

140014

**ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ FENOLİK MADDELERİN
GC-MS METODUYLA BELİRLENMESİ**

Hasan ÇABUK

140014

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Bilim Uzmanlığı Tezi

Olarak Hazırlanmıştır

ZONGULDAK

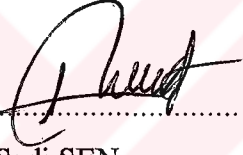
Haziran 2003

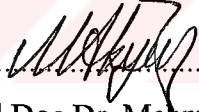
KABUL:

Hasan ÇABUK tarafından hazırlanan "ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ FENOLİK MADDELERİN GC-MS METODUYLA BELİRLENMESİ" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Kimya Anabilim Dalında Bilim Uzmanlığı tezi olarak kabul edilmiştir.

30.10.6/2003

Başkan : 
Prof.Dr. Oktay TORUL

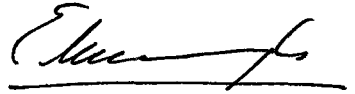
Üye : 
Prof.Dr. Şadi ŞEN

Üye : 
Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKYÜZ
(Tez Danışmanı)

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

21.10.7/2003



Prof.Dr. Etem KİŞİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bilim Uzmanlığı Tezi

ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ FENOLİK MADDELERİN GC-MS METODUYLA BELİRLENMESİ

Hasan ÇABUK

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKYÜZ

Haziran 2003, 75 sayfa

Bu çalışmada, çevredeki fenolik maddelerin gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS) ile belirlenmesi için önerilen bir metot sunulmaktadır. Metot, iyon-değiştirme kromatografisi ve sulu çözeltideki ilgili maddelerin türetilmesini ve GC/MS analizlerini içermektedir. Çalışmanın amacı, fenolik maddelerin belirlenmesi için değişik çevre örneklerine uygulanabilecek teknikler önermektir. Hedeflenen çevre örnekleri içme suları, deniz suyu, atık sular ve dip çamurlarıdır. Önerilen metodun spesifik, hassas ve kantitatif olması amaçlanmıştır. Fenolik maddeler Dowex-1X8-100 (50-100 mesh) anyon-değiştirici reçine üzerinde konsantre edilmiştir. Fenolik maddeler konsantre sulu çözeltiden asetil türevleri halinde izole edilip GC/MS ile analiz edilmiştir. 10 ppb'den daha düşük konsantrasyonlarda, % 3,0-15,7 arasındaki standart sapmalar ile elde edilen verim % 85-100 arasında değişmektedir. Dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin katı - sıvı ekstraksiyonu, DCM ve MeOH

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİLİM UZMANLIĞI

ÖZET (devam ediyor)

kullanılarak sokslet cihazı ile yapılmıştır. Fenolik maddelerin iyon-çifti ekstraksiyonu da ayrıca incelenmiştir. 4-Aminoantipirin (4-AAP) kuarternize edilmiş ve oluşan 4-AAP'nin kuarterner tuzu, fenolik maddelerin izolasyonunda bir iyon-çifti reaktifi olarak kullanılmıştır.

Sonuç olarak, izole edilen bileşikler GC/MS ile analiz edilmiş ve bileşiklerin yapılarının aydınlatılması, kütle spektrumlarının yorumlanmasıyla yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İyon-değiştirme, iyon-çifti ekstraksiyonu, fenolik maddeler, GC-MS, kuarternizasyon

Bilim Kodu: 405.03.01

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

GC-MS DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENTAL SAMPLES

Hasan ÇABUK

**Zonguldak Karaelmas University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Thesis Advisor: Asst.Prof.Dr. Mehmet AKYÜZ

June 2003, 75 pages.

This work presents a proposed method for gas chromatographic-mass spectrometric (GC/MS) determination of phenolic compounds in the environment. The method includes ion-exchange chromatography and derivatisation of compounds of interest in aqueous solution and GC/MS analysis. The aim of this work is to propose techniques that could be applied to a variety of environmental samples to detect phenolic compounds. The target environmental samples are drinking water, sea water, wastewater and sediments. The method proposed, was intended to be specific, sensitive and quantitative. Phenolic compounds were concentrated on Dowex-1X8-100 (50-100 mesh) anion-exchange resin. Phenolic compounds were isolated as their acetyl derivatives from concentrated aqueous solution and analysed with GC/MS. The obtained recoveries ranged from 85-100 % with relative standart deviations (RSDs) between 3,0-15,7 % lower then 10 ppb. Solid-liquid extraction of phenolic compounds in sediment samples were performed in soxhlet apparatus with DCM

ABSTRACT (continued)

and MeOH. Ion-pair extraction of phenolic compounds has also been investigated. 4-Aminoantipyrine (4-AAP) was quaternized and quaternary salt of 4-AAP was used as an ion-pair reagent for the isolation of phenolic compounds.

As a result, isolated compounds were analysed by GC/MS and identification of components were performed by interpreting their mass spectra.

Key Words: Ion-exchange, ion-pair extraction, phenolic compounds, GC-MS, quaternization

Science Code: 405.03.01

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Mehmet AKYÜZ' e şükranlarımı sunarım.

Tezin yazımı sırasında bilgisayarla ilgili karşılaştığım problemlerde sürekli yardım aldığım Öğr.Grv. Alaaddin Yılmaz'a, numunelerin toplanması sırasında yardımlarından dolayı Arş.Grv. Şevket Ata'ya, maddi ve manevi desteğinden dolayı ev arkadaşım Arş.Grv. Bilal Zemher'e, yardımlarından dolayı Arş. Grv. arkadaşlarıma ve tüm ZKÜ Fen Edebiyat Fakültesi öğretim elemanlarına çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım boyunca da beni destekleyen anneme ve babama minnet duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
 BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	 1
1.1 SU KİRLENMESİ OLAYINA GENEL BAKIŞ.....	1
1.2 SU KİRLETİCİLERİNDEN FENOLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	2
1.2.1 Fenollerin Asitlikleri.....	2
1.2.2 Fenollerin Çevreye Karışması.....	4
1.2.3 Fenollerin Toksikliği	6
1.3 ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ FENOLLERİN BELİRLENMESİYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	7
 BÖLÜM 2 TEORİ.....	 12
2.1 FENOLİK MADDELERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN GENEL ANALİZ METOTLARI.....	12
2.1.1 Spektrofotometrik Yöntem.....	12
2.1.2 İyon-Çifti Ekstraksiyonu.....	14

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.2 FENOLİK MADDELERİN BELİRLENMESİNDE	
KULLANILAN İZOLASYON TEKNİKLERİ.....	16
2.2.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	17
2.2.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyonu.....	17
2.2.3 Katı-Faz Ekstraksiyonu.....	18
2.2.4 Katı-Faz Mikro Ekstraksiyonu.....	18
2.2.5 İyon-Değiştirme Kromatografisi.....	19
2.3 FENOLLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ İLE	
ANALİZLERİNDE KULLANILAN TÜRETME	
REAKSİYONLARI.....	21
2.3.1 Fenollerin Alkil Türevleri.....	22
2.3.2 Fenollerin Asetil Türevleri.....	22
2.3.3 Fenollerin Silil Türevleri.....	23
BÖLÜM 3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1 KULLANILAN CİHAZLAR.....	24
3.1.1 UV Spektrofotometresi.....	24
3.1.2 Gaz Kromatografisi.....	24
3.1.3 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	24
3.1.4 pH metre.....	25
3.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI.....	25
3.3 DENEYSEL İŞLEMLER.....	25
3.3.1 Anyon Değiştirici Reçine ile Yapılan Ekstraksiyonlar.....	25
3.3.2 Dip Çamuru Örneklerinin Analizleri.....	27
3.3.3 Türetme Reaksiyonları.....	29
3.3.4 4-Aminoantipirinin Kuarternizasyonu.....	30
3.3.5 4-QAAP'nin İyon-Çifti Reaktif Olarak Kullanılması.....	31

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
3.3.6 4-Aminoantipirin ile Yapılan Ekstraksiyonlar.....	32
BÖLÜM 4 DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....	34
4.1 DENEYSEL SONUÇLAR.....	35
4.1.1 Fenolik Maddelerin Asetillenmesi.....	35
4.1.2 Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması.....	38
4.1.3 Fenollerin Sulu Ortamdan İzolasyonları.....	39
4.1.3.1 4-QAAP'nin UV, ¹ H-NMR, MS ve FTIR Spektrumları.....	40
4.1.3.2 Fenollerle Oluşturulan Bileşikler ve UV Spektrumları	43
4.1.4 Anyon-Değiştirici Reçine ile Yapılan Ekstraksiyonlar.....	49
4.1.5 Standart Fenollerin GC-MS Analizleri.....	51
4.1.6 Su Numunelerinin GC-MS Analizleri.....	57
4.1.7 Dip Çamuru Örneklerinin GC-MS Analizleri.....	61
4.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	69
BİBLİYOGRAFYA.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Klorofenollerin çevreye yayılması.....	5
2.1 Fenol ile 4-AAP arasındaki reaksiyonun mekanizması.....	13
3.1 Anyon-değiştirici reçine ile yapılan ekstraksiyonlara ait deneysel düzenek.....	26
3.2 Su numuneleri ve dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonu ve GC-MS ile analizlerine ait akım şeması.....	28
3.3 Dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonları ve GC-MS ile analizlerine ait akım şeması.....	29
3.4 4-Aminoantipirinin kuarternizasyonu.....	31
4.1 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin GC kromatogramları.....	35
4.2 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin % verimleri..	36
4.3 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin GC analizlerinden elde edilen pik alanı değeri lerinin karşılaştırılması.....	37
4.4 Fenolik maddelerin sulu ortamda asetil türevlerine dönüştürülmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği.....	39
4.5 4-AAP ve 4-QAAP'nin sulu çözeltilerinin UV spektrumları.....	40
4.6 4-QAAP bileşine ait ¹ H-NMR Spektrumu.....	40
4.7 4-QAAP bileşinin kütle spektrumu.....	41
4.8 4-AAP ve 4-QAAP'nin FTIR spektrumları.....	43
4.9 4-AAP ile fenol arasındaki reaksiyondan elde edilen kinon-imin bileşine ait UV spektrumu.....	44
4.10 4-QAAP ile fenol arasındaki reaksiyondan elde edilen iyon-çifti bileşine ait UV spektrumu.....	44
4.11 4-AAP ve 4-QAAP ile fenolik bileşiklerin reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin kimyasal yapıları.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Fenol çözeltilerinin 4-AAP, 4-QAAP karışımı ve saf 4-QAAP ile yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen UV spektrumları.....	46
4.13 Farklı konsantrasyonlardaki <i>p</i> -tert-butilfenol sulu çözeltilerinin 4-QAAP ile ekstraksiyonundan elde edilen UV spektrumları.....	46
4.14 Farklı konsantrasyonlardaki <i>p</i> -tert-butilfenol sulu çözeltilerinin 4-QAAP ile ekstraksiyonundan elde edilen kalibrasyon grafiği.....	47
4.15 4-AAP'nin fenolle oluşturduğu kinon-imin bileşiğinin 460 nm'deki absorbandsının zamanla değişimi.....	47
4.16 4-QAAP'nin fenolle oluşturduğu iyon-çiftinin 276 nm'deki absorbandsının zamanla değişimi.....	48
4.17 Standart fenollerin asetil türevlerinin GC-MS kromatogramı.....	51
4.18 Fenil asetatın kütle spektrumu.....	52
4.19 <i>p</i> -Metilfenil asetatın kütle spektrumu.....	52
4.20 2-Klorofenil asetatın kütle spektrumu.....	52
4.21 4-Klorofenil asetatın kütle spektrumu.....	53
4.22 4-Bromofenil asetatın kütle spektrumu.....	53
4.23 <i>p</i> -Tert-butilfenil asetatın kütle spektrumu.....	53
4.24 2,4,6-Triklorofenil asetatın kütle spektrumu.....	54
4.25 4- Nitrofenil asetatın kütle spektrumu.....	54
4.26 2-Naftil asetatın kütle spektrumu.....	54
4.27 2,4,6-Tribromofenil asetatın kütle spektrumu.....	55
4.28 Deniz suyu numunesinin anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı.....	57
4.29 Deniz suyu numunesinin anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı.....	58
4.30 Nehir suyu numunesinin anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı.....	59
4.31 <i>Tert</i> - butil-4-metoksi fenil asetatın kütle spektrumu.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.32 Dip çamuru örneğinin sokslet ekstraksiyonu ve anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı....	61
4.33 <i>Tert</i> -butilfenil asetatın kütle spektrumu.....	62
4.34 <i>Tert</i> -pentilfenil asetatın kütle spektrumu.....	62
4.35 Dip çamuru örneğinin sokslet ekstraksiyonuyla yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı.....	63



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Fenollerin asitlikleri.....	3
1.2 Bazı fenollerin ölçülen toksiklik sabitleri.....	7
2.1 Tetrabutyl amonyum iyon-çiftlerinin ekstraksiyon sabitleri.....	15
2.2 İyon-değiştirici reçine türleri.....	20
4.1 Fenollerin iki farklı yoldan elde edilen asetil türevlerinin yüzde verimleri.....	36
4.2 Fenolik maddelerin sulu ortamda asetil türevlerine dönüştürülmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğine ait denklemler ve r^2 değerleri.....	39
4.3 Anyon-değiştirici reçine ile yapılan ekstraksiyonlara ait geri kazanım yüzdeleri.....	50
4.4 Standart fenollerin asetil türevlerinin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül iyon piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri....	55
4.5 Organik bileşiklere karışabilecek bazı safsızlıklar.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	=	Dakika
HA ⁺	=	Kuarterner amonyum iyonu
K _{ex} (HAX)	=	Ekstraksiyon sabiti
log K _{ex}	=	Ekstraksiyon sabitinin logaritmik değeri
M ⁺	=	Molekül iyonu piki
m/z	=	Kütle/yük (m/e)
nm	=	Nanometre
Q ⁺	=	UV-absorbanslı olmayan zıt yüklü bir iyonik bileşik
QX _{UV}	=	Organik fazdaki UV-absorbanslı iyon-çifti
r ²	=	Korelasyon katsayısı
rt	=	Alıkonma zamanı (Retention time)
X ⁻	=	Anyonik bileşik
x	=	Madde miktarı (mg)
X _{UV}	=	UV-absorbanslı iyon-çifti reaktifi
y	=	Pik alanı (mm ²)
λ _{max}	=	Maksimum dalgaboyu

KISALTMALAR

4-AAP	=	4-Aminoantipirin
BHA	=	3- <i>Tert</i> -butil-4-metoksi fenol (Butylated hidroksi anisole)
BHT	=	2,6-Bis(1,1-dimetiletil)-4-metil fenol (Butylated hidroksi toluene)
Çz	=	Çözücü
CE	=	Kapiler elektroforez
CTAB	=	Setiltrimetilamonyum bromür
DCM	=	Diklorometan
DIE-SPE	=	Dinamik iyon-değiştirme katı-faz ekstraksiyonu
DTAQ	=	8-(4,6-dikloro-1,3,5-triazinilamino) kinolin
EEC	=	Avrupa Ekonomi Topluluğu (European Economic Community)
EPA	=	Amerikan Çevre Koruma Derneği (US Environmental Protection Agency)
FAB	=	Hızlı atom bombardımanı tekniği
FTIR	=	İnfrared spektroskopisi
GC	=	Gaz kromatografisi
GC-FID	=	Gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma tekniği
GC-MS	=	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
¹ H-NMR	=	Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
HPLC	=	Yüksek-performans sıvı kromatografisi
MS	=	Kütle spektrometresi
MSTFA	=	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsililtrifloroasetamid
4-QAAP	=	4-Aminoantipirinin kuarterner amonyum tuzu
PS-DVB	=	Polistiren-divinilbenzen kopolimeri
SDE	=	Eş zamanlı destilasyon ve ekstraksiyon tekniği (Simultaneous distillation and extraction)
SPE	=	Katı-faz ekstraksiyonu (Solid-phase extraction)
SPME	=	Katı-faz mikroekstraksiyonu (Solid-phase microextraction)
TBAB	=	Tetrabutilamonyum bromür
UV	=	Ultraviyole spektroskopisi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 SU KİRLENMESİ OLAYINA GENEL BAKIŞ

Yeryüzündeki sular, güneşin sağladığı bir enerji ile sürekli bir döngü içinde bulunur. İnsanlar yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için suyu bu döngü içinden alır ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu sırada suya karışan maddeler suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek “su kirliliği” olarak adlandırılan olguyu ortaya çıkarır.

Evsel ve endüstriyel atıkların arıtılmaksızın su ortamlarına boşaltılmaları, tarımda verimi artırmak için kullanılan doğal ve yapay maddelerin su ortamına taşınmaları gibi sebeplerle gerçekleşen su kirliliği, sularda yaşayan çeşitli canlı varlıkları da etkileyerek doğal dengenin bozulmasına yol açabilmektedir (Türkiye Çevre Vakfı, 1995).

Tarih boyunca içme sularının niteliğinin belirlenmeye çalışılması, insan sağlığı için bir faktör oluşturmuştur. İçme sularının kirlenmesi, sık sık su yoluyla bulaşan hastalıkların doğmasına ve bu da birçok şehirdeki nüfusun yok olmasına neden olmuştur. Suların insan sağlığını tehdit edecek şekilde kirlenmesi, bu suyu içme veya sulama amaçlı kullanmak zorunda kalan insanların büyük zorluklarla karşılaşmasına neden olmuştur.

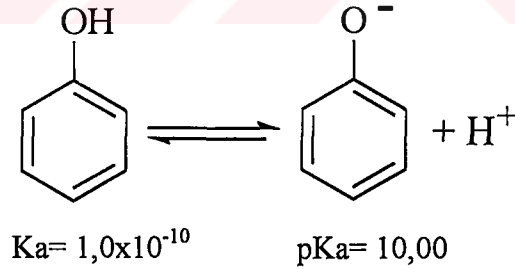
II. Dünya Savaşı'ndan sonra sanayideki hızlı gelişme ve sentetik kimyasal maddelerin kullanımı, su kaynaklarının aşırı oranda kirlenmesine neden olmuştur. Bir çok endüstrinin işleyişinin suyu gerektirmesi, aşırı oranda kirlenmiş atık suların meydana gelmesine neden olmuştur (Manahan, 1994).

1.2 SU KİRLETİCİLERİNDEN FENOLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

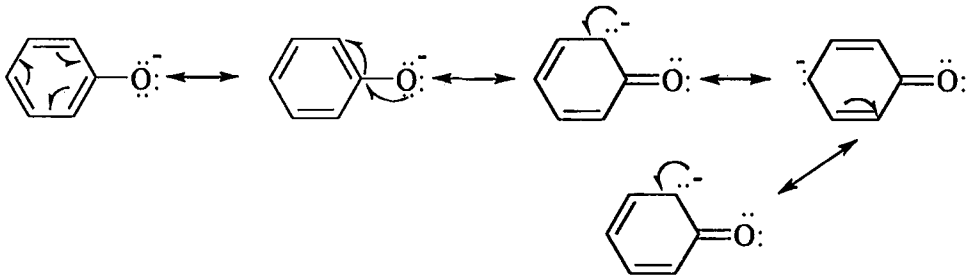
Benzen halkasına, doğrudan hidroksil grubunun bağlı olduğu bileşikler fenoller olarak adlandırılırlar. Kendilerine has keskin kokuları olan fenoller, genellikle renksiz kristaller halinde bulunurlar. Fenolün kendisi havayla temas ettiğinde oksidasyondan dolayı pembeleşir. Fenollerin havayla oksidasyonuna duyarlılığı, yapıda birden fazla hidroksil ya da alkil grubunun bulunmasıyla artar. Fenolün kendisi 40,9°C'de erir. Ancak yapısında genellikle %8 oranında su bulunduğundan yarı sıvı halde bulunur ve bu da erime noktasını düşürür. 100 mL soğuk sudaki çözünürlüğü yaklaşık 6,7 gram iken sıcak suda tamamen çözünür. Alkil fenoller ise suda zor çözünürler. Örneğin *o*-krezol, 25 °C'de 100 mL suda 2,5 gram çözünmektedir. Fenoller asidik özellik gösterdiklerinden dolayı deriyle temas ettiklerinde tahriş ederler ve ayrıca zehirlidirler (Streitwieser et al., 1985).

1.2.1 Fenollerin Asitlikleri

Fenolün pKa'sı 10,00'dur ve bazı substitue fenollerin de pKa değerleri Çizelge 1.1'de verilmiştir.



Fenoller genellikle karboksilli asitlerden daha zayıf asidik ancak alkollerden daha kuvvetli asidik özellik gösterirler.

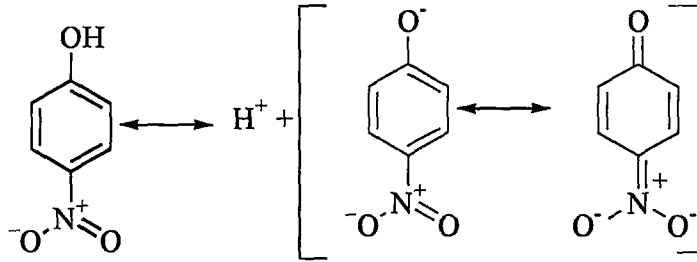


Fenollerin alkollere göre asitliklerinin fazla olmasının nedeni, oluşan anyonun rezonans kararlılığıdır. Bunu sağlayan da eksi yükün aromatik halkadaki delokalizasyonudur.

Çizelge 1.1 Fenollerin asitlikleri.

Substituent	orto	pKa (25°C)	
		meta	para
H	10,00	10,00	10,00
Metil	10,29	10,09	10,26
Flor	8,81	9,28	9,81
Klor	8,48	9,02	9,38
Brom	8,42	8,87	9,26
İyot	8,46	8,88	9,20
Metoksi	9,98	9,65	10,21
Metiltiyo		9,53	9,53
Siyano			7,95
Nitro	7,22	8,39	7,15

Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi halka üzerindeki elektron verici gruplar asitliğin azalmasına yol açarken halojenler asitliği artırmaktadır. Siyano ve nitro gibi elektron çekici gruplar da asitliği önemli derecede artırmaktadır.



Nitro grubunun hidroksil grubuna göre *orto* veya *para* pozisyonunda bulunması asitliği daha da artırmaktadır. Örneğin 2,4- dinitrofenolün pKa’sı 4,00 ve 2,4,6-trinitrofenolün pKa’sı 0,25’dir. Dolayısıyla oldukça kuvvetli bir asittir (Streitwieser et al., 1985).

1.2.2 Fenollerin Çevreye Karışması

Fenoller, çok değişik kaynaklardan kirlenmenin bir sonucu olarak çevrede sık sık oluşan toksik maddelerdir. Bir çok fenol türevi hem Avrupa Ekonomi Topluluğu (EEC) hem de Amerikan Çevre Koruma Derneği (EPA) nin önemli kirleticiler listesinde yer almaktadır (Corcia et al., 1993).

Fenolik maddeler, endüstriyel uygulamalarının bir sonucu olarak plastik, boya, ilaç, böcek öldürücü ve kağıt üretiminde meydana gelip çevreye karışırlar. Penta klorofenoller ahşap koruyucu olarak kullanılmaktadır. Fenoller kağıt üretiminde ligninin bozunmasıyla, klorofenoller içme sularının klorlanmasıyla ve nitrofenoller de atmosferde taşıt eksozlarından fotokimyasal olarak oluşurlar (Trempe et al., 1993; Rodriguez et al.'dan, 2000).

Fenoller petrol, petrokimya, kömür işleten ve fenol üreten endüstrilerden meydana gelir ve atık sularda bulunurlar. Kömürün gazlaştırılması ve koklaştırılması işlemleri sırasında başta fenol, m-krezol ve rezorsinol olmak üzere daha bir çok fenolik madde oluşur ve atık sularda bulunurlar (Dutta et al., 1998).

Hem kömür işleyen endüstriler hem de petrol rafinerilerinin atıklarındaki fenolik madde miktarı genellikle 500-10000 mg L⁻¹ seviyesindedir (Fedorak and Hrudey, 1988; Ha and Vinitnantharat'dan, 2000).

Fenollerin çevrede meydana gelmesi, insanları da doğrudan etkilemektedir. İnsanların yedikleri sebze ve meyveler yetiştirilirken tarım ilaçları kullanılabilenmekte, ayrıca gıdaların korunması ve depolanması esnasında çürümenin engellenmesi amacıyla bazı fenolik maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Suların klorlanmasıyla klorofenoller ve diğer substitue fenoller oluşabilmektedir. Klorofenoller, Şekil 1.1'de görüldüğü gibi havayı, suyu, toprağı, suda yaşayan organizmaları, doğal yaşamı ve insanları etkilemektedir. Orman ürünlerinin korunması amacıyla tetra ve pentaklorofenoller kullanılmakta ve bu ürünlerin

yanmasıyla da dioksinler, furanlar ve difenileterler gibi havayı, çevre sularını ve dolayısıyla insan sağlığını etkileyen maddeler oluşmaktadır (Afghan et al., 1989).

1.2.3 Fenollerin Toksikliği

Farklı kaynaklardan çevreye karışan fenolik maddeler, oldukça toksik bileşikler olup çok düşük konsantrasyonlarda bile sularda hoş olmayan tat ve kokulara neden olmaktadır. Özellikle 2,4-diklorofenol, 2,4,6-triklorofenol ve pentaklorofenoller kanserojen maddeler olarak bilinmektedir. Çevredeki önemli fenollerin toksikliği aşağıdaki ifadelerle özetlenmiştir (Afghan et al., 1989).

- Hidrokarbon kökenli fenoller kloro ve nitro fenollere oranla daha az toksiktirler.
- Klorofenoller oldukça toksik ve kararlıdır.
- Nitrofenoller, bütün fenoller içerisinde en çok toksik olanlardır.
- Fenollerin toksikliği asitlik kuvvetiyle artar.
- Alkilfenoller biyobozunurlar ancak sterik engelden dolayı bazı alkilfenoller biyobozunmaya karşı dayanıklıdır.
- Klorofenoller en çok suda yaşayan organizmalar üzerinde toplanmaktadır.

Birçok sentetik kimyasal maddenin hormon gibi davrandığı ve insanların hormonal sistemini doğrudan etkilediği konusunda bilim adamları hem fikirdir. Örneğin 4-nonilfenol erkek balıkların kısırlaşmasına yol açarak üremelerini engellemektedir (Hileman, 1994; Helaleh et al' den, 2001).

