

SPEKTROSKOPİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK

ADÜTF Biyokimya AD

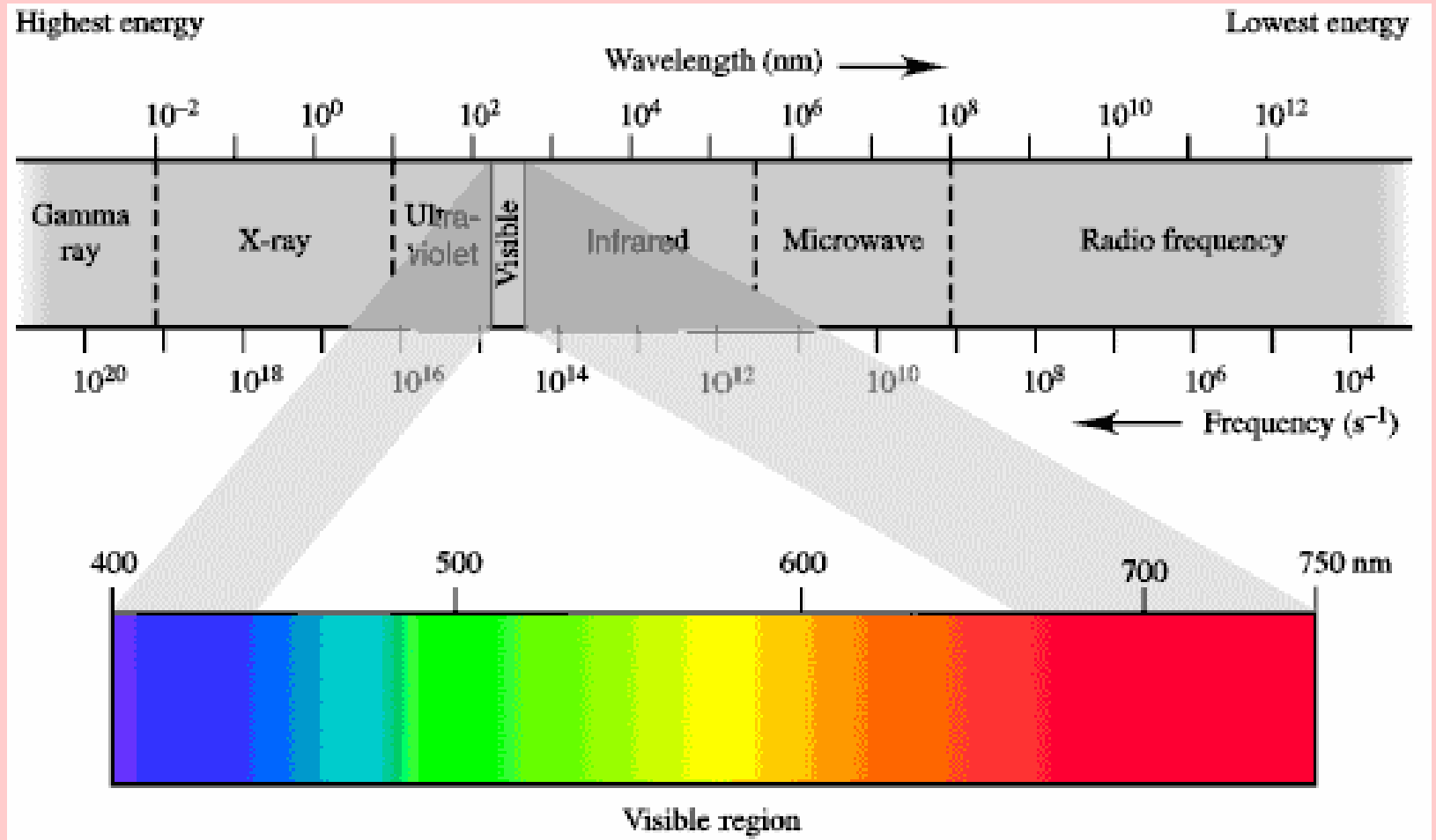
2004

Temel ilkeler

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır.



Elektromanyetik ışınma, uzayda çok büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışınmanın en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlarıdır.

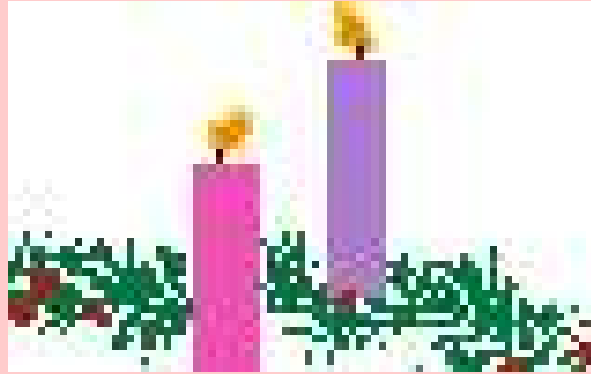


Elektromanyetik ışımaya, hem dalga hem tanecik özelliğine sahiptir. İnterferans (girişim) ve difraksiyon (kırınım) davranışları dalga özelliğiyle açıklanır. Bir metal yüzeyinden ışımaya ile elektronların koparılması (fotoelektrik olay), ışımaya enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olayları ışımaya tanecik özelliği (foton) ile açıklanır.



Elektromanyetik ışımada-Madde etkileşimleri:

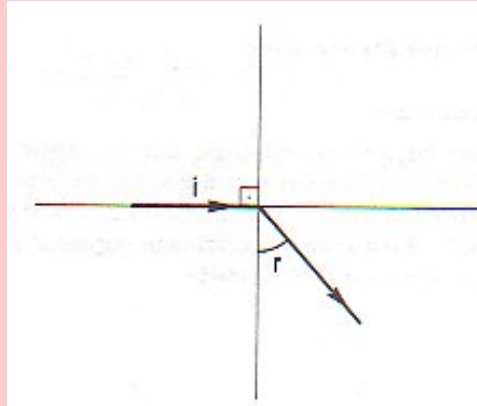
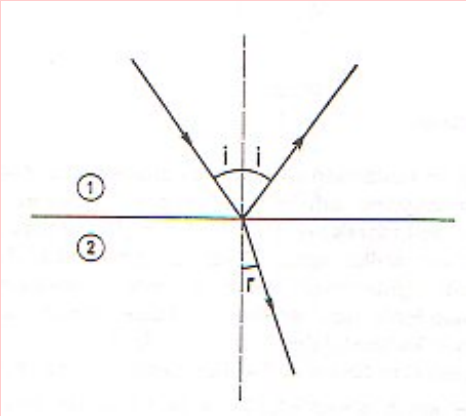
- Işımanın kırılması ve yansıması
- Işımanın saçılması
- Işımanın polarizasyonu
- Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu



Işımanın kırılması ve yansımaları:

Işıma bir ortamdan ikinci bir ortama geçtiğinde kısmen yansır, kısmen de ikinci ortama geçer. İkinci ortamda ilerleyen ışımamın frekansı değişmez, ilerleme yönü ve hızı değişir.

Işık demetinin bir ortamdan yoğunluğu farklı başka bir ortama geçerken yön değiştirmesine kırılma (refraksiyon) adı verilir.



Kritik açının ölçülmesiyle her madde için farklı **kırılma indisi** belirlenmiştir.

Kırılma indisi değerleri, maddelerin belirgin özelliklerinde biri olarak tanımlanmıştır. Kırılma indisinin ölçülmesine dayanan **refraktometri** yönteminde, maddelerin kırılma indisi değerleri, maddenin nitel analizinde, saflık derecesinin belirlenmesinde ve karışımların nicel analizinde kullanılmaktadır.

Kırılma indisi ölçümü yapan düzeneğe **refraktometre** adı verilir. Refraktometre, idrar dansitesi ölçümünde sıklıkla kullanılır.

Işımanın saçılması:

Fotonun örnekteki parçacıklara çarparak yön değiştirmesine saçılma adı verilir.



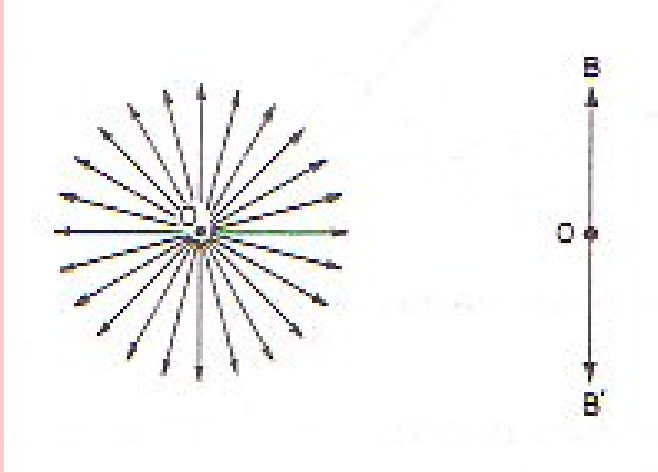
-Görünür bölge ışınması kullanıldığında, kolloidal ve bulanık çözeltilerde gözlenen saçılma, Tyndall saçılmasıdır.

-Çözünmüş moleküller veya çok atomlu iyonlardan saçılması Rayleigh saçılmasıdır.

-Parçacıklarla etkileşen dalga boyunun, ışığı saçan moleküllerin titreşim enerji düzeylerine göre değiştiği saçılma türü Raman saçılmasıdır.

Işımanın polarizasyonu:

Işık dalgası, genellikle her düzlemde ilerleyen dalgaların karışımıdır. Tek bir düzlemde ilerleyen ışık dalgasına düzlemsel polarize ışık denir.



Düzlemsel polarize ışık ile asimetric ve ışığı absorplamayan maddeler etkileştiği zaman, polarize ışığın düzlemi sağa (+) veya sola (-) açı değiştirir.

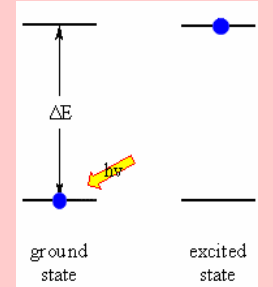
Işımanın absorpsiyonu ve emisyonu:

Kuantum kuramına göre atomlar, ancak elektron konfigürasyonuna ve dış elektronlarının belirli enerji düzeyleri arasındaki geçişlerine bağlı belirli potansiyel enerji düzeylerinde bulunabilirler. Elektronların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri ile ilgili **atomik spektrumlar** belirlenmiştir.

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

$h \rightarrow$ Plank sabiti ($6,63 \times 10^{-34}$)

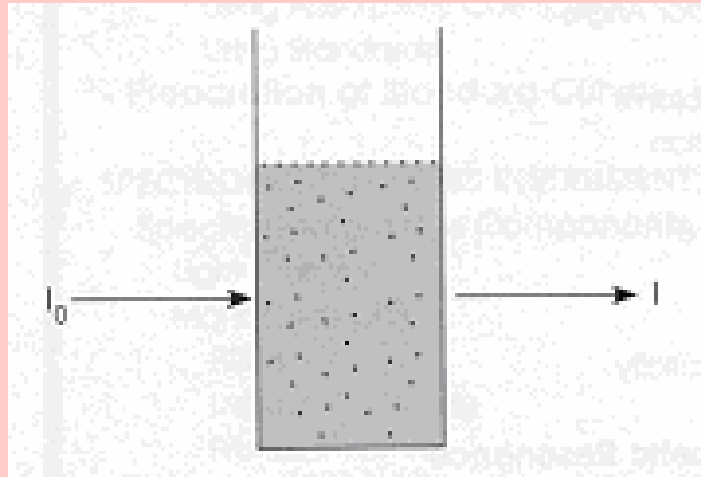
$\nu \rightarrow$ frekans



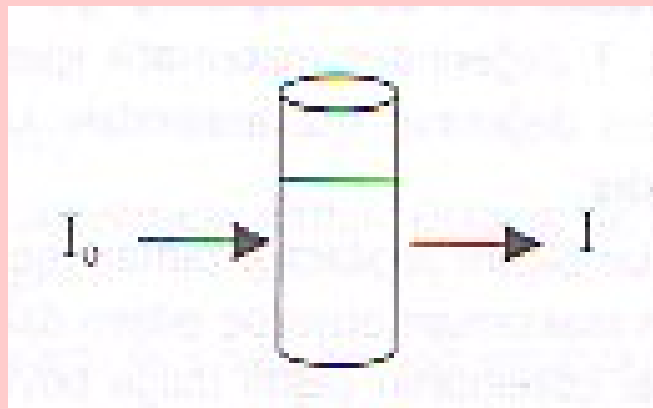
Elektromanyetik ışınmayı absorbe ederek en düşük enerji düzeyinden (temel düzey) uyarılmış düzeylere geçmiş olan atomlar, temel düzeye dönüş sırasında ultraviyole veya görünür bölge sınırları içinde ışınma enerjisi yayarlar (emisyon). Her atom için **emisyon spektrumu** da belirlenir.

Moleküller de atomlarda olduğu gibi uygun enerjideki fotonlarla etkileştiklerinde bu fotonları absorplayarak uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış moleküller, bu kararsız durumdan fazla enerjilerini yayarak kurtulurlar (moleküler emisyon). Atom spektrumlarından daha karmaşık olan moleküler spektrumlar da belirlenir.

Absorplanan fotonların sayısı, ortamdaki absorpsiyon yapan türlerin sayısı ile orantılıdır. Monokromatik ve I_0 şiddetinde ışıma, ortamı daha küçük olan I şiddetinde terk eder.



Lambert-Beer kanunu: Bir çözeltiliden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde katettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır.



Transmittans (T) = I/I_0

%Transmittans (%T) = 100 T

Absorbans (optik dansite, O.D.) = $-\log_{10} T$

Absorbans (A) = $\epsilon \cdot c \cdot l$

c → çözelti konsantrasyonu (mol/L)

l → ışığın çözelti içinde kattetiği yol (cm)

ϵ → molar absorpsiyon katsayısı (L/mol/cm)

Bir maddenin rengi, o maddeden gözümüze ulaşan görünür bölgedeki elektromanyetik ışınlardır. Bu ışınlar, saydam maddeler için maddenin içinden geçip gelen, saydam olmayanlar için ise yansıyan ışınlardır.



Madde tarafından tutulan ışınların rengi ile maddenin görünür rengini oluşturan ışınların rengi, tamamlayıcı renkler olarak adlandırılır:

Sarı-Mavi

Kırmızı-Yeşil

Maddelerin rengi, maddelerin tuttuğu ışının tamamlayıcısı olan ışının rengidir.

Işık λ (nm)	Absorbe edilen renk	Görünen renk
220-380	-	-
380-440	Menekşe	Sarı-yeşil
440-475	Mavi	Sarı
475-495	Yeşil-mavi	Portakal
495-505	Mavi-yeşil	Kırmızı
505-555	Yeşil	Mor
555-575	Sarı-yeşil	Menekşe
575-600	Sarı	Mavi
600-620	Portakal	Yeşil-mavi
620-700	Kırmızı	Mavi-yeşil



Çözelti içindeki madde miktarını çözeltinin renginden faydalanarak ölçme işlemine **kolorimetri**, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **kolorimetre** denir.

Kolorimetrik ölçümde, konsantrasyonu ölçülecek çözeltinin rengi değişik konsantrasyonlardaki standartların rengiyle karşılaştırılarak değerlendirilir.



