin emisyon yaptığı elektromanyetik spektrum aralığında ölçüm yapılmasıdır. Bunun için maddenin önce bir ışın absorpsiyonu yapmış olması gerekir. Bu ışın kaynağına göre isim değişir. Örn. Luminesans spektroskopisi -Spektroflorimetri

3. **Saçılım spektroskopisi**

- Bir maddenin belli dalga boylarında dağıttığı ışın miktarının ölçülmesidir. Örn. Raman Spektroskopisi



Spektroskopik ölçümler spektrofotometreler ile yapılır. Spektrofotometreler tek (single-beam) ya da çift ışık yollu (double-beam) olabilir. Aletlerde ana yapı genel olarak aynıdır.

Işık Kaynağı: Görünür bölgede, tungsten lambalar; UV'de, hidrojen deşarj lambaları kullanılır.

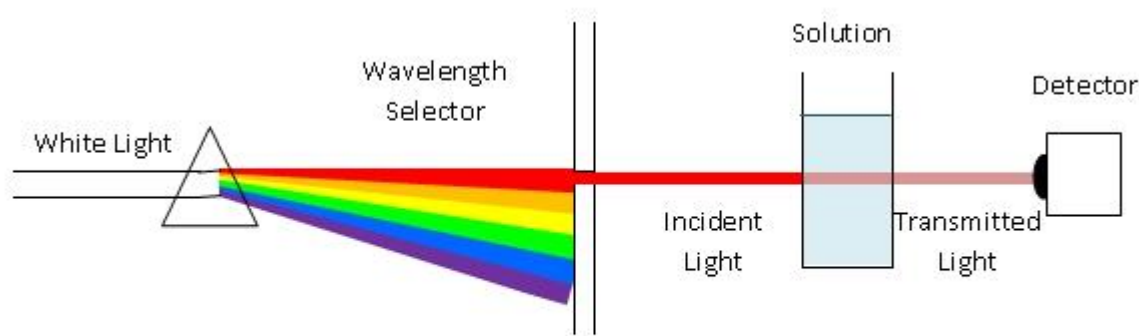
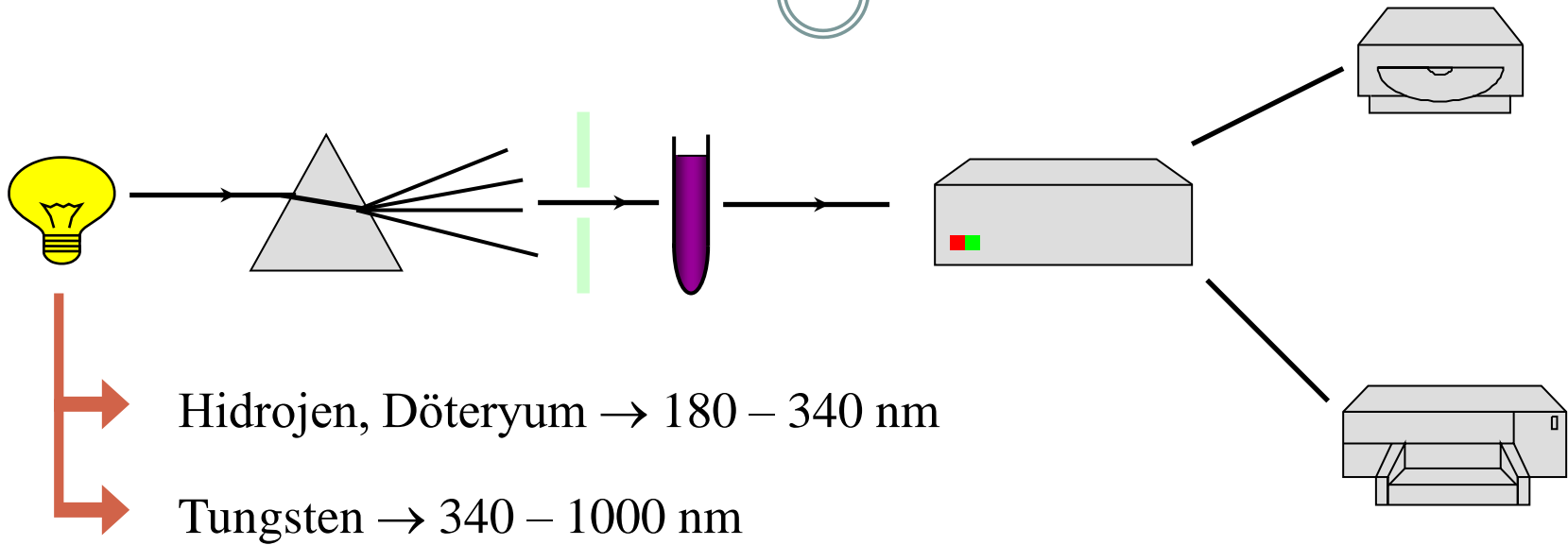
Monokromatör: Polikromatik ışığı monokromatik ışığa çeviren prizmalar kullanılır.

Spektrofotometre kullanarak;



- Spektrum alınabilir.
- Kinetik ölçümler yapılabilir.
- Kolorimetrik ölçümler yapılabilir.