Deri ve tekstil atık sularındaki bazı fenolik maddelerin, anyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin, benzen ve naftalin sülfonatların toksikliği bakteriyel biyosensör kullanılarak ölçülmüş ve toksiklik sabitleri hesaplanmıştır. Bazı fenollerin ölçülen toksiklik sabitleri Çizelge 1.2'de gösterilmiştir (Farré et al., 2001).

Çizelge 1.2 Bazı fenollerin ölçülen toksiklik sabitleri (Farré et al., 2001).

<u>Bileşik</u>	<u>Toksiklik Sabiti</u>
2-klorofenol	0,0040
4-klorofenol	0,0050
2,4,6-triklorofenol	1,49
Pentaklorofenol	27,03
Nonilfenol	0,0020

Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi, asitlik sabiti oldukça büyük olan 2,4,6-triklorofenol ve pentaklorofenoller yüksek oranda toksikliğe sahiptir.

1.3 ÇEVRE ÖRNEKLERİNDEKİ FENOLLERİN BELİRLENMESİYLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çevre örneklerindeki fenolik maddelerin tayin edilmesi ile ilgili, literatürde mevcut bazı çalışmalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

Fiamegos et al. (2000) yaptıkları bir çalışmada, 4-aminoantipirinin (4-AAP) yedi farklı türevini sentezleyerek fenollerı spektrofotometrik olarak belirlemeye çalışmışlardır. Sentezlenen her bir türevin değişik fenollerle reaksiyonları incelenmiş ve 4-AAP metodu ile karşılaştırılmıştır. Özellikle diklorofenollere, 4-AAP türevlerinin 4-AAP’den daha iyi sonuç verdiği ve 4-AAP türevlerinin fenollerle oluşturduğu kırmızı renkli komplekslerin daha kararlı yapıda olduğu belirtilmiştir.

Fiamegos et al. (2002) yaptıkları diğer bir çalışmada, *p*-substitue fenollerin 4-AAP ile reaksiyonlarını incelemişlerdir. *p*-Substitue kloro, hidroksi ve metoksi fenollerin 4-AAP ile reaksiyonu sonucunda kinon-imin bileşikleri elde edilmiş ve bu bileşiklerin kütle spektrumlarının, fenol-4-AAP bileşiğinin kütle spektrumu ile aynı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla reaksiyon sırasında kloro, hidroksi ve metoksi gibi grupların halkadan ayrıldığı ifade edilmiştir.

Su et al. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, fenollerin spektrofotometrik olarak belirlenmesi için yeni bir reaktif olan 8-(4,6-dikloro-1,3,5-triazinil amino) kinolin (DTAQ) bileşiği sentezlenmiştir. DTAQ, rezorsinol ve hidrokinon gibi difenollerle reaksiyona girmediği için bu yöntem, monofenollerin spektrofotometrik olarak tayin edilmesinde seçici bir metot olarak önerilmiştir.

Evtushenko et al.(2002) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *m*-aminofenilarsenik asit diazonyum tuzunun fenollerle çiftleşme reaksiyonu, sulardaki maksimum kabul edilebilir konsantrasyon seviyesindeki fenollerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Birleşme reaksiyonu sonucu oluşan azo boyar madde sulu ortamdan izobutanolle organik faza alınarak 430 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu yöntemle, 0,9 µg/mL seviyesinden daha düşük konsantrasyonlardaki fenollerin tayin edilebildiği belirtilmiştir. Agrawal ve Gupta (1999) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise *p*-aminoasetofenonun diazonyum tuzunun fenollerle reaksiyonu incelenmiş ve bu yöntem diğer spektrofotometrik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Önerilen bu yöntemin, 4-AAP yöntemine göre daha hassas olduğu ve ortamdaki sülfür bileşikler ve metal iyonları gibi yabancı maddelerin yöntemin uygulanmasını olumsuz yönde etkilemediği belirtilmiştir.

Pocurull et al. (1996) tarafından yapıla bir çalışmada, 13 adet fenolik bileşik katı-faz ekstraksiyon tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Ekstraksiyonda karbon ve polistiren-divinilbenzen kopolimeri (PS-DVB) gibi iki farklı adsorban kullanılarak özellikleri karşılaştırılmıştır. Özellikle fenol gibi polar bileşiklerin adsorbana daha iyi tutunmasını sağlamak amacıyla da ekstraksiyon sisteminde iyon-çifti reaktifi olarak tetrabutylamonyum bromür kullanılmıştır. PS-DVB kopolimerinin fenolik maddelere karbonlu adsorbana oranla daha iyi cevap verdiği belirtilmiştir.

Renberg ve Lindström (1981) yaptıkları bir çalışmada, oktadesil silika içeren C₁₈ kolonlarını kullanarak klorofenoller ve katekoller endüstriyel ve doğal sulardan izole etmişlerdir. İzolasyondan sonra fenoller asetil türevlerine dönüştürülerek gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir.

Davi ve Gnudi (1999), içme sularındaki fenolik bileşikler 1994-1996 yılları arasında 15 günde bir ölçümler yaparak tayin etmişlerdir. Su numunelerindeki fenolik bileşikler, katı-faz ekstraksiyon (SPE) tekniği kullanılarak konsantre edilmiş ve yapıları gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile aydınlatılmıştır. Özellikle yiyeceklerin depolanması sırasında antioksidan olarak kullanılan 3-*tert*-butil-4-metoksifenol (BHA) ve izomeri 1,1-dimetiletil-4-metoksifenol, sulardaki en yüksek konsantrasyonlu bileşikler olarak bulunmuştur. Sulu ortamda hızlı bozunabilen kloro ve nitro fenollerin ise diğer fenollere oranla oldukça düşük konsantrasyonlarda olduğu ve ayrıca BHA, nonilfenol ve etilfenollerin konsantrasyonlarının özellikle yaz aylarında artış gösterdiği belirtilmiştir.

Rhee et al. (1998), böceklerin kabuklarında bulunan ve doğal polimerlerden olan çitin ve çitosanın, fenolik maddelerin katı-faz ekstraksiyonuyla belirlenmesinde adsorban olarak uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, adsorbanla klorofenoller arasında hidrojen bağı oluşmakta ve moleküldeki klor atomlarının sayısı arttıkça da molekülün adsorbana bağlanması kolaylaşmaktadır. Dolayısıyla çitin ve çitosanın, çevre örneklerindeki özellikle klorofenollerin konsantre edilmesinde adsorban olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bacocchi et al. (2001) katı-faz mikroekstraksiyon (SPME) ile birlikte gaz kromatografisi-alev iyonlaştırma tekniğini (GC-FID), topraktaki fenollerin hızlı bir şekilde tayin edilmesinde kullanmışlardır. Toprak numuneleri, sulandırıldıktan sonra ekstraksiyon kabına alınarak 85 µm poliakrilat lifi kullanılarak 1 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Kısa bir sürede analizin yapılması, ekstraksiyonda organik çözücünün kullanılmaması ve az miktarda toprak numunelerinin kullanılması bu yöntemin avantajlı yönleri olarak belirtilmiştir.

Forehand et al. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada sigara dumanındaki fenoller, aromatik hidrokarbonlar ve aromatik aminler eş zamanlı destilasyon ve ekstraksiyon (SDE) tekniği kullanılarak ekstrakte edilmiş ve GC-MS tekniği ile de maddelerin yapıları aydınlatılmıştır. 20 farklı sigaradan toplanan dumanlar kağıt filtrelerden geçirilerek organik maddelerin adsorbsiyonu sağlanmış ve daha sonra filtre SDE tekniği ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra aromatik hidrokarbonlar direkt olarak, fenoller sillil türevlerine dönüştürülerek ve aromatik aminler de heptaflorobutirik anhidrit ile türetilerek analiz edilmişlerdir.

Buchholz ve Pawliszyn (1994), fenoller için poliakrilat liflerinin kullanımı esasına dayalı bir metot geliştirmişlerdir. Ekstraksiyonun ardından bu lifler, doğrudan GC enjektörüne yerleştirilmiş ve maddelerin ısıyla beraber lif yüzeyinden ayrılmasıyla miktar analizleri yapılmıştır. Serbest fenollerin kromatografik analizlerinde yaşanan problemler, fenollerin asetil türevlerine dönüştürülmesiyle ortadan kaldırılmıştır. Ancak 2,4-dinitrofenol ve 2-metil-4,6-dinitrofenolün türetme reaksiyonlarına cevap vermediği, diğer fenollerin ise % 85-100 verimle asetil türevlerine dönüştürüldüğü belirtilmiştir.

Li ve Lee (1997), dinamik iyon-değiştirme katı-faz ekstraksiyon tekniğini (DIE-SPE) kullanarak sulu ortamdaki 15 farklı fenolik maddeyi belirlemişlerdir. Metodun ilk basamağında, uzun karbon zincirli setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ve tetrabutilamonyum bromürün (TBAB) C₁₈ kolonundan geçirilmesiyle silika üzerine adsorbsiyonu yapılmıştır. Adsorblanan CTAB ve TBAB'nin iyonik fonksiyonel grupları iyon-değiştirici olarak görev yapmış ve sulu ortamdaki iyonlaşabilen organik maddelerin toplanmasını sağlamıştır. Bu şekilde inorganik iyonların ve hümkik maddelerin etkileri en aza indirgenerek fenollerin ekstraksiyon verimi artırılmıştır.

Abrahamsson ve Xie (1983) yaptıkları bir çalışmada, asetik anhidrit ve n-hekzanı doğrudan su numunesine ekleyerek klorofenolleri asetil türevleri halinde ekstrakte ederek GC ile analiz etmişlerdir. Bu şekilde µg/L seviyesindeki klorofenoller

toplam 18 dakika gibi kısa bir sürede analiz edilmişlerdir. Klorofenoller pentaklorobenzil ve asetil türevlerine dönüştürülmüş ve GC'de asetil türevlerinin daha iyi ayrıldığı belirtilmiştir. Metot içme sularına, deniz suyuna ve atık sulara başarıyla uygulanmıştır.

Castillo et al. (2001), tekstil atık sularındaki toksik organik maddelerin karakterizasyonu için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Fenoller, nonilfenol polietoksilatlar, alifatikalkol polietoksilatlar ve benzen sülfonatlar gibi farklı yüzey aktif maddeler SPE tekniği ve ardından GC-MS ile analiz edilmiştir. Organik maddeler, yapılarına göre sınıflandırılmış ve farklı çözücü sistemleriyle fraksiyonlara ayrılmıştır. Oktadesil silika ve stiren-divinilbenzen kopolimeri gibi iki farklı adsorbanın ard arda kullanılmasıyla ve geri kazanma işleminin de metanolla yapılmasıyla tekstil endüstrisi atıklarında metilfenollere ve nonilfenol izomerlerine rastlanmıştır.

Richard ve Junk (1984) tarafından yapılan bir çalışmada sulu ortamdaki fenoller, organik asit ve bazlar çözücü ekstraksiyonu, iyon-değiştirme ve buhar destilasyonu gibi farklı yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. GC-MS analizleri öncesi, polar organik maddelerin sulu ortamdan izolasyonu için bu yöntemler kullanılmış ve buhar destilasyonu ve iyon-değiştirme yöntemlerinin daha avantajlı yönlerinin olduğu belirtilmiştir. Fenoller ve yağ asitlerinin atık sulardan izolasyonlarında buhar destilasyonunun standart bir metot olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Kuban ve Flowers (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise çevre örneklerinde pikomolar seviyesindeki 14 adet klorofenolik ve fenolik bileşikler, iyon-değiştirme yöntemi ile (Dionex DX-500) konsantre edilerek elektrokimyasal olarak analiz edilmiştir. 1,0 mL/dak. akış hızı ile su numuneleri kolondan geçirilerek sülfirik asit içeren asetonitril ile geri kazanım işlemi yapılmış ve ardından karbon elektrot ve Ag/AgCl referans elektrodu kullanılarak elektrokimyasal olarak analiz işlemi yapılmıştır. Bu yöntemin fenolik maddelerin belirlenmesinde hassas, hızlı ve kolay bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

BÖLÜM 2

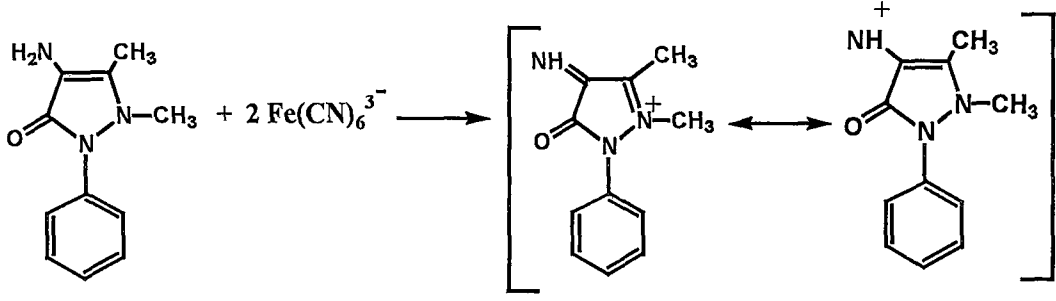
TEORİ

2.1 FENOLİK MADDELERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN GENEL ANALİZ METOTLARI

2.1.1 Spektrofotometrik Yöntem

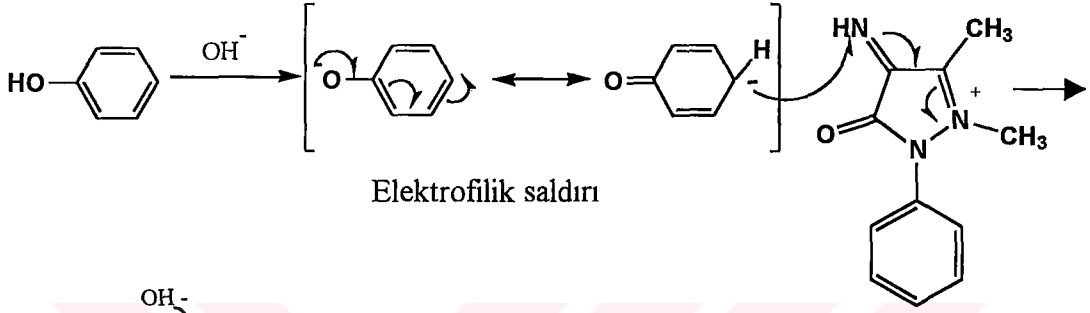
Kromatografik yöntemler fenolik maddelerin tek tek ve hassas olarak belirlenmesinde uygun olmalarına rağmen spektrofotometrik yöntemler, toplam fenolik madde tayini için uygulanmaktadır. Fenollerin 4-AAP ile boyar madde kompleksi oluşturarak kloroform ile sıvı- sıvı ekstraksiyonu, 1965'den beri atık sulardaki fenollerin belirlenmesinde standart bir metot olarak kullanılmaktadır. Reaksiyon, fenolün 4-AAP'ye bazik çözeltide oksidatif bağlanması şeklindedir. 4-AAP yönteminin $\mu\text{g/L}$ seviyesindeki fenollerde etkili olmaması ve *para*-substitue fenollerle 4-AAP'nin reaksiyona girmemesi bu yöntemin dezavantajlarıdır. Reaksiyonun mekanizması Şekil 2.1'de verilmiştir (Fiamegos et al., 2000).

Fenol halkasının *-para* pozisyonuna hidroksil, halojen, karboksil ve metoksi grupları bağlı olduğu zaman 4-AAP ile reaksiyon gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında bahsedilen gruplar halkadan ayrılmaktadır. Bu grupların dışında başka grupların *-para* pozisyonunda bulunması reaksiyonun gerçekleşmesini engellemektedir. Dolayısıyla *p*-substitue fenollerin kantitatif belirlenmesinde bu yöntem seçici ve hassas değildir (Fiamegos et al., 2002).

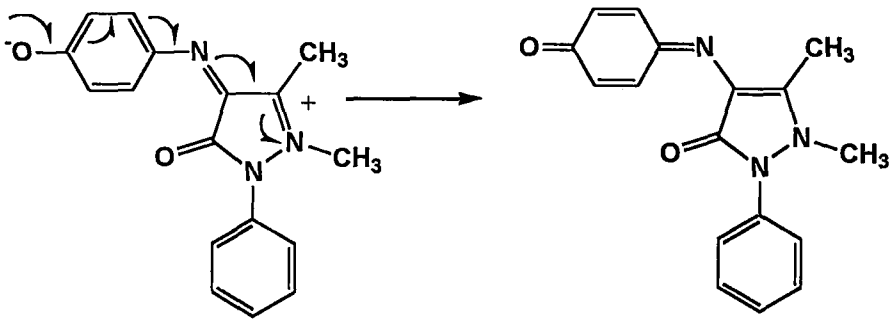
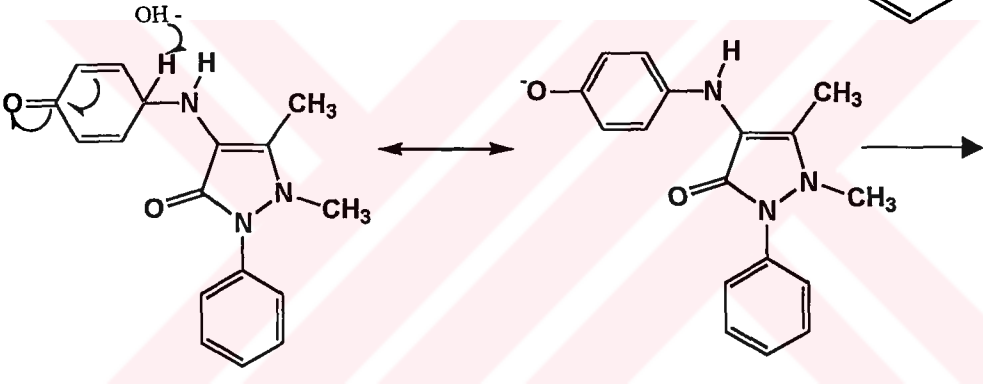


4-AAP

Amino grubunun oksidasyonu



Elektrofilik saldırı



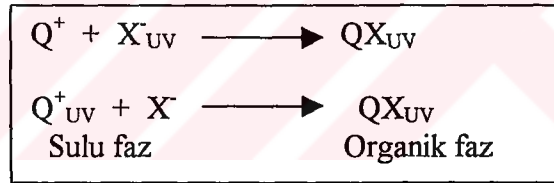
Kinon-İmin Boyar maddesi

Şekil 2.1 Fenol ile 4-AAP arasındaki reaksiyonun mekanizması (Fiamegos et al., 2000).

2.1.2 İyon-Çifti Ekstraksiyonu

İyon-çifti ekstraksiyonu, iyonik bileşiklerin zıt-iyonlar yardımıyla sınıflandırılmasına yarayan bir metottur. Bilinen bütün spektrofotometrik metotlar, organik çözücülerle ekstrakte edilebilen iyon-çifti oluşumuna dayanmaktadır.

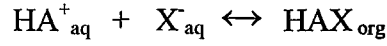
Yöntemin temeli, oluşan iyon-çifti organik çözücüde çözünemeli ancak iyon-çifti reaktifi tek başına organik çözücüde çözünmemelidir. Bu teknikte UV-absorbansı olmayan bileşiklerin, UV-absorbansı olan reaktifler ile organik çözücüde iyon-çifti oluşturmasıyla mevcut dalga boyunda yüksek bir absorbans değerinin elde edilmesi sağlanmış olur. UV-absorbanslı iyon-çifti reaktifi (X_{UV}^-) ve UV-absorbansı olmayan zıt yüklü bir iyonik bileşik (Q^+), organik fazda iyon-çifti oluşturarak yüksek bir UV absorbansının elde edilmesine dair temel prensip aşağıdaki gibidir (Denkert et al., 1981).



İyon-çifti ekstraksiyonunda en önemli nokta, spesifik dedektörlere (fotometrik ve fluorometrik) yüksek oranda cevap verecek iyon-çifti reaktiflerinin seçilmesidir. Çevre analizlerinde ve düşük konsantrasyonlu organik maddelerin belirlenmesinde en sık kullanılan reaktif metilen mavisi reaktifidir. Hassas ve basit bir metot olmasından dolayı metilen mavisi ile iyon çifti ekstraksiyonu yaklaşık 30 yıldır çevre analizlerinde kullanılmaktadır (Schmitt, 1992).

Protonlanmış amin ya da kuarterner amonyum iyonu (HA^+) ve kuvvetli ya da zayıf bir asidin anyonu şeklindeki zıt iyon (X^-), sulu ve organik faz arasında dağılmış halde iyon-çifti oluştururlar. Organik fazda iyon-çifti oluşumu aşağıdaki formülde özetlenmiştir;

T.C. YÖKSEK ÖĞRETİM
BİLİMİNE



Bu ekstraksiyon için denge sabiti (ekstraksiyon sabiti) :

$$K_{ex (HAX)} = [HAX]_{org} / [HA^+]_{aq} \cdot [X^-]_{aq}$$

Ekstraksiyon sabiti ($K_{ex (HAX)}$), HA^+ ve X^- iyonlarının ve organik çözücünün özelliklerine göre değişiklik gösterir. Çizelge 2.1'de tetrabutilamonyum katyonunun kloroformda çeşitli anyonlarla ekstraksiyonunda ekstraksiyon sabitleri verilmiştir (Persson and Schill, 1993). Görüldüğü gibi ekstraksiyon sabitleri geniş bir aralıkta değişiklik göstermektedir.

Çizelge 2.1 Tetrabutil amonyum iyon-çiftlerinin ekstraksiyon sabitleri. (Organik faz: kloroform)

Anyonik Bileşikler		$\log K_{ex[HAX]}$
İnorganik	Cl^-	- 0,11
	Br^-	1,29
	NO_3^-	1,39
	I^-	3,01
	ClO_4^-	3,48
Karboksilat	asetat	2,1
	fenilasetat	0,27
	3-hidroksi benzoat	- 1,54
	benzoat	0,39
	salisilat	2,42
Sülfonat	toluen-4-sülfonat	2,33
	naftalen-2-sülfonat	3,45
	antrasen-2-sülfonat	5,11
Sülfat	3-fenilpropil sülfat	4,20
	2-naftil sülfat	4,90
Boyarmadde	metil oranj	5,47
	bromotimol mavisi	8,0
	hekzanitrodifenil amin	9,6

Ekstraksiyon sabitinin değeri, alkil ve aril gruplarının sayısına göre değişiklik gösterir. Ekstraksiyon sabitinin logaritmik değeri ile metilen gruplarının sayıları arasında lineer bir ilişki vardır. Çözücü olarak kloroform ya da diklorometan kullanıldığında, ekstraksiyon sabitinin logaritmik değeri ($\log K_{ex}$), 0,5-0,6 oranında artmaktadır. Benzer korelasyonlar diğer çözücüler için de geçerlidir. Hidroksil grubunun, *orto*- pozisyonunda karboksilatlar, sülfonatlar veya sülfatlar bulunması molekülde intramoleküler hidrojen bağından dolayı ekstraksiyon sabitinin artmasına neden olur (Çizelge 2.1’de benzoik asit ve salisilik aside bakınız). Hidroksil, karboksil veya amino grupları gibi hidrofilik substituentler, organik çözücü olarak kloroalken kullanıldığında ekstraksiyon sabitini 1-2 kat düşürürler (Persson and Schill, 1993).

2.2 FENOLİK MADDELERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN İZOLASYON TEKNİKLERİ

Çevre örneklerindeki fenolik maddelerin belirlenmesinde bir çok analitik teknik kullanılmaktadır. Literatüre baktığımız zaman fenollerin tayin edilmesinde yüksek-performans sıvı kromatografisi (HPLC) (Realini, 1981), ultraviyole spektroskopisi (UV) ile birleştirilmiş kapiler elektroforez (CE) (Martinez at al., 1996), floresans tekniği (Su et al., 2001), elektrokimyasal sıvı kromatografisi (Galceran and Jauregui, 1995) en çok kullanılan teknikler olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca fenolik maddelerin türetildikten sonra gaz kromatografisi (GC) (Lamparski and Nestruck, 1978) ve birleştirilmiş gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi (GC-MS) (Helaleh et al., 2001) yöntemleriyle belirlenmesi ve yapılarının aydınlatılması son yıllarda sıkça uygulanmaktadır. Her ne kadar bu teknikler fenollerin tayin edilmesinde tek tek ya da birleştirilmiş halde kullanılsa da bir ön konsantre etme basamağına mutlaka ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için kromatografik analiz öncesi çevre örneklerinden fenolik maddelerin uygun izolasyon teknikleriyle konsantre edilmeleri gerekmektedir.

2.2.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Su örneğinin, ayırma hunisi kullanılarak organik bir çözücü ile çalkalanması esasına dayanan ekstraksiyon tekniğidir. Bu teknikte, kullanılacak çözücünün seçimi son derece önemlidir. Örneğin fenolik maddelerin sulu ortamdan ekstraksiyonunda kullanılan organik çözücüde, fenollerin yüksek çözünürlüğe sahip olması gerekmektedir. Ayrıca suyla düşük oranda karışması ve ekstraksiyon sonrası çözücünün kolay uzaklaştırılması için kaynama noktasının düşük olması aranan özelliklerdir.

Doğal sulardan fenollerin ekstraksiyonunda değişik çözücüler kullanılmaktadır. Petrol eteri, benzen ve kloroform gibi çözücüler pentaklorofenol ve trimetilfenol gibi yüksek substitue fenollerin kantitatif ekstraksiyonu için uygun çözücüler olarak belirlenmiştir. N-butilasetat ve izo-amilasetat fenoller, krezoller ve klorofenoller için uygun ekstraksiyon çözücüleridir. (Afghan et al., 1989)

2.2.2 Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Yüksek molekül ağırlıklı, suda az çözünen ve polar grup içermeyen organik maddeler dip çamurları, taşlar ve suda yaşayan canlı organizmalar üzerinde birirmektedir. Bu türden katı maddelerin üzerinde biriken organik maddelerin izolasyonları genellikle sokslet cihazı kullanılarak yapılmaktadır.

Sokslet cihazı içinde organik çözücünün bulunduğu balon, gövde ve geri soğutucudan oluşan silindirik bir çember şeklindedir. Katı numune kartuş içine konularak gövdenin içine yerleştirilir. Balonda kaynayan çözücü soğutucuda yoğunlaşarak katı numunenin üzerine damlar ve sonra sifon yaparak balonun içine akar. İşlem böylece istenildiği kadar devam ettirilir.