Spektroskopik yöntemler

- Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi
- Floresans ve fosforesans spektroskopisi
- Atomik absorpsiyon spektroskopisi
- Atomik emisyon ve atomik floresans spektroskopisi
- İnfrared (IR) spektroskopisi
- Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi
- Kütle spektrometrisi



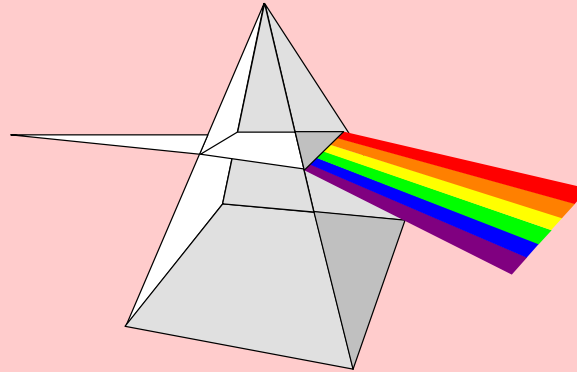
Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi

Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri**, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **fotometre** denir.

Fotometrik ölçümde, renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir.

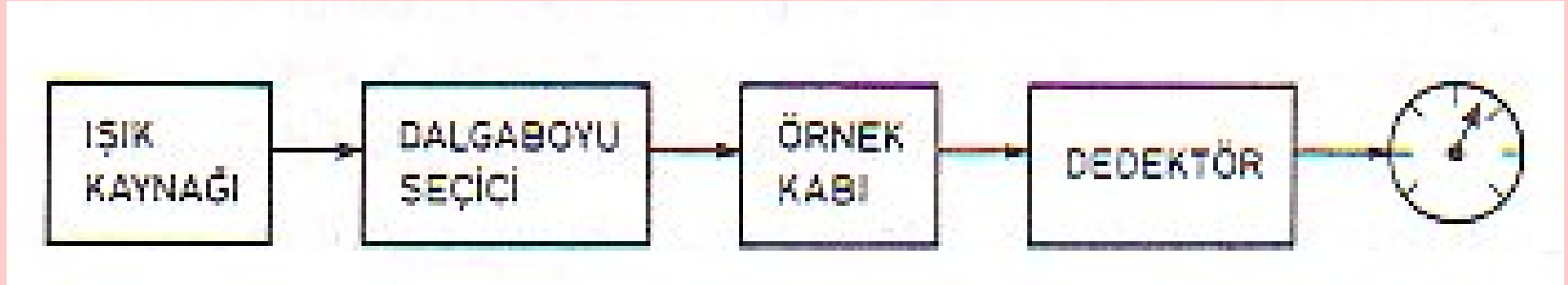


Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler **kolorimetre** veya **fotometre** olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler **spektrofotometre** olarak adlandırılırlar.

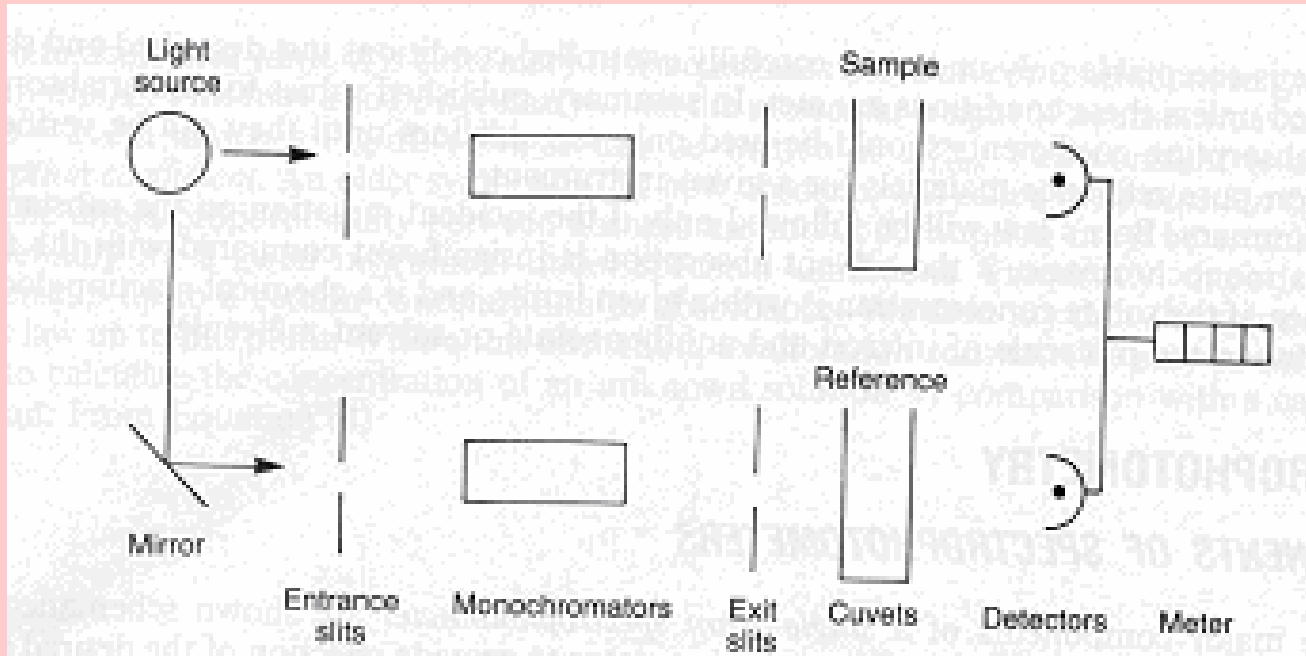


Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe **absorpsiyon spektrometresi** veya **absorpsiyon spektrofotometresi** adı verilir.

Bir spektrofotometre düzeneği, başlıca ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi (monokromatör), dedektörden oluşur; dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür.



Ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek, ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri, giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir.



UV-görünür bölgede D_2 , W, H_2 , Xe, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.



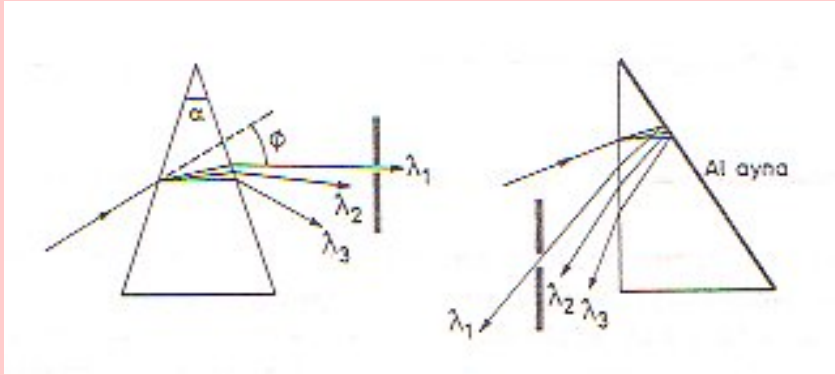
Tungsten flaman lambası, görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba ***tungsten-halojen lambası*** olarak adlandırılır.

Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, **hidrojen ve döteryum elektrikselsel boşalım lambalarıdır**. Bu lambalar 180-380 nm arasında ışık yayar. Daha pahalı ve daha uzun ömürlü olan D_2 lambasının yaydığı ışığın şiddeti H_2 lambasına göre çok daha fazladır.

Xe ark lambası, UV-görünür bölgenin tümünde (150-700 nm) kullanılabilir şiddetli ve sürekli ışık kaynağıdır.

Civa buhar lambası, her iki bölgede ışık yapabilen bir ışık kaynağıdır; sürekli spektruma ek olarak kesikli hatlar da içerir. 22

Dalga boyu seçicileri (monokromatörler), ışık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir.



Monokromatör, **filtreli fotometrelerde** ışık filtresidir; **spektrofotometrelerde** ise ışık prizmasıdır.

Örnek üzerine gönderilen ışığın daha monokromatik olmasını sağlamak için bazı spektrofotometrelerde çift monokromatör kullanılır.

Işık filtreleri, camdan yapılmış ve uygun boylarla boyanmış filtrelerdir. Portatif olup kullanıcı istediği zaman uygun dalga boyundaki filtreyi cihaza takar. Filtrelerin üzerinde geçirdikleri dalga boyu yazılıdır. Filtrenin rengi, ölçüm yapılacak çözeltinin rengine göre seçilir; örneğin, mavi ışığı tutan (sarı) bir maddenin ölçümünde sadece mavi ışığı geçiren filtre kullanılır.

Işık prizmaları, cam veya kuartz olabilir. Özellikle düşük UV ışınları iyi geçirmediğinden cam prizma görünür bölge için uygundur. Kuartz prizmalar ise hem UV ışınlarını iyi geçirir, hem de görünür ışık ve IR'e yakın bölgelerde çalışmaya elverişlidir. Kuartz prizmalar pahalı spektrofotometrelerde bulunur.

Spektrofotometrelerde dedektör, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzendir. UV-görünür bölgede kullanılabilen üç tür dedektör vardır.

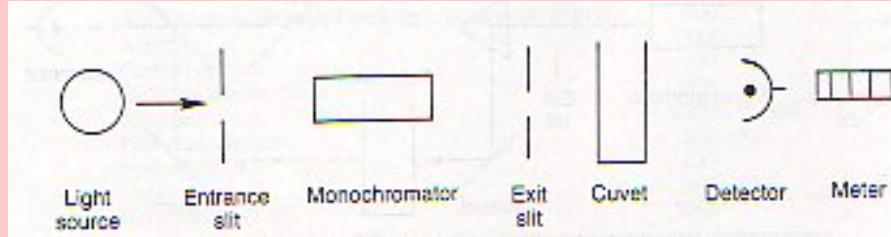
Fotovoltaik dedektörler

Fototüp

Fotoçoğaltıcı tüp



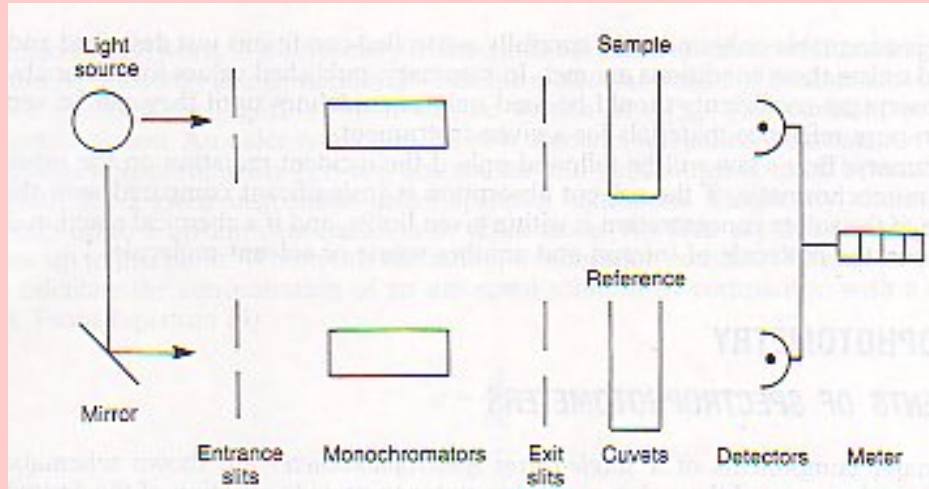
Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir.



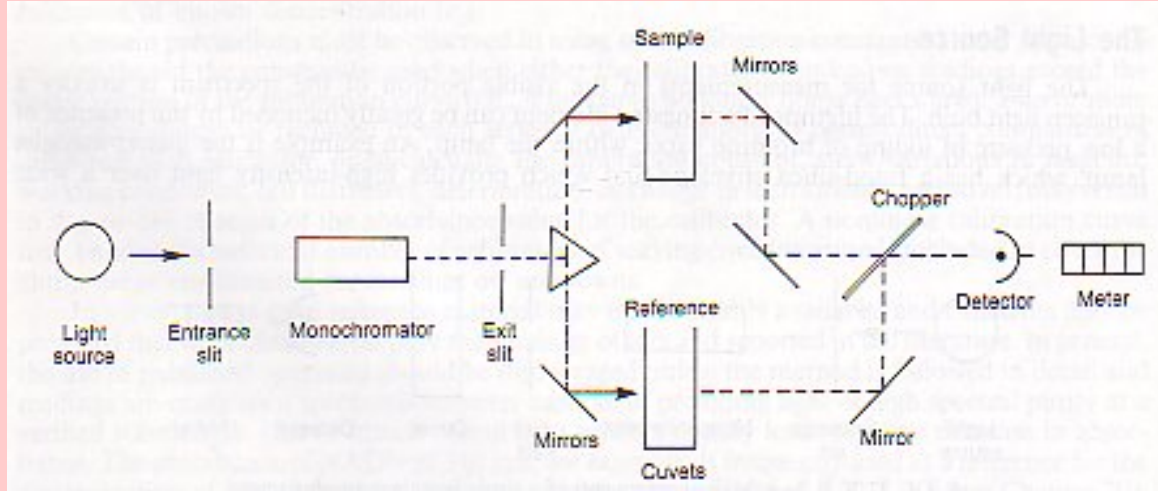
Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi vardır: Bunlardan biri, alette kullanılan optik ağı veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğmedir. İkinci düğme, ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre “sıfır” geçirgenlik ayarını yapmak içindir. Üçüncü düğme, ışığın geçtiği aralığın enini değiştirir.

Ölçümün yapılacağı dalga boyu birinci düğme ile ayarlandıktan sonra ışık yolu kapatılarak ikinci düğme ile “sıfır” ayarı yapılır. Daha sonra üçüncü düğme ile ışığın geçtiği aralığın eni değiştirilerek ve örnek kabında sadece çözücü kullanılarak galvanometre 100 değerine getirilir. Sıfır ve 100 ayarları her dalga boyunda yeniden yapılmalıdır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir.



Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür.

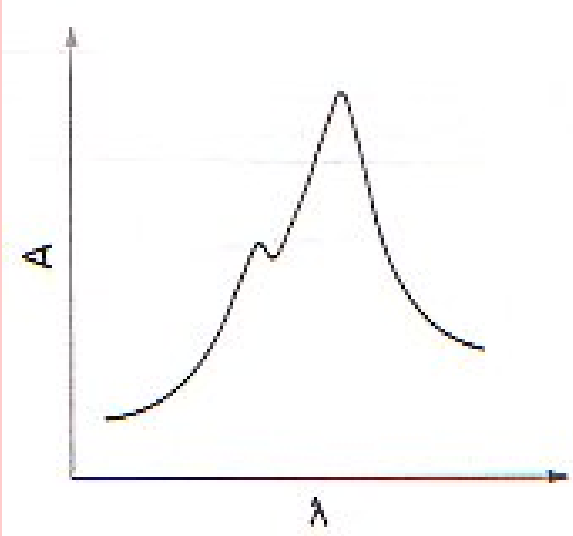


Örnekten ve çözücüden geçen ışık demetleri dedektör üzerine art arda gelir ve alternatif türden sinyal oluşturur. Işık şiddetleri eşit ise dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz; örnek bölmesinden gelen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir başka türü çift dalga boylu spektrofotometrelerdir. Çift dalga boylu spektrofotometrelerde iki farklı monokromatör vardır; iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle art arda etkileştirilir.

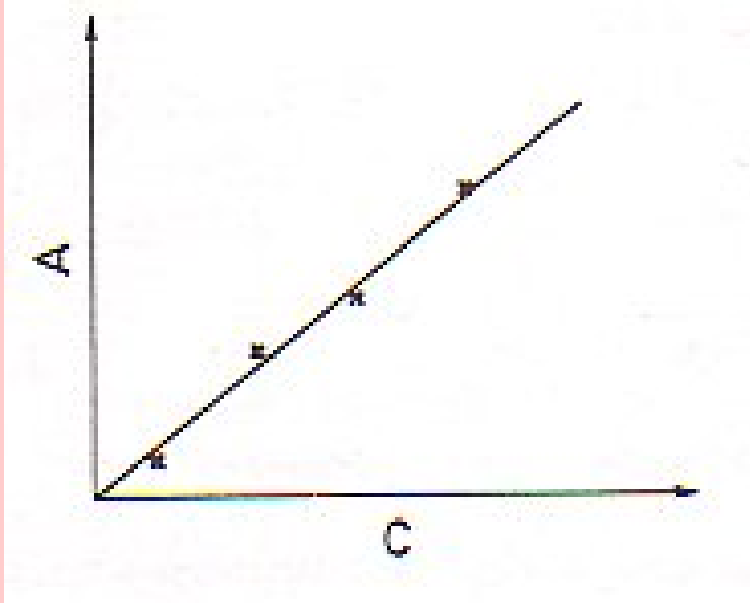
Bulanık çözeltilerde dalga boylarından biri çözeltideki maddenin absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkilidir.

