

NTGT169 ENSTRUMENTAL ANALİZ

DERS 4 (SPEKTROFOTOMETRE)

Dr. Öğr. Üyesi Hicran UZUN KARKA

SPEKTROFOTOMETRE

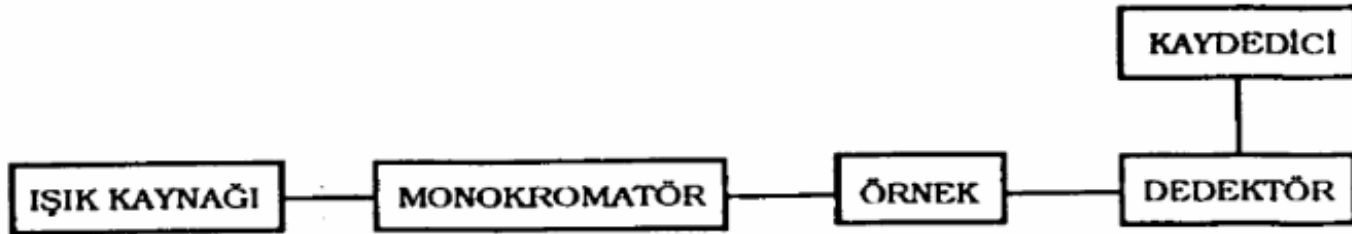
Spektrofotometre

Günümüzde 200-2500 nm dalga boyları arasında ölçüm yapabilen spektrofotometreler geliştirilmiştir. Yani bu cihazlar hem ultraviyole (UV) hem görünür bölge (GB) hem de infrared (IR) bölgelerinde ölçüm yapabilmektedir. UV spektrofotometreleri yapılarına göre Tek ışın demetli ve çift ışın demetli spektrofotometreler olmak üzere ikiye ayrılır.

➤ Tek Işın Yollu Spektrofotometreler

En basit bir spektrofotometrede kaynaktan çıkan ışık, bir mercekle toplanarak monokromatöre gönderilir ve dalga boyu seçiminden sonra bir aralıktan geçirilerek örnek üzerine düşürülür. Örneğin ışığı absorplama miktarı uygun bir dedektörle ölçülür, bu sinyal elektronik olarak çoğaltılır ve bir galvanometrede okunur. Bu bileşenlerin tümünün aynı ışık yoluna yerleştirildiği böyle bir spektrofotometreye tek ışın yollu spektrofotometre adı verilir.

Bu cihazlarda tek bir ışın demeti kullanılır. Sıfır ayarı ve ölçüm işlemleri ayrı ayrı yapılır. Bu tip cihazların dizayn şekli ve çalışma prensibi Şekil 1.20’te verilmiştir. Tek ışın yollu spektrofotometreler basit ve ucuz olmalarının yanında hassas ölçüm yapabilmeleri nedeniyle de tercih edilir. Kantitatif analizler için oldukça uygun cihazlardır.



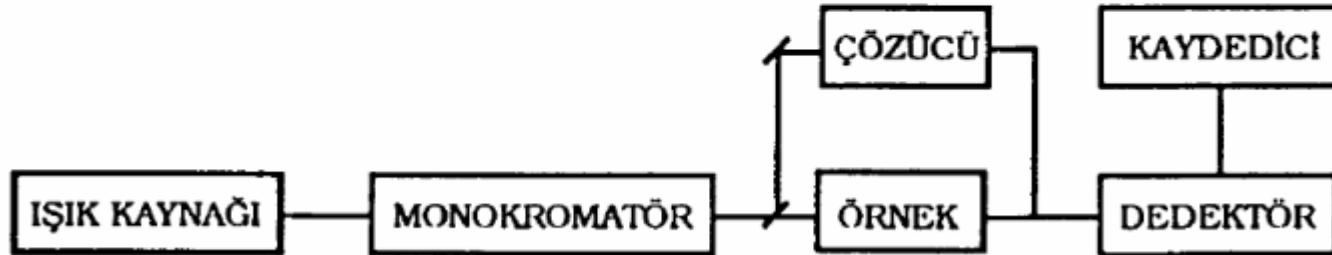
1 : Tek ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı

➤ Çift ışın yollu spektrofotometreler

Her dalga boyunda “sıfır” ve özellikle “yüz” ayarlarının yapılması, oldukça zaman alıcı bir işlemdir. Spektrofotometrede, monokromatörden çıkan ışığın eşit şiddette iki demete bölünerek birinin örneğe, diğerinin ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesi ile bu işleme gerek kalmaz. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Bu tür aletlere çift

ışın yollu spektrofotometreler denir. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir.

Çift ışın yollu cihazlar, tek ışın yollu cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karışıktır. Çift ışın demetli cihazların en önemli avantajı zaman kazandırmamaları ve voltaj değişikliklerinden etkilenmemeleridir. Tek ışın demetlilere göre hassasiyetleri daha düşüktür.

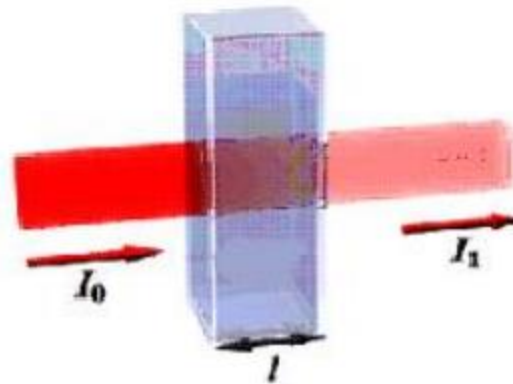


Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı

Spektrofotometrelerin Çalışma Prensibi

Spektrofotometrelerin temel çalışma prensibi, hazırlanan çözeltilerden belirli dalga boyunda ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözelti tarafından tutulduğunun bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerisindeki madde miktarı ne kadar fazla ise çözelti tarafından tutulan ışık miktarı da o oranda fazla olur. Çözelti içerisindeki bütün maddeler, ışığın bir dalga boyunu tutarken diğerlerini yansıtır veya geçirir. Maddenin belli bir dalga boyundaki bir ışığı tutması, onun diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri (yoğunluk, erime, kaynama noktası, donma noktası vb.) gibi sabit bir özelliğidir.

Çözelti içerisindeki bütün maddeler, ışığın bir dalga boyunu tutarken diğerlerini yansıtır veya geçirir. Maddenin belli bir dalga boyundaki bir ışığı tutması, onun diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri (yoğunluk, erime, kaynama noktası, donma noktası vb.) gibi sabit bir özelliğidir.



Işığın çözeltilerde absorplanması

Herhangi bir çözeltilere gönderilen bir ışığın çözelti tarafından tutulmasına **absorbsiyon** (soğurma-emilim), ışığın çözeltilerden geçmesine ise **transmisyon** denir. Işık absorpsiyonu *absorbans (A)* veya *optik dansite (OD)*, çözeltinin ışığı geçirme oranı *transmittan (T)* olarak ifade edilir.

Herhangi bir çözeltiye gönderilen bir ışığın çözelti tarafından tutulmasına **absorbsiyon** (soğurma-emilim), ışığın çözülden geçmesine ise **transmisyon** denir. Işık absorpsiyonu *absorbans (A)* veya *optik dansite (OD)*, çözeltinin ışığı geçirme oranı *transmittan (T)* olarak ifade edilir.

Bir çözeltiye giren, absorbe edilen ve geçen ışık şiddeti arasında kantitatif bir ilişki vardır. Bu ilişki "*Lambert Beer Kanunu*" ile ifade edilir. Spektrofotometride ölçüm yapabilmek için ölçümü yapılacak maddenin Lambert Beer Kanunu'na uyması gerekir.

