

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ**

**ENSTRUMENTAL ANALİZ LABORATUVARI
DENEY FÖYÜ**

Deneyler

- 1- ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRESİ İLE METAL TAYİNİ
- 2- FT-IR SPEKTROSKOPİSİ İLE YAPI KAREKTERİZASYONU
- 3- NMR SPEKTROFOTOMETRİSİ
- 4- TERMAL ANALİZ İLE ORGANİK VE INORGANİK MADDE KARAKTERİZASYONU
- 5-SPEKTROFOTOMETRİ İLE KALİTATİF ANALİZ (UV)
- 6- POTANSİYOMETRİ İLE BAZ ÖLÇÜMÜ
- 7- İNCE TABAKA – KOLON KROMATOĞRAFİSİ
- 8- YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
- 9- GAZ KROMATOĞRAFİSİ
- 10- POLARİMETRİ İLE ÇEVİRİME AÇISININ ÖLÇÜLMESİ

Bu Föyün Hazırlanmasında Katkıda Bulunanalar

Fırat Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlileri &

Abdurrahman ÖKSÜZ

Not: 1- Yukarıdaki deney sırası ile gruplarınızın deney sıralaması farklı olabilir!

2- Bu föyde deneyler ile ilgili verilen bilgiler ön hazırlık amaçlıdır. Yapacağınız deney ile ilgili detaylı bilgilere Enstrumental Analiz kitaplarından ulaşabilirsiniz.

ENSTRÜMENTAL ANALİZ LABARATUVARI ÇALIŞMA VE UYGULAMA ESASLARI

A- GENEL HUSUSLAR

1. Öğrenciler laboratuarda beyaz önlükle çalışmak mecburiyetindedirler.
2. Öğrencinin yapacağı deneye hazır olarak gelip gelmediğini belirlemek amacı ile görevli öğretim elemanı tarafından sözlü sınava tabi tutulur. Sözlüde başarılı olabilmek için her deneyin sonunda yeralan sorulara hazırlıklı olarak gelinmesinde yarar vardır.
3. Sözlüden sonra öğretim elemanının gözetiminde deney hazırlıklarını yapar. Deneyler grup halinde yapılacağı için her öğrencinin deneye katkısına dikkat edilecektir.
4. Deneyin yapılışında önemli hatası olan ve laboratuvar çalışma düzenine uymayan davranışlarda bulunan öğrencilerin o gün yapmakta oldukları deneyleri iptal edilir.
5. Deneyler süreklilik arz ettiğinden derslerde olduğu gibi teneffüs verilmez. Ancak ihtiyacı olanlar deneyin sorumlusu öğretim elemanının bilgisi dâhilinde teneffüs yapabilir.
6. Yapılan deneyin teorik ve pratik yönlerinin kavranıp kavranmadığını belirlemek amacı ile az sorulu küçük bir sınav yapılacaktır. Küçük sınavlar öğleden önceki laboratuvarlar için saat 11.00'den önce, öğleden sonraki laboratuvarlar için saat 16.00'dan önce yapılamaz.
7. Deney ile ilgili rapor bir hafta sonraki derse getirilerek dersin başında ilgili öğretim üyesine teslim edilecektir.

B- CİHAZLARIN KULLANIMI VE BAKIMI

1. Görevli öğretim elemanının bilgisi dışında cihazları karıştırmak kesinlikle yasaktır. Cihazlar kullanma talimatnamesine göre çalıştırılmalıdır.
2. Deney esnasında kullanılan malzeme ve maddeler mutlaka temiz ve uygun bir şekilde görevliye teslim edilmelidir.
3. Deney yapılan masa, malzeme ve cihaz mutlaka deneyden sonra temizlenmelidir.

C- LABARATUVAR ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Sözlü sınavların % 30'u, yazılı sınavların % 40'ı, rapor ve deneysel çalışma performansının % 30'u yıl içi başarı notu olarak alınacaktır. (Deneysel çalışma performansı: Deneylerin gerçekleştirilmesi esnasında öğrencinin deneye olan ilgisi veya ilgisizliğidir).
2. I. Vize notu olarak vize giriş tarihinin sonuna kadar olan süre içerisinde yapılan deneylerin sonuçları verilir. II. Vize notu olarak da benzer şekilde I. Vizeden sonraki deneyleri kapsar.
3. Deney ile ilgili sözlü ve yazılı sınavlar aynı gün yapılacak ancak rapor bir sonraki haftaya getirilmesi zorunludur. Daha sonra getirenlerinki dikkate alınmayacaktır.

D- DENEY RAPORU

1. Deneyler grup halinde yapılmakla beraber raporlar her öğrenci tarafından hazırlanır. Bir başkası yerine rapor hazırlanamaz.
2. Teorik Bilgiler kısmında, genel teorik bilgilere ek olarak deneyin sonunda yeralan soruların teorik olanları da cevaplandırılır.

DENEY RAPORU

Öğrencinin Adı – Soyadı:

Numarası :

Bölümü :

Görevli Öğretim Üyesi veya Asistan

Grup No :

Deneyin Yapıldığı Tarih

DENEYİN AMACI

GENEL BİLGİLER

DENEYİN YAPILIŞI

BULGULAR ve HESAPLAMALAR

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

LABARATUVAR İÇİN GEREKLİ HAZIRLIK

Öğrenciler, labaratuvara gelirken, yapacağı deneylerle ilgili olarak hazırlıklarını yapmaları, deneyin, teorisi ile ilgili bilgi sahibi olmaları, yapacakları deneyin yapılışı ile ilgili işlem basamaklarını öğrenmeleri, yapılacak olan deneyler sırasında, karşılaşılabilecek olan aksaklık ve tehlikelerin ile bunların olmaları halinde, yapılacak olan müdahaleleri öğrenmeleri, elde edilen deney sonuçlarını değerlendirecek şekilde hazırlıklı gelinmelidir. Labaratuvara, kesinlikle önlüksüz, ve güvenlik gözlüğü olmadan gelinmemelidir.

TEMİZLİK

Çalışma alanınızı mutlaka temiz tutunuz. Bu kazaların önlenmesi ve deneylerin daha iyi yürütmesi için oldukça önemlidir. Çalışma masanızda sadece laboratuvar kitabınızı ve defterinizi bulundurunuz. Diğer çanta ve malzemelerinizi tezgahın üzerine bırakmayınız. Terazi ve deney cihazları gibi aletlerin yanını ve kendisini kullanmadan önce ve sonra mutlaka temizleyiniz. Laboratuvar bitiminde nöbetçi olan öğrenciler ve asistanlar temizlik kontrollü yapacaklardır. Temizlik amacı ile her öğrenci mutlaka söylenecek olan malzemeleri getirmek zorundadır.

GENEL GÜVENLİK

Laboratuvarda sorumlu herhangi kişi olmadığı taktirde kesinlikle çalışmak yasaktır. Kapalı sistemleri kesinlikle ısıtmayınız. Tüp veya balonu ısıtmak gerektiğinde kendinize veya başka birine doğru tutmayınız. Belirlenmemiş deneyleri yapmayınız. Radyo, telefon ve benzer ses cihazlarının laboratuvarda kullanımı yasaktır. Uzun saçlar arkada mutlaka bağlı olmalı, terlik ve sandalet gibi giyeceklerin laboratuvarda giyilmesine müsaade edilmeyecektir. Kimyasal atık ve kırık cam malzemeler yaralanmaya neden olacağı için çöpe ve lavaboya atılmamalı mutlaka asistanınızın söyleyeceği yere koymalısınız. Kaban, pardösö, mont gibi kıyafetlerinizi laboratuvar girişinde bulunan askılıklara asmanız gerekmektedir. Daha önceden hırsızlık olayları ile karşılaşıldığı için **kıymetli eşyalarını** mutlaka yanınıza alınız, laboratuvarda ve diğer yerlerde bırakmayınız.

LABARATUAR ÖNCESİ

Laboratuara gelmeden önce deneyin adını, deney öncesi bilgileri, mümkün olan reaksiyonları, formülleri ve deneyde dikkat etmeniz gereken noktaları yazınız. İyi bir hazırlık güvenli ve etkili bir laboratuvar çalışması için gereklidir. Bu nedenle her yeni deneye başlarken önce laboratuvar giriş sınavı yapılacaktır. Hocalarınız tarafından yeterli bulunmadığınız takdirde deneye başlatılmayacaktır. Genel bilgileri kitapta verildiği gibi aynen yazmayınız. Kendiniz anladığınız şekilde özet çıkartınız.

LABARATUVAR ESNASINDA

Notlarınızı temin ediniz. Deney esnasında meydana gelen değişiklikler, gözlemler, ve dikkat edilmesi gereken notları not ediniz? Deney esnasında sonuçları anlamak ve meydana gelen ve gelebilecek gözlemlerinizi de detaylı bir şekilde not ediniz. Düzgün bir not tutulduğunda yaptığınız çalışmaları görmeniz daha öğretici olacaktır. Nöbetçi grup laboratuvardan çıkmadan temizliğini yapmalıdır.

BİR SONRAKİ HAFTA

Daha önceki deneye ait bilgiler tamamlanacaktır. Yeni bir çalışmaya başlamadan önce asistanınıza bunlar teslim edilecektir. Geç teslim etmeniz halinde deney rapor notunuz olmayacak. Geçerli bir nedeniniz ve özel bir durumunuz olması durumunda asistanınıza bunu bildirmeniz gerekmektedir.

DENEY 1

ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRESİ İLE METAL TAYİNİ

DENEYİN AMACI

Çözelti halindeki örneklerde eser halde bulunan metallerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması.

DENEYİN YAPILIŞI

Alevli atomlaştırıcı kullanılarak kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme yöntemleri ile çinko tayini.

Atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazı açılır. Çinko oyuk katot lambası takılarak 214 nm'ye ayarlanır ve lambanın ısınması için 30 dk. beklenir.

Yarık 0.5 nm olacak şekilde ayarlanır.

Ayar eğrisi için önceden hazırlanan 0.1 ile 1 ppm arasında altı ayrı çözelti (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ppm) için absorbans değerleri okunur. Bilinmeyen örneğin de absorbansı okunarak kalibrasyon eğrisinden örneğin konsantrasyonu bulunur.

25 ml lik dört balonjoje'ye 2.0 ml bilinmeyen örnekten konur. 1. balonjoje su ile 25 ml'ye tamamlanır. 2, 3 ve 4. balonjoje'ye 1 ppm'lik standart çözeltiden sıra ile 2, 4 ve 8 ml eklenerek su ile 25 ml'ye tamamlanır.

Bu çözeltilerinden absorbans değerleri okunarak eklenen standart derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilir. Doğrunun x ekseninin uzantısının kestiği bilinmeyen numunenin derişimine karşılık gelir. Başlangıçtaki numunenin kaç defa seyreltildiği vs. dikkate alınarak gerekli düzeltmeler yapılır.

DENEY İLE İLGİLİ SORULAR

Atomik absorpsiyon spektroskopisinin esasını açıklayarak, aletin şemasını çiziniz.

Atomik absorpsiyon spektroskopisinde alevde meydana gelen olayları şematize ederek açıklayınız.

Oyuk katot lambasının çalışma prensibini açıklayınız.

Girişim nedir, AAS'de kaç tür girişim vardır, kimyasal girişimi açıklayınız.

FT-IR SPEKTROSKOPİSİ İLE YAPI KARAKTERİZASYONU

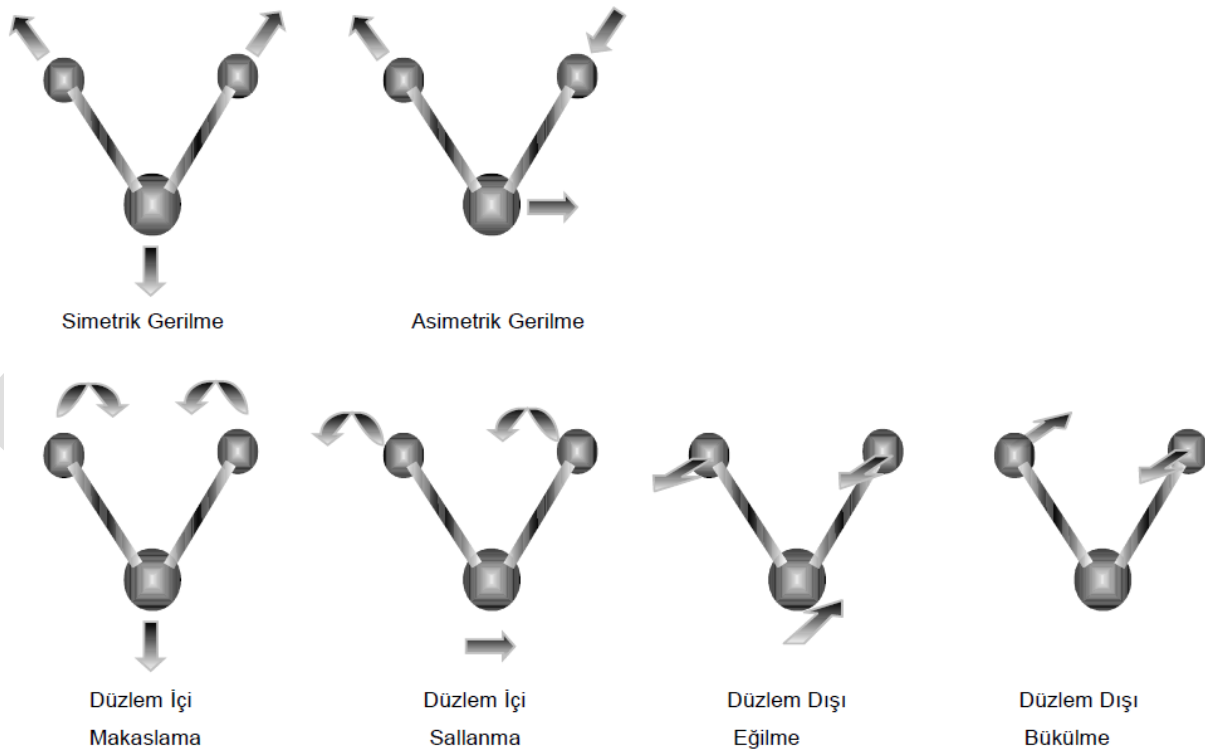
DENEYİN AMACI

Herhangi bir saf maddenin IR spektrumunu alıp gözlenen bantlardan faydalanarak yapısında hangi fonksiyonel grupların bulunduğunu ve molekül içindeki bağ türlerinin neler olduğunu anlamaktır.

