

ENSTRÜMENTAL ANALİZ LABORATUARI
DENEY FÖYÜ

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

2020

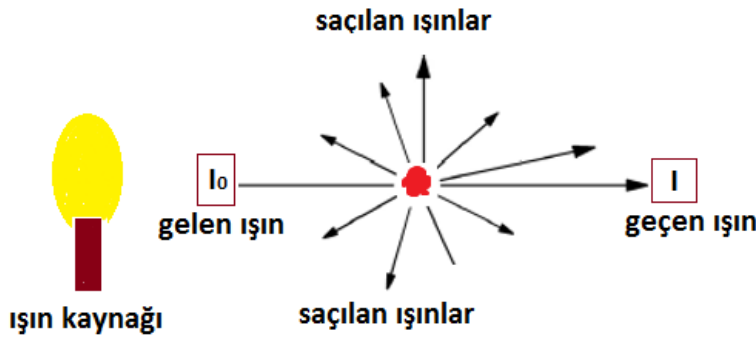
İÇİNDEKİLER	Sayfa
1. TÜRBİDİMETRİ.....	3
2. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ.....	8
3. FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ	12
4. INFRARED SPEKTROSKOPİSİ.....	18
5. NÜKLEER MANYETİK REZONANS SPEKTROSKOPİSİ.....	27
6. ULTRAVİYOLE-GÖRÜNÜR ALAN SPEKTROSKOPİSİ.....	31
7. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).....	40
8. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ.....	46
9. ALEV EMİSYON SPEKTROSKOPİSİ.....	51
10. X-IŞINLARI FLORESANS SPEKTROMETRİSİ (XRF).....	55
11.GAZ KROMATOĞRAFİSİ (GC-MS).....	59

1. TÜRBİDİMETRİ

1.1.Genel Bilgi

Işın, bulanık haldeki bir çözeltiye gönderilirse şeffaf çözeltilerin durumundakine benzer şekilde dört tür olay gerçekleşir. Yani gelen ışının bir kısmı yansır, bir kısmı saçılır, bir kısmı absorbe olur ve bir kısmı da geçirilir. Ancak bulanık çözeltilerde bulanıklığın miktarına bağlı olarak saçılan ışının miktarı da fazla olur. Dolayısıyla saçılan ışının miktarı çözeltideki partiküllerin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu durumda çözeltiden geçen ışının miktarı da çözeltideki partiküllerin konsantrasyonuna bağlı olarak azalır. Işının saçılmasından dolayı azalan geçirgenliğin ölçülmesi türbidimetrenin esasını oluşturur.

Işının çözeltideki bir partikülle etkileşerek saçılması fiziksel bir olaydır. Bu olay sırasında partikülün elektronları bir yönde kuvvete maruz kalırken çekirdek de zıt yönde bir kuvvete maruz kalır. Partikül etrafındaki elektronlar, gelen ışının elektrik alanı ile senkronize olacak şekilde osilasyon gösterirler. Böylece partikül üzerinde bir dipol oluşur. Bu dipolun şiddeti gelen ışının elektrik alanının kuvveti ile orantılıdır. Bu oluşan dipol devamlı osilasyon halindedir ve gelen ışın ile aynı “dalga boyunda” ve “her yönde” ışın yapar. Osilasyon halindeki bu dipolden yayınlanan radyasyona “saçılan ışın” denir. Saçılmaya reaktif katılım hızı, numune konsantrasyonu, karıştırma hızı, bekletme süresi, sıcaklık, pH ve iyon şiddeti gibi etkenler etki eder.



Şekil 1.1. Işının çözeltideki bir partikülle etkileşmesi sonucu saçılması ve geçmesi

Partikül içeren bir çözelti, türbiditesine yani bulanıklığına bağlı olarak üzerine gönderilen ışının şiddetini azaltır. Şekil 1.1’de ışın kaynağından gelen ışının partikülle etkileşmesi sonucu bir kısmının her yöne saçılması ve bir kısmının da geldiği doğrultuda geçmesi temsili olarak

gösterilmiştir. Burada I_0 çözeltiye gönderilen ışının şiddetini, I ise geldiği doğrultuda çözeltiden geçen ışının şiddetini göstermektedir. Türbidite yani bulanıklık Eşitlik 1.1'deki gibi ifade edilebilir.

$$S = \log I_0 / I = kbc \quad (1.1)$$

Eşitlik 1'de S türbiditeyi, b ışın yolunu, c parçacıkların konsantrasyonu gösterirken k bir sabiti temsil etmektedir. Işını absorplayan türlerin de ortamda bulunması halinde türlerin absorpsiyon yapmadığı dalga boyunda bulanıklık ölçülür. Bazı cihazlarda 90° 'lik açıda konumlandırılmış bir dedektörle numuneden saçılan ışının şiddeti de ölçülebilir (nefelometrik ölçüm). Işın olarak IR ışınları kullanılırsa bu ışınlar ortamdaki bulanıklık yapan tanecikler tarafından absorplanmadığı için bozucu etkisi olmaz.

Türbidimetri ile organik türler tayin edilebildiği gibi inorganik türler de tayin edilebilir. Sudaki çözünürlüğü az olan sülfat, klorür ve okzalat iyonları türbidimetrik yöntemle tayin edilebilir. Kısaca türbidimetrimin uygulama alanları arasında kanda kolesterol, tütünde nikotin, lastikte çinko, ilaçlarda etken maddelerin tayinleri sayılabilir.

1.2. Deneysel kısım

Kullanılacak cihaz: Taşınabilir mikroişlemcili türbidimetre

Işın kaynağı: 890 nm ışın yayan diyot (IR-LED)

Dalga boyu seçicisi: Yok

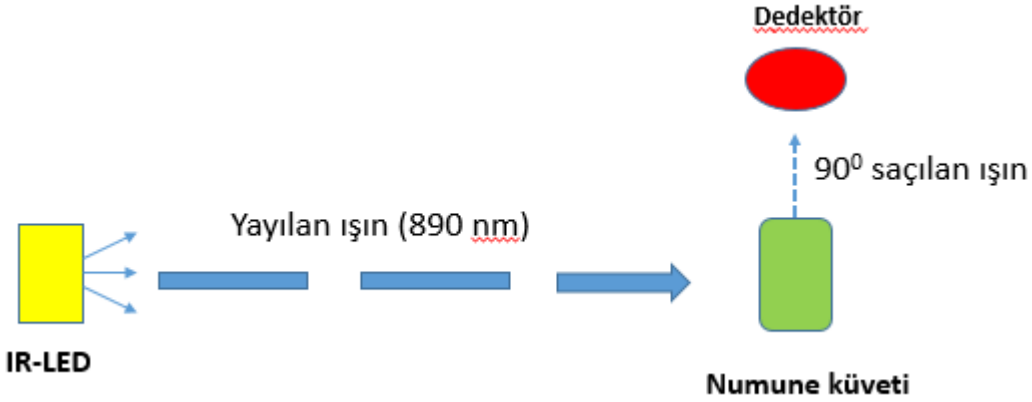
Dedektör: Silisyum fotosel

Çalışma prensibi: Numune çözeltisi üzerine 890 nm'lik ışın gönderilir. Numune hücreesine 90° 'lik açıda konumlandırılmış bir dedektörle numuneden saçılan ışının şiddeti ölçülür. Cihazdaki mikroişleci, bu şiddeti bulanıklık birimi olarak bilinen FTU (Formazine Turbidity Unit) birimine dönüştürdüktan sonra ekranda okunur. FTU birimi NTU (Nefelometric Turbidity Unit) olarak da bilinir. mg/L SiO_2 olarak ifade edilen başka bir bulanıklık birimi de Silika Birimi'dir. Bu birimler arasındaki ilişki Eşitlik 1.2'de verilmiştir.

$$1 \text{ FTU} = 1 \text{ NTU} \text{ ve } 1 \text{ FTU} = 7,5 \text{ SiO}_2 \text{ (mg/L)} \quad (1.2)$$

Kullanılan cihaz 0-1000 FTU arasında ölçüm yapma özelliğine sahiptir.

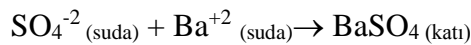
Şekil 1.2 bu deneyde kullanılan cihazın çalışma sistemini şematik olarak göstermektedir.



Şekil 1.2. Türbidimetrik ölçüm için cihazın bileşenlerinin şematik gösterimi

Deney 1.1. Musluk suyundaki sülfat miktarının türbidimetrik yöntemle tayin edilmesi

Sülfat iyonu doğal sularda fazlaca bulunur. Kaynakları arasında organik maddelerin aerobik ortamda ayrışması, özellikle kıyı bölgelerinde deniz tuzu, asit yağmurları ve mineraller sayılabilir. İçme sularında 250 mg/L üzerindeki sülfat konsantrasyonları sağlık sorunlarına yol açabilir. Aynı zamanda sülfatlar su sertliğinin karbonat olmayan kısmını oluşturduklarından su kazanlarında ve borularda tortu oluşumuna yol açarlar. Sülfat tayini için en yaygın kullanılan yöntemler gravimetrik ve türbidimetrik yöntemlerdir. Suda bulunan sülfat iyonu, suya Ba^{+2} iyonlarının eklenmesi ile asidik koşullarda $BaSO_4$ kristalleri oluşturur.



Çözeltideki katı $BaSO_4$ tanecikleri kolloid bir çözelti oluşturur. Suda ne kadar çok SO_4^{-2} iyonu varsa, Ba^{2+} çözeltisi eklenmesinden sonra o kadar fazla bulanıklık oluşur. Türbidimetrik yöntem ile 1-200 mg/L arası sülfat derişimleri ölçülebilir. Ancak 40 mg/L üzerindeki sülfat derişimlerinde, $BaSO_4$ süspansiyonunun stabilitesi azaldığından, metodun güvenilirliği düşer.

Kimyasal madde ve malzemeler: $BaCl_2$, $2H_2O_2$, Na_2SO_4 , gliserin, derişik hidroklorik asit, izopropil alkol, sodyum klorür ve saf su.

100 ppm standart sülfat çözeltisi: 0,1479 g susuz Na_2SO_4 saf suda çözülerek 1 litreye tamamlanır. Bu çözeltinin 1 L' si 100 mg (100 ppm) SO_4^{-2} iyonu içerir.

Yardımcı (taşıyıcı) çözelti: Yardımcı çözelti gliserin (50mL), konsantre hidroklorik asit (30mL), 300 mL distile su, izopropil alkol (100 mL) ve sodyum klorür (75gr) den oluşan bir çözeltilerdir. Çözeltinin bileşenlerinin yukarıdaki sıra ile birbirine karıştırılması gerekmektedir. Bu çözelti BaSO₄ kolloidlerinin analiz süresi boyunca kararlı kalmalarını sağlar.

Deneyin yapılışı

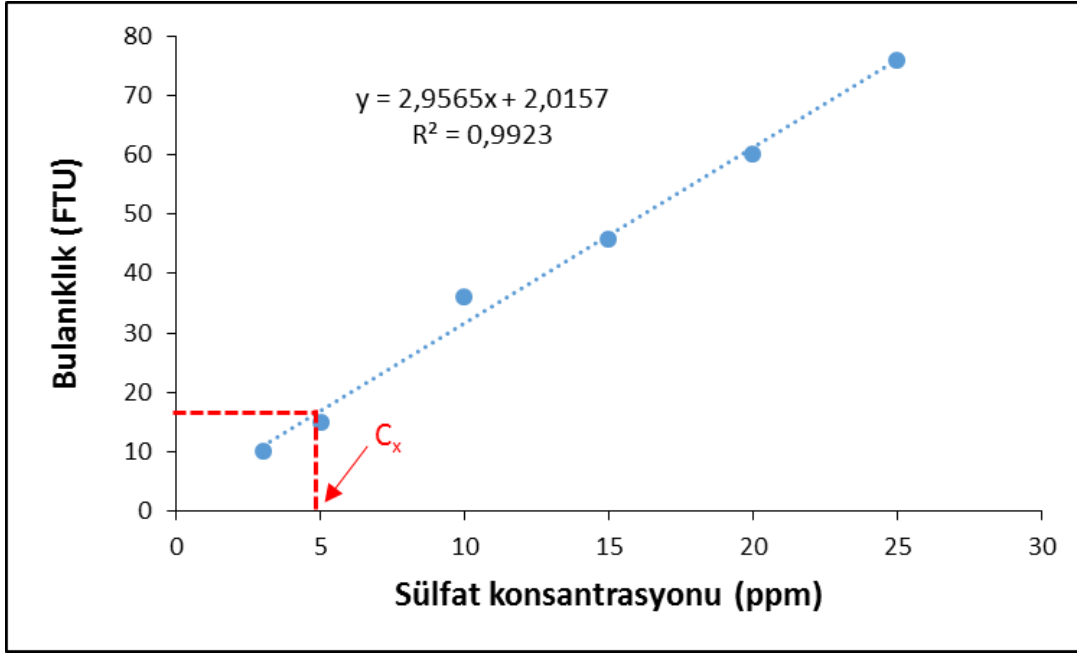
100 ppm'lik standart sülfat çözeltisinden 50 ml'lik balon jöjelere 1,5 mL, 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, 10 mL koyulur. Son iki balon jöjeye sülfat çözeltisinden konmaz. Sonra bütün balon jöjelere 0,15 g BaCl₂. 2H₂O₂ ve 2 mL taşıyıcı çözelti ilave edilir. Son dört balon jöje hariç bütün balon jöjelerin hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlanırken son dört balon jöjeden ikisinin hacmi musluk suyu ile ikisinin hacmi şişe suyu ile 50 mL'ye tamamlanır. 2 dak. karıştırıldıktan sonra her bir balon jöjedeki çözeltilerden numune kabına alınarak türbidimetri cihazına yerleştirilir ve FTU birimi olarak bulanıklık okunur. Tablo 1.1'de yapılan ölçümler için bir örnek gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Türbidimetrik sülfat tayinindeki ölçümler ve okunan sinyaller

Çözeltiler	100 ppm standart sülfat çözeltisinden alınan hacim (mL)	Toplam çözelti hacim (mL)	Standartların son konsantrasyonu (ppm)	Bulanıklık (FTU)
S1	1,5	50	3,0	10,0
S2	2,5	50	5,0	15,2
S3	5,0	50	10,0	39,4
S4	7,5	50	15,0	45,8
S5	10,0	50	20,0	60,1
S6	12,5	50	25,0	75,8
N1 musluk suyu	-	50	-	18,5
N2 musluk suyu	-	50	-	17,2
N1 şişe suyu	-	50	-	10,6
N2 şişe suyu	-	50	-	11,3

Bu şekilde hazırlanan ilk beş çözelti için okunan sinyal değeri y eksenine ve sülfat derişimleri x eksenine yazılarak dış kalibrasyon grafiği çizilir (Şekil 1.3). Grafiğin doğru

denklemini, bilgisayarda bir grafik programı kullanılarak veya milimetrik kağıtta grafik çizilerek belirlenir. Son dört balon joddeki çözeltilerden ikisi musluk suyunda diğer ikisi şişe suyundaki sülfat konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanmış iki paralel çözeltidirler. Bu çözeltiler için okunan sinyallerin kalibrasyon denkleminde yerine konarak bulunan konsantrasyonların ortalaması alınarak sonuç mg/mL olarak rapor edilir.



Şekil 1.3. Türbidimetrik sülfat tayini için kalibrasyon grafiği ve numune konsantrasyonunun grafikten bulunması

Numunelerdeki sülfat miktarının hesaplanması

Su numunelerindeki sülfat iyonlarının konsantrasyonu Şekil 1.3’de gösterildiği gibi numune sinyalinden grafiğe dikme inilerek oradan da y eksenine dikme inilerek bulunabilir.

Alternatif olarak kalibrasyon denklemini $y=2,2565x+2,0157$ kullanılarak da sülfat konsantrasyonu bulunabilir. Örneğin;

N1 (musluk suyu) için bulunan sülfat konsantrasyonu; $C_x=(18,5-2,0157)/2,9565=5,57$ mg/L

N2 (musluk suyu) için bulunan sülfat konsantrasyonu; $C_x=(17,2-2,0157)/2,9565=5,14$ mg/L

Sonuç: İçme suyu numunesinde bulunan sülfat konsantrasyonu: $(5,57+5,14)/2=5,36$ mg/L

2. KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

2.1. Genel Bilgi

Kütle spektrometrisi en eski enstrümental yöntemlerden biri olmakla birlikte günümüzde uygulama alanı çok güncel olan bir spektroskopik yöntemdir. Özellikle kromatografik sistemlerle birleştirilmiş olarak kullanılır. Böylece bu sistemlerde ayrılan bileşenlerin teşhis edilmesinde dedektör olarak kullanılır.

Kütle spektroskopisi ile hem atomik türlerin hem de moleküler türlerin kütlelerinin belirlenmesi mümkündür. Analizi yapılan türler atomlarsa “Atomik Kütle Spektroskopisi”, moleküllerse “Moleküler Kütle Spektroskopisi” olarak adlandırılır. Sonuç olarak bu tip ikili sistemler dedektör kısmında önce kullanılan sistemin ismine göre İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi (ICP-MS) veya Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) gibi isimler alır. Bu laboratuarda kullanılacak cihaz bir moleküler kütle spektroskopisi cihazı olup LC-MS cihazıdır.

Moleküler kütle spektrometrisinde cihazın içindeki tüm hava pompalar yardımıyla dışarı atılır. Sonrasında buhar haline getirilen numune cihazdaki iyonlaşma odasına gönderilir. İyonlaşma odasında gaz halindeki molekülden farklı teknikler uygulanarak çok sayıda iyon oluşturulur. Oluşan bu iyonlar analizör denem kısmında kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılır. Burada m , yüklü taneciğin kütlelerini, z , taneciğin yükünü temsil eder. Bundan yararlanılarak numune teşhis ve tayin edilir. Manyetik alanda m/z oranına göre ayrılan tanecikler dedektör vasıtasıyla teşhis edilir. Spektrumda moleküler iyon pikleri ve temel pikler önemli piklerdir. Bu pikler teşhiste kullanılırlar.

Uygulanan iyonlaştırma tekniklerine göre farklı kütle spektroskopisi metotları vardır. Örneğin, gaz halindeki atom veya moleküller hızlandırılmış elektronlarla çarpıştırılarak atom veya molekülden elektron uzaklaşması sonucunda pozitif yüklü iyonlar oluşur. Bu yöntemle iyon oluşturulması elektron “impakt yöntemi” (EI) olarak adlandırılır. Ancak bu teknik “sert” bir tekniktir. Oluşan moleküler iyon piki çok yüksek enerjili olduğundan parçalanır ve spektrumda çok düşük şiddetli görülür. Bazen da hiç görülmez. Bu molekülün karakterize edilmesi açısından dezavantajlı bir durumdur. Bu nedenle daha “yumuşak” iyonlaştırma teknikleri geliştirilmiştir.

Yumuşak tekniklerden biri “elektro spray” tekniği (ES) ile iyonlaştırmadır. Elektro spray iyonlaştırma (ESI) yöntemi birçok organik bileşik ve ilaç molekülleri için moleküler iyon pikini belirlemede oldukça uygun bir yöntemdir. ESI tekniği ile iyonlaştırma, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşmektedir. Bu yöntemin avantajı büyük ve ısı ile kolayca parçalanmış maddelerin mol kütlelerinin belirlenebilmesidir. ESI yöntemi özellikle LC/MS cihazında kullanılmaktadır.

Moleküler iyon piki M^+ ile gösterilir. Kütleleri molekülün kütlelerine eşittir. Ömrü fazla ise şiddeti fazla olur. Herhangi bir pik görülmesi için 10^{-5} saniye zamana ihtiyaç vardır. Moleküler iyon pikinin spektrumda gözlenmesi molekülün yapısının doğrulanması açısından yararlıdır. Bazı maddelerin M^+ iyonları çok az ömürlü olduğundan şiddetleri düşüktür. Şiddeti en yüksek olan pike “temel pik” denir.

Kütle spektrumlarında sinyal ekseninde gösterilen iyon piklerinin şiddeti iki şekilde verilir.