Lambert Beer Kanunu'na göre; bir çözeltinin tuttuğu ışık, çözeltinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yani çözeltinin konsantrasyonu arttıkça absorbe ettiği ışık miktarı da artar.

Çözeltinin ışığı geçirme oranı (*transmittans, T*);

$$T = I_t / I_o$$

T: Transmittans
I_t: Çözeltiden geçen ışın
I_o: Çözeltiye gelen ışın

eşitliğinden hesaplanabilir.

Transmittans değerinin 100 ile çarpılmasından elde edilen değere "% Transmittans" denir. "% Transmittans" çözeltiye giren ışığın yüzde kaçının çözülden çıktığını gösterir.

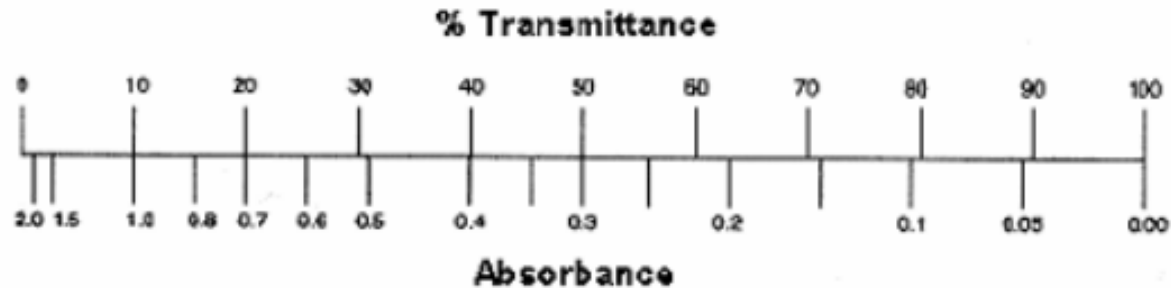
Transmittans ile absorbans arasında $A = 2 - \log \% T$ ilişkisi vardır.

$$\% T = 100 \text{ ise } A = 2 - \log 100 \quad A = 0 \text{ (log 100=2)}$$

% T = 10	ise	$A = 2 - \log 10$	$A = 1$ ($\log 10 = 1$)
% T = 1	ise	$A = 2 - \log 1$	$A = 2$ ($\log 1 = 0$)
% T = 0,1	ise	$A = 2 - \log 0,1$	$A = 3$ ($\log 0,1 = -1$)

% transmittans, 0 - 100 arasında, absorbans ise 0 ile sonsuz arasında değişir.

Rutin çalışmalarda absorbans değerinin 0-2 arasındaki kısmı kullanılır. Bu aralık %T'nin 1-100 arasına tekabül eder.



Absorbans, transmittans skalası

Spektrofotometrik Ölçümün Yapılışı

Spektrofotometrede ölçüm yapılırken numuneye belirli bir dalga boyundaki ışın gönderilerek numunenin absorbe ettiği ışın miktarı ölçülür. Yapılan analize göre ölçümde hangi dalga boyundaki ışının kullanılacağı analiz metodunda belirtilmektedir. Kullanılacak ışın dalga boyu bilinmiyorsa miktarı tespit edilecek maddenin 1 molar çözeltisi hazırlanıp çeşitli dalga boylarındaki absorban değerleri ölçülür. En yüksek değer ölçüldüğü dalga boyu belirlenerek kullanılır. Spektrofotometre bu dalga boyuna ayarlanarak çözeltilerin ölçümüne geçilir.

Spektrofotometrik ölçüm için üç tip çözelti hazırlanır. Bunlar: Kör, numune ve standart çözeltileridir.

- **Kör (tanık, şahit) Çözelti:** Spektrofotometrede okuma yapmadan önce absorbanı sıfıra veya %transmittansı 100'e ayarlamak için kullanılan çözeltilerdir. Bu amaçla yapılan işleme "kör ayarı" veya "0 ve 100 ayarı" denir. Üç tip kör çözeltisi vardır. Bunlar:
 - **Optik kör;** standart çözelti serisi hazırlanırken stok standart çözelti hariç diğer kimyasalların konulmasıyla hazırlanan 0,0 konsantrasyonlu çözeltilerdir. Çözeltilerden ve küvetten gelebilecek absorbanları ortadan kaldırmak için kullanılır. Bunun analiz öncesi yapılması zorunlu olmakla beraber analiz sırasında da yapılması gerekebilir.

- **Reaktif körü;** bulanık veya renkli reaktifler kullanıldığında içinde sadece o reaktifin olduğu kör çözelti olup o reaktiften gelebilecek absorptansı tespit etmek için kullanılır.
- **Numune körü;** renkli veya bulanık numunelerin kullanıldığı ölçümlerde numunenin renginden gelebilecek absorptansı tespit etmek için kullanılan, içinde sadece numunenin bulunduğu kör çözeltidir.

Spektrofotometre optik köre karşı sıfıra ayarlanmışsa reaktif körünün absorptans değeri, numune ve standartların absorptansından çıkarılır. Numune körünün absorptansı ise sadece numunenin absorptansından çıkarılarak hesaplama yapılır.

- **Standart Çözelti:** Miktarı bulunmak istenen maddenin bilinen konsantrasyonlardaki çözeltisidir. Bir veya birden fazla olabilir. Birden fazla olduğunda grafik çizilir.
- **Numune Çözeltisi:** İçindeki madde miktarını tespit etmek istediğimiz çözeltidir.

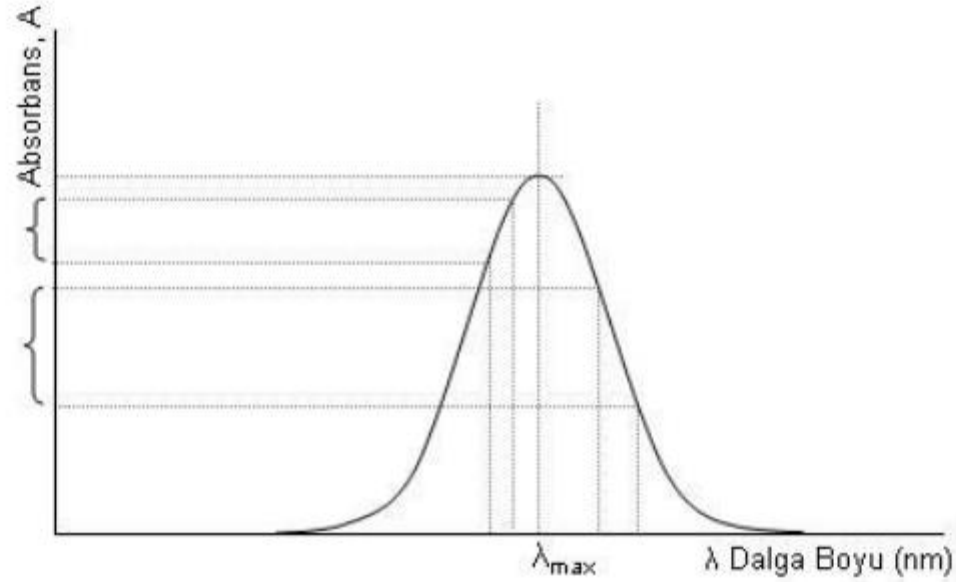
Spektrofotometrik ölçümler; end-point okuma ve kinetik okuma şeklinde yapılır. End-point okuma; spektrofotometrik okumanın reaksiyon tamamlandıktan sonra tek seferde yapıldığı okumalardır. Çoğunlukla end-point okuma yapılmaktadır. Kinetik okuma ise birim zamandaki absorbans değişiminin ölçüldüğü okumalardır. Genellikle enzim analizlerinde kinetik okuma kullanılır.