GENEL BİLGİLER

İnfrared spektroskopisi, maddenin infrared ışınlarını absorblaması üzerine kurulmuş olan bir spektroskopi dalıdır. IR spektroskopisi, daha çok yapı analizinde kullanılır ve çoğu kez elektronik (UV) ve NMR, spektroskopileriyle birlikte uygulanır. Bir maddenin FT-IR spektrumu UV spektrumlarına göre daha karmaşıktır. Bunun nedeni IR ışınları enerjilerinin moleküllerin titreşim enerji seviyelerinde ve molekülde birçok titreşim merkezlerinin olmasıdır. IR spektrumu veren maddelere IR aktif maddeler denir. Bunlar yük dağılımı asimetrik olan dipol moleküllerdir. Bir başka ifadeyle N_2 , O_2 gibi homonükleer olan moleküller hariç bütün moleküller IR ışınlarını absorblarlar ve bant verirler. IR spektroskopisinde ışınlar dalga sayılarıyla (cm^{-1}) verilir. IR spektrumunda genellikle 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} aralığında görülen bantlar %geçirgenlik veya abrobans'a karşı kaydedilir. IR spektrumunda $4000-1500\text{ cm}^{-1}$ aralığına fonksiyonel grup bölgesi, $1500-600\text{ cm}^{-1}$ aralığına da parmak izi bölgesi denir. IR spektrumu değerlendirilirken geliştirilen korelasyon tablolarından, çeşitli organik ve inorganik yapı tayini ile ilgili kaynaklardan yararlanılır.

FT-IR da titreşimler genel olarak iki grupta incelenebilir.



1. İki atom arasındaki bağ eksenini boyunca yalnızca atomlar arasındaki uzaklığın değiştiği gerilme titreşimleri;

a) Asimetrik gerilme, b) Simetrik gerilme

2. İki bağ arasındaki açılardan en az birinin değiştiği eğilme titreşimleri.

a) Makaslama b) Sallanma c) İleri geri eğilme d) Bükülme

IR Spektrometresi: Bir IR Spektrometresi ışık kaynağı, monokromatör ve dedektör olmak üzere üç ana kısımdan oluşur.

IR Spektrometrelerinde kaynaktan çıkan ışınlar küresel aynalar yardımıyla ikiye ayrılarak yarısı numuneden öteki yarısı ise referanstan geçirilir. Referans ışını ve numuneden çıkan ışın monokromatörde dalga boylarına ayrılarak dedektör üzerine düşer ve elektrik sinyaline çevrilir.

Numune hazırlama teknikleri: Gaz, sıvı, katı veya çözeltinin IR spektrumunu almak mümkündür

Gazlar: Gazların veya kaynama noktası düşük sıvıların spektrumları, numunenin boş bir hücreye genişletilmesi ile alınabilir.

Sıvılar ve çözeltiler: Saf sıvılar iki geçirgen levha arasına 0.01 mm veya daha ince bir film halinde sıkıştırılarak hazırlanır. Bu işlem için 1-10 mg numune yeterlidir ve NaCl, AgCl gibi levhalar kullanılır.

Çözeltiler ise geçirgen pencereleri olan 0.1-1 mm kalınlıktaki hücrelere konur.

Katılar: Katı numuneler KBr disk halinde incelenebilir. KBr diskinin hazırlanması için 0,5-1.0 mg numune agat bir havanda iyice toz haline getirilir. Bunun üzerine, yaklaşık 100 mg toz haline getirilmiş kuru KBr konur ve gene iyice ezilerek ince, homojen bir karışım yapılır. Bu karışımdan uygun miktarda alınarak havası çekilebilen preste ince şeffaf disk haline getirilir.

DENEYİN YAPILIŞI

Bilinmeyen organik bir numunenin FT-IR spektrumu kaydedilir ve ortaya çıkan FT-IR bantlarından organik bileşiğin yapısı teşhis edilir. Bu amaçla, çeşitli kaynaklardan, IR atlaslarından, bileşikle ilgili varsa diğer spektroskopik veriler ve fiziksel özelliklerinden yararlanılabilir.

DENEYLE İLGİLİ ÇALIŞMA SORULARI

- 1) Infrared Spektroskopisinin (IR) temelini açıklayınız.
- 2) Infrared, elektromagnetik spektrumun neresinde yer alır?
- 3) IR spektroskopisi daha çok hangi alanda kullanılır?
- 4) N₂, O₂, Cl₂ gibi moleküller Infrared spektrumu verirler mi? tartışınız.
- 5) IR spektroskopisini NMR spektroskopisi ile kıyasladığınızda avantaj ve dezavantajlarını tartışınız.
- 6) Karbonil grubu taşıyan organik bileşiklerde C=O gerilmesi 1640 cm⁻¹ ile 1920 cm⁻¹ aralığında değişmektedir. Örneğin metil asetatındaki C=O gerilmesi 1774 cm⁻¹'de bant verirken, asetamitteki C=O gerilmesi 1650 cm⁻¹'de bant vermektedir. Buna göre

C=O gerilmesinin geniş bir aralığa yayılması ile bantların şiddetli olmasının nedenini yorumlayınız.

- 7) IR de numune alma teknikleri nelerdir?
- 8) Bilinmeyen bir organik maddenin yapısını IR ile nasıl karakterize edersiniz?
- 9) IR spektral bölgeler nelerdir?
- 10) C=C, C=O, C=N-, C=S bağlarının titreşim enerjilerinin büyüklük sırasını yazınız
- 11) Siklohekzen, siklopenten, siklobüten ve siklopropan bileşiklerinin formüllerini yazarak C=C titreşim frekanslarını karşılaştırınız.
- 12) Organik bileşiklerden birinin alkol diğerinin karboksilik asit olduğunu IR ile nasıl ayırt edersiniz.
- 13) IR deki bantların bazılarının şiddetli, bazılarının orta şiddette bazılarının da zayıf şiddette olmasının nedenini tartışınız.
- 14) IR spektrumunda görülen bir bandın dalga sayısını nasıl belirlersiniz.
- 15) IR ışınlarının zararlı olup olmadığını açıklayınız.
- 16) IR'nin çalışma prensibi nedir?
- 17) IR de titreşim modelleri nelerdir?
- 18) IR spektrumundaki başlıca bölgeler nelerdir?
- 19) Numune hazırlarken KBr ve NaCl kullanmanın avantajları nelerdir?
- 20) IR ışınları elektromanyetik spektrumun hangi bölgeleri arasında yer alır? Kısaca anlatınız.
- 21) Bir molekülün IR ışını absorplayabilmesi için gerekli şartlar nelerdir? IR ışının absorplanması molekülde ne tür fiziksel ve kimyasal değişmelere yol açar? Açıklayınız.
- 22) IR Spektroskopisi anorganik maddelerin analizi yapılır mı?
- 23) Moleküler titreşim hareketleri kaç'a ayrılır? Açıklayınız.
- 24) Hooke kanunu ile titreşim frekansı nasıl bulunur? Açıklayınız.
- 25) 6. IR Spektroskopisinde bant türlerini sınıflandırarak kısaca tanımlayınız.
- 26) IR'de katı, sıvı ve gaz örnekler için spektrum alma tekniklerini anlatınız.
- 27) Bir IR spektrometresinin temel parçaları nelerdir? Kısaca açıklayınız.
- 28) IR'de absorpsiyon bölgeleri kaç'a ayrılır? Kısaca açıklayınız.
- 29) IR spektrumunu etkileyen faktörler nelerdir? Kısaca açıklayınız.
- 30) IR spektroskopisinin uygulama alanları hakkında kısaca bilgi veriniz.

NMR yönteminin temeli çekirdeğin manyetik özelliğine dayanır. Bu yöntemde ışın enerjisi elektronlar tarafından değil çekirdek tarafından absorplanmaktadır.

Atomda bulunan çekirdek kendi eksenini etrafında bir dönme hareketi yapar. Çekirdek pozitif yüklü olduğu için çekirdeğin sahip olduğu yükte bu dairesel yörüngede hareket eder. Bu yörüngesel hareket elektrik akımı oluşturur. Her elektrik akımı çevresinde manyetik bir alan oluşturur. Çekirdek kendi eksenini etrafında döndüğü için açısal momentuma da sahiptir.

Elektronlarda olduğu gibi çekirdeklerde de spin kuantum sayıları vardır. Çekirdeğin *spin kuantum sayısı* I , çekirdekte bulunan proton ve nötronların sayısına göre değişmektedir. Spin kuantum sayısı bir elementin izotopları için farklı değerler alır. Çekirdekte bulunan nötron ve proton sayısına göre spin kuantum sayıları belirlenemez. Fakat aşağıdaki kurallarla açıklanabilir.

1) Çift-çift çekirdek: Kütle ve atom numaraları çift olan elementler. ^{12}C , ^{16}O örnek verilebilir. C'un çekirdeğinde 6 proton , 6 nötron bulunur . Bu gruba dahil olan tüm izotopların spin kuantum sayıları $I = 0$ dır.

2) a) Tek –tek çekirdekler: Kütle ve atom numaraları tek olan elementler. Bu gruptaki elementlerin proton sayıları tek, nötron sayıları çifttir. ^1H , ^{11}B , ^{19}F , ^{31}P izotopları örnek verilebilir. H'in 1 protonunu sıfır nötronu vardır. Florun 9 protonu (tek) ve 10 nötronu (çift) vardır.

b) Tek-çift çekirdekler: Kütle numaraları tek, atom numaraları çift olan elementler. Bu gruptaki elementlerin proton sayıları çift, nötron sayıları tektir. ^{13}C , ^{17}O , ^{33}S izotopları örnek verilebilir. C 'un 6 protonunu (çift), 7 nötronu (tek) vardır.

2a ve 2b deki elementlerin spin kuantum sayıları $I = \frac{1}{2}$ ve bunun tek katlarıdır.

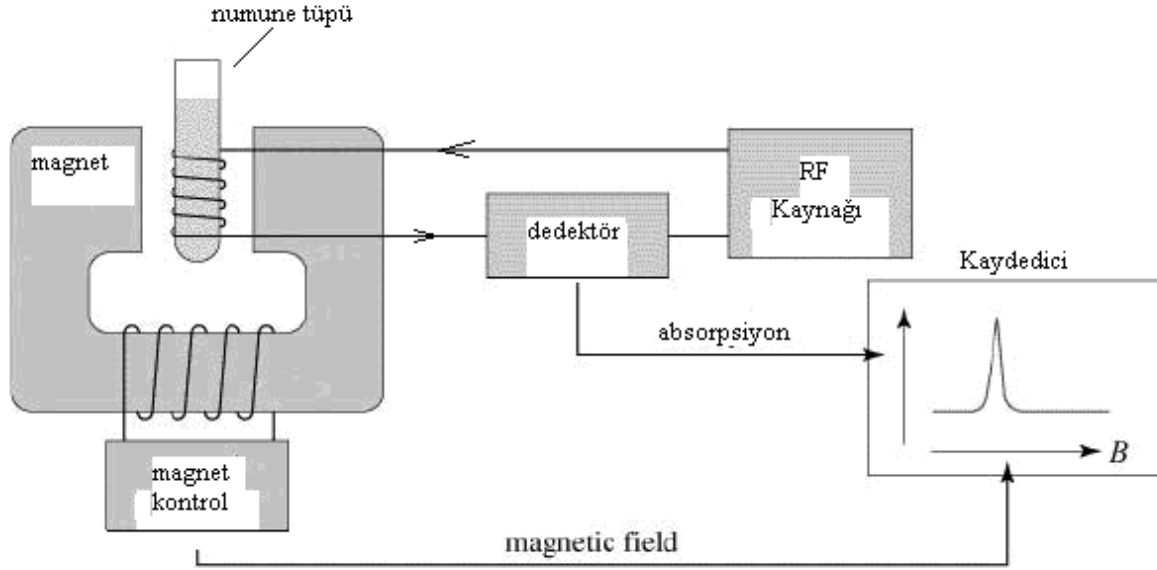
$I = 1/2, 3/2, 5/2, 7/2, 9/2 \dots\dots$ gibi

3) Çift-tek çekirdekler: Kütle numaraları çift, atom numaraları tek olan elementlerdir. Bu gruptaki izotopların nötron ve proton sayıları tektir. $^2\text{H(D)}$, ^{10}B , ^{14}N , ^{18}O örnek olarak verilebilir. H'in 1 (tek) protonu ve 1(tek) nötronu bulunmaktadır. Bu gruptaki elementlerin spin kuantum sayıları tam sayılardan oluşmaktadır.