1. Pikin şiddeti / en şiddetli pik şeklinde yani “iyonun bağıl bolluğu” olarak.

2. Pikin şiddeti / bütün piklerin toplam şiddeti yani “toplam iyonlaşma yüzdesi” olarak. Bu gösterim madde hakkında daha çok bilgi verir.

MS cihazının hassaslığı M^+ pik şiddetlerinin toplam pik şiddetine oranıdır. Bazı cihazlar 1/1000 hassasiyete sahiptir.

Element izotoplarının bulunması sebebiyle spektrumlarında $M+1$ ve $M+2$ piklerine de rastlanır. Bazı $M+1$ pikleri çarpışma sonucu hidrojen atomunun bir molekülden diğerine aktarılması sonucu oluşur. Ancak bu durum madde konsantrasyonunun artması ile arttığından izotop kaynaklı $M+1$ piklerinden ayırt edilebilir.

2.2. Deneysel kısım

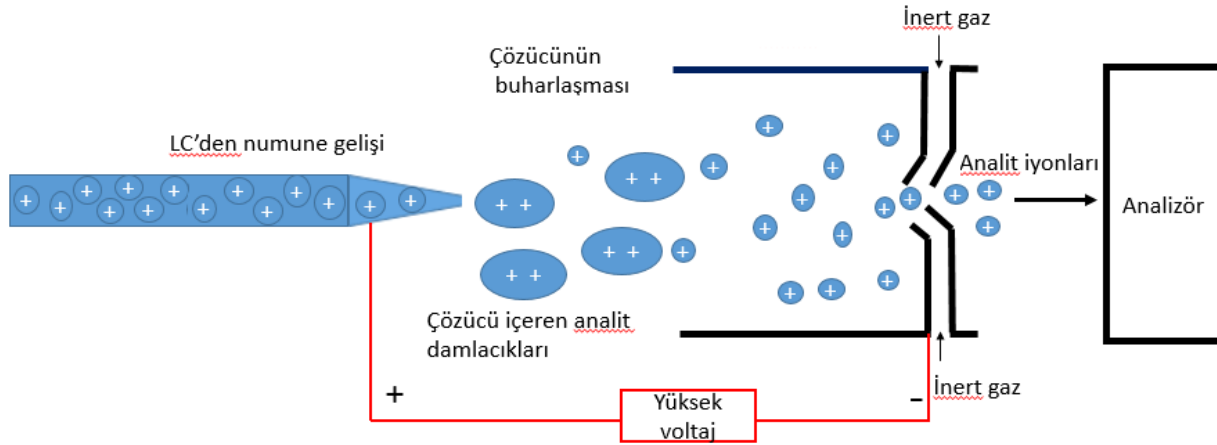
Kullanılacak cihaz: LC-MS-MS

İyonizasyon: ESI

Analizör: Triple kuadrupol kütle analizörü

Dedektör: Elektron çoğaltıcı dedektör

Cihazın çalışma prensibi: HPLC kolonundan çıkan hareketli faz içindeki analit moleküllerinden oluşan numune çözeltisi cihaza enjekte edilir. Numune buharlaştırıcı kısmında gaz haline gelir. Gaz halindeki moleküller elektron spray (ES) tekniği ile iyonlaştırılır. Numunenin enjeksiyonu ince bir sprej şeklindedir. Enjeksiyonun yapıldığı kısımda bir elektrik akımı vardır. Bu akımla analit molekülleri pozitif yüklenmiştir. Pozitif yüklü bu damlacıkların çözücüsü ısıtılmış bir inert gaz sayesinde uzaklaşır. Damlacıklar kararlı halde olmadığından bir süre sonra parçalanarak pozitif yüklü analit iyonlarını oluşturur (Şekil 2.1). Bu iyonların “analizör” kısmında analiz edilerek sinyal şeklinde kaydedilmesi ile spektrum elde edilir.



Şekil 2.1. ES yöntemi ile iyonlaştırmanın şematik olarak gösterilişi

Deney 2.1. Organik bir molekülün kütle spektrumunun alınması

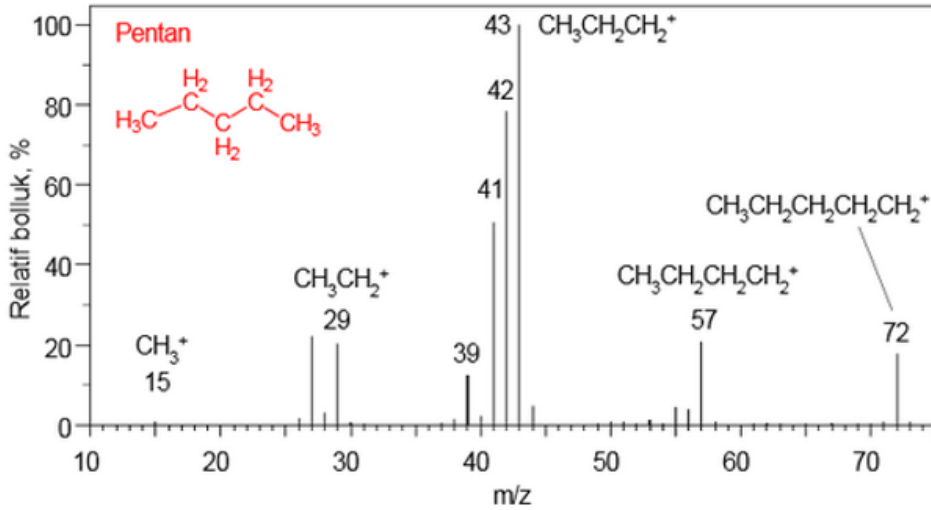
Organik yapı karakterizasyonunda molekülün sırasıyla IR ve ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumlarının alınmasının ardından kütle spektrumu kaydedilir. Kütle spektrumunun alınmasından önce maddenin saflığından emin olmak için bu sıra takip edilir. Madde saf değilse doğası gereği çok hassas olan kütle spektroskopisi yöntemi ile alınan kütle spektrumunda gözlenecek piklerin safsızlıklardan mı yoksa maddenin parçalanma ürünlerine ait pikler mi olduğunu ayırt etmek zorlaşır. Bu nedenle maddenin saf olduğundan emin olmak gerekir. Daha sonra kütle spektrumundaki sinyaller yorumlanarak karakterizasyon yapılır. Bunun için spektrumda moleküler iyon pikinin (M^+) gözlenmesi yapının doğrulanmasında en önemli faktördür.

Kimyasal madde ve malzemeler: Organik madde, organik çözücü, çözeltiyi süzmek için membran, numune enjeksiyonu için enjektör

Numune çözeltisi: Spektrumu alınacak organik maddeden uygun miktarda tartılarak yaklaşık 1 µg/L (ppb) çözeltisi hazırlanır.

Deneyin yapılışı

Bu deneyde kullanılan cihaza numune enjeksiyonu HPLC kolonundan değil, elle yapılacaktır. Numune çözeltisinin içerisinde çok ince de olsa katı partiküllerin kalmış olması sistemde tıkanmaya sebep olabileceğinden cihaza enjekte edilmeden önce uygun bir membran yardımıyla süzülmesi gerekir. Süzme işleminin ardından gerekirse çözücüyle seyreltilerek hazırlanan numune çözeltisi sisteme enjekte edilir. Sonra uygun voltaj uygulanarak spektrum kaydedilir. Daha sonra spektrumdaki pikler yorumlanarak yapı hakkında fikir yürütülerek rapor yazılır. Örnek bir kütle spektrumu pentan molekülü için Şekil 2.2’de verilmiştir. Pentan’ın mol kütlesi 72 g/mol olup, moleküler iyon pikinin 72’de gözlendiği spektrumdan görülmektedir. İyonlaşma ve parçalanma sonucu oluşan diğer fragmentlere ait sinyaller ve ilgili pikler de spektrumdan görülmektedir.



Şekil 2.2. Pentan'ın kütle spektrumu

Spektrumun değerlendirilmesi

Numunenin kütle spektrumunun yorumlanması yukarıda anlatıldığı şekilde yapılır.

3. FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ

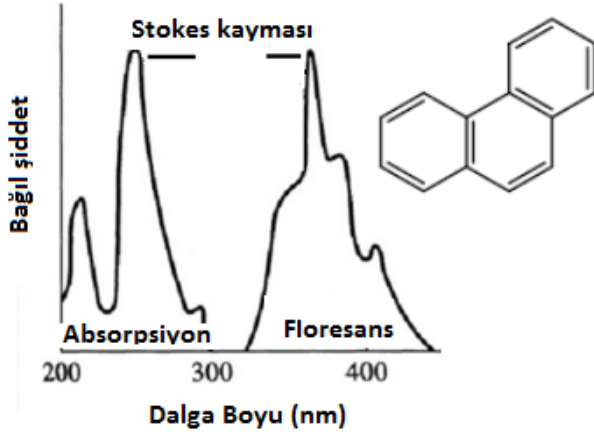
3.1. Genel Bilgi

Floresans spektroskopisi moleküler floresans spektroskopisi ve atomik floresans spektroskopisi olarak ikiye ayrılır. Enstrümental analiz laboratuvarında uygulanması yapılacak olan floresans spektroskopisi *moleküler floresans spektroskopisidir*. Bazı moleküller uygun bir ışınla uyarıldıklarında belli dalga boylarında ışın yayarlar. Bu olaya “fotoluminesans” denir. Fotoluminesansın en çok bilinen şekli “floresans” ve “fosforesans” ışımalarıdır. Böyle ışımaları yapan moleküllerin sayısı oldukça sınırlıdır.

Floresans ışınması kısa süreli bir ışımadır ve uyarıcı ışın molekülü uyarmaya devam ettiği sürece devam eder. Fosforesans ışınması ise daha uzun sürelidir ve uyarıcı ışın molekülü uyarmaya devam etmediği halde fosforesans ışınması devam edebilir. Floresans ışınmasının incelendiği spektroskopiye “Floresans Spektroskopisi”, fosforesans ışınmasının incelendiği spektroskopiye de “Fosforesans Spektroskopisi” denir. Floresans ışınması singlet halde gerçekleşir. Yani uyarılan elektron spinini değiştirmez, eşi olan temel haldeki elektronla hala zıt spinlidir. Fosforesans ise triplet halde gerçekleşir. Yani uyarılan elektron spinini değiştirir, eşi olan temel haldeki elektronla aynı spinlidir. Floresans spektroskopisinin uygulama alanı fosforesans spektroskopisinden fazladır.

Moleküler floresansta molekül, uyarıcı ışının dalga boyundan daha yüksek dalga boyunda ışın yayar. Yani daha düşük enerjide ışın yayılması söz konusudur. Molekül önce uyarıcı ışını absorplayarak üst enerji seviyesine çıkar. Sonra bir kısım enerjisini ışınmaz olarak kaybeder, geri kalan enerjiyi de ışın olarak daha uzun dalga boyunda yayar. Aradaki bu farka “stokes kayması” denir.

Floresans spektrumlarının en önemli özelliği uyarıcı dalga boyundan daha yüksek dalga boyunda yani daha düşük enerjide maksimum emisyonun elde edildiği bir spektrum olmasıdır. Bu farka karşılık olan enerji genellikle molekülün floresans ışınması yapmadan önce başka moleküllere çarpışmak suretiyle kaybedilmesi ile açıklanır. Geri kalan enerji de floresans ışınması olarak yayılır. Daha çok yüksek π bağı konjugasyonuna sahip naftalen, antrasen, piren, fenantren ve rodamin gibi moleküller floresans ışınması yaparlar. Örnek olarak fenantrenin absorpsiyon ve floresans spektrumları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fenantren'in absorpsiyon ve floresans spektrumları

Floresans spektroskopisi daha çok kantitatif amaçlı kullanılır. Diğer spektroskopik yöntemlerde olduğu gibi standart çözeltilerle yapılan kalibrasyona dayalı olarak madde miktarı hesaplanır. Konsantrasyon ile maddenin floresans şiddeti arasındaki doğrusal ilişkiyi faydalanılır. Beer Kanununa benzer bir eşitlik (Eşitlik 3.1) bu spektroskopik yöntemde de geçerlidir.

$$F.Ş = k.c \quad (3.1)$$

Burada F.Ş floresans şiddetini, c konsantrasyonu ve k orantı sabitini gösterir. Floresans spektroskopisinde absorpsiyon spektroskopisindeki gibi geçen ışının şiddeti değil, yayılan ışının şiddeti ölçüldüğünden ve bu şiddet de ışın kaynağının gücüne bağlı olduğundan lazerler gibi güçlü ışın kaynaklarının kullanılması cihazın hassasiyetini artırır.

3.2. Deneysel kısım

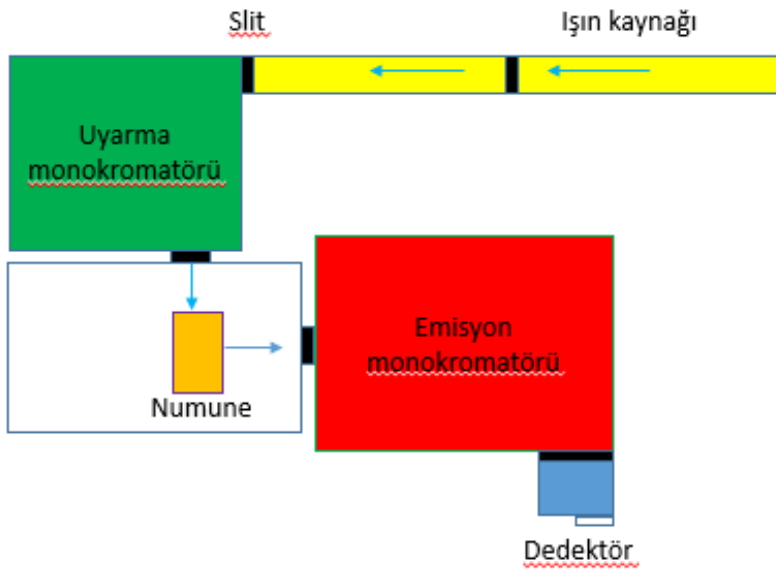
Kullanılacak cihaz: Spektroflorimetre

Işın kaynağı: Ksenon ark lambası

Dalga boyu seçicisi: Uyarma ve emisyon monokromatörü olmak üzere iki monokromatör içerir. Uyarma monokromatörü uyarıcı ışını dalga boylarına ayıran monokromatördür. Emisyon monokromatörü ise yayılan ışınları ayıran monokromatördür.

Dedektör: Fotoçöğaltıcı tüp

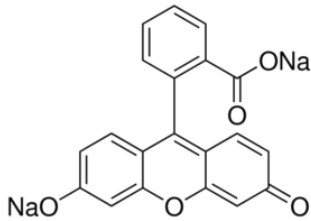
Çalışma prensibi: Işın kaynağından gelen UV-vis. ışınlar numune üzerine gönderilir. Bunun için önce uyarma monokromatöründen geçerler ve burada dalga boylarına ayrılırlar. Cihazın yazılımı kullanılarak uyarıcı ışının dalga boyu seçilir. Bu dalga boyundaki ışın numune üzerine gönderilir. Böylece uyarıcı ışınla uyarılan molekül daha uzun dalga boyunda bir ışıma yapar. Yayılan bu ışınlar gelen ışına göre 90°'lik açıda konumlandırılmış bir dedektörde algılanarak spektrum olarak kaydedilir. Floresans spektrumları, uyarıcı ışınla uyarılan numunenin yaydığı ışınların şiddetinin dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesinden elde edilir. Şekil 3.2 bir spektrofiorimetre cihazını şematik olarak göstermektedir.



Şekil 3.2. Bir spektrofiorimetrenin şematik olarak gösterilişi

Deney 3.1: Boyama kalemindeki Floresein'in florimetrik tayini

Bu deneyde floresans özellik gösteren Şekil 3.3'de açık yapısı verilen floresein bileşiğinin ticari boyama kalemlerindeki miktarı dış kalibrasyon yöntemi kullanılarak florimetrik yöntemle tayin edilecektir.



Şekil 3.3. Tayini yapılacak olan floresein boyasının yapısı

Kimyasal madde ve malzemeler: Floresein disodyum tuzu (376 g/mol), NaOH, saf su, 1 cm ışın yoluna sahip dört yüzeyi saydam kuvars hücre

Stok floresein çözeltisi: 37 mg floresein fosfat tamponunda (pH=7) çözülerek 1×10^{-3} M stok çözelti hazırlanır. Bundan seyrelterek 1×10^{-6} M ara stok çözelti hazırlanır.

Numune çözeltisi: 2.0×10.0 cm ölçülerinde bir kağıt ticari sarı boyama kalemi (highlighter) ile boyandı ve bir beherdeki 100 mL fosfat tamponuna daldırıldı. 1 dak. karıştırılarak boyanın çözelti ortamına alınması sağlanır.

Deneyin yapılışı

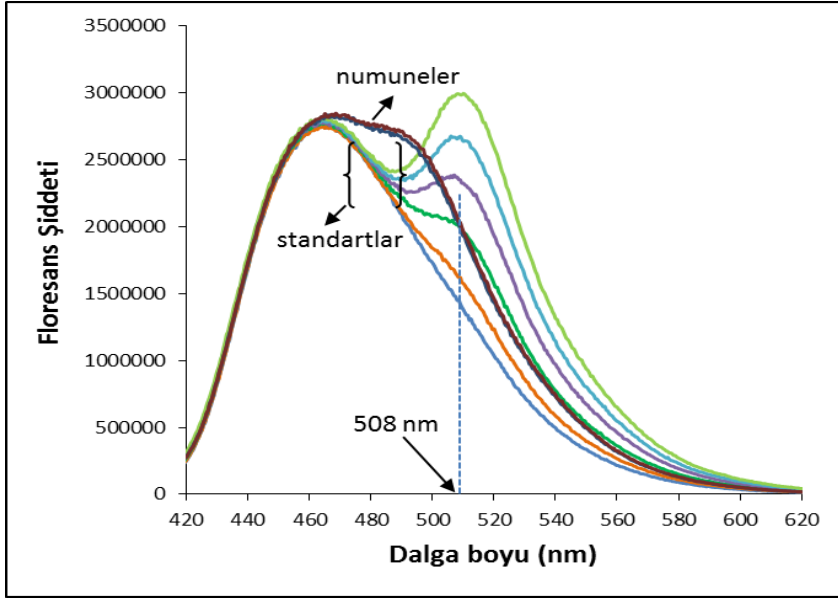
Floresein ara stok çözeltisinden fosfat tamponuyla seyreltmek suretiyle Tablo 3.1’de verilen konsantrasyonlardaki standart çözeltiler hazırlanır. Numune çözeltisi de fosfat tamponuyla 1/20 oranında seyreltilerek (0,2 mL alıp 4 mL’ye tamamlanarak) iki paralel numune (N1, N2) hazırlanır (Tablo 3.1). Tüm çözeltilerin 408 nm de uyarılarak floresans spektrumları kaydedilir (Şekil 3.4).