Bu teknik kullanılarak topraktan ve balık dokuları üzerinden klorofenoller ve fenoksi asitler (Renberg, 1974), karmaşık yapıda halojenli organik bileşikler (Vetter et al., 2001) ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca yalıtımda, ahşapların korunmasında ve makinaların yağlanması için kullanılan ve toksik özelliğe sahip

polikloronaftalenler de sokslet ekstraksiyonuyla ekstrakte edilerek analiz edilebilmektedir (Meijer et al., 2001).

Bu yöntemde de diğerlerinde olduğu gibi kullanılacak organik çözücünün seçimi oldukça önemlidir. Kullanılacak çözücünün seçiminde dikkat edilecek hususlar diğer ekstraksiyon yöntemlerindekiyle benzerlik göstermektedir. Bu teknikte hekzan, dietileter ve diklorometan (DCM) gibi değişik çözücü sistemlerinden fenolik maddeler için en uygun olan çözücü DCM'dir (Helaleh et al., 2001).

2.2.3 Katı-Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda çok fazla çözücünün ve zamanın harcanması, ayrıca bu yöntemle suda yüksek çözünürlüğe sahip polar maddelerin analizlerinin düşük verimle yapılmasından dolayı daha pratik, ekonomik, seçici ve hassas teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda, sıvı-sıvı ekstraksiyonuna alternatif olarak geliştirilen katı-faz ekstraksiyonu tekniğine büyük ilgi vardır. Bu teknikte su numunesi, içinde 100-500 mg adsorban madde bulunan tek kullanımlık kolondan geçirilir. Daha sonra adsorban üzerinde tutunan madde uygun bir organik çözücüyle geri kazanılarak analiz edilir.

Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken önemli noktalar, analizi yapılacak olan maddenin bazı fizikokimyasal özelliklerine göre uygun adsorbanın ve çözücünün belirlenmesidir. En çok kullanılan adsorbentler alkil bağlı silikalar, apolar kopolimerler ve karbon esaslı adsorbentlerdir. Polar bileşikler için C₁₈ olarak adlandırılan oktadesil silikalar ve grafit gibi karbon esaslı adsorbentler, apolar bileşikler için ise polistiren-divinil benzen kopolimeri en çok kullanılan adsorbentlerdir (Pichon, 2000).

2.2.4 Katı-Faz Mikro Ekstraksiyonu

Katı-faz mikro ekstraksiyonu ilk olarak Pawliszyn ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve önerilmiştir (Belardi and Pawliszyn, 1989; Eisert et al.'dan, 1996).

En temel izolasyon metotlarından olan sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sokslet ekstraksiyonu, uygulanması çok zaman alıcı ve çok miktarda organik çözücü gerektirmesinden dolayı, daha basit ve ekonomik bir yöntem olan katı-faz mikro ekstraksiyon tekniği ile yer değiştirmiştir. Katı-faz mikroekstraksiyon tekniği iki adımda uygulanır. İlk adımda iğne ucuna sarılmış bir polimerik zarın sulu çözeltiye daldırılmasıyla analiz edilecek maddenin adsorbsiyonu ve ikinci adımda da maddenin polimerik zardan ayrılarak gaz kromatografisine enjekte edilmesi şeklindedir. Polar olmayan bileşikler için üstün bir seçicilik gösteren polidimetil silioksan zarları bu amaçla kullanılan zarlardır. 85 µm poliakrilat polimerik lifler kullanılarak yüksek polariteye sahip fenoller ve pestisitler katı-faz mikro ekstraksiyon yöntemiyle analiz edilebilmektedir (Eisert et al., 1996).

2.2.5 İyon-Değiştirme Kromatografisi

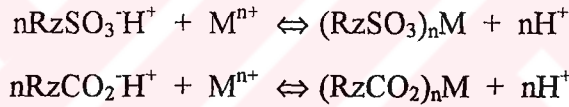
İyon değiştirme temel olarak çözünmez bir katı ile çözeltinin etkileşimi sayesinde iyonlar arasındaki değişime dayanan bir yöntemdir. Doğal ya da sentetik bir çok madde iyon değiştirici gibi davranmaktadır. Sentetik iyon değiştirici reçineler ilk olarak 1935 yılında üretilmiş ve laboratuvarlarda ve endüstriyel alanda geniş olarak kullanılmıştır.

Sentetik iyon değiştirici reçineler, her bir molekülünde iyonik bir fonksiyonel grup içeren yüksek molekül ağırlıklı polimerik maddelerdir. Analitik kimyada temel olarak dört tip iyon değiştirici reçine kullanılmaktadır. Bunlar Çizelge 2.2’de özetlenmiştir (Christian, 1994).

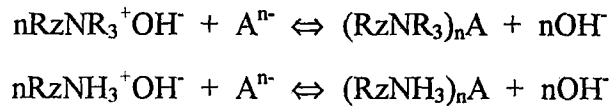
Çizelge 2.2 İyon-değiştirici reçine türleri.

Değiştirici şekli	Fonksiyonel grup	Ticari isim
Kasyon		
Kuvvetli asit	Sülfonik asit	Dowex 50; Amberlite IR120
Zayıf asit	Karboksilli asit	Amberlite IRC50
Anyon		
Kuvvetli baz	Quaterner amonyum iyonu	Dowex 1 ; Amberlite IRA400
Zayıf baz	Amin grubu	Dowex 3 ; Amberlite IR45

Kasyon değiştirici reçineler, aromatik halkaya bağlı asidik fonksiyonel gruplar içerir. Kuvvetli asit kasyon değiştiriciler sülfonik asit gruplarına, zayıf asit kasyon değiştiriciler karboksilli asit gruplarına sahiptirler. Bu gruplar üzerindeki protonlar diğer katyonlarla yer değiştirebilir. İyon değiştirme reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir. Rz, reçineyi ifade etmektedir.



Anyon değiştirici reçineler, kuvvetli baz grupları (kuarterner amonyum grupları) ve zayıf baz grupları (amin grupları) içermektedir. İyon değiştirme reaksiyonları aşağıda gösterilmiştir. R, genellikle metil olan organik grupları, Rz de reçineyi ifade etmektedir (Christian, 1994).



İyon değiştirici reçineler, endüstride kullanışlı materyallerin geri kazanılmasında, su analizlerinde ve çevre çalışmalarında geniş olarak kullanılmaktadır. İyon değiştirme yöntemi düşük konsantrasyondaki spesifik iyonların ayrılmasında ve konsantre edilmesinde destilasyon, ekstraksiyon ve kristalizasyon yöntemlerine göre daha üstündür ve bu amaçla da son yıllarda anyon-değiştirici reçineler, organik anyonların uzaklaştırılmasında, saflaştırılmasında ve geri kazanılmasında kullanılan bir metot olmuştur.

Sulu faz ve reçine fazı arasındaki iyon dağılımı, iyon-değiştirici reçine ile iyon arasındaki kombinasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bir iyon-değiştirici reçine herhangi bir spesifik iyonu diğer iyonlara göre daha kuvvetli tutar. Örneğin kükürt içeren iyon-değiştirici reçine cıva iyonunu kuvvetlice adsorbe eder. İyon-değiştirici reçine seçimi yapılırken ve kullanılmadan önce bazı adsorbsiyon parametrelerinin test edilmesi gerekmektedir (Kanazawa et al., 2001).

2.3 FENOLLERİN GAZ KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZLERİNDE KULLANILAN TÜRETME REAKSİYONLARI

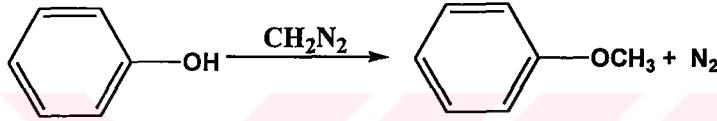
Gaz kromatografik analizlerde kullanılan türetme reaksiyonlarının temel nedeni uçucu olmayan bileşiklere uçuculuk kazandırmaktır. Molekülde N-H, O-H ve S-H gibi polar grupların bulunması, moleküller arası çekimin kuvvetlenmesine ve bu da uçuculuğun azalmasına yol açmaktadır. Özellikle birden fazla polar grup içeren bileşiklerde hidrojenin alkil, asetil ve silil gruplarıyla yer değiştirmesi uçuculuğu artırmaktadır. Oluşan bu uçucu bileşikler kolaylıkla gaz kromatografisiyle analiz edilmektedir.

Bazı durumlarda, örneğin düşük molekül ağırlıklı aminlerin analizlerinde yüksek uçuculuklarından dolayı problemler yaşanmaktadır. Dolayısıyla türetme reaksiyonları bazen de uçuculuğu azaltmak için kullanılmaktadır. Bazı bileşikler ise gaz kromatografisinde ısıl bozunmaya uğramaktadır. Türetme reaksiyonlarının uygulanmasıyla daha kararlı bileşiklerin oluşması ve kromatografik performansın artırılması sağlanmaktadır. Ayrıca polar bileşikler, kolonların iç yüzeylerine tutunma eğiliminde olduklarından istenmeyen piklerin çıkmasına neden olmaktadır. Bu tür etkilerin ortadan kaldırılması amacıyla gaz kromatografik analiz öncesi türetme reaksiyonları uygulanmaktadır (Knapp, 1979).

Fenoller de polar grup içerdiklerinden dolayı gaz kromatografik analizlerinden önce türetme reaksiyonlarına tabi tutulmaları gerekmektedir. Fenoller için en çok kullanılan türetme reaksiyonları alkilleme, asetilleme ve silillendirme reaksiyonlarıdır.

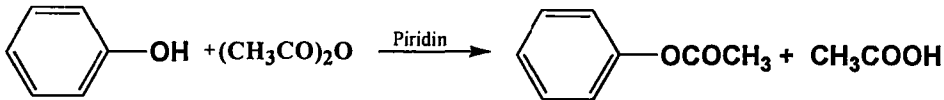
2.3.1 Fenollerin Alkil Türevleri

Kullanılan en temel alkilleme reaktifleri diazoalkanlar, tetraalkilamonyum hidroksitler ve dimetilformamid dialkilasetallerdir. Nötral ortamda reaksiyonun gerçekleşmesi ve N_2 'den başka yan ürünün oluşmamasından dolayı diazometan aktif hidrojen içeren bileşiklerin metillenmesinde geniş olarak kullanılmaktadır. Diazometan genellikle *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluen sülfonamidin (diazald), KOH ile reaksiyonu sonucu oluşur ve dietileter içerisinde toplanır. Diazometan gazı oldukça toksiktir ve 90°C 'nin üzerinde patlayıcı özellik gösterir (Glastrup,1998).



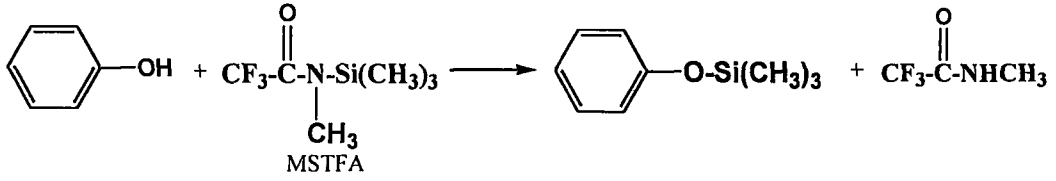
2.3.2 Fenollerin Asetil Türevleri

Asetilleme fenollerin türetilmesinde kullanılan diğer bir reaksiyondur. Asetil türevleri asetik anhidrit, asetik halojenür ve amid türü reaktiflerle piridin ve tetrahidrofuran gibi çözücüler içerisinde oluşturulur ve yan ürün olarak asit oluşur. Oluşan yan ürün kolonu tahrip edebileceğinden dolayı analizden önce ortamdan uzaklaştırılmalıdır (Knapp, 1979).



2.3.3 Fenollerin Silil Türevleri

Silil türevleri, aktif hidrojene sahip OH, SH ve NH gibi gruplar üzerinde oluşturulur. Trimetil silil türevlerinin oluşturulmasında en çok kullanılan reaktifler trimetil klorosilan , hekzametil disilazan, *N*-metil-*N*-trimetil silil asetamid ve *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifloro asetamittir (MSTFA). Silil türevleri neme karşı oldukça duyarlıdır (Knapp, 1979).



BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 KULLANILAN CİHAZLAR

3.1.1 UV Spektrofotometresi

Fenolik maddelerin spektrofotometrik olarak belirlenmesi amacıyla yapılan iyon-çifti ekstraksiyonlarından elde edilen organik fazlara ait spektrumlar UNICAM marka UV/Vis spektrofotometresi kullanılarak elde edildi. Analizlerde kuvars hücreler kullanıldı.

3.1.2 Gaz Kromatografisi

UNICAM-610 marka GC-FID kullanıldı.

Kolon (sabit faz) : RSL 150, 30 metre, 0,25 mm i.d. , %100 dimetilpolisiloksan (apolar) kapiler kolon, 0,3 µm film kalınlığı

Sıcaklık programı : 60°C (4 dak) – 4°C/dak – 290°C (10 dak)

Enjektör bloğu sıcaklığı: 175°C

Detektör bloğu sıcaklığı: 270°C

Enjeksiyon miktarı: 1 µL

3.1.3 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

FİNNİGAN marka GC-MS kullanıldı. Kolon: 60 metre, DB5

Sıcaklık programı: 100°C(1dak) – 4°C/dak – 290°C(10dak)

Enjektör bloğu sıcaklığı: 175°C, iyon kaynağı sıcaklığı: 170°C

Tarama aralığı ve oranı: 50-100 m/z ve 1 tarama/saniye

İyonlaşma voltajı ve akımı: 70 eV ve 350 µA

3.1.4 pH metre

Sulu çözeltilerin pH larının ayarlanmasında ORİON marka cam elektrotlu pH metre kullanıldı.

3.2 NUMUNELERİN TOPLANMASI

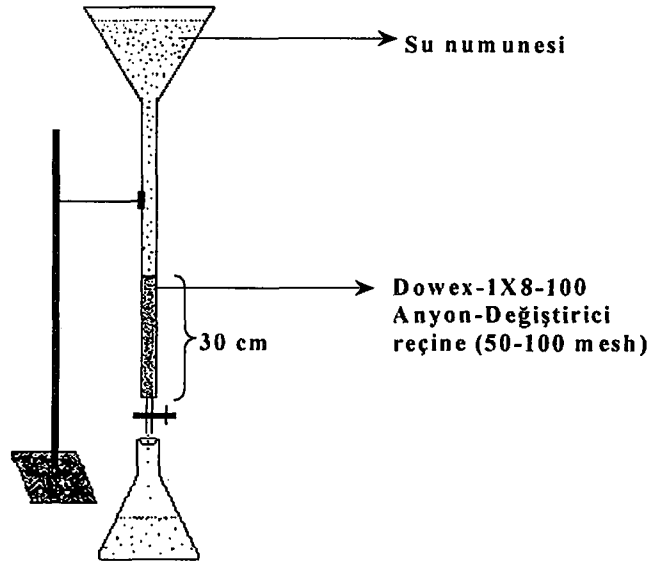
Zonguldak bölgesinden deniz suyu, nehir suyu ve dip çamuru örnekleri toplanarak analizleri yapıldı. Ayrıca Zonguldak içme suyunun büyük bir bölümünü karşılayan Ulutan Barajı'ndan da ham su ve klorlanmış su örnekleri alındı.

Su örnekleri, 2,5 litrelik kahverengi cam şişeler kullanılarak alındı ve analiz edileceği güne kadar buzdolabında bekletildi. Dip çamuru örnekleri ise karanlıkta ve oda sıcaklığında kurutulup havanda dövülerek un haline getirildi ve renkli kavanozlar içerisinde buzdolabında analiz edileceği güne kadar bekletildi.

3.3 DENEYSEL İŞLEMLER

3.3.1 Anyon Değiştirici Reçine ile Yapılan Ekstraksiyonlar

Su numuneleri, Dowex-1X8-100 (50-100 mesh) kuvvetli bazik anyon değiştirici reçine ile ekstrakte edilerek analiz edildi. Reçine, Şekil 3.1'de görüldüğü gibi bir kolonun içerisine yerleştirildi. Saf suyla ve metanolle uzun bir süre yıkandıktan sonra, reçine 100 mL 1M NaCl çözeltisi ile aktive edildi. Kolondan 250 mL saf su geçirilerek fazla NaCl ortamdan uzaklaştırıldı. Su numunelerinin pH'sı kolondan geçirilmeden önce NaH_2PO_4 ve 0,1 N NaOH kullanılarak 9'a ayarlandı. NaH_2PO_4 , sabit bir pH değerinin sağlanması için tampon olarak her 250 mL çözelti için 3 g (0,01M) kullanıldı. Ardından su numunesi kolondan geçirildi (4 mL/dak).



Şekil 3.1 Su numunelerinin anyon-değiştirici reçine ile izolasyonlarına ait deneysel düzenek.

Su numunesi kolondan geçirildikten sonra, reçine üzerinde tutunan anyonik maddeler 50 mL asitli metanol çözeltisi (1mL der. HCl / 50 mL metanol) ile geri alındı. Metanol fazı yaklaşık 5 mL kalana kadar kurutulduktan sonra saf suyla 50 mL'ye seyreltildi. 1 g NaHCO_3 ilave edilerek çözeltinin pH'sı 9'a ayarlandı. 100 μL asetik anhidrit ve 1mL n-hekzan ilave edilerek çözelti ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi 2 kez tekrarlanarak toplanan hekzan fazları susuz Na_2SO_4 ile kurutularak N_2 gazı altında 1 mL'ye kadar uçuruldu. Ardından fenolik maddelerin asetil türevlerini içeren hekzan fazının GC-MS analizleri yapıldı.

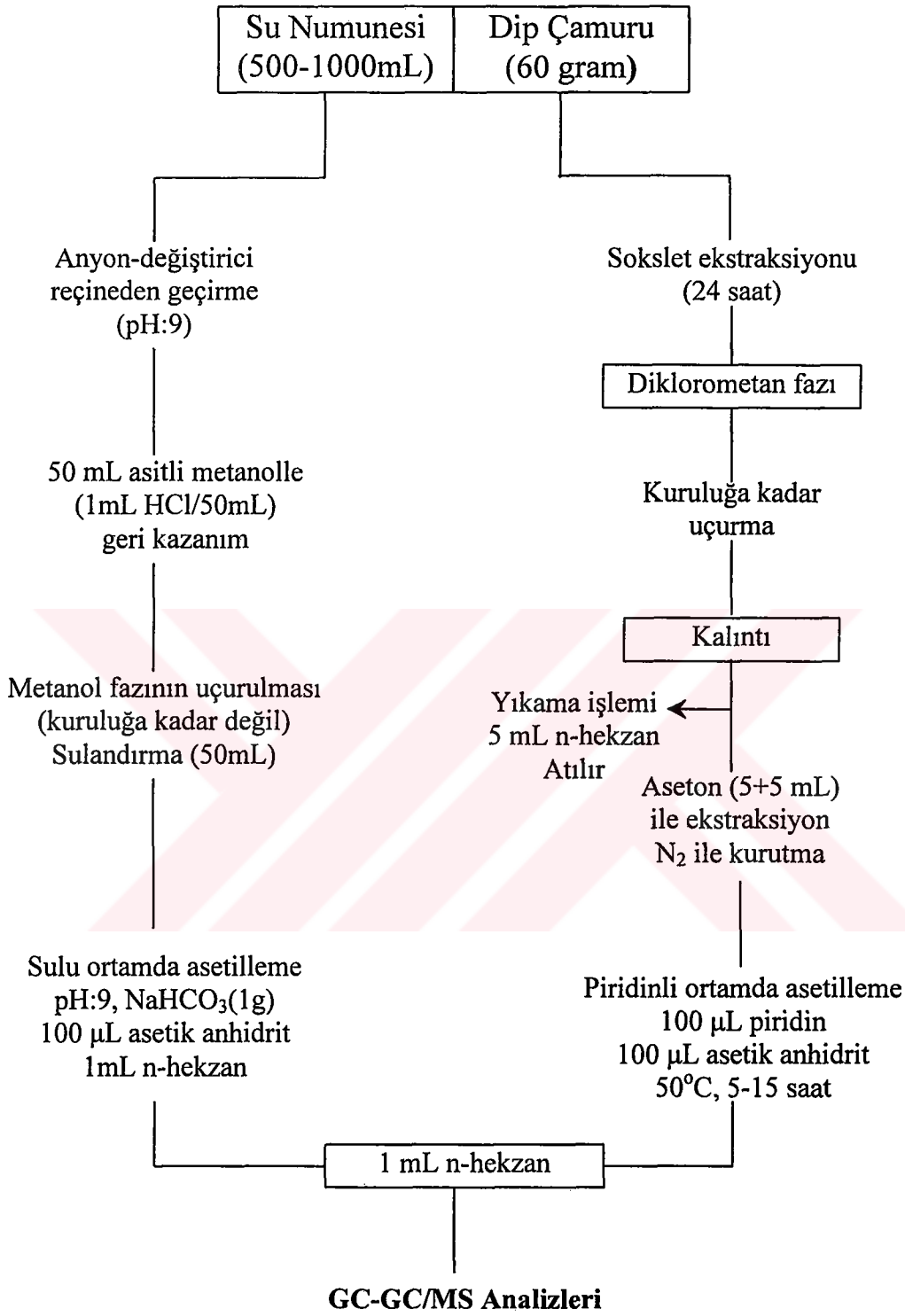
Sulu çözeltide fenollerin doğrudan asetillenmesi reaksiyonunda pH'nın etkisi son derece önemlidir. Yüksek pH'larda asetik anhidritin hidrolizi, fenollerin asetillenmesinden daha hızlı gerçekleşmektedir. Düşük pH'da ise türetme reaksiyonunun verimi oldukça düşüktür. Değişik pH'larda bazı klorofenoller asetil türevlerine dönüştürülmüş ve en uygun pH, 9 olarak bulunmuştur. Ayrıca tampon olarak karbonat, bikarbonat ve fosfatların kullanılması asetilleme verimini çok fazla değiştirmemektedir. Ancak deniz suyundaki fenollerin asetil türevlerine dönüştürülmesinde karbonat tamponunun kullanılması tercih edilebilir. Çünkü fosfat tamponunun kullanılmasıyla oluşabilecek çökelti asetillemeyi etkilemektedir (Abrahamsson and Xie, 1983).

3.3.2 Dip Çamuru Örneklerinin Analizleri

Zonguldak bölgesinden toplanan dip çamurları havada kurutulduktan sonra, havanda dövülerek toz haline getirildi. 60 gram toz halindeki numune kartuş içerisine dolduruldu. Numune, çözücü olarak metanol ve DCM kullanılarak 24 saat sokslet ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Ekstraksiyon sırasında DCM saatte 5 kez sifon yapacak şekilde ayarlandı.

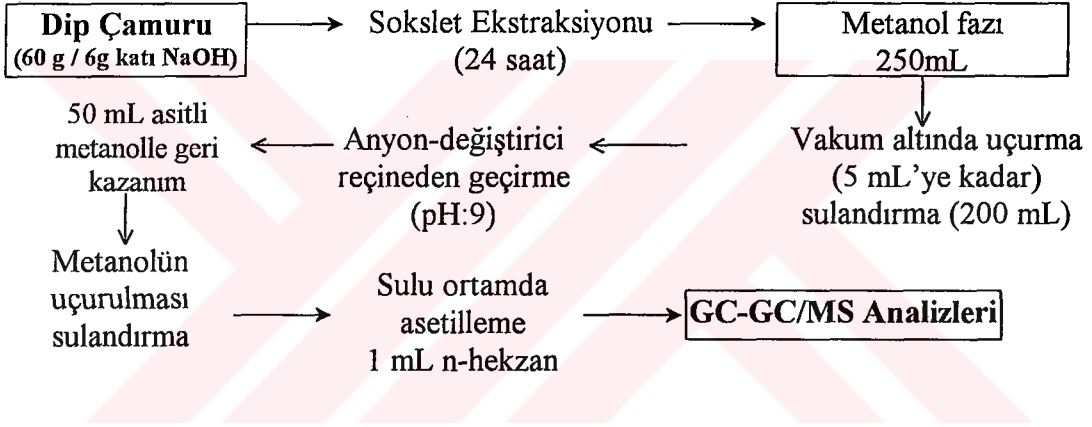
Ekstraksiyonun ardından DCM, vakum altında (30°C'de) kuruluğa kadar uçuruldu. Ardından kalıntı 5 mL n-hekzan ile yıkanarak hekzan fazı atıldı. Yıkama işlemine hekzan fazında renklenme olmayana kadar devam edildi. Kalıntı 5 mL aseton ile 2 kez ekstrakte edildi ve aseton fazları toplanarak kuruluğa kadar N₂ altında uçuruldu. Aseton fazının kurutulmasından sonra geriye kalan kalıntı doğrudan piridinli ortamda asetilleme reaksiyonuna tabi tutuldu. Bu şekilde asetil türevlerine dönüştürülen fenolik maddeler hekzan fazına alınarak GC-GC/MS analizleri yapıldı.

Su numuneleri ve dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonu ve GC-MS analizlerine ait akım şeması Şekil 3.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 3.2 Su numuneleri ve dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonu ve GC-MS analizlerine ait akım şeması.

Dip çamuru örneklerinin sokslet ekstraksiyonunda çözücü olarak DCM'den farklı olarak metanol de kullanıldı. Bunun için kurutulmuş 60 g dip çamuru örneği 6 g katı NaOH ile karıştırılarak sokslet ekstraksiyonu yapıldı. Metanol fazına alınan organik maddeler metanolün vakum altında (30°C'de) uçurulmasıyla konsantre edildi (5 mL'ye kadar). Ardından 200 mL'ye kadar sulandırılıp 5 mL n-hekzan ile iki defa ekstrakte edildi. Hekzan fazları atılarak sulu kısım anyon-değiştirici reçine ile Bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi ekstrakte edilerek GC-MS analizleri yapıldı. Dip çamuru örneklerinin metanolle yapılan ekstraksiyonları ve GC-MS analizlerine ait akım şeması Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3 Dip çamuru örneklerindeki fenolik maddelerin ekstraksiyonları ve GC-MS ile analizlerine ait akım şeması.

3.3.3 Türetme Reaksiyonları

Fenolik maddelerin GC-GC/MS analizleri öncesinde asetil türevlerine dönüştürülmesi iki farklı yolla yapıldı.