$I = 1, 2, 3, 4, \dots\dots\dots$ gibi

NMR spektrofotometresi 4 ana bölümden oluşur.

- 1) Kutup uçları arasında yüksek derecede homojen alan içeren mıknatıs
- 2) Radyo frekans vericisi
- 3) Radyo frekans alıcısı
- 4) Kaydedici



Örnek (proton içeren herhangi bir bileşik) homojen alan içerisine koyulur. Daha homojen bir alan elde etmek için numune döndürülür. Manyetik alanda proton farklı enerji seviyelerine dağılır. Radyo frekans vericisi tarafından oluşturulan değişken alan numune üzerine gönderilir. Radyo frekans vericisinin oluşturduğu değişken alanın frekansı rezonans koşulunu sağladığı zaman enerji absorplanır. Böylece kaybolan enerji radyo frekans alıcısı tarafından ölçülerek kaydedici tarafında sinyal olarak kaydedilir.



Bir NMR spektrogramu bize şu bilgileri verebilir:

- 1) NMR spektrogramunda kaç çeşit proton olduğunu
- 2) Sinyal gruplarının yerleri protonun türünü gösterir (aromatik, alifatik, olefinik)
- 3) Sinyal gruplarındaki yarılmalar komşu gruptaki proton sayısını ve bağ özelliğini verir.
- 4) Sıcaklık değiştirilerek moleküldeki bulunan prosesler belirlenebilir
- 5) Sinyal gruplarının altında kalan alanların integrasyonu, protonların sayıları hakkında bilgi verir.

Örnek Hazırlama

NMR spektrometresinde standart olarak genellikle tetrametilsilan (TMS) kullanılır. Bu maddenin standart olarak seçilmesinin sebebi ucuz olup alımının kolay olması, kimyasal maddeler ile reaksiyona girmemesi, kaynama noktasının 15°C olduğundan spektrum alındıktan sonra numunenin hafif ısıtılması veya çözücünün vakum ile uçurulması ile kolayca ortamdan uzaklaşması ve 12 tane eşdeğer protona sahip olduğundan çok az kullanımında bile şiddetli sinyal vermesidir.

CW tekniği (değişken dalga) ile çalışsan NMR cihazlarında 10-50 mg madde, FT tekniği (Fourier Transform) ile çalışan cihazlar için ise 1 mg madde analiz için yeterlidir. Numune uygun bir çözücünde çözülürken sonra içerisinden alınan 0.5 mL çözelti az miktarda TMS ile karıştırılarak çapı 5 mm uzunluğu 18 cm olan NMR tüplerine koyulur. Çözücünde seçilirken protonunun olmamasına veya tüm proteinlerinin döteryumla yer değiştirmiş olmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca çözücünün polaritesinin numuneyi çözmeye uygun olması da gerekmektedir. Bu parametreler göz önüne alındığında CDCl₃ bu yöntem için en iyi çözücüdür.

Kullanılan NMR çözücüler

Proton NMR spektrofotometresinde örnek hazırlama sırasında kullanılan çözücünün yapısında bulunan proton (H), alınan spektrumda hatalara neden olacağından döterolanmış çözücüler ile çalışılması zorunludur. Uygulamaların doğru sonuç vermesi ve yöntemin hassasiyeti kullanılan bu döteryumlu bileşikler ile doğrudan ilişkilidir.

Merck firması tarafından üretilen döterolanmış ürünler yüksek saflıkta, güvenilir döterolanma derecesine sahip, içerdiği su miktarı son derece düşük ve yüksek izotop zenginliğine sahiptir. Bu kimyasalların içerdikleri su miktarı NMR ve Karl Fischer yöntemi ile tespit edilmiştir.

Bu yöntemde spektral absorpsiyon çizgilerinin kayma değerleri kullanılan çözücüye bağlıdır.

Bilinmeyen örneklerin analizi referans maddeler ile karşılaştırılırken hem bilinmeyen örneğin hem de referans maddesinin aynı çözücü içerisinde hazırlanmış olmasına dikkat edilmelidir. Farklı çözücüler kullanıldığında aynı maddenin pikleri farklılık göstermektedir. Etanol buna verilebilecek en güzel örnektir.

TERMAL ANALİZ İLE ORGANİK VE INORGANİK MADDE KARAKTERİZASYONU

DENEYİN AMACI

Uygun bir organik ya da inorganik maddenin termogravimetri (TG) ile termal kararlılık ve ağırlık değişimini, Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ile de faz dönüşümlerinin incelenmesi.

GENEL BİLGİLER

Termal Analiz, numune sıcaklığı kontrollü bir şekilde değiştirilirken numunenin herhangi bir fiziksel özelliğinin (ağırlık, absorplanan ya da açığa çıkan ısı, boyut, iletkenlik, magnetik özellik v.s) sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü yöntemleri içerir. Bu yöntemler; DTA (diferansiyel termal Analiz), DSC (Diferansiyel Skanning Kalorimetri), TG (Termogravimetri), TMA (Termo Mekanik Analiz), STA (Simultanes Termal Analiz), TAM (Termoakustimetri), ETA (Elektrotermal Analiz) gibi teknikleri kapsamaktadır. Termal analiz aletleri modüler tasarımda TG/DTG/DTA kayıtları; aynı fırın, programlayıcı, yazıcı sistemi kullanılarak aynı numune veya farklı deneylerdeki numuneler için aynı anda eğriler elde edilebilir. Burada kontrollü bir program uygulanmaktadır. Bu nedenle araştırmacı uygulanacak çalışma şartlarını başında ayarlayabilir. Bunlar; a) dinamik çalışma yani değişik ısıtma hızları, soğutma hızları (örneğin $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ yani dakikada 10°C sıcaklığı artırma), b) İzotermal (sabit sıcaklıkta ısıtma) çalışmadır.

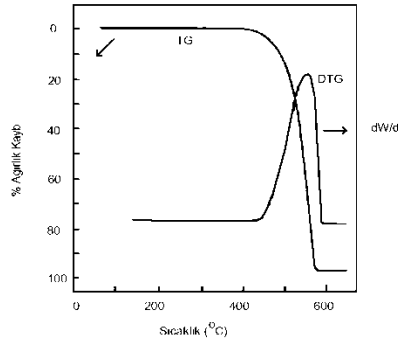
Termal metotların uygulanma alanları:

Termal sabitlerin tayini (erime, kristalizasyon, yumuşama sıcaklığı gibi), faz dönüşümlerinin araştırılması, yapı dönüşümleri, termal kararlılık, termal bozunma, kalite kontrol-saflık tayini, kalitatif ve kantitatif analiz, maddelerin termal karakterizasyonu, hidratasyon-solvatasyon ve koordinasyon etkiler, kinetik çalışmalar, termodinamik incelemeler gibi oldukça yaygın uygulanma alanlarına sahiptir.

Termal Metotlar

a) Termogravimetri Analiz (TGA): Kontrollü ısıtma programına tabi tutulan bir numunenin ağırlığının sıcaklıkla değişiminin ölçüldüğü bir tekniktir. Ağırlık değişimi W ya da %ağırlık kaybı zaman ya da sıcaklığın bir fonksiyonu olarak grafiğe alınır. Ölçüm sonucunda verilerin kağıda dökülmüş haline termogram denir.

b) Derivativ Termogravimetri (DTG): TG sonuçlarının zamana veya sıcaklığa göre birinci türevlerinin alınması ile elde edilen eğrilere denir. DTG eğrilerinde ordinatta, dw/dt , yani ağırlık kaybı hızı, apsiste sıcaklık bulunur. (tipik bir TG ve DTG eğrileri Şekil 1 de verilmiştir).

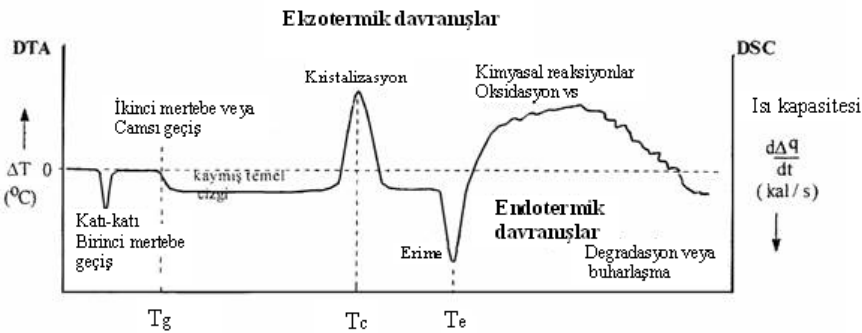


Şekil-1 Temsili TG ve DTG eğrileri

c) Diferansiyel Termal Analiz (DTA): Isıtılan bir örneğin referans bir maddeye göre sıcaklık değişiminin (ΔT) sıcaklık veya zamana karşı grafiğidir. Örnek ile referans maddesi arasındaki bir sıcaklık farkı örnekte bir kimyasal tepkime, faz değişimi veya yapısal değişim gibi bir olay gerçekleştiği zaman gözlenecektir. Eğer bu olayda ΔH pozitif ise (endotermik tepkime), örnek sıcaklığının referans maddesinin gerisinde kalacak, ΔH negatif ise (ekzotermik tepkime) örnek sıcaklığı referansinkini aşacaktır.

d) Diferansiyel Scanning Kalorimetre (DSC): Isıtılan bir örneğin referans bir maddeye göre sıcaklık değişimini (ΔT) ortadan kaldırmak için gerekli ısının sıcaklık veya zamana karşı grafiğidir. DSC de, örnek ve referans maddesine aynı sıcaklık programı uygulanırken, örnekte bir değişiklik olması halinde, örneğe veya referansa bir elektrik devre yardımıyla dışarıdan ısı eklenerek her ikisinin de aynı sıcaklıkta kalması sağlanır. Referans madde olarak çoğunlukla alüminyumoksit, magnezyumoksit gibi verilen ısı ile sadece sıcaklığı yükselen başka hiçbir fiziksel ve kimyasal dönüşüm olmadığı maddeler kullanılır. Temsili bir DTA ve DSC eğrisi Şekil-2 de gösterilmiştir.

Özetle, DTA/DSC yöntemleri ısıtılan veya soğutulan bir numunede ortaya çıkan enerji değişimlerini tespit eder.



Şekil-2. Şematik olarak gösterilen DSC ve DTA eğrileri

DTA ile DSC arasındaki önemli farklar:

DSC de numune ve referans maddelerin ayrı ayrı kendi ısıtıcıları ve kendi sıcaklık sensörleri vardır. Oysa DTA da numune ve referansın her ikisi de aynı kaynaktan ısıtılmaktadır.

DSC'de numune ve referans'a aktarılan ısı hızı elektriksel olarak kontrol edilerek her ikisinin de sıcaklıkları aynı tutulmaktadır.

e) Termomekanik Analiz (TMA): Sıcaklıkla boyutlardaki değişimi inceler. Özellikle polimer, metal ve camların incelemesinde oldukça önemlidir.

DENEYİN YAPILIŞI

a) TGA ölçümü için 10 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, PVC veya bilinmeyen organik kökenli bir numune örneği dikkatlice tartılıp oda sıcaklığından 500°C ye kadar $10^\circ\text{C}/\text{dak}$. Hızla azot atmosferinde ısıtılır.

b) DTA için 10 mg benzoik asit alınıp oda sıcaklığından 300°C ye kadar $20^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızı ile azot atmosferinde ısıtılır.