Spektrofotometrik ölçüm yapılırken şu aşamalar takip edilir:

- Ölçümden yeterli süre önce cihaz çalıştırılarak ısınması sağlanır.
- Cihaz ölçümün yapılacağı dalga boyuna ayarlanır.
- Küvete kör çözelti konularak cihaza yerleştirilir.
- Kör çözelti ile cihazın 0 ve 100 ayarı yapılır.
- Küvete standart çözeltilerden konularak cihaza yerleştirilip okumaları yapılır.
- Küvete numune çözeltisi konularak cihaza yerleştirilip okuması yapılır.
- Kalibrasyon (absorbans) eğrisi çizilerek, numunenin konsantrasyonu hesaplanır.

Okumalar tamamlandıktan sonra ya numunenin absorbans değeri sabit faktör ile çarpılarak numunenin konsantrasyonu hesaplanır veya kalibrasyon grafiği çizilip bu grafik yardımıyla numunenin absorbans değerinden konsantrasyonu tespit edilir.

Bir bileşiğin hangi dalga boyunda absorpsiyon yaptığını bulmak için absorpsiyon eğrisini saptamak gerekir. Bunun için söz konusu bileşiğin değişik dalga boylarındaki uygun aralıklarla absorpsiyonu y eksenine, dalga boyu ise x eksenine işaretlenerek bir eğri elde edilir. Bu eğriye absorbans eğrisi denir. Kantitatif ölçümlerde λ_{max} ölçüm için kullanılır. λ_{max} değerinin dışında bir dalga boyunda çalışılması absorpsiyonun az olmasına yol açar. Aşağıdaki absorbans eğrisinden de anlaşılacağı gibi λ_{max} değerinde maksimum absorbans elde edileceği görülür. Absorbans eğrisinin sağında veya solunda λ değerlerindeki oynamanın, λ_{max} değeri yakınlarındaki oynamalardan daha çok absorbansa yansıtacağı grafik üzerinde görülmektedir.



Absorbans (kalibrasyon) eğrisi

Gelişmiş spektrofotometreler, bilgisayar sistemleri ile donatıldıkları için absorbans değeri ile kantitatif hesaplamalar yapabilmektedir. Yani standartların ölçümünden sonra cihaz, kalibrasyon eğrisini kendisi hazırlayıp numunenin absorbansına göre hesaplama yaparak direkt olarak konsantrasyonu verebilmektedir.

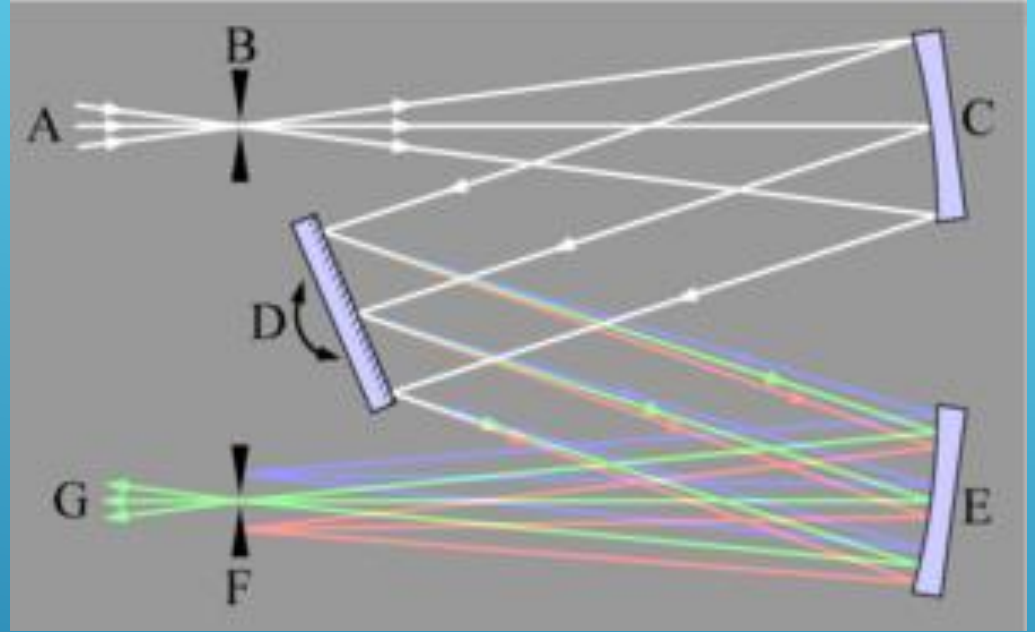
GÖRÜNÜR (VIS) VE ULTRAVİYOLE (UV) ALAN SPEKTROFOTOMETRELERİNİN KISIMLARI

- ▶ Işın kaynağı
- ▶ Işın kaynağından gelen ışınları dalga boylarına göre ayıran cihaz
- ▶ Çözelti ve çözücü koymaya yarayan şeffaf kaplar
- ▶ Işın enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren dedektör
- ▶ Sinyal cihazı



