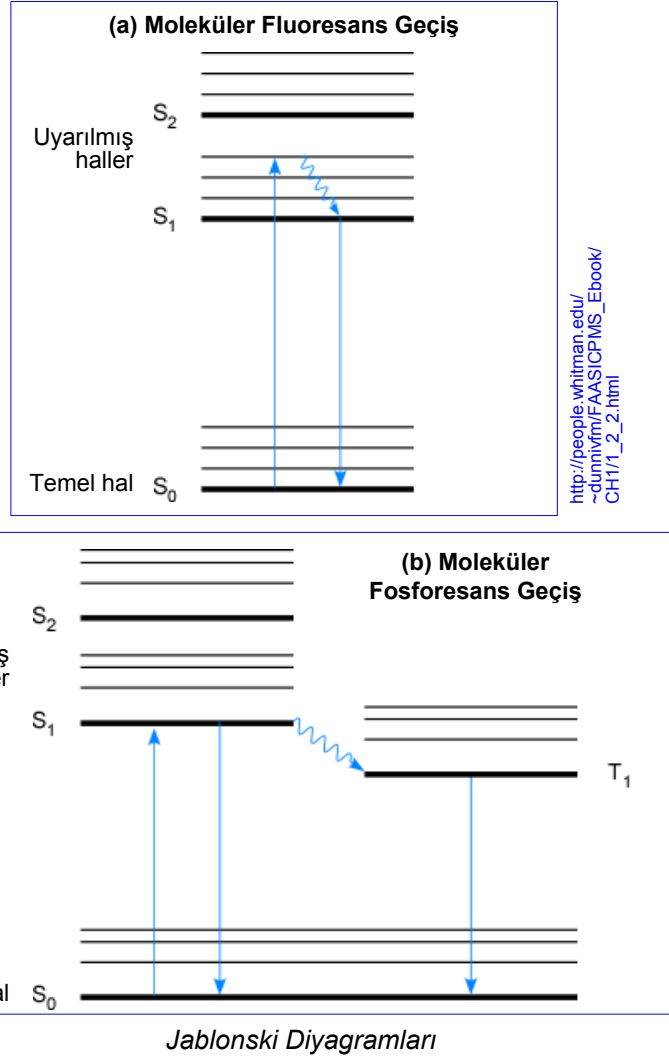


MOLEKÜLER FLUORESANS SPEKTROSKOPİ

Ref. e-makaleleri, Enstrümantal Analiz, Işın Kaynakları, Dalga Boyu Seçiciler, Örnek Kapları , Dedektörler



Kimyasal sistemlerin çoğu fotoluminesanır; yani elektromagnetik ışınla uyarıldıklarında aynı veya daha uzun dalga boylarında ışın yayarlar. Fotoluminesans iki şekilde oluşur;

- Floresans, ve
- fosforesans.

Bu olayların oluşum mekanizmaları kısmen birbirinden farklıdır ve bu fark uyarılmış halin yaşam süresi gözlenerek anlaşılabilir. Floresansta, ışınlandırma durdurulduktan hemen sonra ($< 10^{-6}$ s) ışılda kesilir; fosforesansta ise olay saptanabilecek kadar uzun bir süre devam eder. Analitik yönden floresans fosforesanstan daha önemli olduğundan bu bölümde floresans olayı üzerinde durulacaktır.

Eser miktardaki pek çok inorganik ve organik madde floresans şiddetinin ölçülmesiyle kantitatif olarak analiz edilebilir; özellikle biyolojik sistemler için çok sayıda fluorometrik yöntem geliştirilmiştir.

Fluorometrenin en önemli özelliklerinden biri yapısından kaynaklanan hassasiyettir. Yöntemin alt sınırı, bir absorpsiyon yönteminden en az 10 kat daha düşüktür (1-100 ppb) ve seçiciliği diğer yöntemlerden daha iyidir. Bu avantajlarına karşın fluometre diğer absorpsiyon yöntemleri kadar fazla kullanılmaz, çünkü floresans özellik gösteren kimyasal sistemler sınırlı sayıdadır.

FLUORESANSIN TEORİSİ

Floresans davranış basit ve kompleks gazlarda, sıvı ve katı kimyasal sistemlerde görülebilir. En basit floresans seyreltik atomik buharlar tarafından çıkarılır. Örneğin, buharlaştırılmış sodyum atomunun 3s elektronları, 5896 ve 5890 Å'deki ışının absorpsiyonuyla 3p haline uyarılırlar. 10^{-8} s kadar sonra, elektronlar tekrar temel hale dönerlerken bu iki dalga boyunda (her yönde) ışın çıkarılırlar. Bu tip floresansa, yani absorpsiyon ışının hiç değişmeden tekrar emitlenmesine "rezonans ışını veya floresansı" denir.

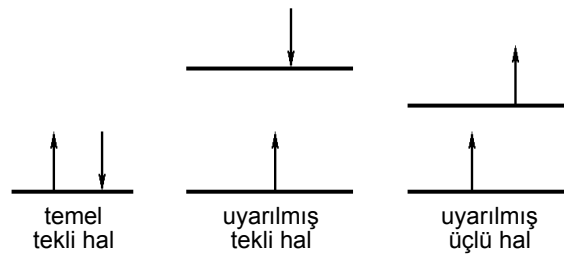
Poliatomik moleküller ve iyonlar da rezonans ışını verirler; ayrıca, daha uzun dalga boylu özel ışınlar emitlenir. Bu olaya "Stokes kayması" denir.

Uyarılmış Haller

İki atom arasındaki bir bağ, bağları oluşturan bir çift elektronun atomik orbitallerinin üst üste düşmesiyle oluşan bir veya daha fazla moleküler orbitalden oluşur. İki atomik orbitalin birleşmesiyle bir bağ orbitali ve bir anti-bağ orbitali meydana gelir; birincinin enerjisi daha düşüktür ve bu nedenle temel haldeki elektronlar buraya yerleşirler. Her bir moleküler orbitalin elektronik enerji seviyesi üzerinde birbirine çok yakın bir seri titreşim enerji seviyeleri bulunur. Bundan dolayı, her elektronik absorpsiyon bandında, temel halden uyarılmış bir elektronik halin birkaç titreşim seviyesine geçişten kaynaklanan, bir seri birbirine yakın titreşim pikleri yer alır.

Pek çok molekülde çift sayıda elektron vardır; temel halde, bu elektronlar çeşitli atomik ve moleküler orbitallerde çiftler şekindedirler. Pauli dışlama ilkesine göre bir orbitaldeki iki elektronun spinleri birbirinin zıttıdır (yani çiftleşmiş spinler). Spin çiftleşmesinin (çift sayılı elektronlu) net elektron spinini yoktur ve molekül diamagnetik özelliktedir. Tüm elektron spinlerinin çiftleştiği bir moleküler elektronik hale "tekli (singlet)" hal denir; molekül bir magnetik alana tutulduğunda enerji seviyesinde ayrılma (bölünme) olmaz (burada çekirdek spininin etkisi ihmal edilmiştir). Bir serbest radikal için temel hal bir "ikiz (doublet)" haldir; burada, tek elektron bir magnetik alanda iki düzende bulunabilir ve enerji seviyesi ikiye ayrılır.

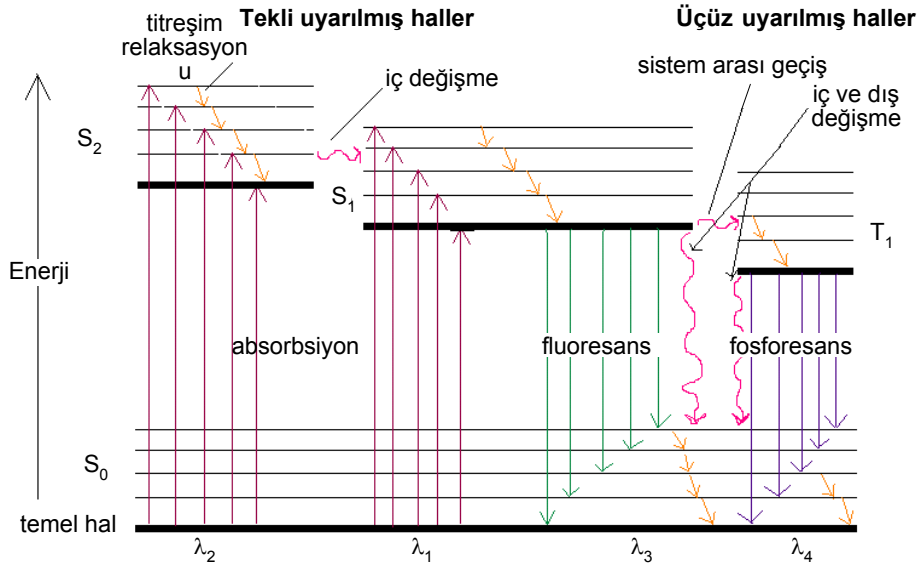
Bir molekülün elektronlarından biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarıldığında, bir tekli veya bir "üçüz (triplet)" hal oluşur. Uyarılmış tekli hale geçirilen elektronun spinini temel haldeki elektronla çiftleşmiş durumdadır; üçlü (üçüz) halde ise iki elektronun spinleri çiftleşmiş değil paralel durumdadır. Bu haller aşağıdaki gibi gösterilebilir (Tekli, ikiz, ve üçlü terimleri spektroskopik çoklukları belirtir).