Spektrofotometre ile bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyunu kararlaştırmak için, örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Bunun için, maddenin 1 molar çözeltisinin çeşitli dalga boylarındaki absorptans değerleri ölçülür.



Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorplamadığı, Lambert-Beer eşitliğine uyulduğu ve nicel analiz en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalga boyundaki absorptans (A) değerleri ölçülür. A değerleri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilir.

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



Nicel analiz, kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğu bölgede yapılır. Derişimi bilinmeyen örneğin A değeri ölçülür ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen derişim saptanır.

Molar absorpsiyon katsayısının değerinin bilindiği durumlarda, Lambert-Beer eşitliğinin analizde doğrudan kullanılması da mümkündür.

$$\text{Absorbans (A)} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Spektrofotometrelerde örneğin konulduğu örnek kapları (küvet), yuvarlak bir tüp veya dört köşe olabilir.

Küvetler, soft veya borosilikat camdan, kuartz veya plastikten yapılır.

Soft camlar asidik çözeltiler, borosilikat camlar kuvvetli alkali çözeltiler için uygundur. Corex gibi bazı camlar 340 nm'de kullanılabilse de kısa UV dalgalar için uygun değildir.

Kuartz küvetler hem UV hem görünür dalga boyları için uygundur.

Plastik küvetler özel üretilmiş ise 200-700 nm arasında rahatlıkla kullanılabilir.



Küvetlerin temizliği:

- Küvetler kullanıldıktan hemen sonra bol eşme suyu ve ardından distile sudan geçirilmelidir.
- Aşırı kirlenen veya koyu renkli reaktiflerin okunduğu küvetler yumuşak deterjanlı su, eşme suyu ve distile su ile yıkanmalıdır. Kesinlikle fırça kullanmamalıdır.
- Deterjanla temizlenemeyen küvetler, %20'lik nitrik asitte bir gece bekletildikten sonra, distile sudan geçirilip kullanılır.
- Küvet temizliğinde bikromat solüsyonu kullanılmamalıdır. %10'luk NaOH kullanılabilir; ancak küvetler bu çözeltide uzun süre kalmamalıdır.

Spektrofotometrik ölçümlerde kör, standart ve numune olmak üzere üç tüp hazırlanır.

Kör, cihazın optik ayarlarının (sıfır ve 100 ayarı) yapılması amacıyla kullanılan çözeltilerdir. Kör çözeltileri olarak distile su veya reaktifin kendisi kullanılır. Bazı ölçümlerde numune köru de kullanılabilir.

Distile su köru, en sık kullanılan kördür; okuma küvetine distile su konularak hazırlanır. Daima absorbans değerinin sıfırlanması için kullanılır.

Reaktif körü, deneyde kullanılan reaktif ile hazırlanan kördür. Deneyde birden fazla reaktif varsa birden fazla reaktif körü de olabilir. Bazen absorbans değerinin sıfırlanması için, bazen de distile su körüne karşı numune gibi kullanılır.

Numune körü, deneyde kullanılan reaktif/numune oranına uygun olarak distile su veya serum fizyolojik ile numune karıştırılarak hazırlanır. Daima distile su veya reaktif körüyle sıfırlanmış cihazda numune gibi okutulur.

Numune gibi okutulan reaktif veya numune körü değerleri numune değerinden çıkarılır.

Standart, aranan maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltisidir.

Numune, içindeki madde miktarını tayin etmek istediğimiz çözeltidir.

Fotometrik ölçümler, esas olarak iki tipte yapılır. Bunlar, end point ve kinetik okumadır.

End point okumada fotometrik okuma, reaksiyon tamamlandıktan sonra yapılır. Bunun için reaksiyon karışımını belli bir süre ve belli bir sıcaklıkta inkübe edilir. Reaksiyon tamamlanıp ürünlerin oluşumu ve dolayısıyla renk oluşumu tamamlandıktan sonra okuma yapılır.

$$A_{\text{ö}} = \varepsilon \cdot c_{\text{ö}} \cdot l$$

$$A_{\text{std}} = \varepsilon \cdot c_{\text{std}} \cdot l$$

$$c_{\text{ö}} = (A_{\text{ö}} / A_{\text{std}}) \cdot c_{\text{std}}$$

$$c_{\text{ö}} = (c_{\text{std}} / A_{\text{std}}) \cdot A_{\text{ö}}$$

$$c_{\text{ö}} = (\text{Faktör}) \cdot A_{\text{ö}}$$

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

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

Dakikadaki ortalama absorbands değişimi ($\Delta A/\text{dakika}$), deneyde ölçölen maddenin miktarı reaksiyon sırasında artıyorsa (+), azalıyorsa (-) bir sayıdır; hesaplamada mutlak değer alınır.

Eğer reaktifte deney şartlarında numune olmaksızın bir absorbands değişimi oluyorsa bunun tespit edilip numune için bulunan değerden çıkarılması gerekir. Ayrıca ΔA değerlerinin birbirinden çok farklı olması reaksiyonun lineer olmadığını gösterir.

Kinetik okumada sonuçlar, $\Delta A/\text{dakika}$ değerleri bir faktörle çarpılarak bulunur.

IU/L ($\mu\text{mol/dak/L}$) olarak enzim aktivitesi hesaplamasında kullanılan faktör (F):

$$F = \text{Total volüm} \times 10^6 / \epsilon \times \text{ışık yolu} \times \text{numune volümü}$$

Total volüm \rightarrow ml cinsinden deney tüpündeki toplam sıvı miktarı

$10^6 \rightarrow$ sonucu $\mu\text{mol/dak/L} = \text{IU/L}$ 'ye çevirme katsayısı

$\epsilon \rightarrow$ L/mol/cm cinsinden molar absorpsiyon katsayısı (ekstinsiyon katsayısı)

ışık yolu \rightarrow cm cinsinden okuma küvetinin çapı

Numune volümü \rightarrow ml cinsinden reaksiyona katılan numune hacmi

Tercih edilen spektrofotometrik ölçüm cihazının özellikleri:

- filtreli fotometre değil, spektrofotometre olmalı.
- Okuma aralığı 340-700 nm aralığını kapsamalıdır.
- Cihazın kuvvet okuma kısmı ısıtıcılı olmalıdır.
- Optik okuma için gerek duyduğu asgari reaksiyon hacmi küçük olmalıdır.
- Cihaz gerekli program bilgilerini hafızasında tutabilmelidir.
- Şebeke elektrik akımındaki dalgalanmaların zararlı etkilerinden korunmak için bir regülatörü olmalıdır.
- Çift ışık yollu cihaz olmalıdır.
- Dijital göstergeli ve 0 100 ayarlarını otomatik yapmalıdır.
- Hafıza sistemi açık olmalıdır; test parametreleri kullanıcı tarafından değiştirilebilmelidir.
- Bikromatik (çift dalga boylu) okuma yapabilmelidir.
- Dalga boyu geçişleri kesintisiz olmalıdır; her bir nm dalga boyuna ayarlanabilmelidir.
- Cihaz, non-lineer testleri çalışıp hesaplayabilmelidir.

Spektrofotometrelerin kalibrasyonu:

-Bir miktar potasyum bikromat ($K_2Cr_2O_7$), $100^\circ C$ 'de bir saat süre ile kurutulur.

-Kurutulmuş potasyum bikromattan çok hassas olarak 0,005 g tartılır ve 1 L'lik balon jodede 0,005 M sülfürik asit çözeltisinde son hacim 1 L olacak şekilde çözülür.

-Bu çözeltinin absorbansı, $15-25^\circ C$ aralığında 1 cm'lik küvette 350 nm dalga boyunda okunur. Reaktif körü olarak 0,005 M sülfürik asit çözeltisi kullanılır.

-Bu şartlarda ölçülen absorbans değeri $0,536 \pm 0,005$ olmalıdır.

Otomatik bir spektrofotometre, otoanalizördür.

Otoanalizör, numune ve reaktifleri uygun ölçülerde alıp karıştırır, belirli süre ve ısıda inkübe eder, gerekli sürelerde optik okumaları yapıp sonunda ilgili analiz sonucunu hesaplanmış olarak kullanıcıya sunar.

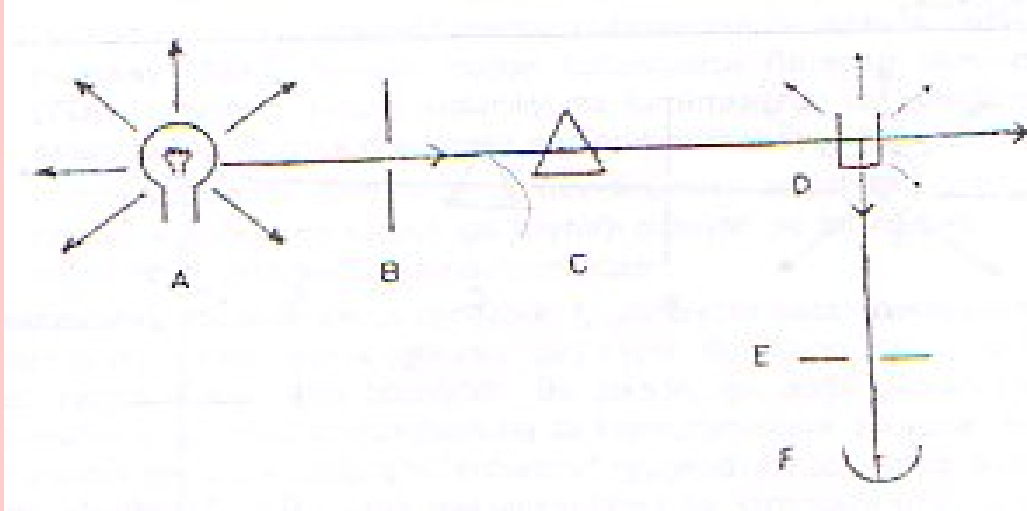
Türbidimetri ve Nefelometri

Bulanıklığın ölçümü esasına dayanan yöntemlerdir.

Türbidimetride, çözeltiliye gelen ışık şiddetinde çözeltideki partiküllerin neden olduğu saçılmadan dolayı ortaya çıkan ışık kaybı ölçülür. Bunun için, absorpsiyonun olmadığı dalga boyundaki ışık ve fotometreler veya kolorimetreler kullanılır.

Türbidimetri, genellikle numunedeki protein yapısındaki maddelerin ölçümünde kullanılır. Değişik yöntemlerde proteinler denatüre edilerek çözünürlükleri ortadan kaldırılır; bulanıklık oluşturulur ve bu ölçülür. Antikorların kullanıldığı deneylere **immünotürbidimetri** adı verilir.

Nefelometride, çözültideki partiküllerce geliş eksenine göre 90° açıyla yerleştirilmiş olan fotosele doğru saptırılan ışınlar ölçülür. Çeşitli açılarda saçılan ışınları ölçen farklı tip **nefelometreler** vardır; spektrofotometreler nefelometri için kullanılamaz.

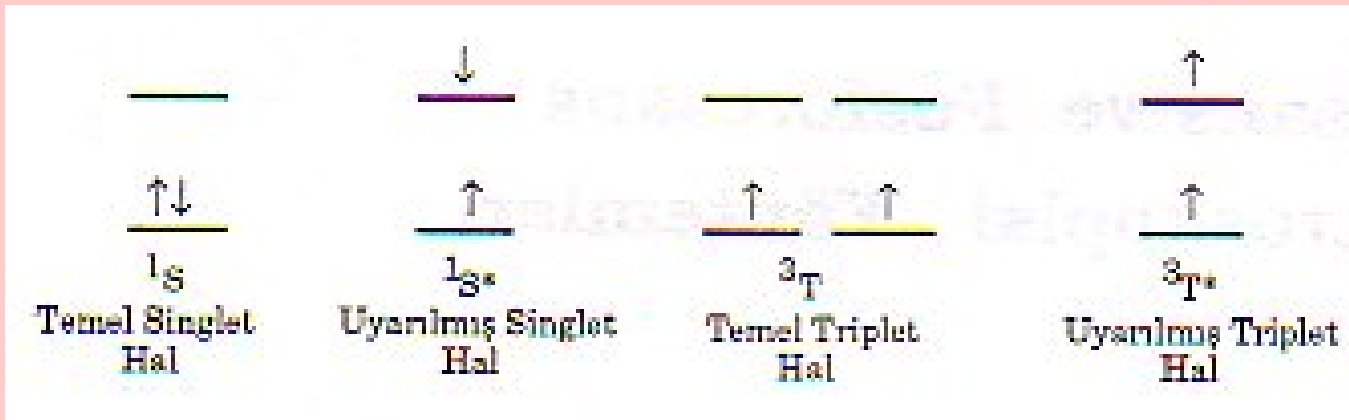


türbidimetre

nefelometre

Floresans ve fosforesans spektroskopisi yöntemleri

Bir atom veya molekülde elektronların en düşük enerjili orbitallere yerleşimi ile atom veya molekülün temel enerji düzeyi veya temel hali oluşur. Elektronların daha üst enerji düzeylerine yerleşmesi ile atom veya molekülün uyarılmış hali oluşur.



Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır; fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir **ışık yayılması (ışık emisyonu)** gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak **lüminesans** denir.

Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen luminesans olayına **kemiluminesans** adı verilir.

Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen luminesans olayına **elektroluminesans** veya **elektrokemiluminesans** adı verilir.

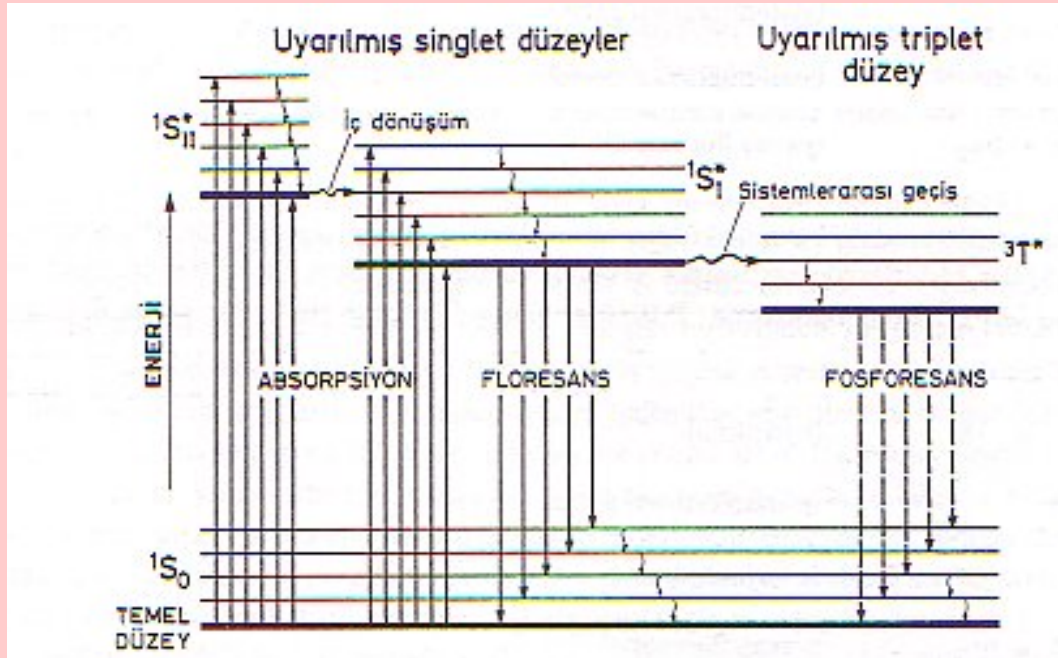
Biyolojik sistemlerde gözlenen luminesansa **biyoluminesans** denir.

Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışık emisyonuna **fotoluminesans** denir.

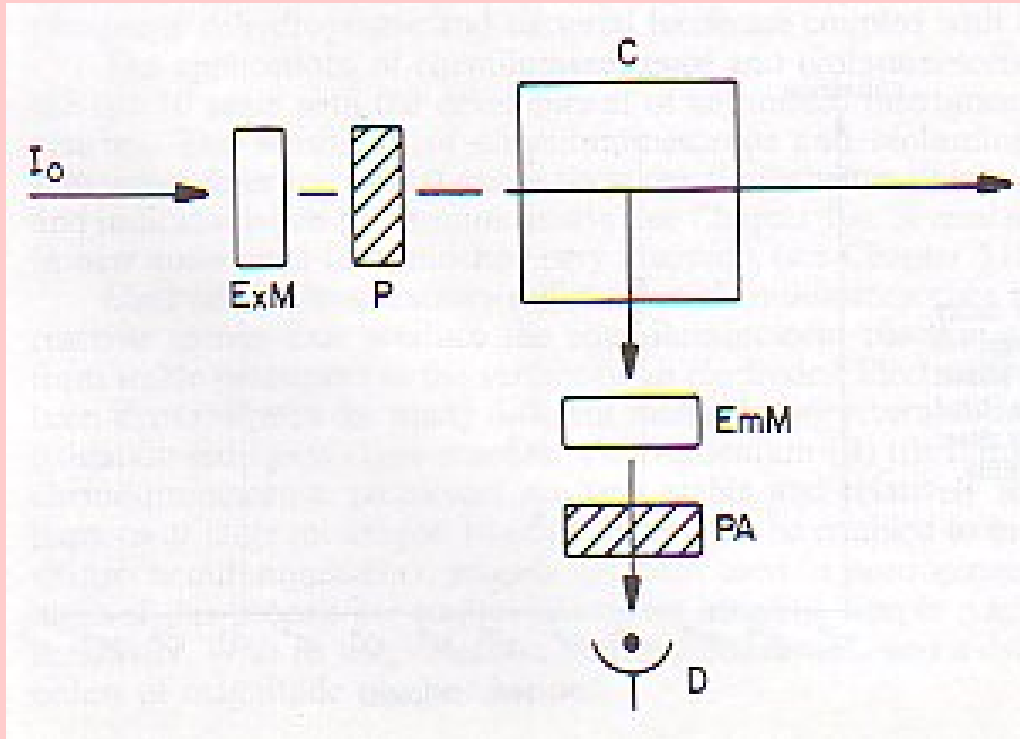
Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **floresans** denir.

Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **fosforesans** denir.

Uyarılma (eksitasyon) ortadan kalkınca floresans olayı, 10^{-10} - 10^{-6} s sürer; fosforesans ise 10^{-6} - 10^2 s sürer.



Florometride, florometre denilen cihazlarla madde konsantrasyonu, floresans ışımının ölçümü ile tayin edilir.



İlaç analizi, birçok organik aktif ilaç maddesinin floresansı yardımıyla yapılabilir.

Metal iyonlarının analizi, bunların oluşturdukları bazı floresant kompleksleri yardımıyla yapılabilir.

Biyolojik örneklerde bazı amino asitler florometrik yoldan tayin edilebilir.

Bazı biyokimyasal bileşiklerin florometrik tayini, bunların bir floresant madde ile tepkimeye sokulup yeni bir floresant ürün veya etiketlenmiş ürün oluşturularak yapılır.

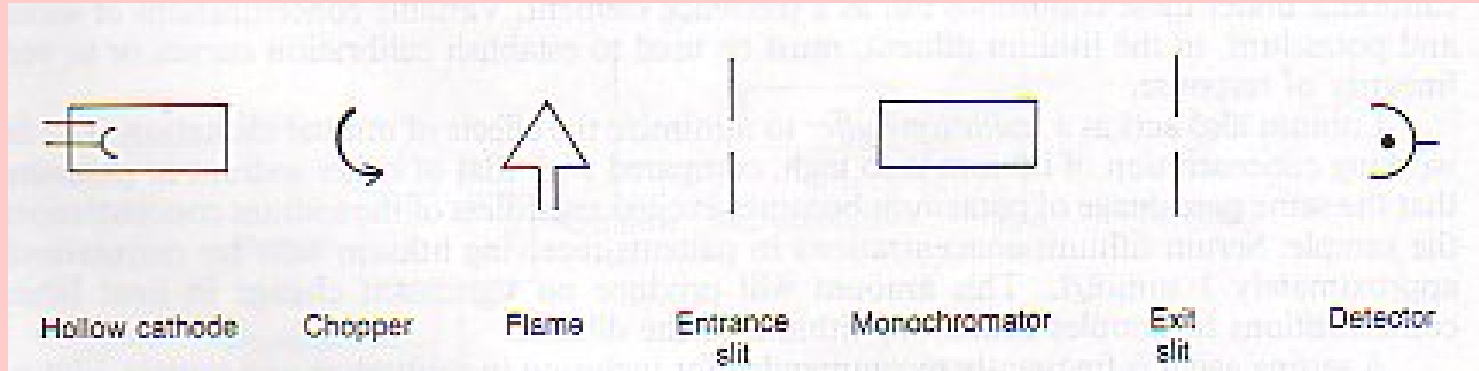
Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)



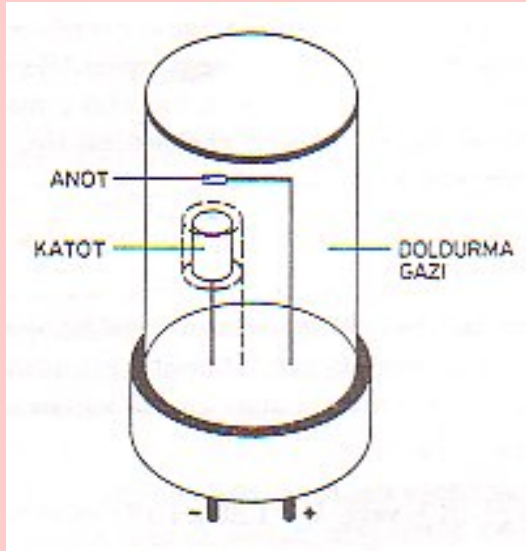
AAS, ışığın gaz halindeki atomlar tarafından absorpsiyonunun ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu ilkeye göre madde konsantrasyonu tayini yapmada kullanılan cihazlar **atomik absorpsiyon spektrofotometreleridir.**

Işığı absorplayan atomlar, temel enerji düzeyinden karasız uyarılmış enerji düzeylerine geçerler ve absorpsiyon miktarı, temel düzeydeki atom sayısına bağlıdır.

Atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinin en önemli bileşenleri, analiz elementinin absorplayacağı ışığı yapan **ışık kaynağı**, örnek çözeltisinin atomik buhar haline getirildiği **atomlaştırıcı**, çalışılan dalga boyunun diğer dalga boylarından ayrıldığı **monokromatör** ve ışık şiddetinin ölçüldüğü **dedektördür**.



Atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinde ışık kaynakları: Oyuk katot lambaları, düşük basınçta neon veya argon gibi bir asal gazla doldurulmuş silindir biçiminde lambalardır. Katot, oyuk bir silindir şeklindedir ve analiz elementinden yapılmıştır. Anot ise tungsten veya nikelden yapılmış bir teldir.



Anot ile katot arasına 100-400 voltluk bir gerilim uygulandığında lamba içindeki asal gaz atomları iyonlaşır. Oluşan iyonlar katoda çarparak yüzeydeki metal atomlarını koparır ve uyarırlar. Uyarılan atomlar temel enerji düzeyine dönerken katot elementine özgü dalga boyundaki ışımayı yayarlar.

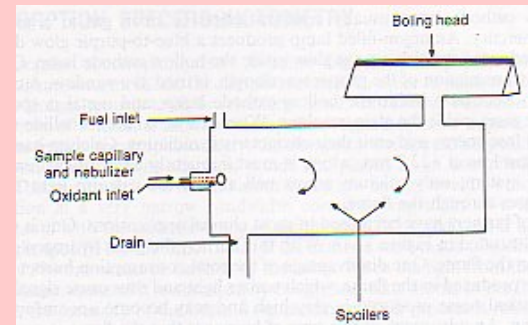
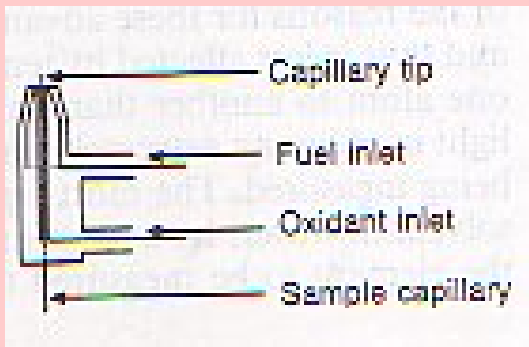
Elektrotsuz boşalım lambaları, As, Se, Sb gibi uçucu ve küçük dalga boylarında absorpsiyon ve emisyon yapabilen elementler için geliştirilmiştir. Bunlarda 1-2 cm boyunda ve 5-10 mm çapındaki bir kuartz tüpe düşük basınçta argon gazı ile analiz elementinin 1-2 mg'ı konmuştur; kuartz tüpün dış çeperleri ile temastaki elektrotlar arasına 200 watt'lık bir güç uygulama ile uyarma sağlanır.



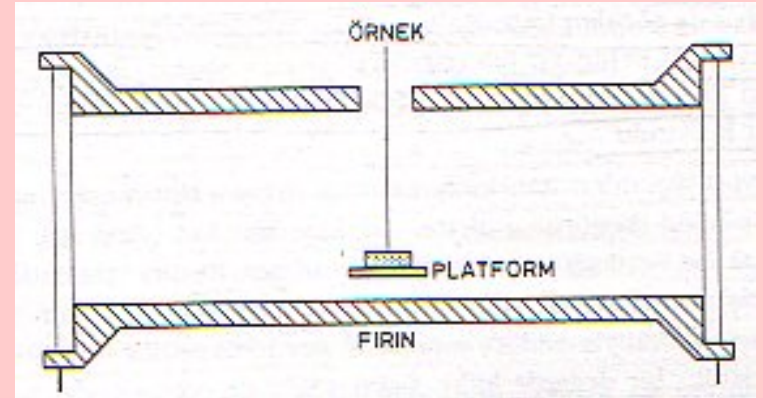
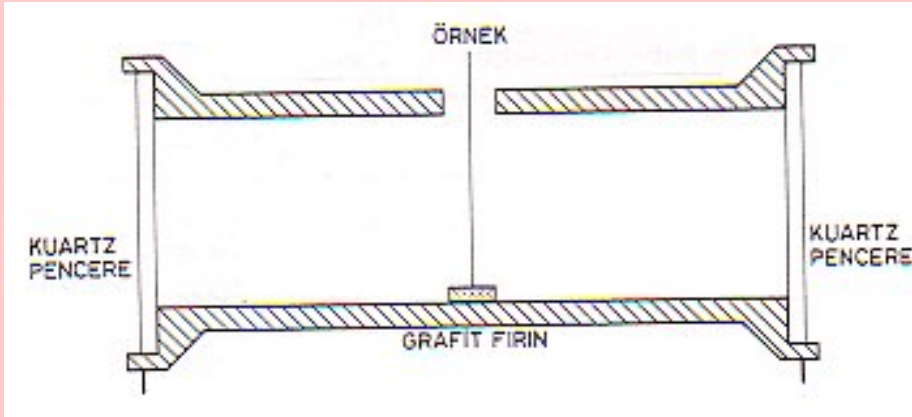
Atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinde atomlaştırıcı (absorpsiyon hücresi), örnekteki iyonlardan ve moleküllerden, analizi yapılacak elementin temel düzeydeki atom buharının oluşturulduğu bölümdür.

Alevli atomlaştırıcılarda örnek çözeltisi aleve havalı bir sisleştirici yardımı ile püskürtülür.

Alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresinde alevin oluşturulması için kullanılan yakıcılar ön-karıştırmaz ve ön-karıştırmalı olmak üzere iki türdür.

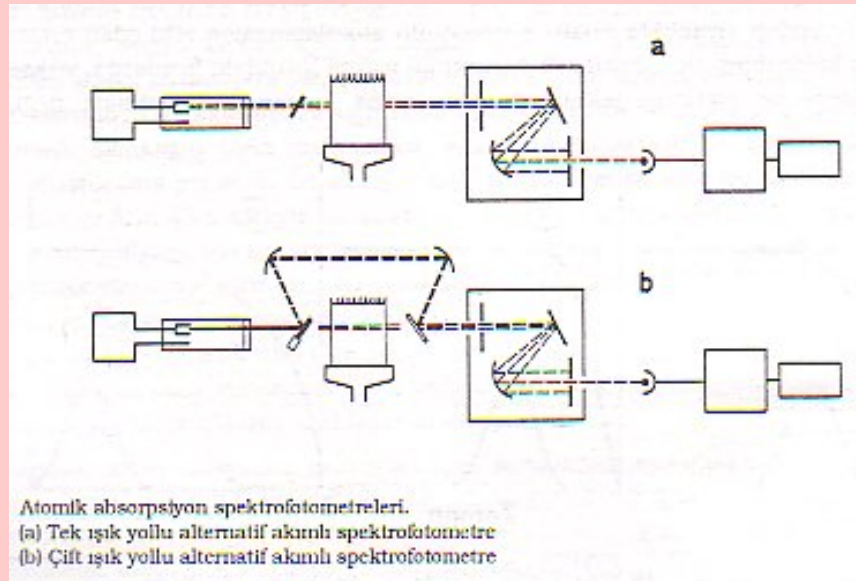


Atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinde atomlaştırıcı olarak alev dışında geliştirilen sistemlerin en önemlileri, **elektrotermal atomlaştırıcı** olarak da adlandırılan **grafit fırınlarıdır**. Bunlar, ısıtılmaları için ayrı bir güç kaynağı gerektirirler ve daha pahalı sistemlerdir. Bunlarda çok küçük örnek hacimleri (5-50 μL) yeterlidir ve duyarlılık aleve oranla çok daha fazladır.



Atomik absorpsiyon spektrofotometrelerinde monokromatörün görevi, oyuk katot lambasının yaydığı, incelenen elementin rezonans hattını diğer hatlardan ayırmaktır.

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde ışık sinyalinin elektrik sinyaline dönüştürülmesi için, fotoçoğaltıcı tüpler kullanılır. **Dedektör**, alternatif akım sinyaline cevap verecek şekilde yapılmıştır.



Atomik absorpsiyon spektroskopisinde, analizi yapılacak örneğin özelliklerine göre birçok engellemeler ile karşılaşılır.

Kimyasal engellemeler, atomlaştırıcılarda oluşan kimyasal tepkimelerin sonucudur.

İyonlaşma engellemesi, atomlaştırıcıdaki atomların önemli bir miktarının uygulanan sıcaklıkta iyonlaşması sonucudur.

