

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FENOLLERİN SPEKTROFOTOMETRİK HPLC TAYİNLERİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MUSTAFA UMUT KONANÇ**

Kimya Anabilim Dalı

**OCAK 2013
SAMSUN**



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KİMYA ANABİLİM DALI

FENOLLERİN SPEKTROFOTOMETRİK HPLC TAYİNLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MUSTAFA UMUT KONANÇ
(08210373)**

Tezin Savuma Tarihi : 28.01.2013

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Adem ASAN
İkinci Danışman : Yrd. Doç. Dr. Halis Türker BALAYDIN**

Bu Yüksek Lisans Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi PYO.FEN.1904.11.021'nolu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
(Kimya) Anabilim Dalında
(Mustafa Umut KONANÇ) Tarafından Hazırlanan

FENOLLERİN SPEKTROFOTOMETRİK HPLC TAYİNLERİ

başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından .../.../... tarihinde yapılan sınav ile
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Jüri Üyeleri :

..../..../...2013

Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca her türlü destek ve imkanı sağlayan, değerli bilgi ve önerilerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Adem ASAN’a yakın ilgi ve alakasından ötürü teşekkür ederim.

Eş danışmanlığımı üstlenen, hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve tezimin her aşamasında tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halis Türker BALAYDIN’a teşekkür ederim

Tezin deneysel çalışmaları için ortam sağlayan Artvin Çoruh Üniversitesi ve sayın rektörümüz Prof. Dr. Mehmet DUMAN başta olmak üzere tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde destek ve anlayışını esirgemeyen sevgili eşim Semra KONANÇ’a teşekkür ederim.

Ayrıca bana çalışmalarımda destek olan bütün aile bireylerime teşekkür ederim.

Diğer taraftan bu tez, PYO.FEN.1904.11.021 nolu proje ile PYO tarafından desteklenmiştir. Bu destekten dolayı proje yönetim ofisine teşekkür ederim.

Ocak 2013

Ad Soyad
Mustafa Umut KONANÇ
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	1
1.2 Literatür Araştırması	2
1.2.1 Fenoller hakkında genel bilgiler.....	2
1.2.2 Fenollerin fiziksel özellikleri.....	3
1.2.3 Fenollerin kimyasal özellikleri.....	5
1.2.4 Fenollerin sınıflandırılması.....	6
1.2.4.1 Monohidroksifenoller.....	6
1.2.4.2 Krezoller.....	6
1.2.4.3 Polihidroksifenoller.....	6
1.2.4 Fenollerin sentezleri.....	7
1.2.5.1 Laboratuvar sentezleri.....	7
1.2.5.2 Endüstriyel sentezleri.....	7
1.2.6 Fenollerin tepkimeleri.....	8
1.2.6.1 Esterleşme tepkimesi.....	8
1.2.6.2 Benzen halkasının tepkimesi.....	9
1.2.7 Fenollerin kullanım alanları.....	10
1.2.8 Çevresel fenol kaynakları.....	12
1.2.9 Fenol ve fenol türelerinin canlılar üzerine etkisi.....	12
1.2.10 Sularda fenoller ve bulunma şekilleri.....	15
1.2.10.1 Atık sulardaki fenoller.....	15
1.2.11 Fenol arıtma yöntemleri.....	16
1.2.11.1 Adsorpsiyon.....	17
1.2.11.2 Elektrokimyasal arıtım.....	17
1.2.11.3 Kimyasal Oksidasyon.....	17
1.2.11.4 İleri oksidasyon prosesleri.....	17
1.2.11.5 Biyolojik arıtım.....	18
2. KURAMSAL TEMELLER.....	19
2.1 Çalışmada Kullanılan Maddelerin Fiziksel Özellikleri.....	19
2.1.1 Fenol.....	19
2.2.2.Rezorsinol.....	19
2.1.3 m-Kresol.....	20
2.1.4 4-Aminoantipirin.....	21