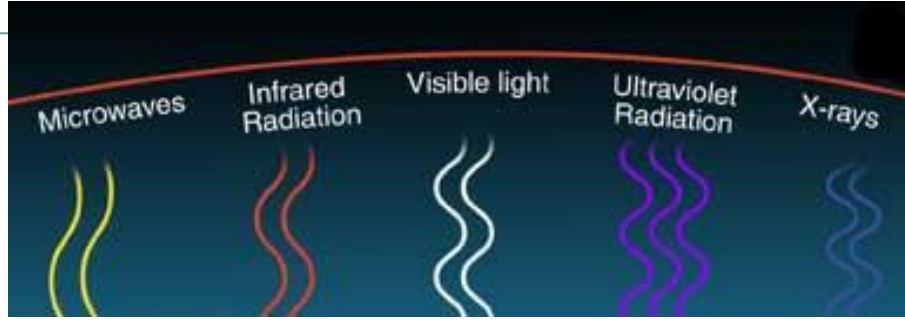
Spektrofotometre



The difference between the incident and transmitted light indicates the absorbance



- Numune Kabı: Görünür bölgede ölçüm yaparken, plastik/cam küvetler kullanılabilir; ama Yakın UV'de (Quartz UV) quartz küvetler kullanılmalıdır; çünkü cam/plastik küvetler girişim yaparak ölçümleri etkilerler.
- Dedektör: Numuneden geçen ışığı başka bir enerjiye dönüştürerek belirleyen düzenektir.



10^{-12} m

10^4 m

γ ışınları

X ışınları

UV

IR

Mirodalga

Radyo Dalgaları

Görünür Bölge

Mor

Mavi

Yeşil

Sarı

Turuncu

Kırmızı

380 nm

440 nm

500 nm

580 nm

600 nm

620 nm

780 nm

KOLORİMETRİ

UV, Görünür Bölge ve Yakın Kızılötesi (IR) Spektrum Özellikleri

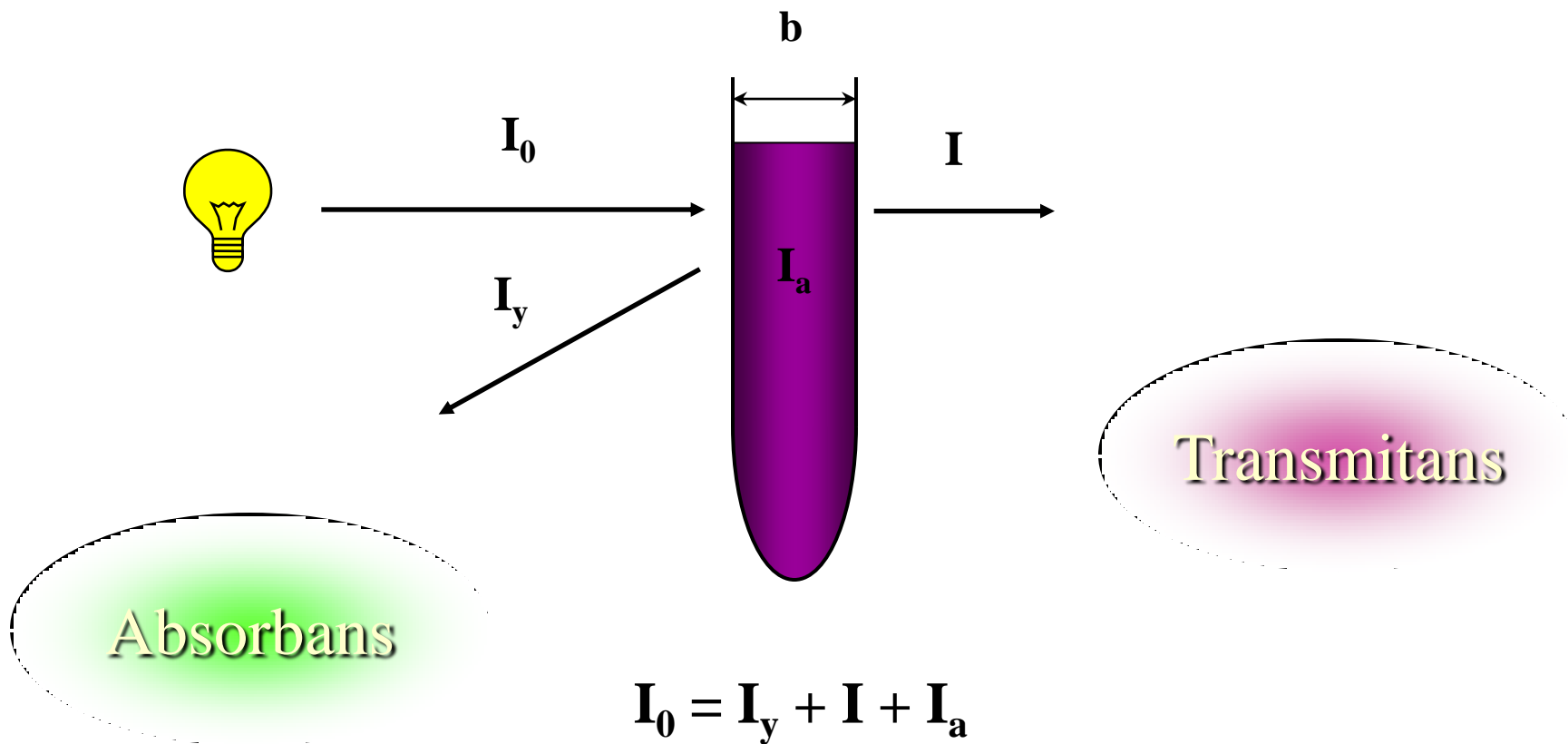
(())

Dalga Boyu (nm)	Bölge Adı	Gözlenen Renk
100 – 200	Vakum UV	Renk gözlenmez.
200 – 380	Yakın UV	Renk gözlenmez.
380 – 440	Görünür	Mor
440 – 500	Görünür	Mavi
500 – 580	Görünür	Yeşil
580 – 600	Görünür	Sarı
600 – 620	Görünür	Turuncu
620 – 750	Görünür	Kırmızı
750 – 2000	Yakın IR	Renk gözlenmez.

UV ve Görünür Bölge Özellikleri



Dalga Boyu (nm)	Bölge Adı	Kullanılan Küvet	Nedeni
100-200	Vakum UV	Vakum altında Quartz küvet	Oksijen ve ışın etkileşir.
200-380	Yakın UV	Quartz Küvet	Cam absorbans verir.
380-780	Görünür Bölge	Cam Küvet	Cam veya oksijen ile etkileşim göstermez.