Tablo 3.1. Spektroflorimetrik floresein tayinindeki ölçümler ve okunan sinyaller

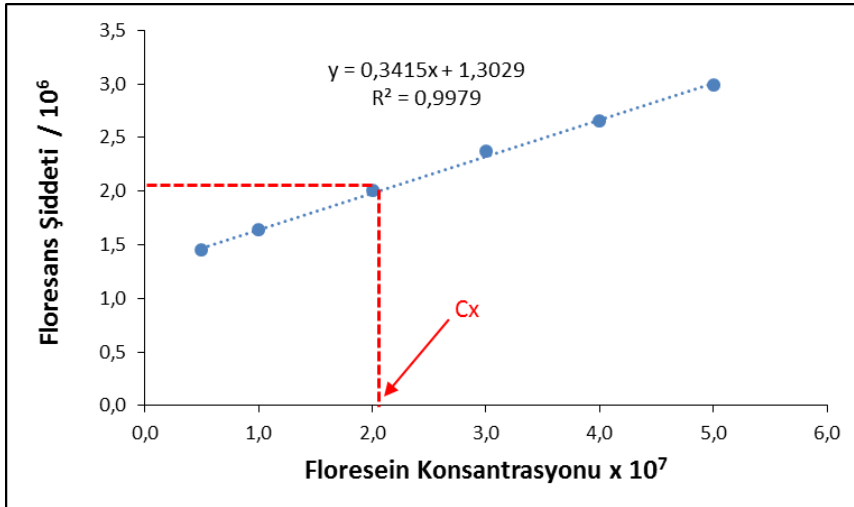
Çözeltiler	1×10^{-6} M stok floresein çözeltisinden alınan hacim (mL)	Toplam çözelti hacim (mL)	Standartların son konsantrasyonu (M)	508 nm deki floresans şiddetleri
S1	0,2	4,0	$5,0 \times 10^{-8}$	1448770
S2	0,4	4,0	$1,0 \times 10^{-7}$	1636340
S3	0,8	4,0	$2,0 \times 10^{-7}$	2010730
S4	1,2	4,0	$3,0 \times 10^{-7}$	2369900
S5	1,6	4,0	$4,0 \times 10^{-7}$	2654100
S6	2,0	4,0	$5,0 \times 10^{-7}$	2991320
N1	-	4,0	-	2048570
N2	-	4,0	-	2075560

Bu şekilde hazırlanan ilk altı çözelti için okunan floresans şiddetleri y eksenine ve floresein konsantrasyonları x eksenine yazılarak dış kalibrasyon grafiği çizilir (Şekil 3.4). Grafiğin doğru

denklemini, bilgisayarda bir grafik programı kullanılarak veya milimetrik kağıtta grafik çizilerek belirlenir. Son iki balon joddeki çözeltiler numune çözeltisindeki floresein konsantrasyonunu belirlemek için hazırlanmış iki paralel çözeltilerdir. Bu çözeltiler için okunan sinyaller kalibrasyon denkleminde yerine konarak veya Şekil 3.5'te gösterildiği gibi floresein konsantrasyonu hesaplanır.



Şekil 3.4. Standart floresein çözeltilerinin ve numunenin floresans spektrumları ve ölçümlerin yapıldığı dalga boyu



Şekil 3.5. Florimetrik floresein tayini için kalibrasyon grafiği ve numune konsantrasyonunun grafikten bulunması

Numunelerdeki floresein miktarının hesaplanması

Numunedeki floresein konsantrasyonu Şekil 3.5'te gösterildiği gibi numune sinyalinden grafiğe dikme inilerek oradan da y eksenine dikme inilerek bulunabilir.

Alternatif olarak kalibrasyon denklemi $y=0,3415x+1,3029$ kullanılarak da floresein konsantrasyonu bulunabilir. Örneğin;

$$N1 \text{ için } C_x = (2,0485-1,3029)/0,3415=2,18 \rightarrow C_x= 2,18 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$N2 \text{ için } C_x = (2,0756-1,3029)/0,3415=2,26 \rightarrow C_x= 2,26 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$\text{Sonuç: } (2,18 \times 10^{-7} + 2,26 \times 10^{-7}) / 2 = \mathbf{2,22 \times 10^{-7} \text{ M}}$$

4. INFRARED SPEKTROSKOPİSİ

4.1. Genel Bilgi

IR spektroskopisi de “moleküler spektroskopi” türlerinden biridir. Yani ışını absorplayan türler moleküllerdir. Moleküllerin absorpladığı ışınlar ise IR ışınlarıdır. Bu ışınların enerjileri moleküldeki titreşimsel enerji seviyelerine karşılık gelir. Molekülde çok sayıda titreşim enerji seviyesi ve onlara eşlik eden rotasyonel enerji seviyeleri bulunduğundan IR spektroskopisinde elde edilen spektrumlar da UV-vis. spektroskopisinde olduğu gibi band şeklindedir. Ancak IR spektrumlarındaki bantlar UV-vis spektrumlarına göre daha çok sayıda ve daha ayrıntılı yapıdaki keskin bantlardan oluşur. Bu nedenle UV. Vis. spektrumları kalitatif amaçla çok kullanılamazken IR spektrumları kalitatif amaçlı ve yapı aydınlatılmasında daha çok kullanılır.

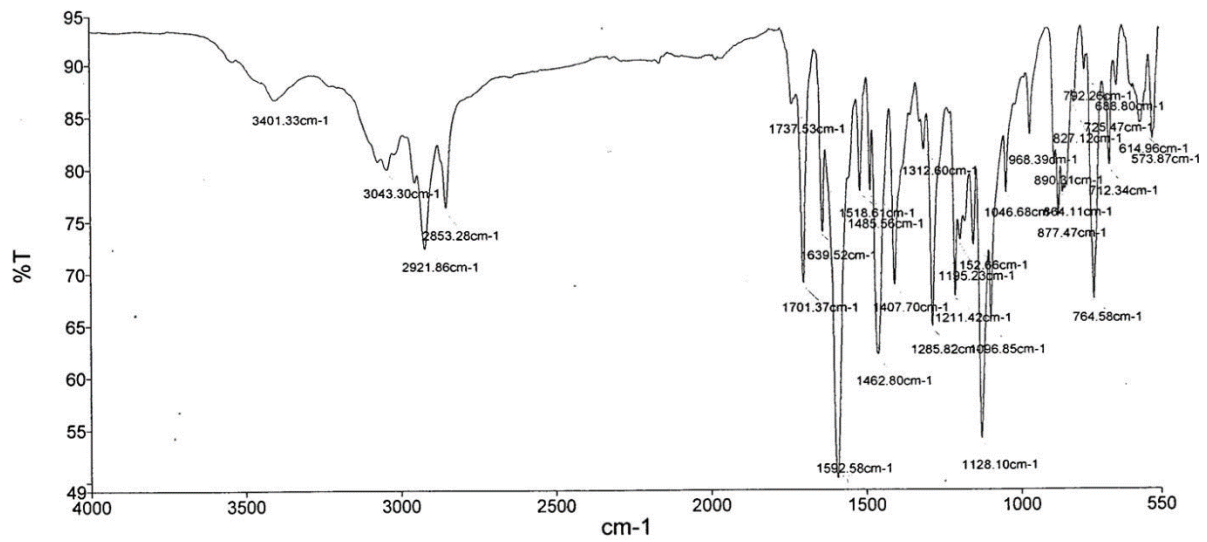
IR spektroskopisi günümüzde kantitatif amaçla da kullanılmasının yanında daha çok organik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Organik moleküllerin karakterizasyonlarının yapılmasında erime noktası veya kaynama noktasının tespit edilmesinden sonra yapılacak ikinci işlem molekülün IR spektrumunun alınmasıdır. Daha sonra sırasıyla ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektrumu alınmalıdır. Son olarak elementel analiz ölçümleri yapılmalıdır. Karakterizasyonda ikinci sırada IR spektrumunun alınmasının en önemli nedenlerinden biri cihazın NMR ve kütle cihazlarına göre daha ucuz olması ve spektrumun alınmasının daha basit olmasıdır. Çünkü maddenin katı, sıvı, çözelti veya gaz halinde IR spektrumunu alma şansı vardır.

Katı halde IR spektrumları genellikle maddenin KBr ile disk haline getirilmesi ile alınır. Bunun için dolgu maddesi olarak susuz KBr ile spektrumu alınacak madde belli oranlarda karıştırılarak agat bir havanda iyice ezilip toz haline getirilir. Sonra bu karışımın belli miktarı çelik bir disk üzerine yayılır ve başka bir çelik disk bu karışımın üzerine konularak üzerine belli bir basınç uygulanır. Bu basınç sonucunda iki çelik disk arasında zar gibi şeffaf bir disk elde edilir. Bu şeffaf disk çelik diskler arasından dikkatlice alınarak uygun aparata yerleştirilerek ışın yolu üzerine yerleştirilir ve üzerine IR ışını gönderilerek absorbansı ölçülür. Şekil 4.1 bu işlemde kullanılan malzeme ve aparatları göstermektedir.



Şekil 4.1. KBr ile disk hazırlamada kullanılan aparatlar ve basınç uygulama cihazı

IR spektrumlarında genellikle x ekseninde cm^{-1} cinsinden ışının dalga sayısı, y ekseninde geçen ışının şiddetiyle ilgili olarak %T (% geçirgenlik) yazılır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Örnek bir IR spektrumu

Sıvıların IR spektrumu alınırken numuneden bir damla kadar miktar NaCl gibi bir tuzdan yapılan iki disk arasına çok ince film halinde yayılır ve bu diskler ışın yolu üzerine konularak spektrum kaydedilir. Destek materyali olarak NaCl disklerinin kullanılmasının sebebi NaCl'ün IR ışınlarını geçirmesidir. Böylece NaCl diskinden geçen IR ışınları diskler arasında bulunan spektrum alınacak madde ile etkileşerek absorpsiyonun ölçülmesi sağlanır.

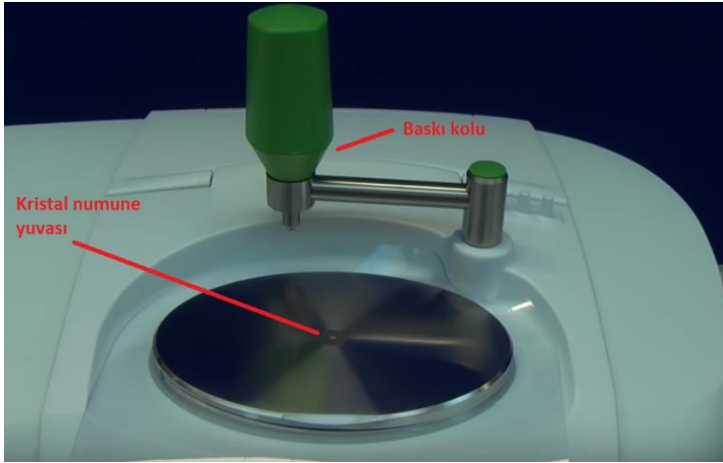
KBr yerine bazen sıvı parafin gibi bir alkan karışımı kullanılabilir. KBr kendisi nem çekici olduğundan KBr ile alınan spektrumlarda OH bölgesinde görülebilecek pikin KBr'ün su tutmasından kaynaklı bir OH bandı mı yoksa maddeye ait fonksiyonel bir OH bandı mı olduğuna karar vermek gerektiğinde spektrum bir kez de nujol (sıvı parafin) ile alınır. OH bölgesinde pik yine varsa bunun maddenin kendi yapısındaki bir OH bağına ait olduğu doğrulanır. Çünkü nujol nem çekici değildir. OH bölgesinde bir bant yoksa o zaman KBr'ün nem çekmesine bağlı bir band olduğuna karar verilir.

KBr ile spektrum alma tekniğinin bir diğer dezavantajı baskı sırasında molekülün simetrisinin bozulma olasılığıdır. Bu da spektrumun özelliğini değiştirir. Diğer bir dezavantaj bromürün molekülün yapısına dahil olma olasılığıdır. Bazı ligandlar bromürü bağlayabilir. Bu da spektrumun yapısının değişmesine sebep olur. Bazen de kompleks bileşiklerin yapısındaki bir grup ile bromür yer değiştirebilir. Bu da hatalı spektrum elde edilmesine sebep olur. Bu durumlarda da nujol kullanılması uygundur. Ancak nujol de alifatik C-H bağları bulundurduğundan spektrumun bu bölgesinde pik vererek karışıklığa sebep olur. Bu durumda maddenin yapısına ve şartlara göre uygun destek maddesi (nujol veya KBr) kullanılarak spektrum alınmalıdır. Çözeltilerin spektrumları alınırken çözeltiden NaCl diskler arasına bir damla koyup veya yeni cihazlarda bahsedilen yuvaya konup çözücüsünü buharlaştırmak suretiyle aynı işlemler uygulanabilmektedir. Gazların IR spektrumlarının alınmasında ise özel numune kapları ve ışın yolu üzerinde molekülleri daha uzun süre tutabilmek için özel düzeneklerle cihaz modifiye edilmiştir.

Günümüzde bu tekniklerin hiçbirine ihtiyaç duymayan bir teknikle IR spektrumları alınabilmektedir. Bazı firmalar bu amaçla ATR (attenuated total reflectance) tekniği olan cihazları piyasaya sürmüşlerdir. Bu cihazlarla katı, sıvı, polimer ve akışkan malzemelerin IR spektrumları kolaylıkla alınmaktadır. Esasen ATR tekniği, yüksek absorpsiyon özelliğinden

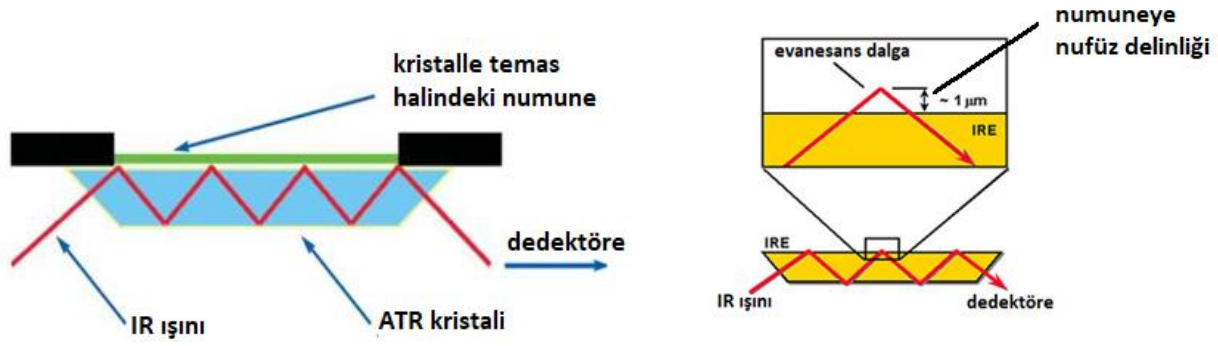
dolayı düşük geçirgenliğe sebep olan ve yoğun numunelerin IR spektrumlarını almak için idealdir.

Bu teknik maddenin kalınlığından etkilenmez. Çünkü IR ışını ile maddenin etkileşimi sadece numunenin yüzeyinde belli bir derinlikte gerçekleşir yani yüzeysel şekildedir. Numuneden geçen ışının şiddeti değil, yansıyan ışının şiddetine bağlı olarak geçirgenlik ölçülür. Bunun için kullanılan cihazın üst platformunda bir elmas veya germanyum kristal malzeme bulunur. Kristalin bulunduğu küçük yuvaya çok az miktarda numune koyulur ve platformun üzerindeki baskı eli ile uygun bir basınç uygulanarak kristalle numune arasında ideal bir temas olması sağlanır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. ATR tekniği için kullanılan kristal yüzey ve baskı kolu

Kristal üzerine belli açıda IR ışını gönderilir. Bu ışın kristaldeki yansımadan kaynaklanan evanesans dalgaların oluşumuna sebep olur ve kristalle temas halindeki maddenin belli bir derinliğine kadar maddeye nüfuz eder (Şekil 4.4, sağda). Bu nüfuzun derinliği ışının geliş açısına, kristalin yapısına ve ışının dalga boyuna bağlıdır.



Şekil 4.4. FT-IR ATR tekniği ile oluşan evanesans dalga (solda), dalganın numuneye işleme (sağda)

Işının madde yüzeyinden ilerlediği derinlik genellikle mikron mertebesindedir. Her bir yansıma noktasında evanesans dalga numuneye işler. Evanesans dalganın enerjisinin bir kısmı numune tarafından absorplanır ve yansıyan kısım kristalin karşı yüzeyinden çıkarak detektöre yönlendirilir (Şekil 4.4, solda). Dedektör, azaltılmış IR ışınını bir interferogram sinyali olarak kaydeder, daha sonra bir IR spektrumu oluşturmak için kullanır.

4.2. Deneysel kısım

Kullanılacak cihaz: FT-IR ATR spektrofotometresi

Işın kaynağı: Sıcak nokta kararlılığı olan uzun ömürlü ışın kaynağı

Işın ayırıcı: Çok tabakalı potasyum bromür, ya da sezyum iyodür

Dedektörler: Elektriksel olarak ısısal kararlı hızlı gerikazanım dötorolanmış triglisin sülfat (FR-DTGS) ya da lityum tantalat (LiTaO)

Çalışma prensibi: Bu deneyde yapısı bilinmeyen organik bir saf maddenin IR spektrumu alınarak gözlenen piklerden molekülün yapısı hakkında yorumlar yapılacaktır. Bunun için ATR sistemi olan Fourier dönüşümü infrared spektrometre (FT-IR) cihazı kullanılacaktır. Bir FT-IR sadece tek bir ışın yolu içerir. Numune olmadan bir arka plan spektrumu toplanıp sonuç cihazın bilgisayar belleğine kaydedilir. Arka plan spektrumu, numunenin spektrumundan çıkarılır. Diğer IR tasarımlarına kıyasla, FT-IR cihazları sinyal/gürültü oranının arttırılmasına imkan sağlayan cihazlardır.

Deney 4.1. Bilinmeyen bir organik maddenin IR spektrumunun alınması ve yorumlanması

Kullanılacak cihaz: FT-IR spektrofotometresi, FT-IR ATR spektrofotometresi

Kimyasal maddeler ve malzemeler: Yapısı bilinmeyen katı, sıvı ve çözelti halindeki organik bileşikler, uygun organik çözücüler.

Deneyin yapılışı:

Yapısı bilinmeyen katı madde bir FT-IR ATR spektrofotometresinin numune yuvasına yerleştirilerek, baskı kolu numune üzerine getirilerek hafif bir baskı uygulanır. Baskının miktarı bilgisayar ekranındaki uyarıya göre ayarlanır. Sonra spektrum bilgisayar aracılığı ile kaydedilir. Sıvı maddenin spektrumu da benzer yolla alınır. Çözelti halindeki maddenin IR spektrumu aynı şekilde alınmadan önce çözücüsü bir kurutma tabancası ile uzaklaştırılır. Aynı numunelerin IR spektrumları KBr ile tablet oluşturularak ve nujol ile pasta yapılarak da alınır.

Spektrumun değerlendirilmesi

Elde edilen spektrumların yapıları korelasyon tablosu ve frekans tabloları kullanılarak molekülün yapısındaki fonksiyonel gruplar belirlenip, yorumlanır. Sonra IR spektrumu alınan maddelerin deney sorumlusunun verdiği açık yapılardan hangisi olabileceği konusunda Tablo 4.1 yardımıyla bir deney raporu hazırlanır.