Spektral engellemeler, atomlaştırıcıdaki iki elementin veya bir element ile çok atomlu bir türün aynı dalga boyundaki ışığı absorplaması veya yayması sonucu oluşur.

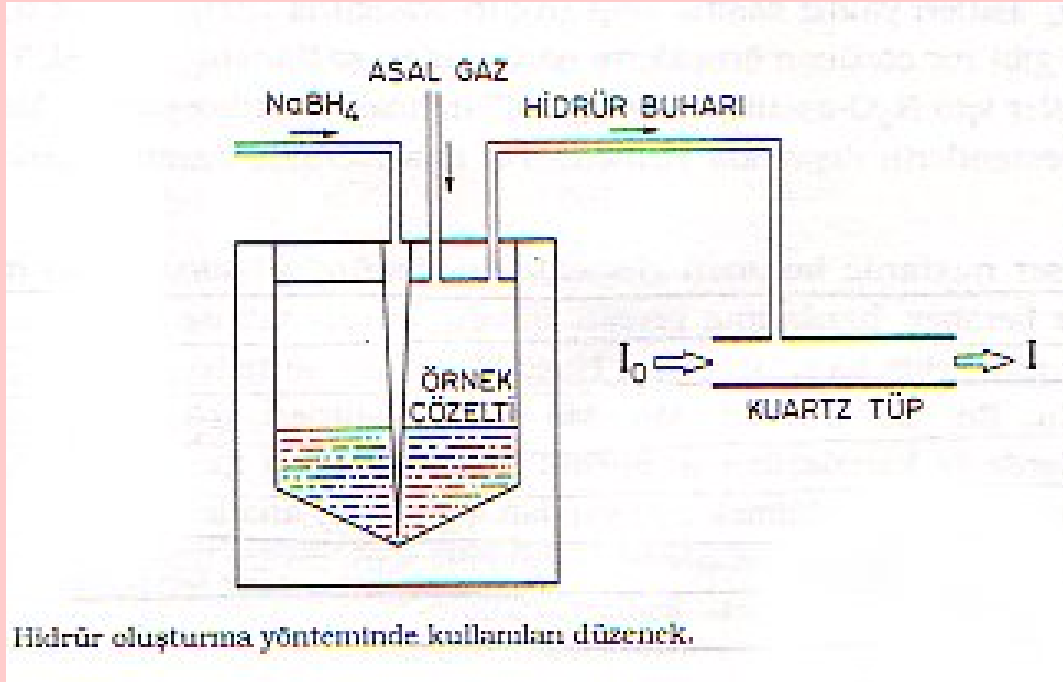
Zemin engellemesi, örnek çözeltisinde bulunan çok atomlu türlerin ışığı absorplamasının sonucudur.

Atomik absorpsiyon spektroskopisi, özellikle eser miktarlardaki elementlerin nicel analizleri için çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Atomik absorpsiyon spektroskopisi yöntemi ile tayin edilebilen elementler ve dalgaboyu değerleri.

Li 670.8	Be 234.9											B 249.7				
Na 589.0	Mg 285.2											Al 309.3	Si 251.6			
K 766.5	Ca 422.7	Sc 391.2	Ti 364.3	V 318.4	Cr 357.9	Mn 279.5	Fe 248.3	Co 240.7	Ni 232.0	Cu 324.8	Zn 213.9	Ga 267.4	Ge 265.2	As 193.7	Se 196.0	
Rb 780.0	Sr 460.7	Y 407.7	Zr 360.1	Nb 405.9	Mo 313.3		Ru 349.3	Rh 343.5	Pd 244.8	Ag 328.1	Cd 228.8	In 303.9	Sn 286.3	Sb 217.6	Te 214.3	
Cs 852.1	Ba 553.6	La 392.8	Hf 307.2	Ta 271.5	W 400.8	Re 316.0		Ir 264.0	Pt 265.9	Au 242.8	Hg 185.0	Tl 377.6	Pb 217.0	Bi 223.1		
		Pr 466.1	Nd 463.4					Sm 429.7	Eu 459.4	Gd 368.4	Tb 432.6	Dy 421.2	Ho 410.3	Er 400.8	Tm 410.6	
								U 351.4								

Periyodik tablonun IVA, VA ve VIA gruplarında bulunan elementlerin oluşturduğu uçucu hidrürlerden yararlanılarak bu elementlerin AAS yöntemi ile analizleri yapılabilir. Analizi yapılacak elementi AsH_3 , BiH_3 , SbH_3 , H_2Se , SnH_4 gibi gaz halinde hidrürünü oluşturarak örnek çözeltisinden ayırmak birçok engellemeyi önler.



Hidrür oluşturma yönteminde kullanılan düzenek.

Atomik emisyon ve atomik floresans spektroskopisi

Uyarılmış enerji düzeyine çıkarılan atomların ve tek atomlu iyonların daha düşük enerjili düzeylere geçişlerinde yaydıkları UV-görünür bölge ışımalarının ölçülmesi, yaygın olarak kullanılan bir atomik spektroskopi yönteminin temelini oluşturur. Eğer atom veya iyonların uyarılmış enerji düzeyine çıkmaları, bunların UV-görünür bölge ışımalarını absorplamaları dışında bir prosesle gerçekleşmişse, yayılan ışımının ölçülmesi yöntemine **atomik emisyon spektroskopisi (AES)** adı verilir.

Atomik emisyon spektroskopisi, uyarmayı sağlayan enerji kaynağının türüne göre sınıflandırılır:

Alev emisyon spektroskopisinde, analiz örneğini atomlaştırmak ve uyarmak için alev kullanılır.

Atomlaşmanın ve uyarmanın elektriksel boşalım veya plazma gibi bir enerji kaynağı ile gerçekleştirildiği yöntem, sadece **atomik emisyon spektroskopisi** veya **optik emisyon spektroskopisi** olarak adlandırılır.

Alev emisyon spektrofotometreleri, alev emisyon spektroskopisi yönteminin de uygulanabileceği şekilde üretilmiş atomik absorpsiyon spektrofotometreleridir. Alev emisyon spektroskopisi yönteminin uygulandığı durumda ışık kaynağı kullanılmaz.

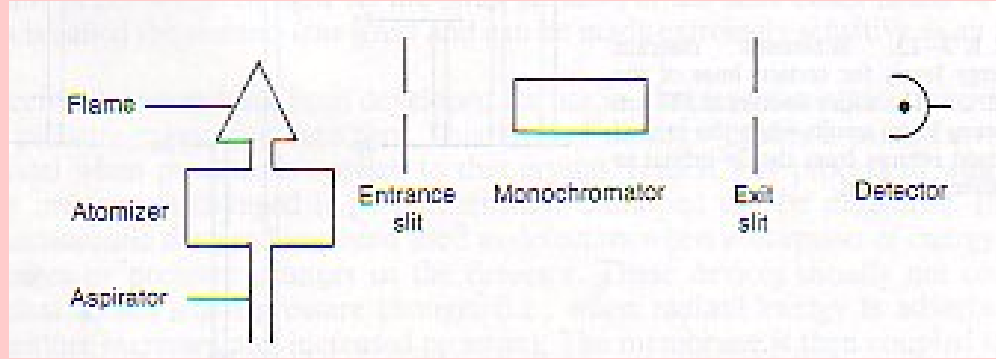
Sadece alev emisyon spektroskopisi yönteminin uygulanabileceği şekilde üretilen spektrofotometrelere **alev fotometresi (flame fotometre)** adı verilir.



Alev fotometresi (flame fotometre) ile analiz için, alev üzerine çözeltili çok küçük damlacıklar halinde (sis şeklinde) püskürtülür. Alevin ısı etkisiyle, çözeltideki madde atomlarının elektronları uyarılır ve bu şekilde daha üst bir enerji seviyesine çıkmış olan anstabil elektronlar daha sonra eski enerji düzeylerine dönerken aradaki enerji farkını ışık olarak dışarı salarlar. Bu ışık, çözeltideki madde konsantrasyonuyla orantılıdır ve alev fotometresinde ölçülür. Rutin laboratuvarlarda bu metod, Na, K tayininde kullanılır.

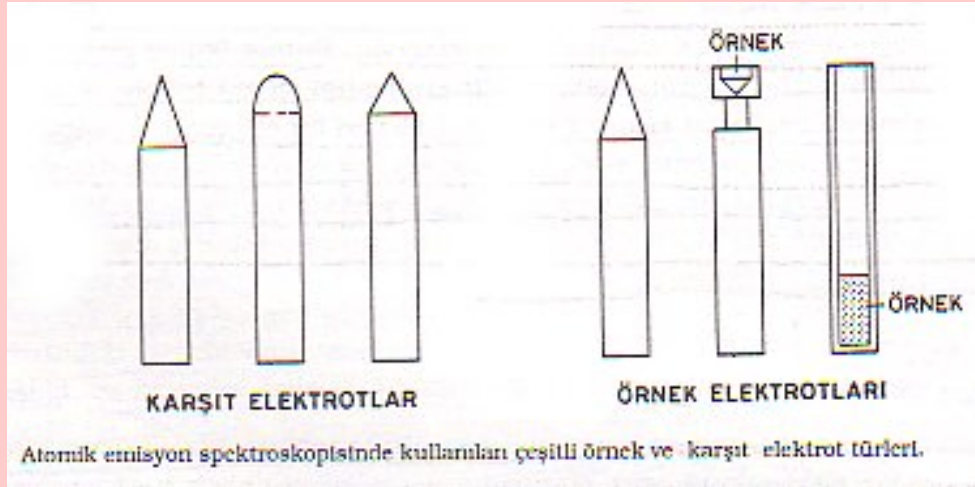


Flame fotometrede alev elde etmek için yakıt olarak genelde metan, bütan, propan, asetilen gibi gazlar kullanılır. Eksitasyon sonucu lityum kırmızı, sodyum sarı, potasyum menekşe renk verir.

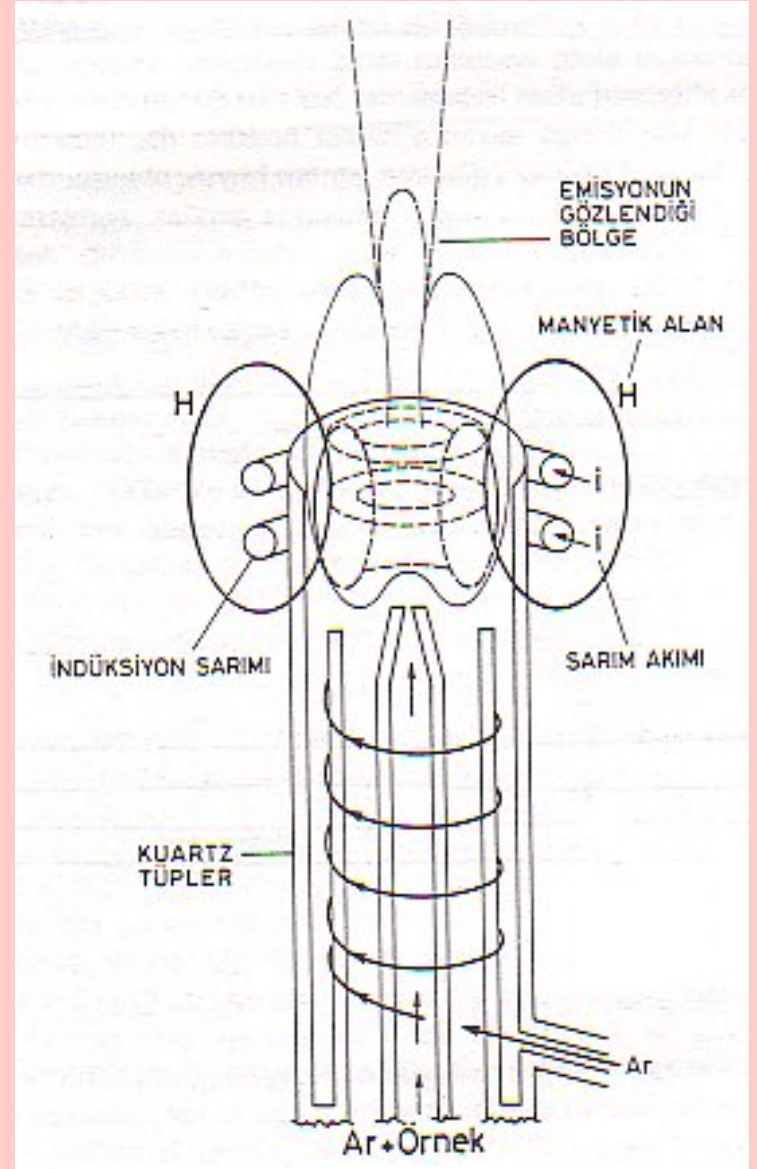


Alev emisyon spektroskopisinde karşılaşılan engellemeler, atomlaştırıcı olarak alevin kullanıldığı atomik absorpsiyon spektroskopisi yönteminde karşılaşılan engellemelerin aynısıdır. Spektral engellemelerin önüne geçmek için iç standart yöntemi kullanılır.

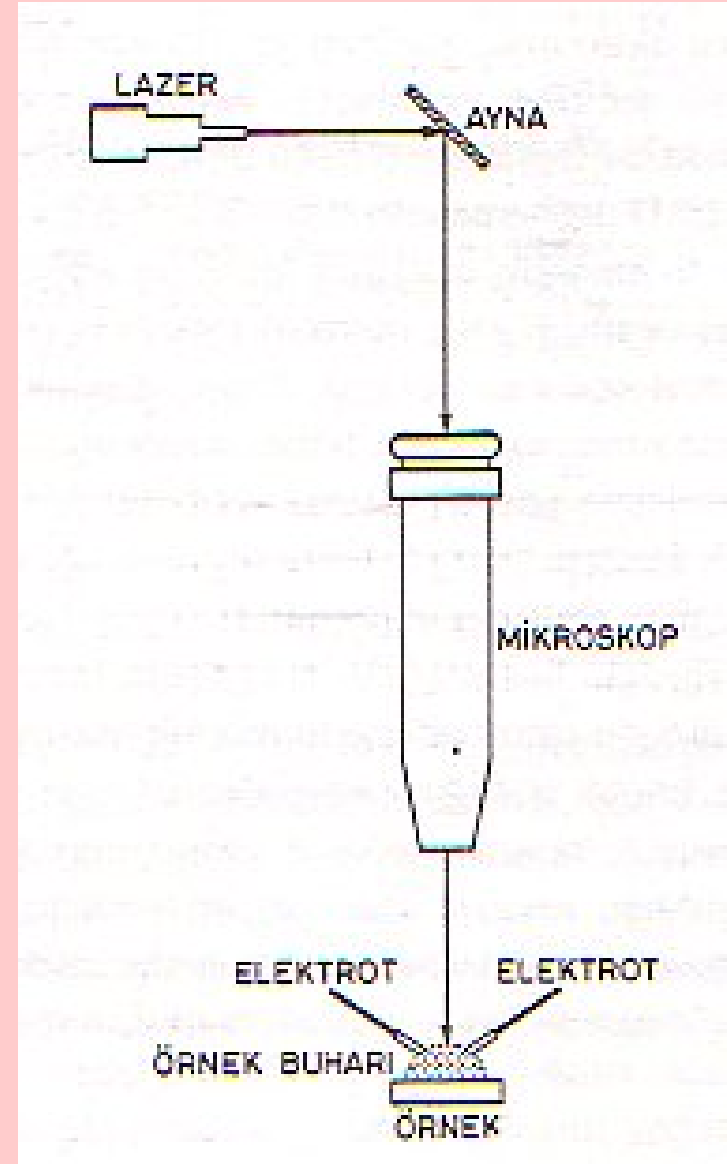
Atomik emisyon spektrofotometrelerinde, analiz edilecek örneğin atomlaştırılması ve uyarılması için en yaygın olarak kullanılan yöntem, iki elektrot arasına elektrik boşalımı uygulamaktır. Bu yöntemde örnek, elektrotlardan birisinin içine konur ve örnek içermeyen bir karşıt elektrotla bu elektrot arasına elektrik boşalımı uygulanır.