$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = -\log \% T \quad \longrightarrow \quad A = \log \frac{I_0}{I}$$

Lambert-Beer Kanunu



Beer

Bir çözelti içinden geçen ve çözelti tarafından absorplanan ışın demetinin şiddeti, çözeltinin **derişimi** ile logaritmik olarak orantılıdır.

$$A = \log I_0/I = a.c$$

Lambert

Bir çözelti içinden geçen ve çözelti tarafından absorplanan ışın demetinin şiddeti, çözeltinin **derinliği**, yani ışığın aldığı yol ile logaritmik olarak orantılıdır.

$$A = \log I_0/I = b.c$$

$$A = -\log I_0 / I = \underbrace{a \times b \times c}$$

a
(L / g / cm)

ϵ
(L / mol / cm)

$A_1 = A_{\%1} = \Sigma$
(dl / g / cm)

a (k): Absorptivite: 1 cm'lik küvetteki 1 g/L çözeltinin absorbansıdır. ($a = \text{L/g/cm}$)

ϵ : Molar Absorptivite: 1 cm'lik küvetteki 1 molar çözeltinin absorbansıdır. ($\epsilon = \text{L/mol/cm}$)

Σ : Spesifik Ekstinksiyon Katsayısı ($A_1 = A(\%)1$): 1 cm'lik küvetteki %1'lik (a/h) çözeltinin absorbansıdır.

b: 1 cm'dir; yani ışığın geçtiği küvet yoludur.

c: Çözeltinin konsantrasyonudur.

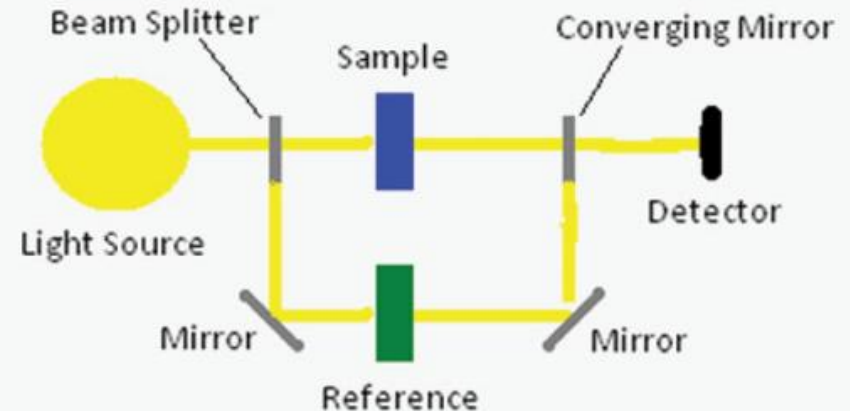


- Tek ışık yollu cihazlar(single beam) da doğru ölçüm için absorbans aralığı 0.3-0.6 absorbans birimi arasındadır ve optimum 0.43 absorbans biriminde başlar.
- Çift ışık yollu(double beam) spektrofotometreler içi ise optimum absorbans aralığı 0.6- 1.2 absorbans birimi arasındadır.

Single Beam



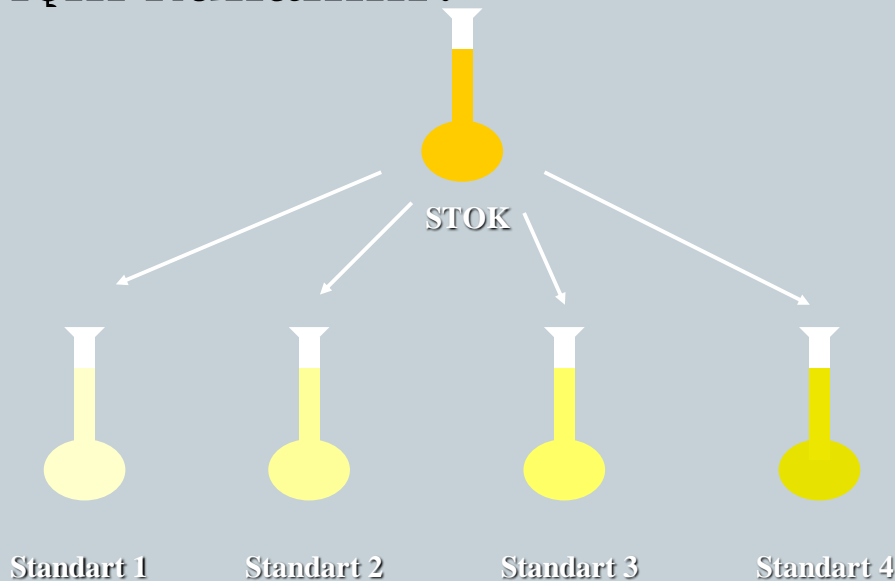
Double Beam



Spektrofotometrik analizlerde kullanılan çözeltiler



- Stok Çözelti: Analizi yapılacak maddeyi yüksek konsantrasyonda içeren çözeltidir.
- Stok çözeltiden belirli bilinen konsantrasyonlarda standart çözelti hazırlanır ve bu standart çözeltiler elimizdeki çözeltideki maddenin miktarını belirlemek için kullanılır.