Uyarılmış üçlü haldeki bir molekülün özellikleri, buna uygun tekli haldeki özelliklerinden farklıdır. Örneğin, molekül birinci durumda paramagnetik olduğu halde,

ikinci durumda diamagnetiktir. Elektronik haldeki bir değişiklikle de ilgili olan bir tekli-üçlü geçişi (veya tersi) olasılığı, tekli-tekli geçişten daha azdır. Bundan dolayı, uyarılmış bir üçüz halin ortalama yaşam süresi bir saniye (veya daha fazla) gibi uzun bir zamandır. Uyarılmış bir tekli hal içinse bu süre 10^{-8} s kadardır. Bundan başka bir temel-hal molekülünün ışın-etkisiyle bir üçüz hale uyarılması çabukça gerçekleşemez ve bu işlem nedeniyle oluşan absorpsiyon piklerinin şiddeti, benzer tekli-tekli geçişten oluşan piklerin şiddetinden birkaç derece daha küçüktür. Uyarılmış bir üçlü hali, bazı moleküllerin "uyarılmış" bir tekli halinin bir arada toplanmasıyla da oluşabilir; bu işlemin sonucunda fosforesans davranış çıkar.

Şekil-1'de tipik bir fotoluminesans molekülün enerji seviyesi diyagramının bir kısmı gösterilmiştir. Alttaki kalın yatay doğru molekülün temel-hal enerji seviyesidir; normal olarak bir tekli haldir ve S_0 'la gösterilir. Oda sıcaklığında temel hal, bir çözeltideki tüm moleküllerin enerjilerini belirtir.



http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Theory

Şekil-1: Bir fotoluminesans sistem; absorpsiyon, fluoresans ve fosforesans için kısmi Jablonski (enerji) diyagramı

Üst kısımdaki kalın yatay hatlar, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim hallerinin enerji seviyeleridir. Soldaki iki hat birinci (S_1) ve ikinci (S_2) elektronik tekli halleri, sağdaki hat (T_1) birinci elektronik üçüz hali gösterir. Normal olarak, birinci uyarılmış üçlü halin enerjisi, karşılığı olan tekli hallerden daha düşüktür.

Dört elektronik halin her biri için çok sayıda titreşim enerji seviyeleri bulunur. Bunlar ince yatay çizgilerle gösterilmiştir.

Şekil-1'de görüldüğü gibi, bu molekülün uyarılması, iki ışın bandının absorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir, bunlardan biri λ_2 ($S_0 \rightarrow S_1$) dalga boyu dolayında, diğeri daha kısa olan λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$) dolayındadır. Uyarma işlemi sonunda molekül birkaç uyarılmış titreşim hallerinden birine geçer. Doğrudan üçüz hale uyarılma mümkün olmaz, çünkü bu işlem çoklukta bir değişiklik gerektirir.

Deaktivasyon (Aktifliğin Bozulması)

Uyarılmış bir molekül birkaç mekanik kademeye temel haline geri döner. Şekil-1'deki dik oklarla gösterildiği gibi, bu kademelerden ikisi (bir ışın fotonu çıkar) fluoresans ve fostoresanstır. Dalgalı çizgilerle gösterilmiş olan diğer deaktivasyon kademeleri ışımaz işlemlerdir. Temel hale geçişteki en olası durum yaşam süresi minimum olan uyarılmış haldir. Buna göre, fluoresansla deaktivasyon ışımaz işleme kıyasla daha hızlı ise, fluoresans olayı gözlenir. Eğer ışımaz bir yolun hız sabiti daha yüksekse, fluoresans olayı gözlenmez veya çok zayıftır.

Fluoresans olayının gözlenebildiği sistemler oldukça azdır. Yapısal ve çevresel durum ışımaz relaksasyon veya deaktivasyon hızını, emisyon reaksiyonu hızının (kinetik olarak) buna rakip olduğu bir noktaya kadar azaltır. Bu hızı kantitatif olarak saptayabilecek emisyon işlemi ile ilgili yeterli bilgi vardır.

Emisyon Hızı

Fluoresans emisyon uyarma işleminin tersi olduğundan, bir uyarılmış halin yaşam süresi ve uyarma işlemine uygun absorpsiyon pikinin molar absorbtivitesi arasında basit ters bir ilişki bulunur. Deneylerle de doğrulandığı gibi uyarılmış halin tipik yaşam süresi, molar absorbtivite $10^3 - 10^5$ aralığında olduğunda $10^{-7} - 10^{-9}$ saniyedir (ve emisyonla deaktive olur). Geçiş işlemi olasılığının düşük olduğu daha zayıf absorblayıcı sistemler için, yaşam süresi $10^{-6} - 10^{-5}$ saniye gibi daha uzun olur. Deaktivasyon işlemi fluoresans şiddeti azaltır.

Titreşim Relaksasyonu (Gevşemesi)

Şekil-1'de görüldüğü gibi, bir molekül, uyarma işlemi sırasında titreşim seviyelerinden herhangi birine gönderilebilir. Çözeltilerde, uyarılmış moleküllerle solvent arasındaki çarpışmalar sonunda fazla titreşim enerjisi kaybolur; böylece bir enerji transferiyle solventin sıcaklığında az bir artış gözlenir. Titreşimce uyarılmış bir molekülün ortalama yaşam süresi 10^{-12} saniye veya daha az ise relaksasyon işlemi olur; bu süre bir elektronik uyarılmış halin yaşam süresinden daha kısadır. Buna göre, çözeltiden floresans oluşması, daima "uyarılmış bir halden en düşük titreşim seviyesine" bir geçiş olmasıyla gerçekleşir. Elektron "temel halin herhangi bir titreşim seviyesine" geri dönebildiğinden (Şekil-1a), diğer bir titreşim relaksasyonu ile hızla en düşük temel hale düşer.

Titreşim relaksasyonu yeterliyse elektronik bir geçişten oluşan floresans bandı absorpsiyon bandından daha düşük frekanslara kayar; Sadece temel haldeki en düşük titreşim seviyesi ve buna uygun uyarılmış hal seviyesi arasındaki geçişlerle oluşan rezonans piki absorpsiyon bandının üzerine düşer.

İç Dönüşüm (İç Değişme)

"İç dönüşüm" terimi ile, bir molekülün ışın yaymadan daha düşük enerjili bir "elektronik" hale geçtiği molekül içi işlemler tarif edilir. İç dönüşüm, özellikle iki elektronik enerji seviyesinin, titreşim seviyelerinde bir üst üste düşme olayı yaratacak kadar yakın olması durumunda ortaya çıkar. Bu durum iki uyarılmış tekli hal için Şekil-1'de gösterilmiştir. Üst üste durumda iki uyarılmış halin potansiyel enerjileri birbirine eşittir; bu eşitlik verimli bir geçiş sağlar. Üst üste titreşim seviyeleri yoluyla iç değişme olasılığı, bir yüksek uyarılmış halden floresansla enerji kaybetme olasılığından daha fazladır. Buna göre (Şekil-1), λ_2 ışını ile uyarılma sonunda S_2 ve S_0 arasındaki bir geçişten oluşan bandın çıkmasıyla, λ_3 dalga boyunda floresans üretilir. Burada, uyarılan molekül yüksek elektronik halden bir seri titreşim relaksasyonları, bir iç değişme ve diğer relaksasyonlar yoluyla daha düşük elektronik halin en düşük titreşim seviyesine ilerler. Bu halde, floresans uymayı yapan λ_1 veya λ_2 dalga boylarına bağlı olmayarak, "sadece" λ_3 meydana gelir.

Şekil-1'de görülen iç değişme işlemlerinin ($S_1 \rightarrow S_0$ ve $T_1 \rightarrow S_0$) mekanizması çok iyi bilinmemektedir. Temel halin titreşim seviyeleri birinci uyarılmış halin titreşim seviyeleri üzerine düşebilir; böyle durumlarda deaktivasyon, yukarıda tarif edilen şekilde olur. Bu durum alifatik bileşiklerde çok görülür, ve bu nedenle de alifatik

bileşiklerde fluoresansa nadiren rastlanır; yani, titreşim seviyelerinin üst üste düşmesiyle çok hızla enerji transferi olması fluoresansı engeller.

"Ön disosiyasyon (ön ayrışma)" olayı da iç değişmeye neden olabilir. Burada, elektron, yüksek bir elektronik seviyeden, titreşim enerjisi bir bağı koparabilecek kadar büyük olan, daha düşük bir elektronik seviyenin en üstteki titreşim haline geçer. Büyük bir molekülde, kromoforların elektronik uyarılma enerjilerinden daha az kuvvetli bağların bulunma olasılığı fazladır. Elektronik enerjinin iç değişimle titreşim enerjiye geçmesinin ardından kromoforların enerji absorpsiyonu sonunda bu bağlar kopar.