Doğrudan piridinli ortamda asetilleme: Asetik anhidrit ve piridin kullanılarak çok değişik hidroksil bileşikleri farklı sıcaklıklarda ve sürelerde asetil türevlerine dönüştürülmüştür (Blau and Halket, 1993). Ayrıca asetilleme reaksiyonu, kloroform içerisinde ve 52°C'de 2-16 saat sürede gerçekleştirilmiştir (Saunders and Vanatta, 1974).

Bu yöntem, dip çamuru örneklerinden ekstraksiyonla organik faza alınan fenolik maddelerin asetil türevlerine dönüştürülmesi basamağında kullanıldı. Ağzı kapaklı cam tüpler içerisindeki kuru kalıntı üzerine 100 µl piridin ve 100 µl asetik anhidrit ilave edilerek 50°C’de 5-15 saat ısıtıldı. Reaksiyon sonunda reaktiflerin fazlası N₂ gazı altında ortamdan uzaklaştırıldı. Kalıntı 1 mL hekzan içerisinde çözüldü ve birkaç kristal susuz Na₂SO₄ ilave edilerek hekzan fazının GC-GC/MS analizi yapıldı.

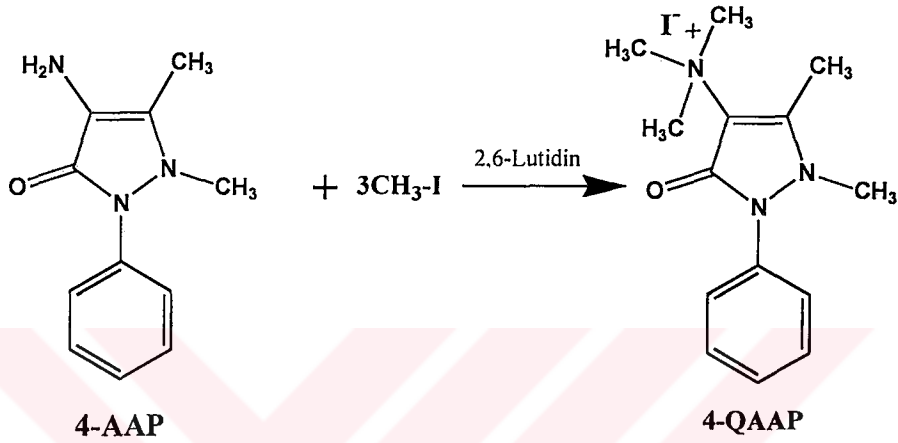
Sulu ortamda asetilleme: Bu yöntem su numunelerinin anyon-değiştirici reçine ile ekstraksiyonlarının ardından metanol fazına alınan fenollerin asetil türevlerine dönüştürülmesi basamağında kullanıldı. Metanol fazı 3 mL’ye kadar uçurulup 50 mL’ye kadar sulandırıldıktan sonra üzerine 1 gram NaHCO₃ ilave edildi. Çözeltinin pH’sı 9 yapıldıktan sonra 1mL hekzan ve 100 µl asetik anhidrit eklenerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyon işlemi 2 kez tekrarlanarak toplanan hekzan fazları susuz Na₂SO₄ ile kurutularak N₂ gazı altında 1 mL’ye kadar uçuruldu. Ardından hekzan fazına alınan fenolik maddelerin asetil türevlerinin GC-GC/MS analizleri yapıldı.

3.3.4 4-Aminoantipirinin Kuarternizasyonu

Sommer and Jackson (1969), yeni bir metotla primer ve sekonder aminlerden başlayarak, bir basamakta aminlerin kuarterner amonyum bileşiklerini sentezlemişlerdir. pKa değerleri 3,86-5,34 olan anilin ve anilin türevleri, baz olarak 2,6-lutidin (pKa: 6,77) kullanılarak kuarternize edilmiştir. Primer ve sekonder aminlerin, kuarterner amonyum tuzlarına dönüştürülmesi için genel prosedür amin bileşiğinin alkil halojenürün aşırısı ve sodyum karbonatla beraber reaksiyona tabi tutulması şeklindedir.

4-AAP’nin kuarternizasyonu Sommer ve Jackson (1969) tarafından önerilen metot kullanılarak yapıldı. Bunun için 2 gram 4-aminoantipirinin (0,00985 mol) 30 mL metanoldeki çözeltisi üzerine metil iyodür (aşırısı) ve 2,1 gram 2,6-lutidin (0,0197 mol) ilave edildi. Reaksiyon ekzotermik olduğu için reaksiyon karışımı

yaklaşık 30 dakika buz banyosu içinde soğutuldu. 4-Aminoantipirinin kuarterner amonyum tuzu (4-QAAP), reaksiyon karışımının oda sıcaklığında 24-36 saat bekletilmesiyle oluştu. Karışımın süzülüp metanolla yıkanmasından sonra beyaz-sarı kristaller halindeki 2,56 gram ürün (% 70 verim) elde edildi. Reaksiyonun mekanizması Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4 4-Aminoantipirinin kuarternizasyonu.

Oluşan ürünün saflaştırılması ve temizlenmesi için reaksiyonda kullanılacak çözücünün seçimi son derece önemlidir. Çünkü çözücü olarak aseton kullanıldığında ürün olarak sarı renkli saf olmayan bir karışım elde edildi. Bu karışım 4-QAAP ve 2,6-lutidin tuzlarını içermektedir.

3.3.5 4-QAAP in İyon-Çifti Reaktifi Olarak Kullanılması

Ekstraksiyon yapılmadan önce, kullanılacak olan çözeltiler saf su kullanılarak hazırlandı. Ekstraksiyonda kullanılan maddeler ve çözeltiler aşağıda belirtilmiştir.

4-QAAP çözeltisi: 0,1 gram 4-QAAP suda çözüldü ve balon jöje içerisinde çözelti hacmi 100 mL’ye tamamlandı. Bu çözeltiden her 250 mL’lik ekstraksiyonlarda 5’er mL kullanıldı.

NaH₂PO₄ çözeltisi: 3 gram NaH₂PO₄ 100 mL saf suda çözüldü. Bu çözeltiden her 250 mL'lik ekstraksiyon için 10 mL kullanıldı.

Fenollerin stok çözeltileri: Fenol çözeltileri, çözücü olarak aseton kullanılarak 10 ppm olacak şekilde haftalık hazırlandı ve bu süre içerisinde buzdolabında bekletildi. Bu çözeltiler kullanılarak fenollerin istenilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

Ekstraksiyonun yapılması: Erlen içerisindeki su numunesine (250-500 mL) 10 mL NaH₂PO₄ çözeltisi ilave edilerek çözeltinin pH'sı, 0,1 N NaOH ilavesiyle 9'a ayarlandı. Üzerine 5 mL 4-QAAP çözeltisi ilave edilerek çözelti ayırma hunisine alındı. Karışım 10'ar mL kloroform kullanılarak iki defa ekstrakte edildi ve toplanan kloroform fazları susuz Na₂SO₄ kullanılarak kurutuldu. Daha sonra kloroform fazının 274 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü.

Hidroliz: 10 cm boyunda ve 1 cm çapında, teflon kapaklı cam tüpler içerisindeki kloroform fazları azot gazı altında uçuruldu. Kalıntı üzerine bir damla derişik HCl damlatıldıktan sonra tüp 60⁰C'de 30 dakika ısıtıldı. Ardından HCl, azot gazı altında uçuruldu.

Türetme reaksiyonları: Cam tüp içerisindeki kuru kalıntı Bölüm 3.3.3'de belirtildiği gibi piridinli ortamda doğrudan asetilendi.

3.3.6 4-Aminoantipirin ile Yapılan Ekstraksiyonlar

Fenollerin 4-AAP ile verdiği reaksiyonları incelemek amacıyla standart fenol çözeltileri ve su numuneleri 4-AAP ile de ekstrakte edildi. Elde edilen sonuçlar, 4-QAAP ile yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Ekstraksiyonda kullanılan maddeler ve deneysel işlemler aşağıda belirtilmiştir (Rump et al., 1988).

4-Aminoantipirin çözeltisi: 2 g 4-AAP ($C_{11}H_{13}N_3O$) saf suda çözöldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

Tampon çözelti (pH:10): 34 g amonyum klorür ve 200 gram potasyum sodyum tartarat ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$) 700 mL suda çözöldü. 150 mL amonyak (%25) ilave edilerek suyla 1 L'ye tamamlandı.

Peroksidisülfat çözeltisi: 0,65 g potasyum peroksidisülfat ($K_2S_2O_8$) 1 L saf suda çözöldü.

Fenollerin stok çözeltileri: Fenol çözeltileri, çözücü olarak aseton kullanılarak 10 ppm olacak şekilde haftalık hazırlandı ve bu süre içerisinde buzdolabında bekletildi. Bu çözeltiler kullanılarak fenollerin istenilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

Ekstraksiyon işlemi: Stok çözeltilerden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki sulu çözeltilerin (250-500 mL) pH'sı 4'e ayarlandı. 0,5 g katı $CuSO_4$ ve 20 mL tampon çözelti ilave edildi. pH'nın 10 olmadığı durumlarda 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH 10'a ayarlandı. 3 mL aminoantipirin çözeltisi ve ardından 3 mL peroksidisülfat çözeltisi ilave edilerek çözelti ayırma hunisine alındı. Kısa bir süre çalkalandıktan sonra 30-60 dakika karanlıkta bekletildi. Daha sonra karışım 25 mL kloroform ile 5 dakika çalkalandı. Kloroform fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra 460 nm'deki absorpsanlar ölçöldü.

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

Çevre örneklerindeki değişik fenolik maddelerin GC-MS metoduyla belirlenmesi ve yapılarının aydınlatılmasında öncelikle bahsedilen maddelerin, sulu ortamdan anyon-değiştirici reçine ile ekstraksiyonu ve konsantre edilmesi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Öncelikle değişik yapıdaki fenolik maddeler GC-MS analizleri öncesinde asetil türevlerine dönüştürülerek her bir fenol için kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Fenolik maddeler iki farklı yöntemle asetil türevlerine dönüştürülerek, her iki yöntemle elde edilen verimler hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Daha sonra bilinen konsantrasyondaki çözeltiler anyon-değiştirici reçine ile ekstrakte edilerek % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

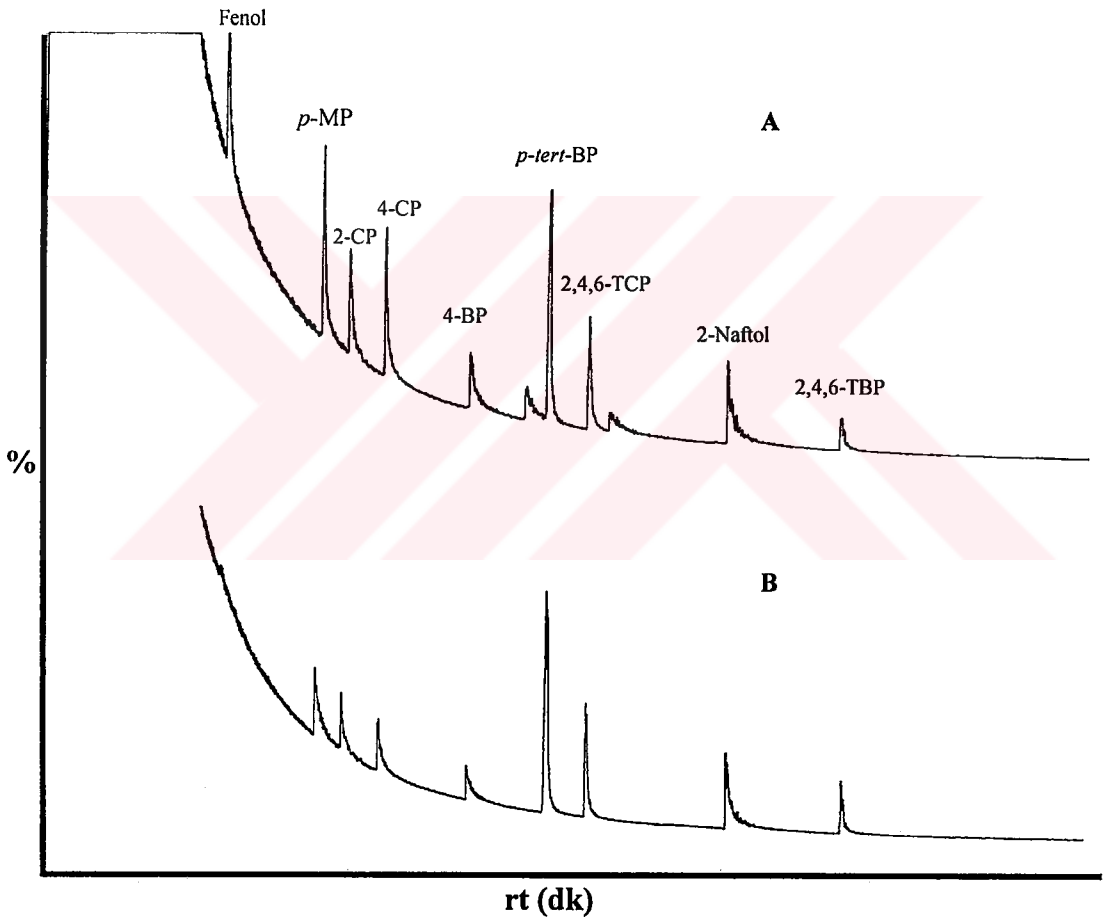
Bu çalışmada ayrıca 4-AAP'nin NH_2 grubu CH_3I ile kuarternize edilerek oluşan 4-AAP'nin kuarterner amonyum tuzunun fenolik maddelerin belirlenmesinde iyon-çifti reaktifi olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

Deneysel çalışmalardan elde edilen tüm deneysel sonuçlar ve açıklamalar Bölüm 4.1'de verilmiştir. Bölüm 4.2'de ise sonuçların genel bir değerlendirilmesi verilmiştir.

4.1 DENEYSEL SONUÇLAR

4.1.1 Fenolik Maddelerin Asetillenmesi

Fenolik maddeler sulu ortamda ve doğrudan piridinli ortamda asetil türevlerine dönüştürülerek GC kromatogramları alınmıştır. Fenollerin sulu ortamda ve doğrudan piridinli ortamda asetillenmesi ile ilgili yöntemler ayrıntılı olarak Bölüm 3.3.3’de ve elde edilen GC kromatogramları da Şekil 4.1’de verilmiştir.



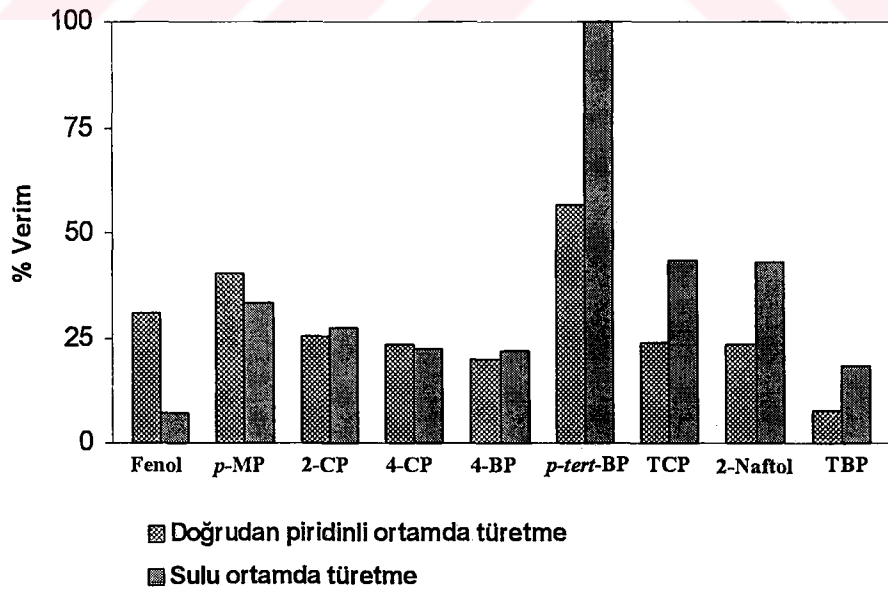
Şekil 4.1 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin GC kromatogramları. (A) Doğrudan piridinli ortamda türetme. (B) Sulu ortamda türetme. Her bir fenolün miktarı 50 µg (*p*-MP: *p*-metilfenol, 2-CP: 2-klorofenol, 4-CP: 4-klorofenol, 4-BP: 4-bromofenol, *p*-tert-BP: *p*-tert-butilfenol, 2,4,6-TCP: 2,4,6-triklorofenol, 2,4,6-TBP: 2,4,6-tribromofenol).

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi her bir fenol farklı oranlarda asetil türevlerine dönüşmüştür. Sulu ortamda yapılan türetme işleminde *p- tert*-butilfenolün asetillenme verimi %100 kabul edilerek diğer fenoller buna göre hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Fenollerin iki farklı yoldan elde edilen asetil türevlerinin yüzde verimleri (Her bir fenol eşit miktarda ve 50µg’dır. *p-Tert*-butilfenolün verimi %100 kabul edilmiştir).

Deney sayısı (n): 4, s.s:standart sapma, dk: dakika

Fenoller (Asetil türevleri)	Alıkonma zamanı (dk)	Piridinli ortamda türetme % Verim(s.s)	Sulu ortamda türetme % Verim(s.s)
fenol	5,42	30,9(4,0)	6,9(1,5)
<i>p</i> -metilfenol	8,16	40,6(6,9)	33,5(4,9)
2-klorofenol	8,91	25,1(4,1)	27,2(3,7)
4-klorofenol	9,90	23,3(5,5)	22,3(3,6)
4-bromofenol	12,32	19,8(6,8)	21,8(2,0)
<i>p-tert</i> -butilfenol	14,35	56,4(4,7)	100,0(10,9)
2,4,6-triklorofenol	15,50	23,7(3,8)	43,4(4,8)
2-naftol	19,60	23,4(5,4)	42,7(5,5)
2,4,4-tribromofenol	22,51	7,8(0,3)	18,0(2,0)



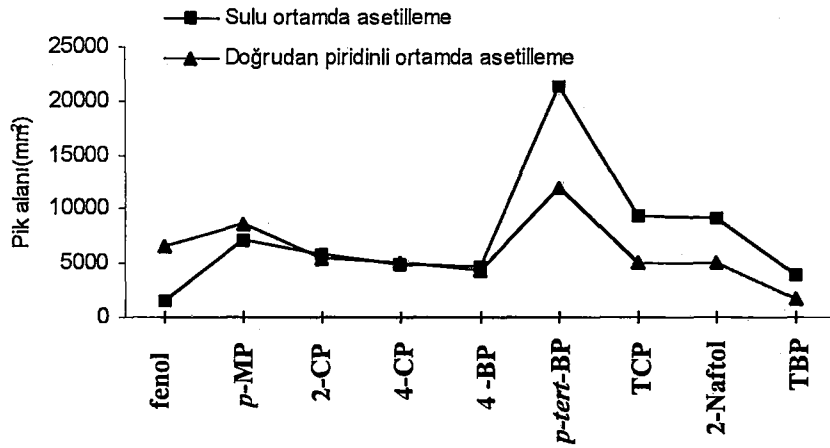
Şekil 4.2 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin % verimleri (Her bir fenolün miktarı 50 µg’dır. *p*-MP: *p*-metilfenol, 2-CP: 2-klorofenol, 4-CP: 4-klorofenol, 4-BP: 4-bromofenol, *p-tert*-BP: *p-tert*-butilfenol, TCP: 2,4,6-triklorofenol, TBP: 2,4,6-tribromofenol).

Elde edilen bu sonuçlara göre, her bir fenol asetillenme reaksiyonuna pozitif cevap vermektedir. Genel olarak fenolik maddelerin sulu ortamda asetillenmesi, piridin varlığında yapılan asetilemeye oranla daha yüksek verimle gerçekleşmiştir. Fenol ve *p*-metilfenol gibi bazı fenolik maddeler ise piridinli ortamda daha yüksek verimle asetillenmiştir.

Her bir fenolün farklı oranlarda asetillenmesi kantitatif olarak tayin edilmelerinde bir engel oluşturmamaktadır. Çünkü her bir fenol için farklı kalibrasyon grafikleri hazırlanmış ve miktar analizleri bu grafikler kullanılarak yapılmıştır.

2- ve 4-nitrofenoller için de aynı türetme reaksiyonları uygulanmış ancak elde edilen verimler diğer fenollerden elde edilenlere oranla çok daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla nitrofenollerin GC/MS metoduyla tayin edilmesinde asetileme reaksiyonunun kullanılması durumunda verimin çok düşük olabileceği, dolayısıyla düşük konsantrasyonlar için yeterli olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.3’de fenolik maddelerin hem sulu ortamda hem de doğrudan piridinli ortamda oluşturulan asetil türevlerinin GC analizlerinden elde edilen pik alanı değerleri verilmektedir.



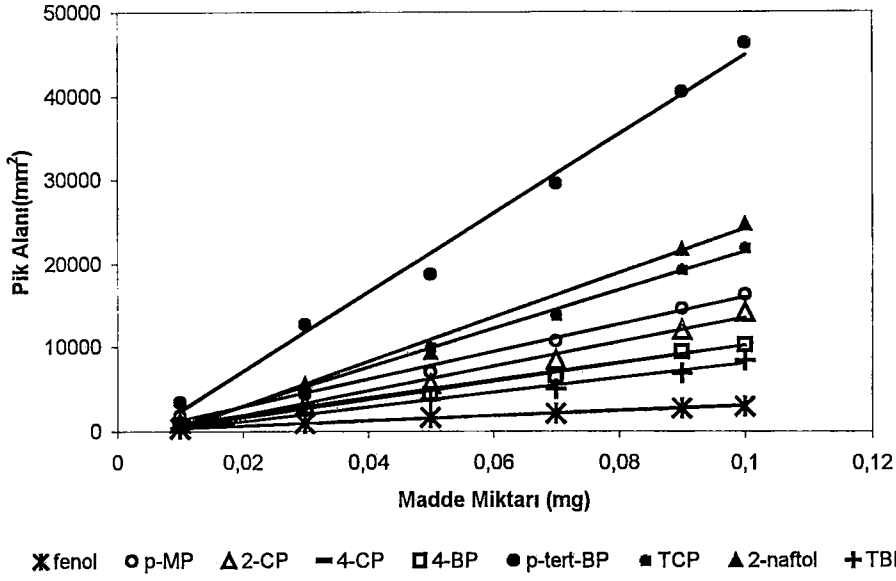
Şekil 4.3 Fenollerin iki farklı yolla elde edilen asetil türevlerinin GC analizlerinden elde edilen pik alanı değerlerinin karşılaştırılması (Her bir fenol eşit miktarda ve 50µg’dır).

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi her bir fenol eşit miktarda alınmasına rağmen farklı oranlarda asetil türevleri oluşmaktadır. Elde edilen sonuçlar, fenol ve *p*-metilfenol hariç diğer fenollerin sulu ortamda daha yüksek verimle asetillendiğini göstermektedir.

4.1.2 Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Değişik miktarlardaki (10-100 µg) her bir fenol, 50 mL suya ilave edilerek Bölüm 3.3.3’de belirtildiği gibi sulu ortamda asetik anhidrit ile türetilmiş ve GC analizleri yapılmıştır. GC analizlerinden elde edilen kromatogramlardan her bir fenol için pik alanları hesaplanmış ve madde miktarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Her bir fenol için ayrı ayrı çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4’de verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.4’de verilen grafikteki her bir fenol için hesaplanan kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (r^2) Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Su numunelerinin anyon-değiştirici reçine ile ekstraksiyonlarının ardından, reçine üzerindeki fenolik maddeler 50 mL asitli metanolle geri alınmaktadır (Bölüm 3.3.1’e bakınız). Bu nedenle kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması için fenol çözeltileri 50 mL suda hazırlanmıştır.



Şekil 4.4 Fenolik maddelerin sulu ortamda asetil türevlerine dönüştürülmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiği.

Çizelge 4.2 Fenolik maddelerin sulu ortamda (50mL) asetil türevlerine dönüştürülmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğine ait denklemler ve r^2 değerleri [y: pik alanı (mm^2), x: madde miktarı (mg)].