2.1.5 Potasyumperoksidisülfat.....	21
2.2 Fenolün Kantitatif Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	22
2.3 Kromatografi.....	22
2.3.1 Sıvı kromatografi.....	26
2.3.1.1 Sıvı kromatografide kolon verimliliği.....	26
2.3.1.2 Sıvı kromatografide kolon dışı bant genişlemesi.....	27
2.4 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi).....	28
2.4.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının yapısı ve kısımları.....	29
2.4.1.1 Hareketli faz haneleri.....	29
2.4.1.2 Pompalama sistemleri.....	29
2.4.1.3 Akış kontrollü pompalama sistemleri.....	30
2.4.1.4 Numune enjeksiyon sistemleri.....	30
2.4.1.5 HPLC' de kullanılan kolonlar ve kolon dolgu malzemeleri.....	31
2.4.1.6 Kolon termostatları.....	34
2.4.1.7 Dedektörler.....	34
2.5. Fenolün Kantitatif Analiz Yöntemlerine Ait çalışmalar.....	38
3. MATERYAL VE METOD.....	41
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	41
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması.....	42
3.4 Deneysel Çalışmalar.....	42
3.4.1 Fenol ve fenolik bileşiklerin türevlendirilmesi çalışmaları.....	43
3.4.1.1 Ph etkisi.....	43
3.4.1.2 En uygun reaktif miktarı.....	43
3.4.1.3 En uygun süre.....	44
3.4.1.4 En uygun ekstraksiyon yöntemi.....	44
3.4.2 Kromatografik Çalışmalar.....	44
3.4.2.1 HPLC yönteminin optimizasyonu.....	45
4.BULGULAR.....	48
4.1 Fenol Ekstraksiyon işlemleri.....	49
4.1.1 Sıvı Ekstraksiyonu.....	49
4.1.2 Katı sıvı ekstraksiyonu.....	52
4.2 Derivatizasyon Reaksiyonuna pH 'nın Etkisi.....	54
4.3 Derivatizasyon Reaksiyonuna En Uygun Reaktif Miktarının Belirlenmesi.....	55
4.4 Derivatizasyon Reaksiyonuna Sürenin Etkisi.....	57
4.5 Kromatografi Çalışmaları.....	58
4.5.1 Kromatografik şartların optimizasyonu.....	57
4.5.1.1 Hareketli fazın belirlenmesi.....	59
4.6 Kromatografik Şartlar.....	59
4.7 Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması İçin Yapılan Çalışmalar.....	59
4.8 Kantitatif Analiz.....	60
4.9 Örnek Numuneler İçin Yapılan Çalışmalar.....	62
4.10 Geri Kazanım Çalışmaları.....	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Fenolün ana fiziksel özellikleri	3
Çizelge 1.2: Bazı fenollerin fiziksel özellikleri	4
Çizelge 1.3: Fenollerin asitlik sabitleri	5
Çizelge 1.4: Fenollerin kullanım alanları	11
Çizelge 1.5: Çevresel fenol kaynakları	12
Çizelge 1.6: Ham su ve içme suyunda bulunan bazı fenollere ait limit değerleri.	16
Çizelge 2.1: Asetonitril-Su karışımında Debye-Hückel solvatokromik parametre değerleri ve silika kolon pH değerleri	24
Çizelge 4.1: Fenolik bileşiklerin 4-Aminoantipirinm derivatizasyonunda çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstraksiyon verimleri	50
Çizelge 4.2: 10 ml standart fenol çözeltileri kullanarak 4-aminoantipirin derivatizasyonunda kolon ekstraksiyonu yapıldığında elde edilen ekstraksiyon verimleri	52
Çizelge 4.3: 100 ml standart fenol çözeltileri kullanarak 4-aminoantipirin derivatizasyonunda kolon ekstraksiyonu yapıldığında elde edilen ekstraksiyon verimleri	52
Çizelge 4.4: Türeve ait en uygun peroksidisülfat derişimi verileri	54
Çizelge 4.5: Türeve ait en uygun 4- aminoantipirin derişimi verileri	55
Çizelge 4.6 : Türeve ait süre-absorbans verileri	56
Çizelge 4.7 : Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen regrasyon eşitlikleri ve regrasyon katsayıları	59
Çizelge 4.8 : Fenollerin 4-Aminoantipirin derivatizasyonunda ters-faz HPLC ve asetonitril-su (55:45 v/v) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak elde edilen alkonma zamanları ve tayin limitleri	60
Çizelge 4.9: Baraj ve Murgul su örneklerinden elde edilen fenolik bileşiklerin miktarları	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Fenolün yapısı	2
Şekil 1.2: E vitaminin yapısı.....	7
Şekil 1.3: Fenolün labaratuvar sentezi.....	7
Şekil 1.4: Fenolün endüstriyel sentezi	7
Şekil 1.5: Sodyum benzensülfonatlardan fenol sentezi	8
Şekil 1.6: Kümen sentezi	8
Şekil 1.7: Fenollerin esterleşme tepkimesi	8
Şekil 1.8: Fenolün bromlanması	9
Şekil 1.9: Fenolün nitrolanması.	9
Şekil 1.10: Fenolün sülfolama tepkimeleri	10
Şekil 2.1: Fenolün yapısı	19
Şekil 2.2: Rezorsinolün yapısı	19
Şekil 2.3: m-Kresolün yapısı	20
Şekil 2.4: 4-Aminoantipirin yapısı	21
Şekil 2.5: Sıvı kromatografide tabaka yüksekliği.....	27
Şekil 2.6: HPLC cihazının şematik görünümü	28
Şekil 2.7: Fenolik bileşiklerin MBTH-Ce ^{IV} ile reaksiyonu.....	38
Şekil 3.1: Fenollerin 4-Aminoantipirin ile reaksiyonları.....	47
Şekil 4.1: 1x10 ⁻⁴ M Fenol çözeltisinin spektrumu	47
Şekil 4.2: 1x10 ⁻⁴ M 4-Aminoantipirin çözeltisinin spektrumu.....	48
Şekil 4.3: 1x10 ⁻⁴ M Peroksidisülfat çözeltisinin spektrumu.....	49
Şekil 4.4: Katı sıvı ekstraksiyon kolonu.....	51
Şekil 4.5: Fenol- 4-aminoantipirin derivatizasyonunda ortamın pH'sının ürün oluşumuna etkisi	53
Şekil 4.6: Derivatizasyon reaksiyonu için reaktif konsantrasyonu- Absorbans grafiği(peroksidisülfaiçin).....	54
Şekil 4.7: Derivatizasyon reaksiyonu için reaktif konsantrasyonu- Absorbans grafiği (4-Aminoantipirin için).....	55
Şekil 4.8: Fenollerin 4-Aminoantipirin ile türevlendirilmesine zamanın etkisi.....	56
Şekil 4.9: Fenollerin 4-aminoantipirin derivitizasyonundan elde edilen standart HPLC kromotogramı (Fenol, 0.080 µg/L; m-Kresol, 0.087 µg/L ve Rezorsinol 9,23 µg/L olarak bulunmuştur. Asetonitril-su (55:45 v/v); akış hızı : 1,0 ml/dak; 50 µL enjeksiyon).....	58
Şekil 4.10: 50 µL standart fenol çözeltilerinin 4- aminoantipirin ile derivatizasyonu sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.....	59
Şekil 4.11: Artvin Borçka Barajından alınan su numunelerinden elde edilen kromotogram.....	61
Şekil 4.12: Artvin Murgul çayından alınan su numunelerinden elde edilen kromotogram.....	61

KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	: Sıvı kromatografi
UV-Vis	: Ultraviyole ve Görünür Işık
t_R	: Alıkonma zamanı
k	: Kapasite faktörü
α	: Seçicilik
R_s	: Ayırma gücü
R	: Korelasyon katsayısı
r²	: Tanımlayıcılık katsayısı
GC	: Gaz kromatografisi
N	: Tabaka sayısı
W	: Pik genişliği
$\sqrt{N}$	: Etkin tabaka sayısı
RPHPLC	: Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SEC	: Jel geçirgen sıvı kromatografisi
MS	: Kütle spektroskopisi
PVA	: Polivinil alkol
PS	: Polistiren
DVB	: Divinil benzen
ODS	: Octadecyl functionalized Slica jel

FENOLLERİN SPEKTROFOTOMETRİK HPLC TAYİNLERİ

ÖZET

Bu çalışmada, Ters-Faz Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak fenolik bileşiklerin(fenol, m-krezol ve rezorsinol) tayinleri için bir yöntem geliştirildi. Bunun için bazik ortamda peroksidisülfat varlığında 4-aminoantipirin ile türevlendirilerek UV-Gör. aktif türevlerine dönüştürülen fenolik bileşikler kloroform ile sulu fazdan ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen UV-Gör aktif fenolik türevler, HPLC sistemine enjekte edilerek asetronitril-su (%45:55 v/v) hareketli faz kompozisyonu ile ters faz C₁₈ kolonunda ayırma tabi tutuldu ve 440 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrik dedektör ile tayin edildi. Bu üç fenol için tayin süresi 14 dakikadan az ve hesaplanan tayin sınırları 50 µL su numunesi kullanıldığında 0,015 -3,666 µg/L arasında bulundu. Geliştirilen metod baraj ve nehir suyu örneklerine uygulandı. Baraj ve nehir suyundaki fenol ve m-krezol'ün ortalama konsantrasyonları 0,033 µg/L iken, rezorsinolün ortalama konsantrasyonu 12,935 mg/L olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fenolik Bileşikler, HPLC, Derivatizasyon, Aminoantipirin