Bir ön disosiyasyon, bir disosiyasyon olayından farklıdır; disosiyasyonda absorblanan ışın, bir kromoforun elektronunu kromoforik bandı koparabilecek kadar yüksek bir titreşim seviyesine doğrudan uyarır; bir iç değişme olayı yoktur. Disosiyasyon işlemi de fluoresans olayına rakiptir.

Dış Dönüşüm (Değişme)

Uyarılmış bir elektronik halin deaktivasyonu, uyarılmış molekül ve solvent (veya diğer moleküller) arasındaki etkileşim ve enerji transferi ile ilgilidir. Bu işlemlere "dış dönüşüm" denir. Solventin fluoresans şiddetini önemli derecede etkilemesi dış değişme olayının varlığını gösteren bir örnektir; ayrıca tanecikler arasındaki çarpışma sayısını azaltan koşullar (düşük sıcaklık ve yüksek viskozite) fluoresansın yükselmesini sağlarlar. Dış değişmenin detayları çok iyi bilinmemektedir.

En düşük uyarılmış tekli ve üçüz hallerden temel hale ışımsız geçiş (Şekil-1), iç değişme olayları kadar, dış değişme olayları ile de ilgilidir.

Sistem-Arası Geçiş

"Sistem-arası geçiş", uyarılmış bir elektron spininin ters dönmesi ve molekülün çokluğunda bir değişme işlemidir. İç değişmede olduğu gibi, iki halin titreşim seviyelerinin üst üste düşmesi bu geçişin olasılığını artırır. Şekil-1'de görülen tekli-üçlü geçişi bir örnektir; burada, en düşük tekli titreşim seviyesi üstteki üçlü titreşim seviyelerinden biri ile üst üste düşer ve böylece spin halinde bir değişiklik olasılığı çok büyür.

Sistem-arası geçiş, iyod ve brom gibi, ağır atomlar içeren moleküllerde daha çok görülür. Bu tip atomların varlığında spin ve orbital hareketleri arasındaki etkileşim

çok büyük ve spinde bir değişiklik kolaylaşır. Çözeltide moleküler oksijen gibi paramagnetik maddelerin bulunması da sistem içi geçişi artıracağından fluoresansı azaltır.

Fosforesans

Deaktivasyon olayı fosforesansla da ilgilidir. Uyarılmış bir üçüz hale sistem-arası geçişten sonra iç veya dış dönüşüm, veya fosforesans yoluyla deaktivasyon oluşur. Bir üçlü-tekli geçişi olasılığı, bir tekli-tekli değişiminden daha azdır, ve uyarılmış üçlü halin ortalama yaşam süresi, emisyonla göre, 10^{-4} - birkaç saniye aralığındadır. Buna göre, böyle bir geçişten oluşan emisyon, ışınlandırma kesildikten sonra bir süre daha devam eder.

İç ve dış değişimler fosforesans olayı ile rekabet ederler, bu tip emisyon sadece çok düşük sıcaklıklarda veya viskoz ortamlarda gözlenebilir.

Fluoresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler

Bir maddenin fluoresans veya fosforesans olup olmaması moleküler yapısına, kimyasal çevresine, ve oluşan emisyonun şiddetine bağlıdır. Bu kısımda değişkenlerden bazılarının etkileri kısaca incelenecektir.

Verimi

Bir fluoresans işlemindeki "kuvantum verimi" veya "kuvantum etkinliği", basitçe, ışık veren moleküllerin sayısının toplam uyarılan moleküllerin sayısına oranı olarak tarif edilir, (fosforesans için de kuvantum verimi benzer şekilde tarif edilir). Fluoresansın gibi çok yüksek bir fluoresans molekül için kuvantum verimi, bazı koşullarda, 1'e ulaşır. Hissedilir derecede ışık göstermeyen kimyasal maddelerin verimi sıfıra yakındır.

Şekil-1 deki bilgilere ve deaktivasyon işlemleri üzerindeki incelemelere göre bir bileşiğin fluoresans kuvantum verimi ϕ , en düşük uyarılmış tekli-halin olduğu işlemlerin relatif hızları ile saptanmalıdır; bu işlemler fluoresans, sistemler arası geçiş, dış ve iç dönüşümler, öndisosiyeasyon ve disosiyeasyondur. Bu ilişkileri aşağıdaki denklemle gösterebiliriz. (k terimleri, yukarıda belirtilen işlemlerin hız sabitleridir.)

Fluoresansın kuvantum verimi:

$$\phi = \frac{\text{emitlenen fotonların sayısı}}{\text{absorblanan fotonların sayısı}}$$

Fluoresansın yaşam süresi:

$$\phi = \frac{k_f}{\sum k}$$

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d} \quad (1)$$

Denklem(1), fluoresans şiddeti etkileyen yapısal ve çevresel etkenlerin kalitatif yorumuna olanak verir. Fluoresans hız sabiti k_f nin büyük olması ve diğer k terimlerinin küçük olmalarının fluoresansı artıracığı açıktır. k_f nin büyüklüğü, öndisosiyasyon hız sabiti k_{pd} , ve disosiyasyon hız sabiti k_d kimyasal yapıya bağlıdır. Diğer sabitler daha çok çevreden, az derecede de yapıdan etkilenirler.

Fluoresansta Geçiş Tipleri

Ultraviyole ışının veya 250 nm den kısa dalga boylarındaki ışının absorpsiyonu fluoresans vermez (veya nadiren verir). Çünkü bu ışının enerjisi uyarılmış halin öndisosiyasyon veya disosiyasyon ile deaktivasyonu için yeteri kadar yüksektir. Örneğin, 250 nm dalga boyundaki ışın 140 kcal/mol kadar enerjiye eşdeğerdir; pek çok moleküldeki bazı bağlar bu büyüklükteki enerjiyle koparılır. Sonuçta, $\sigma^* \rightarrow \sigma$ geçişi ile oluşan fluoresans nadiren gözlenir; bunun yerine, böyle emisyonlar daha az enerjili $\pi^* \rightarrow \pi$ ve $\pi^* \rightarrow n$ işlemleriyle sınırlanır.

Elektronik olarak uyarılmış bir molekül, ışın emisyonu vermeyen bir seri hızlı titreşim relaksasyonları ve iç değişimlerle, "en düşük uyarılmış haline" döner. Bu durumda, gözlenen herhangi bir fluoresans çoğu kez birinci uyarılmış halden temel hale bir geçişten oluşur. Fluoresans bileşiklerin çoğunluğu için sonra, hangisinin daha az enerjili olduğuna bağlı olarak, ya n, π^* veya π, π^* uyarılmış halin deaktivasyonu ile ışın üretilir.

Kuvantum Verimi ve Geçiş Tipi

Fluoresans davranış daha çok, en düşük enerjili uyarılmış halin, π, π^* tipi (n, π^* yerine) olduğu bileşiklerde gerçekleşir, yani, $\pi^* \rightarrow \pi$ geçişlerinde kuvantum verimi daha büyüktür.

π , π^* haliyle ilgili daha büyük kuvantum verimi iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, bir $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin molar absorbtivitesi, $n \rightarrow \pi^*$ işleminin 100-1000 katıdır, ve bu miktar her iki yöndeki geçiş olasılığını belirler; buna göre, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişiyle ilgili zaman süresi daha kısadır (bir n , π^* hali için olan $10^{-5} - 10^{-7}$ s ile kıyaslandığında $10^{-7} - 10^{-9}$ s dir) ve Denklem(1) deki k_f büyük olur.

Başka bir konu da sistem içi geçiş hız sabiti k_i nin π , π^* uyarılmış halinde daha küçük olmasıdır, çünkü tekli-üçüz halleri arasındaki enerji farkı daha büyüktür; yani π , π^* uyarılmış halinin elektron çiftlerini ayırmak için daha fazla enerjiye gereksinim vardır. Bu nedenle de, bu tekli hallerle üçüz titreşim seviyelerinin üst üste düşmesi daha azdır ve sistem içi geçiş olasılığı daha küçük olur.

Özetlenecek olursa fluoresans, n , π^* hallerinden çok, π , π^* hallerinde görülür. Çünkü π , π^* işleminin ortalama yaşam süresi daha kısa (k_f daha büyük) ve fluoresansla rekabet eden diğer deaktivasyon işlemleri daha azdır.


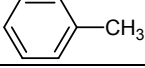
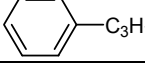
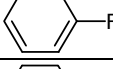
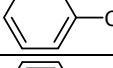
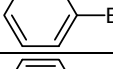
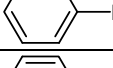
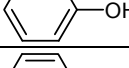
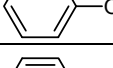
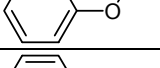
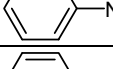
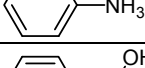
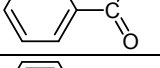
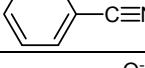
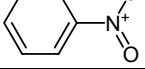
Fluoresans ve Yapı

En şiddetli fluoresans davranışa, düşük-enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş seviyeli fonksiyonel gruplar içeren aromatik bileşiklerde raslanır. Alifatik ve alisiklik karbonil yapılar içeren bileşikler veya çok yüksek konjuge çift bağ yapılar da fluoresans özellik gösterebilirler, fakat bu tip bileşiklerin sayısı aromatik sistemlere göre azdır.