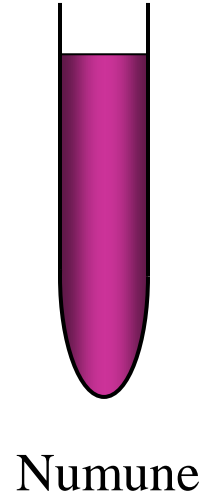
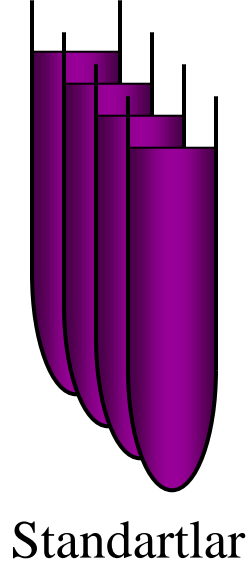


Spektrofotometrik analizlerde kullanılan çözeltiler

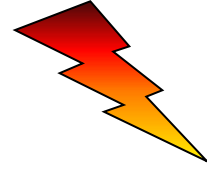
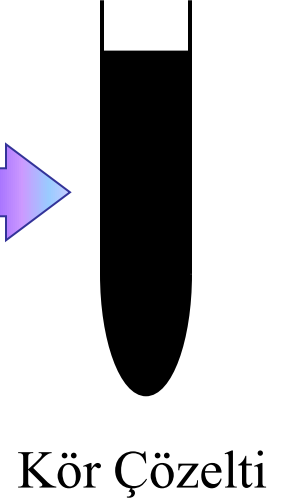
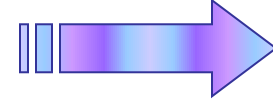


- **Standart Çözelti:** Stok çözeltinin seyreltilmesi ile belirli konsantrasyonda hazırlanan çözeltidir. Hazırlayacağımız standart çözeltiler konsantrasyonunu bulmak isteyeceğimiz çözeltinin konsantrasyonunun sınırları içinde olmalıdır.
- **Kör:** Analizi yapılacak madde dışında kullanılan diğer tüm reaktifleri içeren çözeltidir. Reaktiflerin oluşturabileceği girişimleri ortadan kaldırmak için hazırlanır. Örneklerle uygulanan bütün işlemler kör çözeltiliye de uygulanır.

Kör Çözelti

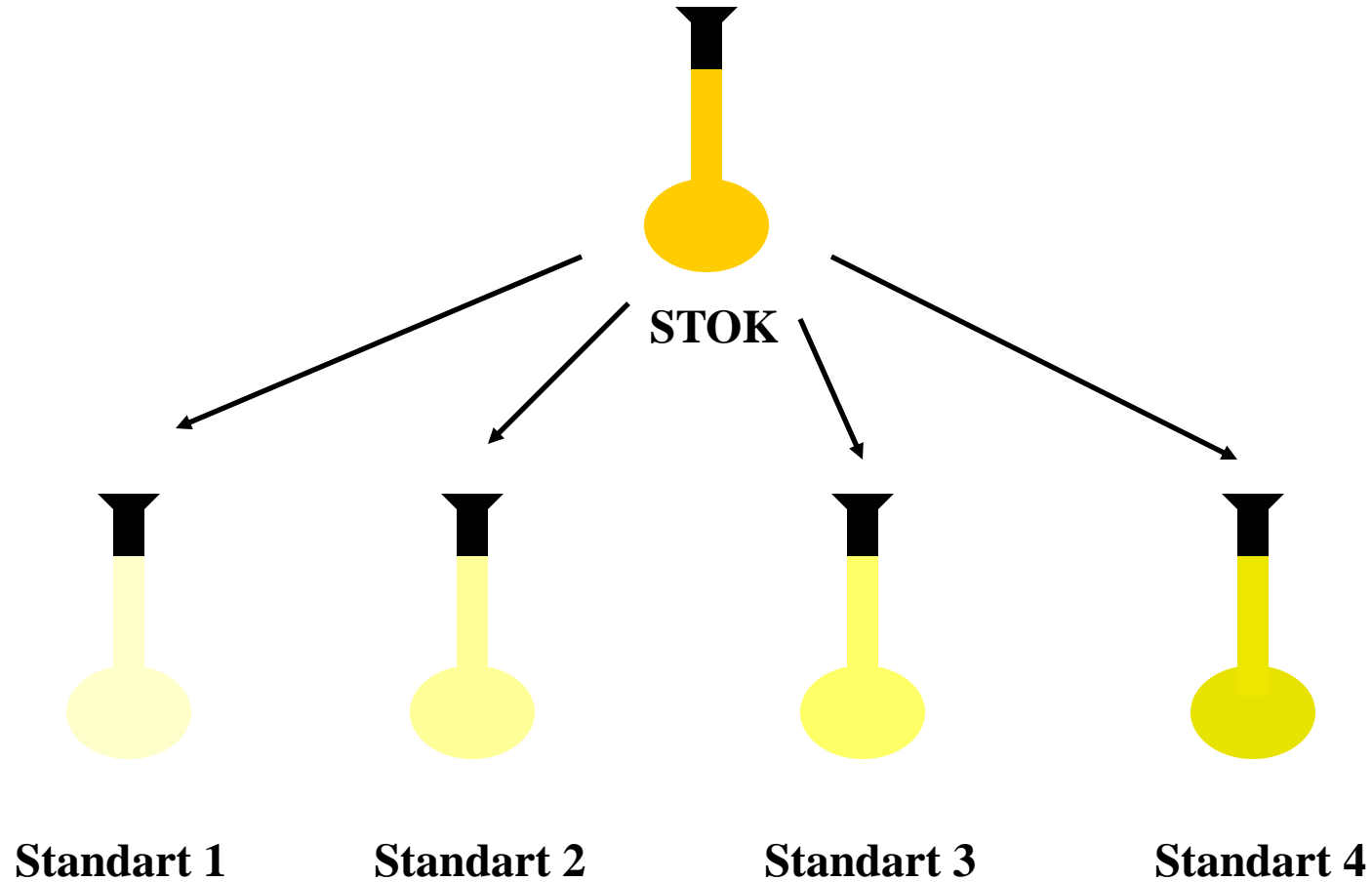


Çözücü ve
Reaktif
absorbansı
?