Tablo 4.1 Bazı fonksiyonel gruplara ait gerilme ve eğilme titreşimleri tablosu

4000-3000 cm ⁻¹						
3700-3584	orta	keskin	O-H	gerilme	alkol	serbest
3550-3200	şiddetli	yayvan	O-H	gerilme	alkol	moleküler arası bağlı
3500-3400	orta		N-H	gerilme	primer amin	
3400-3300	orta		N-H	gerilme	alifatik primer amin	
3330-3250					sekonder amin	
3350-3310	orta		N-H	gerilme	karboksilik asit	genellikle 3000 cm ⁻¹ üzerine merkezlenmiş molekül içi bağlı
3300-2500	şiddetli	yayvan	O-H	gerilme		
3200-2700	zayıf	yayvan	O-H	gerilme	alkol	
3000-2500 cm ⁻¹						
3333-3267	şiddetli	keskin	C-H	gerilme	alkin	
3100-3000	orta		C-H	gerilme	alken	
3000-2840	orta		C-H	gerilme	alkan	
2830-2695	orta		C-H	gerilme	aldehit	dublet
2600-2550	zayıf		S-H	gerilme	tiyol	

2400-2000 cm⁻¹						
2349	şiddetli		O=C=O	gerilme	karbondioksit	
2275-2250	şiddetli	yavan	N=C=O	gerilme	izosiyanat	
2260-2222	zayıf		C≡N	gerilme	nitril	
2260-2190	zayıf		C≡C	gerilme	alkin	disubstitue
2175-2140	şiddetli		S-C≡N	gerilme	tiyosiyanat	
2160-2120	şiddetli		N=N=N	gerilme	azid	
2150			C=C=O	gerilme	keten	
2145-2120	şiddetli		N=C=N	gerilme	karbodiimit	
2140-2100	zayıf		C≡C	gerilme	alkin	monosubstitue
2140-1990	şiddetli		N=C=S	gerilme	izotiyosiyanat	
2000-1900	orta		C=C=C	gerilme	allen	
2000			C=C=N	gerilme	ketenimin	
2000-1650 cm⁻¹						
2000-1650	zayıf		C-H	eğilme	aromatik bileşik	overton
1870-1540 cm⁻¹						
1818	şiddetli		C=O	gerilme	anhidrit	
1750						
1815-1785	şiddetli		C=O	gerilme	asit halojenür	
1800-1770	şiddetli		C=O	gerilme	konjuge asit halojenür	
1775	şiddetli		C=O	gerilme	konjuge anhidrit	
1720						
1770-1780	şiddetli		C=O	gerilme	vinil / fenil ester	
1760	şiddetli		C=O	gerilme	karboksilik asit	monomer
1750-1735	şiddetli		C=O	gerilme	ester	6-üyeli lakton
1750-1735	şiddetli		C=O	gerilme	δ-lakton	γ: 1770
1745	şiddetli		C=O	gerilme	siklopentanon	
1740-1720	şiddetli		C=O	gerilme	aldehit	
1730-1715	şiddetli		C=O	gerilme	α,β-doymamış ester	yada formatlar
1725-1705	şiddetli		C=O	gerilme	alifatik keton	yada sikloheksanon, siklopentenone
1720-1706	şiddetli		C=O	gerilme	karboksilik asit	dimer
1710-1680	şiddetli		C=O	gerilme	conjugated acid	dimer
1710-1685	şiddetli		C=O	gerilme	konjuge aldehit	
1690	şiddetli		C=O	gerilme	primer amit	serbest (birleşmiş: 1650)
1690-1640	orta		C=N	gerilme	imin / oksim	
1685-1666	şiddetli		C=O	gerilme	konjuge keton	
1680	şiddetli		C=O	gerilme	sekonder amit	serbest (birleşmiş: 1640)
1680	şiddetli		C=O	gerilme	tersiyer amit	serbest (birleşmiş: 1630)
1650	şiddetli		C=O	gerilme	δ-laktam	γ: 1750-1700 β: 1760-1730
1670-1600 cm⁻¹						
1678-1668	zayıf		C=C	gerilme	alken	disubstitue (trans)
1675-1665	zayıf		C=C	gerilme	alken	trisubstitue

1675-1665	zayıf		C=C	gerilme	alken	tetrasubstitue
1662-1626	orta		C=C	gerilme	alken	disubstitue (cis)
1658-1648	orta		C=C	gerilme	alken	viniliden
1650-1600	orta		C=C	gerilme	konjuge alken	
1650-1580	orta		N-H	eğilme	amine	
1650-1566	orta		C=C	gerilme	siklik alken	
1648-1638	şiddetli		C=C	gerilme	alken	monosubstitue
1620-1610	şiddetli		C=C	gerilme	α,β -doymamış keton	
1600-1300 cm⁻¹						
1550 - 1500	şiddetli		N-O	gerilme	nitro bileşiği	
1372-1290						
1465 1450	orta		C-H	eğilme	alkan	metilen grubu
1375	orta		C-H	eğilme	alkan	metil grubu
1390-1380	orta		C-H	eğilme	aldehit	
1385-1380	orta		C-H	eğilme	alkan	gem dimetil
1370-1365						
1400-1000 cm⁻¹						
1440-1395	orta		O-H	eğilme	karboksilik asit	
1420-1330	orta		O-H	eğilme	alkol	
1415-1380	şiddetli		S=O	gerilme	sulfat	
1200-1185						
1410-1380	şiddetli		S=O	gerilme	sulfonyl klorür	
1204-1177						
1400-1000	şiddetli		C-F	gerilme	Florür bleşiği	
1390-1310	orta		O-H	eğilme	fenol	
1372-1335	şiddetli		S=O	gerilme	sulfonat	
1195-1168						
1370-1335	şiddetli		S=O	gerilme	sulfonamid	
1170-1155						
1350-1342	şiddetli		S=O	gerilme	sulfonik asit	susuz
1165-1150						
1350-1300	şiddetli		S=O	gerilme	sulfon	
1160-1120						
1342-1266	şiddetli		C-N	gerilme	aromatik amin	
1310-1250	şiddetli		C-O	gerilme	aromatik ester	
1275-1200	şiddetli		C-O	gerilme	alkil aril eter	
1075-1020						
1250-1020	orta		C-N	gerilme	amin	
1225-1200	şiddetli		C-O	gerilme	vinil eter	
1075-1020						
1210-1163	şiddetli		C-O	gerilme	ester	
1205-1124	şiddetli		C-O	gerilme	tersiyer alkol	
1150-1085	şiddetli		C-O	gerilme	alifatik eter	
1124-1087	şiddetli		C-O	gerilme	sekonder alkol	
1085-1050	şiddetli		C-O	gerilme	primer alkol	
1070-1030	şiddetli		S=O	gerilme	sulfoksit	
1050-1040	şiddetli	yavan	CO-O-CO	gerilme	anhidrit	

1000-650 cm⁻¹					
995-985	şiddetli	C=C	eğilme	alken	monosubstitue
915-905					
980-960	şiddetli	C=C	eğilme	alken	disubstitue (trans)
895-885	şiddetli	C=C	eğilme	alken	viniliden
850-550	şiddetli	C-Cl	stretching	Halojen bileşiği	
840-790	orta	C=C	eğilme	alken	trisubstitue
730-665	şiddetli	C=C	eğilme	alken	disubstitue(cis)
690-515	şiddetli	C-Br	gerilme	halojen bileşiği	
600-500	şiddetli	C-I	gerilme	halojen bileşiği	
900-700 cm⁻¹					
880 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	1,2,4-trisubstitue	
810 ± 20					
880 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	1,3-disubstitue	
780 ± 20					
(700 ± 20)					
810 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	1,4-disubstitue yada 1,2,3,4- tetrasubstitue	
780 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	1,2,3-trisubstitue	
(700 ± 20)					
755 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	1,2-disubstitue	
750 ± 20	şiddetli	C-H	eğilme	monosubstitue	
700 ± 20					

5. NÜKLEER MANYETİK REZONANS SPEKTROSKOPİSİ (NMR)

5.1. Genel Bilgi

NMR spektroskopisi organik yapı karakterizasyonunda en çok bilgi edinilen spektroskopik tekniktir. Kantitatif amaçla kullanımdan çok kalitatif amaçlı ve yapı tayininde kullanılır. Oldukça pahalı bir cihaz kullanımını söz konusudur. Cihazın manyetik alanını sağlayan manyetin soğutulması için genellikle sıvı azot kullanılır. Sistemin verimli çalışabilmesi için bu bakımın rutin olarak yapılması gerekir. Bu nedenle zahmetli ve maliyeti yüksek bir spektroskopik yöntemdir. Ancak sağladığı bilgiler diğer tekniklerde mevcut olmadığından özellikle organik yapı tayinleri için çok önemlidir.

NMR spektrofotometrelerinde ışın olarak radyo dalgaları kullanılır. Bu nedenle UV-vis ve IR spektrofotometrelerine göre daha düşük enerjili ışınlara ihtiyaç duyar. Bunun sebebi NMR aktif çekirdeklerin manyetik alandaki presesyon hareketinin oluşturduğu frekansın ancak radyo dalgalarının enerji seviyelerine karşılık gelmesidir. Her element çekirdeği NMR spektrumu vermez. NMR spektrumu veren çekirdeklere NMR aktif çekirdekler denir. Bunlardan en çok faydalanılanlar organik moleküllerin esas elementleri olan karbon'un kütle numarası 13 olan izotopu (^{13}C) ve hidrojenin kütle numarası 1 olan izotopu (^1H)'dır. ^{13}C çekirdeğinin doğal bolluğu çok düşük olduğundan ^{13}C -NMR spektrumlarını almak, ^1H -NMR spektrumlarını almaktan daha çok zamana ihtiyaç duyar. Çünkü numunedeki ^{13}C atomlarının sayısı çok düşüktür. Buna karşılık ^1H çekirdeklerinin doğal bolluğu döteryum ve trityuma kıyasla çok yüksektir. Bu nedenle ^1H -NMR spektrumunu almak için birkaç dakika yeterlidir. Oysa ^{13}C -NMR spektrumlarını almak için saatlere ihtiyaç vardır.

NMR spektroskopisi absorpsiyon ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Numune çözeltisi özel bir ince cam tüp içinde manyetik alana bırakılır ve üzerine radyo frekansı gönderilir. Bu esnada numunenin manyetik alandan homojen etkilenmesi için numune tüpü sürekli döndürülür. Manyetik alanda farklı enerji seviyelerine ayrılan NMR aktif çekirdeklerden düşük enerjide olanlar radyo frekansını absorplayarak üst enerji seviyesine geçer. Buna çekirdeğin “rezonansa gelmesi” denir. Bu haldeki çekirdek uygun relaksasyon süreçleri ile alt enerji seviyesine geçerken absorplanan enerji de geri verilir. Absorplanan ışın enerjisi dedektörde algılanarak NMR piki olarak kaydedilir.

Çekirdeğin rezonans enerjisi Larmor bağıntısı ile verilir (Eşitlik 5.1) ve belli bir çekirdek için sabittir.

$$\nu = (\gamma \cdot B_0)/2\pi \quad (5.1)$$

Eşitlik 5.1’de ν çekirdeğin manyetik alandaki rezonans frekansını, γ çekirdeğe ait jiromanyetik sabiti, ve B_0 cihazın manyetik alan şiddetini ifade eder. Bu durumda bir çekirdek için tek bir rezonans frekansı olması beklenir. Ancak moleküldeki NMR aktif çekirdeklerin kimyasal çevrelerinin farklı olması onların farklı frekanslarda rezonansa gelmesine sebep olur. Bu da spektrumda farklı yerlerde piklerin gözlenmesini sağlar.

NMR spektrumları aslında iki şekilde alınabilir. Ya sabit manyetik alan şiddetinde frekans değiştirilerek, ya da sabit frekansta alan şiddeti değiştirilerek çekirdeklerin rezonansa gelmesi sağlanır. Böylece rezonans şartı sağlandığında her bir çekirdek farklı frekanslarda veya alan şiddetlerinde rezonansa gelir ve pik olarak kaydedilir. Böylece moleküldeki özellikle H ve C atomlarının kimyasal çevreleri hakkında bilgi elde edilir. Her bir cihazın sahip olduğu manyetik alan şiddeti aynı olmayabilir. Manyetik alan şiddeti yüksek olan cihazlarla daha ayrıntılı spektrumlar elde edilir. Bu nedenle yüksek manyetik alan şiddetine sahip cihazlarla spektrumların alınması tercih edilir. Ancak böyle cihazların fiyatları oldukça yüksektir.

Cihazların manyetik alan şiddetlerindeki farka bağlı olarak çekirdeklerin rezonans frekanslarını standardize etmek için kimyasal kayma (δ ppm) ölçeği kullanılır. Spektrumda x ekseninde bu ölçeğe ait rakamlar bulunur. Bu ölçek $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında TMS (tetrametil silan, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) standardının 12 eşdeğer olan protonunun rezonans frekansı ile numunenin ilgili protonunun rezonans frekansı arasındaki Hz cinsinden farkın cihazın MHz cinsinden frekansına

bölünmesi ile elde edilen rakamlardan oluşur. TMS'nin kimyasal kayma değeri 0 ppm olarak kabul edilmiştir. Buna göre ^1H -NMR spektrumlarında kimyasal kayma skalası 0-17 ppm arasındadır. Benzer şekilde ^{13}C -NMR spektrumlarında ise 0-250 ppm arasındadır.

TMS'ın NMR spektrumları alınmasında iç standart olarak kullanılmasının nedenleri şunlardır.

1. Eşdeğer protonun şiddetli bir tek sinyal vermesi
2. Kimyasal reaksiyon yatkınlığının düşük olması
3. Ucucu olması sebebiyle ortamda kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi
4. Bir çok organik bileşiğin NMR sinyallerinin TMS'nin NMR sinyallerinin solunda kalması

NMR spektrumları özel olarak protonların yerine döteryum geçirilmiş olan çözücülerde alınır. Bunlara dötero çözücüler denir. Oldukça pahalıdırlar. Bazı firmalar TMS'yi içinde bulunduran çözücülerini satarlar. Böylece analizcinin numune tüpü içerisine ayrıca TMS ilave etmesine gerek kalmaz. NMR tüpleri yıkanırken kromik asit kullanılmaz. Çünkü paramanyetik safsızlıklar kalabilir. Bu da NMR sinyallerinin genişlemesine dolayısıyla yapı hakkında ayrıntılı bilgi veren yarımların kaybolmasına sebep olur. Bu nedenle tüpler etanol, aseton gibi organik çözücülerle yıkanmalıdır. Oda sıcaklığında kurutulmalıdır. Etüvde kurutulmaları tüplerin yapılarının bozulmasına sebep olacağından tercih edilmemelidir.

Kullanılacak cihaz: NMR spektrofotometresi

Kimyasal maddeler ve malzemeler: Yapısı bilinmeyen organik katı numune, TMS içeren dötero kloroform veya dötero DMSO

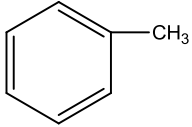
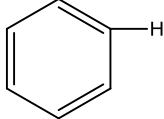
Numune çözeltisi: ^1H -NMR spektrumunu almak için yapısı bilinmeyen katı maddeden 10 mg tartılarak 2-3 mL TMS içeren dötero kloroformda çözülür. Çözücünün fazlası harcanmamalıdır. Bir cam pamuğundan süzülerek katı partikül kalmışsa uzaklaştırılarak berrak çözelti hazırlanır. Aynı numunenin daha derişik çözeltisi (yaklaşık 30 mg/mL) hazırlanarak ^{13}C -NMR spektrumunun alınmasında kullanılır.

Deneyin yapılışı: Bir pastör pipeti aracılığıyla uygun hacimde (1-2 mL) numune çözeltisi NMR tüpü içerisine alınır. Tüpün kapağı kapatılarak proba yerleştirilir ve cihaz içerisine bırakılır. Bilgisayar aracılığı ile yazılım kullanılarak $^1\text{H-NMR}$ spektrumu kaydedilir.

Spektrumun değerlendirilmesi

Elde edilen spektrumların yapıları kimyasal kayma değerleri, pik gruplarındaki yarılmalar ve piklerin altındaki integral değerleri dikkate alınarak yorumlanacaktır. Böylece molekülün yapısındaki fonksiyonel gruplar tahmin edilerek bir açık yapı önerisi yapılacaktır. Sonra deney sorumlusunun vereceği açık yapılardan hangisi olabileceği konusunda her bir öğrenciden rapor hazırlanması istenecektir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunun yorumlanmasında, bazı proton türlerinin kimyasal kayma değerlerinin özetlendiği Tablo 5.1.'den yararlanılacaktır. Yorumlanan spektrum raporda sunulacaktır. Spektrumların yorumlanmasında dikkate alınmayacak olan, bazı çözücülerin protonlarına ait kimyasal kaymalar Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Bazı proton türlerinin kimyasal kayma değerleri

Proton türü	Yaklaşık kimyasal kayma (ppm)	Proton türü	Yaklaşık kimyasal kayma (ppm)
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS)	0	$\text{Cl}-\text{CH}-$	3-4
$-\text{CH}_3$	0,9	$\text{F}-\text{CH}-$	4-4,5
$-\text{CH}_2-$	1,3	$\text{R}-\text{NH}_2$	1,5-4 (değişken)
$-\text{CH}-$	1,4	$\text{R}-\text{OH}$	2-5 (değişken)
$-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$	1,7	$\text{Ar}-\text{OH}$	4-7 (değişken)
$-\text{C}-\text{CH}_3$	2,1	$\text{R}-\text{C}=\text{CH}_2$	4,7
$\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$	2,1	$\text{R}-\text{C}=\text{CH}$	5,3
	2,3	$\text{R}-\text{C}=\text{CH}$	5,3
$-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	2,4		6,5-8
$\text{I}-\text{CH}-$	2,5-4	$-\text{C}-\text{H}$	9,0-10
$\text{Br}-\text{CH}-$	2,5-4	$-\text{C}-\text{OH}$	10-12 (değişken)

Tablo 5.2. Bazı NMR çözücülerinin protonlarına ait kimyasal kayma değerleri

Çözücü	Protonun kimyasal kayma	Çözücü	Protonun kimyasal kayma
Aseton-d ₆	2,05	Döteryumoksit	4,80
Asetonitril-d ₃	1,94	DMSO-d ₆	2,50
Benzen- d ₆	7,16	Metanol-d ₆	4,78 - 3,31
Kloroform-d	7,24	Piridin- d ₅	8,74 - 7,58 -7,22

6. ULTRAVİYOLE-GÖRÜNÜR ALAN SPEKTROSKOPİSİ

6.1.Genel Bilgi

UV-vis. spektroskopisi daha çok kantitatif amaçla kullanılan bir spektroskopik yöntemdir. UV ve görünür bölge ışınları ile *moleküllerin* etkileşmesine dayandığından “*moleküler* spektroskopi” türlerinden biridir. Bu etkileşim sonucunda moleküllerin bağ elektronları uyarılır. Çünkü UV-vis. ışınlarının enerjileri moleküllerin dış tabaka elektronlarının enerji seviyesindedir. Böylece uygun enerjiyi alan dış tabaka elektronları kısa bir süreliğine karşı bağ orbitallerine geçerler. Bu olaya “ışının absorplanması” denir. Işının absorplanması sonucunda molekülün enerjisi kısa süreliğine artmıştır. Ancak bu hal kararlı bir hal olmadığından molekül tekrar temel hal enerjisine döner.

Molekül uygun ışını absorpladığında bir “elektronik geçiş” söz konusu olduğundan bu spektroskopiye “elektronik spektroskopi” de denir. Molekülün yapısında π bağları veya ortaklanmamış elektron çiftleri bulunduğu anda alınan spektrumda bu elektronların geçişlerine karşılık bazı absopsiyon bandları gözlenir. Bu nedenle UV-vis. spektroskopisine “çifte bağlar ve ortaklanmamış elektron çifti spektroskopisi” de denir. Molekülde çok sayıda elektronik enerji seviyesi ve onlara eşlik eden titreşimsel ve rotasyonel enerji seviyeleri bulunduğu anda elde edilen spektrumlar bandlar şeklindedir.

Özetle; yapılarında çifte bağlar ve ortaklanmamış elektron çiftleri bulduran C=O, C=C, C=N, CHO, CN, NO₂ gibi *kromofor gruplar* taşıyan moleküllerin UV-vis spektrumları bir veya

birden çok absorpsiyon bandı verir. Bu absorpsiyon bandlarındaki absorbanslar ölçülerek ilgili kromofor grubu taşıyan molekülün kantitatif tayini yapılabilir. Organik moleküllerin olduğu kadar inorganik moleküllerin de UV-vis. absorpsiyon spektrumları alınabilir. Işının absorplanması olayı iki tür bileşikte de aynıdır. Ancak farklı teorilerle açıklanır.

UV-vis. absorpsiyon spektrumunda x ekseninde genellikle dalga boyu (nm olarak), y ekseninde ise numuneye gönderilen ışının absorplanma miktarını temsil eden absorbans değeri bulunur. Işın kaynağından gelen ışının bir kısmı çözültideki moleküller tarafından absorplandığından çözültiden geçen ışının şiddetinde azalma olur. Bu azalma Beer Kanunu ile ifade edilir. Beer Kanunu Eşitlik 6.1 ile gösterilmiştir.

$$A = \epsilon bc \quad (6.1)$$

Eşitlik 6.1’de A absorbans, ϵ absorptivite katsayısı, b ışın yolu ve c çözültinin konsantrasyonunu ifade eder. A birimsizdir. b cm olarak verilebilir. c molarite olarak verilmişse ϵ ’un birimi $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ olur.