IŞIN KAYNAĞI





A= gelen ışın demeti

B= giriş sliti

C=mercek

D=optik ağı veya prizma olabilir

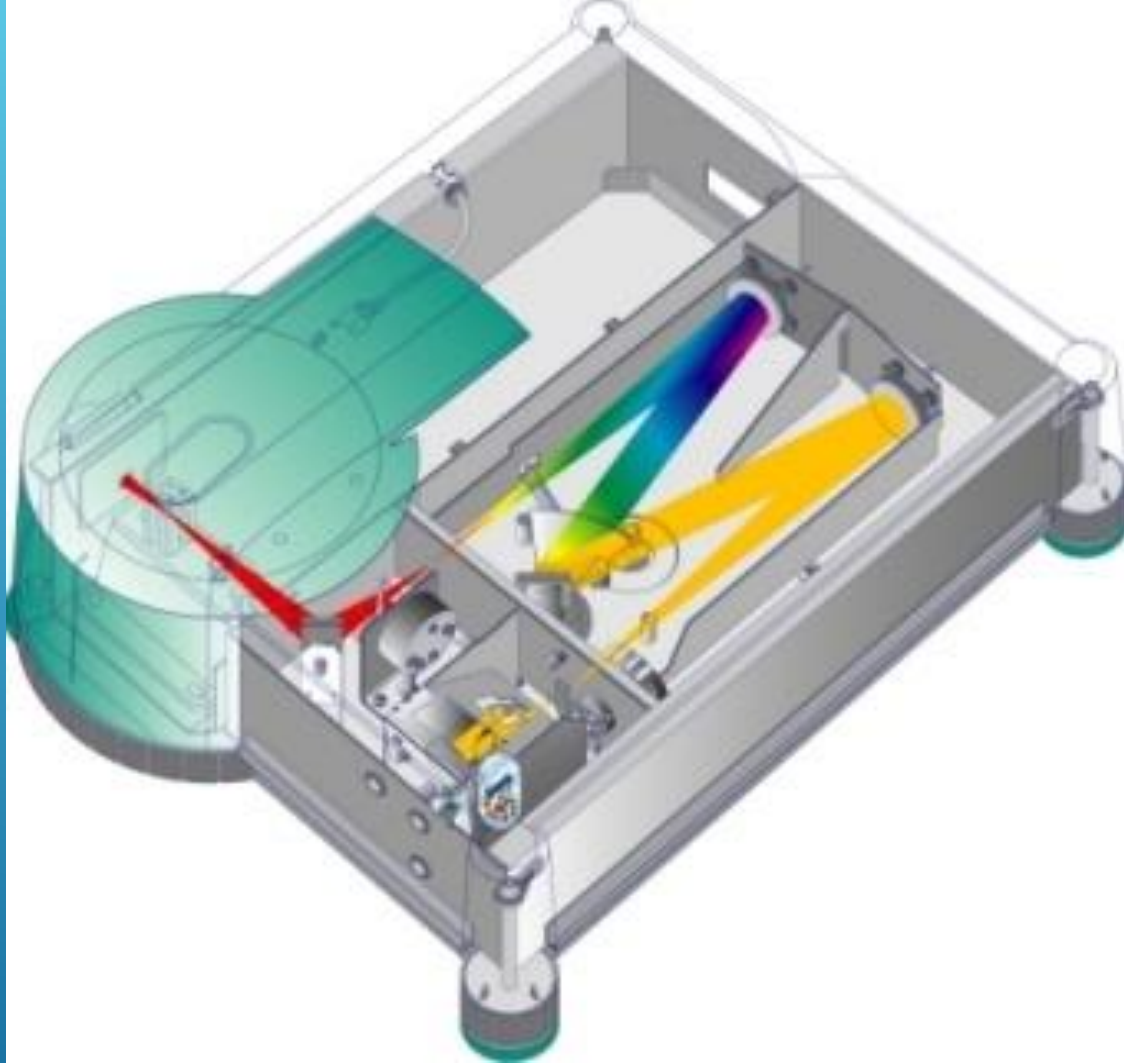
E= mercek

F= çıkış sliti

G= tek dalga boylu ışın

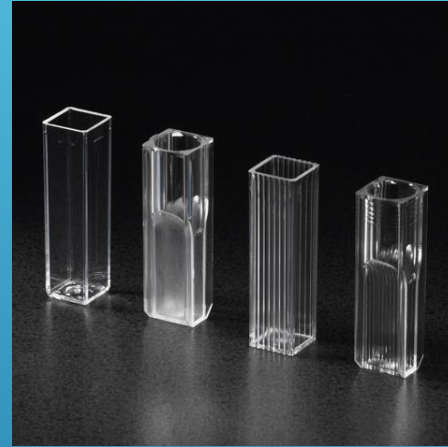
İŞİN KAYNAĞINDAN GELEN İŞİNLARI

DALGA BOYLARINA GÖRE AYIRAN CİHAZ :



Spektrofotometrenin iç görünüşü

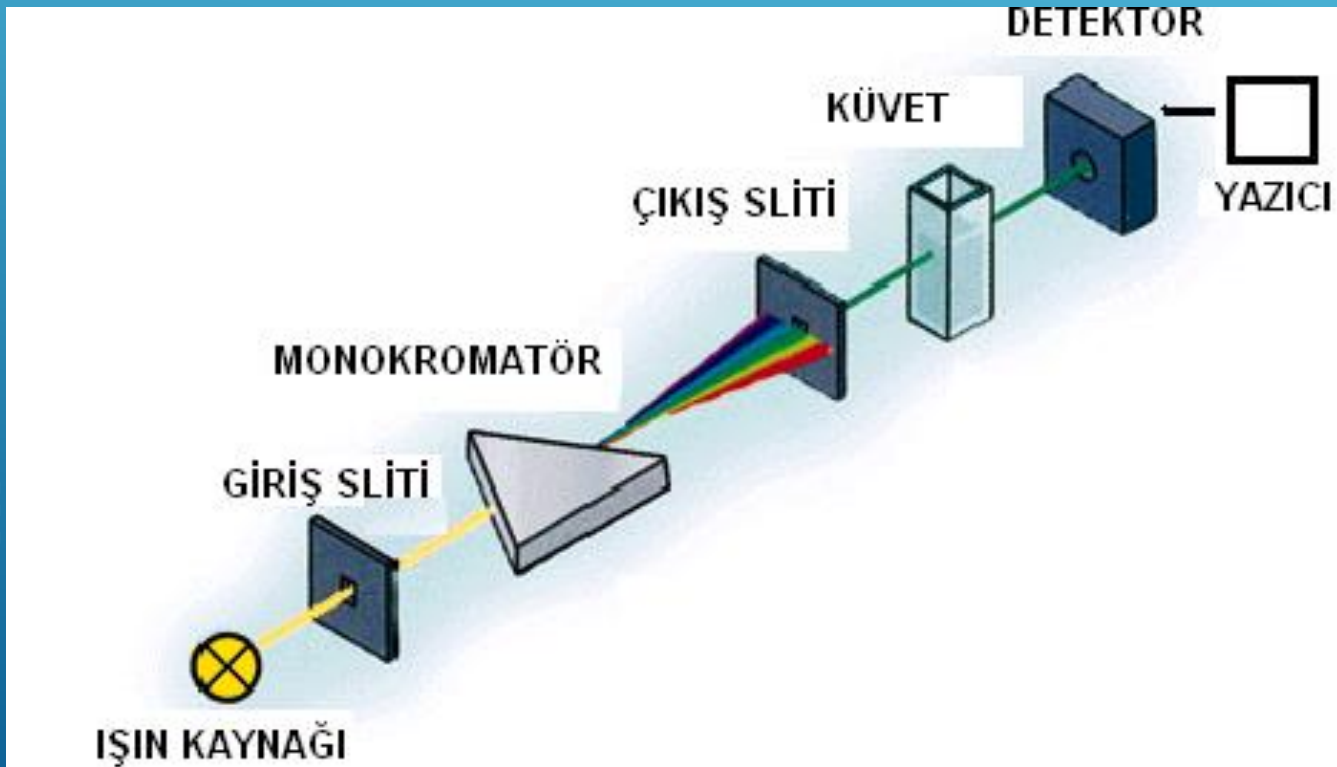
ÖRNEK KAPLARI (KÜVETLER) (CAM, KUVAR VE TEK KULLANIMLIK NUMUNE KAPLARI)

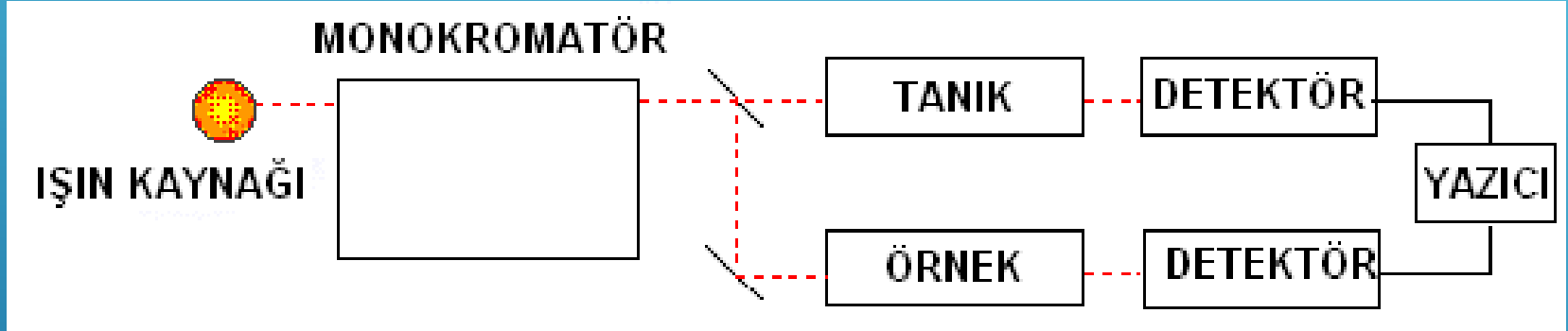


IŞIN DETEKTÖRLERİ: Işın enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren cihazlara detektör denir.