**Tüm deney prosedürü
değişiklik yapılmadan
uygulanır.**

Standart Çözelti



Kolorimetri



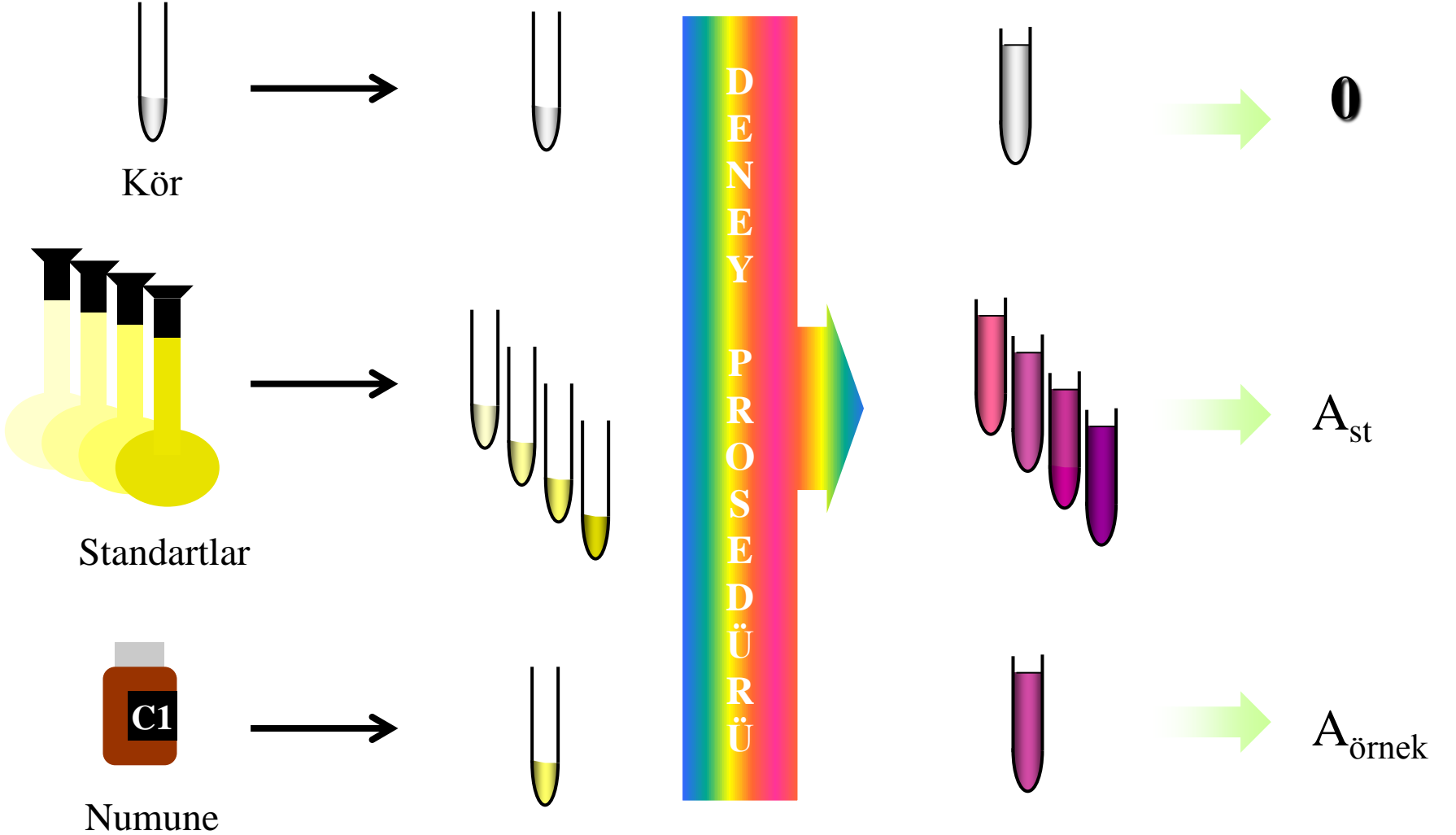
- Görünür bölge spektroskopisi olarak da adlandırılır.
- Esası renkli bir çözeltinin ışığı absorplamasına dayanır.
- Kolorimetri ile spektrofotometrinin çalışma prensipleri aynıdır; ancak burada prizma yerine değişik filtreler kullanılmaktadır.
- Kolorimetri görünür bölge spektroskopisi olduğu için 380- 750 nm arasında çalışılır. Genellikle çözeltilerin renk şiddeti arttıkça konsantrasyonları da artar.

Spektrofotometrik Analizden Önce;



- Stok Çözelti
- Standart çözelti
- Kör
- Deney prosedürü
- Kalibrasyon doğrusu
- Hesaplama

Deney Prosedürü



Hesaplama



- Formül Yöntemi
- Referans Yöntemi
- Grafik Yöntemi

$$C_{\text{örnek}} = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3}$$

1. Formül Yöntemi



$$A_{\text{st}} = a \times b \times C_{\text{st}} \quad \Rightarrow \quad a = \frac{A_{\text{st}}}{b \times C_{\text{st}}}$$

$$A_{\text{örnek}} = a \times b \times C_{\text{örnek}} \quad \Rightarrow \quad C_{\text{örnek}} = \frac{A_{\text{örnek}}}{a \times b}$$