Beer Kanunu absorbansın ışın yolu ve çözültinin konsantrasyonu ile doğrusal ilişkili olduğunu gösterir. ϵ değeri bilindiğinde molekülün belli konsantrasyonunun belli ışın yolunda vereceği absorbans bulunabilir. Bunun tersi de doğrudur. Yani ϵ bilindiğinde absorbans ölçülerek konsantrasyon bulunabilir. Bununla birlikte ϵ değerinin, ölçümlerin yapıldığı anda belirlenmesi yani kalibrasyon grafiğinin numunenin ölçümüyle aynı anda hazırlanması gerekir. Çünkü okunan absorbans değerleri gün içinde değişebileceği gibi cihazdan cihaza da farklılıklar gösterebilir.

6.2. Deneysel Kısım

Kullanılacak cihaz: Çift ışın demetli UV-Vis. spektrofotometre

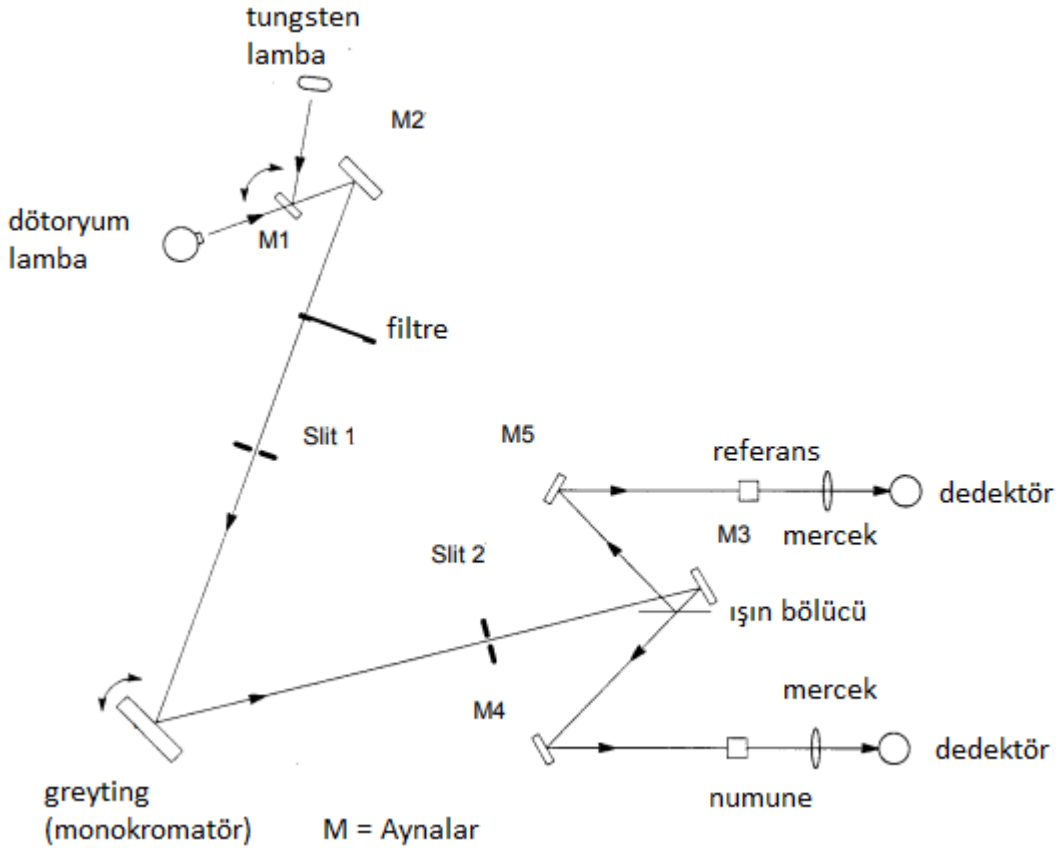
Işın kaynağı: UV bölge için dötoryum lamba, görünür bölge için tungsten lamba.

Monokromatör: Holografik konkav greyting

Dedektör: Fotodiyot

Çalışma prensibi: Cihaz çift ışın demetli bir cihazdır. UV bölge için dötoryum lamba, görünür bölge için tungsten lamba ışın kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kaynaktan gelen ışın bir ışın bölücü yardımıyla iki eşit şiddete bölünür ve biri referans çözültiden diğeri numune çözültisinden

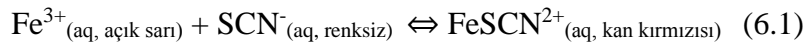
geçer. Geçen ışınların şiddetleri ölçülerek absorbansa çevrilir. Cihazın dizaynı ve ölçüm şeması Şekil 6.1’de verilmiştir.



Şekil 6.1. Kullanılan UV-vis spektrofotometresinin şeması

Deney 6.1. Demir (III) Tiyosiyonat Kompleksinin Denge Sabitinin Hesaplanması

Fe^{3+} iyonu SCN^- iyonu ile asidik ortamda kan kırmızısı rengindeki $FeSCN^{2+}$ kompleksini verir. Eşitlik 6.1 kompleks oluşum dengesini göstermektedir.



Bu deneyde Fe^{3+} iyon kaynağı olarak $Fe(NO_3)_3$ çözeltisi, SCN^- iyon kaynağı olarak $KSCN$ çözeltisi hazırlanacaktır. Bir kimyasal tepkimenin denge sabiti, sıcaklığa ve dengedeki tüm türlerin derişimlerine bağlıdır. Tepkimede oluşan ürünlerin denge derişimlerinin, tepkimeye giren türlerin derişimlerine oranı denge sabitini verir. $FeSCN^{2+}$ kompleksinin denge sabiti hesaplanmasında Eşitlik 6.2’deki ifade kullanılır.

$$\beta = \frac{[FeSCN^{2+}]}{[Fe^{3+}][SCN^-]} \quad (6.2)$$

Eşitlik 6.2’de yer alan köşeli parantezler, türün dengedeki derişimini ifade etmektedir. İyon şiddetini, tüm karışım çözeltilerinde karşılaştırılır kılmak için tüm çözeltiler 0.10 M HNO₃ çözeltilisinde hazırlanır.

Deneyde dikkat edilmesi gereken hususlardan biri, derişimleri tam olarak bilinen bir seri standart FeSCN²⁺ çözeltileri hazırlanmasıdır. Tepkime, denge tepkimesi olduğu için sistem sürekli tersinirdir ve tam olarak FeSCN²⁺ kompleks derişimi belirlenemez. Tepkimenin ürünler yönüne yani FeSCN²⁺ kompleksi oluşum yönünde ilerlemesi için sisteme etki edebiliriz. Bu nedenle, Fe³⁺ iyonu konsantrasyonunu SCN⁻ iyonu konsantrasyonundan görece olarak ortamda daha fazla bulundurarak tepkimenin neredeyse tamamlanması sağlanır ve SCN⁻ iyonu derişimi denge anında neredeyse sıfırlanır. Bu durumda, FeSCN²⁺ kompleksi denge derişimi, başlangıçtaki SCN⁻ iyonu derişimine yaklaşık olarak eşit varsayılır. Bu yaklaşımla, her bir standart FeSCN²⁺ kompleksi derişimi hesaplanır.

Kimyasal maddeler ve malzemeler: Potasyum tiyosiyanat (KSCN), demir (III) nitrat (Fe(NO₃)₃), nitrik asit (HNO₃), 10, 50, 100 ve 500 ml lik balon joje, 1 ml’lik pipet

0,10 M HNO₃ çözeltisi: %65 lik d=1.39 g/ml olan HNO₃ den 500 ml 0.10 M hazırlamak için 0,3 ml pipet ile çekilir. 500 ml lik balon joje içerisine bir miktar saf su eklenir, üzerine çekilen asit ilave edilir ve işaret çizgisine kadar saf su ile tamamlanır.

2 x 10⁻¹ M Fe(NO₃)₃ stok çözeltisi: Yaklaşık 8 g Fe(NO₃)₃ tartılır. 100 ml lik balon jöjeye aktarılır ve 0,1 M HNO₃ ile işaret çizgisine kadar tamamlanır.

2 x 10⁻³ M Fe(NO₃)₃ stok çözeltisi: Yaklaşık 40 mg Fe(NO₃)₃ tartılır. 50 ml lik balon jöjeye aktarılır ve 0.1 M HNO₃ ile işaret çizgisine kadar tamamlanır.

2 x 10⁻³ M KSCN stok çözeltisi: Yaklaşık 10 mg KSCN tartılır. 50 ml lik balon jöjeye aktarılır ve 0,1 M HNO₃ ile işaret çizgisine kadar tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

1. Kısım

FeSCN²⁺ kompleksinin oluşturulması, standart çözeltilerinin hazırlanması ve kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

1. 6 adet 50 mL lik balon joneyi S1 den S6 ya kadar etiketleyiniz. Her bir balon joneye 10 mL 2×10^{-1} M Fe(NO₃)₃ çözeltisinden eklenir.
2. İlk balon joje (S1) 0,10 M HNO₃ çözeltisi ile son hacim 50 mL ye tamamlanır. S2 den S6 ya kadar 1, 2 , 3, 4, 5 mL artan hacimlerde 2×10^{-3} M KSCN çözeltisinden eklenir ve işaret çizgisine kadar 0,10 M HNO₃ çözeltisi ile son hacim 50 mL'ye tamamlanır. Çözeltilerin iyice karışması için balon jocular birkaç kez alt üst edilir.
3. Hazırlanan standart çözeltilerin spektrofotometrik ölçümü için, ışık kaynağı dalga boyu 447 nm'ye ayarlanır. Kör (S1) çözeltisi ile cihazda sıfırlama yapınız.
4. Sırası ile tüm standart çözeltilerin (S2 den S6 ya kadar) absorbans değerleri okuyunuz.
5. Hazırladığınız FeSCN²⁺ komplekslerinin (S2-S6) derişimlerini hesaplayınız.

Tablo 6.1'de, okunan absorbans ölçümleri ve hesaplanan FeSCN²⁺ denge derişimi örnek olarak gösterilmiştir. Aşağıda hesaplamalar kısmında FeSCN²⁺ kompleksinin denge derişimi hesabı açık bir şekilde ifade edilmiştir.

Tablo 6.1. FeSCN²⁺ kompleksi standart çözeltilerinin hazırlanması

Standartlar	2×10^{-1} M Fe(NO ₃) ₃ (mL)	2×10^{-3} M KSCN (mL)	Toplam çözelti hacim (mL)	[FeSCN ²⁺] Denge Derişimi (M)	447 nm'deki FeSCN ²⁺ 'in absorbans
S1 (kör)	10.0	0.0	50.0	0.0	0.0000
S2	10.0	1.0	50.0	$4,0 \times 10^{-5}$	0,0906
S3	10.0	2.0	50.0	$8,0 \times 10^{-5}$	0,1890
S4	10.0	3.0	50.0	$1,2 \times 10^{-5}$	0,3140
S5	10.0	4.0	50.0	$1,6 \times 10^{-4}$	0,4551
S6	10.0	5.0	50.0	$2,0 \times 10^{-4}$	0,5309

Hesaplamalar

Ortamdaki tüm SCN^- iyonlarının Fe^{3+} iyonu ile FeSCN^{2+} kompleksini verdiği ve dengedeki FeSCN^{2+} iyonu derişimi, başlangıçtaki SCN^- derişimine eşit olduğu varsayılır (SCN^- iyonu sınırlayıcı tepken olarak düşünülür).

FeSCN^{2+} 'nin denge derişimini bulmak için başlangıçtaki SCN^- iyonu derişimi Eşitlik 6.3'e göre hesaplanır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (6.3)$$

C_1 : 2×10^{-3} M KSCN stok çözeltisinin derişimi

C_2 : Hazırlanacak standart çözeltinin derişimi

V_1 : 2×10^{-3} M KSCN stok çözeltisinden alınması gereken hacim (mL)

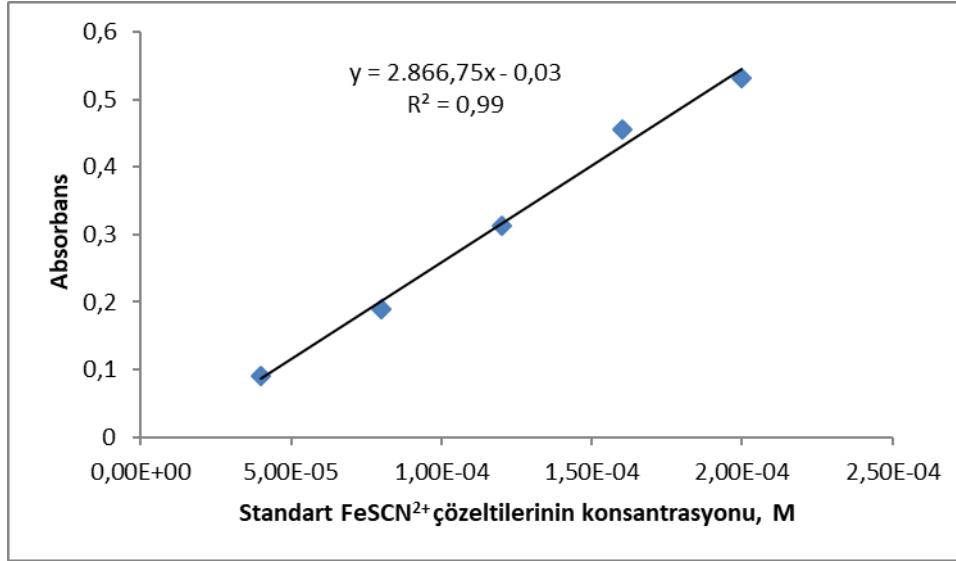
V_2 : Hazırlanacak standart çözeltinin hacmi (mL)

$$2 \times 10^{-3} \text{ M} \times 1 \text{ mL} = C_2 \times 50 \text{ mL}$$

$$C_2 = 4 \times 10^{-5} \text{ M} \text{ (S2 standart } \text{FeSCN}^{2+} \text{ denge derişimi)}$$

Bu yaklaşımla deneyde hazırlanan S2, S3, S4, S5 ve S6 FeSCN^{2+} standartlarının derişimleri hesaplanır.

Hesaplanan derişimlere karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilir. Bunun için x eksenine FeSCN^{2+} denge derişim değerleri, y eksenine absorbans değerleri yazılır. Elde edilen grafiğin doğru denklemi excel programı kullanılarak veya elle grafik kağıdı kullanılarak hesaplanır. Şekil 6.2'de Tablo 6.1'in verileri kullanılarak örnek kalibrasyon grafiği çizilmiştir.



Şekil 6.2. FeSCN²⁺ kompleksi için kalibrasyon grafiği

2. Kısım

Numunelerin hazırlanması ve FeSCN²⁺ in denge sabitinin hesaplanması

2. Kısım FeSCN²⁺ in denge sabitinin hesaplanması için numune hazırlanmasını içerir.

1. 6 adet 10 mL'lik balon jöje N1 den N6 ya kadar etiketlenir. 2×10^{-3} M Fe(NO₃)₃ çözeltisinden 5 mL çekilip, her bir balon jöjeye ilave edilir.
2. 2×10^{-3} M KSCN çözeltisinden de 1, 2, 3, 4, 5 mL alınıp, Fe(NO₃)₃ çözeltisi üzerine ilave edilir ve son hacim 10 mL olacak şekilde 0,10 M HNO₃ ile işaret çizgisine kadar tamamlanır (Tablo 6.2) . Çözeltilerin iyice karışması için balon jöjeler alt üst edilir.
3. Kör numune (N1) ile cihazda sıfırlama yapılır. Hazırlanan tekrar numunelerinin (N2-N6) 447 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans değerleri okunur.
4. Absorbans değeri kalibrasyon denkleminde yerine konarak FeSCN²⁺ denge derişimi bulunur. Fe³⁺ ve SCN⁻ in başlangıç derişimleri seyreltme dikkate alınarak hesaplanır.
5. Tüm numuneler için denge sabiti hesaplanır ve bulunan denge sabitlerinin ortalaması alınır.

Tablo 6.2'de, okunan absorbans ölçümleri ve FeSCN²⁺ hesaplanan denge derişimi örnek olarak gösterilmiştir. Aşağıda hesaplamalar kısmında kalibrasyon doğru denkleminde yararlanarak FeSCN²⁺ kompleksinin denge derişimi ve Fe³⁺, SCN⁻ nin başlangıç derişimlerinin hesaplanması açık bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 6.2. FeSCN²⁺ kompleksi Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Numuneler	2 x 10 ⁻³ M Fe(NO ₃) ₃ (mL)	2 x 10 ⁻³ M KSCN (mL)	Toplam çözelti hacim (mL)	Grafiğin doğru denkleminde hesaplan [FeSCN ²⁺] (M)	447 nm'deki FeSCN ²⁺ 'nin absorbansı
N1 (kör)	5,0	0,0	10,0	0.0000	0.0000
N2	5,0	1,0	10,0	7.63 x 10 ⁻⁵	0,1887
N3	5,0	2,0	10,0	1,2 x 10 ⁻⁴	0,3111
N4	5,0	3,0	10,0	1,8 x 10 ⁻⁴	0,5099
N5	5,0	4,0	10,0	2,4 x 10 ⁻⁴	0,6601
N6	5,0	5,0	10,0	2,8 x 10 ⁻⁴	0,7708

Hesaplamalar

FeSCN²⁺ kompleksinin denge sabitinin (β) bulunması için sistem dengede iken Eşitlik 6.2'deki bileşenlerin değerlerinin hesaplanması gereklidir. Bu bileşenler; [SCN⁻], [Fe³⁺] ve [FeSCN²⁺]’dir. FeSCN²⁺’in denge derişimi kalibrasyon doğru denkleminde yararlanılarak hesaplanır. Her bir numunenin 447 nm’de vermiş olduğu absorbans değeri kalibrasyon doğru denkleminde yerine konular ve FeSCN²⁺ derişimi hesaplanır. SCN⁻ ve Fe³⁺’ün denge derişimleri ise, başlangıçtaki derişimlerinden, oluşan FeSCN⁻ kompleksin derişiminin farkı kadardır.

N2 için [FeSCN²⁺], [SCN⁻], [Fe³⁺] hesaplayacak olursak;

447 nm deki absorbans değeri 0,1887

$$y = 2.866,75 x - 0,03 \quad (\text{kalibrasyon doğru denklemi}) \quad (6.4)$$

$$x = (0,1887+0,03) / 2.866,75 = 7,6288 \times 10^{-5} \text{ M (dengedeki FeSCN}^{2+})$$

$$\text{Dengedeki SCN}^{-} \text{ derişimi, mol L}^{-1} = \text{başlangıç SCN}^{-} \text{ derişimi} - \text{dengedeki FeSCN}^{2+} \quad (6.5)$$

$$[\text{SCN}^{-}] = [(1\text{mL} \times (2 \times 10^{-3})) / 10 \text{ mL}] - 7,6288 \times 10^{-5} = 1,24 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{Dengedeki Fe}^{3+} \text{ derişimi, mol L}^{-1} = \text{başlangıç SCN}^{-} \text{ derişimi} - \text{dengedeki FeSCN}^{2+} \quad (6.6)$$

$$[\text{Fe}^{3+}] = [(5 \text{ mL} \times (2 \times 10^{-3})) / 10 \text{ mL}] - 7,6288 \times 10^{-5} = 9,24 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Sonuç: Eşitlik 6.2 kullanılarak β hesaplanır.

$$\beta = (7,6288 \times 10^{-5}) / [(9,24 \times 10^{-4}) \times (1,24 \times 10^{-4})] = 6,68 \times 10^{+2}$$

Bu yaklaşımla hazırlanan N2, N3, N4, N5 ve N6 numunelerinin denge sabiti (β) değerleri hesaplanır ve Tablo 6.3'deki formatta sonuçlar rapor edilir.