Atomik emisyon spektrofotometrelerinde, analiz edilecek örneğin atomlaştırılması ve uyarılması için son yıllarda plazma (gaz halindeki iyon akımı) kullanılmaktadır. ICP (Inductively Coupled Plasma) tekniğinde plazma, argon gazı ile oluşturulur.



Atomik emisyon spektroskopisinde sadece katı haldeki örneklerin analizi için kullanılan atomlaştırma ve uyarma düzeneği **lazer mikroprop** adını alır. Bu düzende örnek yüzeyinde küçük bir alana lazer ışınması odaklanarak buharlaştırma işlemi gerçekleştirilir; buharlaşan örnek, alternatif akım arkının oluşturduğu iki elektrot arasında uyarılır.



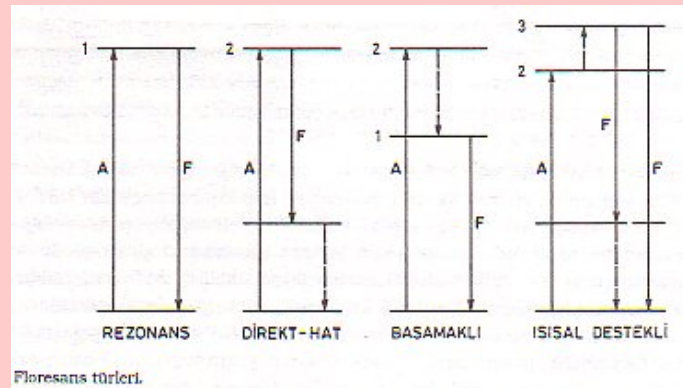
Atomik floresans spektroskopisi (AFS), kesikli veya sürekli bir ışık kaynağından yayılan ışımının absorplanması ile uyarılmış enerji düzeyine çıkan atomların temel enerji düzeyine dönerken yaydıkları ışımının ölçülmesi ilkesine dayanan yöntemdir.

Yayılan ışımının absorplanan ışıma ile aynı dalga boyunda olduğu floresans türüne **rezonans floresans** denir. Atomik floresans spektroskopisi yönteminde nicel analiz için genellikle bu floresans türü kullanılır.

Uyarılmış enerji düzeyindeki atomun ışıma yaparak ilk uyarıldığı enerji düzeyinden daha yüksek enerjili bir düzeye dönmesi sonucu **direkt hat floresansı** oluşur.

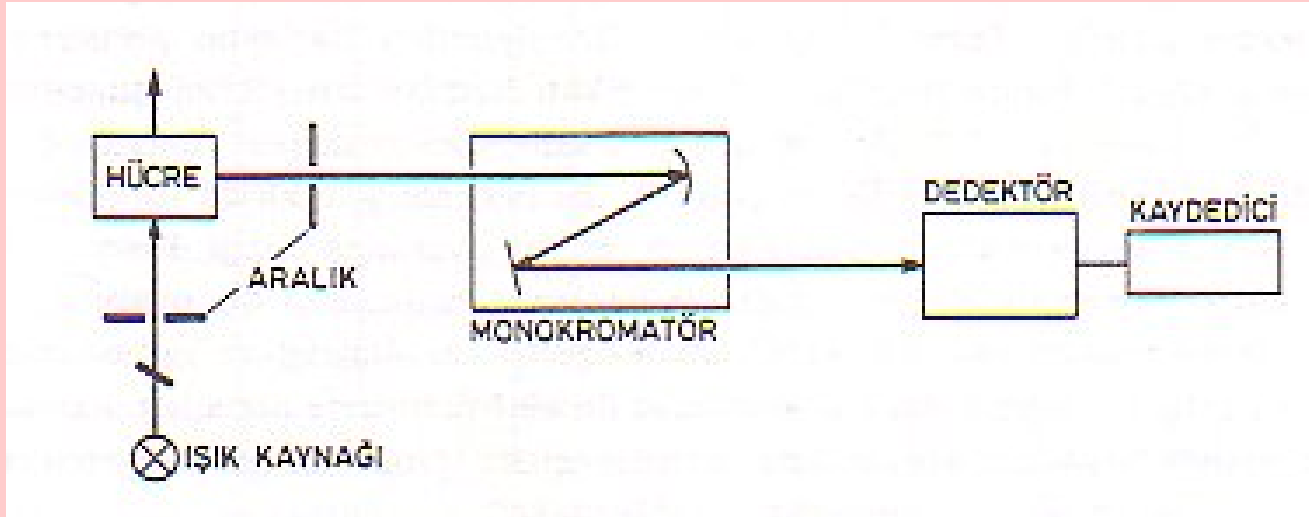
Uyarılmış enerji düzeyindeki atomun ışımatsız yoldan daha düşük bir enerji düzeyine geçişi ve bu düzeyden temel düzeye dönerken yaydığı floresans ışınması, **basamaklı floresans** olarak adlandırılır.

Uyarılmış enerji düzeyine çıkarılan atom, yüksek enerjili taneciklerle yaptığı çarpışmalarla daha yüksek enerjili bir uyarılmış düzeye çıkabilir. Atomun bu uyarılmış düzeyden temel düzeye ya da temel düzeyin üstünde bir enerji düzeyine dönmesi sırasında yayılan floresans ışınmasına **termal destekli floresans** denir.



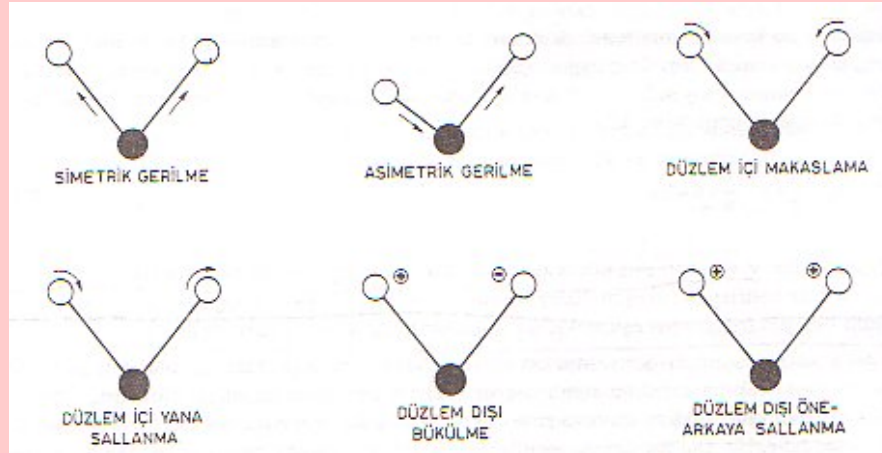
Atomik floresans spektrofotometrelerinde, yayılan floresans ışığının şiddeti, uyarmayı sağlayan ışık kaynağına dik bir açıda ölçülür.

Floresans sinyalinin ısısal olarak oluşan emisyon hatlarından ayrılmasını sağlamak için, ışık örneğe bir ışık bölücü yardımı ile ve belirli bir frekansta gönderilir ve dedektör bu frekansa cevap verecek şekilde ayarlanır.



İnfrared (IR) spektroskopisi

Molekülleri oluşturan atomlar sürekli bir hareket içinde olduklarından, molekülün öteleme hareketleri, bir eksen etrafında dönme hareketleri ve bir kimyasal bağın uzunluğunun periyodik olarak azalıp çoğalmasına veya moleküldeki açıların periyodik olarak değişmesine neden olan **titreşim hareketleri** doğar. Moleküllerde ortaya çıkan titreşimler, gerilme ve eğilme hareketlerini oluşturur.

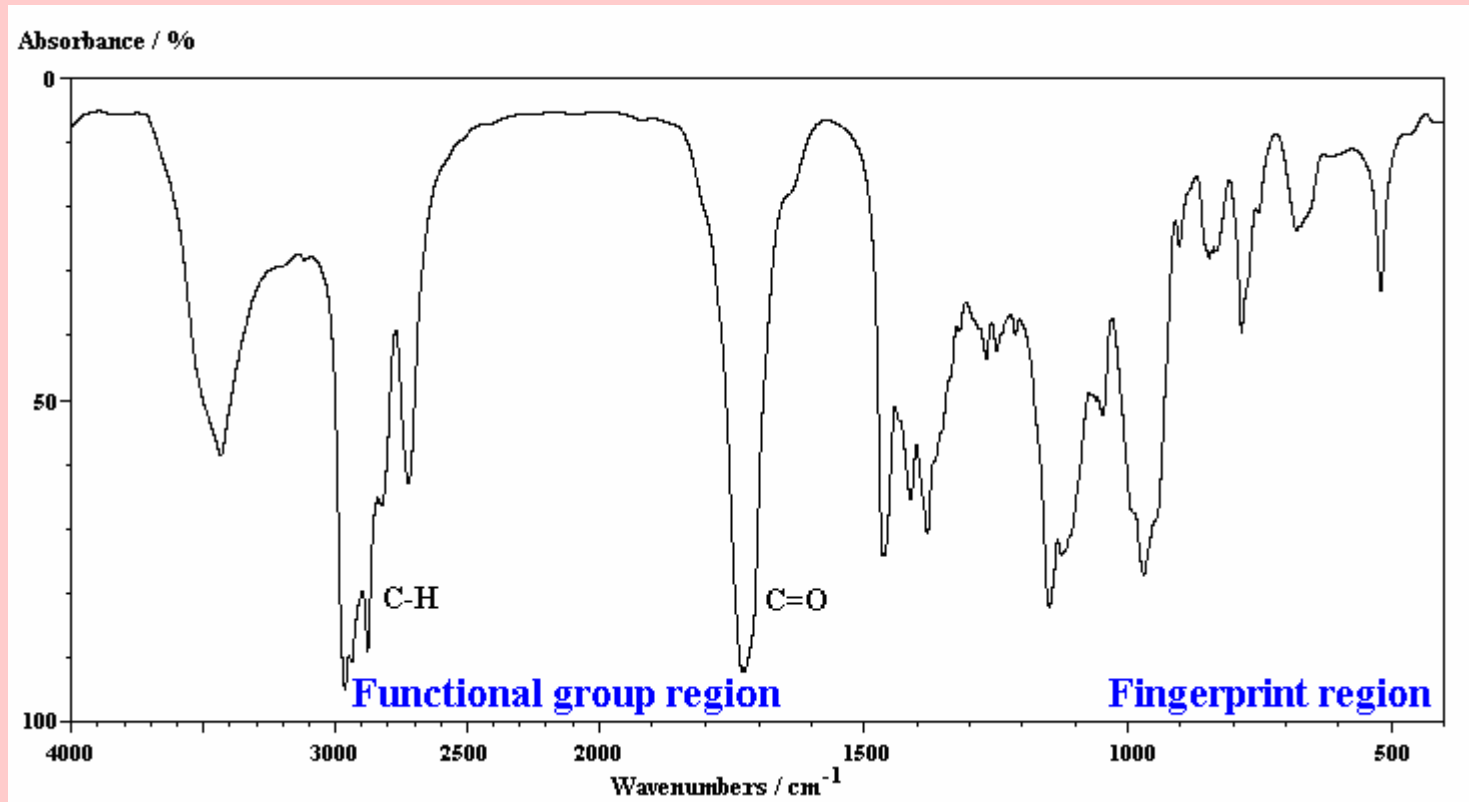


$v=0$ titreşim düzeyinde bulunan ve v frekansı ile titreşmekte olan bir molekülü $v=1$ ile belirlenen titreşim düzeyine çıkarmak için, yani titreşim enerjisini arttırmak için bu molekülü titreşim frekansına eşit frekansa sahip bir foton ile etkileştirmek gerekir.

Moleküllerde titreşim enerji düzeyleri arasındaki geçişleri gerçekleştirecek fotonlar, elektromanyetik ışımının infrared bölgesinde yer alırlar.

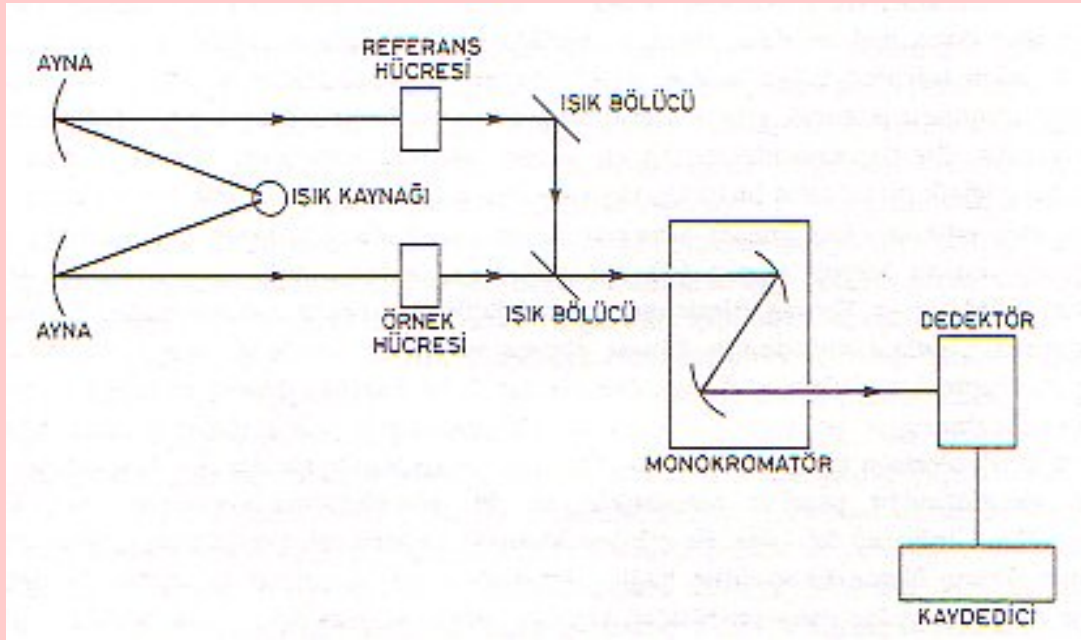
Moleküller için infrared absorpsiyon spektrumları tanımlanmıştır.

Moleküllerin infrared absorpsiyon bandlarında iki bölge tanımlanır. İnfrared bölgesinin 4000-1000 cm^{-1} arasında kalan kısmı **fonksiyonel grup bölgesidir**; $< 1000 \text{ cm}^{-1}$ bölgesi **parmak izi bölgesidir**.



İnfrared bölgesinin **parmak izi bölgesinde** gözlenen bandların tümü incelenen moleküle özgüdür.

Moleküllerin infrared spektrumları yardımıyla yapılarının aydınlatılması bu yöntemin en yaygın olarak kullanıldığı alandır. Bilinmeyen maddelerin infrared spektrumları, şüphelenilen maddelerin aynı koşullarda çekilen spektrumları ile veya katologlarda bulunan spektrumlarla karşılaştırılır. Bunun için kullanılan cihazlar, **infrared absorpsiyon spektrofotometreleridir.**



İnfrared absorpsiyon spektrofotometrelerinde ışık kaynağı olarak, elektrik akımını yardımı ile ısıtıldıkları zaman siyah cisim ışıması yapan ve yüksek sıcaklıklarda bozunmayan katılar kullanılır.

İnfrared ışınlarının şiddetinin ölçülmesi, foton dedektörleri veya ısısasal dedektörlerle yapılır.