2. Referans Yöntemi

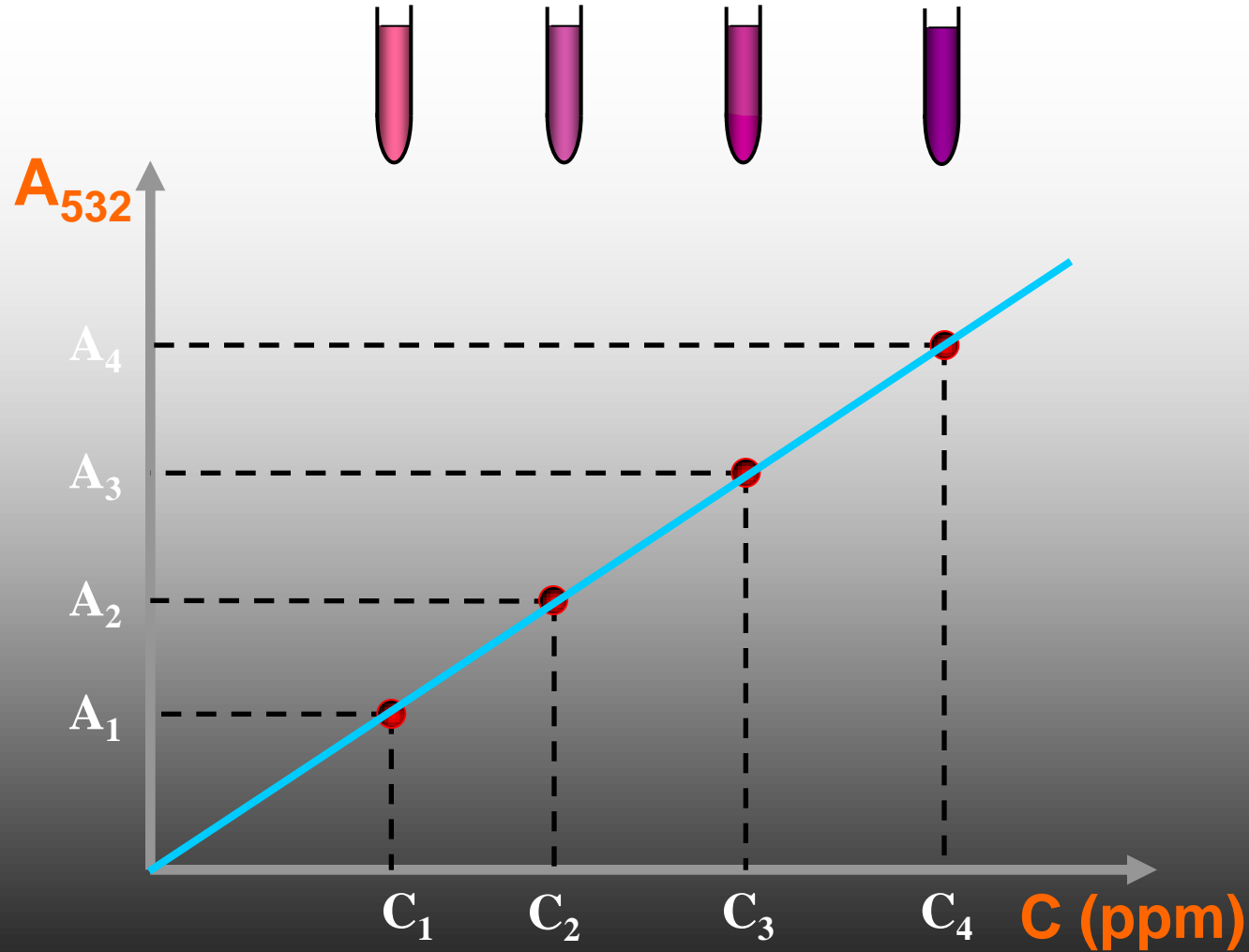


$$\frac{A_{\text{st}}}{A_{\text{örnek}}} = \frac{\cancel{a} \times \cancel{b} \times C_{\text{st}}}{\cancel{a} \times \cancel{b} \times C_{\text{örnek}}}$$