Tablo 6.3. Denge Sabitinin Hesaplanması

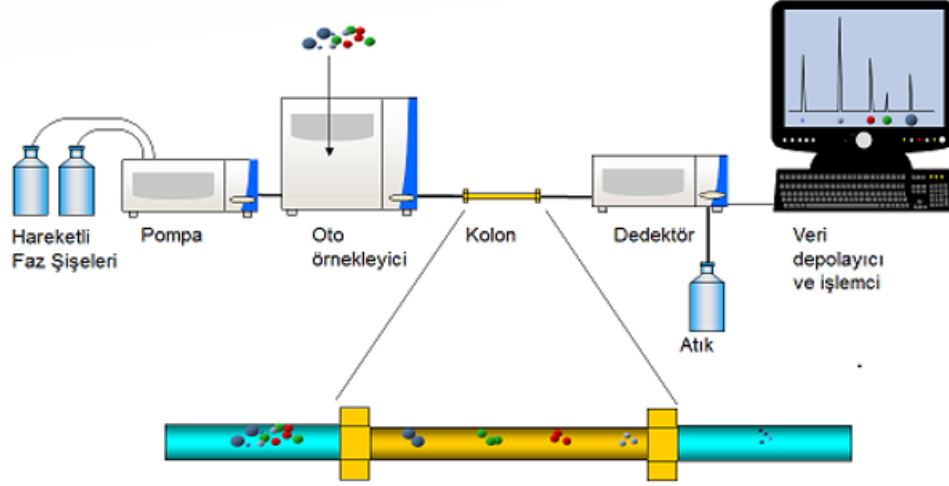
Numuneler	Başlangıç Derişimleri		Denge Derişimleri			Bulunan β değerleri	Ortalama β değeri
	Fe^{3+}	SCN^-	FeSCN^{2+}	Fe^{3+}	SCN^-		
N2							
N3							
N4							
N5							
N6							

7. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

7.1. Genel Bilgi

HPLC, “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi” teriminin kısaltılmışıdır. 1960’ların ortalarına kadar sıvı kromatografisi daha çok, düşük verimli büyük kolonlarla yürütölen zahmetli ayırmalar şeklinde uygulanmıştır. Ayırma veriminin artırılması için küçük çaplı dolgu materyali üzerinden genellikle çözücü karışımları olan hareketli fazın akışı yüksek basıncı gerektirir. Bu nedenle yöntem daha önceleri “yüksek basınçlı sıvı kromatografisi” (HPLC) olarak adlandırılmıştır. Hareketli fazın sıvı olması, kolonun başında ve sonunda basınç farklılıklarının oluşmasına sebep olmuş bu nedenle ayırma verimi ve tekrarlanabilirlik düşmüştür. Ayırma verimini iyileştirmek için kolon boyu kısaltılıp, tanecik boyutu küçültölerek bu problemler büyük ölçüde giderilmiştir. Yaklaşık 40 yıl önce 5-10 µm boyutlu tanecikler kullanılarak ayırma işlemi çok kısa sürede gerçekleştirilebilmiştir. Bundan sonra yöntemin adı “yüksek performanslı sıvı kromatografisi” diye değiştirilmiş ancak kelimelerin baş harfleri aynı kaldığından HPLC olarak kısaltılmaya devam edilmiştir.

Sıvı ya da katı bir numunenin uygun bir çözücüdeki çözeltisi cihaza enjekte edilir. Enjeksiyon, kullanılan cihazın özelliğine bağlı olarak ya elle yapılır veya cihaz otomatik olarak bu işlemi yapar. Bazı cihazlarda çok sayıda numune sırasıyla otomatik olarak sistem tarafından enjekte edilerek kromatografik işleme tabi tutulur. Hareketli faz ayrılacak olan bileşenlerin özelliğine bağlı olarak uygun bir çözücü karışımıdır. Durgun faz kolon içerisinde bulunur. Kolonların durgun faz bileşimleri farklıdır. Bu şekilde satışa sunulan HPLC kolonlarının ticari isimleri farklıdır. Ayrılacak olan karışımdaki bileşenlerin kimyasal yapılarına bağlı olarak uygun durgun faza sahip kolon seçilir. Kolonların çıkartılıp amaca uygun başka kolonların takılması mümkündür. Karışımdaki bileşenler belli basınç altında hareketli fazla kolon boyunca değişik hızlarla hareket ederler (Şekil 7.1). Böylece farklı zamanlarda kolonu terk ederek dedektöre ulaşırlar. Dedektörde bu bileşenlerin bir fiziksel veya kimyasal özelliği ölçölerek her bir bileşen için bir sinyal alınır. Örneğin HPLV-UV cihazında dedektör UV-vis spektrofotometredir ve maddenin absorbansını ölçer.



Şekil 7.1. HPLC sisteminin bileşenleri

HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından bir tanesidir. Sistemde; çözücünün enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlar. HPLC analizlerinde kullanılan pompalar; emme basma piston pompalar, şırınga pompalar, şırınga tipi pompalar ve sabit basınç pompalarıdır.

HPLC için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik çözünürlüğe (rezolüsyona) kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Böyle bir dedektör sıcaklık ve basınçtaki değişmelere de duyarsız olmalıdır. Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır. En çok kullanılan dedektörler, UV veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar. Ayrıca kırılma indisi (RID), floresans (FD) ve kütle spektrometri dedektörleri de kullanılır.

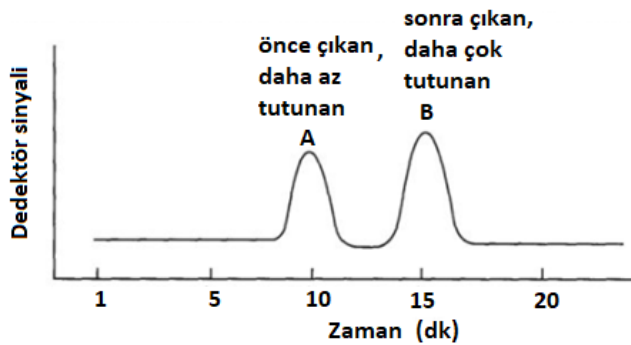
HPLC de kullanılan kolonlar genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Genel olarak kullanılan kolonlar 4.5-5.0 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğundaki kolonlardır. Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır.

HPLC’de kullanılan çözücüler yüksek saflıkta olmalıdır. Sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler ya da çözücü karışımları kullanılabilir. Kullanımdan önce tüm çözücülerin gazı sistemdeki pompalar yardımıyla alınmalıdır. Aksi takdirde pompa ve kolonda problemler oluşabilir. Piklerin şekillerinde düzensizlikler görülür.

HPLC hem kalitatif hem de kantitatif analiz yapılabilen ve günümüzde çok yaygın kullanılan bir kromatografik sistemdir. Eczacılık, adli tıp, çevre kimyacıları, ziraatçıların, jeologların, biyokimyacıların, botanikçilerin ve daha birçok disiplinin yararlandığı bir yöntemdir. Bu kadar yaygın kullanılmasının bir nedeni de hem inorganik hem de organik türlerin analizinin yapılabilmesine imkan sağlamasıdır.

HPLC’de kromatografik şartlar yani; enjekte edilen numune hacmi, hareketli fazın bileşimi, hareketli fazın akış hızı gibi faktörler optimize edilerek en iyi ayırım yapılmaya çalışılır. Eluasyon, yani karışımdaki bileşenlerin hareketli fazla sürüklenmesi işlemi “izokratik” ya da “gradient” olarak gerçekleştirilir. İzokratik elüsyonda kolon tek bir bileşimdeki hareketli fazla yıkanırken, gradient elüsyonda belli zaman aralıklarında farklı bileşimdeki hareketli fazla yıkama işlemi gerçekleştirilir. Gradient elüsyon genellikle daha verimli bir ayırma sağlar. Hazırlanan izokratik veya gradient program cihaza komut verilerek uygulanır.

Kolondaki bileşenlerin enjeksiyonu ile detektöre ulaşması arasında geçen süreye “alınma süresi” denir. Her maddenin alınma süresi kromatografik şartlara bağlı olarak farklıdır. Bu süreler göre kalitatif tayin yapma imkanı vardır. “Kromatogram”, alınma süresine karşı dedektör sinyalinin çizilmesi ile oluşan bir grafikdir. Bu grafikte her bir bileşen Gauss eğrisi şeklinde gözlenir. Bu eğrinin altındaki alan yani integral değeri konsantrasyonla ilişkilidir. Bu ilişki kullanılarak maddenin miktarı hesaplanır. Yani kantitatif tayin yapılabilir. Bunun için diğer spektroskopik yöntemlerde olduğu gibi konsantrasyona karşı integral değeri grafiği çizilerek bir kalibrasyon grafiği hazırlanır. Sonra konsantrasyonu bilinmeyen madde için aynı kromatografik şartlar altında ölçüm yapılarak bulunan integral değerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak konsantrasyon hesaplanır.



Şekil 7.2. Kolonda ayrılan A ve B gibi iki maddenin kromatogramı

HPLC ile iki çeşit çalışma şekli vardır. Bunlar normal faz ve ters faz ile çalışmadır. Normal fazda durgun faz polar, hareketli faz apolarken ters fazda durum bunun tam tersidir. Günümüzde yapılan HPLC çalışmaları daha çok ters fazla yapılmaktadır. Yani hareketli faz olarak, su, etanol, metanol, THF, asetonitril gibi polar çözücüler kullanılmaktadır. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için normal fazla yapılan çalışmalarda düşük polariteye sahip analit hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Yani böyle bileşenler polar sabit fazla az etkileştiği için sabit fazda kısa süre tutulur ve hareketli fazla sürüklenmeyi tercih eder. Polar analitler için ise durum tam tersidir.

Ters faz kromatografisinde ise durgun faz apolar ve hareketli faz polar niteliktedir. Ters fazlı HPLC’de en yaygın kullanılan apolar durgun faz organoklorosilan grubunda oktil (C₈) veya oktadesil (C₁₈) hidrokarbon zincirinin yer aldığı fazlardır. Destek malzemesi olan slika jel (durgun faz) bazik ortamda hidrolize uğradığından, hareketli fazın pH’ı 7.5 değerini aşmamalıdır. Bu sistemde yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk önce çıkar. Yani polar analit, apolar durgun fazla az etkileştiği için kolonda kısa süre tutunur.

7.1. Deneysel Kısım

Kullanılacak cihaz: HPLC-DAD-UV cihazı

Dedektör: UV-vis. spektrofotometre

Çalışma prensibi: Ters fazla çalışma yapılacaktır. C18 kolonu kullanılacaktır. Mobil Faz A: %50 Asetonitril %50 su, Mobil faz B: Su. Mobil fazlar %2 asetik asit içermektedir. 45 dk. gradient elüsyon uygulanacaktır. 280 nm’de absorbans ölçülecektir. Akış hızı: 0,7 ml/dk.’dır: Enjeksiyon hacmi: 20 µL, sıcaklık 25 °C’dir. Kalitatif amaçla standart gallik asidin alıkonma zamanı ve DAD dedektörü ile elde edilecek UV-vis. Spektrumu kullanılacaktır. Kantitatif amaçla farklı konsantrasyonda gallik asit standartlarından elde edilen kromatogramlardaki pik alanları kullanılarak kalibrasyon grafiği hazırlanacaktır.

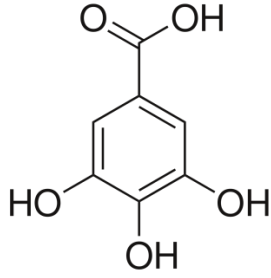
Deney 7.1. HPLC-DAD-UV ile çayda gallik asitin kalitatif ve kantitatif tayini

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) Şekil 7.3’te açık yapısı verilen bir organik asittir. Yapısından da görüldüğü gibi üç tane fenolik OH grubu taşıyan bir polifenol bileşiğidir. Polifenoller bitkilerin yapısında bulunan önemli bir bileşik sınıfıdır. Gallik asit diğer pekçok

polifenol bileşiminin bir kısmını oluşturur. Üzüm, çay, şerbetçi otu, meşe kabuğu ve diğer birçok bitkide bulunur.

Tüm fenolik bileşikler gibi gallik asit de hücrelere zarar verebilen serbest radikalleri temizleyen kuvvetli bir antioksidan özellik gösterir. Gallik asitin, sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelere sitotokisite gösterdiği de bilinmektedir.

Bu deneyde ticari yolla temin edilen siyah çay örneklerinde ters faz HPLC ile gallik asidin kalitatif ve kantitatif tayini yapılacaktır.



Şekil 7.3. Gallik asidin molekül yapısı

Kimyasal madde ve malzemeler:

Mobil faz A: %50 Asetonitril, %50 su (%2 asetik asit)

Mobil faz B: Su (%2 asetik asit)

Çay çözeltisi: Kuru çaydan saf su ile ekstraksiyon yoluyla hazırlanacaktır.

Standart gallik asit çözeltisi: Gallik asidin metano:su (%40:%60) karışımında çözmek suretiyle hazırlanacaktır.

Deneyin yapılışı

Ön hazırlık

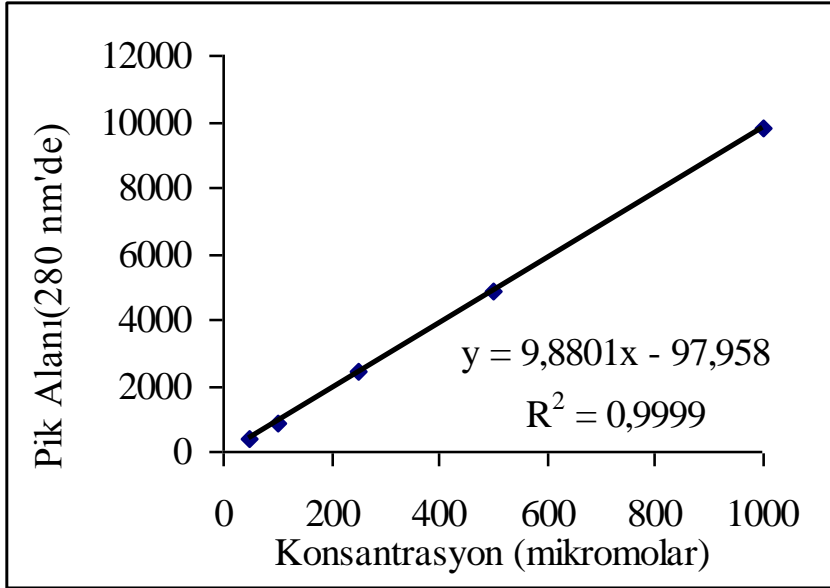
Önce mobil faz A ve mobil faz B hazırlanacaktır. Sonra bu mobil fazlar çözücü tanklarına yerleştirilmeden önce 0,45 µm gözenekli membrandan süzülerek içerisinde kalabilecek partikül veya tozlar uzaklaştırılacaktır. Kolonun dengeye gelmesi için mobil fazla uygun süre yıkanması sağlanacaktır.

Kalitatif tayin

Standart gallik asit çözeltisi (1,0 mM) sisteme enjekte edilecek ve alıkonma zamanı ve DAD spektrumu numunedeki ile karşılaştırmak üzere elde edilecektir. Numune de aynı şartlarda analize tabi tutulacaktır.

Kantitatif tayin

Standart gallik asit çözeltilerinden bir seri çözelti (0,1-1,0 mM) hazırlanarak sırayla sisteme enjekte edilecek ve pik alanları kromatogramdan belirlenecektir. Konsantrasyona karşı çizilen pik alanlarından elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak numunedeki gallik asit miktarı belirlenecektir.



Şekil 7.4. Gallik asit tayini için hazırlanmış bir kalibrasyon grafiği

8. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ (AAS)

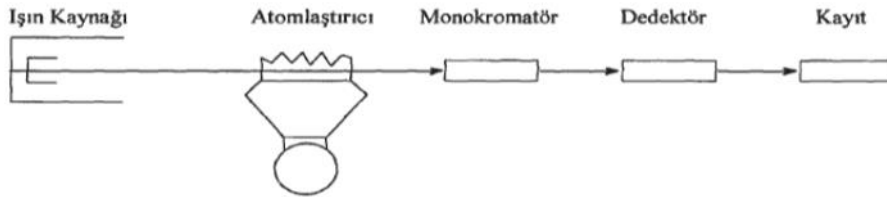
8.1. Genel Bilgi

Atomik spektrometri, atomların veya elementer iyonların ışınla etkileşimine dayanır. Etkileşim sırasında atomik tanecikler absorpsiyon, emisyon ve floresans yapabilirler. Atomik spektrometri her türlü malzeme ve çözeltilerde çok düşük seviyelerde bulunabilen metallerin kalitatif ve kantitatif tayini için kullanılır. Kendi içinde 3 kısımda incelenir.

- Atomik absorpsiyon spektrometri
- Atomik emisyon spektrometrisi
- Atomik floresans spektrometrisi

Mor ötesi – görünür bölge atomik spekturumları elde etmek için, önce bir örneğin bileşenleri ısıtılarak bir işlemle gaz halindeki atomlara veya elementer iyonlara dönüştürülür. Sonra gaz karışımının absorpsiyon, emisyon veya floresansı bir dedektör yardımı ile ölçülür. Burada, örnek maddenin atomik buhar haline dönüştürüldüğü işleme “atomlaştırma” denir.

Atomik absorpsiyon spektrometri (AAS) metodu, temel haldeki atomun bir ışın kaynağından, atomlaştırma ortamına gönderilen kendine has ışın demetini kısmen absorplaması ve geride kalan karakteristik ışın demetinin şiddetinin azalma derecesini ölçme esasına dayanır. Ölçümün gerçekleştirildiği cihaz, ışın kaynağı, atomlaştırma kısmı, monokromatör, dedektör ve yazıcı olmak üzere beş kısma ayrılır (Şekil 8.1).



Şekil 8.1. Atomik absorpsiyon spektrometresinin kısımları

Atomlar temel enerji düzeyinden uyarılmış enerji düzeyine geçerlerken, bu iki enerji düzeyi arasındaki fark kadar enerjiye eşit enerjili ışınları absorplarlar. Bir atomlaştırıcıda oluşan atomların ışınları absorplaması, Lambert-Beer yasasına göre gerçekleşir. Atomlaştırıcı sistemdeki

atomların üzerine düşen ışınların şiddeti I_0 ve çıkan ışınlarınki de I ise, Lambert Beer yasasına göre, bunlar arasında Eşitlik 8.1'de gösterilen bir ilişki vardır.

$$I = I_0 e^{-kIN} \quad (8.1)$$

Buradaki N : ışın yolu üzerinde birim hacimdeki atom sayısı, l soğurucu ortamın uzunluğu, k : atomik absorpsiyon katsayısıdır.

8.2. Deneysel Kısım

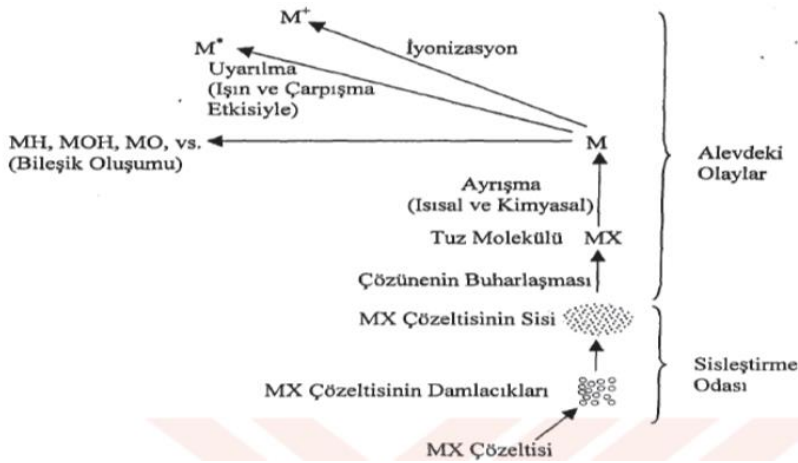
Kullanılacak Cihaz: Atomik absorpsiyon spektrofotometresi

Işık Kaynağı: Oyuk katot lamba

Dalga Boyu Seçicisi: Gratting

Dedektör: Yarı iletken dedektör

Cihazın Çalışma Prensipleri: Atomlaştırmanın alev içerisinde gerçekleştiği, alevli atomik absorpsiyon spektrometri metodunda bir metalin analizini yapmak için o elementin temel haldeki atomlarına ayrışması ve elektromanyetik ışın demetinin yoluna dağılması gerekir. Bu amaçla çözelti haline getirilmiş örnek bir kapilerle yakıcı ve yanıcı gaz karışımıyla birlikte aleve püskürtülür. Damlacık halindeki örnek sis haline gelir ve alevde çözüsü buharlaşır. Tayin elementinin tuzu gaz halinde iken alevin sıcak bölgelerine ulaştığında atomlarına ayrışır (Şekil 8.2). Temel haldeki atom sayısı analitin yaptığı absorpsiyonla orantılı olduğundan metallerin kantitatif analizleri gerçekleştirilebilir.



