

Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

(Floresans, Fosforesans, Kemilüminesans)

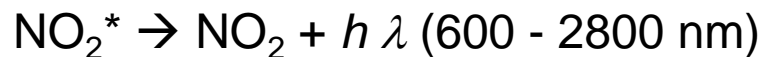
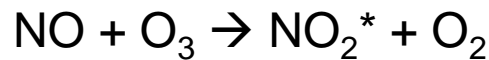


Çalışma ilkesi: Bu yöntemlerin her birinde, analit molekülleri, emisyon (**floresans, fosforesans ve kemilüminesans**) spektrumları kalitatif veya kantitatif bilgiler sağlayacak şekilde uyarılır.

Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Bunun bir sonucu olarak, bu iki olay, sıklıkla daha genel bir terim olan fotolüminesans ile ifade edilir. Sonradan görüleceği gibi, floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılır. Bunun bir sonucu olarak, floresans hemen yok olan ($<10^{-5}$ s) bir lüminesans olup, kısa ömürlüdür. Buna karşılık fosforesans emisyonları ile ilişkili elektron spinindeki bir değişme, ışınlamanın bitmesinden sonra kolayca tespit edilebilir bir süre kadar, genellikle birkaç saniye veya daha uzun, ışınlamanın sürmesine sebep olur. **Bir çok durumda, floresans veya fosforesans olarak foto lüminesans emisyonu, onu uyarmak için kullanılan ışınlamanınkinden daha uzun dalga boyundadır.**

Lüminesansın üçüncü tipi olan **kemilüminesans**, bir **kimyasal reaksiyon sonucu oluşan** uyarılmış bir türün emisyon spektrumuna dayanır. Bazı durumlarda, uyarılmış tür, analit ve uygun bir reaktif (ozon veya hidrojen peroksit gibi kuvvetli bir yükseltgen) arasındaki bir reaksiyonun ürünüdür. Bu durumda sonuç, analitin kendisinden çok, analitin veya reaktifin yükseltgenme ürününün karakteristik bir spektrumudur. Diğer durumlarda, analit kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz.

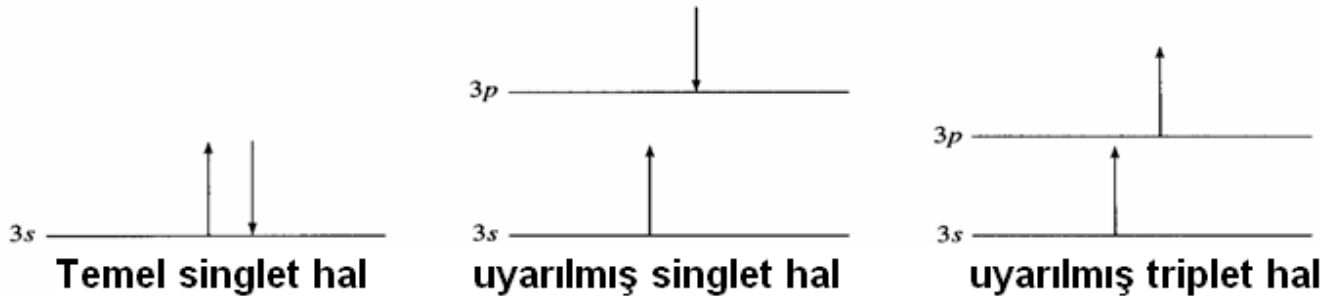
Fotolüminesans veya kemilüminesansın şiddetinin ölçümü, eser miktarlardaki önemli bazı inorganik veya organik türün kantitatif tayinini mümkün kılar. Günümüzde, florimetrik yöntemlerin sayısı, fosforesans ve kemilüminesans yöntemlerinin uygulamalarının sayısından önemli ölçüde daha fazladır.



Singlet/ Triplet uyarılmış Haller

Bütün elektron spinlerinin eşleşmiş olduğu bir moleküler **elektronik hal**; bir **singlet hal** olarak adlandırılır ve molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde hiçbir yarıлма meydana gelmez. **Diğer taraftan, bir serbest radikal için temel hal bir dublet halidir.** Çünkü, tek elektronun bir manyetik alan içinde, sisteme çok az farklı enerjilerde katkı yapan iki yönlenmeye sahip olduğu kabul edilebilir.

Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarılırsa ya bir singlet ya da bir **triplet** hal meydana gelir. Uyarılmış singlet halde, uyarılmış elektronun spini hala temel haldeki elektron ile eşleşmiş durumda, bununla beraber, triplet halde, iki elektronun spinleri eşleşmemiş durumda ve



Seçim Kuralları

S ↔ S

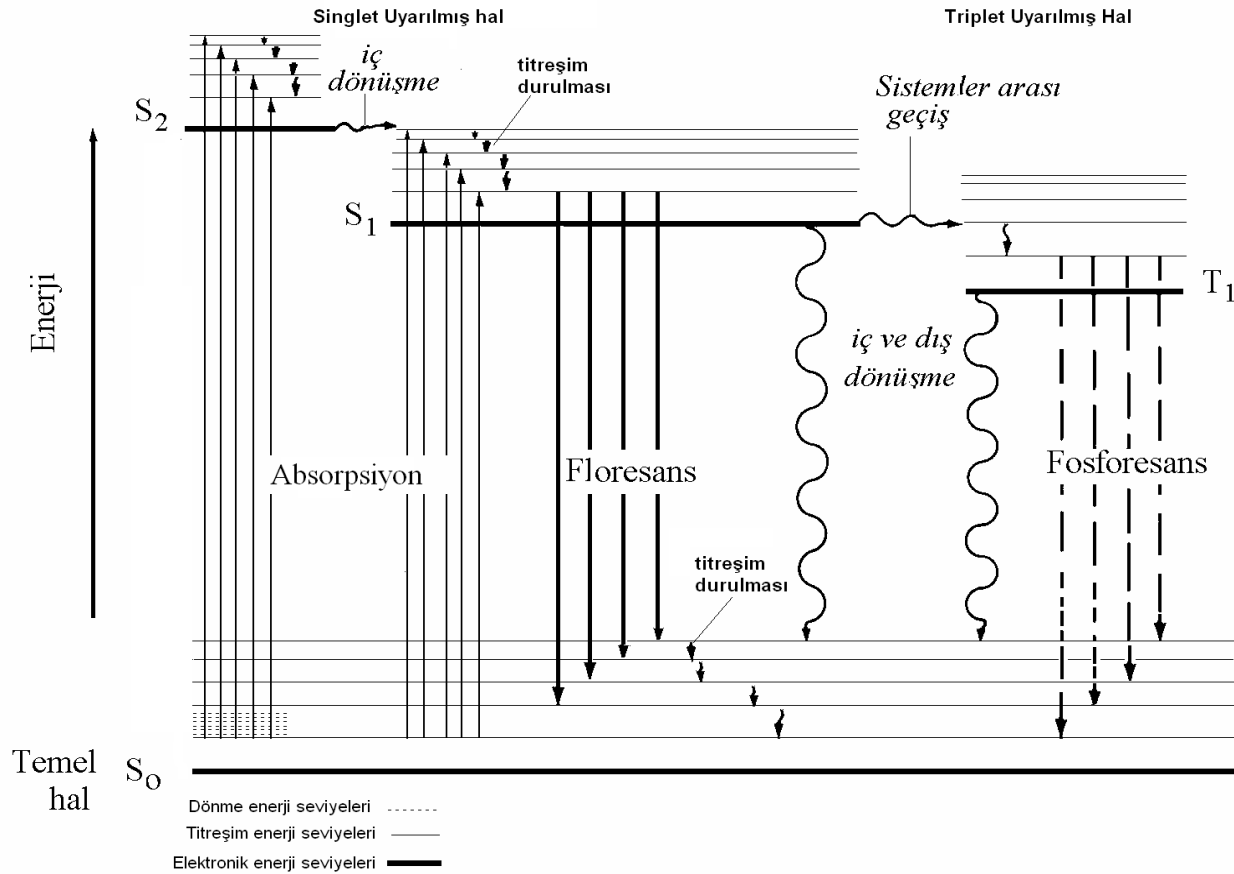
T ↔ T

S ↔ / T



Uyarılmış triplet haldeki bir molekülün özellikleri, uyarılmış singlet halindeki önemli derecede farklıdır. 1. Örneğin, bir molekül triplet halde paramanyetik iken, singlet halde diamanyetikdir. **2.** Bununla beraber, daha da önemlisi, elektronun halindeki bir değişmeyi de kapsayan, singlet triplet geçişinin, karşı gelen, singlet singlet geçişine göre önemli derecede daha az mümkün olması gerçektir.

Bunun sonucu olarak uyarılmış triplet halinin ortalama ömrü 10^{-4} s den birkaç saniyeye kadar uzayabilir. Bir uyarılmış singlet halin ortalama ömrü ise 10^{-5} 10^{-8} s kadardır. Ayrıca, temel haldeki bir molekülün ışınla, bir uyarılmış triplet hale uyarılması, düşük olasılığa sahiptir ve bu işlem sonucu oluşan absorpsiyon piklerinin şiddeti, benzer şekilde singlet-singlet geçişine karşı gelenlerinkinden bir kaç kat ondalık mertebesi daha düşüktür. Bazı moleküllerin, bir uyarılmış singlet halinden bir uyarılmış triplet hale geçebilmesine **sistemlerarası geçiş**, uyarılmış triplet halden temel singlet hale geçmesiyle yayılan ışığa **fosforesans** denir.