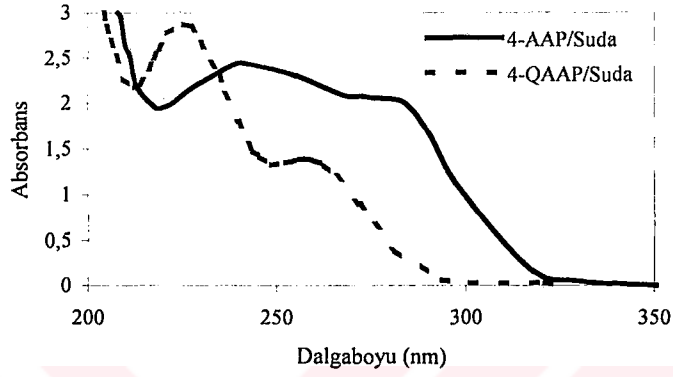
Fenoller (Asetil türevleri)	r^2	Denklem
fenol	0,9980	$y = 29133x + 45,9$
p-metilfenol	0,9964	$y = 162712x - 431,5$
2-klorofenol	0,9936	$y = 144604x - 1073,9$
4-klorofenol	0,9980	$y = 103600x - 217,1$
4-bromofenol	0,9965	$y = 107591x - 645,6$
p-tert-butilfenol	0,9957	$y = 472628x - 2443,6$
2,4,6-triklorofenol	0,9975	$y = 230987x - 1729,2$
2-naftol	0,9959	$y = 265766x - 2449,3$
2,4,6-tribromofenol	0,9959	$y = 85829x - 657,2$

4.1.3 Fenollerin Sulu Ortamdan İzolasyonları

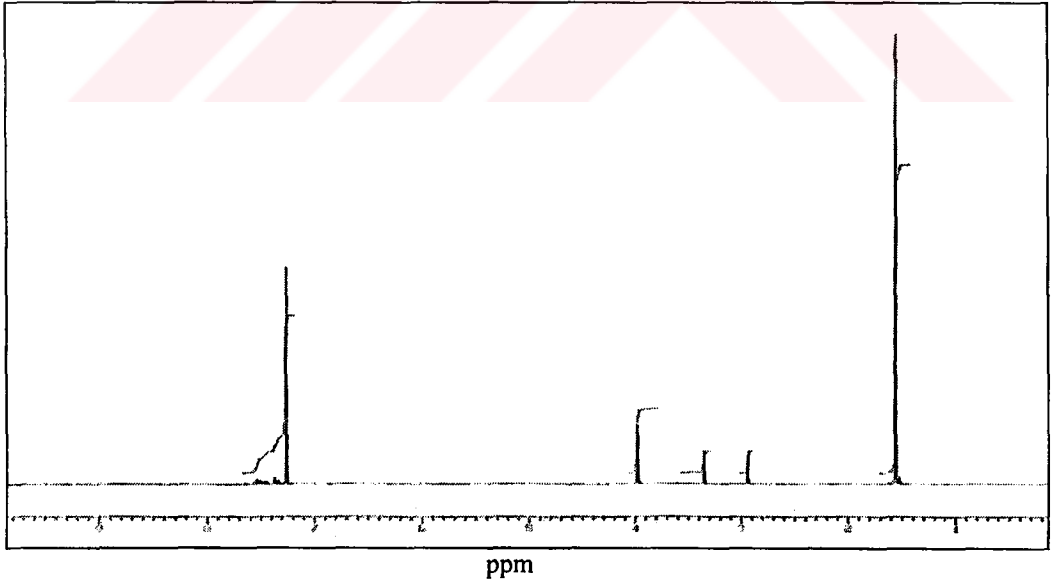
Fenollerin sulu ortamdan izole edilmesinde iyon-çifti ekstraksiyonu ve anyon-değiştirme teknikleri kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak 4-AAP'nin amino grubu kuarternize edilmiş ve elde edilen 4-QAAP'nin, fenollerin tayin edilmesinde bir iyon-çifti reaktifi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

4.1.3.1 4-QAAP'nin UV, ^1H -NMR, MS ve FTIR Spektrumları

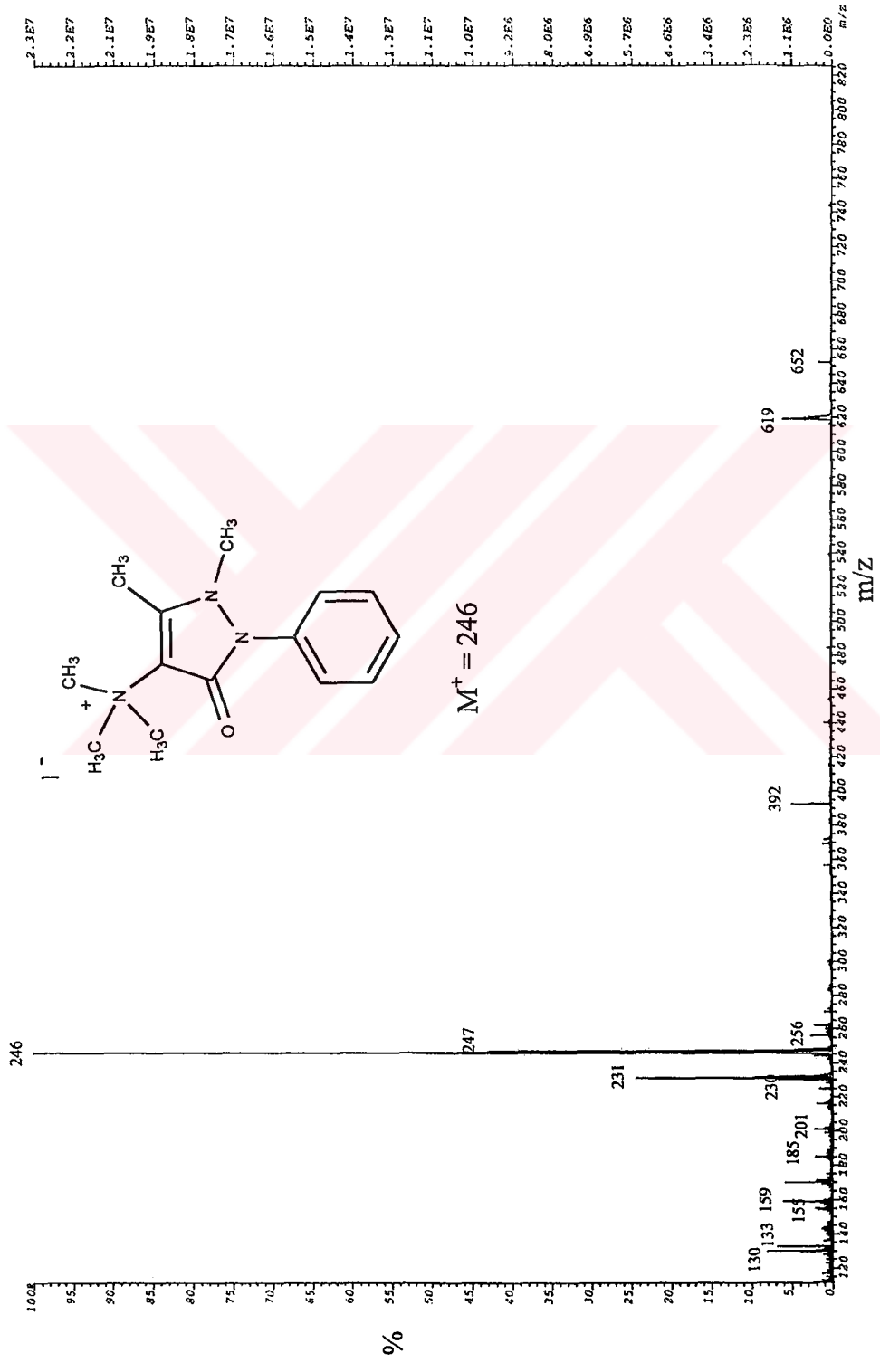
4-AAP'nin kuarternizasyonundan elde edilen 4-QAAP'nin UV, ^1H -NMR, MS ve FTIR spektrumları Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.5 4-AAP ve 4-QAAP'nin sulu çözeltilerinin UV spektrumları.



Şekil 4.6 4-QAAP bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu (270MHz, Çz: CDCl_3).

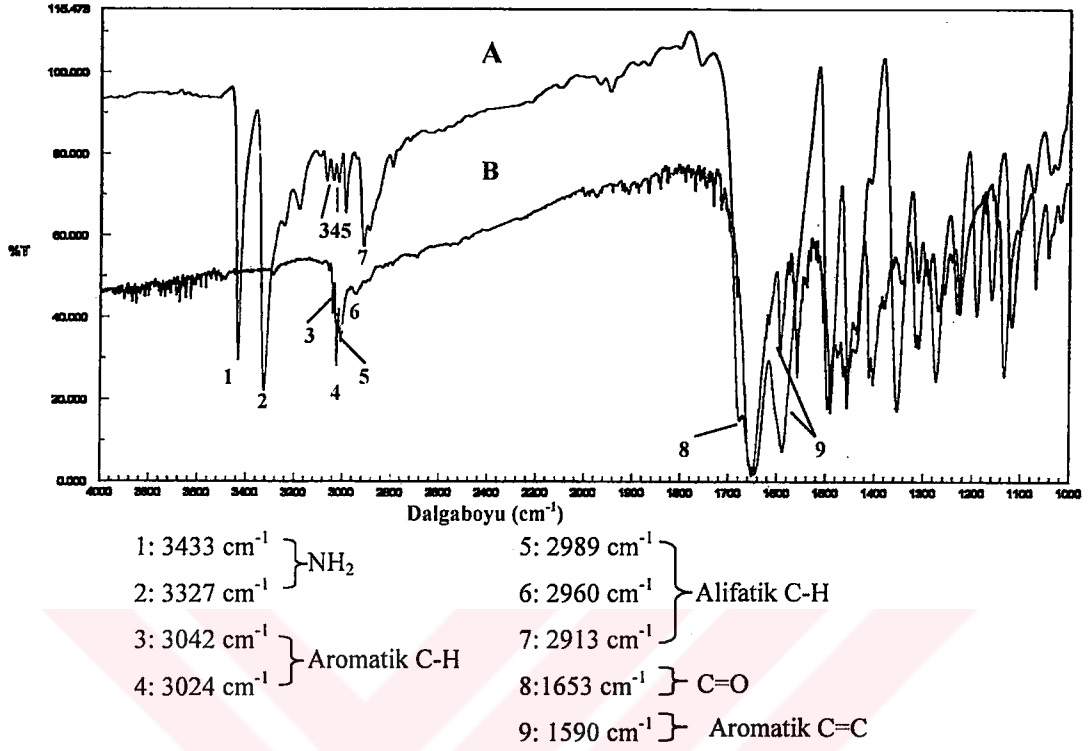


Şekil 4.7 4-QAAP bileşiğinin kütle spektrumu.

Şekil 4.5’de 4-AAP ve 4-QAAP’nin sulu çözeltilerinin UV spektrumları verilmiştir. 4-AAP için $\lambda_{\max}$ değeri 241 nm ve 4-QAAP için $\lambda_{\max}$ değeri 226 nm’dir. Elde edilen bu spektrumlardan bileşiklerin yapısı hakkında bilgi edinmemiz mümkün değildir. Çünkü iki bileşiğin aynı olması için UV spektrumlarının çakışabilir olması ve $\lambda_{\max}$ değerlerinin aynı olması yeterli bir kanıt değildir. Çünkü iki benzer bileşiğin UV analiz sonuçları aynı çıkabilir. Bununla beraber iki bileşiğin aynı olması için FTIR spektrumlarının aynı olması gerekli ve yeterli bir kanıttır.

Şekil 4.6’da, 4-QAAP’nin ^1H -NMR spektrumunu incelediğimiz zaman $\delta=1,5$ ppm’de moleküldeki azot atomlarına bağlı metil gruplarına ait pik singlet olarak görülmektedir ($4\text{CH}_3=12\text{H}$). Karbon atomuna bağlı diğer metil grubuna ait pik ise $\delta= 4$ ppm’de görülmektedir ($\text{CH}_3=3\text{H}$). Benzen halkasındaki aromatik hidrojenler ise $\delta= 7,2$ ppm’de ortaya çıkmıştır ($\text{C}_6\text{H}_5=5\text{H}$).

Şekil 4.7’de, 4-QAAP’nin hızlı atom bombardımanı (FAB) tekniği ile yapılan analizinden elde edilen kütle spektrumu verilmiştir. FAB, kütle spektrometresinde iyonlaştırma tekniklerinden bir tanesidir ve daha çok polar bileşiklerin molekül kütlesinin bulunması amacıyla kullanılmaktadır. Şekil 4.7’de 4-QAAP’nin FAB tekniği ile elde edilen kütle spektrumunda tuzun katyonu, temel pik (m/z : 246) olarak gösterilmiştir.

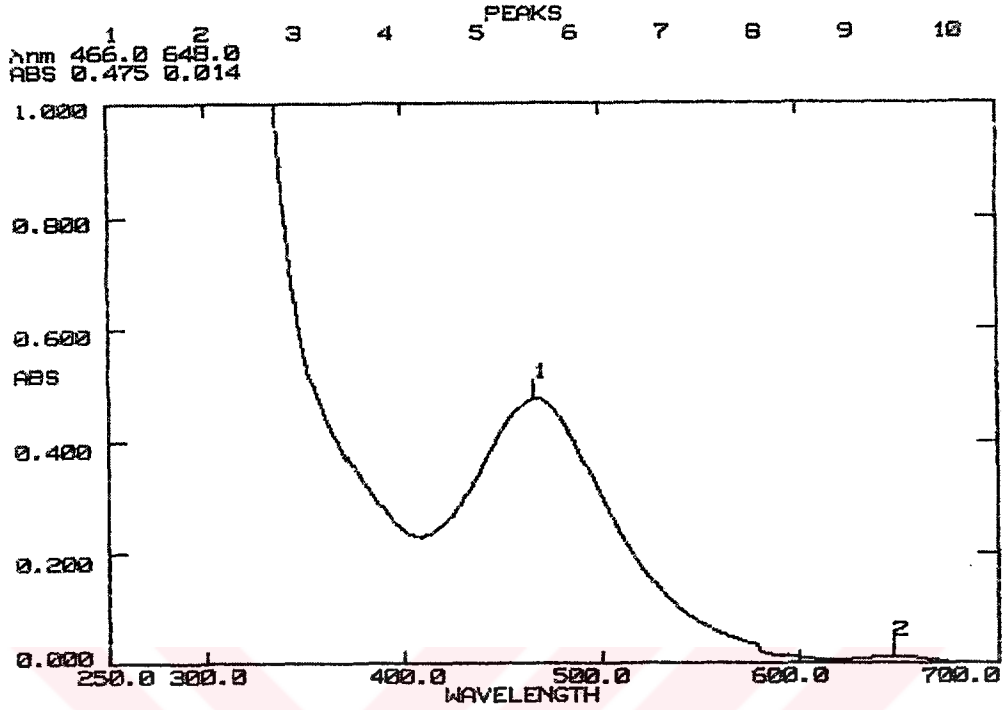


Şekil 4.8 4-AAP ve 4-QAAP'nin FTIR spektrumları. (A: 4-AAP, B: 4-QAAP)

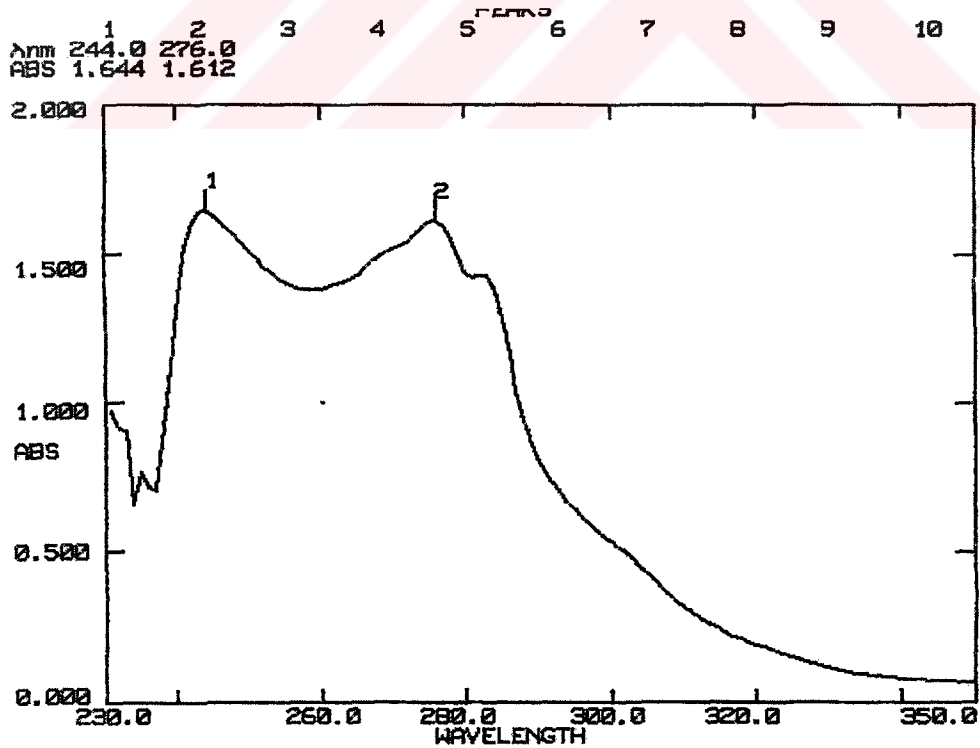
4-AAP ve 4-QAAP'nin FTIR spektrumlarına baktığımız zaman, 3327 ve 3433 cm⁻¹'deki şiddetli çift amin bandının kuarternizasyondan sonra kaybolduğunu görmekteyiz. Bunun dışında her iki molekülün yapısında da bulunan aromatik C-H, C=C, alifatik C-H ve C=O fonksiyonlu gruplara ait bantlar Şekil 4.8'deki spektrumlarda görülmektedir.

4.1.3.2 Fenollerle Oluşturulan Bileşikler ve UV Spektrumları

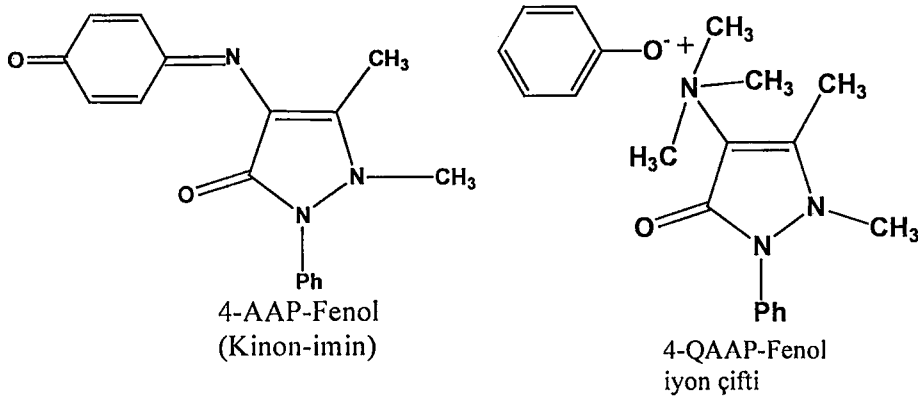
Fenollerin, 4-AAP ve 4-QAAP ile verdiği reaksiyonları incelemek amacıyla Bölüm 3.3.5 ve 3.3.6'da verilen deneysel işlemler kullanılarak Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da UV spektrumları verilen ve Şekil 4.11'de de kimyasal yapıları gösterilen bileşikler elde edilmiştir.



Şekil 4.9 4-AAP ile fenol arasındaki reaksiyondan elde edilen kinon-imin bileşiğine ait UV spektrumu. (Çz:CHCl₃, fenol: 1 ppm)



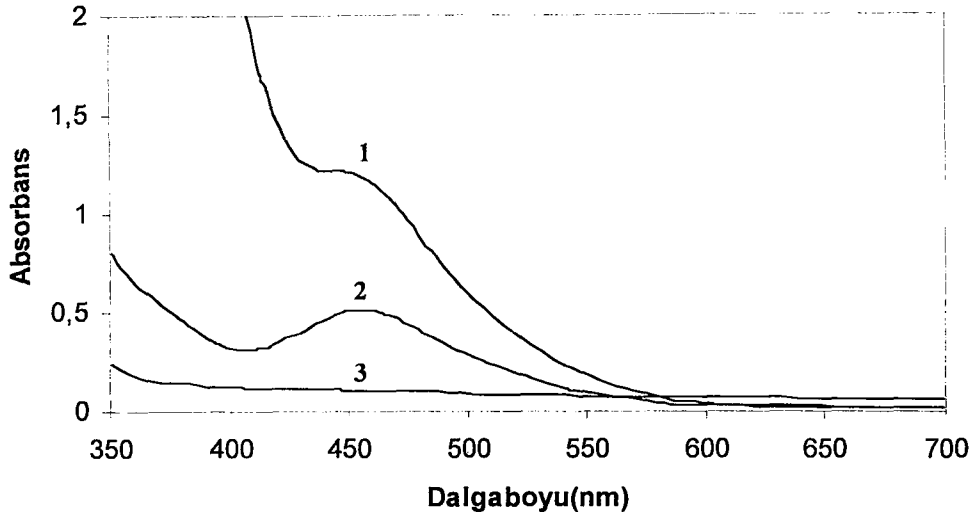
Şekil 4.10 4-QAAP ile fenol arasındaki reaksiyondan elde edilen iyon-çifti bileşiğine ait UV spektrumu. (Çz:CHCl₃, fenol: 1 ppm)



Şekil 4.11 4-AAP ve 4-QAAP ile fenolik bileşiklerin reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin kimyasal yapıları.

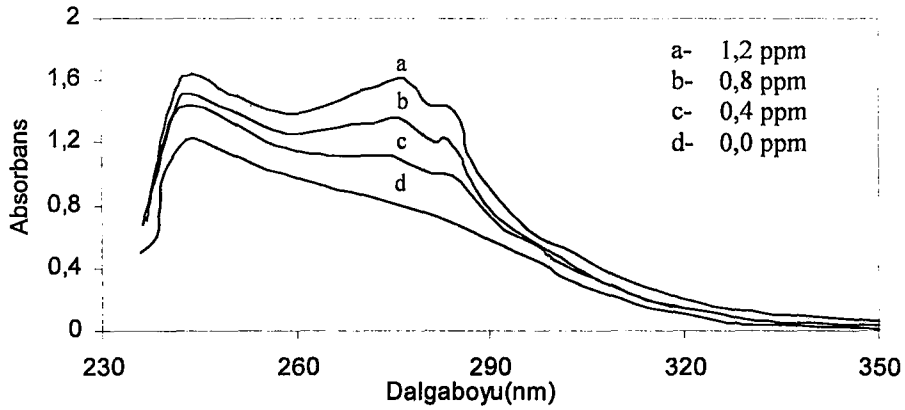
Şekil 4.11’de, oluşan ürünlerin kimyasal yapılarına baktığımız zaman 4-AAP ile fenoller arasında bazik ortamda oksidasyonla kinon-imin bileşiği oluşmaktadır. Oluşan ürünün 450-500 nm’de (Şekil 4.9) ölçülen absorbans değerlerinden çevre sularında toplam fenolik madde tayini yapılabilmektedir. 4-AAP’nin amino grubu kuarternize edildikten sonra ise molekülün yapısında N-H bağı olmadığı için (Şekil 4.8), oksidasyon gerçekleşmemekte ve kinon-imin bileşiği oluşmamaktadır. 4-QAAP ile fenoller arasında iyon-çifti oluşumuna dayanan bir reaksiyon gerçekleşmekte ve oluşan ürünün 276 nm’de (Şekil 4.10) ölçülen absorbans değerlerinden toplam fenol tayini yapılabilmektedir.

Şekil 4.12’de verilen UV spektrumlarında, 0,2 ppm konsantrasyonundaki fenolün 4-AAP ve sentezlenen 4-QAAP tuzu ile verdiği reaksiyonlar görülmektedir. Fenol ile 4-AAP arasında bazik ortamda boyar madde kompleksi olduğu 460 nm’deki pikten anlaşılmaktadır. Ancak 4-AAP’nin NH₂ grubunun tamamının CH₃I ile kuarternizasyonundan sonra oluşan saf kuarternier amonyum tuzunun fenol ile aynı reaksiyonu vermediği 460 nm’de herhangi bir pikin olmamasından anlaşılmaktadır. Bu da NH₂ grubunun tamamının kuarternize edildiğinin diğer bir kanıtıdır. Bu sonuç Şekil 4.8’deki FTIR spektrumuyla da desteklenmektedir. Kuarternizasyonda çözücü olarak aseton kullanıldığında ürün olarak sarı renkli saf olmayan bir karışım oluşmakta ve bu karışımın da 4-AAP ile aynı reaksiyonu verdiği görülmektedir. Dolayısıyla ortamda hala amin grubunun kaldığı anlaşılmaktadır.

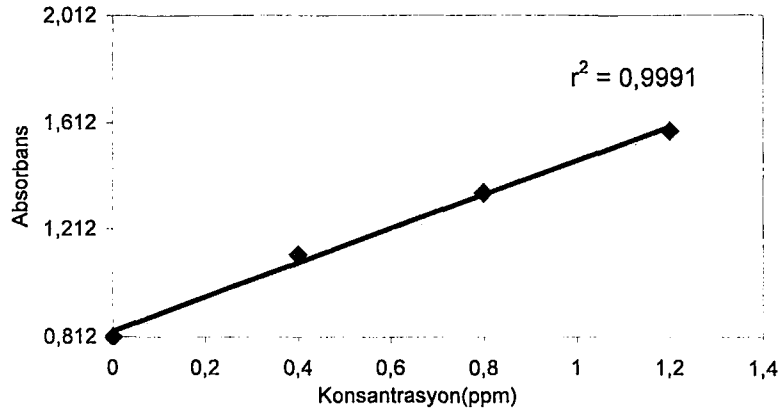


Şekil 4.12 Fenol çözeltilerinin (0,2ppm) 4-AAP (1), 4-QAAP karışımı (2) ve saf 4-QAAP (3) ile yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen UV spektrumları. (Çz: CHCl₃)

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi, 4-QAAP ortamda fenolik madde olmadan da kloroform fazına bir miktar transfer olmaktadır. Ancak fenol konsantrasyonunun artmasıyla organik faza transfer lineer olarak artmaktadır. Bu artış Şekil 4.14’de de görülmektedir.

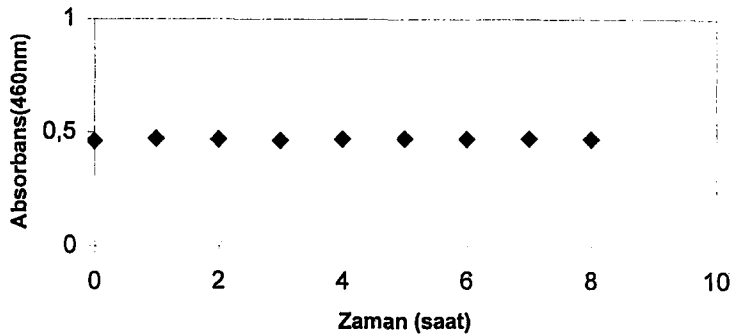


Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlardaki *p*-tert-butilfenol sulu çözeltilerinin 4-QAAP ile ekstraksiyonundan elde edilen UV spektrumları.

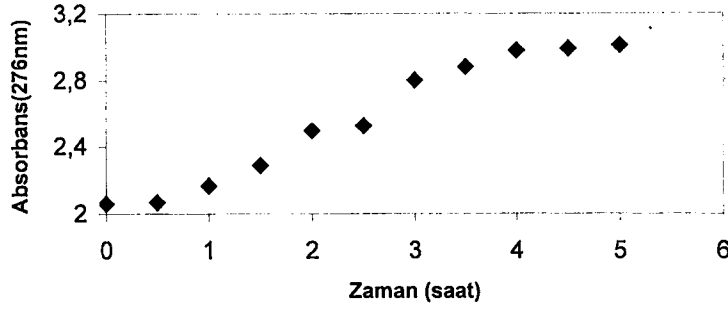


Şekil 4.14 Farklı konsantrasyonlardaki *p*-tert-butilfenol sulu çözeltilerinin 4-QAAP ile ekstraksiyonundan elde edilen kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da verilen grafiklerde 4-AAP ve 4-QAAP’nin fenol ile oluşturduğu bileşiklerin belli dalga boyundaki absorbanslarının zamanla değişimleri görülmektedir. 4-AAP ile fenoller arasında oluşan C=N bağı kuvvetli bir bağıdır ve bu nedenle de oluşan ürün kararlı bir yapıdadır. 4-AAP’nin fenolle oluşturduğu kinon-imin bileşiğinin oldukça kararlı bir yapıda olduğu ve zamanla bozunmadığı Şekil 4.15’deki grafikte görülmektedir. Ancak 4-QAAP ile fenolik maddeler arasında ise zayıf bir etkileşim söz konusudur ve dolayısıyla kararsızdır. Bu sebeple kloroform fazında oluşturulan iyon-çiftinin zamanla bozunarak ikili bir karışım oluşturacağı düşünülürse, 276 nm’deki absorbans değerinin de artması beklenebilir (Şekil 4.16). Dolayısıyla kantitatif tayinlerde, ekstraksiyon işleminin hemen ardından kloroform fazının UV spektrumu alınmalıdır.