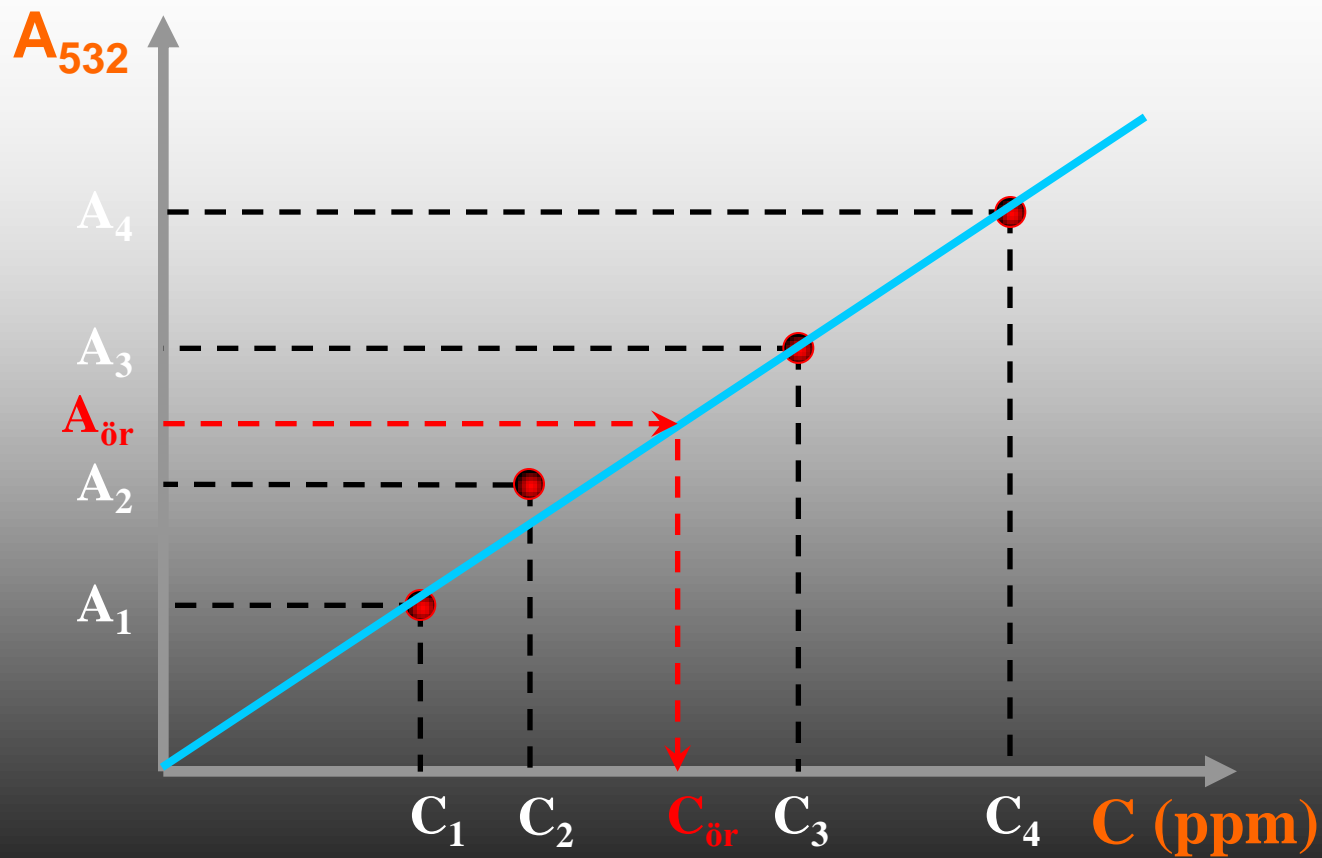


$$\frac{A_{\text{st}}}{A_{\text{örnek}}} = \frac{C_{\text{st}}}{C_{\text{örnek}}}$$

Kalibrasyon Doğrusu



3. Grafik Yöntemi



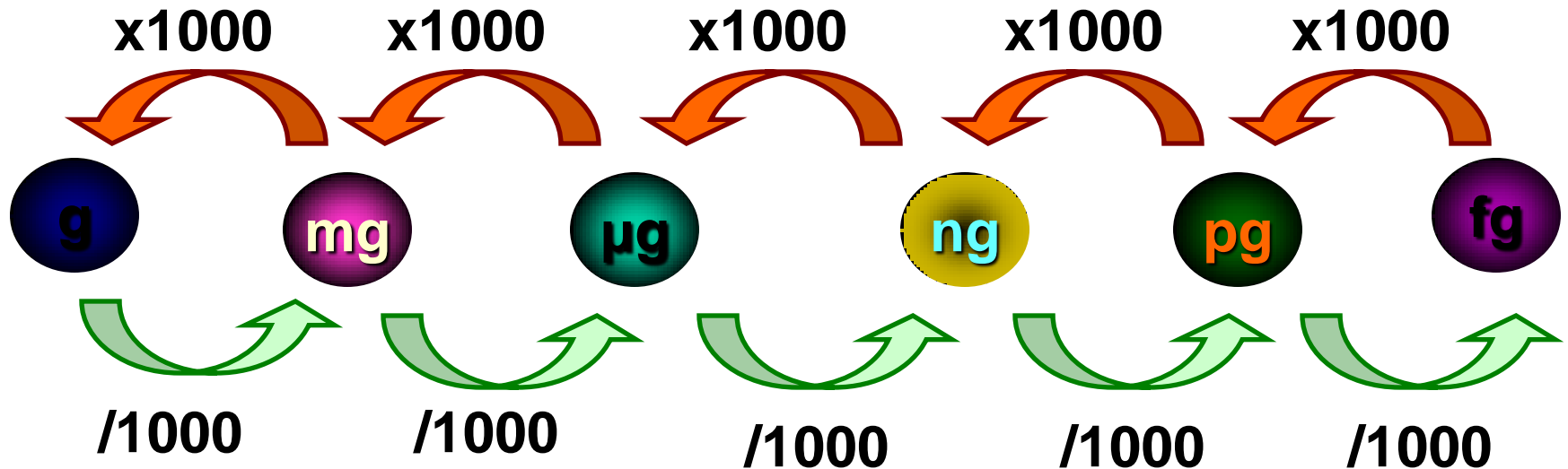
Biyolojik Tanımlarda Kullanılan Eser Düzeyler

Konsantrasyon Aralığı	Kısım (parts per)
1-999 mikrogram / ml ($\mu\text{g} / \text{ml}$) ($1 \mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g}$)	ppm (parts per million; milyonda bir kısım)
1-999 nanogram / ml (ng/ml) ($1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$)	ppb (parts per billion; milyarda bir kısım)
1-999 pikogram / ml (pg/ml) ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$)	ppt (parts per trillion; trilyonda bir kısım)
1-999 femtogram / ml (fg/ml) ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$)	ppq (parts per quadrillion; katrilyonda bir kısım)