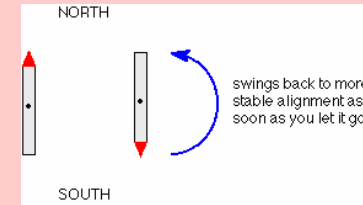
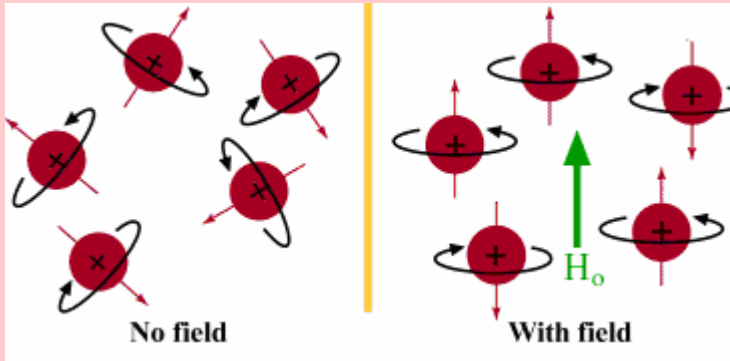
Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

Atomu oluşturan yüklü taneciklerden elektronlar, kendi etraflarında dönerler yani bir “spin” hareketi yaparlar. Atom çekirdeklerinin çoğu da “spin” hareketi yaparlar.

Atom çekirdeklerinde proton ve nötron sayıları çift sayılı ise (^4He , ^{12}C , ^{16}O gibi) bu çekirdeklerin net spini yoktur. Çekirdekteki nötron ve proton sayıları tek sayılı ise yani nötron ve proton sayılarının toplamı çift sayılı ise çekirdeğin net spini tam sayıdır. Çekirdekteki nötron veya proton sayısı tek sayılı ise spini yarımlı değer alır.

Kendi eksenini etrafında dönen yüklü bir parçacık, dairesel bir elektrik alanı oluşturur ve bu akım bir manyetik alan yaratır.

Spin hareketi yapan yüklü bir tanecik, küçük bir mıknatıs gibi davranır ve dolayısıyla dıştan uygulanan bir manyetik alandan etkilenir. Manyetik alan içinde tutulan yüklü bir taneciğin oluşturduğu manyetik dipol, bu alan içinde **Lamor dönmesi** hareketini yapar.



Manyetik alan etkisinde olan ve spin hareketi yapan ve net spini olan çekirdek $h\nu$ enerjisine sahip bir ışığa ile etkileşirse, bu ışığın frekansı Larmor hareketinin frekansına eşit olduğu zaman rezonans koşulu sağlanmış olur ve ışık absorplanır.

Manyetik alan içinde tutulan bir çekirdeğin elektromanyetik ışığı önemli ölçüde absorplaması için, örnek içerisindeki bolluğu çok olmalı ve büyük bir manyetik moment değerine sahip olmalıdır. Bu iki özelliği bir arada taşıyan çekirdekler ^1H , ^{19}F , ^{31}P 'dur.

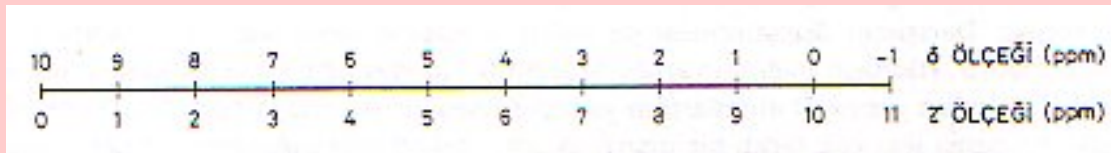
Uygun bir radyo dalgası fotonu ile etkileştiğinde proton manyetik rezonansa gireceğinden ^1H -NMR yöntemiyle bir örnekte hidrojen atomu olup olmadığını anlamak ve varsa ne kadar hidrojen atomu olduğunu ölçmek mümkündür.

Farklı kimyasal çevreye sahip çekirdeklerin uygulanan radyo dalgası fotonu ile farklı manyetik alanlarda rezonansa girmesine **kimyasal kayma** denir.

Kimyasal kayma değerlerini birbirleri ile karşılaştırabilmek ve tablo haline getirebilmek için incelenen örnekle beraber bir karşılaştırma maddesinin de kullanılması gerekir.

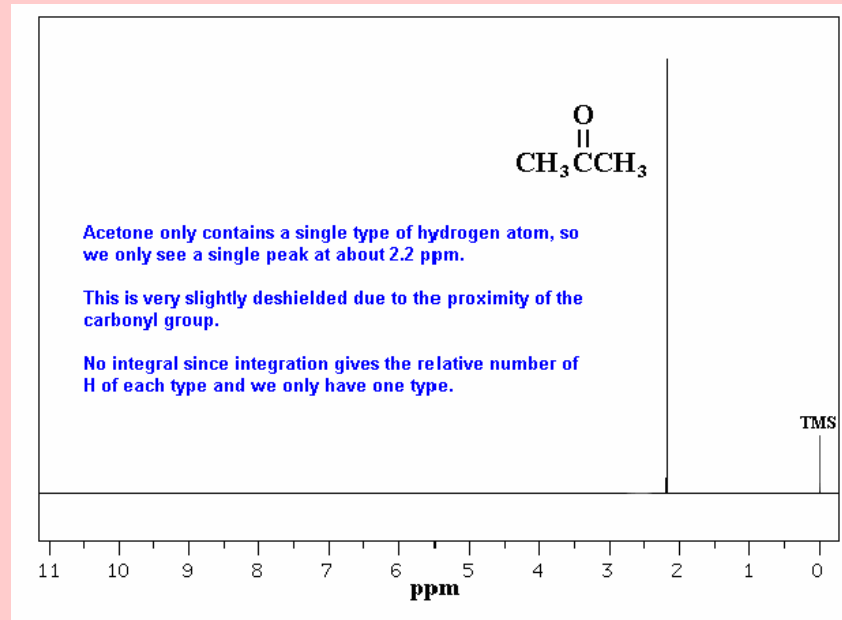
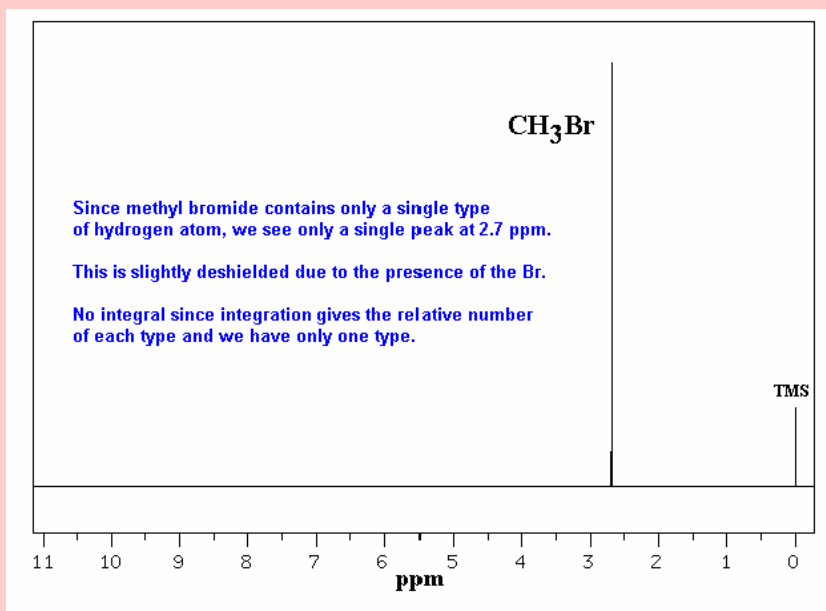
Sulu olmayan çözeltilerde kullanılan karşılaştırma maddesi tetrametil silandır [TMS, Si(CH₃)₄]. Bu madde, örnek çözeltilisine %5 oranında eklenir. Sulu çözeltilerde karşılaştırma maddesi olarak 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonik asit sodyum tuzu kullanılır.

TMS'nin proton rezonansına ait pikin kimyasal kayma değeri sıfır kabul edilir ve öteki piklerin kimyasal kayma değerleri TMS'ninkine göre verilir. Bu tür kimyasal ölçeğe δ ölçeği adı verilir. Bir başka ölçek olan τ ölçeğinde TMS'nin kimyasal kayma değeri 10 olarak alınır.

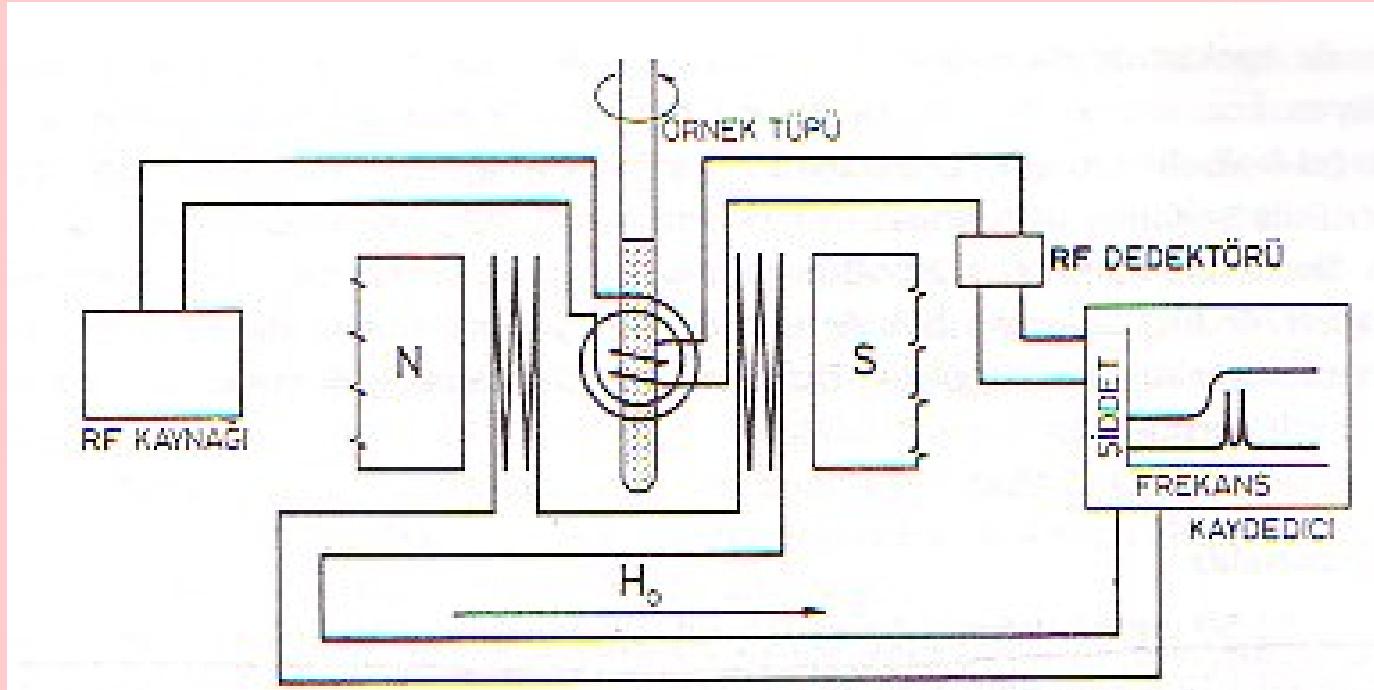


$$\delta (\text{ppm}) = \frac{\text{TMS ye göre ölçülen kimyasal kayma (Hz)}}{\text{Spektrometrede kullanılan radyodalga frekansı (Hz)}} \times 10^6$$

^1H -NMR, ^{19}F -NMR, ^{31}P -NMR spektrometreleri tasarlanmış ve bunlarla çeşitli maddelerin NMR spektrumları elde edilmiştir.



Nükleer manyetik rezonans spektrometreleri, numune sabit frekansta bir elektromanyetik enerjiyle ışınlanırken, manyetik alan şiddeti sürekli olarak değiştirilecek şekilde tasarlanabilir.



Taramalı spektrometre ve pulslu spektrometre gibi NMR spektrometreler vardır.

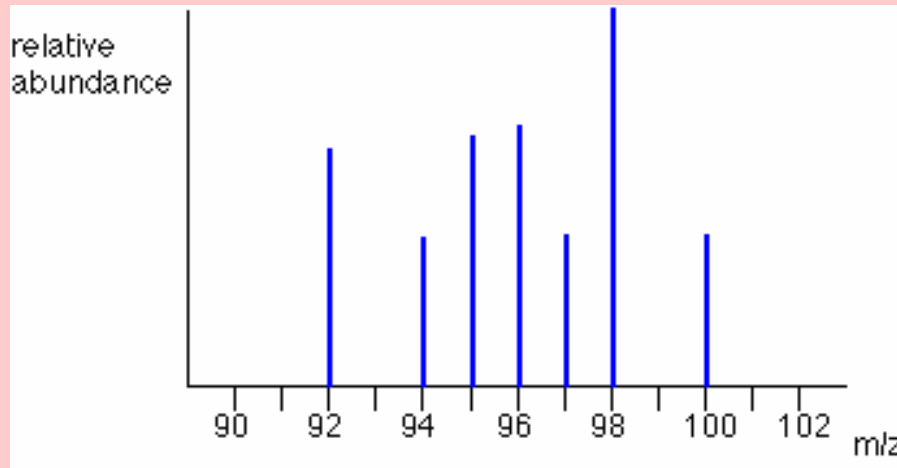
NMR spektrumları, daha çok saf haldeki bileşiklerin nitel analizinde ve yapılarının belirlenmesinde kullanılır. ^1H -NMR için, 20-50 mg ağırlığında örnek 0,5 mL çözücüde çözülerek 15 cm uzunluğunda ve 0,5 cm çapında bir tüp içinde manyetik alana yerleştirilir. Nitel analizde kimyasal kayma değerleri tablolardaki değerlerle karşılaştırılır.

NMR spektroskopisi ile nicel analiz de gerçekleştirilebilir. Ancak bu amaçla kullanılırken yöntemin duyarlılığı çok azdır.

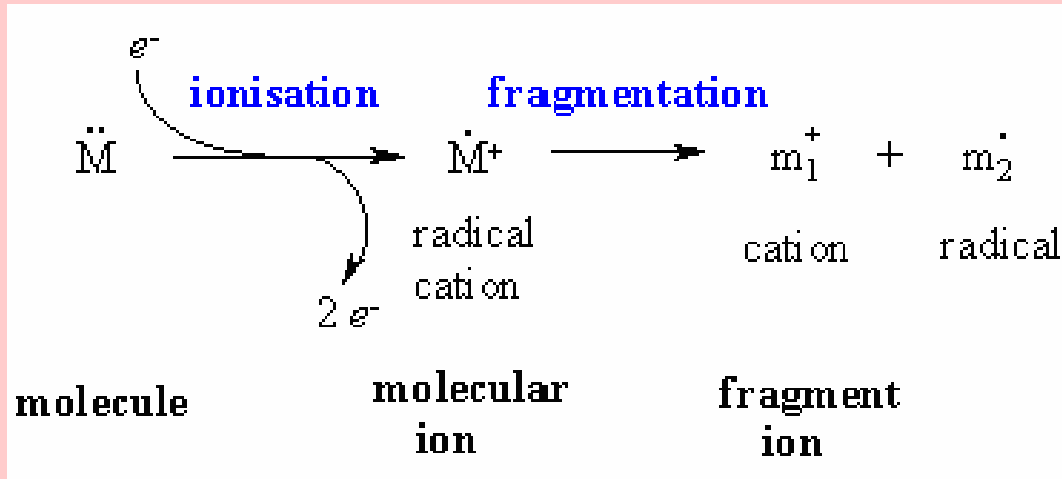
Kütle spektrometrisi (MS)

Kütle spektrometrisi yönteminde, atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılarak kaydedilir.