Bir fotoluminesans molekülünün kısmi bir enerji seviyesi diyagramıdır. En alttaki koyu yatay çizgi, normal olarak singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermekte olup, S₀ ile gösterilmiştir. Oda sıcaklığında, bu hal, bir çözeltideki moleküllerin hemen hemen tamamının enerjisini gösterir. En üstteki koyu çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki iki çizgi, birinci (S₁) ve ikinci (S₂) elektronik singlet hallerini gösterir. Sağdaki tek çizgi (T₁) birinci elektronik triplet halinin enerjisini gösterir.

Daha ince yatay çizgilerle gösterilen çok sayıdaki titreşim enerji seviyesi, dört elektronik halin her biri ile ilişkilidir. Bu molekülün uyarılması, biri uzun dalga boyunda ($S_0 \rightarrow S_1$) ve ikincisi de daha kısa dalga boyu ($S_0 \rightarrow S_2$) civarında merkezlenmiş iki ışın bandın absorpsiyonu ile meydana gelebilir. Uyarılma işleminin, molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden herhangi birine dönüşü ile sonuçlandığına dikkat ediniz. Triplet hale doğrudan uyarılma da gösterilmemiştir. Çünkü bu işlem, multiplisitede bir değişmeyi gerektirir ve önceden de bahsedildiği gibi bu geçişin olma olasılığı düşüktür bu tip düşük olasılıkla bir geçişe ***yasaklanmış*** denir.



FLORESANS Ve FOSFORESANS

Uyarılmış singlet bir sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **floresans** denir. Floresans basit veya karmaşık gaz, sıvı ve katı kimyasal sistemlerde meydana gelir. Floresansın en basit tipi, seyreltik atomik buharların gösterdiği floresanstır. Örneğin, buhar halindeki sodyum atomlarının 3s elektronları, 589,6 ve 589 nm lik dalga boylarındaki ışınların absorpsiyonu ile 3p enerji seviyesine uyarılabilir. 10^{-5} - 10^{-8} s sonra, elektronlar temel duruma geri döner ve her yöne doğru, aynı iki dalga boyunda ışın yayar. Frekansta değişiklik olmaksızın absorplanan ışının yeniden yayılmasını kapsayan floresansın bu tipi *rezonans ışınması* veya *rezonans floresansı* olarak bilinir.

Birçok moleküler tür, rezonans floresansı gösterir. Bununla beraber çok sık olarak, moleküler floresans veya fosforesans bantları rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarında merkezlenmiş olarak bulunur. Bu uzun dalga boylarına veya düşük enerjilere kayma **stokes kayması** olarak ifade edilir.



Uyarılmış elektronik halin enerji kaybetmesi, **fosforesans** yoluyla da olabilir. Triplet bir halde sistemler arası geçişten sonra, iç veya dış dönüşüm veya fosforesans ile biraz daha sönüm olabilir. Bir triplet → singlet geçişi singlet→singlet dönüşümüne göre çok daha az mümkündür; bu nedenle, uyarılmış triplet halin ortalama ömrü, emisyonla göre 10^{-4} s'den 10s' ye veya daha fazla süreye kadar olabilir. Böylece, böyle bir geçişten kaynaklanan emisyon, ışınlanma kesildikten sonra biraz daha sürebilir.

Elektron Spini

Pauli dışarlama prensibi, bir atomdaki iki elektron için dört kuantum sayısının hepsinin birden aynı olamayacağını belirtir. Bu sınırlama, bir orbitalde iki elektrondan daha fazla elektron bulunmamasını ve ayrıca iki elektronun da zıt spinli olmasını gerektirir. Bu şartlar altında, spinler eşleşmiştir. **Spin eşleşmesi sebebiyle, moleküllerin çoğu net manyetik alan göstermez ve bu yüzden *diamanyetik* olarak adlandırılır.** Yani bunlar, durgun manyetik alan tarafından ne çekilir ne de itilirler. Buna karşılık, **eşleşmemiş elektronlar içeren serbest radikallerin bir manyetik momenti vardır ve bunun sonucu olarak bir manyetik alan tarafından çekilir. Bu yüzden serbest radikaller *paramanyetik* olarak adlandırılır.**

○ **Absorpsiyon ve Emisyon Hızları**

- Bir ışın fotonunun absorplanma hızı çok büyüktür. Bu işlem 10^{-14} - 10^{-15} s mertebesinde tamamlanır. Diğer taraftan, floresans emisyonu önemli derecede daha yavaş hızda oluşur.
- Uyarılmış bir molekül temel haline birkaç mekanik basamağın bir birleşimi yoluyla dönebilir. Şekil de düz düşey okların gösterdiği gibi, 'bu basamakların ikisi, bir ışın fotonunun yayımını içeren floresans ve fosforesanstır. Dalgalı oklarla gösterilen diğer sönüm basamakları ışımasız olaylardır. Temel hale geçişte en tercih edilen yol, uyarılmış halin ömrünü en az yapan yoldur. Bu yüzden, ışımasız geçişlere göre floresans ile sönüm hızlı ise, bir emisyon gözlenir. Diğer taraftan, eğer bir ışımasız yol daha büyük hız sabitine sahipse, floresans ya yoktur ya da çok düşük şiddettedir.