Şekil 4.15 4-AAP’nin fenolle oluşturduğu kinon-imin bileşiğinin 460 nm’deki absorbansının zamanla değişimi.



Şekil 4.16 4-QAAP'nin fenolle oluşturduğu iyon-çiftinin 276 nm'deki absorbansının zamanla değişimi.

4-AAP ile sulardaki toplam fenol miktarının belirlenmesi, uzun yıllardır kullanılan standart bir metottur. Ancak bu yöntemle toplam fenol tayini yapılabildiği için fenollerin yapısı hakkında bilgi edinilememektedir. Bu nedenle 4-QAAP, fenolik maddelerin sulu ortamdan izole edilmesinde iyon-çifti reaktifi olarak kullanılmıştır. Ardından oluşan iyon-çifti asidik ortamda hidroliz edilerek fenoller asetil türevlerine dönüştürülmüş ve GC-FID ile analizleri yapılarak yapıları hakkında bilgi edinilmiştir.

Bölüm 2.1.2'de de belirtildiği gibi iyon-çifti ekstraksiyonu tekniğinin temel prensibi, UV-absorbansı olmayan iyonik bir bileşiğin UV-absorbanslı iyon-çifti reaktifi ile organik fazda iyon-çifti oluşturarak yüksek bir absorbans değerinin elde edilmesi şeklindedir. 4-AAP'nin NH_2 grubunun kuarternize edilmesiyle başlangıçta UV-absorbanslı iyon-çifti reaktifinin sentezi hedeflenmiş ve bu da başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 4-QAAP'nin 0,1-1 ppm konsantrasyonlardaki fenolik maddelerin belirlenmesinde kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Daha düşük konsantrasyonlarda yapılan deneylerde ise iyon-çifti oluşumunun çok zayıf olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada fenolik maddelerin çevre örneklerinden izolasyonlarında daha hassas bir teknik olan anyon-değiştirme kromatografisi ayrıca uygulanmıştır.

4.1.4 Anyon-Değiştirici Reçine ile Yapılan Ekstraksiyonlar

Fenolik maddelerin bulunduğu su numuneleri, Şekil 3.1'deki deneysel düzenekte görüldüğü gibi içinde anyon-değiştirici reçine bulunan bir kolondan geçirilerek ekstrakte edilmiştir. Su numunelerinin kolondan geçirilmeden önce en uygun pH'sının belirlenmesine ilişkin yapılan denemelerde sabit bir pH değeri elde edilememiştir. pH 5-10 arasında yapılan denemeler sonucunda elde edilen geri kazanım yüzdeleri pH'ya bağlı olarak düzenli değişmemektedir. pH 5-10 arasında, geri kazanım yüzdeleri 80-100 arasında değişiklik göstermektedir. Li and Lee (1997) tarafından yapılan çalışmada, fenolik maddelerin anyon-değiştirme yöntemiyle belirlenmesinde en uygun pH'nın 9,5 olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada da su numunelerinin pH'sı 9'a ayarlanarak anyon-değiştirme kolonundan geçirilmiştir.

Çözeltiler 250, 500, 1000 mL suda 50 µg madde (200, 100, 10 ppb) olacak şekilde hazırlanmış ve kolondan geçirilmeden önce çözeltilerin pH'sının sabitlenebilmesi için ortama 0,3 g (0,01M) NaH_2PO_4 ilave edilmiştir. pH'nın 9 yapılmasının ardından su numuneleri anyon-değiştirici kolondan geçirilmiştir. Su numunelerinin akış hızı 4 mL/dak. olacak şekilde ayarlanmıştır. Fenolik maddelerin reçine üzerinde birikmesiyle birlikte akış hızı zamanla azalmıştır. Reçine üzerinde tutunan maddeler asitli metanolle geri alınarak metanol fazı uzaklaştırılıp 50 mL'ye sulandırıldıktan sonra sulu fazdaki fenolik bileşikler asetik anhidrit ile türetilmiş ve ardından GC analizleri yapılmıştır.

GC kromatogramlarından okunan pik alanı değerleri, Çizelge 4.2'de verilen denklemlerde yerine konularak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Örneğin 500 mL'sinde 50 µg *p*-metilfenol içeren sulu çözeltinin (100 ppb) bahsedilen metotla yapılan analizinde okunan pik alanı değeri (y) 6846 mm² olarak bulunmuştur. Bu değer $y = 162712x - 431,5$ denkleminde yerine konulduğu zaman madde miktarı(x) 45 µg olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan madde miktarının başlangıçta suya ilave edilen madde miktarına oranından da % geri kazanım değeri (%90) hesaplanmıştır. Aynı deneyler her bir fenol için 5 defa

tekrarlanarak % geri kazanım ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Anyon-değiştirici reçine ile yapılan ekstraksiyonlara ait geri kazanım yüzdeleri. (Her bir fenolün miktarı 50 µg).
Deney sayısı(n):5, s.s: standart sapma

Fenoller (Asetil türevleri)	250 mL %Geri kazanım(s.s)	500 mL % Geri kazanım(s.s)
Fenol	99,7(9,9)	88,6(4,2)
<i>p</i> -metilfenol	88,5(5,9)	96,5(7,6)
2-klorofenol	57,4(4,4)	55,0(5,8)
4-klorofenol	102,3(6,5)	100,5(15,7)
4-bromofenol	92,9(7,1)	96,9(4,2)
<i>p-tert</i> -butilfenol	93,8(3,0)	96,1(9,6)
2,4,6-triklorofenol	85,5(4,2)	85,8(3,0)
2-naftol	86,6(7,8)	95,5(8,2)
2,4,6-tribromofenol	96,8(9,3)	94,1(8,5)

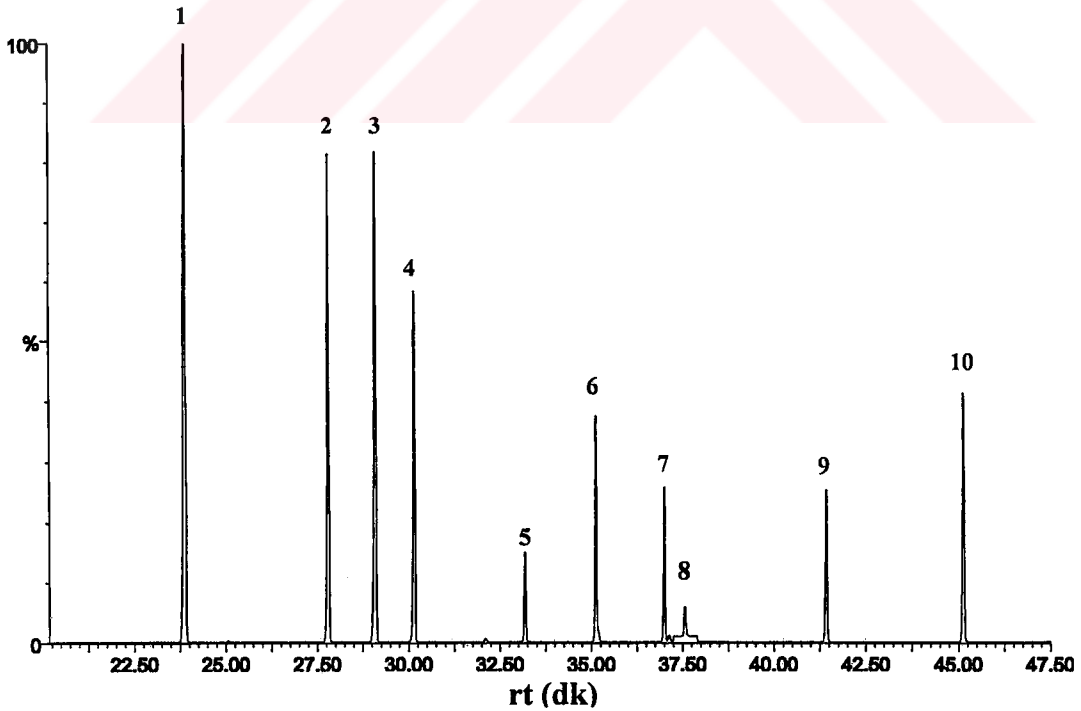
Çizelge 4.3’de, bilinen konsantrasyonlarda fenolik madde içeren sulu çözeltilerin anyon-değiştirici reçine ile ekstraksiyonunun ardından hesaplanan % geri kazanım değerleri verilmiştir. Her bir fenol için hesaplanan geri kazanım değeri yaklaşık %85-100 arasında değişiklik göstermektedir. Ancak 2-klorofenol için hesaplanan geri kazanım değeri yaklaşık % 55 civarındadır. Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi numune miktarının 250 mL’den 500 mL’ye çıkarılmasıyla geri kazanım değerleri çok fazla değişiklik göstermemektedir. Aynı işlemler 1000 mL çözelti için de yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Anyon-değiştirici reçine üzerinde tutunan fenolik maddelerin geri alınmasında kullanılacak çözücünün seçimi son derece önemlidir. Bu metotta asitli metanol (1mL der. HCl/50mL metanol) kullanılarak reçine üzerinde iyonik halde bulunan fenolik maddelerin moleküler hale geçerek metanol fazına alınması sağlanmıştır. Asit ilavesinin belirtilen miktardan daha az kullanılmasıyla geri kazanım değerlerinin % 50’nin altına düştüğü gözlenmiştir. Reçineye zarar vereceği düşünülerek asit miktarının aşırısından kaçınılmıştır. Diğer bazı çalışmalarda ise asetik asit/metanol (Li and Lee, 1997), HCl/dietileter (Richard and Junk, 1984), H₂SO₄/metanol (Renberg, 1974) gibi değişik çözücü sistemleri kullanılmıştır.

Reçine üzerinde tutunan fenolik maddelerin asitli metanolle geri alınmasından sonra metanol fazı vakum altında (30°C'de) 5 mL'ye kadar uçurulmuştur. Ardından tekrar saf suyla 50 mL'ye kadar sulandırılarak asetilleme reaksiyonu uygulanmıştır. Asetilleme reaksiyonu, uçurma işlemi yapılmadan metanol ortamında da uygulanmış ancak çok düşük verim elde edilmiştir. Ayrıca metanol ortamında oluşturulan fenol türevlerinin hekzan fazına alınması sırasında, hekzanın tamamına yakını metanolle karışmıştır. Bu da hekzanın geri alınmasını ve analizin yapılmasını zorlaştırmıştır. Metanol fazının uçurulup sulandırılmasıyla bu olumsuz etkiler ortadan kaldırılmıştır.

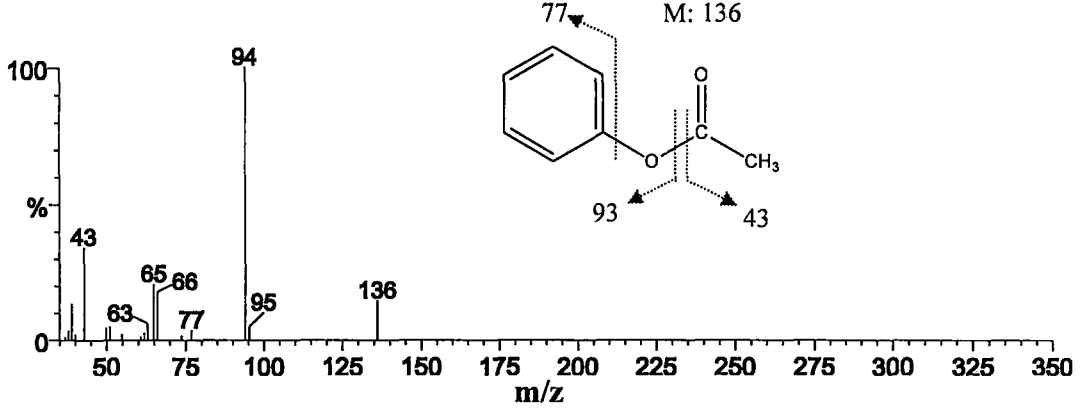
4.1.5 Standart Fenollerin GC-MS Analizleri

Değişik fonksiyonel grupları bulunan fenolik bileşiklerin asetik anhidrit ile türetilmelerinin ardından GC-MS analizleri yapılmıştır. Standart fenollerin GC-MS analizlerinden elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.17'de verilmiştir.

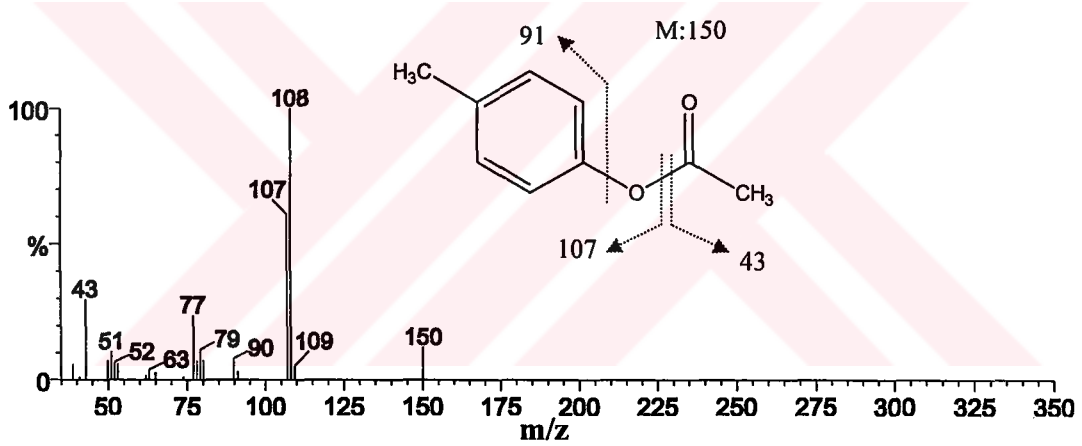


Şekil 4.17 Standart fenollerin asetil türevlerinin GC-MS kromatogramı. (1: fenol, 2: *p*-metilfenol, 3: 2-klorofenol, 4: 4-klorofenol, 5: 4-bromofenol, 6: *p*-*tert*-butilfenol, 7: 2,4,6-triklorofenol, 8: *o,p*-nitrofenol, 9: 2-naftol, 10: 2,4,6-tribromofenol).

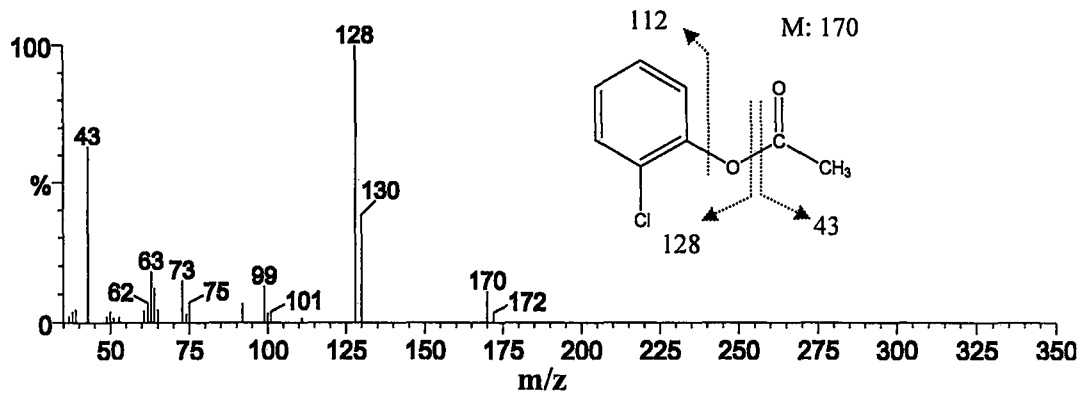
Şekil 4.17’de GC-MS kromatogramı verilen standart fenollerin asetil türevlerine ait kütle spektrumları sırasıyla aşağıda verilmiştir.



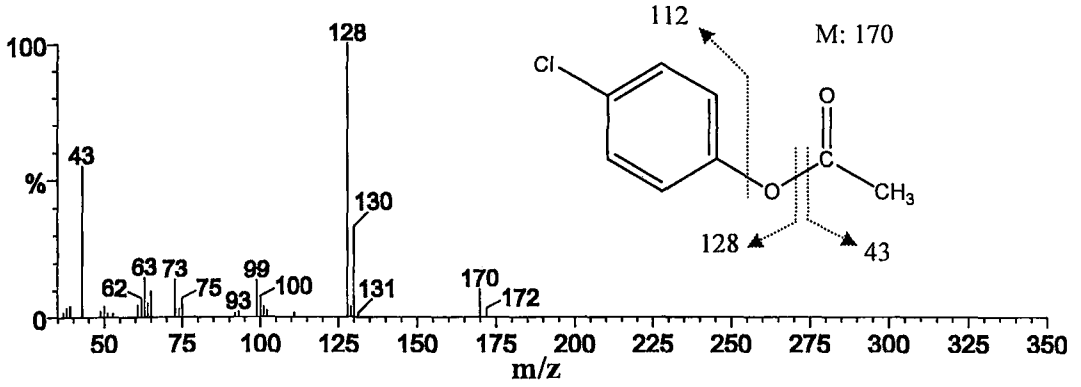
Şekil 4.18 Fenil asetatın kütle spektrumu.



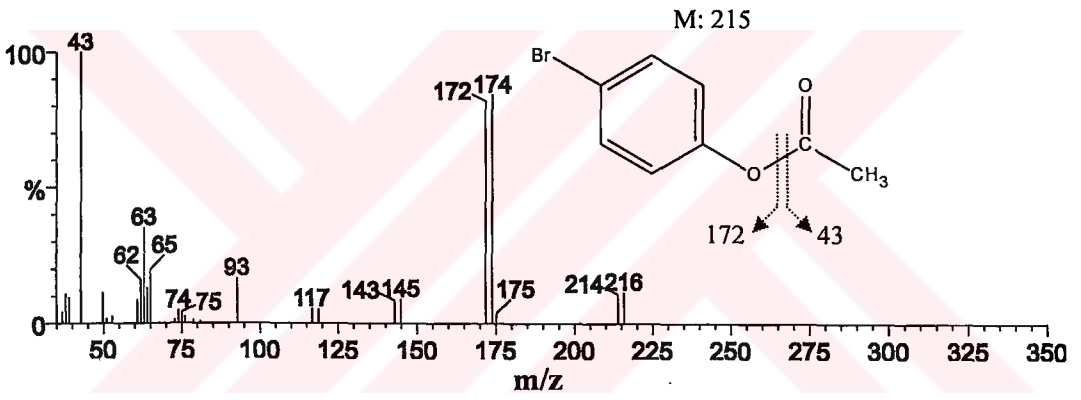
Şekil 4.19 *p*-Metilfenil asetatın kütle spektrumu.



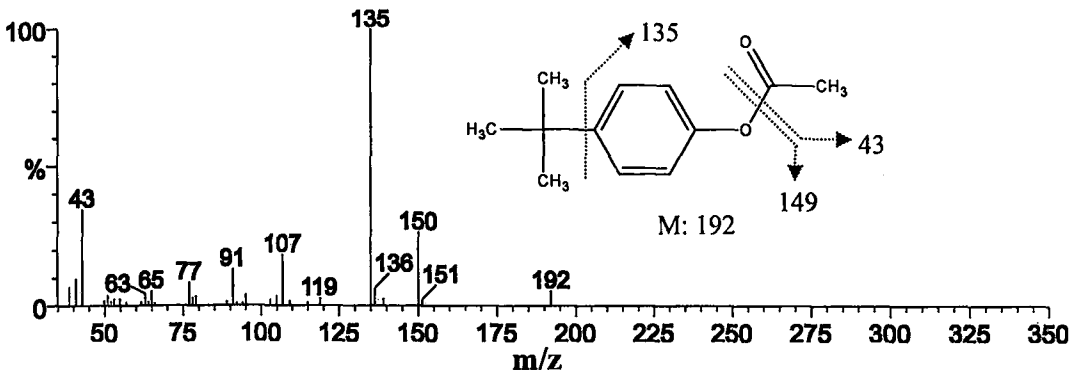
Şekil 4.20 2-Klorofenil asetatın kütle spektrumu.



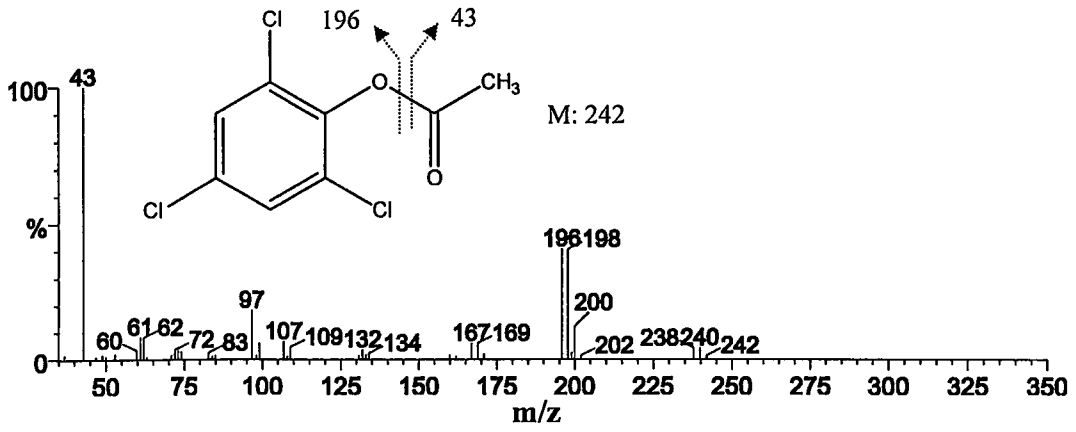
Şekil 4.21 4-Klorofenil asetatın kütle spektrumu.



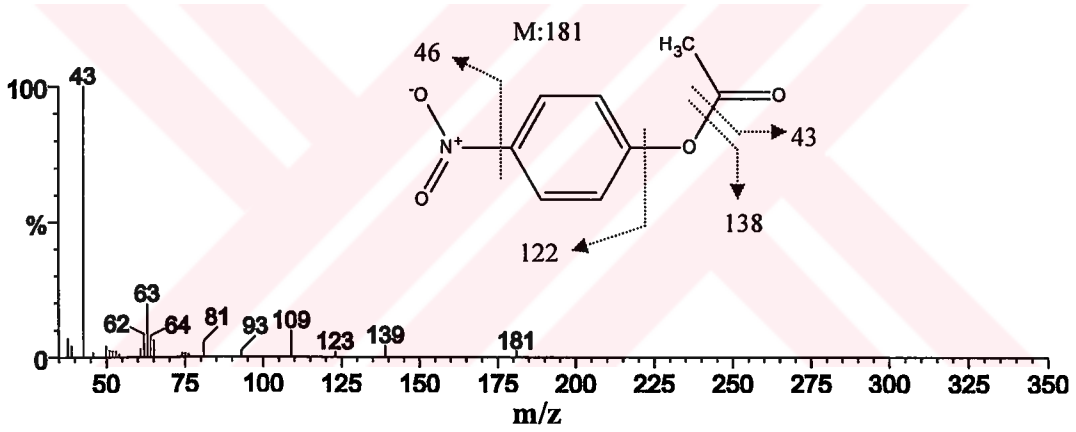
Şekil 4.22 4-Bromofenil asetatın kütle spektrumu.



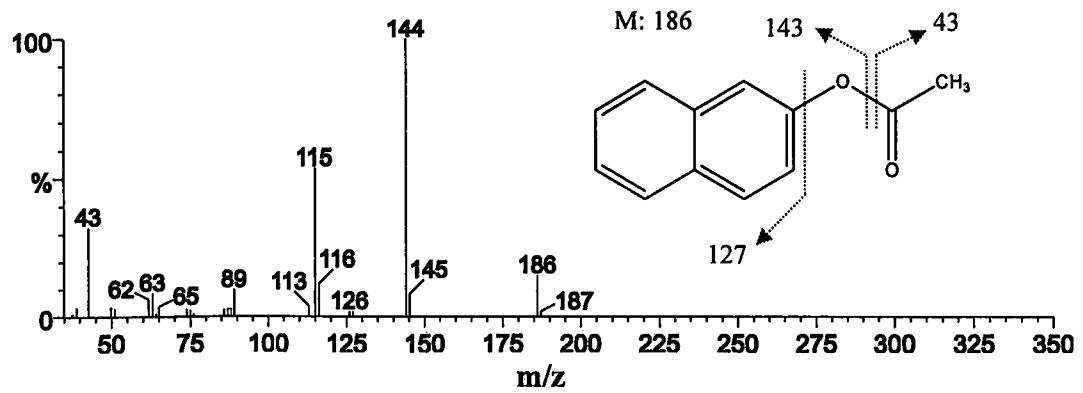
Şekil 4.23 *p*-Tert-butilfenil asetatın kütle spektrumu.



