

Türev Spektrofotometrisi

Feyyaz ONUR (*)

Cem YÜCESOY (*)

Özet : Türev spektrofotometrisi günümüzde analiz yöntemi olarak çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu derlemede yöntemin genel prensibi, türev eğrileri, avantajları ve uygulandığı alanlar gösterilmiştir.

DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

Summary : At present, Derivative Spectrophotometry is widely used in the field of analysis. In this paper its principle, derivative curves, advantages and the areas of applications are described and reviewed.

Key words : Derivative Spectrophotometry

GİRİŞ :

UV - Görünür bölgedeki bir spektrum madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bu fonksiyonun herbir noktasındaki türevi hesap-

$$dA$$

lanabilir (—). Eğer bu türev

$$d\lambda$$

değerleri dalga boyuna karşı grafiğe

geçirilecek olursa «türev spektrumu» meydana gelir ve 1 den n'e kadar derecede olabilir.

$$\left(\frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \dots, \frac{d^n A}{d\lambda^n} \right)$$

Türev spektrofotometri ise türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir.

Görüldüğü gibi türev eğrilerinin hazırlanmasında matematik

(*) A. Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tandoğan - ANKARA

işlemler gerekmektedir. Bir orijinal spektrumun herbir noktasındaki türevinin hesapla bulunması ve sonra bunların grafiğe geçirilerek yeni türev eğrilerinin hazırlanması oldukça güç bir işlemdir. Bu nedenle hesapların yapılması için bilgisayarlardan yararlanılır.

Deneysel eğrilerin ölçüm aletleri ile türevlerinin alınması oldukça eskiye dayanır ve 1920'lerde ilk defa Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanmasında kullanılmıştır. Genel kullanıma ise 1950 senelerini bulmuştur. Günümüzde mikro işlemcilerin yaygın olarak kullanılması bu yöntemin kolaylıkla analizlere uygulanmasına imkan tanımaktadır ve geliştirilen spektrofotometreler de bu şekilde donanmışlardır. Son senelerde yayınlanan araştırmaların çoğunda bu yöntemle ilgili çalışmalar bulunmaktadır (1-15).

YÖNTEMİN ÖZELLİKLERİ :

1 — Avantajları :

a) Türev çalışması orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir birleşik daha kolay ve kesin olarak tanımlanabilir.

b) Coğunlukla orijinal spektrumda elde edilen eğriler birçok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir.

Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece birarada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.

c) Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltilerle çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir ve bulanık ortamlarda çalışılabilir. (1, 16, 17).

d) Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir (1, 18).

e) Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.

2 — Dezavantajları :

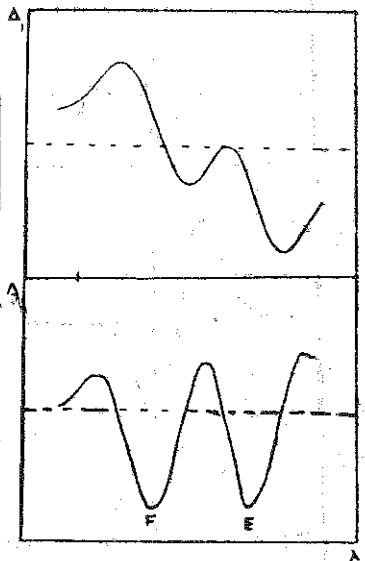
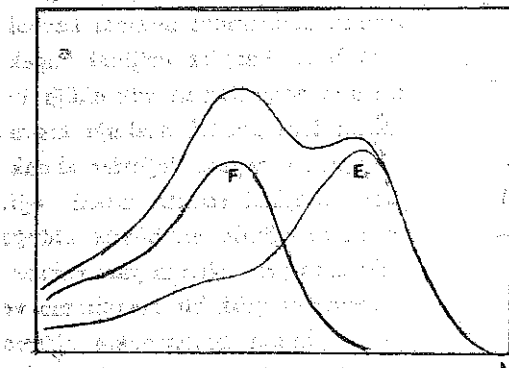
a) Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

b) Türev spektrumlarında çok sayıda uydu pikler de görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışılırken başka bileşenlerin de varlığına bizi götürür (19, 20). Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır.