Titreşimsel Durulma

Şekilde görüldüğü gibi, elektronik uyarılma sırasında bir molekül birçok titreşim seviyesinden herhangi birine uyarılabilir. Bununla beraber, çözeltide, aşırı titreşim enerjisi, uyarılmış türlerin molekülleri ile çözücü molekülleri arasındaki çarpışmalar sonucu hemen kaybedilir; sonuç, bir enerji aktarımı ve çözücü sıcaklığındaki çok az bir artıştır. *Titreşim* enerji seviyeleri bakımından uyarılmış bir molekülün ortalama ömrü 10^{-12} s veya daha az olup, bu süre *elektronik* olarak uyarılmış bir halin ortalama ömründen önemli derecede daha kısa olduğundan, durulma işlemi çok etkilidir. Bununla beraber, elektron, *temel halin titreşim seviyelerinden herhangi birine* dönebileceği için, birbirine yakın birçok pik oluşur. Daha sonra, daha fazla titreşimsel durulma ile elektron, hızla temel elektronik halin en düşük titreşim seviyesine dönecektir.



○ İç Dönüşüm

- *İç dönüşüm* terimi, bir molekülün, ışın yaymadan daha düşük bir *elektronik* enerji seviyesine geçmesi ile ilgili molekül içi olayları ifade eder. Bu olaylar, ne tam olarak tanımlanmış ne de tam olarak anlaşılmıştır; fakat bağıl olarak çok az bileşiğin floresans göstermesi bunların genellikle çok etkili olduklarının açık göstergesidir.

○ Dış Dönüşüm

- Uyarılmış bir elektronik halin sönmelenmesi, uyarılmış molekül ve çözücü veya diğer çözünenler arasındaki etkileşimi ve enerji aktarılmasını içerebilir. Bu olaylara topluca *dış dönüşüm* veya *çarpışma ile sönm* denir. Dış dönüşüm için delil, çözücünün floresans şiddeti üzerindeki, kuvvetli etkisini içerir; ayrıca tanecilikler arasındaki çarpışma sayısını azaltan koşullar (düşük sıcaklık ve yüksek viskozite) genellikle floresansı azaltır.
- Dış ve iç dönüşümler, fosforesans ile o kadar başarılı bir, şekilde rekabet ederler ki, normal olarak bu tür emisyon", sadece düşük sıcaklıklarda; çok viskoz ortamlarda veya katı yüzeyle absorplanmış moleküllerde gözlenir.

○ Sistemler Arası Geçiş

- Sistemler arası, geçiş, uyarılmış bir elektronun spininin ters döndüğü bir olaydır ve molekülün multiplisitesinde bir değişme olur.
- iç dönüşümde olduğu gibi, eğer iki halin titreşim seviyeleri, örtüşürse/bu geçişin olasılığı artar. Şekil de gösterilen singlet/triplet geçişi buna bir örnektir; burada, en düşük singlet titreşim seviyesi, daha yüksek triplet titreşim seviyelerinin biri ile örtüşmektedir ve böylece spin halinde bir değişme daha muhtemeldir. Sistemler arası geçiş, iyot veya brom gibi ağır atomları içeren moleküllerde çok yaygındır.



Floresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler

Bir maddenin lüminesans yapısı yapmayacağına, hem moleküler yapı hem de kimyasal çevre etki eder; lüminesans olurken bu faktörler, emisyon şiddetini de belirler.

Kuantum Verimi

Floresans veya fosforesans için *kuantum verimi veya kuantum verimi oranı* basit olarak lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır. Floresein gibi oldukça floresans bir molekül için bazı şartlar altındaki kuantum verimi bire yaklaşıp. Önemli derecede, floresans yapmayan kimyasal türler sifira yakın verimlere sahiptir.