DENEY İLE İLGİLİ ÇALIŞMA SORULARI

- 1) Termal metotların uygulama alanları nelerdir?
- 2) Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ile Diferansiyel Scanning Calorimetre (DSC) arasındaki farkı açıklayınız.
- 3) Termogravimetrik eğrileri etkileyen faktörler nelerdir?
- 4) DSC'nin çalışma prensibini açıklayınız.
- 5) Sıcaklık ile ısı arasındaki fark nedir?
- 6) Termogram nedir? Kısaca açıklayınız.
- 7) NH_4NO_3 tamamen bozunduğunda 2 mol NH_3 ve 1 mol H_2O 'a ayrılmaktadır. Böyle bir bozunmada ağırlık azalması % kaçtır?
- 8) $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 600°C 'ye kadar iki basamaklı bozunma eğrisi göstermektedir. İlk basamak $80-200^\circ\text{C}$ arasında %12.3 ağırlık azalması gösterirken, ikinci basamak $380 - 500^\circ\text{C}$ arasında % 30.1 ağırlık azalması gösteriyor. Buna göre, gerekli eğriyi çizerek bozunma mekanizmasını gösteriniz.
- 9) Simulten tekniği örnekleyerek açıklayınız.
- 10) Kontrollü ısıtma programına tabi tutulan bir numunenin ağırlık değişiminin ölçüldüğü bir tekniktir. Bu tekniğe ne ad verilir?
- 11) Numune sıcaklığı ile inert referans madde sıcaklığı arasındaki sıcaklık farkının (ΔT) sıcaklıkla veya zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülen tekniğe ne ad verilir?
- 12) Termal analizde bir numunenin analizi nasıl yapılır? İstedığınız bir teknik üzerinde açıklayınız.
- 13) DTA da Ekzotermik olaylar yukarıya doğru uzanan pikler verirken aşağıya doğru Endotermik pikler verir. Numunede meydana gelen olaylarda $\Delta T > 0$ ise egzotermik, $\Delta T < 0$ ise endotermik olarak kabul edilmiştir. Buna göre egzotermik ve endotermik enerji ölçümlerinin temel mantığı nedir?
- 14) Bilinmeyen saf bir katı örneğin ne olduğu araştırılmak isteniyor. Bir araştırmacı olarak, böyle bir numuneyi termal analizle nasıl karakterize (tanımlar) edersiniz?
- 15) Termal analizde kullanılan numune kapları hakkında bilgi veriniz.
- 16) Kristal bir maddenin erime sıcaklığını, erime ısısını, kristalizasyon sıcaklığını hangi aletle ölçersiniz. Bu verileri örnek bir termogram üzerinde gösteriniz.
- 17) Amorf bir madde ile kristal bir maddeyi termal analizle nasıl farklılaştırırsınız?
- 18) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'ın TGA termogramı üzerinde kütle kayıplarını teorik ve deneysel olarak gösteriniz.

DENEY 5

SEKTRFOTOMETRE İLE KALİTATİF ANALİZ

DENEYİN AMACI

UV görünür bölge spektrofotometresi ile karışım halinde bulunan iyon veya bileşiklerin kantitatif olarak tayin edilmesi.

GENEL BİLGİ:

UV görünür bölge spektrofotometresi çalışma ilkesi: Moleküler absorpsiyon spektroskopisi 110-1100 nm dalga boyları arasındaki ışığın b ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçümüne dayanır. Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır, bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır. UV/GB spektroskopisi çok sayıda organik ve inorganik bileşiğin analizinde kullanılmaktadır.

UV/GB bölgesindeki geçişler:

π , σ ve n orbitalleri arasındaki geçişler (organik moleküllerde)

d ve f orbitalleri arasındaki geçişler (koordinasyon komplekslerinde)

Yük aktarım geçişleri (hem organik moleküller ve hem de komplekslerde)

π , σ ve n orbitalleri arasındaki geçişler

Organik bileşiklerde 185 nm den daha düşük dalga boylu ışınları absorplayan geçişleri incelemek zordur, çünkü vakum UV bölgesine düşer.

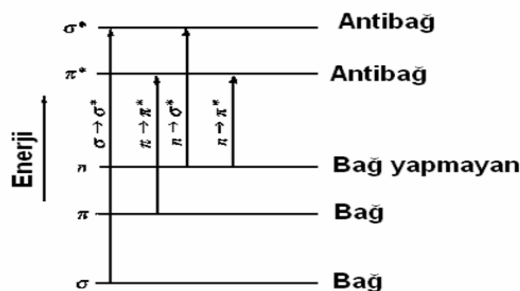
Bir organik molekülde absorpsiyona neden olan elektronlar şunlardır;

bağ elektronları (π ve σ bağ orbitallerindeki elektronlar)

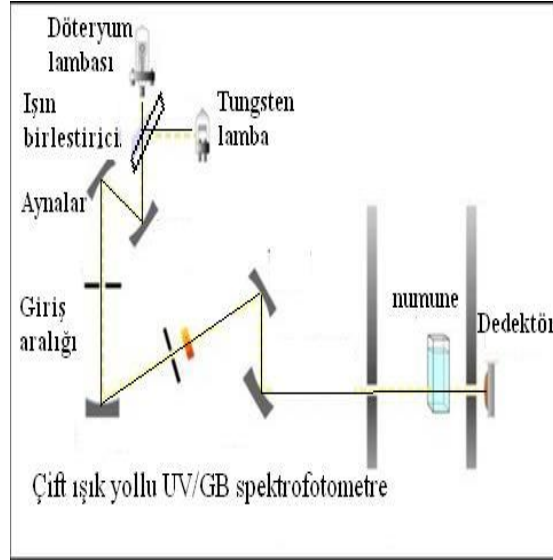
Oksijen, kükürt, azot, halojenler gibi atomların çevresinde bulunan ortaklanmamış elektron çiftleri (n bağ yapmayan orbitaldeki elektronlar)

Çoğu kez, bağ yapmayan orbitalin enerji seviyesi, bağ ve antibağ (karşıbağ) orbitallerinin enerji düzeylerinin arasında yer alır. Şekilde gösterildiği gibi, organik moleküllerde dört tür elektronik geçiş olasıdır:

$\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, ve $\pi \rightarrow \pi^*$.



UV/GB Spektrofotometre kısımları:



Tek ışık yollu spektrofotometrelerde aynı dalga boyunda çözücüye karşı ışık yolu kapatılarak sıfır geçirgenlik ayarı ve de ışık yolu açılarak %100 geçirgenlik ayarı yapılır. Aynı dalga boyunda analit içeren çözeltinin absorpsansı ölçülür.

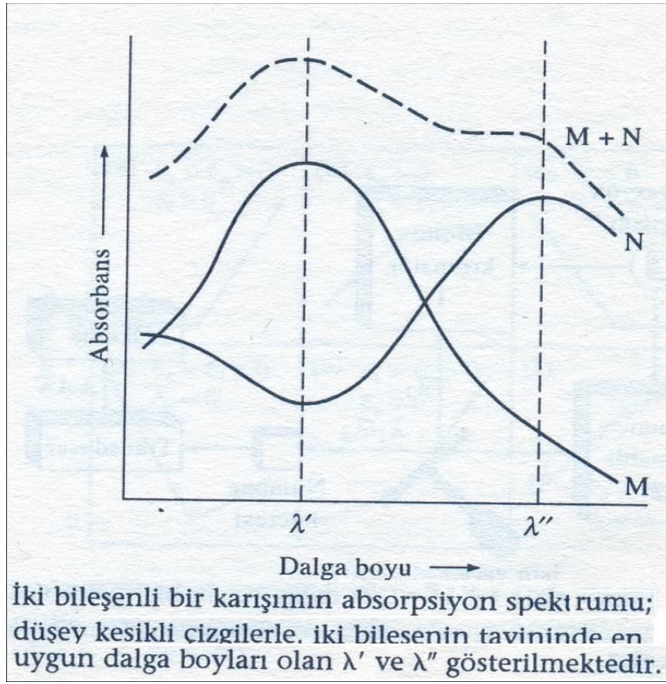
Çift ışık yollu cihazlarda her dalga boyu için ayrı ayrı 0 ve 100 ayarları yapmak yerine, monokromatörden çıkan ışık eşit şiddete iki demete bölünerek birinin ölçülecek örneğe diğerinin çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesiyle ölçüm süresi azaltılır. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur.

Işık Kaynakları UV ve GB de Döteryum, W, H₂, Civa buhar ve Xe lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Tungsten (W) lambası görünür ve yakın IR arasında ışık yayar. Elektrik akımı ile ısıtılan tungstenden yayılan ışık bir siyah cisim ışıması olup, 320 nm ile 3000 nm arasındaki bölgeyi kapsar. UV bölgede en çok kullanılan (180-380 nm) hidrojen ve döteryum elektriksel boşalım lambalarıdır. Düşük basınçta (5 mmHg) H₂ veya D₂ gazı içeren bu lambalarda 40 V luk doğru akım uygulanarak elektriksel boşalım elde edilir. Xe ark lambası 150-700 nm de ışık yayar. Civa buhar lambası her iki bölgede de ışık yayar.

Monokromatörler : UV/GB de monokromatör olarak prizma veya optik ağ kullanılır.

Dedektörler : Dedektör olarak, fotoçoğaltıcı tüp veya fotovoltajik tüp kullanılır.

Absorplayan Maddelerin Karışımlarının Analizi Bir çözeltinin verilen bir dalga boyundaki toplam absorpsansı, çözeltide var olan bileşenlerin bireysel absorpsansları toplamına eşittir. Söz konusu bileşenlerin spektrumları çakışsa bile, bu bağıntı yardımıyla bir. karışımın bileşenlerinin her birinin kantitatif tayini mümkün olur. Şekil 'de verilen M ve N; 'nin spektrumları incelendiğinde, karışımının absorpsansının sadece bir bileşenden ileri geldiği hiçbir dalga boyunun bulunmadığı görülecektir; şu halde M ya da N'in tek bir ölçüm ile tayini imkansızdır. Ancak, karışımın λ' ve λ'' olarak seçilen iki dalga boyundaki absorpsansları aşağıdaki gibi ifade edilebilir:



DENEYİN YAPILIŞI

Saf $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ tuzları kullanılarak her birinin 0.1 M stok çözeltileri hazırlanır. Bu çözeltiler kullanılarak 10 mL, 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M standart çözeltiler hazırlanır. Bu standart çözeltilerden herhangi biri kullanılarak her bir bileşene ait maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyu bulunur (Co^{+2} için λ_1 , Cr^{+3} için λ_2)

Bilinen λ_1 ve λ_2 değerlerinde her iki standardın hazırlanmış olan çözeltileri için, absorpsiyon değerleri ölçülür. Ölçülen bu absorpsiyon değerlerinin her biri için çalışma grafikleri çizilir. Doğrunun eğiminden her bileşenin molar absorpsiyon katsayıları belirlenir (Co^{+2} nin λ_1 için molar absorpsiyon katsayısı ϵ_1 , λ_2 için ϵ_{21} ; Cr^{+3} nin λ_1 için molar absorpsiyon katsayısı ϵ_2 , λ_2 için ϵ_{21}).

Numune çözeltisinin λ_1 ve λ_2 deki absorbans değerleri okunur. Aşağıdaki eşitliklerde yerine konularak Co^{+2} ve Cr^{+3} iyonlarının konsantrasyonları bulunur.

$$\lambda_1 \text{ için } A_1 = \epsilon_1 \cdot l \cdot C_{\text{Co}} + \epsilon_{21} \cdot l \cdot C_{\text{Cr}}$$

$$\lambda_2 \text{ için } A_2 = \epsilon_2 \cdot l \cdot C_{\text{Cr}} + \epsilon_{11} \cdot l \cdot C_{\text{Co}}$$

DENEY İLE İLGİLİ SORULAR

- 1) Elektronik geçişler hakkında bilgi veriniz.
- 2) Molar absorplama katsayısı nedir, önemini açıklayınız.
- 3) Elektronik geçişleri değiştiren faktörler nelerdir?
- 4) UV Spektroskopisinin esasını açıklayarak, cihazın şemasını çiziniz.
- 5) UV Spektroskopisinin uygulama alanları nelerdir?
- 6) UV Spektroskopisi ile kompleks stokiometrisi nasıl tayin edilir?

POTANSİYOMETRİ İLE BAZ ÖLÇÜMÜ

DENEYİN AMACI

Kuvvetli baz, zayıf baz ve bu bazları karışımının potansiyometrik titrasyonunu potansiyel (mV) ölçümleriyle izlemek ve baz karışımındaki her bazın miktarını hesaplamaktır.

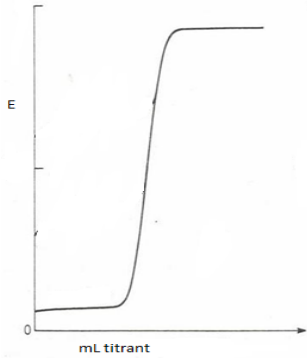
POTANSİYOMETRİ

Potansiyel ölçümüne dayanan analitik metotlar potansiyometrik metotlar veya potansiyometri olarak adlandırılır. Bir **referans elektrot (karşılaştırma elektrodu)**, analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit elektrot potansiyeline sahip bir yarı-hücredir. Bir **indikatör elektrot (çalışma elektrodu)**, analit konsantrasyonundaki değişimlerle bilinen şekilde potansiyeli değişen bir elektrot sistemidir. Potansiyometrik hücrenin üçüncü bileşeni **tuz köprüsü**dür ve analit çözeltisi ile referans elektrot çözeltisinin bileşenlerinin karışmasını önler.

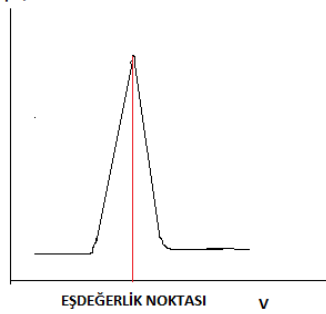
Titrant hacminin fonksiyonu olarak uygun bir indikatör elektrodun potansiyelini ölçme olayı potansiyometrik titrasyon olarak adlandırılır. Bu nicel analiz yönteminde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değeri eklenen titrant hacmine karşı geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. Bu eğride dönüm noktası eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır.