Süstitue olmamış pek çok aromatik hidrokarbonlar da çözültide fluoresans özellik gösterirler, kuvantum verimi halka sayısı ve halkanın durumuna göre artar. Piridin, furan, tiyofen, ve pirrol gibi en basit heterosiklik bileşikler fluoresans davranış göstermezler; diğer taraftan yapışık-halkalı yapılar fluoresanstır. Azot içeren heterosiklik bileşiklerde en düşük-enerjili elektronik geçiş $n \rightarrow \pi^*$ geçiştir, bu ise hızla üçüz hale dönüşerek fluoresansa engel olur. Benzen halkasının heterosiklik bir çekirdeğe yapışması, absorbsiyon pikinin molar absorbtivitesini artırır; uyarılmış halin yaşam süresi kısılır ve fluoresans oluşur. Kinolin, isokinon, indol bu tip bileşiklerdir.

Benzen halkasında süstitüsyon, absorbsiyon maksimumundaki dalga boyunun kaymasına ve ilgili fluoresans piklerinin değişmesine yol açar. Ayrıca, süstitüsyon çoğu kez fluoresans verimini de etkiler (Tablo-1).

**Tablo-1: Benzenin Fluorensansına Sübstitüsyonun Etkisi
(Etanol çözeltisinde)**

Bileşik	Formül	Fluorensansın dalga boyu, nm	Fluorensansın relatif şiddeti
Benzen		270-310	10
Toluen		270-320	17
Propilbenzen		270-320	17
Fluorobenzen		270-320	10
Klorobenzen		275-345	7
Bromobenzen		290-380	5
İyodobenzen		-	0
Fenol		285-365	18
Fenolat iyonu		310-400	10
Anisol		285-345	20
Anilin		310-405	20
Anilinyum iyonu		-	0
Benzoik asit		310-390	3
Benzonitril		280-360	20
Nitrobenzen		-	0

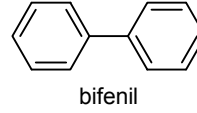
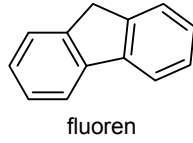
Halojen süstitüsyonunun etkisi oldukça çarpıcıdır; halojenin atom numarası art-tıkça fluoresans azalır, bu durum kısmen ağır atom etkisinden kaynaklanır. Bu durumda sistemler arası geçişle üçüz hale geçiş olasılığı artar. İyodobenzen ve nitro türevlerinde ön disosiyasyonun önemli bir rol oynadığı kabul edilir; bu bileşik-lerdeki bağlar, iç değişmeden sonra uyarma enerjisinin absorblanmasıyla kopar.

Bir aromatik halkaya bir karboksilik asit veya karbonil grubunun süstitüsyonu fluoresansı engeller. Bu bileşiklerde, n, π^* sisteminin enerjisi π, π^* sistemindekin-den daha azdır; daha önce de değinildiği gibi, birinci tip sistemin fluoresans verimi oldukça düşüktür.

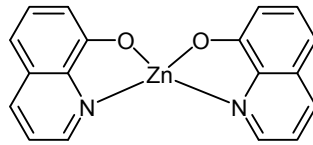
Yapısal Sertliğin Etkisi

Sert yapılı moleküllerdeki fluoresansın daha fazla olduğu deneylerle saptanmıştır. Örneğin, fluoren ve bifenilin kuvantum verimleri, benzer ölçme koşullarında sıra-sıyla, 1.0 ve 0.2 dolayındadır.

Fluoren metilen grubu köprüsü nedeniyle daha sert bir yapıdadır, bu nedenle de fluoresans özelliği bifenilden daha fazladır. Benzer pek çok örnek gösterilebilir. Ayrıca, fluoresans boyalar katı bir yüzey (sertliği artırıcı etki) üzerinde absorblandığında emisyon artar.



Bazı organik şelat maddeleri bir metal iyonuyla kompleks oluşturduğunda, fluoresans özellik artar, bu durum da molekül sertliğinin artmasının bir sonucudur. Örneğin, 8-hidroksikinolinin fluoresans şiddeti, bunun çinko kompleksininkinden çok daha azdır.



Bir molekülün sertliğini kaybetmesi iç değişme hızını (Denklem-1 deki k_{ic}) artırarak ışımaz deaktivasyon olasılığını yükseltir. Sert olmayan bir molekülün bir parçası

diğer parçalara göre düşük-frekans titreşimi yapabilir; bu tür hareketler enerji kaybına neden olabilir.

Sıcaklık ve Çözücünün (Solventin) Etkileri

Pek çok molekülde sıcaklığın artmasıyla fluoresansın kuvantum verimi azalır, çünkü yüksek sıcaklıklarda çarpışma frekansı artar ve böylece dış dönüşüm ile deaktivasyon olasılığı yükselir. Solvent viskozitesinin azalması da dış değişme olasılığını artırarak aynı etkiyi yapar.

Solventin polaritesinin etkisi de önemli olabilir. Bölüm(4)'de, $n \rightarrow \pi^*$ geçiş enerjilerinin polar solventlerde artırıldığı, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin ise azaltıldığı belirtilmiştir. Bu kaymalar bazan, $\pi \rightarrow \pi^*$ işleminin enerjisini $n \rightarrow \pi^{**}$ geçişinin altına düşürecek kadar büyük olur; sonuçta fluoresans artırılır.

Bir molekülün fluoresansını, ağır atomlar içeren solventer veya yapısında ağır atomlar bulunan bileşikler azaltır; karbon tetrabromür ve etil iyodür bu tip maddelerdir. Buradaki etki, fluoresans maddelere ağır atomların süstitüsyonunda görülen etki ile aynıdır; orbital spin etkileşimi üçlü oluşum hızını artırır ve buna uygun olarak ta fluoresans azalır. Ağır atomlar içeren bileşiklerde yüksek fluoresans istendiğinde, madde uygun bir solventle birleştirilir.

Fluoresansa pH ın Etkisi

Asidik veya bazik halka süstitüenti bulunan bir aromatik bileşiğin fluoresansı, çoğunlukla, pH a bağımlıdır. Bileşiğin iyonize ve iyonize olmamış hallerinin dalga boyu ve emisyon şiddetleri farklıdır. Tablo-1'de fenol ve aniline ait veriler bu etkiyi göstermektedir. Bu bileşiklerin emisyon değerlerindeki değişiklikler, asit-baz indikatörlerinde gözlenen farklılığa benzer; gerçekte, çok renkli çözeltilerde asit-baz titrasyonları fluoresans indikatörlerle yapılır. Örneğin, 1-naftol-4-sülfonik asitin fluoresansı, ultraviole bölgede olduğundan, gözle izlenemez. Baz ilavesiyle madde fenolat şekline dönüştürülürse, emisyon piki görünür dalga boylarına kayar ve gözle izlenebilir hale gelir. Bu değişiklik, fenolün asit disosiyasyon sabitinden çıkarılan pH dan farklı bir pH'da oluşur; nedeni "uyarılmış" molekülün asit disosiyasyon sabitinin aynı molekülün temel haddeki değerinden farklı olmasıdır. Uyarılma ile asit veya baz disosiyasyon sabitlerinin değişmesi olağandır; büyüklüğü 4. veya 5. derecedendir.

Bu incelemelere göre, fluorensansa dayanan analitik işlemlerde pH in çok iyi kontrol edilmesi gereği açıkça görülmektedir.

Çözünmüş Oksijenin Etkisi

Fluoresans bir çözeltinin şiddeti, ortamda çözünmüş oksijen bulunması durumunda azalır. Bu etki, fluoresans taneciklerin fotokimyasal tesirle oksitlenmelerinden kaynaklanabilir. Ayrıca, moleküler oksijenin paramagnetik özelliği nedeniyle, sistemler arası geçişin hızlanması ve uyarılmış moleküllerin üçüz hale dönüştürülmesi de fluoresansı azaltır; bu etki daha fazladır. Diğer paramagnetik maddeler de fluoresansı zayıflatırlar.