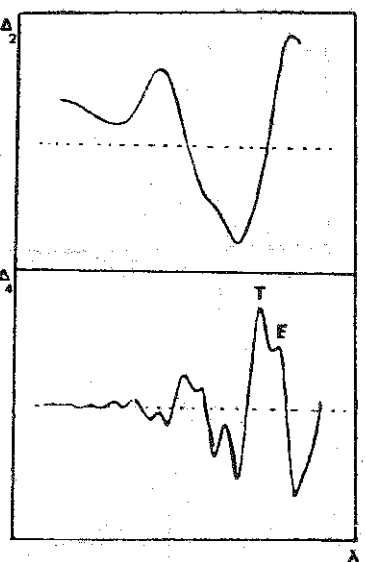
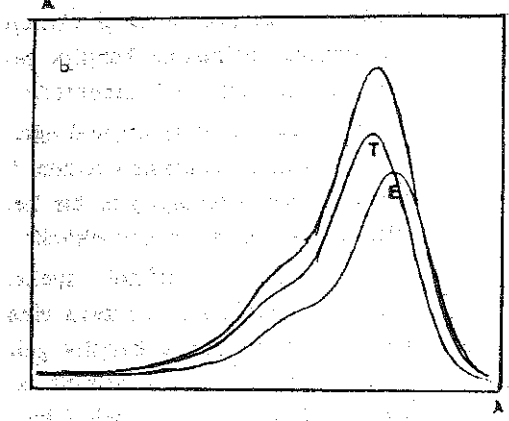
3 — Türev Eğrilerinin Şekilleri:

Günümüzde 1. den 4. çüye kadar türev eğrisi çizilmekte ve anlam kazanmaktadır.

Çevre kirliliği, özellikle su kaynaklarındaki kirlenme, suyun biyolojik oksijen ihtiyacını artırarak suyun kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle suyun kalitesini kontrol etmek için suyun biyolojik oksijen ihtiyacını ölçmek önemlidir.

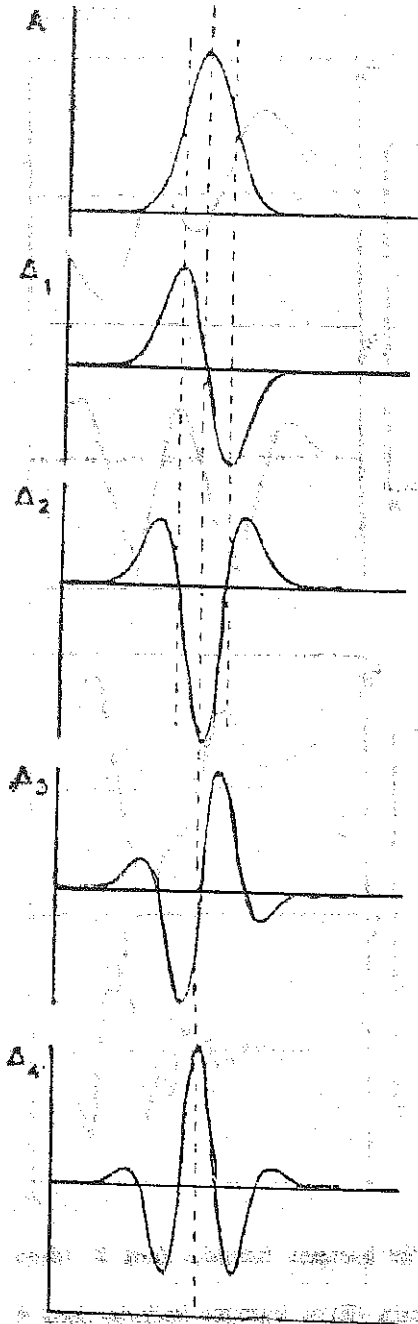


su kaynağına ulaşarak suyun kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle suyun kalitesini kontrol etmek için suyun biyolojik oksijen ihtiyacını ölçmek önemlidir.



su kaynağına ulaşarak suyun kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle suyun kalitesini kontrol etmek için suyun biyolojik oksijen ihtiyacını ölçmek önemlidir.