Dönüm noktası 3 şekilde bulunur:

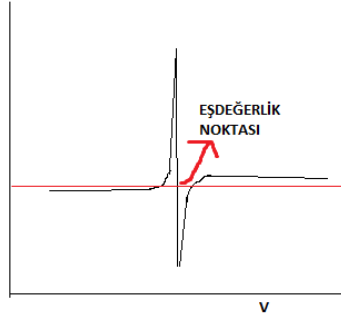
- Eklenen titrant hacmine karşı değişen potansiyel grafiği çizilerek,
- Eklenen titrant hacmine karşı $\Delta E/\Delta V$ veya $\Delta pH/\Delta V$ grafiği çizilerek (1. Türev)
- Eklenen titrant hacmine karşı $\Delta^2 E/\Delta^2 V$ veya $\Delta^2 pH/\Delta^2 V$ grafiği çizilerek (2. Türev)



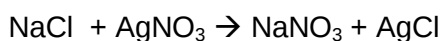
$\Delta E/\Delta V$
veya
 $\Delta pH/\Delta V$



$\Delta^2 E/\Delta^2 V$
veya $\Delta^2 pH/\Delta^2 V$



DENEYİN YAPILIŞI: 5 mL Cl^- içeren numune 50 mL saf su ile seyreltilir. 0.01 M $AgNO_3$ ile titre edilir. Her 0.5 mL titrant ilavesine karşı potansiyeldeki değişme okunarak kaydedilir.



HESAPLAMALAR: Elde edilen veriler, harcanan titrant hacmine karşılık potansiyel olarak grafiğe geçirilir. Elde edilen grafikten dönüm noktası tespit edilir. Buna göre numunedeki klorun molaritesi hesaplanır.

SORUMLU OLUNAN KAYNAK KİTAPLAR:

- Enstrumental Analiz Yöntemleri, Prof. Dr. A. YILDIZ; Prof. Dr. Ö. GENÇ; Prof. Dr. S. BEKTAŞ
- Analitik Kimyanın Temelleri, D. SKOOG; D.M. WEST; J. HOLLER
- Enstrumental Analizin Temelleri, , D. SKOOG; J. HOLLER; T. NIEMAN

DENEY İLE İLGİLİ SORULAR

- 1) Potansiyometrinin esasını açıklayarak bir elektrokimyasal hücre şekli çizin.
- 2) Potansiyometride kullanılan elektrot çeşitleri hakkında bilgi veriniz.
- 3) Potansiyometrik metotlarla yapılan tayinleri kısaca açıklayınız.
- 4) Potansiyometrik titrasyonlarda dönüm noktası tayin metotları nelerdir?
- 5) Cam elektrotta görülen hatalar nelerdir, açıklayınız.
- 6) Cam elektrotun potansiyeli nasıl oluşur, açıklayınız.

İNCE TABAKA - KOLON KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografi, bir karışımdaki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir tekniktir. Çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşiklerden oluşan karışımları ayırmsal kristallendirme veya ayırmsal damıtma gibi yöntemlerle çalışmak boşa gidecek çabalar, oysa kromatografik yöntemlerle bunları tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırma olanağı vardır.

Kromatografi 'nin Sınıflandırılması		
Ayrılma Mekanizmalarına Göre	Uygulama Biçimine Göre	Faz Tiplerine Göre
Adsorpsiyon kromatografisi Partisyon kromatografisi İyon değişirme kromatografisi Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi İyon çifti kromatografisi Afinite kromatografisi	Düzlemsel kromatografi Kağıt kromatografisi İnce tabaka kromatografisi (TLC) Kolon kromatografisi Gaz kromatografisi (GC) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Sıvı kromatografisi Sıvı-Katı kromatografisi Sıvı-Sıvı kromatografisi Gaz kromatografisi Gaz-Katı kromatografisi Gaz-Sıvı kromatografisi

AYRILMA MEKANİZMALARINA GÖRE

Adsorpsiyon kromatografisi

Katılar yüzeydeki enerjilerini azaltmak için başka maddeleri çekerler. İşte bu özelliğe sahip katılara "**Adsorban**" adı verilir. Yabancı maddelerin katı maddelerin yüzeyinde tutulması olayına adsorbsiyon, bundan yararlanarak karışımların birbirinden ayrılması yöntemine "**Adsorbsiyon Kromatografisi**" denir.

Bu türde ayırma, çok ince gözenekli bir yüzeyin üzerinde, saflaştırılan maddelerin seçici adsorplanmasına bağlıdır. Adsorban yüzeyi ile tutunan madde arasında kimyasal bir bağ oluşmaz. Sadece geçici olan fiziksel bir bağ meydana gelir. Bu durumda madde adsorban yüzeyine elektrostatik kuvvetler, dipol-dipol çekimi ve Vander Waals kuvvetleri ile geçici bir süre için tutunur.

Adsorbsiyon çeşitli faktörlerden etkilenir. Adsorbanın kimyasal yapısı ve aktivite derecesi çok önemlidir. Adsorbsiyon kromatografisi hareketli fazda çözünmüş halde bulunan madde ile adsorbanın yüzeyinde tutunmuş olan maddelerin molekülleri arasında bir dengenin sağlanması esasına göre işler. Ayırma birbirine karşı olan kuvvetlerin etkileşmesi sonucu meydana gelir. Bunlar hareketli fazdaki sürükleyici kuvvet ile hareketsiz fazdaki tutucu kuvvettir. Ayrılmada fazlara bağlı faktörler yanında ayrılması istenen maddelere bağlı faktörlerde önemlidir. (Karışımındaki maddelerin konsantrasyonu ve polaritesi gibi) Maddelerin polariteleri hem hareketli fazdaki sürüklenme hızını, hem de adsorban yüzeyinde tutunma derecesini tayin eder. Genel kural olarak polar maddeler polar çözücülerde, apolar maddeler ise apolar çözücülerde iyi sürüklenir. Bir molekülün polaritesi yapısında bulunan fonksiyonel grupların cinsi, sayısı ve pozisyonuna bağlıdır.

-Cl, -NH₂ ve -OH grupları polariteyi artırır. -CH₂ ise azaltır. Adsorptive ve genellikle şu sırayı takip eder;

İdeal Bir Adsorban Nasıl Olmalıdır?

1. Hareketli fazda çözünmemelidir.
2. Sistemdeki maddelerle kimyasal reaksiyona girmemelidir. Yani inert olmalıdır.
3. Partikülleri (parçacıkları) eşit büyüklükte olmalıdır.
4. Ayrılması istenen maddeler ve hareketli faza bağlı olarak aktivitesi istenen düzeyde olmalıdır. Eğer adsorban çok aktif ise (yani çok az su ihtiva ediyorsa veya kuvvetli. adsorbanssa) maddenin sürüklenmesi çok yavaş olur. Yani madde adsorban yüzeyine sıkıca tutunur. Az aktif adsorbanlar da ise tutunma hemen hemen hiç olmaz.
5. Beyaz renkli olmalıdır.

En Çok Kullanılan Adsorbanlar ve Çözücüler

En çok kullanılan adsorbanlar şunlardır.

Zayıf olanlar: Şeker, nişasta, selüloz, talk, kieselguhr ve selit

Orta kuvvette olanlar: Kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, magnezyum hidroksit, kalsiyum hidroksit.

Kuvvetli olanlar: Magnezyum silikat, alumina (Al₂O₃), silikajel (SiO₂ nH₂O), aktif

kömür, aktif magnezyum oksit, kaolin, bentonit, alüminyum silikat

Bir maddenin sürüklenme oranı belli bir adsorban için, kullanılan çözücüye (solvan) bağlı olacağından çözücüler sınıflandırılırlar. Çözücü listesi aşağıda verilmiştir.

Alkanlar (Petro eteri, hegzan, siklohegzan vb)		APOLAR
Karbon tetraklorür	CCl_4	Artan Yürütme Kuvveti 
Toluen		
Dikolrometan, dietil eter	CH_2Cl_2 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{-O-C}_2\text{H}_5$	
Kloroform	CHCl_3	
Aseton	$\text{CH}_3\text{-(C=O)-CH}_3$	
Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-(C=O)-O-CH}_2\text{CH}_3$	
Etil alkol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}$	
Metil alkol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	
		POLAR

Yürütücü hareketli faz olarak kullanılacak olan çözücülerin özellikleri şunlardır:

- Adsorbanı çözmemelidir
- Adsorban ve ayrılacak maddelerle reaksiyon vermemelidir
- Ayrılacak maddelerin desorbsiyonu için iyi bir seçiciliği olmalıdır
- Ayrılacak maddeleri yeteri kadar çözebilmelidir
- Ayrımdan sonra kolay uzaklaştırılabilmek için düşük kaynama noktasına sahip olmalıdırlar
- Toksik olmamalı ve ucuz olmalıdırlar

Organik bileşiklerin adsorblanma yetenekleri

Alkanlar	$\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R'}$	HIZLI YÜRÜME
Alkenler	R-CH=CH-R'	Artan Adsorblanabilme Yeteneği 
Dienler	R-CH=CH-CH=CH-R'	
Aromatik Bileşikler		
Halojenürler	$\text{R-CH}_2\text{-X}$ (X= F, Cl, Br, I)	
Eterler	$\text{R-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-R'}$	
Esterler	R-(C=O)-O-R'	
Amidler	R-(C=O)-NR_2	
Ketonlar	R-(C=O)-R'	
Aldehitler	R-(C=O)-H	
Alkoller	R-CH(OH)-R'	
Aminler	$\text{R-CH(NR}_2\text{)-CH}_2\text{-R'}$	
Karboksilik Asitler	R-(C=O)-OH	YAVAŞ YÜRÜME

Kromatografisinin etkinliği esitli faktörlerin düzgün ayarlanmasına bağlıdır. Bu faktörler şöyle sıralanabilir:

- Adsorban seçimi
- Çözücünün polaritesi
- Kullanılacak kolonun boyu ve apı
- Çözücünün akış hızı
- Kromatografiye uygulanan madde miktarı

UYGULAMA BİÇİMİNE GÖRE

Düzlemsel kromatografi

Düzlem üzerine kurulan kromatografide hareketli faz (ortam), ya kapiler olaylarla veya yerçekimi (gravitasyon) kuvvetiyle hareket eder. Bu tür kromatografilerde sabit faz, ya düz bir levha üzerine muntazam olarak yayılmış özel bir madde (silika jel, alüminyum oksit gibi) veya kağıt gibi lifli bir maddedir. Bu iki tür kromatografide kurulan dengeler ve teoriler aynıdır.

Kağıt kromatografisi

Kağıt kromatografisi, özellikle ayırmak küçük miktarlardaki maddeleri ayırmak için kullanılan, partisyon kromatografisinin bir esididir. Kağıt kromatografisinde bir birinde az çözünen iki sıvı kullanılır. Bunlardan birisi genellikle sudur. Analizi yapılacak sulu maddeden kapiler bir boruyla alınan bir kısım, süzgeç kağıdının alt kısmında bir noktaya emdirilir ve orada kurutulur, bir leke meydana getirilir. Bu leke suyla doyurulmuş bir organik çözücü içine daldırılır. Suyla doyurulmuş çözelti kağıtta yükselirken beraberinde bu leke içindeki maddeleri sürükler ve çeşitli lekeler meydana gelir. Maddeler renkliyse lekeler kolaylıkla görülür. Renkli değilse bir ayırala ayrılır.

İnce tabaka kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography (TLC)) hızlı ayırma ve küçük miktardaki maddelerin kalitatif analizi için çok önemli bir tekniktir. Bu teknik kolon kromatografisiyle yakından ilgilidir.

İnce tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi gibi bir katı – sıvı ayırma tekniğidir. Bununla beraber, adsorbent sıvı fazın aşağı akmasına izin vermez. Bir destek üzerindeki tabaka üzerine kaplanmış adsorbent sıvı fazın yukarı akmasına sebep verir. En iyi destek bir cam tabakadır, fakat diğer materyaller de kullanılır. İnce tabaka adsorbenti tabakanın üzerine serilir ve kurumasına izin verilir. Kaplanmış ve kurutulmuş cam tabakaya ince tabaka denir.

Bir ince tabaka çok az bir çözücü içeren bir kaba dik olarak yerleştirildiğinde çözücü, tabaka üzerindeki adsorbentten yukarıya doğru gider.

İnce tabaka kromatografisinde numune, tatbik edildikten sonra çözücüde yürütmesine izin verilir. Genellikle numune tabakanın altına bir nokta olarak tatbik edilir. Bu tekniğe noktalama tekniği denir. Numune küçük bir kapiler pipet ile tabakaya tatbik edilir. Numune ile dolmuş pipet tabakaya değdiğinde numune kapilerden akarak tabakaya taşınır ve bir nokta oluşur.