Fluoresans Şiddetine Konsantrasyonun Etkisi

Fluoresans ışının gücü F, sistem tarafından absorblanan uyarıcı demetin ışın gücü ile orantılıdır. Yani,

$$F = K' (P_0 - P) \quad (2)$$

P_0 çözeltiye gelen demetin gücü, P demetin b uzunluğundaki ortamı geçtikten sonraki gücüdür. K' sabiti, fluoresans işleminin kuvantum verimine bağlıdır. F nin fluoresans madde konsantrasyonu (c) ilişkisi Beer kanunundan çıkarılır. Kanun aşağıdaki şekilde yazılabilir,

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (3)$$

burada ε fluoresans moleküllerin molar absorbtivitesi, $\varepsilon b c$ de absorbans, A, dır. Denklem(3) denklem(2)'de yerine konularak aşağıdaki eşitlik çıkarılır.

$$F = K' P_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc}) \quad (4)$$

buradaki üstel terim açılabilir:

$$F = K' P_0 \left[2.3 \varepsilon b c - \frac{(-2.3 \varepsilon b c)^2}{2!} - \frac{(-2.3 \varepsilon b c)^3}{3!} - \dots \right] \quad (5)$$

$\varepsilon b c = A < 0.05$ olduğunda, parantez içindeki tüm terimler birinci terime göre çok küçük olur; bu durumda,

$$F = 2.3 K' \varepsilon b c P_0 \quad (6)$$

yazılabilir, veya sabit P_0 da eşitlik aşağıdaki basit şekli alır.

$$F = K c \quad (7)$$

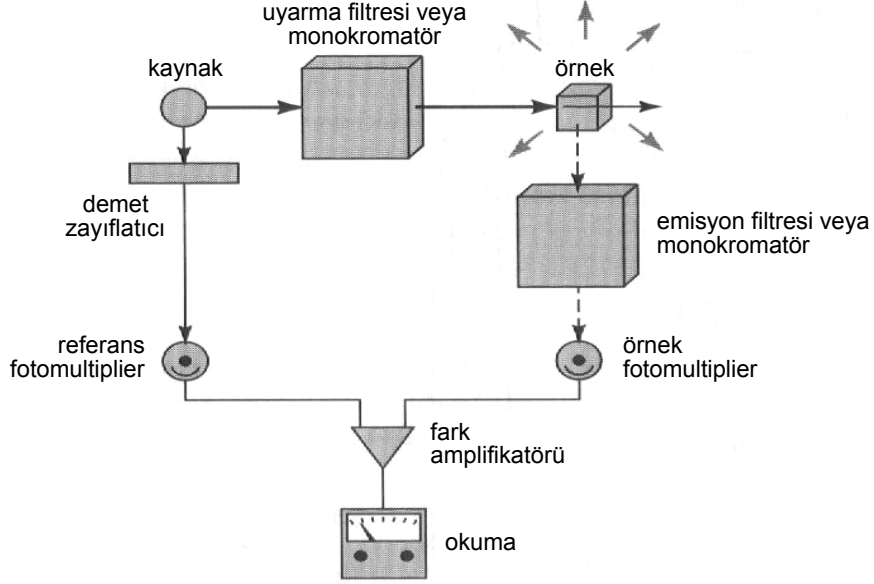
Buna göre bu çözeltinin floresans gücünün emisyonu yapan taneciklerin konsantrasyonuna göre çizilen eğrisi, düşük konsantrasyonlarda, bir doğru şeklindedir. Konsantrasyonun, 0.05'ten büyük absorbandsa kadar artırılmasından sonra doğrusallık kaybolur ve F, doğru-hattın ekstrapolasyonunun altında bir yerde bulunur.

Yüksek konsantrasyonda doğrusallıktan negatif sapmanın iki nedeni vardır, bunlar "kendini-zayıflatma" ve "kendini-absorblama" dır. Birincisi, uyarılmış moleküller arasındaki çarpışmanın sonucudur. Bu durumda ışımsız enerji transferi olur; bu olay bir dış dönüşümdeki solvent moleküllerine enerji transferine benzer. Kendini zayıflatma konsantrasyonla artar. Öz soğurma (kendini absorblama) olayı, emisyon dalga boyunun bir absorbsiyon dalga piki ile çakışması durumunda ortaya çıkar; emitlenen demet çözeltiye geçerken floresans zayıflar. Bu olayların etkileri nedeniyle, floresans güç-konsantrasyon eğrisi, çoğu zaman, bir maksimum gösterir.

FLUORESANS ANALİZ CİHAZLARI

Floresans cihazlarının kısımları ultraviyole-görünür fotometreler veya spektrofotometrelerdekine benzer. Şekil-2'de bu kısımların bir "fluorometre" veya "spektrofluorometre" deki dizilişleri gösterilmiştir. Hemen hemen tüm floresans cihazlarda, kaynak gücündeki dalgalanmaları gidermek için, çift demetli optikler kullanılır. Önce örnek demeti bir uyarıcı filtre veya monokromatörden geçerek örnekten çıkan floresans dalga boylarını uyarır, fakat diğer dalga boylarını etkilemez. Örnekten her yönde floresans ışın emitlenir, bunlar en iyi, uyarılan demete göre doğru açı altında gözlenebilir; çözeltiden ve hücre duvarlarından saçılan diğer ışınlar floresans şiddetin ölçülmesinde hatalara neden olabilirler. Emitlenen ışın, ölçülecek floresans piki ayıran ikinci bir filtre veya monokromatörden geçtikten sonra bir fotoelektrik dedektöre ulaşır.

Referans demet, gücünü floresans ışına göre 100 kat veya dahafazla azaltan bir atenuatörden geçer; referans ve örnek fototüplerinin çıkışı sonra bir işlem amplifikatörüne, bunun çıkışı da bir metre veya kaydediciye beslenir. Floresans cihazların çoğu null tiptir, bu durum optik veya elektrik amplifikatörlerle sağlanır.



Şekil-2: Bir fluorometre veya spektrofluorometrenin kısımları

Fluorometre ve spektrofluorometrelerin karmaşıklığı ve performans özellikleri absorpsiyon cihazlarından oldukça değişiktir. Fluorometrelerdeki uyarılan ve emitlenen dalga boylarını sınırlayan filtreler absorpsiyon fotometrelerdekine benzer. Spektrofluorometreler iki tiptir. Birincisinde, uygun bir filtre ile uyarılan ışın sınırlandırılır ve bir grating veya prizmalı monokromatörle bir fluoresans emisyon spektrumu piki ayrılır. Bazı ticari spektrofotometrelerde bunların spektrofluorometre olarak kullanılmasına olanak veren adaptörler bulunur.

Spektrofluorometrelerde iki monokromatör vardır. Bunlardan biri uyarılmış ışının dar bir band olmasını sağlar, diğeri özel bir fluoresans dalga boyunu diğerlerinden ayırır. Bu tip cihazlarla "fluoresans", "uyarma", ve "absorpsiyon" spektrumları ölçülebilir. Bir uyarma spektrumu, emisyon monokromatörünün en yüksek fluoresans dalga boyuna ayarlanmasıyla elde edilir; fluoresans çıkışı uyarma dalga boyuna karşı grafiğe alınır. Bir fluoresans spektrumunda ise, uyarma dalga boyu sabit, fluoresans dalga boyları değişkendir. Kaynak çıkışında dalga boyuna göre uygun düzeltmeler yapılarak bir maddenin mutlak uyarılma spektrumu elde edilir.

Spektrofluometrelerin seçiciliği, moleküllerin elektronik ve yapısal özelliklerinin kalitatif ve kantitatif incelenmesine olanak verir. Kantitatif çalışmalarda basit cihazlar yeterlidir. Gerçekte, fazla pahalı olmayan fluorometreler, geliştirilmiş spektrofotometreler kadar seçici ve uygun cihazlardır.

Cihazların Kısımları

Fluorometreler ve spektrofluorometreler sadece detaylarda farklıdır; burada bu farklılıklar belirtilecektir.

Kaynaklar

Uygulamaların çoğunda, absorpsiyon ölçmelerinde kullanılan tungsten veya hidrojen lambasından daha şiddetli bir kaynağa gereksinim vardır. Bu bir civa veya ksenon ark lambası olabilir.

Ksenon ark lambası, akımın bir ksenon atmosferinden geçirilmesiyle yüksek şiddette ışın üretir. Spektrum 250-600 nm dolayında bir pik verir. Bazı cihazlarda, lambada bir kapasitörün deşarjı ile düzgün pırıltılar elde edilir; böylece yüksek şiddetler alınır. Ayrıca, fototüplerin çıkışı ac olduğundan tümüyle kuvvetlendirilerek iletilebilir.

Civa ark lambaları şiddetli hat spektrumu verirler. Yüksek-basınç lambaları (~ 8 atm.) 366, 405, 436, 546, 577, 691 ve 773 nm'de hatlar verir. Düşük basınç lambalarında silika pencereler bulunur, bunlar ayrıca 254 nm'de'de şiddetli bir hat verirler. Floresans bileşiklerin çoğundaki floresans davranış dalga boylarındaki bir değişiklikten etkilendiğinden, civa hatlarından en az bir tanesinin bulunması yeterlidir.

Son gelişmelerde fluorometrede çeşitli lazer kaynakları kullanılmaya başlanmıştır. Pulsu bir azot lazerinin bulunduğu ayarlanabilir boya lazeri bunlardan biridir. Bu kaynakla 360-650 nm arasında ışın üretilir. Böyle bir sistemle çalışıldığında bir uyarma monokromatörüne gereksinim olmaz.

Filtreler ve Monokromatörler

Fluorometrelerde girişim ve absorpsiyon filtreleri kullanılır. Spektrofluorometrelerin çoğunda ise gratingli monokromatörler bulunur.