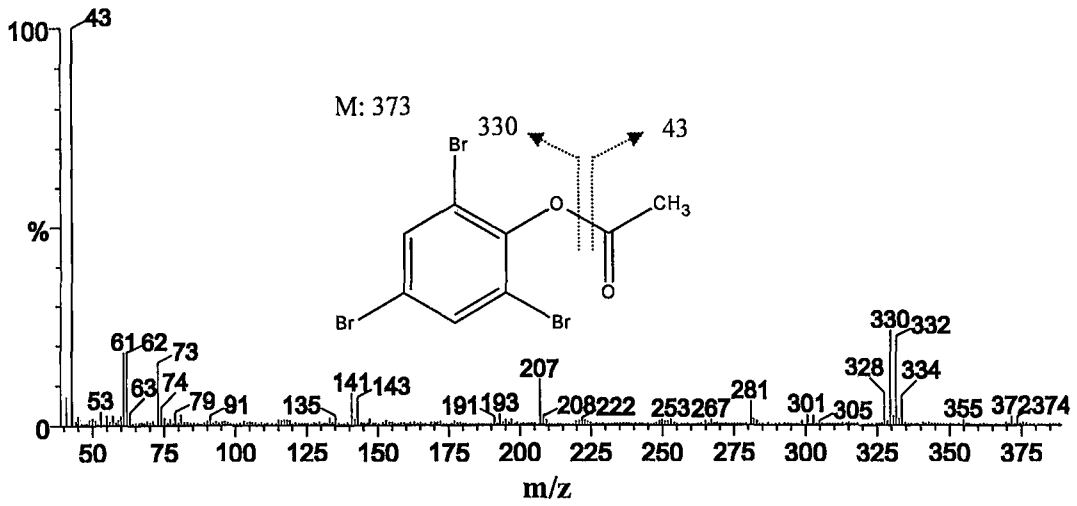
Şekil 4.24 2,4,6-Triklorofenil asetatın kütle spektrumu.



Şekil 4.25 4- Nitrofenil asetatın kütle spektrumu.



Şekil 4.26 2-Naftil asetatın kütle spektrumu.



Şekil 4.27 2,4,6-Tribromofenil asetatın kütle spektrumu.

Çizelge 4.4’de, standart olarak kullanılan fenollerin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül iyon piki (M^+) ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri verilmiştir. Kütle spektrumlarında şiddeti en fazla olan pik temel pik ve bileşiğin molekül kütlesine eşit olan pik ise M^+ piki olarak belirtilmiştir. Örneğin *p*-metil fenolün kütle spektrumunda (Şekil 4.19), temel pik 108 ve M^+ piki ise 150’dir. Esterlerde ve eterlerde M^+ pikinin şiddeti orta şiddette yada zayıftır.

Çizelge 4.4 Standart fenollerin asetil türevlerinin kütle spektrumlarındaki temel pik, molekül iyon piki ve diğer karakteristik piklerin m/z değerleri.

Fenoller (Asetil türevleri)	Temel pik	Molekül iyon (M^+) piki	Diğer karakteristik pikler
fenol	94	136	66,43
<i>p</i> -metilfenol	108	150	90,77,51,43
2-klorofenol	128	170	99,63,43
4-klorofenol	128	170	99,63,43
4-bromofenol	43	216	172,93,63
<i>p</i> -tert-butilfenol	135	192	150,91,77,43
2,4,6-triklorofenol	43	240	196,132,97,61
o,p-nitrofenol	43	181	139,109,81,63
2-naftol	144	186	115,89,43
2,4,6-tribromofenol	43	372	330,141,73,61

Bu çalışmada ayrıca fenolik maddeler için asetilleme reaksiyonunun dışında farklı türetme reaksiyonları da uygulanmıştır. Fenolik maddelerin metil eterlerine dönüştürülmesi için reaktif olarak diazometan ve silil türevleri için de MSTFA kullanılmıştır. Ancak diazometanın toksik özellik göstermesi ve hazırlanmasının zor olması, sililleme reaksiyonunda ise özel koşullara ihtiyaç duyulmasından dolayı bu reaksiyonlar tercih edilmemiştir. Blau ve Darbre (1993), fenolik maddelerdeki polar grupların asetilleme reaksiyonu ile korunabileceğini ve bunun da maddelerin kararlılığını artıracaklarını belirtmişlerdir. Ayrıca oluşan ürünlerin kararlılığı bakımından sililleme yerine asetillemenin tercih edilebileceği belirtilmiştir. Asetillemenin doğrudan sulu ortamda uygulanabilir olması bu reaksiyonun bir diğer avantajıdır. Coutts et al.(1979,1980) tarafından yapılan çalışmalarda sulu ortamdaki fenolik maddeler, asetik anhidritin doğrudan sulu ortama ilave edilmesiyle asetil türevlerine dönüştürülüp analiz edilmiştir.

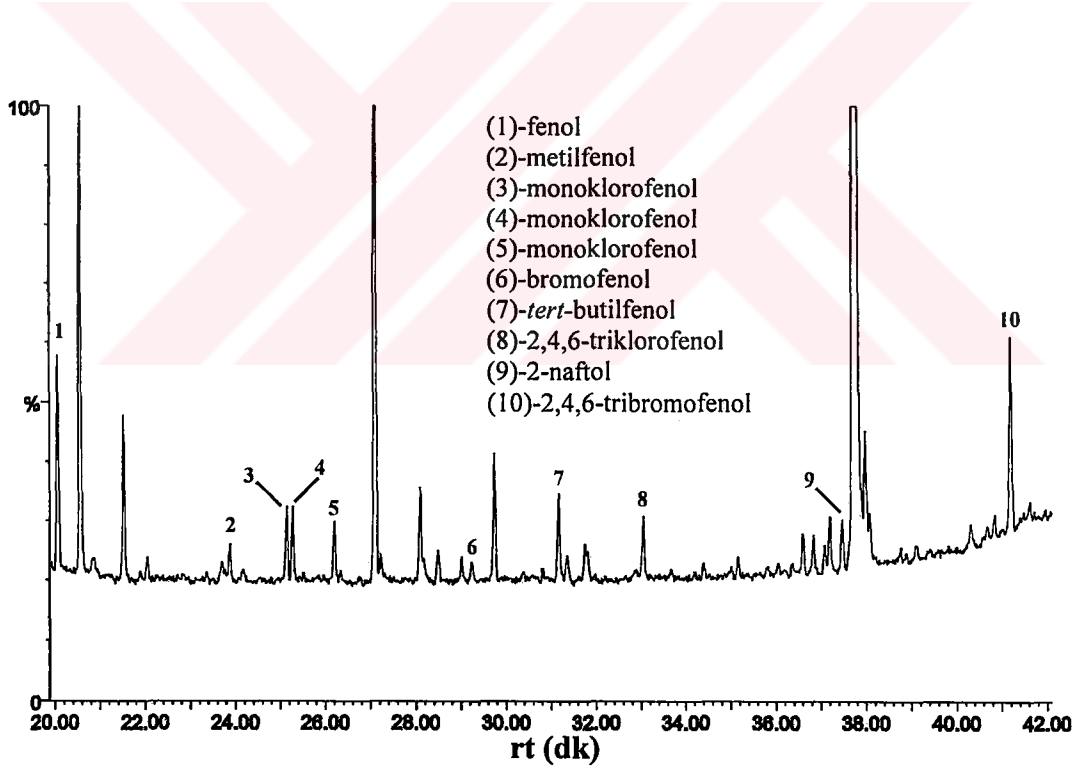
Bu çalışmada da fenolik maddelerin doğrudan asetil türevlerine dönüştürülmesiyle ilgili Coutts ve arkadaşları tarafından önerilen yöntem uygulanmış ancak tercih edilmemiştir. Yöntem, sulu ortamdaki fenollerin doğrudan asetik anhidrit ile türetilerek hekzan ile ekstrakte edilmesi şeklindedir. Bu yöntemin uygulanması sırasında çevre sularındaki birçok apolar organik maddenin de ekstraksiyon sırasında hekzan fazına transfer olduğu ve bunun da fenolik maddelerin analizini zorlaştırdığı gözlenmiştir. Ayrıca yöntem çevre sularındaki ppb seviyesindeki fenolik maddelerin tayin edilmesinde yetersiz kalmıştır. Bu nedenle su numunelerinin analizlerinde anyon-değiştirme kromatografisi hem apolar organik maddelerin uzaklaştırılması hem de fenolik maddelerin konsantre edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Anyon-değiştirme kromatografisi tekniğinin, fenolik maddelerin sulu ortamdan izole edilmesinde kullanılan diğer tekniklere göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlardan bir tanesi temizlenerek defalarca kullanılabilmesi ve dolayısıyla ekonomik bir uygulama olmasıdır. C₁₈ kolonlarının kullanıldığı SPE tekniği ise, kolonların tek kullanımdan sonra atılmasından dolayı ekonomik değildir. Ayrıca fenolik maddelerin sulu ortamdan izole edilmesinde C₁₈ kolonları tek başına

yeterli olmamakta ve CTAB (Li and Lee, 1997) ve TBAB (Pocurull et al., 1996) gibi iyonik fonksiyonel gruplar içeren maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Anyon-değiřtirici rećineler iyonik fonksiyonel gruplar içerdikinden bu gibi maddelerin kullanımına gerek kalmamaktadır. Bu ćalıřmada anyon-değiřtirici rećineler, bu gibi avantajları da dikkate alınarak tercih edilmiřtir.

4.1.6 Su Numunelerinin GC-MS Analizleri

Zonguldak bölgesinden toplanan su numunelerinin řekil 3.3’de belirtildięi gibi ekstraksiyonlarının ardından GC-MS analizleri yapılmıřtır. 1 L deniz suyu numunesinin anyon-değiřtirici rećine içeren kolondan gećirildikten sonra yapılan GC-MS analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı řekil 4.28’de verilmiřtir.



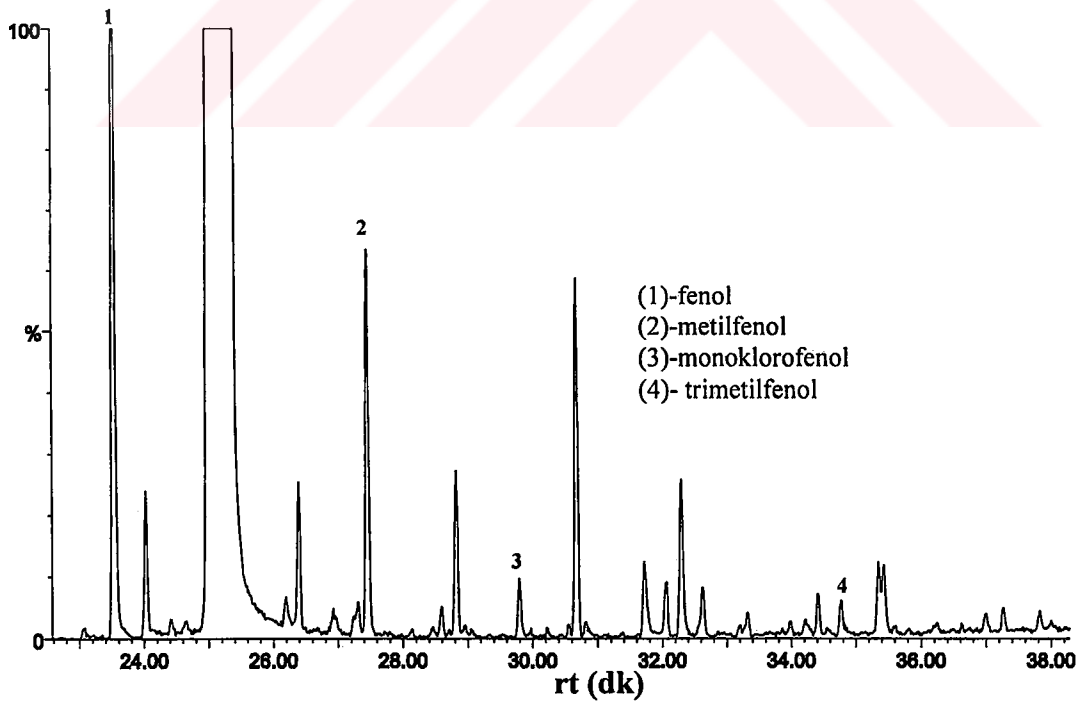
şekil 4.28 Deniz suyu numunesinin anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı. (Toplam fenol miktarı: 76 µg/L, Tarih: Haziran 2002).

Su numunelerindeki fenolik maddelerin miktarlarının belirlenmesinde, GC analizlerinden okunan pik alanı değerleri kullanılmıştır. Her bir fenol için okunan pik alanı değerleri ćizelge 4.2’deki kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak su numunelerindeki fenolik maddelerin gerćek konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Asetillenme verimleri ve geri kazanım değerleri de dikkate alınarak sulardaki ve dip çamurlarındaki fenolik maddelerin miktarları tek tek belirlenip ardından toplanarak “toplam fenol miktarı” olarak verilmiştir.

Literatürdeki konuyla ilgili çalışmalarda, ilkbahar ve yaz aylarında yapılan analizlerde fenolik madde konsantrasyonlarının maksimum değere ulaştığı ve bunun nedeninin yaz aylarında fenolik madde kaynaklı kimyasalların tarımda ve endüstride daha sık kullanılmasından dolayı olabileceği açıklanmıştır (Davi and Gnudi, 1999). Bu sonuç elde edilen deneysel sonuçlarla da desteklenmektedir. Ayrıca fenolik madde miktarının yaz aylarında daha yüksek oranda bulunmasının, fenolik maddelerin çözünürlüğünün sıcaklıkla artmasıyla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Deniz suyu numunesinin yaz mevsiminde, anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.29’da verilmiştir.

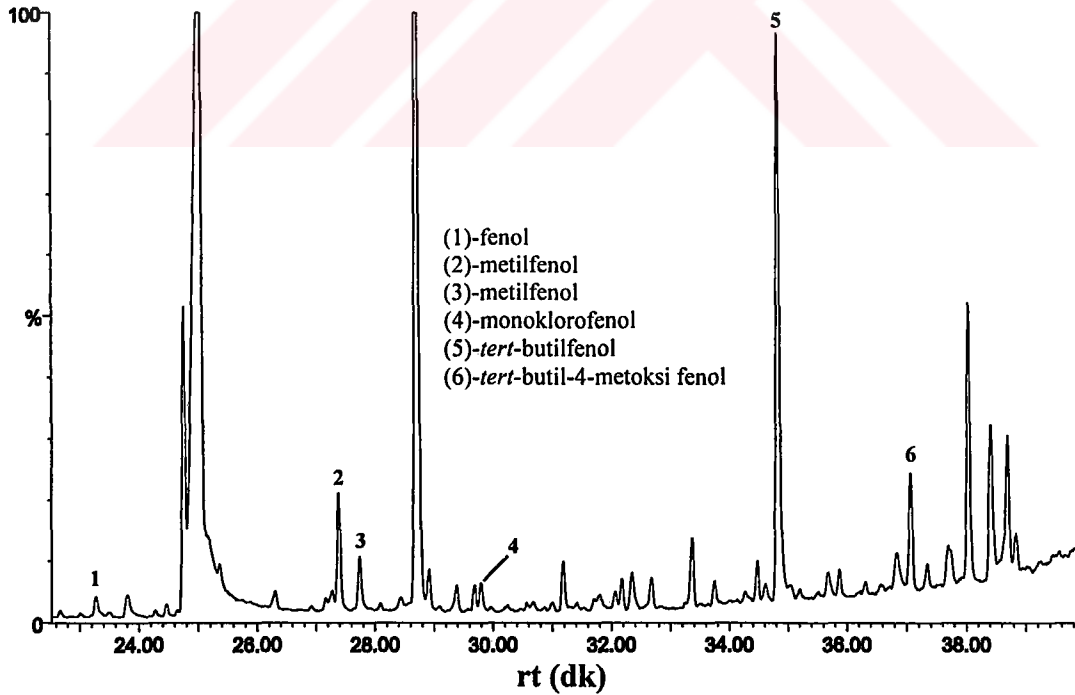


Şekil 4.29 Deniz suyu numunesinin (2 litre) anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı. (Toplam fenol miktarı: 20µg/L, Tarih: Ocak 2003).

Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’da verilen kromatogramlarda, fenolik madde çeşitliliğinin ve konsantrasyonunun yaz aylarında daha fazla olduğu görülmektedir.

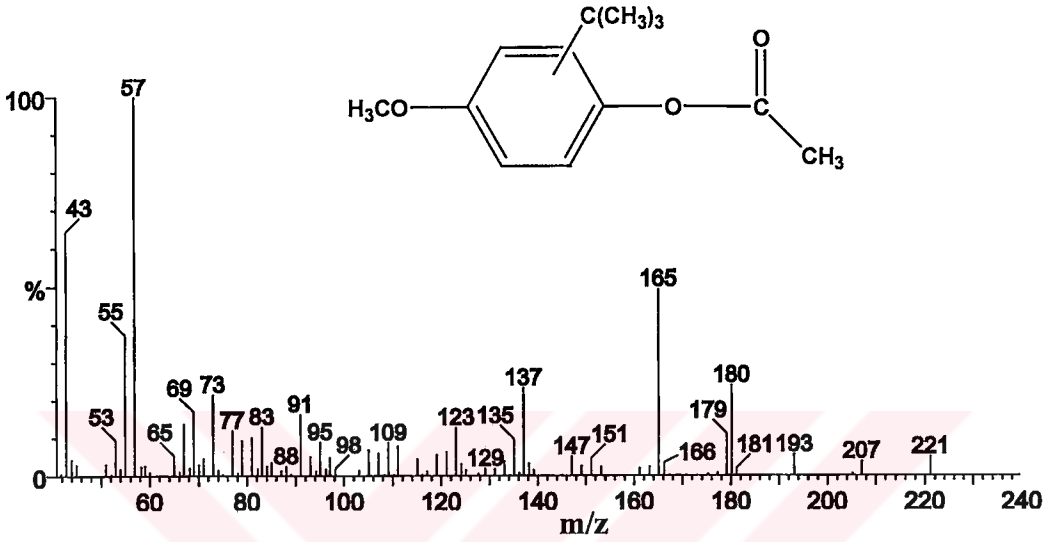
Zonguldak bölgesinden toplanan nehir suyu, deniz suyu ve dip çamuru gibi çevre örneklerinin analizlerinden elde edilen sonuçlarda, fenol ve metilfenol (krezol) en çok karşılaşılan fenolik maddeler olarak göze çarpmaktadır. Yapılan analizlerin tamamında bu maddelerle karşılaşılmasının, Zonguldak bölgesinde kömür endüstrisinin fazla gelişmiş olmasıyla bağlantılı olabileceği sonucuna varılmıştır. Dutta et al.(1998), kömürün gazlaştırılması ve koklaştırılması işlemleri sırasında başta fenol, m-krezol ve rezorsinol olmak üzere daha birçok fenolik maddenin oluştuğunu ve çevreye karıştığını belirtmişlerdir.

Nehir suyu numunesinin (2 litre) anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.30’da verilmiştir.



Şekil 4.30 Nehir suyu numunesinin (2 litre) anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı. (Toplam fenol miktarı: 9µg/L, Tarih: Ocak 2003).

Şekil 4.30'da görüldüğü gibi nehir suyu numunesinin anyon-değişirme yöntemiyle yapılan analizinde, 6 ile gösterilen *tert*- butil-4-metoksi fenolün asetil türevi ile karşılaşılmıştır. Bu bileşiğin kütle spektrumu Şekil 4.31'de verilmiştir.



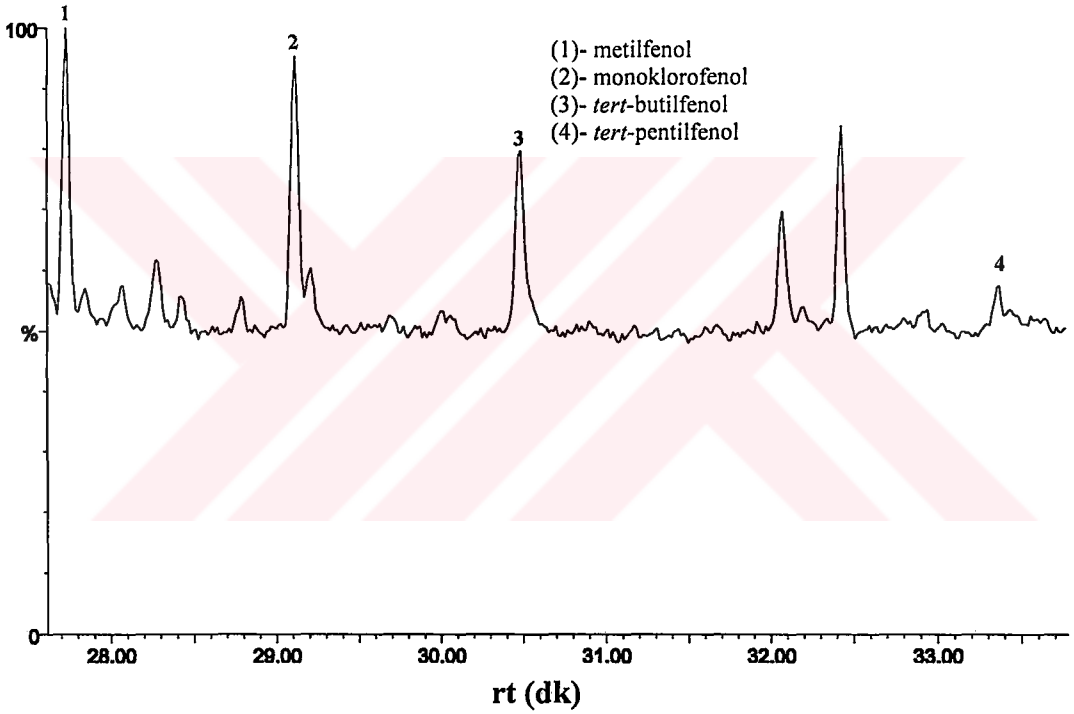
Şekil 4.31 *Tert*- butil-4-metoksi fenil asetatin (6) kütle spektrumu.

Tert-butil-4-metoksi fenol (BHA), genellikle gıda sanayisinde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Özellikle bisküvi, kek, patates cipsi, donmuş et ve sebze gibi gıdaların uzun süreli depolanmasında kullanılmaktadır. BHA'nın bir izomeri olan 2,6-bis(1,1-dimetil etil)-4-metil fenol (BHT) ise daha çok motor sanayisinde yalıtım ve yağlamada, mum, plastik, boya gibi malzemelerin depolanmasında kullanılmaktadır. Bu tür bileşiklerin yüzey sularında bulunması istenmeyen bir durumdur. Ancak hayvanlar ve insanlar üzerinde düşük toksik özellik göstermesinden dolayı tehlikeli değildir ve bu nedenle de gıda sanayisinde kullanılmaktadır (Davi and Gnudi, 1999).

Elde edilen sonuçlarının tamamında, *tert*-butilfenolün en yüksek konsantrasyonlu ve en çok karşılaşılan fenolik madde olduğu görülmektedir. Rudel et al. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, evsel atıklarda bulunan yüzey aktif maddelerin bozunmasıyla bir çok alkilfenolün oluşabileceği ve bu maddelerin de hormonal etkilerinin olduğu belirtilmiştir. *Tert*-butilfenolün de bu şekilde oluşan bir bozunma ürünü olabileceği ifade edilmiştir.

4.1.7 Dip Çamuru Örneklerinin GC-MS Analizleri

Zonguldak bölgesinden toplan dip çamuru örneklerinin iki farklı yolla yapılan GC-MS analizlerinden elde edilen spektrumlar aşağıda verilmiştir. İlk olarak dip çamuru örneğinin metanol kullanılarak sokslet ekstraksiyonu yapılmış ve devamında da istenmeyen maddelerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla anyon-değiştirme tekniği kullanılmıştır. Metodun uygulanışı ayrıntılı olarak Şekil 3.2’de ve elde edilen GC-MS kromatogramı da Şekil 4.32’de verilmiştir.

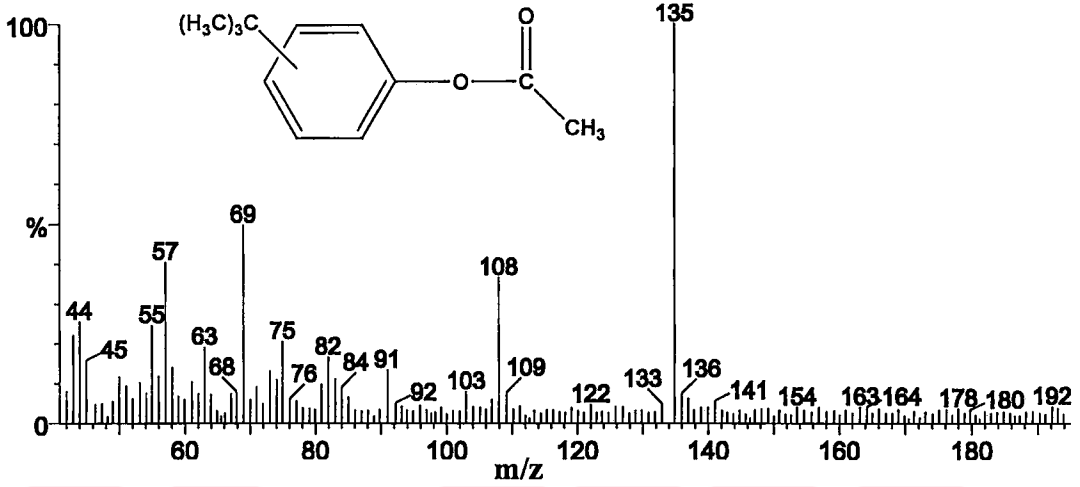


Şekil 4.32 Dip çamuru örneğinin sokslet ekstraksiyonu ve anyon-değiştirme yöntemiyle yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı. (Toplam fenol miktarı : 9µg/ 60g dip çamuru, çz: metanol).

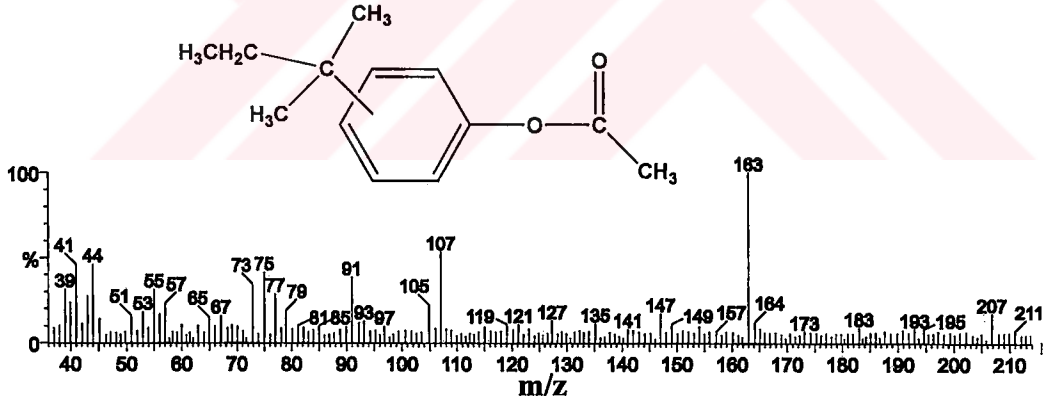
Literatürdeki bilgiler dikkate alındığında, fenolik maddelerin metanolla ekstraksiyonunda baz ilavesiyle ekstraksiyon veriminin arttığı belirtilmiş (Alonso et al., 1998) ve bu çalışmada da ekstraksiyon öncesi kurutulmuş dip çamuru örneğine katı NaOH ilave edilmiştir.