Şekil 8.2. Alevde meydana gelen olaylar

Deney 8.1. Alevli atomik absorpsiyon spektrometri yöntemiyle madeni paradaki bakır tayini

Bakır insanların ilk kullandıkları metal malzemelerden birisidir. Tarihin ilk zamanlarından günümüze kadar oldukça yaygın bir kullanım alanına sahip olmuştur. Elektriği çok iyi iletmesinden ötürü bakıra ihtiyaç daha da artmıştır. Kolay işlenebilme, ısıl iletkenliğinin yüksek olması geniş kullanım alanı yaratmaktadır. Diğer bilinen çok geniş kullanım yeri çeşitli metallere alaşım oluşturulmasıdır. Herhangi bir malzeme içerisindeki ya da alaşımlardaki bakır oranını tayin etmek için AAS yöntemi hızlı, pratik ve duyarlı bir yöntemdir.

Kimyasal madde ve malzemeler: 0,5 M HNO₃, derişik HCl, derişik HNO₃, %30 luk H₂O₂ derişik HClO₄, volümetrik beher, polipropilen reaktif şişeleri, 10, 5 ve 1 mL lik cam pipet, 250,100 ve 50 mL lik Balon jöje.

1000 mg/L Stok bakır (II) çözeltisi: 0,392 gram CuSO₄.5H₂O tuzundan 0,392 g hassas bir şekilde tartılır ve 0,5 M HNO₃ ile balon jöjede 100 ml ye seyreltilir.

50 mg/L ara stok bakır(II) çözeltisi: Hazırlanan stok çözeltiden 5 ml alınır ve 0,5M HNO₃ ile balon jöjede 100 ml ye tamamlanır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁: Derişik standardın derişimi

V₁: Derişik çözeltiden alınması gereken miktar (ml)

C₂: Hazırlanacak standart çözeltinin derişimi

V₂: Hazırlanacak standart çözeltinin hacmi (ml)

$$1000 \times V_1 = 50 \times 100$$

V₁ = 5 ml (1000 mg/l çözeltiden alınması gereken miktar)

1 mg/L standart bakır(II) çözeltisi: Hazırlanan ara stok çözeltiden 1 ml alınır ve 0,5M HNO₃ ile balon jöjede 50 ml ye tamamlanır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50 \times V_1 = 1 \times 50$$

$V_1 = 1 \text{ ml}$ (50 mg/l çözültiden alınması gereken miktar)

3 mg/L standart bakır(II) çözültisi: Hazırlanan ara stok çözültiden 1 ml alınır ve 0,5M HNO₃ ile balon jodede 50 ml ye tamamlanır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$50 \times V_1 = 3 \times 50$$

$V_1 = 3 \text{ ml}$ (50 mg/l çözültiden alınması gereken miktar)

Deneyin Yapılışı

Analiz Numunesinin Çözünürleştirilmesi

Toz haline getirilmiş 0,5 g madeni para örneği 100 ml'lik beher içerisinde bir çeker ocakta 24 ml kral suyu ve 2 ml hidrojen peroksit içeren karışımla ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılır. Gaz çıkışı sona erdikten sonra soğutulan karışıma 5 damla perklorik asit ilave edilir ve karıştırılır. 0,45 µm gözenekli membran filtreden süzülür ve balon jodede saf su ile 250 ml ye seyreltilir.

Deney Numunesinin Hazırlanması ve Ölçüm

250 ml ye seyreltilmiş analiz numunesinden 1 ml alınarak balon jodede son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözültiden alınan 10 ml'lik kısım 100 ml lik balon jodede tekrar 100 ml'ye seyreltilir. Cihaz açılır ve bakıra özgü oyuk katot lamba yakılır. 7-10 dakika lambanın ısınması beklendikten sonra alev yakılır. Aleve saf su (blank çözülti) püskürtülerek ışık absorpsiyonu sıfır olacak şekilde cihaz ayarlanır. Aleve sırasıyla 1 ve 3 mg/L konsantrasyonlarındaki bakır(II) standart çözülteleri püskürtülür. Kapiler tekrar saf suya daldırılarak cihazın bir miktarı su çekmesi beklenir. Ardından hazırlanan deney numunesi (madeni para çözültisi) cihaza gönderilir ve ölçülen "absorbans" ya da konsantrasyon değerleri kaydedilir.

Hesaplamalar

Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Bakır Miktarının Hesaplanması

Numune ve standartların ölçülen absorbansları aşağıdaki tabloya kaydedilir. Absorbans değerleri dikey eksene bu değerleri karşılayan standart bakır çözültilerinin konsantrasyonları yatay eksene işaretlenerek milimetrik kağıt üzerinde veya microsoft excell programında kalibrasyon eğrisi çizilir. Numune absorbansından faydalanarak seyreltik örneğin derişimi belirlenir.

Bakır derişimi (mg/L)	Absorbans
1	
3	
Numune	

Eşitlik 8.2 kullanılarak numunedeki bakır yüzdesi hesaplanır.

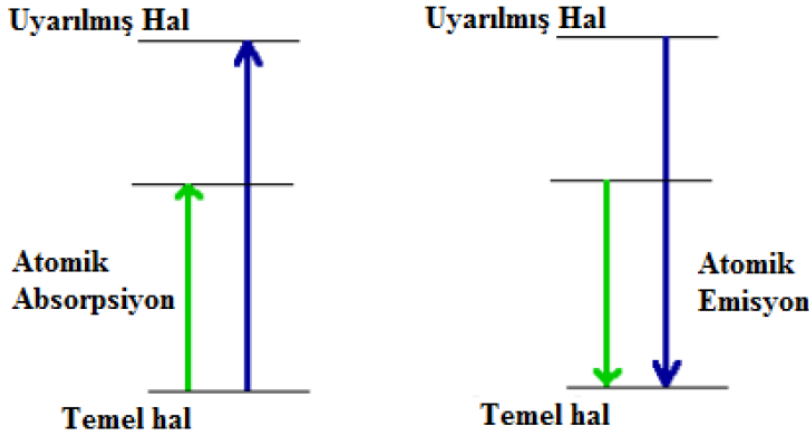
$$\% \text{ Cu} = \frac{C_{\text{kalib}} \times \text{SF} \times 250/1000 \times 100}{\text{Numune miktarı} \times 1000} \quad (8.2)$$

Eşitlik 8.2'deki C_{kalib} : kalibrasyon eğrisinden hesaplanan seyreltik numunenin derişimi (mg/L), SF: seyreltme faktörü olup bu deneyde 1000'dir. Çünkü 250 ml'lik numune çözeltisinden 1 mL alınarak balon jodede son hacim 100 mL'ye tamamlandığından ilk kademede 100 kat, bu çözeltiden alınan 10 ml'lik kısım ikinci kademede 100 ml'lik balon jodede tekrar 100 ml'ye tamamlandığından 10 kat, toplamda 1000 kat seyreltilmiştir. Numune miktarı 0,5 g'dır.

9. ALEV EMİSYON SPEKTROSKOPİSİ

9.1. Genel Bilgi

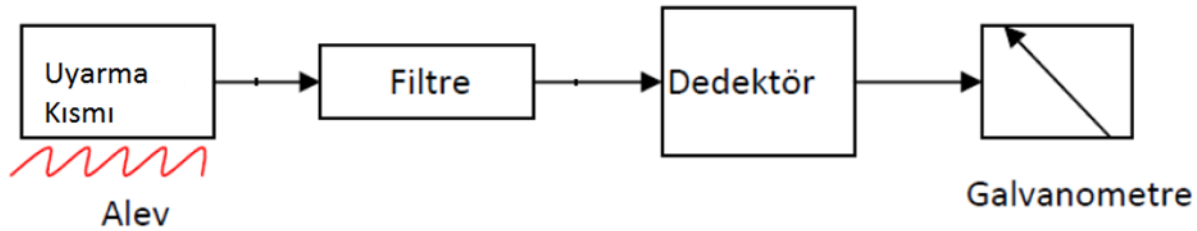
Atomik emisyon spektrometri yöntemi uyarılmış enerji düzeyine çıkarılan atomların daha düşük enerjili düzeylere geçişlerinde yaydıkları UV-görünür bölge ışımalarının ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 9.1).



Şekil 9.1. Atomik absorpsiyon ve emisyon

Atomik emisyon spektrofotometresi, uyarmayı sağlayan enerji kaynağının türüne göre isimlendirilir. Örneği atomlaştırmak ve uyararak için alevin kullanıldığı yonteme “alev emisyon spektroskopisi”, elektriksel boşalım ve plazma gibi yüksek enerji kaynağı kullanılan yonteme ise “atomik emisyon spektroskopisi” veya “optik emisyon spektroskopisi” denir.

Uyarma kaynağı olarak propan, butan karışımı kullanıldığında 800-1200 °C’lik sıcaklık sağlanır. Bu sıcaklık aralığında iyonlaşma enerjisi düşük olan Li, Na, K, Ca, Sr, Ba metalleri ölçülebilir. Monokromatör yerine optik filtre içeren alkali ve toprak alkali metallerin ölçüldüğü yonteme “alev fotometrisi” denir ve ölçümün yapıldığı cihaz 4 kısımdan oluşur (Şekil 9.2).



Şekil 9.2. Alev fotometresinin kısımları

9.2. Deneysel Kısım

Kullanılacak Cihaz: Alev fotometre

Uyarma Kaynağı: Alev

Dalga Boyu Seçicisi: Filtre

Dedektör: Foto tüp

Çalışma Prensibi: Alev fotometresi (flame fotometre) ile analiz için, alev üzerine çözelti çok küçük damlacıklar hâlinde (sis şeklinde) kapiler aracılığı ile püskürtülür. Alevin ısı etkisiyle çözültideki madde atomlarının elektronları uyarılır ve bu şekilde daha üst bir enerji seviyesine çıkmış olan kararlı olmayan elektronlar daha sonra eski enerji düzeylerine dönerken aradaki enerji farkını ışık olarak yayarlar. Bu ışık, çözültideki madde konsantrasyonuyla orantılıdır ve alev fotometresinde “emisyon şiddeti” olarak ölçülür.

Deney 9.1. Alev fotometrisi yöntemiyle deniz suyundaki sodyum tayini

Sodyum metali alkali metaller grubuna dahil olup, pek çok doğal ürünlerin içerisinde yer almaktadır. Özellikle tuz formu, NaCl, halinde bulunmaktadır. Vücutta su dengesinin korunmasında, besinlerin hücre duvarından geçişinde görev alır. Sodyum bileşikleri suda kolayca çözünürler. Suyu tuzlu bir tat verdiği için içme sularında 200 mg/L’den fazla olması istenmez. Deniz suyunda ortalama 10.000 mg/L NaCl olarak bulunur.

Bu deneyde standart ilave etme yöntemi uygulanarak deniz suyunda sodyum miktarı hesaplanacaktır.

Kimyasal Madde ve Malzemeler: Volümetrik beher, polipropilen reaktif şişeleri, 10, 5 ve 1 mL lik cam pipet, 250,100 ve 50 mL lik balon jöje.

1000 mg/L stok sodyum çözeltisi: 140 °C de kurutulmuş 0,254 g sodyum klorür (NaCl) bir miktar saf suda çözülerek son hacim balon jöjede 100 ml’ye tamamlanır.

100 mg/l ara stok sodyum çözeltisi: Hazırlanan sodyum stok çözeltiden 10 ml alınır ve saf su ile balon jöjede 100 ml’ye tamamlanır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C₁: Derişik stok çözeltilinin derişimi

V₁: Derişik çözeltiliden alınması gereken miktar (mL)

C₂: Hazırlanacak standart çözeltilinin derişimi

V₁: Hazırlanacak standart çözeltilinin hacmi (mL)

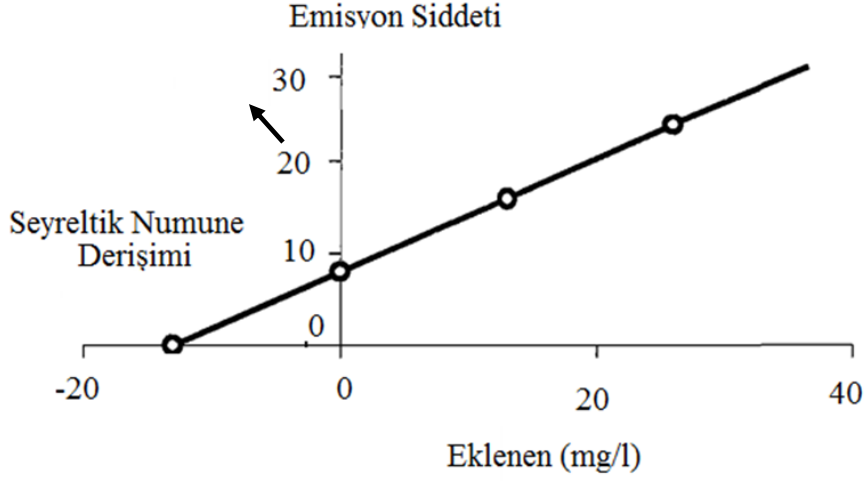
$1000 \times V_1 = 100 \times 100 \rightarrow V_1 = 10 \text{ ml}$ (1000 mg/L çözeltiliden alınması gereken miktar)

Deneyin Yapılışı

100 ml deniz suyu örneği 0,45 µm gözenekli membran filitreden süzülür. Süzüntüden alınan 5 mL' lik örnek saf su ile balon jodede 250 mL'ye seyreltilir. 4 adet 100 mL'lik balon jodaye hazırlanan seyreltilmiş deniz suyu örneğinden 5'er mL ilave edilir. Balon jodelerden biri hariç diğerlerine 100 mg/L ara stok sodyum çözeltilisinden sırasıyla 2, 4, 8 mL ilave edilir. Tüm ölçü kaplardaki son hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanır. Alev fotometre cihazı çalıştırılır ve saf su ile sıfır ayarı yapılır. 8 mL ara stok sodyum çözeltilisinin eklendiği balon jodedeki çözelti ile emisyon şiddeti 100'e ayarlanır. Sırasıyla 4 adet ölçülü balon içeriğinin emisyon şiddetleri okunur. Deney sonunda ölçü balonlardan 1. veya 2. tekrar okunur, ilk okuma aradaki fark %5 den daha fazla ise işlem tekrarlanır.**Hesaplamalar**

Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi ve Sodyum Derişiminin Hesaplanması

Eklenen standart derişimine karşı okunan emisyon şiddeti değerleri şekildeki gibi grafiğe geçirilir. Bu noktalar bir doğru oluşturacak şekilde birleştirilip elde edilen doğru derişim eksenini kesecek şekilde uzatıldığında bulunan nokta örneğin seyreltilmiş derişimini verir. Bu amaçla milimetrik kağıt ya da microsoft excell programı kullanılabilir. Orjinal örnek derişimine geçmek için bulunan değer seyreltme faktörü ile çarpılır.



Eşitlik 9.1 kullanılarak numunedeki sodyum miktarı hesaplanır.

$$C = C_{\text{kalib}} \times SF \quad (9.1)$$

Eşitlik 91.'deki C_{kalib} : Standart ekleme metodu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanan seyreltik numunenin derişimi (mg/l)'dir. SF: Seyreltme faktörü=1000'dir. Çünkü filtreden süzölmüş 5 ml deniz suyu örneği saf su ile 250 ml ye seyreltildiğinde 50 kat seyreltme yapılmış olur. Balon jojelere konulan 5 ml örnek 100 ml'ye seyreltildiğinden 20 kat seyreltme yapılmış olur. Toplamda iki kademe numune 1000 kat seyreltilir.

10. X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ

10.1. Genel Bilgi

X-Işını (Röntgen Işını); Bir atomun iç elektronlarının uyarılması ve uyarılan elektronların temel hale dönerken yaymış oldukları enerjidir. Dalga boyları 0,01-1 nm aralığındadır. Gözle görülemezler. Saydam, yarısaydam ve saydam olmayan maddelerden belirli oranlarda geçebilir ancak metalik kurşundan geçemez. Onun için sağlık kuruluşlarında röntgen filmi çekilirken giydirilen elbiseler kurşun içerir.

⁵⁵Fe gibi radyoaktif element veya X-Işını tüpü gibi bir kaynaktan üretilmiş X-Işını; bir atom, molekül veya iyon tarafından absorplanabilir, absorplanıp tekrar yayılabilir (emisyon, floresans) veya saçılabilir (difraksiyon). Bu dört durum için X-Işını kaynağı kullanılarak dört farklı ölçüm tekniği geliştirilmiştir.

Bunlar;

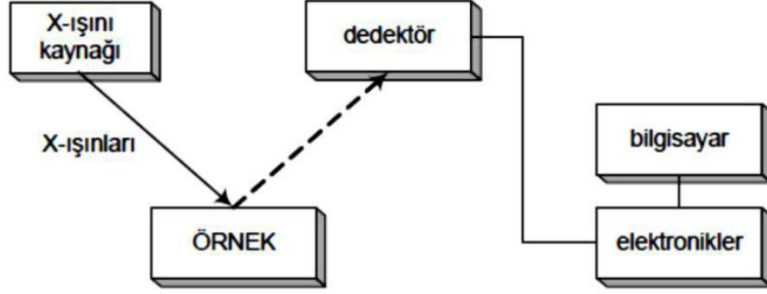
- 1) X-Işını Absorpsiyon Spektroskopisi
- 2) X-Işını Emisyon Spektroskopisi
- 3) X-Işını Floresans Spektroskopisi
- 4) X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi'dir.

X-Işını Floresans Spektroskopisi (XRF), uygulamasında kullanılan üç teknik vardır.

1. Dalga Boyu Ayırmalı X- Işınları Floresans Spektroskopisi (WDXRF): Dalga boyu ayırmalı cihazlarda kaynak olarak daima tüpler kullanılır. Bir Coolidge tüpü, temelde, havası iyice boşaltılmış bir tüptür. İçinde katot olarak çalışan bir tungsten flaman ile anot görevi yapan metalden yapılmış kalın bir hedef vardır. Anot metali W, Cu, Mo, Cr, Ag, Ni, Co veya Fe olabilir.

2. Enerji Ayırmalı X-Işınları Floresans Spektroskopisi (EDXRF): Enerji ayırmalı sistemin en belirgin avantajı basitliği ile, uyarma ve algılama (dedektör) sistemlerinin hareketli kısımlar olmayışıdır. Dedektör örneğe çok yakın bir yerde bulunduğundan, dedektöre gelen enerji, dalga boyu ayırmalı cihazlara kıyasla 100 kat daha fazladır. Bu özellikler radyoaktif maddeler veya düşük güçlü X-ışını tüpleri gibi zayıf kaynakların kullanılmasına olanak verir. Bunlar hem ucuzdur hem de örneği fazla tahrip etmezler.

3. Ayırmasız teknik (XRF): Floresans ışını peş peşe duran bir çift filtreden geçirilir ve orantılı ikiz sayıcılara gönderilir. Filtrelerden birinin absorpsiyon sınırı 0,54 nm'den hemen önce, diğerinin de hemen sonradır. İki sinyal arasındaki fark, elementin konsantrasyonu ile orantılıdır.