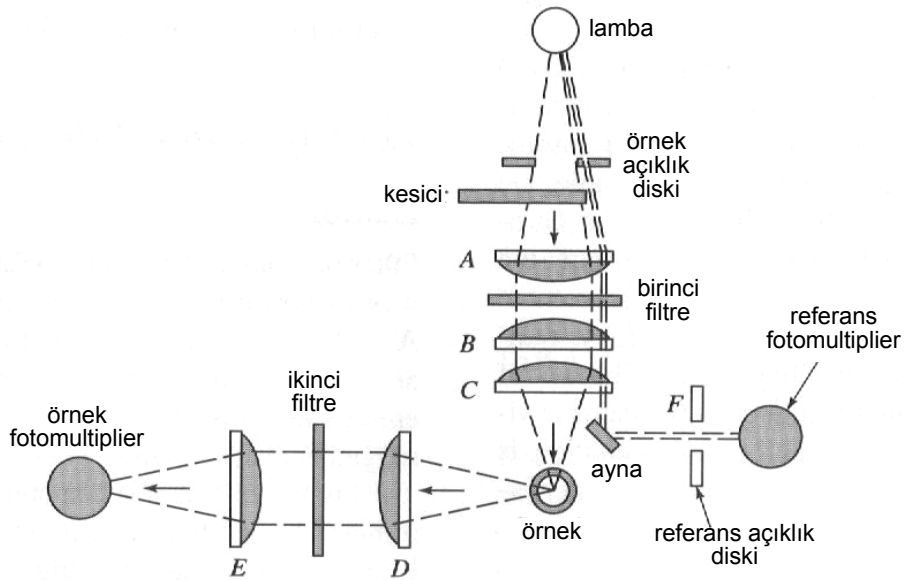
Dedektörler

Tipik floresans sinyalin şiddeti düşüktür ve ölçülmesi için büyük derecelerde kuvvetlendirmeye gereksinim vardır. Hassas floresans cihazlarda dedektör olarak en çok fotomultiplier tüpler kullanılır.

Hücreler ve Hücre Bölmeleri

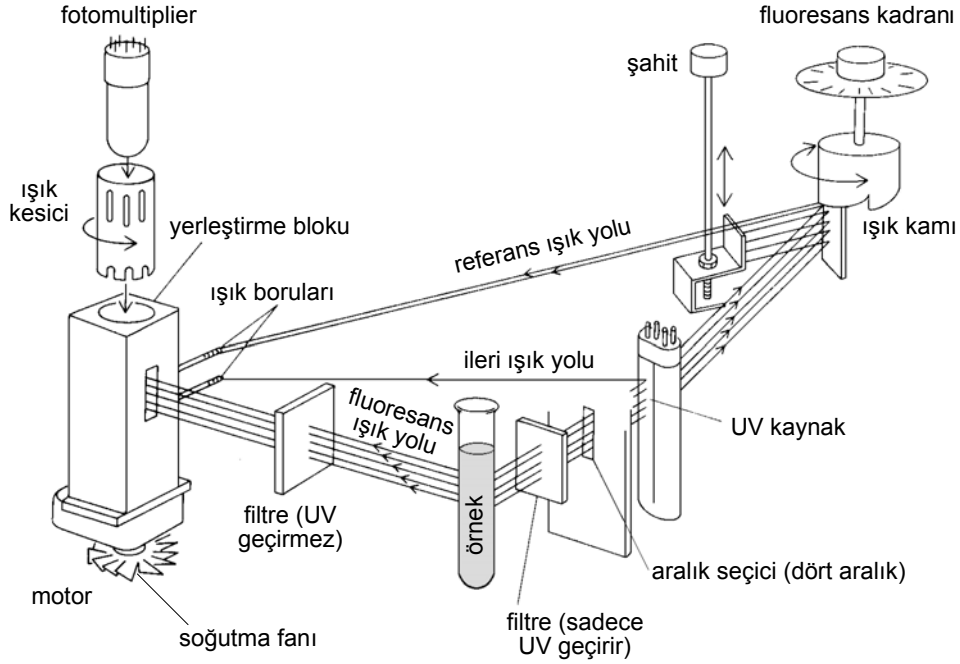
Silindirik ve dikdörtgen hücreler cam veya silikodan yapılır. Hücrenin bulunduğu bölme dedektöre ulaşan saçılan ışını en aza indirecek şekilde dizayn edilmelidir. Bu amaçla bölme bafflelar yerleştirilir.

Fluorometreler



http://analytic2010.weebly.com/uploads/5/7/4/8/5748856/spectrofluometry__chapter_3_b.ppt

Tipik bir fluorometre (Courtesy of Farrand Optical Co., Inc.)



Şekil-3: Turner model 110 fluorometrenin optik dizaynı

Şekil-3'de, bir civa lambası ve tek bir fotomultiplier tüp (dedektör olarak) bulunan çift-demetli bir fluorometrenin şematik diyagramı verilmiştir. Lambadan gelen ışığın bir kısmı bir filtreden geçerek örneğe gelir. Fluoresans ışın sonra ikinci bir filtreden dedektöre geçer bir referans demet ışık kamının aynalanmış yüzeyinden, fotomultiplier tüpü yönlendiren bir parlak ışık borusuna yansıtılır. Dönen ışık kesici bu referans demetin ve fluoresans demetin, sıra ile, dedektör yüzeyine çarpmasını sağlar, böylece güçleri farklı olan demetler bir ac sinyali üretirler; ac sinyalinin fazını kuvvetli olan demet belirler. Bu fark ve işareti, bir faz-hassas aletle bir metre ibresini hareket ettirecek şekle dönüştürülür (Şekil-3'de gösterilmemiştir). Referans demetin gücü sonra ışık kamının dönmesiyle değişir, kam dedektöre ulaşan referans demetin miktarını mekanik olarak artırır veya azaltır. Kamda, herbir bölümü eşit miktarda ışığı belirten doğrusal bir kadran bulunur.

Bir null aleti her iki yönden de sıfırlanabilecek şekilde ayarlanmalıdır. Tüm fluoresans olmayan bir örnek için dedektöre fazlardan birinden ışık gelmeyeceğinden null noktasına sadece bir yönden ulaşılır. Sonucun hatalı olmaması için,

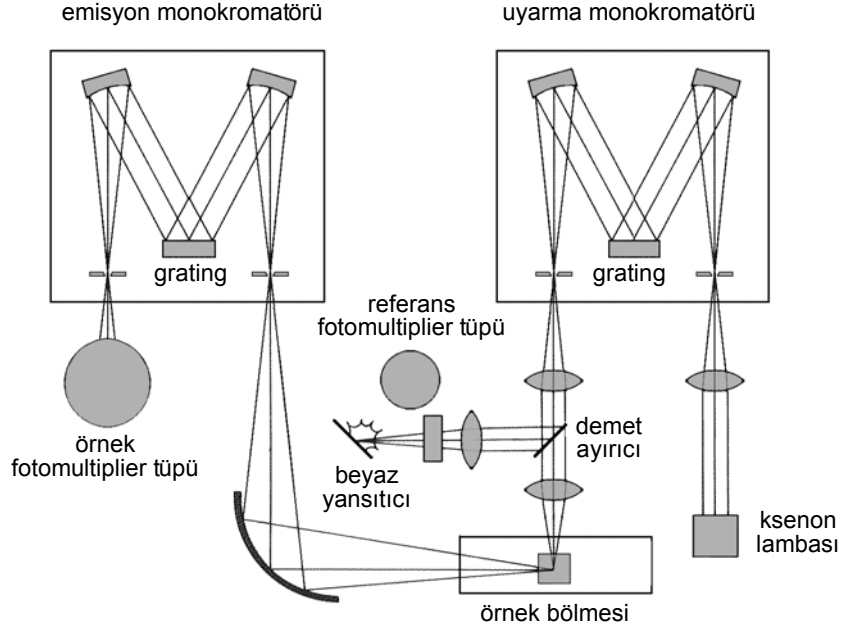
dedektöre fluoresans demetle "faz içinde" olan sabit şiddetli üçüncü bir demet (ışık yolu yönünde) gönderilir, böylece fotomultipliere bir miktar ışın çarpar. Ölçülen fluoresansa üçüncü demetin etkisi, hücre bölmesine bir şahit konulup fluoresans kadranı sıfıra ayarlanarak giderilir; referans demetin şiddeti, optik bir null noktasına ulaşıncaya kadar şahit tarafından azaltılır. Bu işlem bir seri analiz sırasında sık sık yapılmalıdır.

Bu tip çift-demetli cihazda tek-dedektörle, kararlı dedektör hassasiyeti ve kaynak çıkışı için uzun-zaman gerektiği halde, tekrarlanabilirlik çok iyidir. Bu nedenle kalibrasyon eğrilerinin, sadece arada sırada, bir standartla kontrolü yeterli olur. Bazı cihazlar tek-ışın yollu olarak dizayn edilmişlerdir.

Spektrofluorometreler

Spektrofluorometre yapan birkaç firma bulunur. Basit ve tipik bir cihaz Şekil-4'de gösterilmiştir. Bunda iki tane gratingli monokromatör vardır. Ksenon lambasından gelen ışın birinci monokromatörde dağıtılır ve örneği uyarır. Oluşan fluoresans ışın, ikinci monokromatörden dağıtıldıktan sonra, bir fotoselde algılanır. Okuma bir metre veya kaydedici ile yapılır. Cihaz, sadece birinci monokromatör ile, absorbans ölçmelerinde kullanılabilir.