Konsantrasyon Birimleri

10 g / dl asetaminofen

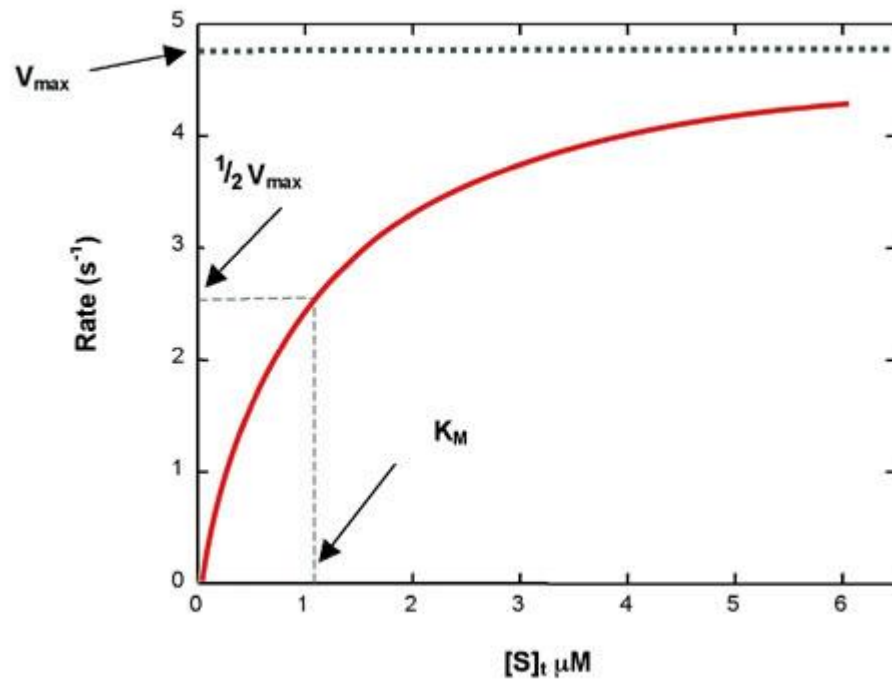
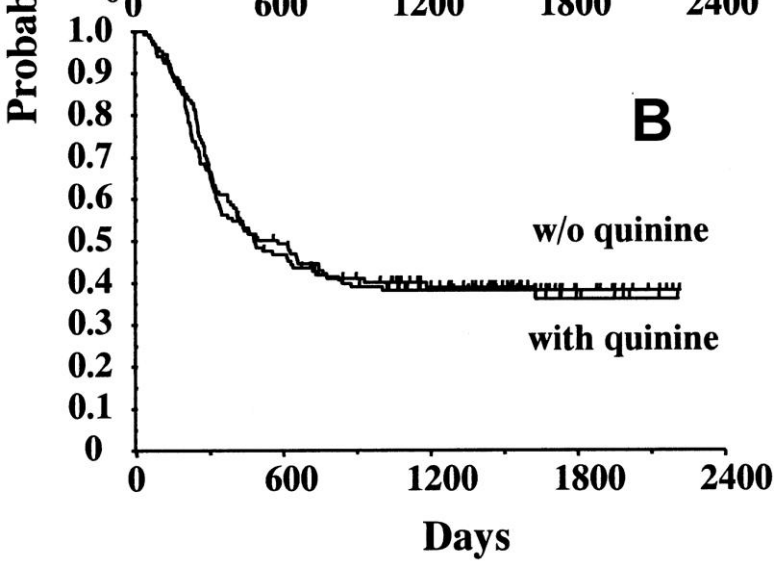
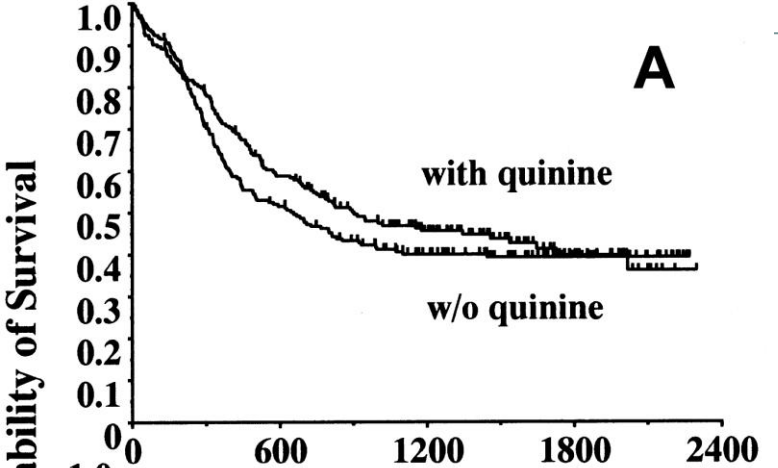
% 10'luk salisilik asit çözeltisi



$$1\text{g} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \mu\text{g} = 10^9 \text{ ng} = 10^{12} \text{ pg} = 10^{15} \text{ fg}$$

Kinetik okumada birim zamandaki absorbans değişimi ölçölür. Genellikle enzimlerin katalitik aktivitelerinin tayininde kullanılır. Hesaplama için deney ortamındaki kromojen maddenin molar absorpsiyon katsayısının bilinmesi gerekir.

Analiz tüpüne reaktif ve numune konup belirtilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. Deney metodunda belirtilen bir süre sonra ilk absorbans değerleri okunur. Daha sonra belirli zaman aralıklarında 2, 3 defa daha absorbans değerleri okunur ve birbirini takip eden her iki okumanın farkı alınır (ΔA). Daha sonra bu dakikalık absorbans farkları toplanıp okuma aralığı sayısına bölünerek dakikadaki ortalama absorbans değişimi ($\Delta A/\text{dakika}$) bulunur.



Spektrofotometrik Analizlerde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar:



- 1-Çözeltide herhangi bir çökelti ve hava kabarcığı olmamalıdır. Çöküntü veya hava kabarcığı varsa, tutarsız sonuçlar alınabilir. (Hava kabarcıkları fiske ile veya ultrasonik banyo ile giderilebilir.)
- 2-Küvetler son derece temiz olmalıdır. Küvetleri distile su ile yıkayıp, kurutmak gereklidir. Ayrıca küvetlerde çizikler olmamalıdır; bu da sonuçları etkileyebilir.
- 3-Hep aynı tip küvetleri kullanmak gereklidir; araştırma içinde küvetler değiştirilmemelidir.
- 4- Küvetler uygun hacimde olmalıdır.

Spektrofotometrik Analizlerde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar:



- 5-Stabil çözeltiler için, beklemeden sonra da ölçüm yapılabilir. Ancak stabil olmayan çözeltilerde beklemeyle renk değişebilir. Bu durumda ölçüm hemen yapılmalıdır.
- 6-Atmosferik koşullar da etkili olabilir; bu nedenle hep aynı koşullarda ölçüm yapılmalıdır.
- 7-Kullanılan reaktifler saf olmalıdır; zira reaktiflerin içindeki kirlilikler absorbansını ölçtüğümüz çözelti ile aynı dalga boyunda λ_{\max} verebilir.



BAŞARILAR...