1) Tek ışın yollu spektrofotometreler

SPE





2) ÇİFT IŞIN YOLLU SPEKTROFOTOMETRELER

- 1) Ani sıcaklık değişmeleri
- 2) Elektrik voltajındaki değişmeler
- 3) Standart madde tartım ve seyreltme hataları
- 4) Küvetten kaynaklanan hatalar

- SPEKTROFOTOMETRELERİN ÇALIŞMA**
5) Spektrofotometrenin kendi aksamından kaynaklanan
STABİLİTESİNİ
hatalar
ETKİLEYEN FAKTÖRLER

UV/VIS SPEKTROFOTOMETRELERİNİN KULLANIM ALANLARI

- 1- Yapısal analizler
- 2- Kalitatif analizler
- 3- Kantitatif analizler
- 4- Titrimetrik analizler
- 5- Mikrobiyolojik analizler



Spektroskopik analizlerde kullanılacak çözücülerde (solventlerde) şu özellikler aranır:

1. Spektrumu alınacak maddeyi çözmeli,
2. Polar olmamalı,
3. Spektrumu alınacak maddenin absorplama yaptığı alanda absorplama yapmamalı ve
4. Çözdüğü maddelerle reaksiyona girmemelidir.

2) KALİTATİF ANALİZLER

- Karbonhidrat analizleri
- Amino asit, peptid ve protein analizleri,
- Vitamin analizleri,
- İnorganik elementler,
- ADP ve ATP gibi azotlu bileşikler ve
- Toksin ve diğer benzeri analizler

3) KANTİTATİF ANALİZLER

Kantitatif analiz için ilk şart, tayini yapılacak maddeyi bilmek gerekir. Bundan sonra bir takım işlemler yapmak gerekir. Bunlar;

1) Tayini yapılacak maddeyi saflaştırmak,

2) Tayinin yapılacağı dalga boyunu seçmek,

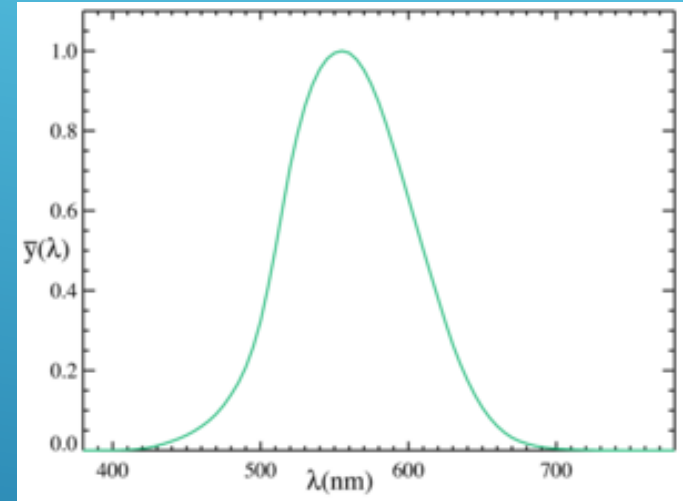
3) Tayinin sıcaklığını ayarlamak,

4) Tayin için uygun çözücü seçmek ve pH'yı ayarlamak,

5) Tayin için çalışma grafiğini çizmek

Spektrofotometre ile bir maddenin kantitatif analizinin yapılacağı dalga boyunu kararlaştırmak için,

Analiz edilecek numunenin, absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Bunun için, maddenin 1 molar çözeltilisinin çeşitli dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçölür. Belli bir dalga boyundan başlayarak, çeşitli dalga boylarında absorbans taraması yapılır. Maksimum absorbans elde edilen dalga boyu, analiz için seçilir. Örneğin yandaki grafikte, 400-700 nm arasında absorbans taraması yapılmış, maksimum absorbans yaklaşık 540 nm de elde edilmiştir. Sonuç olarak 540 nm dalga boyunda analiz yapılabilir.

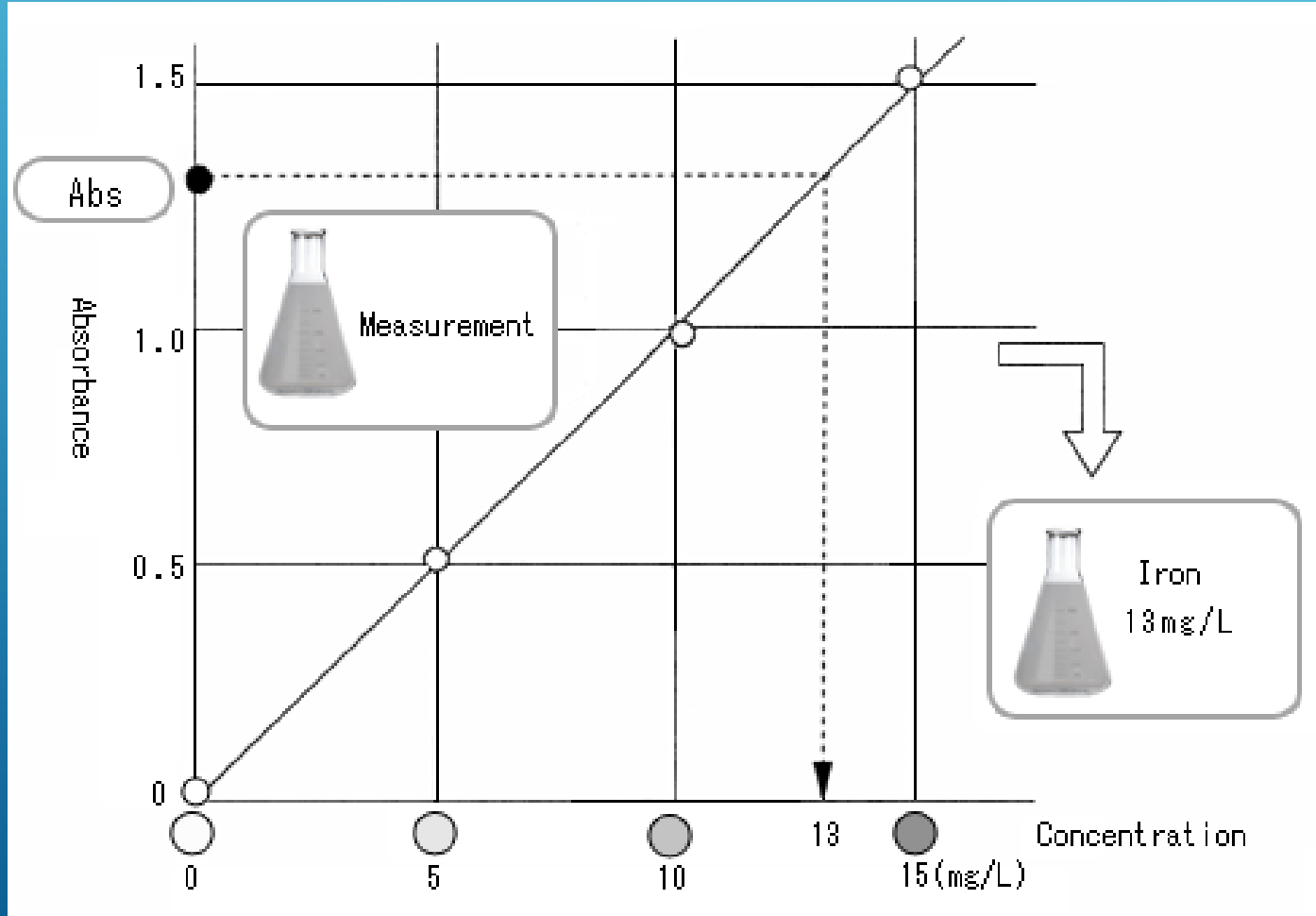


şekil. Bir örnek için dalga boyuna karşılık absorbans taramasını gösteren örnek bir grafik

Kantitatif analizin en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra analizi yapılacak maddeyi iğeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözeltili ile bu dalga boyundaki absorbans (A) değerleri ölçülür.

Standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı Absorbans değerlerini grafiğe geçirmek suretiyle elde edilen doğruya kalibrasyon doğrusu denir.

KANTİTATİF ANALİZ, KALİBRASYON DOĞRUSUNUN DOĞRUSAL OLDUĞU BÖLGEDE YAPILIR. DERİŞİMİ BİLİNMEYEN ÖRNEĞİN A DEĞERİ ÖLÇÜLÜR VE KALİBRASYON DOĞRUSUNDA BU DEĞERE KARŞILIK GELEN DERİŞİM SAPTANIR



4- TİTRİMETRİK ANALİZLER

Özellikle renk dönüşümü olmayan veya indikatörle hassas olarak titrasyon bitim noktası belirlenemeyen maddelerin reaksiyonlarının takibi için bu yöntem tercih edilmektedir.

5- MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

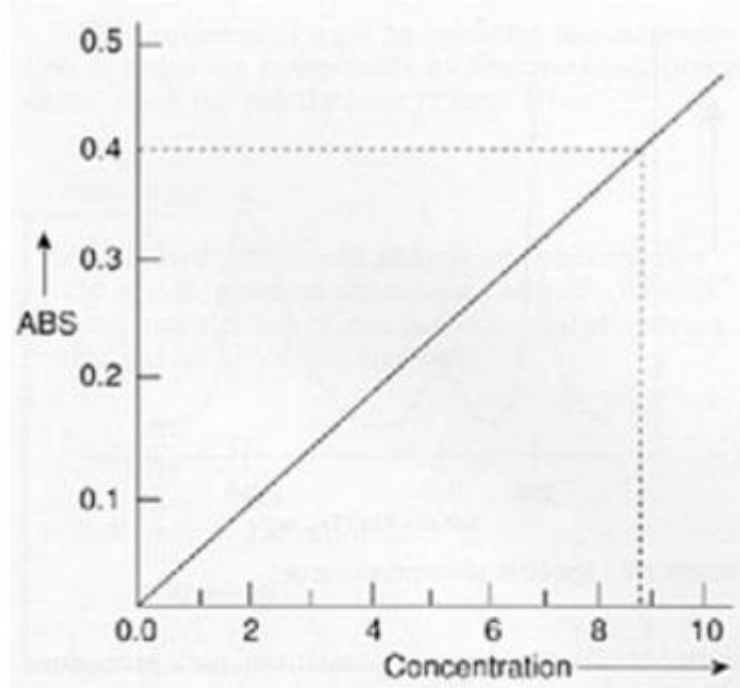
Mikroorganizma hücre süspansiyonlarının oluşturduğu türbiditenin, ışınların bazı dalga boylarında absorbanans verdiğini ortaya koymuştur.

UV/Görünür alan spektrofotometresinin üstünlükleri

- Geniş bir kullanım alanına sahip olması
- Yüksek derecede hassasiyet
- Seçicilik kapasitesi
- Doğruluk derecesinin yüksek olması
- Kullanım kolaylığı



Şekil. Spektrofotometre



Şekil 1: Kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon eğrisi, standart çözeltilerin cihaz okumalarının (absorbans değerlerinin), konsantrasyonlarına karşı koordinat düzlemine aktarılıp kesişme noktalarının birleştirilmesiyle elde edilen grafikdir.

Absorbansa (A) karşı konsantrasyonlar (C), milimetrik kâğıt ya da bilgisayar yardımı ile grafiğe aktarılıp kalibrasyon eğrisi elde edilir. (Şekil 1)

Milimetrik Kâğıtta Kalibrasyon Eğrisi Çizme

Milimetrik kâğıtta kalibrasyon eğrisi şu şekilde çizilir:

- Öncelikle milimetrik kâğıt üzerine koordinat düzlemi çizilir.
- Konsantrasyonlar x eksenine (apsis), konsantrasyonlara ait absorbens değerleri y eksenine (ordinat) işaretlenir.
- Her bir konsantrasyonun absorbens değerleri ile birleşme noktaları işaretlenir.
- İşaretlenen noktalar birleştirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olur.

Konsantrasyonlar ve absorbens değerleri koordinat düzlemine yerleştirilirken 0 noktasından başlanarak küçükten büyüğe doğru ve büyüklüklerine uygun aralıklarla yerleştirilmelidir. İki değer arasındaki aralık değerlerin büyüklüğü ile doğru orantılı olmalıdır. En küçük değer yerleştirildikten sonra takip eden değerler bununla orantılı olarak yerleştirilmelidir.

ÖRNEK - 1

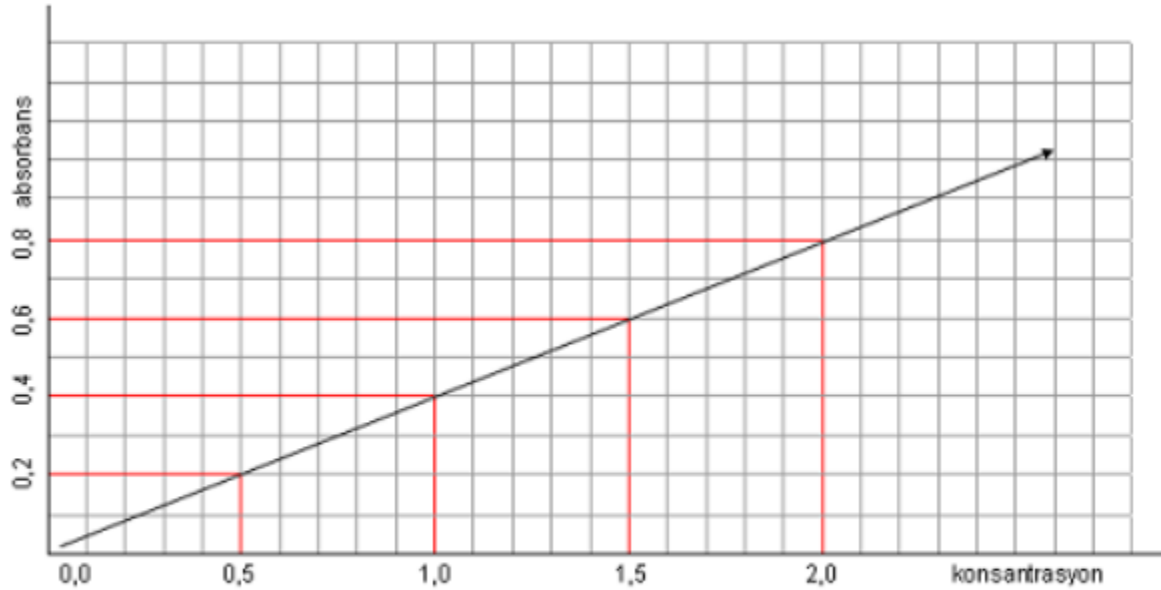
Konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara ait absorbens değerleri aşağıda verilen standart çözelti serisine ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ile Şekil 3.2'deki grafik elde edilir.