Şekil 10.1. X-Işınları spektroskopisi ölçüm şeması

Dedektörler

Üç tip transduser vardır. Bunlar;

1.Gazlı dedektörler: "iyonizasyon odaları", "orantılı sayıcılar" ve "Geiger tüpleri" olmak üzere üç tipi vardır. Orantılı Sayıcılar; ortasında ince bir iletken tel takılmış silindirik preslenmiş bir metal tüptür. Bu tüp kararlı bir gazla doludur. Tele pozitif yüksek voltaj uygulandığında elektronlar tele geldikçe elektrik akımını artırır ve ölçülebilir bir sinyal elde edilir.

2. Sintilasyon Sayıcıları: NaI kristali içine homojen olarak dağıtılmış talyum (Tl) elementinden yapılan preslenmiş paletlerdir. Oluşan ışık çok kolay harekete geçebilecek elektronların bulunduğu katoda çarptırılır. Bu elektronlar fotoçoğaltıcıda hızlandırılır ve ölçülebilir bir sinyal oluştururlar.

3.Yarı iletken dedektörler: Üzeri silisyum dioksit kaplanmış lityum, metal alaşım (SDD) veya germanyum detektörlerdir.

10.1 Deneysel Kısım

Kullanılacak Cihaz: Enerji Ayırmalı X-Işını Floresans Spektrofotometre

Işık Kaynağı: X-Ray Tüp Varian VF-50jPd/S (Pd Anot)

Dalga Boyu Seçicisi: Yok

Dedektör: Yarı iletken dedektör

Çalışma Prensibi: Işık kaynağından üretilen X- ışını, atom tarafından soğurularak atomun iç tabaka elektronlarını uyarır. Bu uyarma sonucu çeşitli elektronik geçişlerle uyarılmış halden

temele hale dönen atom kendisine ait floresans yayımı yapar. Yayınlanan floresans şiddetinin ölçülmesine dayanarak numunedeki analit miktarı hesaplanabilir.

Deney 10: Enerji Ayırmalı X-Işını Floresans Spektrometri (EDXRF) yöntemi ile fuel-oilde kükürt tayini

Hava kirletici emisyonların en yaygın olanları kükürtdioksitlerdir. Her yıl tonlarca SO₂ çeşitli kaynaklardan yayılarak atmosfere karışmaktadır. Bu emisyonların en önemli bölümü enerji elde etmek için kullanılan katı ve sıvı yakıtların yakılmasından meydana gelmektedir. Bu yakıtların yapısında bulunan kükürt, yanma ile birlikte oksit formuna dönüşerek havaya salınımı gerçekleşir. Atmosferde biriken SO₂ yağmurla beraber toprağa karışarak, toprağın zayıflamasına ve zirai verimin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca, atmosferdeki nem ile birleşmesi sonucu sülfürik asit oluşumuna neden olurlar. Bununla beraber, endüstriyel atıklardan ötürü toprağa ya da göle inmiş olan civa, kadmiyum ya da alüminyum asidik nem varlığında çözünerek, besin zinciri ve içme suyu yoluyla bitki, hayvan ve insana ulaşarak toksik etkiler yaratmaktadır. Ekosistem üzerinde direk ya da dolaylı yönden zararlı etkileri olması nedeniyle atmosfere yayılan kükürt miktarının kontrol altında tutulması önemlidir. Bu sebeplerle, yakıtlardaki kükürt oranının belirlenmesine ihtiyaç duyulur.

Kimyasal Madde ve Malzemeler: Saflığı en az % 99,999 (V/V) olan inert gaz (helyum), kükürt standartları (%0,50 -%1,0-%1,50-%2,00), en az 3 mm numune derinliği sağlayan ve değiştirilebilir X-ışını geçirgen bir film tabakası ile donatılmış olan numune kabı, 0,1 mg yaklaşımla tartım yapabilen analitik terazi.

Kükürt Standartları: Kalibrasyonda kullanılacak standartlar, kükürtsüz fuel oil matriksinde; benzotiyofen (tiyonaften), dibenzotiyofen veya dibutilsülfür ilave edilerek hazırlanabilir. Ya da hazır standartlar kullanılır.

Deneyin Yapılışı

Kükürt miktarını belirlemek için standartlar ve numune, X-ışını kaynağından yayılan bir ışın demeti önüne yerleştirilir. Numunedeki kükürdü uyarma işlemi için gerekli olan enerji, bir X-ışını kaynağından (radyoaktif ⁵⁵Fe veya X-ışını tüpü) elde edilebilir. Meydana gelen karakteristik X-Işınları ölçülür ve toplanan sayımlar (floresans emisyonu), numune matriksine

benzeyen bir matrikse sahip belli derişimlerdeki kükürt standartları ile oluşturulmuş kalibrasyon grafiğinde karşılaştırmalı olarak okunur.

Ön Hazırlık

Deney için yapılacak ön hazırlıklar Şekil 10. 2’de adım adım gösterilmiştir. Plastik numune kapları iki tane silindir ve bir tane kapak olmak üzere toplam üç parçadan oluşmaktadır (1). Bağlantılı parçalar kesilerek ayrılır (2). İç kısma girecek parça tabanı filmle (Mylar Film) kaplanır (3). Dışa gelen kısım filmi sıkıştırarak giydirilir (4). Üste kapak kapatılır (5).



Şekil 10.2. Deney için yapılacak ön hazırlıklar

Bu şekilde hazırlanmış beş adet kaba dört adet standart ve 1 adet numune konarak ölçümler yapılır. Numunenin kaptan sızması gerekir. Numune kapları bir kez kullanılabilir. Tedbir amaçlı cihazı korumak için numune kabı, hazırlanan ikinci bir kap içerisine yerleştirilerek ölçüm alınır.

Kalibrasyon İşlemi

Numune kaplarına hem standartlar (% 0,50; 1,00; 1,50 ve 2,00) hem de numunedan 4’er g konularak önce dört adet standart cihazda okutulur. Cihaz için tavsiye edilen floresans emisyon süresi (sayma süresi) kullanılarak okuma yapılır. Her bir standart için alınan floresans emisyonu değerlerine karşı % kükürt (analit) derişimi grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizilir. Burada elde edilen veri dizisinden elle veya bir bilgisayar yardımıyla bağımsız değişken olarak kükürt muhtevası ve bağımlı değişken olarak da okunan değerler kullanılarak doğrusal regresyon yöntemi kullanılır.

Hesaplamalar

Numunenin kükürt derişimi, her bir deney numunesi kısmı için hesaplanan veya hesaplama özelliğine sahip analizörlerden doğrudan okunan ortalama sayım değeri kullanılarak, kalibrasyon eğrisinden bulunur. Hesaplamada bilgisayar kullanılıyor ise, yüklenmiş programdan hesaplanmış

değer /değerler doğrudan okunur. Cihaz bir bilgisayara bağlı değil ise; dört nokta koordinatları kullanılarak ortalamalar yöntemi ile doğru denklemi elde edilir. Yatay eksene (x) derişim, dikey eksene (y) sinyal girilmiş ise; numune derişimi için doğru denkleminde y sinyaline karşı x hesaplanabilir. Veya milimetrik kağıt kullanarak grafik çizilir, numune için bulunan sinyal işaretlenip, yatay eksene paralel bir doğru çizilerek kalibrasyon eğrisi (doğrusu) kestirilip, oradan yatay eksene dik inilerek derişim bulunur.

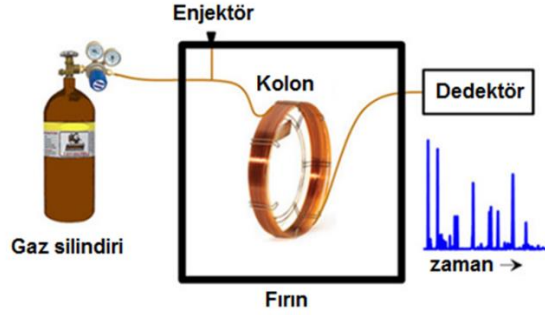
11. GAZ KROMATOĞRAFİSİ (GC)

11.1. Genel Bilgi

Termal kararlılığı yüksek, kaynama noktası düşük kimyasal bileşenlerin ayrılması ve tayininde kullanılan bir ayırma yöntemidir. Kromatografik sistemlerde bileşenler, durgun fazla, hareketli faz arasında dağılıma uğrar. Gaz kromatografisinde hareketli faz, taşıyıcı bir gaz olup sistem boyunca sürekli akış devam eder. Gaz ya da sıvı örnek bileşenleri bir şırınga yardımıyla cihazın enjeksiyon bloğuna aktarılır. Burada örnek bileşenlerinin kimyasal değişikliğe uğramadığı, termal kararlılıklarını korudukları bir sıcaklıkta buharlaştırılır ve taşıyıcı gaz tarafından kolona taşınır. Kolonda örnek bileşenleri durgun ve hareketli faz arasında, belirli sıcaklıktaki çözünürlüğüne göre dağılıma uğrar. Dağılıma uğrayan örnek bileşenleri, kaynama noktaları ve durgun faz etkileşim düzeyine göre dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar ve kromatogramda ayrı pikler biçiminde gözlenirler. Kaynama noktası düşük yani bağıl buhar basıncı yüksek olan bileşen kromatogramda ilk gözlenen piktir. Her bir maddenin alıkonma süresi iki faz arasındaki maddenin dağılım dengesine göre belirlendiğinden, bir karışımdaki bileşenlerin kromatogramda ayrı ayrı pik şeklinde görülebilmesi için, farklı dağılım dengelerine sahip olmaları gerekir.

Gaz kromatografisi genelde üç parçadan oluşmuştur.

1.Enjektör 2. Kolon 3.Dedektör (Şekil 11.1)



Şekil 11.1. Gaz kromatografisi sisteminin gösterimi

Gaz kromatografisinde analizi yapılabilen örnek bileşenleri sıvı ya da gaz olabilir. Bununla birlikte, bazı katı örneklerle de ön bir tepkime uygulanarak türevleri oluşturulur. Türevlendirme ile bileşenlerin bir ya da daha fazla fonksiyonel grubu değiştirilerek benzer bir kimyasal yapı elde edilir. Türevlendirmenin amacı bileşenlerin kaynama noktası düşürülerek, uçucu hale getirmek ve daha yüksek termal kararlılık sağlamaktır. Genelde yüksek kaynama noktasından sorumlu olan hidrojen bağlarını bir alkil veya silil grubu ile değiştirmek kaynama noktası düşürebilir. Gaz kromatografisinde eğer örnek gaz değilse gaz fazına geçirilir. Hareketli faz bir gazdır. Durgun faz genellikle tepkime vermeyen, katı üzerine tutturulmuş buharlaşmayan bir sıvıdır.

Bir maddenin bu yöntem ile analizlenebilmesi için;

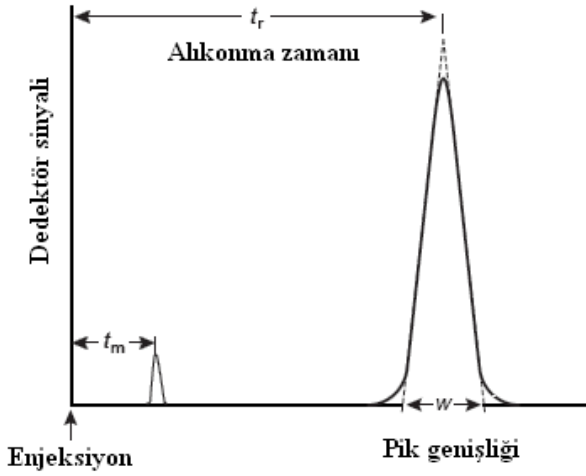
1. Bağlı buhar basıncı yüksek, yani buharlaşabilir olmalıdır.
2. Sıcaklık ile bozunmayıp, termal kararlılığı yüksek olmalıdır.
3. Molekül ağırlığı < 400 akb olmalıdır.
4. Gaz fazda stabil olmalıdır ve taşıyıcı gazlar ile reaksiyona girmemelidir.
5. Analiz edilen diğer malzemeler ile reaksiyona girmemelidir.

Gaz kromatografisinde analiz edilemeyen maddeler

1. Buhar basıncı 1-2 torr'dan daha az ya da kolon sıcaklığında bozulan maddeler (polimer ve proteinler gibi)

2. Analiz için yeterli uçuculuğuna sahip olmayan, yüksek kaynama noktasına sahip, iyonik ve polar bileşikler gibi (şekerler, tuzlar ve aminoasitler gibi)

Bileşenin saf haldeki standardının kolona enjekte edildiği zaman ile dedektöre ulaştığı zaman arasındaki fark, alıkonma süresi, t_R (Şekil 11.2) dir. Aynı deney ve cihaz koşulları altında alıkonma süresi bileşenin kendisine özgüdür. Örnek içerisindeki bileşenin analizi ile saf haldeki standardının analizinden elde edilen alıkonma süresi karşılaştırılarak, herhangi bir örneğin nitel ve nicel analizini yapmak olasıdır. Fakat alıkonma süreleri deney koşulları değiştiğinde farklılaşacağı için, tek başlarına nitel analiz için gerekli koşulları sağlamazlar. Örneğin alıkonma süreleri aynı olan iki farklı örnekle karşılaşmak olasıdır.



Şekil 11.2. Bir gaz kromatogramı örneği

Pik alanları örneğin derişimi ile orantılıdır. Pik alanlarını cihazın yazılımı kullanılarak belirlenir. Konsantrasyon ile pik alanı arasındaki ilişkiden madde miktarı hesaplanır. Ölü zaman t_m örneğin kolona yüklenmesinden hemen sonra gözlenen en küçük pik olup kolonda alıkonmadan hareketli fazla birlikte hızla ilerleyen türlere ilişkin bir sinyaldir.

Nicel ve nitel analizlerin doğru ve güvenilir olabilmesi için, kullanılan cihazın koşullarının iyi optimize edilmesi gereklidir. Bu nedenle, kromatografik analizi yapılacak örneğin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak, uygun kolon, dedektör, fırın sıcaklık aralıkları ve örnek miktarı başlıca optimize edilmesi gereken parametreleri oluştururlar. Kolon seçiminde genelde, örneğin polaritesine yakın kolon seçilerek, “benzer sistem benzer sistemde çözünür”

ilkesinden hareketle bu koşul sağlanmaya çalışılır veya özelliği hiç bilinmeyen örnekler için apolar kolonlardan başlanarak polar yapılı kolonlara doğru deneme yanılma suretiyle uygun kolon saptanmaya çalışılır.

11.2. Deneysel Kısım

Kullanılacak Cihaz: Gaz kromatografisi cihazı (GC)

Kolon: Kapiler Kolon

Hareketli Faz: Helyum

Dedektör: Alev iyonlaşma dedektörü (FID)

Çalışma Prensipleri:

Gaz fazındaki örnek bileşenleri, enjektör yardımı ile enjeksiyon bloğuna yüklenir. Hareketli faz olarak, inert gazlar kullanılır (Bunların başlıcaları argon, helyum, azot ve karbondioksittir). Örnek bileşenleri hareketli faz tarafından kolona taşınır. Kolonda örnek bileşenleri durgun ve hareketli faz arasında, belirli sıcaklıktaki çözünürlüğüne göre dağılıma uğrar. Dağılıma uğrayan örnek bileşenleri, kaynama noktaları ve durgun faz etkileşim düzeyine göre dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar ve kromatogramda ayrı pikler biçiminde gözlenirler.

Deney 11.1. Gaz kromatografi yöntemi ile biyodizelde (yağ asidi metil esteri, YAME) metanol tayini

Biyodizel, fosil yakıtlarına alternatif bir yenilenebilir enerji kaynağıdır. Hayvasal, bitkisel ya da atık yağların potasyum hidroksit ya da sodyum hidroksit varlığında küçük molekül ağırlığına sahip metanol veya etanol gibi alkoller ile transesterifikasyon reaksiyonu sonucunda elde edilir. Uzun zincirli yağ asitlerinin metil esteri olarak da tanımlanır. “Biyo” kökü biyolojik esaslı olduğunu, “dizel” kelimesi ise dizel yakıtı olduğunu gösterir. Biyodizel üretiminde alkol, katalizör olarak kullanılır ve hayvansal veya bitkisel yağların kendi esterlerine tamamen dönüştürülmesinden emin olmak için normal olarak fazla miktarda kullanılır. Üretim sonunda biyodizelin yanında kalıntı olarak bulunan alkolün, ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Biyodizelden uzaklaştırılamayan alkol alevlenme noktasının düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca, kalite standartları gereği biyodizelin, %99 değeri üzerinde saf üretilmesi istenir.

Biyodizel kalitesinin belirlenmesinden birçok parametre vardır. Yağ asidi metil esterinde metanol içeriğinin belirlenmesi de bu parametrelerden biridir.

Kimyasal Madde ve Malzemeler : Saflığı en az %99.5 (m/m) olan metanol ve 2-propanol (iç standart olarak kullanılmak üzere), metanol içeriği %0.001 (m/m)'den az olan referans YAME, saflığı en az %99 (m/m) olan azot, helyum veya hidrojen gazı (taşıyıcı gaz olarak) 0,1mg yaklaşımla tartım yapılabilen analitik terazi, 20 mL'lik septumlu şişe, inert septumlu metal kapak, 10 µL'lik, 0,1 µL doğrulukla ölçme yapabilen şırınga, kapağın yerleştirilmesi için pense, 1 mL, 2 mL ve 5 mL'lik pipet, 10 mL ve 25 mL'lik ölçülü balon.

Kalibrasyon Çözeltileri: Referans YAME içerisinde farklı metanol derişimlerine (kütlece %0,5 ; %0,1 ve %0,01) sahip 25'er mL kalibrasyon çözeltileri hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Kalibrasyon ve İşlem

Her bir kalibrasyon çözeltisi için tekrarlanmak üzere, herhangi bir kalibrasyon çözeltisinden $5 \pm 0,01$ g alınarak 20 mL'lik septumlu şişeye aktarılır ve şırınga yardımı ile 2-propanol (izopropil alkol, IPA)'den 5 µL alınarak doğrudan sıvı faz içerisine enjekte edilir. Enjeksiyon tamamlanır tamamlanmaz, pense yardımıyla septumlu metal kapak şişelerin ağzı kapatılır ve karışmanın tam olması için iyice çalkalanır. Hazırlanan çözeltiler gaz kromatografi cihazına enjeksiyondan önce $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 'da 45 dk. süre ile tutulur. En son aynı sıcaklıkta aynı sürede tutulmuş şırınga ile septumlu şişenin üs kısmındaki gaz fazından 500 µL çekilir ve gaz kromatografi cihazına enjeksiyon yapılır. İşlem üç farklı kalibrasyon çözeltisi için tekrarlanır ve aşağıdaki Eşitlik 11.1'den kalibrasyon faktörü (F: yaklaşık 0,7) hesaplanır.

$$F=(C_m \times S_i) / (C_i \times S_m) \quad (11.1)$$

Burada;

F : Belirlenen kalibrasyon faktörü,

C_i : Numuneye ilave edilen 2-propanol miktarı, % (m/m), 5.0 g numune içerisine 5µL 2-propanol ilave edildiyse $C_i = \%0.0785$ (m/m) olur. ($d_{ipa} = 0,786$ g/mol)

C_m : Kalibrasyon çözeltisinin metanol içeriği % (m/m)

S_i : 2-propanol'e ait pikin alanı

S_m : Metanol'e ait pikin alanıdır.

Hesaplama

Üç referans çözelti için ayrı ayrı elde edilen F faktörünün varyasyon katsayısı en fazla %15 olmalıdır. Faktör hesaplandıktan sonra gerçek numunelere de aynı işlemler uygulanarak, numunedeki metanol içeriği C_m olarak Eşitlik 11.2'den hesaplanır.

$$C_m = (F \times C_i \times S_m) / S_i \quad (11.2)$$

Numunedeki metanol miktarı, kalibrasyon çözeltilerindeki metanol miktarı ile karşılaştırılıp elde edilen kalibrasyon faktörlerinden en uygunu kullanılarak da numunedeki metanol miktarı hesaplanabilir. Yani üç ayrı faktörün ortalaması yerine numunedeki metanol içeriği hangi kalibrasyon çözeltisindeki metanol içeriğine yakın ise onun faktörü kullanılarak Eşitlik 11.2'den C_m hesaplanır.