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PHENOL BY HPLC

SUMMARY

In this study, a method was developed for the indications of compounds of phenol (pHenol, m-cresol and resorcinol) by using high pressure liquid chromatography (HPLC). For this study, phenolic compounds were extracted with the chloroform which were the phenolic compounds transformed into UV-Vis active derivatives that were derivatized by 4-aminoantipyrine in the existence of peroxydisulphate in alkaline medium. Extracted UV-Vis active phenolic derivatives, injected to HPLC system, were dissociated with acetonitrile-water (%45:55 v/v) mobile phase composition in reversed-phase C18 column and they were indicated with the spectrophotometric detector adjusted to 440 nm wavelength. For these three phenols, retention time of indication was less than 14 minutes and limits of detection was found between 0,015 -3,666 µg/L when 50 µL water samples was used. The developed method was applied to the dam and river water sample. The phenol in barrage and river water, resorcinol average concentration was determined as 12,935 mg/L when the average concentrations of m-cresol was 0,033 µg/L.

Key Words: Phenolic compounds, Derivatization, HPLC, Aminoantipyrine

1.GİRİŞ

Dünyadaki endüstriyel gelişmeler; hızlı nüfus artışı ve sanayileşme günden güne kullanılan su kaynaklarını hızla kirletmektedir. Bu kaynakların kirlenmesinde etkin olan türlerden biri de fenollerdir. Fenoller en zehirli kimyasalların içerisinde 11. sırada yer almaktadır. Bu yüksek toksite özelliği nedeniyle fenoller ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar; fenolik bileşiklerin sucul yaşam ve insan üzerinde toksik etki yaratığını göstermiş ve bu yüzden tehlikeli kirletici olarak tanımlanmıştır. Gerek insan hayatının metabolizmik ihtiyacı; gerekse yerleşim bölgelerinde tarımsal sulama amaçlı kullanılan suların, belirlenen risk faktörlerini de içermesi konuyu daha da önemli hale getirmektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir konsantrasyon 0,001 mg/L ve maksimum konsantrasyon değeri 0,002 mg/L olarak belirlenmiştir. Fenol konsantrasyonu 2 mg/L'nin üzerine çıktığında, deniz faunası üzerinde toksik etki gösterir ve 10 ile 100 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda ise 96 saat içinde sucul yaşamın ölmesiyle sonuçlanır [1]. Fenol, 1 µg/L gibi düşük konsantrasyonlarda bile içme suyunda önemli tat ve koku problemleri yaratır ve organizmalara zarar verir. Fenol içeren atık suların insanlar tarafından tüketilmesi kılcal damarların zarar görmesine yol açarak şiddetli ağrılara ve en sonunda da ölüme sebep olur [2].

1.1 Tezin Amacı

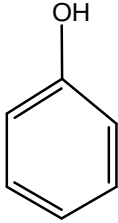
Bu çalışmada öncelikli olarak lokal bir akarsu havzası belirlenmesi ve havza içerisinde bulunması muhtemel fenolik türlerin tespitine yönelik bir metod geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak;

- 1) Düşük absorbansa sahip olan fenolik türlerin, absorbansını artırma yönünde türevlendirme ve optimizasyon çalışmaları
- 2) Türevlendirme ve optimizasyon çalışmaları sonrası fenolik bileşiklerin tespiti için HPLC ile kromatografik ayırım çalışmaları hedeflenmiştir.

1.2 Literatür Araştırması

1.2.1 Fenoller hakkında genel bilgiler

Benzen hidrojenlerinden biri veya birkaçı yerine hidroksil (OH) gruplarının girmesiyle oluşan bileşiklere genel olarak **fenol** denir. Bununla birlikte fenol, monohidroksi benzenin (C₆H₅OH) özel adıdır [3].



Şekil 1.1: Fenolün yapısı

Fenol sözcüğü, fenil sözcüğünün ilk harfi ile çifte bağa bağlı karbon üzerinde hidroksil grubu bulunduran yapıların adı olan enol sözcüğünden türetilmiştir.(Chemical Abstracts, IUPAC sistemini kullanarak süstitüe fenolleri benzenol şeklinde adlandırmakta ve örneğin o-nitrofenol yerine nitrobenzenol demektedir).

Fenol kömür katranının bir bileşenidir ve 1834 yılında bir Alman kimyager olan Friedlieb Runge tarafından izole edilmiş ve karbolik asit olarak adlandırılmıştır. Bu tarihten sonra fenolün, benzenin sülfolanması ve sülfolanma sonucu oluşan ürünün hidroliz edilmesi ile ilk defa sentetik olarak elde edilmesine kadar geçen sürede; kömür katranı fenol elde edilmesinde kullanılan tek kaynak olma özelliğini korumuştur[4]. Günümüzde ise fenol üretiminin neredeyse tamamı sentetik yollardan gerçekleşmektedir[5]. Fenol ayrıca sayısız ara ve nihai ürün için başlangıç malzemesi olarak önem taşımaktadır.