Şekil 1: a) Floresein (F) ve Eosin (E)'in karışım halinde iken 2. türev spektrumunda ayrılmaları. b) Tribromoflorescein (T) ve Eosin (E)'in karışım halinde iken 4. türev spektrumunda ayrılmaları. (Analisis 14, 1-20 (1986))



Şekil 2 : Orijinal spektrumdaki pik (A) ve bunun 1, 2, 3 ve 4'üncü türevleri (Δ_1 , Δ_2 , Δ_3 ve Δ_4). (Anulusis 14, 1-20 (1986))

Şekil 2 de de görüldüğü gibi 1. türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Burada orijinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuş buna karşılık orijinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için ise negatif değerler almaktadır. Orijinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara yani eğrinin yarı yüksekliklerine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Buna göre gauss eğrisindeki maksimum noktasına 1. türev eğrisinde bir «kesim noktası» karşılık gelmektedir.

2. türev eğrisinde ise aynı işlemler sonucunda orijinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir.

3. türev eğrisinde orijinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir.

4. türevde ise orijinal spektrumdaki maksimum noktaya yine bir maksimum nokta karşılık gelmektedir. Bu nedenle kantitatif tayinlerde 2. ve 4. türev eğrileri kullanılmaktadır (19).

Ayrıca orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pik'e karşılı n. türevde $n + 1$ tane maksimum ve minimum rastlanmaktadır. Yani 1. türevde 2, 2. türevde 3, 3. türevde 4 tane gibi maksimum ve minimum noktası gözlenmektedir

Önemli bir nokta ise, türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı

içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliğinin azalmasıdır. Bu azalma yaklaşık 1. türevde yarısına, 2. türevde üçte birine ve 4. türevde yüzde 40'ına inmektedir (21).

KULLANIM ALANLARI :

Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan bu yöntem : amonyak, azot monoksit, azot dioksit (22), ozon, benzaldehit, toluen, ksilen formol (23) gibi gaz ve uçucu bileşiklerin analizinde,

Sularda fenol ve anilin (1, 24) ve sütlerde protein (1) gibi su ve besin analizlerinde,

Steroidlerin ayırımı ve tayininde (25, 26), aspirin içerisinde salsilik asit tayini (27, 28), benzodiazepinlerin tayininde (29), şuruplarda difenhidramin HCl tayini (30), polivitamin tabletlerinde nikotinik asit tayini (31), tablet ve enjektar çözeltilerde prosiklidin tayini (32), K vitaminin stabilitesi (33), şurup damla ve tabletlerde efedrin HCl tayini (34) gibi ilaç analizlerinde,

Membranlarda protein tayini (35), fermentasyon ortamlarında anilin tayini (36), kanda hemoglobin (37), methemalbumin (38) ve fenilalanin tayini (39), hemoglobin yanında bilirubin tayini (40), hemoglobin yanında karboksihemoglobin tayini (41), üre tayini (42) gibi biyolojik ortam analizlerinde kullanılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Talsky, G., Mayring, L., Kreuzer, H., «Feinauflösung UV/VIS

-Derivativspektrofotometrie höherer Ordnung», *Angew. Chem.*, 90, 840-854, (1978).

2. Ruggieri, G., Niola, I., «Application of Derivative Spectroscopy to Urine Analysis», *Rass. Chim.* 36 (6), 353-357 (1984).

3. Bettero, A., Bollettin, P., «Atropin Sulphate Determination by Derivative Spectroscopy or HPLC», *Ann. Chim. (Rome)*, 75 (7-8), 351-358, (1985).

4. Simal, J., Lage, M.A., Iglesias, I., «Second Derivative UV Spectroscopy and Sulfamic Acid Method for Determination of Nitrates in Water», *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68 (5), 962-964, (1985).

5. Terade, H., Seki, H., Yamamoto, K., Kametani, F., «Quantitative Determination by Derivative Spectrophotometry of Triton X-100 in Solubilized Preparations of Membrane Proteins», *Anal. Biochem.*, 149 (2), 501-506, (1985)

6. Vetuschci C., Ragno, G., Mazzeo, P., Mazzeo-Farina, A., «Simultaneous Determination of Oxprenolol and Chlorthalidone in Pharmaceutical Formulations using Derivative Spectrophotometry», *Farmaco Ed. Prat.*, 40 (7), 215-224, (1985).