Çözücünün tabakadan yukarı doğru hareketiyle, numune sıvı fazda sabit duran katı fazdan ayrılır. Bu işlemde çözücüye **yürütücü** denir. Bu işlemde tatbik edilen karışımdaki farklı komponentler ayrılır. Ayırma, hareket eden faz ile duran faz arasındaki çözünme kabiliyetine bağlıdır.

Kolon kromatografisindeki gibi en az polar maddeler polarlığı fazla olan maddelerden daha hızlı ilerler. Ayırma karışımdaki her bir komponentin ilerleme hızlarının farklılığına bağlıdır. Karışımda bir çok madde olduğundan, her maddenin çözünürlük ve adsorptivite özelliklerini farklı olması yapısındaki farklı gruplara bağlıdır. Genellikle katı faz polardır ve polar maddeleri daha kuvvetli bağlar. Hareketli sıvı faz adsorbentten daha az polardır ve daha az polar olan ve olmayan maddeleri çok daha kolay çözer. Çözücü yeter derecede apolar ise çok polar olan maddeler yavaş ilerlerken apolar maddeler daha hızlı hareket ederler.

İnce tabakada yürütme bittikten sonra ince tabaka tanktan çıkarılır ve çözücü uçana kadar kurumaya bırakılır. Tabakadaki orijinal noktalar yarılmış ise tabaka noktalarla dikey bir çizgi oluşacaktır. Her bir nokta karışımda bulunan komponente veya bir bileşiğe karşılık gelir. Karışımdaki komponentler renkli ise yürütme tamamlandıktan sonra farklı noktalar açıkça görülecektir. Bunu yanında renksiz madde içeren noktalar görülmeyecektir. Nokta görülmüyorsa renklendirme metodu kullanarak renklendirme yapılır. İnce tabaka ultraviyole ışık altına tutulduğunda noktalar görülür. Aynı zamanda iyot buharının kullanımı da çok yaygındır. İyot açıkça görülen renkli kompleksler vermek için tabakada adsorblanmış farklı bileşikler ile reaksiyon verir.

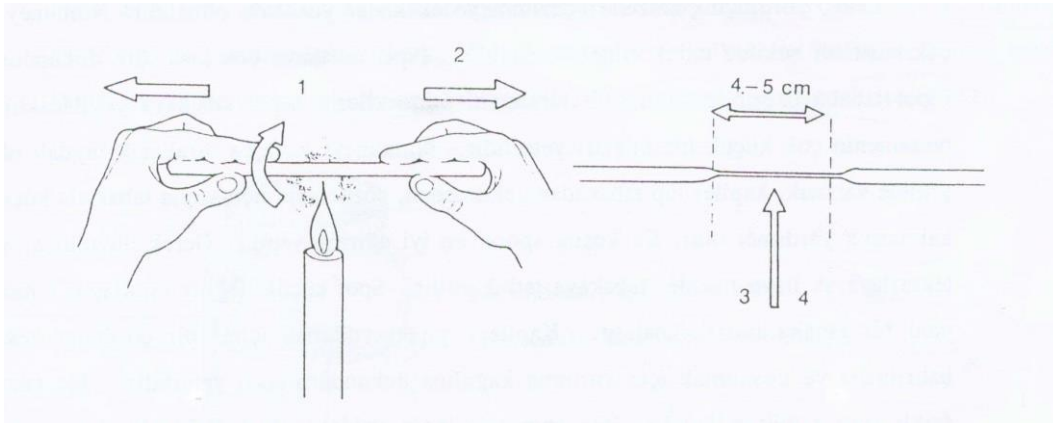
İNCE TABAKA LAM VE TABAKALARIN HAZIRLANMASI

Laboratuarda da ince tabaka hazırlanmakla birlikte hazırlama metodları burada verilmeyecektir. Çoğu imalatçılar, silikajel ya alümina ile önceden kaplanmış cam tabakaları bulundururlar. Bu tip tabakalar pahalı fakat devamlı kullanılabilir ve aynı zamanda ihtiyaç duyulan ölçülerde makasla kesilebilmektedir.

İNCE TABAKADA NUMUNE TATBİKİ

Bir Mikro Pipetin Hazırlanması

Ayrılacak numuneyi ince tabakaya tatbik etmek için bir mikro pipet kullanılır. Bir mikro pipet kaynama noktası tayininde kullanılan tüplerden kolaylıkla yapılabilir. Kapiler tüp küçük bir alev ortasında ısıtılır ve yumuşayana kadar döndürülür. Tüp yumuşadığında, tüpün ısıtılan kısmı 4 – 5 cm uzunluğunda ince bir tüp oluşana kadar iki baştan çekilir. Soğuduktan sonra eğe ile kertik oluşturulur ve kırılır. İki tane mikro pipet elde edilir. Bunun dışında satında alınabilir.



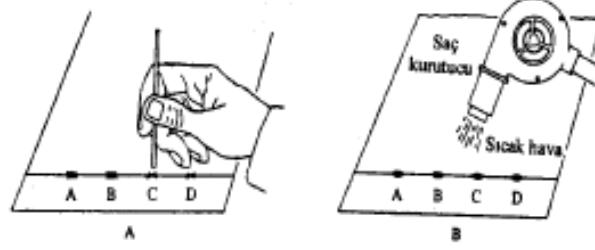
Şekil. Mikro Pipet Hazırlama

Tabakaları Spotlama (Lekeleme)

Numuneyi tabakaya tatbik etmek için, deney tüpü veya saat camı gibi küçük bir kaba, 1 mg katı numune veya bir damla sıvı konarak başlanır. Numune kolay buharlaşabilen bir çözücüde çözülür. Genellikle aseton ve metilen klorür uygun çözücülerdir. Tarif edildiği gibi hazırlanan küçük kapiler pipet çözeltiye batırarak doldurulur. Daha sonra ince tabakaya alttan yaklaşık 1 cm lik bir noktaya hafifçe dokunarak boşaltılır

Leke, yürütücü çözücüde çözünmeyecek kadar yukarıda olmalıdır (yaklaşık 1-1.5 cm). Numuneyi tabakaya çok hafif bir biçimde tatbik etmek önemlidir. Pipet tabakaya çok kısa süre dokundurulmalıdır. Pipet tabaka üzerinde uzun süre tutulursa, içindekilerin hepsi tabakaya yayılacaktır. Halbuki numunenin çok küçük bir miktarı yeterlidir. Numuneyi yavaşça bırakmak faydalı olur. Bu şekilde yapmak, kapiler tüp tabakadan çekilmeden, çözücünün uçmasıyla tabakada küçük bir leke kalmasına yardımcı olur. En küçük spotla en iyi ayırma yapılır. Gerek duyulursa, spotlamayı tekrarlayarak ilave madde tabakaya tatbik edilir. spot küçük değilse (yaklaşık 2 mm çapında) yeni bir tabaka hazırlanmalıdır. Kapiler pipeti yıkamak için bir çözücüye tekrar tekrar batırılması ve boşaltmak için kurutma kağıdına dokundurulması yeterlidir. Tlc tabakasına üç farklı spot tatbik edilebilir. Her spot tabakanın yaklaşık 1 cm yukarıda, bir spot tabakanın ortasında olmak üzere hepsi düz olarak tatbik

edilmelidir. Dağılma sebebiyle, spotlar tabakada ilerledikçe çapı artacaktır. Farklı spotların birleşmesinden korunmak için, bir tek tabakaya üçten fazla spot konmaz. Çok fazla maddeler için daha büyük tabakalarla çalışılmalıdır.



TLC TABAKALARINDA YÜRÜTME

Yürütme Kabının Hazırlanması

Lamdan yapılmış tcl tabakası için uygun yürütücü kabı vida ağızlı bir kavanoz veya kullanılan tabakaya uygun kapaklı cam tank olabilir.

Yürütme kabının iç tarafı, bir parça filtre kağıdıyla çizgi ile gösterilmelidir.

İlerlemenin gözlenebilmesi için küçük bir açıklık (2-3 cm) bırakılmalıdır.

Astar doyurulmasından sonra, 5 mm olana kadar çözücü yürütme kabına konur, kapağı kapatılır ve kullanıla kadar bir kenara bırakılır.

Tlc Tabakasında Yürütme

İlk önce spot ince tabakaya tatbik edilmeli ve çözücü seçilmiş olmalı, daha sonra tabaka yürütme için yürütme kabına konmalıdır. Kabın dibindeki çözücü seviyesi tabakaya tatbik edilen spotun üstünde olmalıdır. İlk önce tabaka doğru bir şekilde konur, yürütme kabının kapağı kapatılır ve ilerleme için beklenir. Bu işlem hızlı olduğundan dikkatle izlenmelidir. Çözücü yukarı çıktıkça tabaka görünebilir şekilde nemlenir. Çözücü kaplamış yüzeyin bitimine 5 mm kalana kadar ilerlediğinde tabaka geri alınmalı ve çözücünün durduğu yer bir kurşun kalemle çizilerek belirlenmelidir. Çözücünün kaplanmış yüzeyin sonuna kadar ilerlemesine izin verilmemelidir. Bu olay olmadan önce tabaka geri alınmalıdır. Tabaka kurutulmalı, görünen spotlar kurşunkalemle daire içine alınmalıdır. Herhangi bir spot görülmüyorsa renklendirme metoduna ihtiyaç duyulur.

İnce Tabakada Yürütücü (Çözücü) Seçimi

Kullanılan yürütücü (çözücü) seçimi ayrılan maddelere bağlıdır. Tam bir ayırma yapmadan önce birkaç çözücü denenmelidir. Tüm spotları çözücü ile birlikte yürüten çözücü

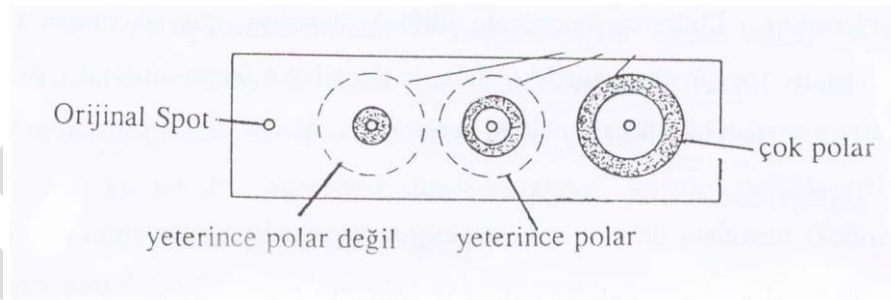
çok polardır. Spottaki herhangi bir maddeyi yürütmeyen çözücü yeterince polar değildir. Çözücülerin nisbi polaritesi bir rehber olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

Kromatografi İçin Çözücüler

Petrol eteri
Sikloheksan
Karbon tetraklorür
Benzen
Kloroform
Metilen klorür

Artan polarlık ve çözme kabiliyetine göre metilen klorür ve toluen orta polarlıkta olan çözücülerdir ve geniş kullanım alanı vardır. Hidrokarbonlar için uygun olanlar sırasıyla hekzan, petrol eteri ve toluendir. Hekzan – petrol eteri veya toluen – etrin çeşitli oranlardaki karışımları ile hazırlanan çözücüler bir çok fonksiyonel gruplar için orta polaritede yürütücüler olarak kullanılır. Polar maddeler için etil asetat, aseton veya metanol kullanılabilir.

İyi bir çözücü tahmin etmek için hızlı bir yol, bir tabakaya birkaç numune spotu tatbik etmektir. Spotlar minimum 1 er cm arayla tatbik edilmelidir. Kapiler pipet bir çözücü ile doldurulur ve spotların birine yavaşça dokundurulur. Çözücü bir daire içinde dışa doğru genişleyecektir. Çözücü bir kurşun kalemle işaretlenmelidir. Çözücüler dışarıya doğru genişledikçe, spotlarda ortak merkezde halkalar gibi genişleyecektir. Halkaların farklılığından çözücünün uygunluğuna tahmini olarak karar verilir.(Şekil 3.2.)



Şekil. Çözücüler Test Etmede Konsantre Halka Metodu

Renklendirme Metodu

Tlc ile ayrılan bileşikler renklendirilirse ayırma görerek takip edildiğinden, daha başarılı sonuçlar elde edilir. Bununla beraber çok da olmasa bile bileşikler renksizdir. O zaman ayrılan maddeler bazı reaktiflerle veya ayrılan bileşikleri görünür yapan bazı metodlarla renklendirilmelidir. Spotların rengini arttıran reaktiflere renklendirme reaktifleri denir. Spotları görünür yapan metodlara renklendirme metodları denir. Çok sık olarak

kullanılan renklendirme reaktifi iyottur. İyot, çoğu organik maddelerle sarı veya kahverengi kompleksler oluşturmak için reaksiyon verir.

Bu renklendirme metodunda yürütülmüş ve kurutulmuş tlc tabakası birkaç iyot kristali yürütme kabına konur. Yürütme kabı kapatılır ve bir buhar banyosunda yavaşça ısıtılır. Yürütme kabı iyot buharı ile dolar ve spotlar görünmeye başlar. Spotlar kafi derecede görünüyorsa tabaka yürütme kabından alınır ve spotlar bir kurşun kalemle işaretlenir. Spotlar daima aynı halde kalmazlar. Onların görünümü, iyodun organik maddelerle yaptığı kompleksin oluşumundan ortaya çıkar. İyot tabakadan süblimleştikçe spotlar solar. Bundan dolayı spotlar derhal işaretlenmelidir.