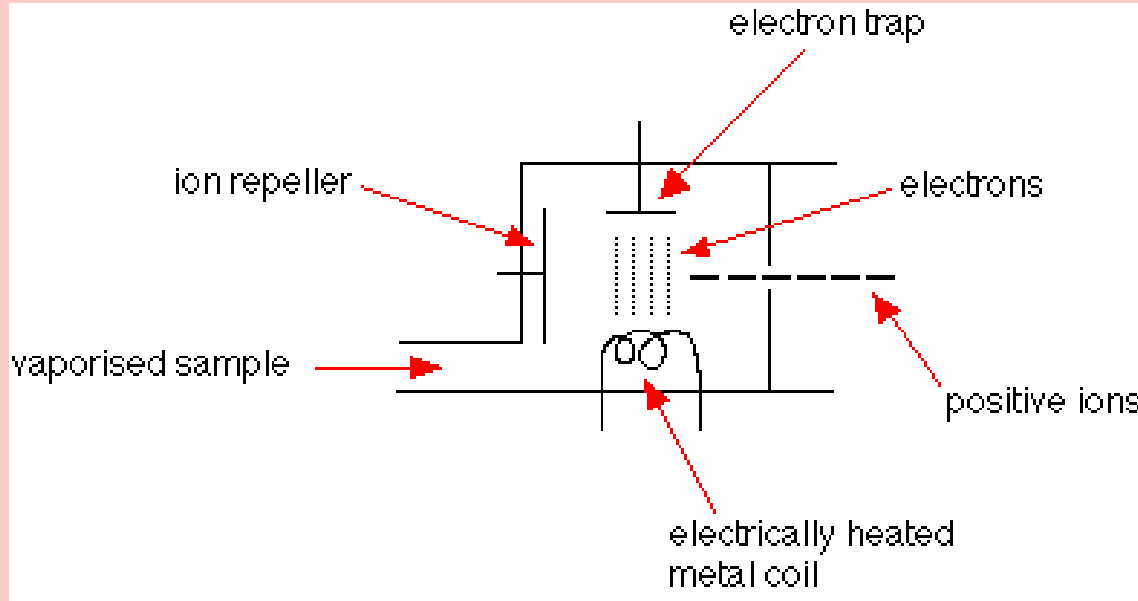
İyonların bağıl miktarlarınının (kütle/yük) oranlarına göre çizilmiş grafiğine **kütle spektrumu** denir.



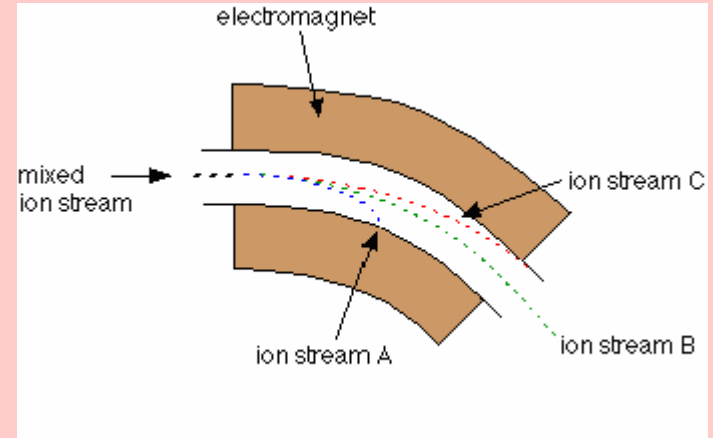
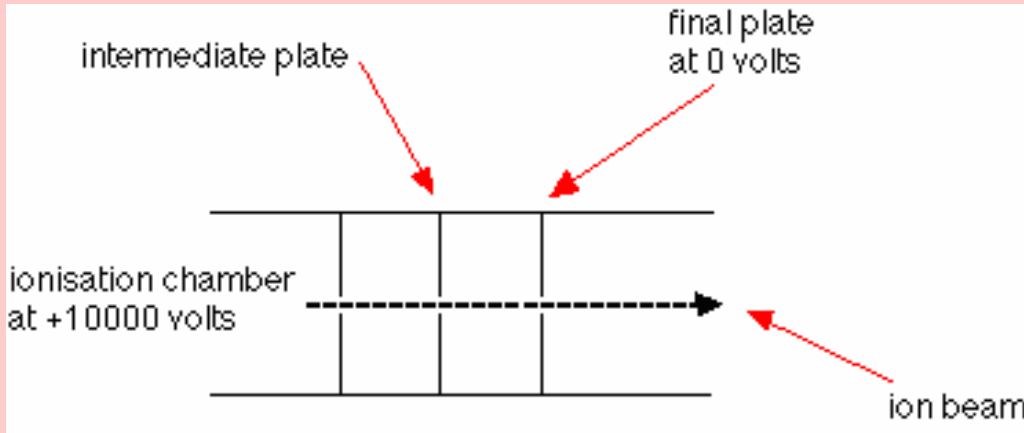
Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için bunun önce gaz fazına geçirilmesi ve daha sonra iyonlaştırılması gerekir. Örnek önce kütle spektrometresinin vakum altında tutulan giriş kısmına gönderilir ve madde gaz fazında değilse, ısıtılarak gaz fazına geçmesi sağlanır. Gaz haline getirilmiş maddenin molekülleri ince bir delikten difüzyon ile iyonlaşma bölgesine sızarlar.



Örneğin ve uygulamanın türüne göre çeşitli iyonlaştırma yöntemleri uygulanır. En çok uygulanan iyonlaştırma yönteminde örnek, ısıtılmış bir flamandan yayılan ve elektrik alanından geçirilerek hızlandırılan 50-80 eV'luk bir enerjiye sahip elektron demetiyle bombardıman edilerek iyonlaştırılır.

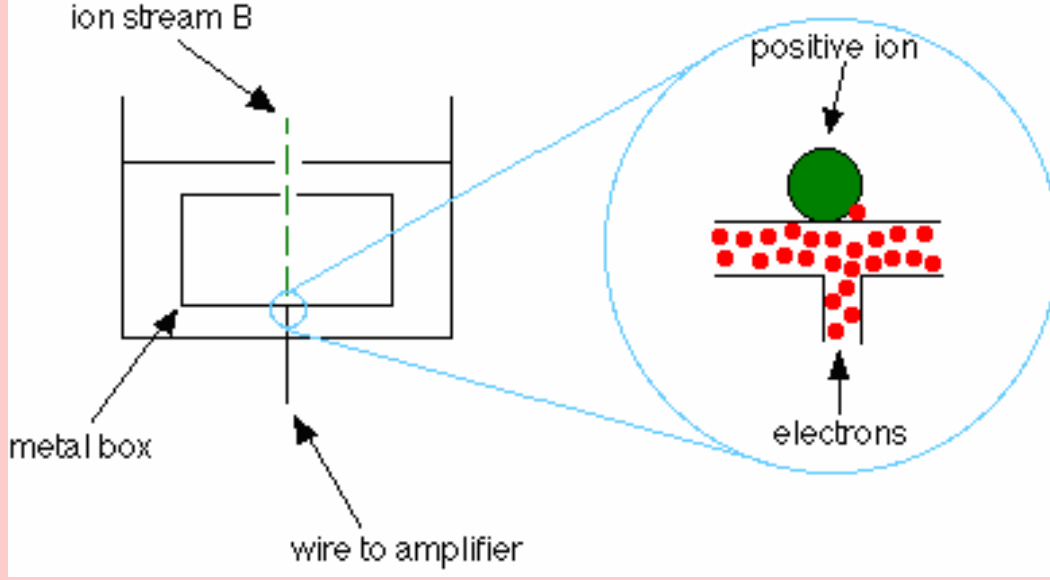


Kütle spektrometresinde iyonlaştırma bölgesinde elde edilen iyonlar, elektrikle yüklü plakalara doğru çekilerek hızlandırılır ve kütle ayırıcısına gönderilir.



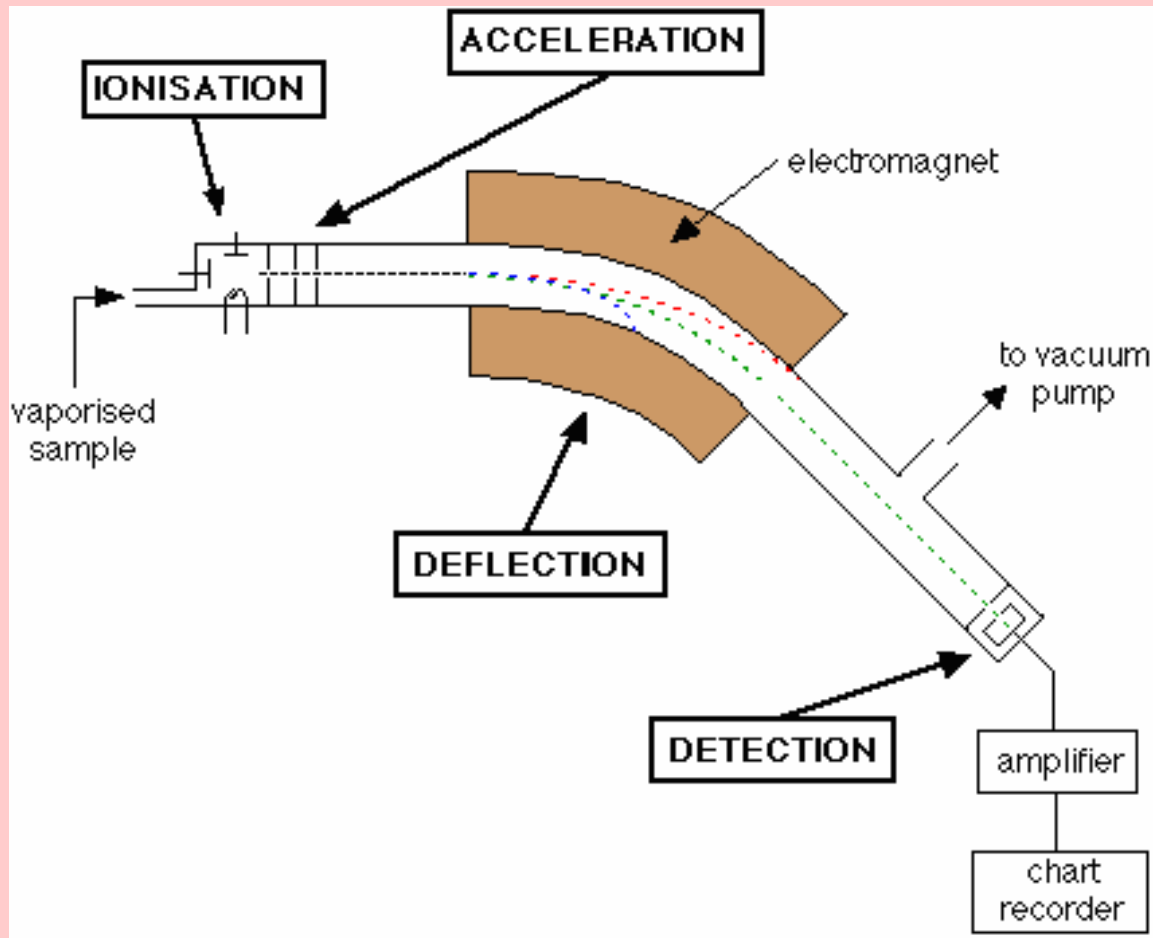
Kütle ayırıcıları, manyetik, uçuş zamanlı, dört kutuplu ve iyon siklotron rezonanslı olmak üzere dört türdür. En çok kullanılan kütle ayırıcısı, manyetik ayırıcıdır.

Kütle spektrometresinde kütle ayırıcısından geçen iyonlar dedektör tarafından algılanır.

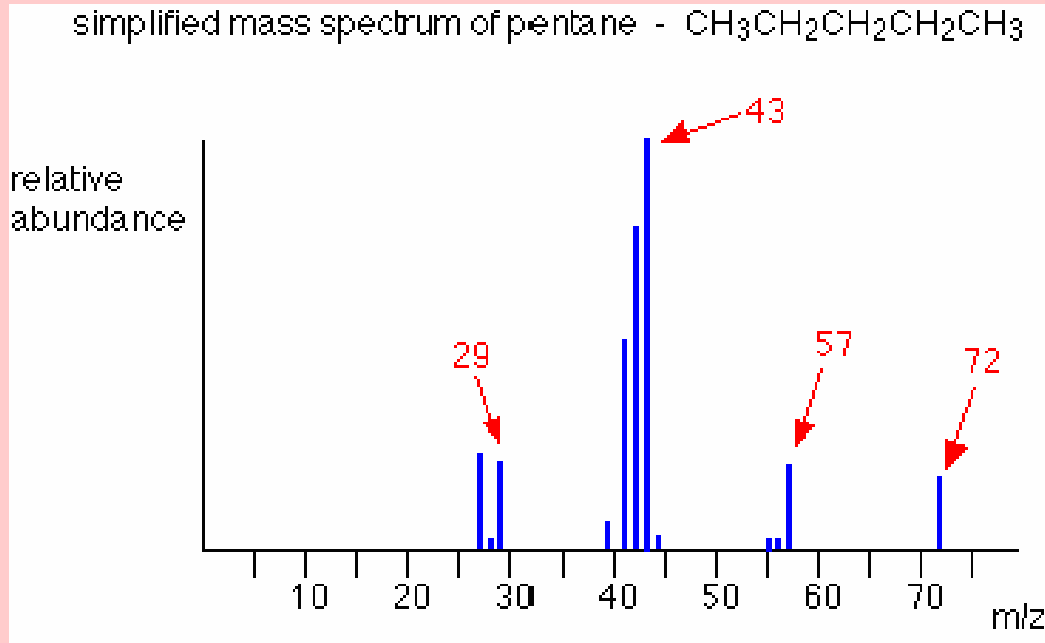


Kütle spektrometresinde iyonları algılamak üzere kullanılan dedektörlerin en basiti, Faraday kabıdır. Bu dedektörde bir iletken kap, spektrometrenin öteki kısımlarına göre negatif bir potansiyelde tutulur ve böylece bu kaba doğru çekilen pozitif yüklü iyonlar elektrik akımını oluştururlar.

Kütle spektrometresinde hem pozitif hem de negatif iyonlar incelenebilir, ancak pozitif iyonların incelenmesi daha yaygın bir uygulamadır.



Kütle spektrometresinde, belli koşullarda elde edilen ve parçalanma ürünlerini içeren kütle spektrumu aynı koşullarda elde edilmiş spektrumlarla karşılaştırılarak molekülün nitel analizi yapılır.



Kütle spektrumunda ölçülen en şiddetli pik, **temel pik** adını alır ve bu, parçalanma ürünleri içinde en kararlı iyon aittir. Öteki piklerin bağlı şiddetleri bu pike göre hesaplanır.

Kütle spektrometresinde gözlenen piklerin yüksekliği örnekte bulunan maddenin derişimi ile doğru orantılı olduğundan bu yöntem, nicel analiz amacıyla da kullanılır. Bu yöntemle nicel analiz, 10^{-9} - 10^{-6} g gibi çok az örnek miktarı ile ve büyük bir duyarlılıkla yapılır.

Kütle spektrometresi ile, alkoloidler, terpenler, steroidler, ilaçlar, petrol ürünlerinin nitel ve nicel analizi yapılabilir. Yöntem, adli tıpta ve uyuşturucu madde analizinde sık kullanılır.



Gaz haline getirilmesi zor olan veya ısıtılınca bozunmaya uğrayan bileşiklerin kütle spektrometrik analizi için uygulanacak bir yöntem, bu bileşikleri belli moleküllerle tepkimeye sokarak uçucu özelliği olan ürünlere çevirmektir.