7. El-Yazbi, F. A., Barary, M. H., «Determination of Some Cephalosporins Using Derivative Spectrophotometry», *Anal. Lett.*, 18 (B5), 629-640, (1985).

8. El Yazbi, F. F., Barary, M. H., Abdel-Hay, M. H., «Determination of Nitrazepam and Dipotassium Chlorazepate in the Presence of their Degradation Products Using Second - Derivative Spectrophotometry», *Int. J. Pharm.*, 27 (2-3), 139-144, (1985).
9. Grant, A., Bhasttacharyya, Ü. K., «Application of Derivative Spectroscopy to the Determination of Chromatographic Peak Purity», *J. Chromatog.*, 347 (2), 219-35, (1985).
10. Bryant, S.L., Neel, A.R., Sewell, G. J., «Analysis of Hospital-formulated Oral Liquid Preparations by Second Derivite UV -Spectroscopy», *J. Clin. Hosp. Pharm.*, 11 (5), 327-339, (1986).
11. El-Sebakhy, N. A., Seif El-Din, A. A., Korany, M. A., «First Derivative Spectrophotometric Determination of Quinine-Quinidine in Cinchona Liquid Extract», *J. Pharm. Belg.*, 41 (4), 222-225, (1986).
12. Walters, M., Thornton, D. J., «Multiwavelength Analysis of Derivative Spectra. An Application for the Determination of Urinary Porphyrins», *Clin. Chim. Acta.*, 157 (3), 311-316, (1986).
13. El-Yazbi, F.A., Korany, M. A., Abdel - Razak, O., Elsayed, M. A., «Derivative Spectrophotometric Determination of Some Corticosteroids in Combinations with Other Drugs», *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69 (4), 614-618, (1986).
14. Daley, L. S., Thompson, M.M., Proebsting, W. M. Portman, J., Jeong, B. R., «Use of Fourth-Derivative Visible Spectroscopy of Leaf Lamina in Plant Germplasm Characterization», *Spectroscopy*, 1 (7), 28-31, (1986).
15. Shijo, Y., Sakai, K., «Spectrophotometric and Analog Derivative Spectrophotometric Determination of Chromium (III) With 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino) phenol», *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 59 (5), 1455-1458, (1986).
16. O'Haver, T. C., Green, G. L., «Derivative Spectroscopy», *Amer. Lab.*, 7 (3), 15-16, 18, 20-21 (1975).
17. Cahill, J. E., Padera, F. G., «Derivative Analysis of UV/VIS Spectra», *Amer. Lab.*, 12 (4), 101, 102, 104, 106, 109, 110, 112, (1980).
18. Levillain, P., Fompeydie, D., «Spectrophotométrie Dérivée : Intéret, Limites et Applications», *Analisis*, 14 (1), 1-20, (1986).
19. Morrey, J. R., «On Determining Spectral Peak Positions From Composite Spectra with a Digital Computer», *Anal. Chem.*, 40 (6), 905-914, (1968).
20. Wahbi, A. M., Ebel, S., «The Use of the First-Derivative Curves of Absorption Spectra in Quantitative Analysis», *Anal. Chim. Acta*, 70, 57-63, (1974).