Şekil-4'deki gibi bir cihaz ile kantitatif analizlerde fevkalade spektrumlar alınır. Spektranın mükemmelliği çıkışın sadece fluoresansa değil, aynı zamanda lambanın özelliğine, dedektöre ve monokromatörlere de bağlı olmasından kaynaklanır. Bütün bu cihaz özellikleri dalga boyu ile değişir ve cihazdan cihaza farklı bir durum gösterir. "Düzeltilmiş" (cihazın etkilerinden kurtarılmış) bir spektrum elde edebilmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir; yeni ve geliştirilmiş cihazlar doğrudan doğruya düzeltilmiş spektrayı çizerler.



Şekil-4: Bir spektrofotometre; cihaz absorpsiyon ölçmelerinde de kullanılabilir
(Courtesy of SLM Instruments, Inc., Urbana, IL.)

FLUOROMETRENİN UYGULAMA ALANLARI

Fluorometrik yöntemler, spektrofotometrik tayinlerdekinden daha düşük konsantrasyonlara uygulanabilir. İki yöntem arasındaki temel farklılık, fluorometrede konsantrasyon-ilişki parametresinin (F) kaynağın gücünden (P_0) bağımsız olarak ölçülebilmesidir. Tersine, spektrofotometrik ölçmelerde P_0 ve P etkindir, çünkü konsantrasyona-bağımlı A parametresi bu iki miktarın oranına bağlıdır. Bir fluorometrik yöntemin hassasiyeti P_0 in artırılması veya fluoresans sinyalin daha fazla kuvvetlendirilmesiyle artırılabilir. Spektrofotometrede ise P_0 'ın artırılması P 'nin'de orantılı olarak artmasına neden olacağından A 'yı etkilemez; böylece, hassasiyette bir yükselme elde edilemez. Benzer şekilde, dedektör sinyalinin kuvvetlendirilmesi de P ve P_0 üzerinde aynı derecede etki yapacağından A 'da herhangi bir iyileşme sağlanamaz. Bu nedenlerle, fluorometrik yöntemler, aynı amaç-

larla kullanılan spektrofotometrik işlemlerden 1-4 derece kadar daha hassas sonuçlar verir.

İnorganik Analizler

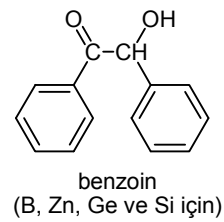
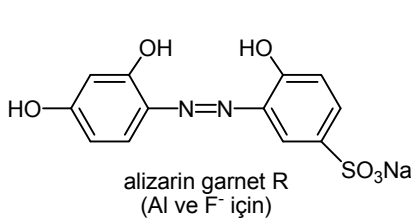
İnorganik fluorometrik yöntemler iki tiptir. Birincisi doğrudan analiz yöntemidir; bunda, bir floresans şelat oluşturularak bunun emisyonu ölçülür. İkinci yöntemde, analizi yapılan maddenin söndürülme (guenching) özelliğinden yararlanır; yöntem floresanstaki azalmanın ölçülmesine dayanır (anyon analizlerinde çok kullanılır).

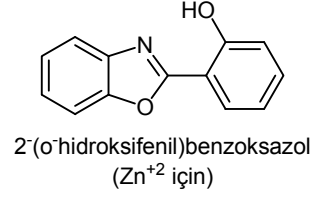
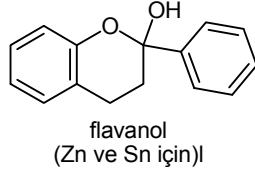
Fluoresans Şelat Oluşturan Katyonlar

Fluoresans şelat oluşturan geçiş-metallerinin sayısı iki nedenle sınırlanır. Birincisi bu iyonların çoğunun paramagnetik olmasıdır; bu özellik sistem içi geçiş hızını artırarak üçüz hale geçişi kolaylaştırır. Bu durumda fosforesans davranış gözlemlendiği halde, floresansla deaktivasyon oluşmaz. İkinci neden, geçiş-metalleri komplekslerinde çok yakın ve çok sayıda enerji seviyelerinin bulunmasıdır; bu durum deaktivasyonun iç geçişle gerçekleşme olasılığını yükseltir. Geçişsiz-metal iyonlarında üçüz halden veya iç geçiş sonucu deaktivasyon işlemlerine çok nadiren raslanır; bu tip iyonlarda fluorometre uygulanabilir. Geçişsiz-metal katyonların çoğunlukla renksiz olduklarını ve renksiz şelatlar yapma eğilimlerini de belirtmek gerekir; bu nedenle, çoğu zaman, spektrofotometriyi tamamlayıcı bir yöntemdir.

Fluorometrik Reaktifler (Maddeler)

Katyon analizlerinde kullanılan en başarılı fluorometrik reaktifler, metal iyonu ile şelat yapmayı sağlayacak iki veya daha fazla fonksiyonel grubu bulunan aromatik yapılardır. Bu tip dört maddenin yapıları aşağıda verilmiştir:





Seçilmiş bazı fluorometrik reagentlar ve uygulamaları ise Tablo-2'de verilmiştir. Daha fazla bilgi için çeşitli literatürlerden yararlanılabilir.

Tablo-2: İnorganik Maddeler İçin Seçilmiş Fluorometrik Yöntemler

İyon	Reagent	Dalga Boyu, nm		Hassasiyet, µg/ml	Engelleyici (girişim)
		Absorbsiyon	Fluoresans		
Al ⁺³	Alizarin garnet R	470	500	0.007	Be, Co, Cr, Cu, F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ni, PO ₄ ⁻³ , Th, Zr
F ⁻	Alizarin garnet R-Al kompleksi	470	500	0.001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO ₄ ⁻³ , Th, Zr
B ₄ O ₇ ⁻²	Benzoin	370	450	0.04	Be, Sb
Cd ⁺²	2-(o-hidroksifenil) benzoksazol	365	Mavi	2	NH ₃
Li ⁺	8-hidroksi-kinolin	370	580	0.2	Mg
Sn ⁺⁴	Flavanol	400	470	0.1	F ⁻ , PO ₄ ⁻³ , Zr
Zn ⁺²	Benzoin	-	yeşil	10	B, Be, Sn, renkli iyonlar

Organik Maddeler

Organik sorunlara uygulanan fluorometrik analizlerin sayısı şaşırtıcıdır. Weissler ve White bunlardan çok önemlilerini çeşitli tablolarda toplamışlardır. "Organik ve Genel Biyokimyasal Maddeler" başlığı altında 100'den fazla madde için bilgi bulunabilir; Adenin, antranilik asit, aromatik polisiklik hidrokarbonlar, sistein, guanidin, indol naftoller, bazı sinir gazları, proteinler, salisilik asit, skatol, triptofan, ürik asit, ve varfarin bu tablolardaki bazı maddelerdir. Fluorometrik olarak analiz edilebilen 50 kadar tıbbi madde sayılabilir. Bunlardan bazıları adrenalin, alkilmorfin, kloroquin, digitalis prensipıls, liserjik asit dietilamin (LSD), penisilin, fenobarbütal,

prokain, ve reserpindir. Bu tablolarda on kadar steroid ve bir o kadar da enzim ve koenzim için de analiz yöntemleri bulunur. Bazı sanayi ürünlerinin analiz yöntemleri de verilmiştir; klorofil, ergot alkaloidler, rauwolfia alkaloidleri, lavanoidler, ve reten analizleri gibi. Vitaminler ve vitamin ürünlerini içeren 18 kadar tablo bulunur; askorbik asit, folik asit, nikotinamid, pridoksal, ribovlavin, tiamin, vitamin A, ve Vitamin B12 bu tablolarda bulunan maddelerden bazılarıdır.

Fluorometrenin yiyeceklerde, farmasetiklerde, klinik örneklerde, ve doğal ürünlerde çok geniş bir uygulama alanı bulunur. Yöntemin bu alanda başarıyla uygulanabilmesinin en önemli nedeni hassasiyeti ve seçiciliğidir.

NEFELOMETRE VE TÜRBİDİMETRE

Nefelometre ve türbidimetre, ışının tanecik yapılı maddeler tarafından saçılmasına dayanan analitik yöntemlerdir. Nefelometre cihazı fluorometrelere benzer, farkı bulanıklık ölçümünde kullanılan bir filtre fotometresinin bulunmasıdır. Bu iki yöntemi bu farklılık yönünden kısaca inceleyelim.

Katı taneciklerin dağıtıldığı berrak bir ortamdan geçen ışığın bir kısmı her yönde saçılarak karışıma bulanık bir görünüm verir. "Türbidimetrik" yöntemler taneciklerin neden olduğu saçılmayla paralel demetin gücündeki azalmaya dayanır. "Nefelometrik yöntemler" de ise, saçılan ışın gelen demetle doğru bir açı altında ölçülür. Nefelometre türbidimetreden daha hassas bir yöntemdir; nedeni fluorometrenin fotometreden daha hassas olmasını sağlayan nedenlerle aynıdır.