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_s + k_{dd} + k_{id} + k_{öa} + k_a}$$

k_f = floresans	bağıl hız sabiti
k_s = sistemler arası geçiş	“ “
k_{dd} = dış dönüşüm	“ “
k_{id} = iç dönüşüm	“ “
$k_{öa}$ = ön ayrışma	“ “
k_a = ayrışma	“ “

Floresansta 250 nm'den daha küçük dalga boylarındaki ultraviyole ışınların absorpsiyonun sonucu floresansın nadiren olduğunu bilmek önemlidir. Çünkü, bu tür ışımalar, önyayışma ve ayrışma ile uyarılmış halin sönümüne sebep olmaya yetecek kadar enerjilidir. Örneğin, 200 nm'lik bir ışın yaklaşık 140 kcal/mol'e karşılık gelir; birçok organik molekül bu büyüklükteki enerjiler ile kopartılabilecek bazı bağlara sahiptir. Sonuç olarak, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi sebebiyle olan floresans nadiren gözlenir; bunun yerine, böyle emisyon, daha az enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri ile sınırlıdır.

○ **Kuantum Verimi ve Geçiş Tipi**

- Floresansın en düşük enerjili geçişi $\pi \rightarrow \pi^*$ tipi olan bileşiklerde, en düşük enerjili geçişi $n \rightarrow \pi^*$ tipi olan bileşiklerden daha fazla olduğu gözlenmiştir; yani, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi için kuantum verimi daha büyüktür. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi ile ilgili olan daha büyük kuantum verimi iki yolla gerçekleşebilir. Birincisi, bir $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişin molar absorpsiyon katsayısının normal olarak bir $n \rightarrow \pi^*$ geçişininkinden 100 ile 1000 kat daha büyük olmasıdır. Bu büyüklük her iki yöndeki geçiş olasılığının bir ölçüsünü gösterir. Böylece, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi ile ilgili ömür daha kısa (bir $n \rightarrow \pi^*$ geçişi için olan $10^{-5} - 10^{-7}$ s ile karşılaştırıldığında $10^{-7} - 10^{-9}$ s kadar) ve Eşitlik deki k_f daha büyüktür.

○ **Floresans ve Yapı**

- En şiddetli ve en faydalı floresans, düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerde görülür. Alifatik ve alisiklik karbonil gruplarının veya fazla sayıda konjüge çift bağlı yapıları içeren bileşikler de floresans gösterebilir, ancak bunların sayısı aromatik sistemlerin sayısı ile karşılaştırıldığında daha azdır.

○ **Derişim etkisi**

- Floresans şiddeti F , düşük derişimlerde derişim ile orantılıdır.

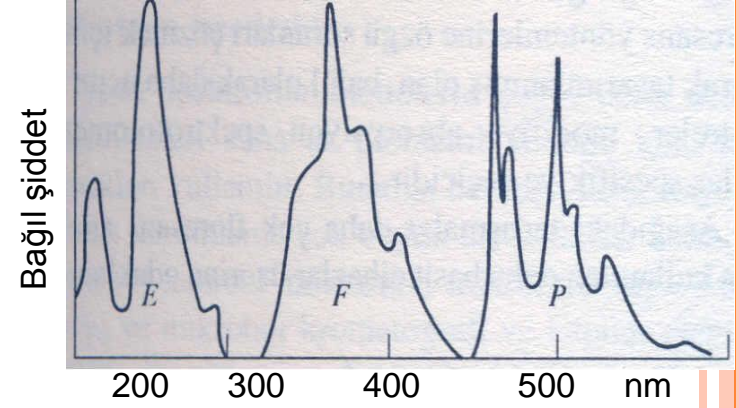
○ $F = KC$

- Yüksek derişimlerde kendi kendine sönüm ve kendi kendine absorpsiyon nedeniyle negatif sapma gösterir.



Bir uyarma spektrumu, uyarma dalgalıboyu değiştirilirken, sabit dalgalıboyunda lüminesansın ölçülmesiyle elde edilir. (aynı şartlarda elde edilen absorpsiyon spektrumu ile aynıdır). Floresans ve fosforesans spektrumları dalgalıboyunun bir fonksiyonu olarak emisyon şiddeti kaydedilirken sabit dalgalıboyunda uyarılmayı kapsar.

Fotolüminesans genellikle uyarma dalgalıboyundan daha uzun dalgalıboylarında olur. Ayrıca fosforesans bantları floresans bantlarından daha uzun dalgalıboylarında olur. Çünkü triplet uyarılmış enerji seviyesi genelde singlet uyarılmış enerji seviyesinden daha düşük enerjilidir.