<u>Konsantrasyonlar (mg/l)</u>	<u>Absorbans Değerleri</u>
0,0	0,0
0.5	0.2
1.0	0.4
1.5	0.6
2.0	0.8

ÖRNEK - 1

Konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara ait absorbands değerleri aşağıda verilen standart çözelti serisine ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ile *Şekil 2*'deki grafik elde edilir.

<u>Konsantrasyonlar (mg/l)</u>	<u>Absorbans Değerleri</u>
0,0	0,0
0,5	0,2
1,0	0,4
1,5	0,6
2,0	0,8



Şekil 2: Kalibrasyon grafiği

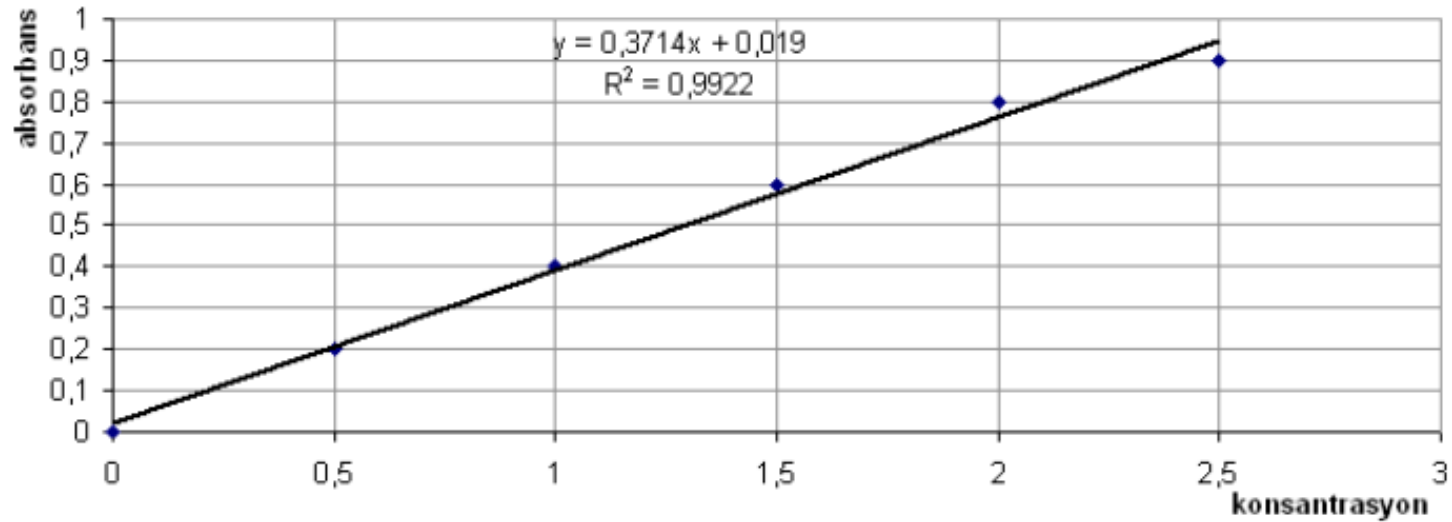
Bilgisayarda Kalibrasyon Eğrisi Çizme

Kalibrasyon eğrisi oluşturmada ikinci metot bilgisayarda kalibrasyon eğrisi çizilmesidir. Bilgisayarda açılan boş bir tablolama (excel) sayfasına standartların konsantrasyon ve absorbands değerleri yazılarak bu veriler grafiğe dönüştürülmektedir.

Bilgisayarda kalibrasyon eğrisi çizilirken şu işlem basamakları takip edilir:

- Boş bir tablolama (excel) sayfası açılarak konsantrasyon ve absorbands değerleri yazılır.
- Yazılan bu değerler seçilip ekle menüsünden grafik komutu tıklanır.
- Ekrana gelen grafik sihirbazı penceresinde “XY” (dağılım) grafik türü seçilerek ileri düğmesi tıklanır.
- Açılan ikinci grafik sihirbazı penceresinde de ileri düğmesi tıklanır.
- Açılan üçüncü grafik sihirbazı penceresinde başlıklar sekmesinde “X” değer eksenine “konsantrasyon”, “Y” değer eksenine de “absorbans” başlıkları yazılarak son düğmesi tıklanır.
- Ekrana gelen tabloda herhangi bir kesişme noktasına sağ tıklanarak “eğilim çizgisi ekle” seçilir.
- Açılan eğilim çizgisi ekle penceresinde seçenekler sekmesi açılarak “grafik üzerinde denklemini görüntüle” ve “grafik üzerinde R-kare değerini görüntüle” kutuları işaretlenip tamam butonu tıklanarak kalibrasyon eğrisi elde edilir.

Örneğin konsantrasyonları 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l, absorbans değerleri ise sırasıyla 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9 olan standart çözelti serilerine ait kalibrasyon eğrisinin bilgisayarda çizilmesi ile Şekil 3.4'deki grafik elde edilir.



Şekil 3.4 Kalibrasyon grafiği

KALİBRASYON EĞRİSİNDEN KONSANTRASYON HESAPLAMA

Kalibrasyon eğrisi metodunda standart okumaları yapıp grafik oluşturulduktan sonraki aşama numunenin konsantrasyonunun hesaplanmasıdır. Numune konsantrasyonunun hesaplanması milimetrik kâğıt metodu veya regresyon eşitliği ile yapılır.

Milimetrik Kâğıt Metodu

Milimetrik kâğıt üzerinde hazırlanan kalibrasyon grafiğinde, numuneye ait absorbands değerinin grafikte kesiştiği nokta işaretlenip bu noktanın x eksenine (apsis) ile kesiştiği noktadaki konsantrasyon tespit edilir. Bulunan bu değer numune çözeltisinin konsantrasyonudur.

Bu metotla konsantrasyon hesaplanmasında;

- Öncelikle standartlara ait kalibrasyon eğrisi hazırlanıp y eksenine (ordinat) numunenin absorbands değeri (cihaz okuması) işaretlenir.
- İşaretlenen noktadan kalibrasyon eğrisine dik bir doğru çizilip kesişme noktası tespit edilir.
- Çakışma noktasından x eksenine (apsis) dik bir doğru çizilir.
- Çizilen dik doğrunun apsisle kesişme noktası numunenin konsantrasyonunu verir.