Bir nefelometrik ve bir türbidimetrik yöntem arasındaki seçim saçılan ışık miktarına göre yapılır. Saçılan ışık yaygın ise (çok tanecik bulunması), türbidimetrik bir yöntem tercih edilir. Saçılma az ve gelen demetin gücündeki azalma küçükse, nefelometrik ölçmeler daha başarılıdır.

Nefelometre ve Türbidimetrenin Teorisi

Nefelometre ve türbidimetredeki saçılmada (Raman spektroskopisindekinin tersine) ışın gücünde net bir kayıp yoktur; sadece ilerleme yönü değişir. Herhangi bir açı altındaki ışının şiddeti taneciklerin sayısına, büyüklük ve şekillerine, taneciklerin ve ortamın relatif refraktif indekslerine, ve ışının dalga boyuna bağlıdır. Bu

değişkenlerin birbiriyle ilişkileri oldukça karmaşıktır. Özel analitik sorunlara teorik yorumlar getirilebilirse de olayın karmaşıklığı böyle bir uygulamaya nadiren olanak verir.

Saçılmaya Konsantrasyonun Etkisi

Seyreltik bir süspansiyondaki saçılma ile paralel bir ışın demetinin zayıflaması aşağıdaki bağıntı ile verilir.

$$P = P_0 e^{-\tau b} \quad (8)$$

P_0 ve P , demetin b uzunluğundaki bulanık ortamdan geçmeden önce ve geçtikten sonraki güçleridir. τ ya "bulanıklık katsayısı" veya bulanık denir; değeri, ışığı saçan taneciklerin c konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu durumda Beer kanununa uygun bir eşitlik yazılabilir.

$$\text{Log}_{10} \frac{P_0}{P} = k b c \quad (9)$$

Burada $k = 2.3 \tau / c$ ye eşittir.

Denklem(9)'un türbidimetrik analizlerde kullanılışı, aynen fotometrik analizlerde Beer kanununun kullanılışı gibidir. $\text{Log}_{10} P_0/P$ ve c arasındaki ilişkiyi bulmak için standart örneklerle (P_0 in tayininde kullanılan aynı solventlerle) kalibrasyon eğrisi çizilir. Daha sonra örneğin konsantrasyonu bu eğriden yararlanılarak bulunur.

Nefelometrik ölçmelerde, gelen demetle doğru açı altında bulunan saçılmış demetin gücü, konsantrasyona karşı grafiğe alınır; grafik çoğunlukla bir doğru şeklindedir. Buradaki işlem bir fluorometrik yöntemle tamamiyle aynıdır.

Saçılmaya Tanecik Büyüklüğünün Etkisi

Herhangi bir açı altında saçılan ışının miktarı, saçılmaya neden olan taneciklerin büyüklük ve şekline bağlıdır; etki çok büyüktür. Analitik uygulamaların pek çoğunda, çözeltilerde koloidal olarak dağılmış bir faz yaratıldığından, çökeltme sırasında tanecik büyüklüğünü değiştiren faktörler de türbidimetrik ölçmeleri etkiler. Bu faktörler reaktiflerin konsantrasyonu, karıştırma hızı ve derecesi, bekletme süresi, sıcaklık, pH, ve iyonik kuvvettir. Kalibrasyon ve analiz sırasında tanecik büyüklüğünü etkileyen tüm koşulların aynı olmasına özen gösterilmelidir.

Saçılmaya Dalga Boyunun Etkisi

Bulanıklık katsayısının,

$$\tau = s \lambda^{-1}$$

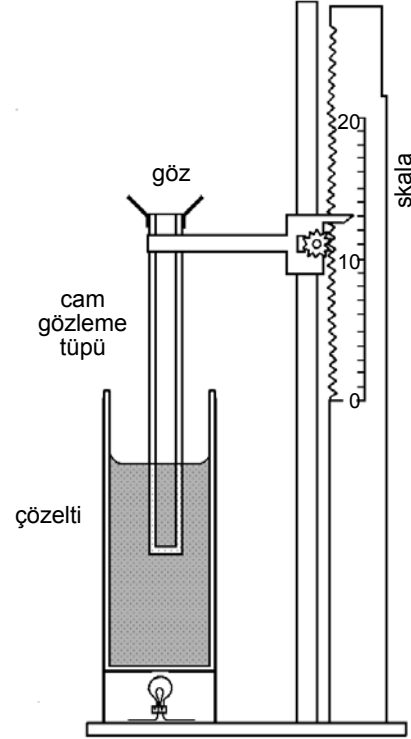
denklemine göre, dalga boyu ile değiştiği deneysel olarak görülebilir. s , verilen bir sistem için sabittir. τ nin değeri tanecik büyüklüğüne bağlıdır ve saçılmayı yapan tanecikler ışının dalga boyundan küçük olduğunda 4'dür (Rayleigh saçılması); dalga boyu ile benzer büyüklükteki tanecikler için t 'nin değeri 2 dolayında olur (bu durum türbidimetrik bir analizde görülür).

Analizlerde sıradan beyaz ışık kullanılır. Çözelti renkli ise, spektrumun ortam tarafından en az absorblanan kısmı seçilir.

Cihaz

Nefelometrik ve türbidimetrik ölçmeler daha önce görülen çeşitli fluorometreler ve fotometrelerle yapılabilir. En çok kullanılan hücreler dikdörtgen hücrelerdir. Işın geçen yüzeyler dışındaki hücre duvarları, istenmeyen yansıma ışınlarının dedektöre gitmesine engel olmak için, siyah bir madde ile kaplanmıştır.

Şekil-5'de basit bir gözlem türbidimetresi verilmiştir. S şeklindeki lamba filamenti kayboluncaya kadar, gözlem tüpünün süspansiyon içindeki konumu ayarlanır. Sonra kalibrasyonla çözeltinin uzunluğu ve konsantrasyon arasındaki ilişki tayin edilir. Böyle bir sistemle düşük konsantrasyondaki sülfat analizlerinde oldukça doğru sonuçlar alınır. Burada, $BaCl_2$ ilavesiyle bir $BaSO_4$ süspansiyonu oluşturulur.



Şekil-5: Basit bir türbidimetri

Saçılma Yöntemlerinin Uygulama Alanları

Türbidimetrik veya nefelometrik yöntemler en çok, suyun berraklığının tayininde ve çeşitli su arıtma işlemlerinin kontrolünde kullanılır. Ayrıca, uygun çöktürme reaktifleri ile çeşitli iyonların konsantrasyon tayinleri de yapılabilir. Analizde dikkat edilecek önemli bir nokta oluşan katı fazın kararlı bir süspansiyonda bulunmasıdır; buna uygun koşullar seçilmesi gerekir. Daha önce değinildiği gibi, sadece tanecik büyüklüğünü etkileyen faktörlerin çok iyi kontrol edilmesi durumunda güvenilir veriler alınır.

Tablo-3'de türbidimetrik veya nefelometrik yöntemle tayin edilebilen bazı maddeler verilmiştir. En çok uygulama sülfat iyonlarında görülür. Nefelometrik yöntemle birkaç ppm kadar düşük konsantrasyonlar %1-5 hassasiyetle tayin edilebilir. Aynı tekrarlanabilirlik derecesine türbidimetrik yöntemlerde daha konsantrasyonlarda erişilebilir.

Tablo-3: Bazı Türbidimetrik (T) ve Nefelometrik (N) Yöntemler

Element	Yöntem	Süspansiyon	Reagent	Engelleyiciler
Ag	T, N	AgCl	NaCl	-
As	T	As	KH ₂ PO ₂	Se, Te
Au	T	Au	SnCl ₂	Ag, Hg, Pd, Pt, Ru, Se, Te
Ca	T	CaC ₂ O ₄	H ₂ C ₂ O ₄	Mg, Na, SO ₄ ⁻² (yüksek kons.)
Cl ⁻	T, N	AgCl	AgNO ₃	Br ⁻ , I ⁻
K	T	K ₂ NaCo(NO ₂) ₆	Na ₃ Co(NO ₂) ₆	SO ₄ ⁻²
Na	T, N	NaZn(UO ₂) ₃ (OAc) ₉	Zn(OAc) ₂ ve UO ₂ (OAc) ₂	Li
SO ₄ ⁻²	T, N	BaSO ₄	BaCl ₂	Pb
Se	T	Se	SnCl ₂	Te
Te	T	Te	NaH ₂ PO ₄	Se, As

Türbidimetrik ölçmeler çökeltme titrasyonlarında eşdeğerlik noktası tayinlerinde de kullanılır. Cihaz çok basittir, titrasyon kabının zıt yönünde yerleştirilmiş bir ışık kaynağı ve bir fotosel bulunur. Fotoakımın, reagent hacmine karşı grafiği çizilir. İdeal hal, bulanıklığın son noktaya ulaşıncaya kadar doğrusal olarak artması ve eşdeğerlik noktasından sonra sabit kalmasıdır.

Yararlanılan Kaynaklar

Principles of Instrumental Analysis, D.A.Skoog, D.M. West, II. Ed. 1981