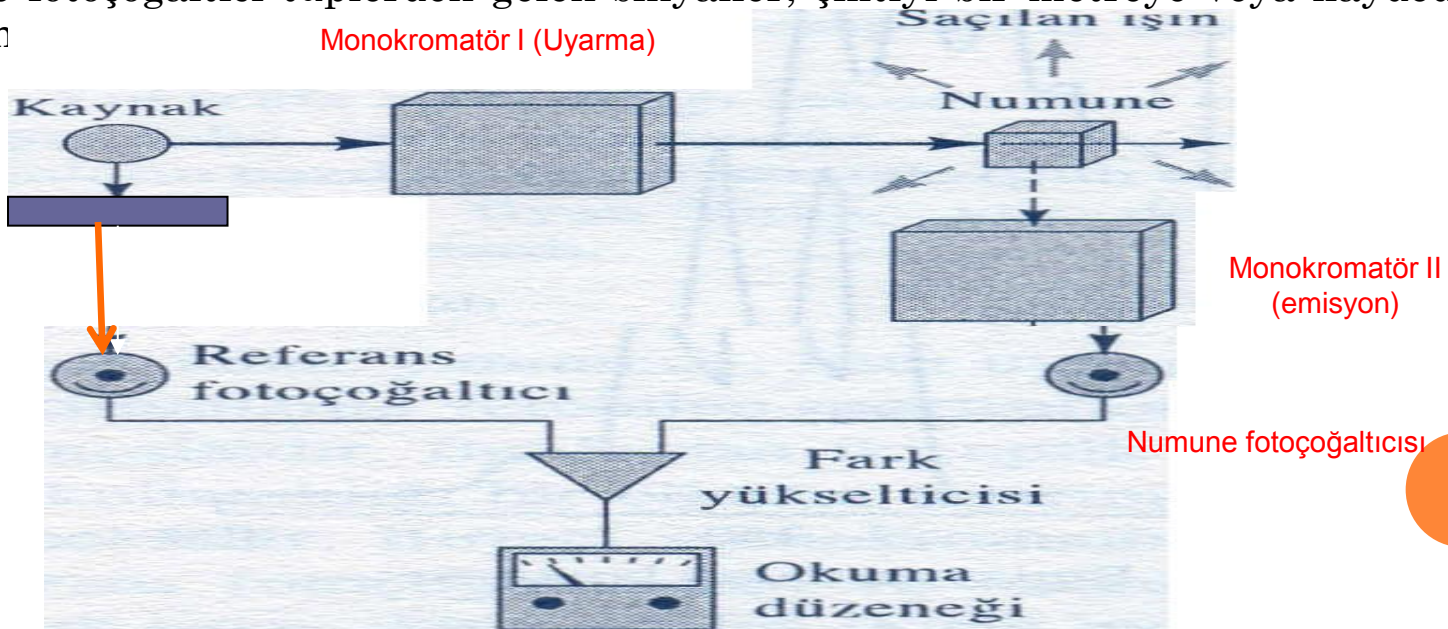


Fenantren için spektrumları:
E, uyarma;
F, floresans;
P, fosforesans



FLORESANS VE FOSFORESANS ÖLÇÜMÜ İÇİN CİHAZLAR

Fotolüminesans ölçülmesi için kullanılan cihazların çeşitli bileşenleri, ultraviyole görünür bölge fotometreleri veya spektrofotometrelerinde bulunanlarla benzerdir. Şekilde *florimetreler* ve *spektroflorometrelerdeki* bu bileşenlerin tipik bir dizilişi görülmektedir. **Hemen hemen bütün floresans cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaları dengelemek (etkisini gidermek) için çift-ışınlı optik sistem kullanılır.** Kaynaktan gelen ışın, önce floresans uyuracak ışınları geçiren fakat floresans emisyonunun dalga boyundaki ışınları dışarıda tutan veya sınırlayan bir uyarılma filtresinden veya bir monokromatörden geçer. Floresans numuneden bütün yönlerde doğru olur, fakat en uygun şekilde floresans uyarma ışınına dik açıdan gözlenir; diğer açılarda çözeltiden ve hücre duvarlarından oluşan saçılma, şiddet ölçümünde büyük hatalara sebep olabilir. Yayılan ışın, ölçme için floresansı ayıran ikinci bir filtreden veya monokromatörden geçtikten sonra bir dedektöre ulaşır. Referans ışın demeti ise, ışığın gücünü yaklaşık olarak floresans ışınlarına azaltan bir azaltıcıdan geçer (güç azaltılması ekseriya 100 kat veya daha fazladır). Referans ve numune fotoçogaltıcı tüplerden gelen sinyaller, çıktıyı bir metreye veya kaydedici ile gösteren



Işık Kaynakları;

Filtreli florometreler için en yaygın kullanılan kaynak, erimiş silika pencere, düşük basınçlı Civa buhar lambasıdır. Bu kaynak, 254, 302, 313, 546, 578, 691 ve 773 nm'deki uyarma floresansında faydalı çizgiler meydana getirir. Her bir çizgi, uygun absorpsiyon veya girişim filtreleri ile diğerlerinden ayrılabilir. Floresans yapan birçok bileşikte, floresans çeşitli dalga boylarıyla sağlanabildiğinden, cıvanın en azından bir çizgisi normal olarak bu iş için uygun olur.