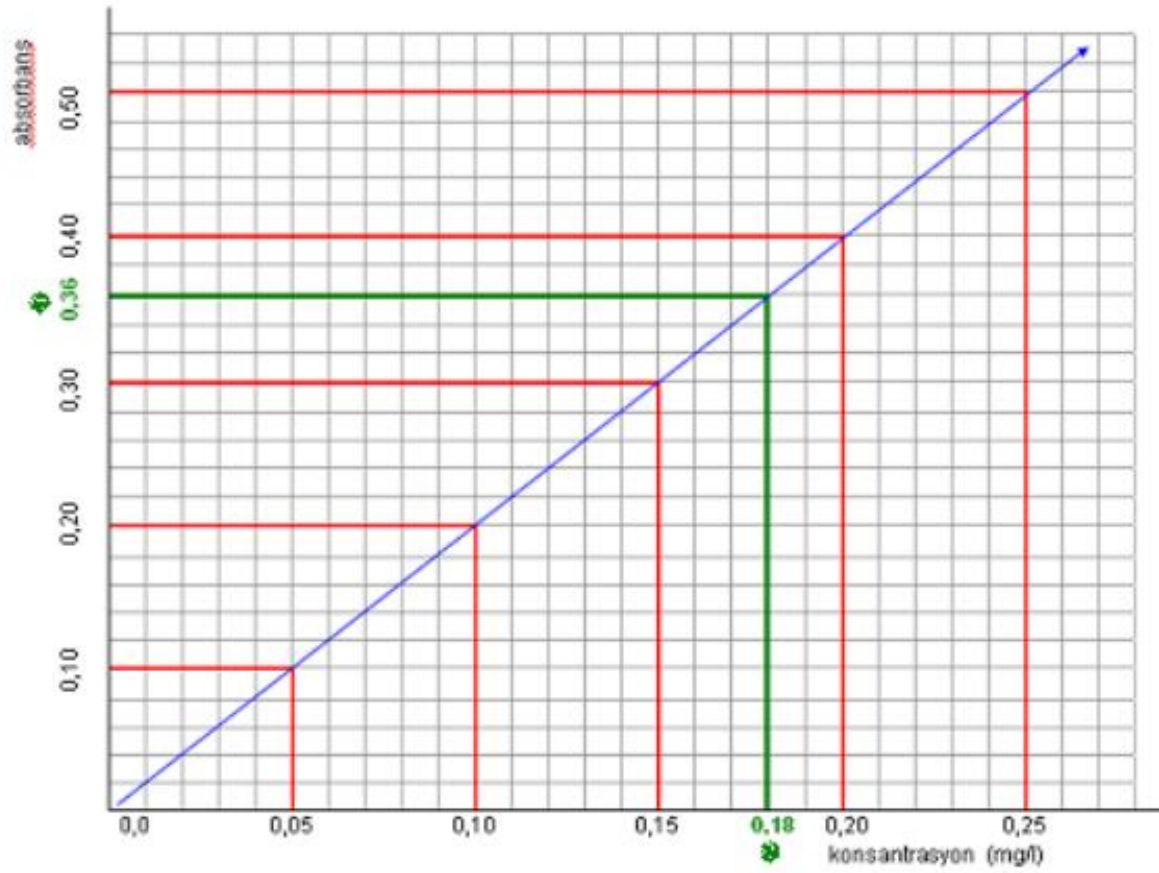
Numune çözeltisine seyreltme uygulanmışsa analiz numunesine ait konsantrasyon tespit edildikten sonra bu değer seyreltme faktörü ile çarpılarak numuneye ait gerçek konsantrasyon tespit edilir.

Milimetrik kâğıt metoduyla konsantrasyon hesaplanırken;

- Çizilen grafik belli bir noktadan sonra eğilmeye başlıyorsa eğilmenin başladığı noktadan sonraki değerler dikkate alınmamalıdır. Aynı durum regrasyon eşitliği için de geçerlidir.
- En sağlıklı absorban değerinin 0,1 – 0,5 arasında olduğu bilinmeli, bunların dışında kalan özellikle 1,0'ın üzerindeki değerlere güvenilmemelidir.

Örneğin; yapılan bir deneyde 0,05 – 0,10 – 0,15 – 0,20 – 0,25 mg/l konsantrasyonlara sahip standart çözelti serilerinin absorban değerleri sırasıyla 0,10 – 0,20 – 0,30 – 0,40 – 0,50 numune çözeltisinin absorban değeri ise 0,36 ölçülmüştür.

Bu deneye ait kalibrasyon eğrisi çizilip (*Şekil 4.1*) numuneye ait absorban değeri kalibrasyon eğrisiyle birleştirildiğinde numunenin konsantrasyonunun 0,18 mg/l olduğu tespit edilir. Numune çözeltisine seyreltme uygulanmışsa 0,18 değeri seyreltme faktörü ile çarpılarak numuneye ait gerçek konsantrasyon tespit edilir.



· Kalibrasyon eğrisinde konsantrasyon tespiti

REGRASYON EŞİTLİĞİ

Milimetrik kâğıt metodunun dışında regrasyon eşitliği kullanılarak da numunenin konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Kalibrasyon eğrisi bilgisayarda oluŐturulmuŐsa elde edilen grafik otomatik olarak regrasyon eŐitliĐini de vereceğinden buradan numunenin konsantrasyonu hesaplanır. Aksi taktirde önce a (kesim noktası) ve b (eğim) değerleri hesaplanmalıdır. (eğim = konsantrasyon)

Regrasyon eşitliği:

$$Y = bx + a$$

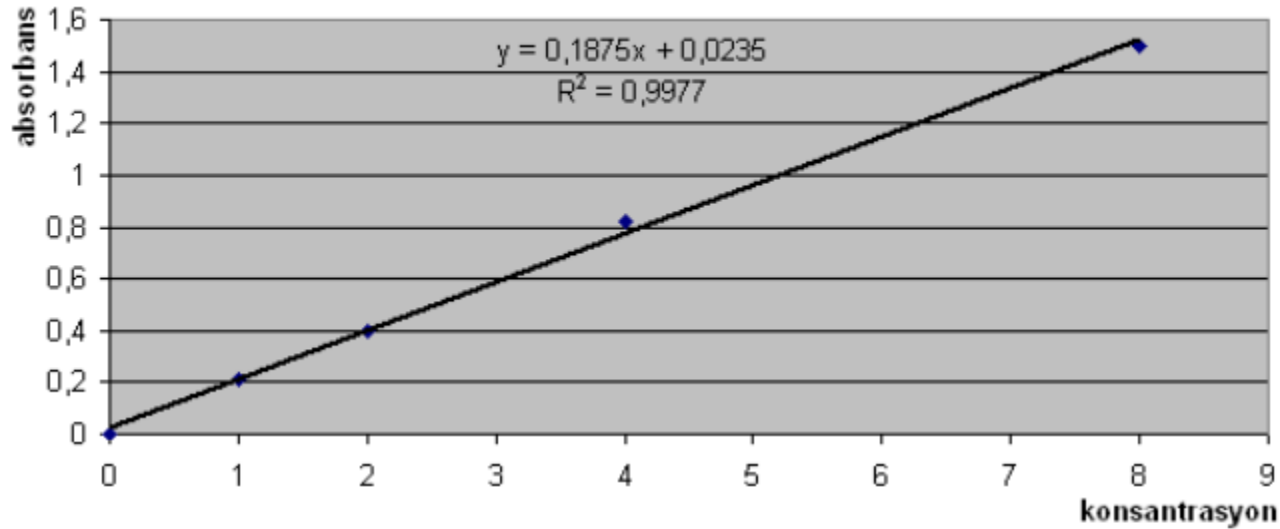
formülüyle ifade edilmektedir. Formülde;

Y: Absorbans

x: Konsantrasyon

a: Kesim noktası, $a = y_{ort} - b \cdot x_{ort}$ formülüyle hesaplanmaktadır.

b: Doğrunun eğimi, $b = S_{xy} / S_{xx}$ formülüyle hesaplanmaktadır.



Şekil · Kalibrasyon eğrisin ve regrasyon eşitliği

Grafikte görüldüğü gibi “ $y = 0,1875x + 0,0235$ ” eşitliği otomatik olarak elde edilmekte ve buradan konsantrasyon hesaplanabilmektedir.

Regrasyon hesabında elde edilen R^2 değeri 1'e yaklaştıkça absorbans ile konsantrasyon arasındaki ilişki artar, elde edilen sonucun doğruluk payı artar. Yani R^2 değeri ne kadar yüksek çıkarsa eşitlik o kadar sağlıklı demektir.