Doymuş hidrokarbonlar hariç hemen hemen tüm bileşikler ve alkil halojenürler iyot ile kompleks oluşturur. Spotların yoğunlukları mevcut maddenin miktarını tam olarak göstermez.

Renklendirmede ikinci yaygın metot; ultraviole lambası kullanmaktır. UV ışığı altına, bileşikler tabakada renkli spotlar gibi görünür. Bu çok sık olarak bazı bileşiklerin yapısını açıklar. Çünkü bu tür bileşikler, Flüororasans özelliğinden dolayı uv ışık altında çok parlak ışık yayarlar.

İnce Tabakada R. Değeri

İnce tabaka kromatografisinde aşağıdaki şartlara dikkat etmek gerekir.

Çözücü sistemi

Adsorbent

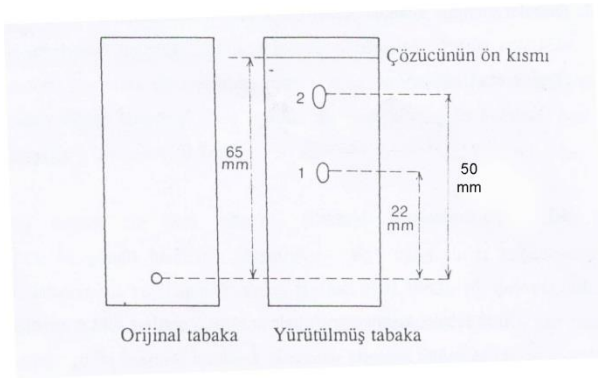
Adsorbent tabakasının kalınlığı

Spotlanan maddenin nisbi miktarı

Yukarıdaki şartlara göre hazırlanan tabakada çözücü bileşikten önde yürür. Bileşiğin mesafesinin çözücünün mesafesine oranına R. Değeri denir.

$$R = \frac{\text{Yürüyen maddenin mesafesi}}{\text{Yürüyen çözücünün mesafesi}}$$

Ölçme şartları tamamen belirtildiğinde, R. Değeri her hangi bir bileşik için sabittir ve bileşiğin bir fiziksel özelliğini gösterir. R değerinin en büyük çıktığı çözücü yürütme için en iyi çözücüdür. R. Değerinin hesaplanması aşağıda görülmektedir.



$$R(1. \text{ Bileşik}) = \frac{22}{65} = 0.34$$

$$R(2. \text{ Bileşik}) = \frac{50}{65} = 0.77$$

Organik Kimyada Bir Çok Kullanım Alanı Vardır ***

1. Benzer iki bileşiği tespit etmek
2. Karışımdaki bileşenlerin sayısını belirlemek için
3. Kolon kromatografisine uygun çözücü bulmak için
4. Kolon kromatografisindeki ayırmayı gözlemek için
5. Kolonda yapılan bir ayırmanın etkilerini kontrol etmek için.
6. Reaksiyon sürecini izlemek için

Tüm bu uygulamalarda, ince tabaka kromatografisi çok az madde gerektirdiği için avantajlıdır. Madde israf edilmez. Birçok renklendirme metotları ile maddenin bir mikrogramının ($10^{-7} \mu\text{g}$) onda birinden daha az miktarı ile çalışılabilir. Büyük preparatif tabakalarla aynı zamanda 0,2-0,5 g madde ayırmak mümkündür. Tlc nin başlıca dezavantajı buharlaşan maddelere uygulanamamasıdır. Çünkü bunlar tabakada hemen buharlaşır. İnce tabaka kromatografisi benzerliği şüpheli bileşikler tespit etmede kullanılır. Her iki bileşikte tabakada aynı mesafede yürüyorsa muhtemelen aynı bileşiklerdir. Spotların durumu aynı değilse farklı bileşiklerdir denir. Her iki bileşiğe aynı tabakada spot yapmak önemlidir.

İnce tabaka kromatografisi ile bir numunenin tek bir madde veya karışım olup olmadığı anlaşılabilir. Tek bir madde tek bir spot verir. Diğer taraftan bir karışımdaki komponentlerin sayısı bir karışımda farklı çözücüler demek suretiyle tespit edilebilir. İzomerler gibi çok benzer özelliklere sahip karışımları ayırt etmek için çözücü bulmak zor olabilir. Başarısız bir ayırma bir bileşiğin saf madde olduğunun ispatı değildir. Bir çok bileşik apolar çözücü ile, tlc tabakasında tekrar tekrar yürütme ile ayrılabilir. Bu metot da tabaka ile yürütmeden sonra geri kazanılır ve kurutmaya bırakılır. **Bir karışımı ayırmak için kolon kromatografisi düşünülüyorsa, çözücü seçimi için tlc kullanılır.** Bir çok çözücü, kolonda

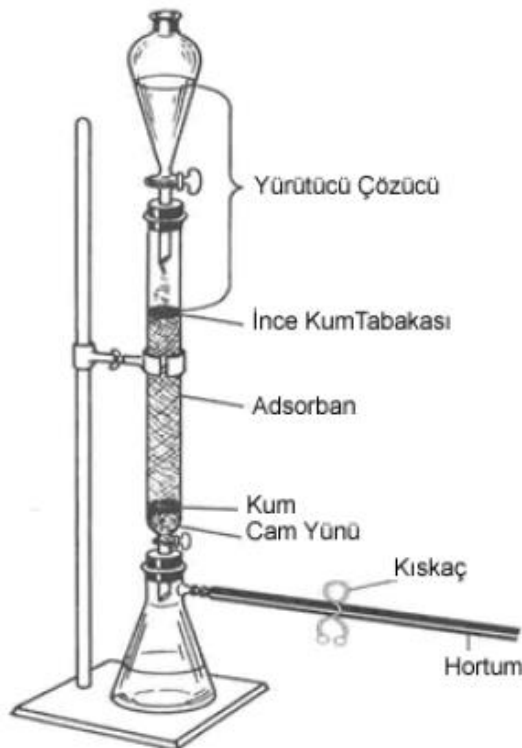
kullanılacak adsorbentle kaplanmış bir tabakada denenebilir. Komponentleri en iyi şekilde ayıran çözücüyü kolonda kullanmak en iyi olacaktır.

Kolon kromatografisi

Kolon üzerinde kurulan kromatografilerde yukarıda da söylendiği gibi hareketli faz kolondaki sabit faz içinden geçerek kolonun altına iner. Kolon kromatografisinin etkinliği çeşitli faktörlerin düzgün ayarlanmasına bağlıdır. Bu faktörler şöyle sıralanabilir:

- Adsorban seçimi
- Çözücünün polaritesi
- Kullanılacak kolonun boyu ve çapı
- Çözücünün akış hızı

Zamanımızda bu metotla çalışmalarda sabit faz olarak ince ezilmiş kalsiyum karbonat, alüminyum oksit, talk, silikajel gibi maddeler, hareketli faz olarak da, su, alkol, aseton, kloroform, nitrobenzen, toluen, benzen gibi çözücüler kullanılmaktadır. Gerek hareketli, gerekse sabit fazların seçimi oldukça ampiriktir. Hangi hareketli fazla sabit fazın iyi sonuç verdiği ancak denenerek bulunur. Seçilen sabit faz, bir büretin alt kısmına pamuk veya cam pamuğu konduktan sonra sıkıca doldurulur. Ondan sonra kromatogramı yapılacak maddelerin çözüldüğü çözücüyle iyice ıslatılır ve bir kere daha sabit fazın iyice yerleşmesi sağlanır. Ondan sonra ayrılması istenen maddeleri ihtiva eden çözelti kolonun üstüne konur. Maddelerin yerleri kolonda ayrı ayrı görülünceye kadar daha önceki çözücünden ilâve edilir.



Çeşitli maddelerin adsorplayıcı veya sabit tabaka üzerinde adsorplanma dereceleri farklı olduğundan, kromatogram esnasında yukardan aşağıya farklı yerlerde toplanırlar. Maddeler farklı renklerdeyse yerleri kolaylıkla tesbit edilir. Renkli değilseler, kullanılan bir ayıraç vasıtasıyla renklendirilip veya ultraviyole ışınlarla tutulup yerleri tesbit edilir. Ayrılmanın kesin olmadığı, yani maddelerin kolon üzerinde birbiri üzerinde veya birbirine çok yakın mesafelerde bulunduğu hallerde, tekrar çözelti konarak maddelerin yavaş yavaş aşağıya inmeleri beklenir. Gene iyi bir ayırma elde edilememişse, daha polar bir çözücü kullanılır. Maddeler birbirinden iyice ayrıldıktan

sonra, bunların kolon ve adsorplayıcıdan ayrılması sağlanır. Kolondan ayırma başlıca şöyle yapılır:

1. Kolondan uzun zaman çözücü geçirilerek her halka yavaş yavaş aşağıda indirilir ve nihayet adsorplayıcı fazdan çözelti fazına geçirilir. Bu şekilde her halkayı ihtiva eden çözelti ayrı bir kaba alınır. Çözelti buharlaştırılarak saf madde elde edilir. Böylece ele geçen saf madde üzerinde de bir takım deneyler yapılarak cinsi ve hatta miktarı tayin edilir.
2. Maddeler renksiz ve renklendirilmeleri mümkün değilse, o zaman kolondan akan çözelti belirli aralıklarla numaralı büyükçe tüplerde toplanır. Belirli bir akış hızıyla her tüpte toplanan çözeltinin kroamatogramdan kaç dakika sonra ve kaç mi olduğu tesbit edilir. Bundan sonra tüplerdeki çözücüler buharlaştırılarak her tübün içindeki madde üzerinde kâğıt veya ince tabaka kromatografisi yapılır. Netice olarak her tüpte kaç madde olduğu tesbit edilir. Ardarda üç tüpte toplanan madde aynıysa (e.n aynıysa), bu aralıkta saf bir madde geçiyor demektir. Bundan sonra yapılacak daha büyük bir ayırmada, o üç tüpte toplanan bir kaba alınır. Aynı şekilde çeşitli tüpler ve aralıklar gözden geçirilir. Bu oldukça yorucu bir işlemdir ve fakat bilinmeyen maddelerin neler olduğunu anlamak için de tesirli ve güçlü bir işlemdir.
3. Kolonda, tabakalara ayrılan maddeler renkli veya ultraviyole ışın altında renkleniyorsa, ince ve uzun bir spatül vasıtasıyla ilk tabaka gevşetilir ve kolon ters döndürülerek dışarıya alınır. Birinci tabaka dışarıya alındıktan sonra aynı şekilde ikinci tabaka alınır. Her tabaka ayrı bir kaptan toplanır ve daha polar çözücülerle muamele edilerek adsorplayıcıdan çözücüye alınır.
4. Alt kısmı ince bakır tel ye cam-pamuğuyla sarılı bir cam kolon içkide meydana gelen kromatogram, bakır tel alınmak suretiyle kolaylıkla dışarıya çıkarılır. Bu tip, bir kolon farklı adsorplayıcılarla da doldurulabilir. Yalnız bu takdirde her iki adsorplayıcı arasına yuvarlak kesilmiş bir süzgeç kâğıdı konur. Böyle bir düzenek bazan çok daha iyi sonuç verir. Daha da iyi sonuç almak için kolonlar ister bir, isterse birden fazla adsorplayıcıyla doldurulsun, adsorplayıcı kolon kullanılacak çözücüyle ıslatılarak doldurulur ve bu esnada da lâstik bir boruyla kolona vurmak suretiyle hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. Bu işlem iyi bir kromatogram için gereklidir.

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)**DENEYİN AMACI**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinden yararlanarak bazı organik maddelerin nicel analizini yapmak.

GENEL BİLGİLER

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir.

HPLC'nin sıvı kromatografisinin diğer türlerinden üstünlükleri şunlardır:

HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.

Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.

Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.

Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.

Analiz süresi çok kısadır.

Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

Cihazın başlıca kısımları:

- ❖ Pompa
- ❖ Örnek enjektörü
- ❖ Kolon
- ❖ Dedektör
- ❖ Kaydedici

Örnek hazırlanması

Katı örnekler: Bir örneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan çözücüde çözünmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su karışımında çözülmalıdır. Eğer örnek böyle bir çözücüde çözünmüyorsa, diğer bir çözücüde çözünmeli, fakat bu durumda kullanılan çözücü kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, mobil faz çözücüsünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.

Sıvı örnekler: Sıvı örneklerde çözücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözücüde değilse veya enjekte edilecek kadar derişik değilse, kurutulmalıdır veya deriştirilmelidir. Daha sonra hareketli fazda tekrar çözünmelidir.

Örneklerin süzülmesi: Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek çözünmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğin enjeksiyondan önce süzülmesi tavsiye edilir.

Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

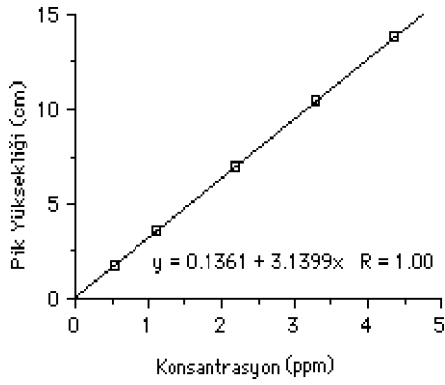
Lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler.

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini deriştirir.

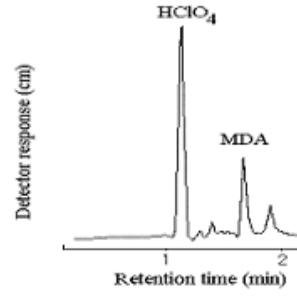
MDA Analizi

0.3 mL serum örneği üzerine 0.5 M HClO₄'den 0.2 mL ilave edilir. Proteinlerin çöktürülmesinden sonra saf su ilave edilerek toplam hacim 1 mL'ye tamamlanır. Karışım 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra berrak kısımdan 20 µL dikkatlice alınarak HPLC'de analizlenir.

Analiz şartları, 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 65 - 35; pH : 4) hareketli fazında, 254 nm dalga boyu, Techopak 10µ C-18 (25 cm x 3.9 mm) kolonu ve akış hızı 1.5 mL/dak. olarak belirlenmiştir.



Şekil . Malondialdehit'e ait çalışma eğrisi

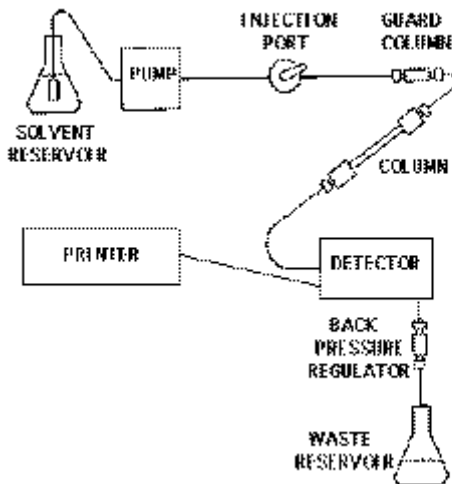


Şekil. MDA için örnek bir kromatogram.

Ayrılmaları çok güç olduğundan öteki analitik yöntemlerle ayrılamayan maddeler kromatografik metotlarla ayrılır. Bu metotlar genellikle kalitatif ve kantitatif amaçlar için kullanılır. Kromatografik analiz, analiz edilecek maddenin hareketli bir faz yardımıyla sabit bir fazın içinden geçirilmesine dayanır. Temel bir bakış açısıyla bu yöntemler 4'e ayrılır:

- Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- HPLC
- Süperkritik akışkan kromatografisi

Küçük dolgu maddeleriyle doldurulup yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) denir.



Avantajları:

- Hassas olması
- Sıcaklığa karşı duyarlı olan maddelere bile uygulanabilmesi
- Doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir.

DENEYİN YAPILIŞI:

HPLC cihazı açılarak analize hazırlanır. 2, 4, 6 ve 8 ppm'lik A vitamini standard çözeltileri hazırlanır. Her biri seyreltikten derişige doğru sırayla cihaza enjekte edilerek ölçüm alınır. Her bir ölçüm için cihazda görüntülenen pikin yüksekliğı cetvel ile ölçülerek tabloya kaydedilir:

2ppmcm

4ppmcm

6ppmcm

8ppmcm

Bu veriler ppm cinsinden standart konsantrasyonuna karşılık pik yüksekliğı olacak şekilde grafiğı geçirilir ve bir doğru elde edilir (Kalibrasyon grafiğı). Excel yardımıyla bu doğrunun R^2 ve doğru denklemi hesaplanır.

Sonra derişimi bilinmeyen bir A vitamini numunesi cihaza enjekte edilir ve çıkan pikin yüksekliğı ölçülür. Ölçülen bu değer, kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde yerine konarak bilinmeyen konsantrasyon hesaplanır.

SORUMLU OLUNAN KAYNAKLAR:

- Enstrumental Analiz Yöntemleri, Prof. Dr. A. YILDIZ; Prof. Dr. Ö. GENÇ; Prof. Dr. S. BEKTAŞ
- Enstrumental Analizin Temelleri, , D. SKOOG; J. HOLLER; T. NIEMAN

DENEY İLE İLGİLİ SORULAR

- 1) Cihazın temelini ve çalışma prensibini açıklayınız.
- 2) HPLC kromatografisinde kullanılan sabit ve hareketli fazlar nelerdir.
- 3) HPLC ile kantitatif analiz nasıl yapılır açıklayınız.
- 4) HPLC'de herhangi bir analizin nasıl yapılacağını ana hatlarıyla açıklayınız.
- 5) HPLC ile çalışırken çalışma grafiğinin nasıl oluşturulabileceğini açıklayınız.
- 6) HPLC'nin uygulama alanlarını yazınız.
- 7) HPLC ile gaz kromatografisini karşılaştırınız.
- 8) HPLC dedektörleri hakkında bilgi veriniz.
- 9) HPLC kolonları hakkında bilgi veriniz
- 10) HPLC ile çalışılırken dikkat edilmesi gerekli hususları açıklayınız.
- 11) HPLC nin parçalarını yazarak, UV-dedektörü hakkında bilgi veriniz.
- 12) HPLC kolon dolgu maddelerinin özelliklerini yazınız.
- 13) HPLC kolonunda ayırmaya etki eden faktörleri açıklayınız.
- 14) HPLC ile yapılan çalışmada elde edilen C vitaminin doğru denklemi
- 15) $y = 0.5x + 1.6$ $R=0.92$ olup 10 kat seyreltilmiş örneğin pik yüksekliğı 0.5 cm ise örnekteki C vitamini miktarının kaç ppm olduğunu hesaplayınız.

DENEY 9

GAZ KROMATOĞRAFİSİ

DENEYİN AMACI

Gaz kromatografisi cihazından faydalanılarak bazı organik maddelerin kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) analizini yapmak.

GENEL BİLGİLER

Gaz kromatografisi, uçucu karışımların ayrılması ve analizi için büyük bir kolaylıkla uygulanabilen basit bir tekniktir. Gaz kromatografisi için az miktarda numune yeterlidir. Bu metotla karışımlar büyük bir oranda birbirinden ayrılabilir.

Gaz kromatografisine konan numune içindeki maddeler, azot helyum gibi özel bir gazla sabit faz içinden sürüklenirler. Bu arada numune içindeki gazlar sabit fazla aralarında ilgiye göre az veya çok tutulurlar. Tutulma aslında bir frenlemedir. Bazıları çok bazıları az frenlenirler. Gazların sabit fazla hareketli faz arasında dağılmalarında çözünürlük, bağlanma adsorplanma, moleküler çözülebilme gibi olaylar etkili olabilirler.

Her maddenin sabit fazla tutulma oranı farklıdır. Bazıları az kimileri ise çok tutulurlar. Fazlar, sıcaklık, kolon uzunluğu sabit tutularak çeşitli maddelerin piklerini ihtiva eden cetveller yapılır. Bilinmeyen numuneler içindeki maddeler bu cetvellerden yararlanarak analiz edilirler.

Başlıca iki tür gaz kromatografisi vardır: Bunlar “gaz-sıvı dağılma kromatografisi” ve “gaz-katı adsorpsiyon kromatografisi”dir. Gaz kromatografisinde kolon sıcaklığı maddelerin ayrılabilmesi için uygun değere ayarlanır. Bir bileşenin kolonda ilerleme hızı o bileşenin buhar basıncıyla orantılıdır. En uçucu bileşen en hızlı hareket eder ve böylece daha düşük buhar basınçlı diğer bileşenlerden ayrılır. Gaz kromatografisinin en önemli parçalarından biri de dedektördür. En yaygın kullanılan iki dedektör “alev iyonlaşmalı dedektör” ve “termal iletkenlik dedektörü”dür.

DENEYİN YAPILIŞI

2.5 µl n-hekzan ve 2.5 µl aseton ayrı ayrı enjektörle alınır ve 90 °C’de gaz kromatografisine enjekte edilir. Alınma süreleri ve oluşan pikler kromatogram alınarak değerlendirilir. Daha sonra diğer şartlar sabit kalmak şartıyla sıcaklık 60°C’ye çıkarılarak yukarıdaki işlemler tekrarlanır.

Gaz Kromatografisinin Çalışma Şartları

- ❖ Dedektör: FID
- ❖ Kolon: % 30 OVI
- ❖ Taşıyıcı gaz : 23 ml/dk
- ❖ Hidrojen gazı : 45 ml/dk
- ❖ Hava gazı : 450 ml/dk
- ❖ Sıcaklık programı :
- ❖ Kolon sıcaklığı : 50-60°C
- ❖ Dedektör sıcaklığı : 200°C
- ❖ Enjektör sıcaklığı : 200°C

DENEY İLE İLGİLİ SORULAR

- 1) Gaz kromatografisinin temelini ve çalışma prensibini açıklayınız.
- 2) Gaz kromatografisinde kullanılan sabit ve hareketli fazlar nelerdir?
- 3) Gaz kromatografisinde kalitatif ve kantitatif analiz nasıl yapılır açıklayınız.
- 4) Gaz kromatografisinde hangi tür kolon kullanılır?
- 5) Kolon sıcaklığı nasıl ayarlanır?
- 6) Gaz kromatografisi cihazının temel bileşenlerini şematik olarak gösteriniz
- 7) Gaz kromatografisi hangi analizlerde kullanılır?
- 8) Gaz kromatografisinde nitel ve nicel analiz nasıl yapılır?
- 9) Kolana enjeksiyon yapılırken nelere dikkat edilir?
- 10) Alıkonma süresi nedir ve nasıl tayin edilir?
- 11) Gaz kromatografisinde kullanılan detektörler hakkında bilgi veriniz.

POLARİMETRİ İLE ÇEVİRME AÇISININ TAYİNİ

DENEYİN AMACI

Şeker gibi optikçe aktif maddelerin çevirme açılarından yararlanarak kalitatif ve kantitatif analizlerin yapılması..

DENEYİN YAPILIŞI

Polarimetri cihazı ile çalışırken önce cihazın sıfır ayarının yapılması gerekir. Bunun için numune kabı saf su ile doldurularak teleskopun iki yarım küresinin aydınlıkları mikrometrik vida kullanılarak eşitlenir. Buradan okunan değer cihazın sıfır noktası olarak kabul edilir (bu değer sıfır olması beklenir). Sonra hazırlanan % 5, % 10, % 15, % 20'lik şeker çözeltileri ayrı ayrı numune kabına konarak cihazdan çözeltilerin çevirme açıları okunur. Birinci çözelti cihaza konduğunda iki yarım kürenin aydınlıklarının homojenliği bozulur. Yarım kürelerin birisi karanlık, diğeri aydınlık veya yarı karanlık, yarı aydınlık olabilir. İki yarım kürenin aydınlıklarının eşit olduğu anda okunan değer o çözeltinin çevirme açısıdır. Diğer çözeltilerin çevirme açıları da aynı şekilde okunduktan sonra tayini yapılacak çözelti numune tüpüne konarak çevirme açısı okunur. Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak tayini istenen örneğin % Şeker miktarı bulunur.

Okunan çevirme açılarından aşağıdaki bağıntı kullanılarak şekerin spesifik çevirme açısı hesaplanır ve literatür değerleri ile karşılaştırılarak kalitatif analiz yapılır.

$$[\alpha]_{t\lambda} = \frac{\alpha}{L \cdot C}$$

α : Okunan çevirme açısı L : Tüpün dm cinsinden uzunluğu

t : Sıcaklık λ : Kullanılan ışığın dalga boyu, 589 nm (Sodyumun sarı ışığı)

DENEYLE İLGİLİ SORULAR

- 1) Polarimetri aletinin basitçe şeklini çizerek, temel çalışma prensibini anlatınız.
- 2) Polarize ışık, optikçe aktiflik, çevirme açısı, optikçe aktif bileşik, enantiyomer, rasemik karışım, diastereomer, levo ve dekstro terimlerini tanımlayınız.
- 3) Polarimetre ile hangi tür maddelerin analizi yapılır? Açıklayınız.
- 4) Polarimetre ile nicel analiz nasıl yapılır? Açıklayınız.
- 5) Polarize ışık ile enantiyomerlerin, rasemik karışımların ve mezo yapıların etkileşimleri nasıl olur? Açıklayınız.
- 6) Optik çevirmenin büyüklüğüne etki eden faktörleri sıralayınız
- 7) Optikçe aktiflik gösteren bir alkol, bir süre asidik bir çözeltide bekletilince optikçe aktifliğini kaybeder, sebebini açıklayınız.
- 8) Polarize ışık nasıl elde edilir? Açıklayınız.
- 9) Konfigürasyon belirlemede kullanılan D-, L- ve R-, S- ile çevirme yönlerini gösteren d-, l- arasında nasıl bir ilişki vardır? Açıklayınız.
- 10) Rasem bileşiklerin ayrılması (rezolüsyonu) nasıl yapılır? Anlatınız.