Şekil 4.32’de dip çamuru örneklerinin metanolla sokslet ekstraksiyonun ardından yapılan GC-MS analizinden elde edilen GC-MS kromatogramında farklı yapıda

alkil fenollerin olduğu görülmektedir. Bu fenollerin elde edilen kütle spektrumları Şekil 4.33 ve Şekil 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.33 Tert-butilfenil asetatın (3) kütle spektrumu.



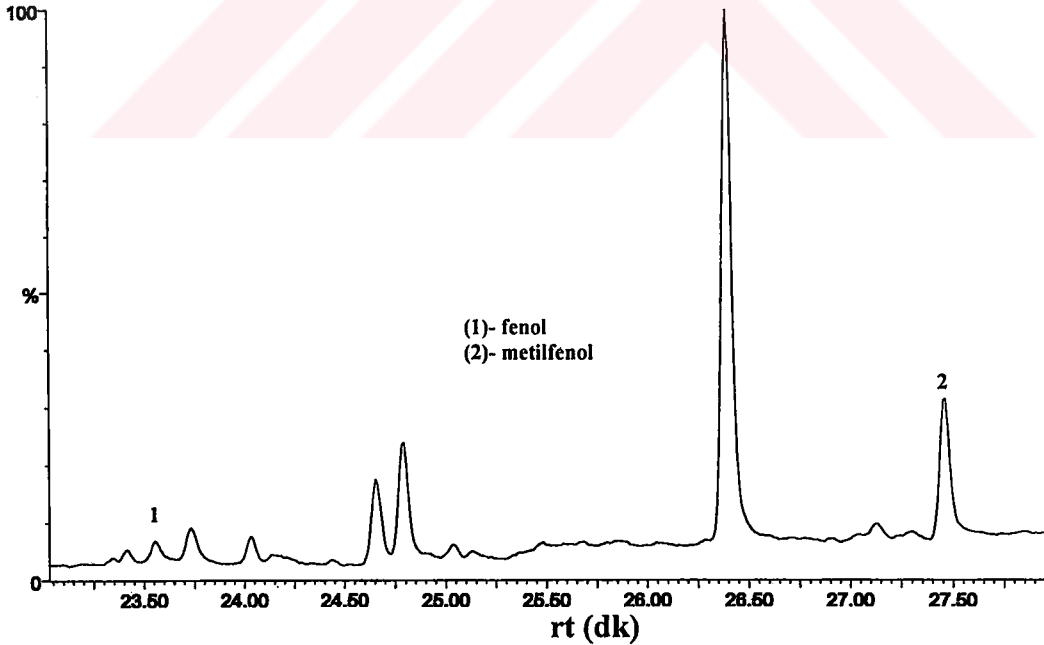
Şekil 4.34 Tert-pentilfenil asetatın (4) kütle spektrumu.

Metil ve *tert*-butil grubu içeren fenoller de gıdaların depolanması işleminde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Fenolik antioksidanların etkisi yapıdaki metil gruplarının artmasıyla doğru orantılı olarak artmaktadır (Davi and Gnudi, 1999). Ayrıca *tert*-pentilfenol ve *tert*-butil-4-metoksi fenolün de aralarında bulunduğu daha birçok fenolik maddenin hormon gibi davranabileceği belirtilmiştir (Rudel et al.,1998).

Standart fenollerin dışında, çevre örneklerinden izole edilen *tert*-pentilfenol ve *tert*-butil-4-metoksi fenol gibi diğer bazı fenollerin kütle spektrumları, literatürdeki verilerle (Hites, 2000) karşılaştırılarak yapıları aydınlatılmıştır. Bu maddelerin *p-tert*-butilfenol gibi davranacağı düşünüldüğünden, kantitatif analizlerinde *p-tert*-butilfenole ait veriler kullanılmıştır.

Literatürde dip çamuru örneklerinin analizleri ile ilgili çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. En yaygın olarak kullanılan metot, kurutulmuş numunenin sokslet cihazı kullanılarak değişik organik çözücüler ile ekstrakte edilmesi şeklindedir. Bu çalışmada, dip çamurlarının analizlerinde çözücü olarak metanol ve DCM kullanılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Dip çamuru örneklerin DCM kullanılarak yapılan sokslet ekstraksiyonu ile ilgili metodun uygulanması ayrıntılı olarak Şekil 3.3'de ve GC-MS analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı da Şekil 4.35'de verilmiştir.



Şekil 4.35 Dip çamuru örneğinin sokslet ekstraksiyonu ile yapılan analizinden elde edilen GC-MS kromatogramı. (çz: DCM, toplam fenol miktarı: 7µg/60 g dip çamuru).

Bu çalışmada, dip çamuru örnekleri metanol ve DCM gibi çözücüler ile sokslet cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Metanolün kullanılmasıyla fenolik maddelerin bu çözücüde apolar organik maddelere oranla daha fazla çözünmesi sağlanmıştır. Daha polar bir çözücü olan suyun metanolle beraber kullanılması, ekstraksiyon sonrası çözücünün uzaklaştırılması işlemini zorlaştıracak ve uçurma sırasında fenolik maddelerin de uzaklaşabileceği dikkate alınarak tercih edilmemiştir. Metanolle yapılan sokslet ekstraksiyonunun devamında anyon-değiştirici reçinelerin kullanılmasıyla da apolar organik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Ancak temizleme işlemlerinin hiç biri bu maddelerin ortamdan tamamen uzaklaştırılması için yeterli olmamaktadır. Alonso et al. (1998) tarafından yapılan çalışmada, bilinen konsantrasyonlardaki fenolik maddeler toprak numunelerine ilave edilerek sokslet ekstraksiyon tekniği ile geri analiz edilmiştir. Metanol-su (4:1) çözücü sistemi kullanılarak yapılan ekstraksiyonun ardından elde edilen geri kazanım değerlerinin % 67-90 arasında değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca sokslet ekstraksiyonunun ardından çözücünün temizlenmesi amacıyla katı-sıvı ekstraksiyon tekniği uygulanmıştır. Endüstriyel atıklarla kirletilmiş toprak numunelerinin analizlerinde sadece polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve pentaklorofenoller tespit edilmiş ve katı-faz ekstraksiyon tekniğinin yıkama amaçlı kullanılmasına rağmen hidrokarbonların pentaklorofenollere göre çok daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir. Bu da katı-faz ekstraksiyon tekniğinin temizleme amaçlı kullanılmasının yeterli olmadığı bir göstergesidir.

Bu çalışmada, su numunelerinin ve dip çamuru örneklerinin GC-MS analizlerinde fenolik maddelerin dışında istenmeyen bazı maddelere ait piklerle karşılaşmıştır. Bu pikler, dip çamuru örneklerinin DCM ile sokslet ekstraksiyonunun ardından yapılan GC-MS analizlerinden elde edilen sonuçlarda daha fazla göze çarpmaktadır. DCM fazının kurutulmasının ardından kuru kalıntı hekzan ile yıkanarak istenmeyen maddelerin ortamdan uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Ancak hekzan ile yıkama işlemine rağmen bu maddeler ortamdan uzaklaştırılamamıştır. Bu maddelerin, yapılan GC-MS analizlerinden organik asitler, yağ asitleri ve hidrokarbon türünden maddeler olduğu anlaşılmaktadır.

Anyon-değiştirme kromatografisi kullanılarak elde edilen sonuçlarda ise bu maddelere ait piklerin daha az oranda çıkması, bu maddelerin ortamdan mümkün olduğunca uzaklaştırıldığının bir göstergesidir.

Çevre örneklerinin yapılan GC-MS analizlerinden elde edilen bazı kütle spektrumlarında, m/z değerleri 133, 207, 281 olan piklerle karşılaşılmıştır. Bu piklerin de silikon yağı kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca analizlerde polidimetilsiloksan apolar kolon kullanıldığından dolayı bu kirliliklerin kolondan kaynaklandığı da düşünölebilir. Ancak saf su kullanılarak hazırlanan standart fenol çözeltilerinin analizlerinde bu piklerle karşılaşılmamıştır. Bu piklerin çevre örneklerinin analizlerinden elde edilen sonuçlarda çıkması, safsızlıkların kolondan değil çevreden geldiğini göstermektedir. Bings ve Dong (1998) silikon yağlarının kayganlaştırıcı, köpük kontrol ajanı olarak endüstride, boyaların ve kozmetik ürünlerin hazırlanmasında geniş olarak kullanıldığını belirtmişlerdir. Çizelge 4.5’de organik bileşiklere karışabilecek bazı safsızlıklara ait m/z değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.5 Organik bileşiklere karışabilecek bazı safsızlıklar (Erdik, 1993).

m/z	İyon kaynağı
149, 167, 269	Plastifiyan (ftalik asit türevleri)
129, 185, 259, 329	Plastifiyan (tri-n-butilastilsitrat)
133, 207, 281, 355, 429	Silikon yağı
99, 155, 211	Plastifiyan (tributilfosfat)

Zonguldak içme suyunun büyük bir bölümünü karşılayan Ulutan Barağı’ndan alınan ham su ve klorlanmış su örneklerinin yapılan analizlerinde fenolik maddeye rastlanmamıştır. Bir başka ifade ile, uygulanan bu metotla belirlenebilecek minimum konsantrasyon 0,5-1 ppb olduğundan içme suyunda bulunabilecek daha düşük konsantrasyondaki fenolik maddeler belirlenememiştir.

4.2 DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Bu çalışmada çevre örneklerindeki fenolik maddelerin iyon-çifti ekstraksiyon tekniği ve anyon-değiştirme kromatografisi ile izole edilmesi, kromatografik analiz öncesi uygun türetme reaksiyonlarının uygulanması ve GC-MS analizlerinin yapılması basamaklarını içeren bir metot önerilmiştir. Metot, içme sularına, deniz suyu, nehir suyu ve dip çamurları gibi değişik çevre örneklerine uygulanmış ve elde edilen sonuçlar genel olarak aşağıda özetlenmiştir;

- 4-AAP'nin NH_2 grubu kuarternize edilmiş ve oluşan 4-QAAP, fenolik maddelerin belirlenmesinde iyon-çifti reaktifi olarak kullanılmıştır.
- Fenolik maddeler ve 4-QAAP arasında oluşturulan iyon-çifti asidik ortamda hidroliz edilerek fenolik maddeler asetil türevlerine dönüştürülmüştür. Ardından GC-MS ile fenolik maddeler tek tek belirlenip yapıları aydınlatılmıştır.
- Fenol ile 4-AAP arasında oluşan kinon-imin bileşiğinin kararlı bir yapıda olduğu ve hidroliz olmadığı, 4-QAAP ile oluşturulan iyon-çiftinin ise hidroliz olabildiği sonucu elde edilmiştir.
- 4-QAAP'nin 0,1-1 ppm konsantrasyonlardaki fenolik maddelerin belirlenmesinde kullanılabileceği belirlenmiş ve daha düşük konsantrasyonlarda ise iyon-çifti oluşumunun zayıf olduğu gözlenmiştir.
- Çevre örneklerindeki fenolik maddelerin analizlerinde anyon-değiştirme kromatografisi, hem apolar organik maddelerin uzaklaştırılması hem de fenolik maddelerin konsantre edilmesi amacıyla kullanılmış ve ppb seviyesindeki fenolik maddeler analiz edilmiştir.
- Bilinen konsantrasyonlardaki standart fenol çözeltilerinin anyon-değiştirme kromatografisi kullanılarak yapılan analizlerinden geri kazanım değerleri hesaplanmış ve % 85-100 arasında değişiklik gösterdiği gözlenmiştir.
- Fenolik madde çeşitliliğinin ve konsantrasyonunun yaz aylarında artış gösterdiği sonucuna varılmıştır.

- Zonguldak bölgesinden toplanan çevre örneklerinin analizlerinden fenol, metilfenol ve klorofenollerin en sık karşılaşılan fenolik maddeler olduğu bulunmuştur.
- Çevre örneklerinin analizlerinden en yüksek konsantrasyonlu fenolik maddenin ise *p-tert*-butilfenol olduğu bulunmuştur.
- Dip çamuru örneklerinin sokslet ekstraksiyonunda metanol ve DCM gibi organik çözücüler kullanılmıştır. Metanolle yapılan sokslet ekstraksiyonunun ardından anyon-değiştirme kromatografisinin uygulanmasıyla, apolar organik maddeler mümkün olduğunca ortamdan uzaklaştırılmıştır. DCM kullanılarak yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen sonuçlarda ise istenmeyen maddelerin ortamda kaldığı gözlenmiştir.
- Fenolik maddeler iki farklı yöntemle asetil türevlerine dönüştürülerek elde edilen verimler karşılaştırılmıştır. Fenolik maddelerin sulu ortamda asetillenmesi, piridin varlığında yapılan asetillemeye oranla daha yüksek verimle gerçekleşmiştir. Fenol ve *p*-metilfenol ise piridinli ortamda daha yüksek verimle asetillenmiştir.

İyon-çifti ekstraksiyonu metodunun başarıyla uygulanabilmesi için ortamın pH'sının iyi ayarlanması, reaktif miktarının belirlenmesi, uygun tampon ve çözücünün seçimi son derece önemlidir. En uygun koşulların sağlanmasıyla, 4-QAAP'nin daha düşük konsantrasyonlarda da uygulanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca 4-QAAP ile farklı yapıdaki anyonik maddelerin de iyon-çifti oluşturabileceği düşünüldüğünden daha sonraki çalışmalarda 4-QAAP'nin farklı analitik uygulamalarının da incelenebileceği önerilmektedir.

Fenolik maddelerin sulu ortamdan izolasyonları için anyon-değiştirici reçinelerin kullanılmasıyla fenolik maddeler çok düşük konsantrasyonlarda bile ($\mu\text{g/L}$) GC-MS analizleri için konsantre edilmişlerdir. Literatürde, fenolik maddelerin sulu ortamda doğrudan türetilmesi ve GC-MS ile analizlerine ait bilgiler mevcuttur. Ancak fenolik maddelerin sulu ortamda doğrudan asetillenmesi düşük konsantrasyonlarda çok az verimle gerçekleşmekte ya da konsantrasyona bağlı

olarak hiç gerçekleşmemektedir. Önerilen bu metotta, fenolik maddeler önce anyon-değıştirme kromatografisi ile konsantre edilmekte, ardından yine sulu ortamda asetil türevlerine dönüştürölmektedir. Elde edilen sonuçlar, fenolik maddelerin çok düşük konsantrasyonlarda bile kalitatif ve kantitatif analizleri için güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Dip amuru örneklerindeki fenolik maddelerin belirlenmesi için farklı organik özöcüler ile sokslet ekstraksiyonu, anyon-değıştirme kromatografisi ve türetme teknikleri seçici bir metot olarak başarıyla uygulanmıştır.



KAYNAKLAR

- Abrahamsson, K. and Xie, T.M.** (1983) Direct determination of trace amounts of chlorophenols in fresh water, wastewater and sea water, *Journal of Chromatography*, Vol.279, pp.199-208.
- Afghan, B.K., Chau Alfred, S.Y.** (1989) *Analysis of Trace Organics in the Aquatic Environment*, CRS Press, pp.122-149.
- Agrawal, O. And Gupta, V.K.** (1999) Sub-parts-per-million spectrophotometric determination of phenol and related pesticides using diazotized *p*-aminoacetophenone, *Microchemical Journal*, Vol.62, pp.147-153.
- Alonso, M.C., Puig, D., Silgoner, I., Grasserbauer, M., Barcelo, D.** (1998) Determination of priority phenolic compounds in soil samples by various extraction methods followed by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Vol.823, pp.231-239.
- Binks, B.P. and Dong, J.** (1998) Emulsions and equilibrium phase behaviour in silicone oil+water+nonionic surfactant mixtures, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol.132, pp.289-301.
- Blau, K. and Darbre, A.** (1993) *Handbook of derivatives for chromatography*, John Wiley and Sons Ltd., p.37.
- Baciocchi, R., Attina, M., Lombardi, G., Boni, M.R.** (2001) Fast determination of phenols in contaminated soils, *Journal of Chromatography A*, Vol.911, pp.135-141.
- Buchholz, K.D. and Pawliszyn, J.** (1994) Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols, *Analytical Chemistry*, Vol.66, pp.160-167.
- Castillo, M., Barcelo, D.** (2001) Characterization of organic pollutants in textile wastewaters and landfill leachate by using toxicity-based fractionation methods followed by liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, Vol.426, pp.253-264.
- Christian, G.D.** (1994) *Analytical Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley and Sons, Inc. p.517.

- Corcia, A.D., Marchese, S., Samperi, R.** (1993) Selective Determination of Phenols in Water by Two-Trap Tandem Extraction System Followed by Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, Vol.642, pp.175-184.
- Coutts, R.T., Hargesheimer, E.E. and Pasutto, F.M.** (1979) Gas chromatographic analysis of tracephenols by direct acetylation in aqueous solution, *Journal of Chromatography*, Vol.179, pp.291-299.
- Coutts, R.T., Hargesheimer, E.E. and Pasutto, F.M.** (1980) Application of direct aqueous acetylation technique to the gas chromatographic quantitation of nitrophenols and 1-naphthol in environmental water samples, *Journal of Chromatography*, Vol.195, pp.102-112.
- Davi, M.L. and Gnudi, F.** (1999) Phenolic compounds in surface water, *Water research*, Vol.33, No.14, pp.3213-3219.
- Denkert, M., Hackzell, L., Schill, G., Sjögren, E.** (1981) Reversed-phase ion-pair chromatography with UV-absorbing ions in the mobile phase, *Journal of Chromatography*, Vol.218, pp.31-34.
- Dutta, N.N., Borthakur, S., Baruah, R.** (1998) A novel Process for Recovery of Phenol from Alkaline Wastewater: Laboratory Study and Predesign Cost Estimate, *Water Environment Research*, Vol.70, Number 1, pp.4-9.
- Eisert, R., Levsen, K.** (1996) Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water, *Journal of Chromatography A*, Vol.733, pp.143-157.
- Erdik, E.** (1993) *Organik kimyada spektroskopik yöntemler*, Gazi Büro Kitabevi, Ankara, s.395.
- Evtushenko, Y.M., Ivanov, V.M. and Zaitsev, B.E.** (2002) *m*-Aminophenylarsonic acid as a reagent for the extraction preconcentration of phenol, *Journal of Analytical Chemistry*, Vol.57, No.4, pp.310-312.
- Farre, M., Pasini, O., Alonso, M.C., Castillo, M., Barcelo, D.** (2001) Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor, *Analytica Chimica Acta*, Vol.426, pp.155-165.
- Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D., Pilidis, G.A., Karayannis, M.I.** (2000) Synthesis and Analytical Application of 4-Aminopyrazolone Derivatives as Chromogenic Agents for the Spectrophotometric Determination of Phenols, *Analytica Chimica Acta*, Vol.403, pp.315-323.
- Fiamegos, Y., Stalikas, C., Pilidis, G.** (2002) 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, Vol.467, pp.105-114.

- Forehand, J.B., Dooly, G.L., Moldoveanu, S.C.** (2000) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as a sole sample clean-up step, *Journal of Chromatography A*, Vol.898, pp.111-124.
- Galceran, M.T. and Jauregui, O.** (1995) Determination of phenols in sea water by liquid chromatography with electrochemical detection after enrichment by using solid-phase extraction cartridges and disks, *Analytica Chimica Acta*, Vol.304, pp.75-84.
- Glastrup, J.** (1998) Diazomethane preparation for gas chromatographic analysis, *Journal of Chromatography A*, Vol.827, pp.133-136.
- Ha, S.R. and Vinitnantharat, S.** (2000) Competitive removal of phenol and 2,4-dichlorophenol in biological activated carbon system, *Environmental Technology*, Vol.21, pp.387-396.
- Helaleh, M., Tanaka, K., Fujii, S.I., Korenaga, T.** (2001) GC/MS determination of phenolic compounds in soil samples using soxhlet extraction and derivatization techniques, *Analytical Sciences*, Vol.17, pp.1225-1227.
- Hites, R.A.** (2000) *Handbook of Mass Spectra of Environmental Contaminants*, Second Edition, Lewis Publishers, CRS Press, Inc.
- Kanazawa, N., Urano, K., Kokado, N. and Urushigawa, Y.** (2001) Adsorption equilibrium equation of carboxylic acids on anion-exchange resins in water, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.238, pp.196-202.
- Knapp, D.R.** (1979) *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley and Sons, Inc., p.2.
- Kuban, P., Flowers, H.** (2001) On-line preconcentration for the ion chromatographic determination of chlorophenolic and phenolic compounds in environmental samples using electrochemical detection, *Analytica Chimica Acta*, Vol.437, pp.115-122.
- Lamparski, L.L. and Nestrick, T.J.** (1978) Determination of trace phenols in water by gas chromatographic analysis of heptafluorobutyl derivatives, *Journal of Chromatography*, Vol.156, pp.143-151.
- Li, N. and Lee, H.K.** (1997) Trace enrichment of phenolic compounds from aqueous samples by dynamic ion-exchange solid-phase extraction, *Analytical Chemistry*, Vol.69, pp.5193-5199.
- Manahan, S.E.** (1994) *Environmental Chemistry*, Sixth Edition, Lewis Publishers.

- Martinez, D., Pocurull, E., Marce, R.M., Borrull, F., Calull, M.** (1996) Separation of eleven priority phenols by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography A*, Vol.734, pp.367-373.
- Meijer, S.N., Harner, T., Helm, P.A., Halsall, C.J., Johnston, A.E., Jones, K.C.** (2001) Polychlorinated naphthalenes in U.K. soils: time trends, markers of source and equilibrium status, *Environmental Science and Technology*, Vol.35, pp.4205-4213.
- Persson, B.A., Schill, G.** (1993) *Ion-Pair Extraction in Chromatography*, John Wiley and Sons Ltd., pp.253-265.
- Pichon, V.** (2000) Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water, *Journal of Chromatography A*, Vol.885, pp.195-215.
- Pocurull, E., Calull, M., Marce, R.M., Borrull, F.** (1996) Determination of phenolic compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels by various solid-phase extractions followed by liquid chromatography and diode-array detection, *Journal of Chromatography*, Vol.719, pp.105-112.
- Realini, P.A.** (1981) Determination of priority pollutant phenols in water by HPLC, *Journal of Chromatographic Science*, Vol.19 pp.124-129.
- Renberg, L.** (1974) Ion-exchange technique for the determination of chlorinated phenols and phenoxy acids in organic tissue, soil and water, *Analytical Chemistry*, Vol.46, No.3, pp.459-461.
- Renberg, L. and Lindström, K.** (1981) C_{18} reversed-phase trace enrichment of chlorinated phenols, guaiacols and catechols in water, *Journal of Chromatography*, Vol.214, pp.327-334.
- Rhee, J.S., Jung, M.W., Paeng, K.J.** (1998) Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water, *Analytical Sciences*, Vol.14, pp.1089-1092.
- Richard, J.J. and Junk, G.A.** (1984) Steam distillation, solvent extraction, and ion-exchange for determining polar organics in shale process waters, *Analytical Chemistry*, Vol.56, pp.1625-1628.
- Rodriguez, I., Llompart, M.P., Cela, R.** (2000) Solid-Phase Extraction of Phenols, *Journal of Chromatography A*, Vol.885, pp.291-304.
- Rudel, A.R., Melly, S.J., Geno, P.W., Sun, G. And Brody, J.G.** (1998) Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage and groundwater on cape cod, Massachusetts, *Environmental Science and Technology*, Vol.32, pp.861-869.

- Rump, H.H., Krist, H.** (1988) *Laboratory Manual for the Examination of Water, Wastewater and Soil*, VCH Publishers, New York, pp.120-123.
- Saunders, D.G. and Vanatta, L.E.**, (1974) Derivatization and gas chromatographic measurement of some thermally unstable ureas, *Analytical Chemistry*, Vol.46, No.9, p.1319.
- Schmitt, T.M.** (1992) *Analysis of Surfactants*, Marcel Dekker, Inc., pp.289-295.
- Sommer, H.Z. and Jackson, L.L.** (1969) Alkylation of amines. A new method for the synthesis of quaternary ammonium compounds from primary and secondary amines, *The Journal of Organic Chemistry*, Vol.35, No.5, pp.1558-1562.
- Streitwieser, A., Heathcock, H.C.** (1985) *Introduction to Organic Chemistry*, Third Edition, University of California, Macmillan Publishing Company, New York, Chap.26, pp.808-813.
- Su, M.H., Ma, H.M., Ma, Q.L., Wang, Z.H. et al.**, (2001) Fluorescent Labeling of Phenol Using 8-(4,6-dikloro-1,3,5- triazinylamino) quinoline, *Analytica Chimica Acta*, Vol.426, pp.51-56.
- Türkiye Çevre Vakfı** (1995) *Türkiye'nin Çevre Sorunları*, Türkiye Çevre Vakfı Yayını, Önder Matbaa, Kasım, s.91
- Vetter, W., Hiebl, J., Oldham, N.** (2001) Determination and mass spectrometric investigation of a new mixed halogenated persistent component in fish and seal, *Environmental Science and Technology*, Vol.35, No.21, pp. 4157-4162.

BİBLİYOGRAFYA

Belardi, R.P. and Pawliszyn, J. (1989) *Water Pollution Research J. Canada*, Vol.24, p.179.

Fedorak, P.M. and Hurudey, S.E. (1988) Anaerobic degradation of phenolic compounds with application to treatment of industrial wastewaters, *Biotreatment System*, Vol.1, CRC Pres, Florida, pp.169-225.

Hileman, B. (1994) *Chem. Eng. New*, Vol.31, p.19.

Tremp, J., Mattrel, P., Fingler, S., Giger, W., (1993) *Water Air Soil Pollut.*, Vol.68, p.113.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Trabzon'un Salpazarı ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı ilçede tamamladı. 1995 yılında Giresun Anadolu Öğretmen Lisesinden mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'ne girdi. 1999 yılında mezun olduktan sonra 2000 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2000 yılından beri ZKÜ, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.