21. Martin, A. E., «Multiple Differentiation as a Means of Band Sharpening», *Spectrochim. Acta*, 14 97-103, (1959).
22. Matthews, T. G., Hawthorne, A. R., Gammage, R. B., «Evaluation of a Second Derivative UV-Absorption Spectrometer (Duvas) for Analyzing Gases in Smoke Plumes», *Report 1982 ORNL/TM 8007; Order No. DE 82010335*
23. Hager, R. N., «Derivative Spectroscopy with Emphasis on Trace Gas Analysis», *Anal. Chem.*, 45 (13), 1131A-1138A, (1973).
24. Shibata, S., Furukawa, M., Nakashima, R., «Dual Wavelength Spectrophotometry Part VI. Determination of Phenol in Industrial Waste and Determination of 2,4-Dichlorophenol and 2, 4, 6-Trichlorophenol in Mixtures by First Derivative Spectra», *Anal. Chim. Acta*, 81, 206-210, (1976).
25. Davidson, A. G., «Effects of Temperature Variation on the Zeroth, Second and Fourth Derivative UV-Absorption Spectra of Benzenoid Drugs», *Analyst*, 108 (1287), 728-732, (1983).
26. Corti, P., Lencioni, E., Sciarra, G. F., «Use of Derivative Resolution for the Spectrophotometric Determination of Drug Mixtures III. Second Derivative Determination of Binary Mixtures of Estrogens and Progestins», *Boll. Chim. Farm.*, 12 2(6), 281-288, (1983).
27. Mazzeo, P., Quaglia, M. G., Segnalini, F., «Determination of Salicylic Acid in Acetylsalicylic Acid by Second Derivative UV-Spectrophotometry», *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 470-472, (1982).
28. Kitamura, K., Majima, R., «Determination of Salicylic Acid in Aspirin Powder by Second Derivative Ultraviolet Spectrometry», *Anal. Chem.*, 55 (1), 54-56, (1983).
29. Martínez, D., Gimenez, P., «Determination of Benzodiazepines by Derivative Spectroscopy», *J. Anal. Toxicol.*, 5, 10-13, (1981).
30. Fell, A. F., Scott, H P., Gill, R., Moffat, A. C., «The Analysis of Diphenhydramine Hydrochloride by Computeraided Multichannel UV-Spectrophotometry», *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 99P, (1982).
31. Lou, Y., Wang, Y., Wang, M., Chen, D., Lin, J., Xu, S., Hong, D., «Determination of Nicotinic Acid in Nine Multivitamin Pills by Second Derivative UV-Spectrophotometry», *Yaowu Fenxi Zazhi*, 3 (3), 137-141, (1983). Ref. : Chem. Abstr., 99, 146172y, (1983).
32. Jones, R., Marnham, G., «The Assay of Procyclidine in Tablets and Injections by Derivative Spectrometry», *J. Pharm. Pharmacol.*, 33 (7), 458-459, (1981).
33. Haines-Nutt, R. F., Adams, P., «Stability of Oral Vitamin K. A Comparison of an HPLC and Derivative Spectrophotometric

- Method», *Anal. Proc.*, 21 (7), 241-243, (1984).
34. Davidson, A. G., Elsheikh, H., «Assay of Ephedrin and Pseudoephedrin in Pharmaceutical Preparations by Second and Fourth Derivative UV-Spectrophotometry», *Analyst*, 107 (1277), 879-884, (1982).
 35. Demchenko, P., Sandrovskii, A. K., Korobkov, M. E., «Derivative Spectrophotometry of Aromatic Amino Acids and Proteins», *Mol. Biol. (Kiev)*, 20, 3-12, (1978). Ref. : Chem. Abstr., 89, 142780r, 1979.
 36. Woodrow, J., Spear, K., «The Use of Derivative Spectrophotometry for the Rapid Measurement of Substrate and Product Concentration in Fermentation», *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 19 (3), 177-180, (1984).
 37. Sanderink, G. J. C., Van Rijn, H. J. M., «Quantitative Measurement of Plasma Hemoglobin by Second Derivative Spectrophotometry», *Clin. Chim. Acta.*, 146 (1), 65-73, (1985).
 38. Bertrand, A., Cox, C., Foucart, P., Buret, J. «Determination of Serum Methemalbumine by Second - Derivative Spectroscopy», *Clin. Chim. Acta.*, 123 (1-2), 121-6, (1982).
 39. Kullmann, K., Endres, W., Kirzinger, S., Schmidt, H. C., «Direct Determination of Phenylalanine in Serum by Derivative Spectrometry», *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20 (4), 181-3, (1982).
 40. Amazon, K., Soloni, R., Rywlia, A., «Seperation of Bilirubin from Hemoglobin by Recording Derivative Spectrophotometry», *Am. J. Clin. Path.*, 75 (4), 519-523, (1981).
 41. Parks, J., Worth, H. G., «Carboxyhemoglobin Determination by Second Derivative Spectroscopy», *Clin. Chem.*, 31 (2), 279-81, (1985).
 2. Nagashima, K., Suzuki, S., «The Determination of Urea by Using an Enzyme Reactor and Second-Derivative Spectrophotometry», *Anal. Chim. Acta.*, 151, 13-18, (1983).