○ **Filtreler ve Monokromatörler**

- Hem uyarma demetinin hem de oluşan floresans ışınının dalga boyunun seçilmesi için, florometrelerde girişim ve absorpsiyon filtrelerinin her ikisi de kullanılmıştır. Spektroflorometrelerin çoğu, en az bir ve bazen iki optik ağı monokromatör ile donatılmıştır.

○ **Dedektörler**

- Tipik lüminesans sinyali düşük şiddetlidir; ölçülebilmeleri için yükseltilmeleri gerekir. Duyarlı floresans cihazlarda fotoçogaltıcı tüpler en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Bunlar, genellikle, artırılmış sinyal/gürültü oranları elde etmek için foton sayım modunda çalıştırılırlar. Sinyal/gürültü oranlarını artırmak için bazen dedektörlerin soğutulması da gerekir.

○ **Hücreler ve Hücre Bölmeleri**

- Floresans ölçmeleri için cam veya silisden yapılmış hem silindirik hem de dikdörtgen prizması şeklindeki hücreler kullanılır.

- **Fosforesans ölçümünde florometrelere uyarma ile fosforesansın aralıklı olarak ölçülmesini sağlayacak düzenek eklenir. Fosforimetre ile florometre arasındaki fark budur.**



○ Analitik Uygulamaları

- Floresans ve fosforesans yöntemleri absorbanza dayalı spektrofotometrik ölçümlerden **daha düşük derişim aralıklarına uygulanabilir**. Yüksek duyarlık ışık kaynağının gücünü artırmak suretiyle sağlanabilir. **Ancak fotolüminesans yöntemlerinin kesinlik ve doğruluğu absorpsiyona dayalı spektrofotometrik yöntemlerden daha düşüktür**.
- Floresans oluşturan kompleks oluşturarak metal iyonlarının emisyonu ölçülebilir.
- Florometrik analizin organik ve biyokimyasal türlere çok sayıda uygulaması vardır. Florometrenin en önemli uygulamaları, gıda ürünleri, ilaç, klinik numuneler ve doğal ürünlerin analizidir.
- Fosforesans ve floresans yöntemleri birbirlerini tamamlama eğilimindedirler. çünkü, kuvvetli floresans yapan bileşikler zayıf fosforesans, kuvvetli fosforesans yapan bileşikler de zayıf floresans yaparlar. **Örneğın, bitişik halkalı aromatik hidrokarbonlar arasında, halojenler veya sülfür gibi daha ağır atomları içerenler, genellikle kuvvetli olarak fosforesans yaparlar; diğer taraftan, ağır atom içermeyen aynı tip bileşikler fosforesanstan daha çok floresans yapma eğilimindedir**.
- Fosforimetri, nükleik asitler, amino asitler; pirin ve pirimidin, enzimler, petrol hidrokarbonları ve pestisitler gibi maddeleri de kapsayan çok çeşitli organik ve biyokimyasal türlerin tayini için kullanılmıştır. **Bununla beraber, bu yöntem, florometri kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır**. Bunun sebebi, düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyulması ve fosforesans ölçmelerindeki daha zayıf kesinlik olabilir. Diğer taraftan, fosforesans işlemlerinin potansiyel olarak daha yüksek seçiciliği cezbedicidir.

- Gözlenebilme sınırı:

- Lüminesans yöntemlerinin en cezbedici özelliklerinden birisi, absorpsiyon spektroskopide karşılaşılan bir ile üç ondalık mertebesinden daha küçük gözlenebilme sınırları sağlayan kendilerine özgü duyarlılıklarıdır. **Pik gözlenebilme sınırları milyarda bir (ppb) mertebesindedir.** Fotolüminesans yöntemlerin diğer bir üstünlüğü, onların geniş doğrusal derişim aralığı olup, bu da genellikle absorpsiyon yöntemleriyle karşılaşılanlardan önemli derecede daha büyüktür. Yüksek duyarlılıkları sebebiyle, kantitatif lüminesans yöntemleri, sıklıkla numune matriksinden kaynaklanan ciddi girişim etkilerine maruz kalırlar. Bu sebepten dolayı, lüminesans ölçmeleri genellikle çok iyi kromatografik ve elektroforez ayırma teknikleri ile birlikte kullanılır. Floresans dedektörler, sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez için dedektör olarak, fevkalade duyarlılıkları sebebiyle, özellikle değerlidir.
- Genel olarak, lüminesans yöntemleri, kantitatif analizde absorpsiyon yöntemlerinden daha az uygulanır. Çünkü, ultraviyole/görünür ışını absorplayan türler, spektrumun bu bölgesinde ışının absorpsiyonu sonucu oluşan fotolüminesans gösterenlerden çok daha fazladır.

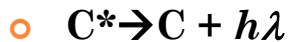
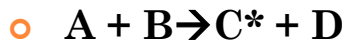


○ **KEMİLÜMINESANS**

- Kemilüminesansın analitik kimyaya uygulanması bağıl olarak son yıllarda gelişmiştir. Kemilüminesans oluşturan kimyasal reaksiyonların sayısı azdır ve bu yüzden işlem bağıl olarak az sayıdaki tür ile sınırlıdır. **Ancak, kemilüminesans vermek üzere reaksiyona giren bileşiklerin bazıları önemli bileşikleridir. Bu nedenle, yüksek seçicilik, basitlik ve yöntemin aşırı duyarlılığı onun kullanımının son yıllarda artmasına yol açmıştır.**

○ **Kemilüminesans Olayı**

- Bir kimyasal reaksiyon, temel haline dönerken, ışık yayan veya enerjisini daha sonra emisyon yapacak başka bir türe aktaran, elektronik olarak uyarılmış bir tür verdiği zaman kemilüminesans meydana gelir. **Kemilüminesans reaksiyonlarına çok sayıda biyolojik sistemde rastlanır ve bu olaya genellikle *biyolüminesans* adı verilir.** Biyolüminesans gösteren türler için örnekler, ateşböceği, deniz menekşesi ve bazı deniz anası bakteriler, tek hücreli hayvanlar ve kabuklu hayvanlardır. Çeşitli doğal biyolüminesans olaylarının kimyası tam olarak anlaşılamamıştır.



Kemilüminesans ölçmeleri için cihaz, oldukça basittir ve sadece uygun bir reaksiyon kabı ve bir fotoçoğaltıcı tüpten ibaret olabilir; **Genel olarak, tek ışın kaynağı, analit ile reaktif arasındaki kimyasal reaksiyon olduğundan, dalga boyu seçici cihazına gerek yoktur.**

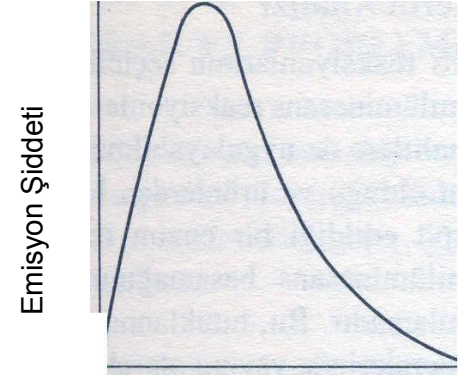
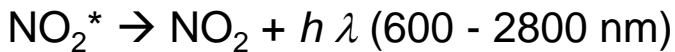
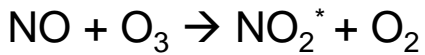
Zamanın bir fonksiyonu olarak, bir kemilüminesans deneyinden elde edilen tipik sinyal, reaktif ve analitin karıştırılması tamamlandığında, hızla en yüksek değere ulaşır; sonra sinyalin daha az veya daha çok üstel bozunması takip eder. Kantitatif analiz için genellikle sinyal sabit bir zaman periyodu için integre edilir ve aynı yolla işlem görmüş standartlar ile karşılaştırılır. Alternatif olarak, pik yükseklikleri de kullanılır. Sinyal ve derişim arasında geniş bir derişim aralığında genellikle doğrusal bir ilişki vardır.



Analitik Uygulamaları

Kemilüminesans yöntemleri genellikle yüksek duyarlılığa sahiptirler. çünkü gürültü yokluğunda düşük ışık seviyeleri bile kolayca izlenebilir. **Ayrıca, bir filtre veya monokromatör ile ışığın zayıflaması söz konusu değildir.** Gerçekte gözlenebilme sınırları genellikle dedektör duyarlılığı tarafından değil, reaktifin saflığı tarafından belirlenir. **Tipik gözlenebilme sınırları milyarda bir (bazen daha az) ile milyonda bir aralığındadır.**

Ozon, azot oksitler ve kükürt bileşikler gibi atmosferik kirleticilerin tayini için yüksek duyarlılık ihtiyacı sonucu, gaz bileşenlerinin tayini için kemilüminesans yöntemleri ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerin en yaygın kullanılanlarından biri, azot monoksit tayini için olmaktadır; reaksiyonlar şöyledir:



Zaman



Sıvı fazda analizlerde kemilüminesans gösteren organik maddeler yardımıyla inorganik türlerin analizi yapılır.

Kemilüminesans reaksiyonlarının seçiciliğini artırmak ve yöntemi kemilüminesans reaksiyonlarında doğrudan yer almayan analitlere de uygulayabilmek için, istenen analitin substrat olduğu ve ürünlerden birinin kemilüminesansla tespit edildiği bir enzim reaksiyonundan sonra bir kemilüminesans basamağının yürütülmesi yaygın bir uygulamadır.