1.2.2 Fenollerin fiziksel özellikleri

Çizelge 1.1:Fenolün ana fiziksel özellikleri[42].

Özellikler	Değerler
Ticari adı	Karbolik asit, fenik asit, fenik alkol
Molekül ağırlığı (g/mol)	94,144
Molar hacim (cm ³ /mol)	90
Kaynama noktası (°C)	182
Erime noktası (°C)	43
Otomatik tutuşma sıcaklığı (°C)	715
Parlama noktası (°C)	79
Yanma noktası (°C)	85
Sıvı yoğunluğu (g/cm ³)	1.058 (20°C)
Sulu çözelti pH'ı	6
Suda moleküler dağılma gücü (cm/s)	6.0x10 ⁻⁴
Buhar basıncı (mmHg)	0,41 (25°C)
Bağıl buhar yoğunluğu	3,24 (air = 1)
Doygun hava içindeki hacim yüzdesi	0,046 % (25°C)
Doygun havanın yoğunluğu	1,00104 (air =1)
Hava su ayırma katsayısı.K _{aw} (25°C)	2.5x10 ⁻⁵
Log K _{ow}	1,46
Ayrışma sabiti	1,3x10 ⁻¹⁰
Koku eşik değeri	0,047 ppm (0,18 mg/m ³)-%100 tepki 0,006 ppm(0,02 mg/m ³)-duyarlılık
Dönüşüm faktörü	1 ppm (v/v) = mg/m ³ x 0,260 1 mg/m ³ = ppm (v/v) x 3,65
Dipol moment	1,450007
Polarize olabilirlik,[ϵ] _i	0.89
Kırılma oranı	1,54 (45 °C)
Sıvı yüzey gerilimi (dynes/cm)	36,5(55)°C
Aşırı serbest enerji(k _J /mol)	10
Aşırı entalpi(k _J /mol) [S/D]*	1/8
Aşırı entropi(j/mol K) [S/D]*	-9/-2
Asidite sabiti, pKa (25°C'da,H ₂ O içerisinde	10,02

S/D* doygun sulu çözelti

Fenoller renksiz prizmalar halinde kristallenebilen; düşük erime noktasına sahip, keskin kokusu olan bir bileşiktir[7,5]. Renksiz olan bu yapı açık havada bırakıldığında çoğu kez yükseltgenerek renkli ürünlere dönüşürler. Fenol örneğine bir miktar hidrokinon (1,4-dihidroksibenzen) eklenirse, fenolün havadaki yükseltgenmesi önlenir[8]. Basit fenol 41⁰ C de erir, ancak çok nem çekici olduğundan kısmen sıvılaşmış olarak bulunur ve bu nedenle erime noktası daha da düşer.

Fenol moleküllerinde bulunan hidroksil grupları fenollerinde alkoller gibi güçlü hidrojen bağları yapabilmesini sağlamaktadır. Su molekülleri ile yapılan bu hidrojen bağları fenolün suda çözünmesine katkıda bulunmaktadır.(fenolün sudaki çözünürlüğü 8,3 g/100 mL ile sınırlıdır) Bu hidrojen bağları, fenollerin kaynama noktalarının aynı molekül kütlesine sahip hidrokarbonların kaynama noktasından daha yüksek olmasına yol açar. Örneğin fenol ve tolueinin molekül kütleleri aynı olduğu halde, fenolün kaynama noktası (181,75° C) tolueinin kaynama noktasından (110,6° C) daha yüksektir[9].

Fenol; etil eter, metil alkol, etil alkol, karbon tetraklorür, asetik asit, gliserin, sıvı kükürtdioksit ve benzende çözünür[5].

Aşağıdaki tabloda bazı fenollere ait fiziksel özellikler yer almaktadır.

Çizelge1.2: Bazı fenollerin fiziksel özellikleri

Adı	Formülü	E.N (°C)	K.N (°C)	Suda çözünürlüğü g/100mL
Fenol	C ₆ H ₅ OH	43	182	8,3
2-Metilfenol	o-CH ₃ C ₆ H ₄ OH	30	191	2,5
3-Metilfenol	m- CH ₃ C ₆ H ₄ OH	11	201	2,6
4-Metilfenol	p- CH ₃ C ₆ H ₄ OH	35,5	201	2,3
2-Klorofenol	o-ClC ₆ H ₄ OH	8	176	2,8
3-klorofenol	m-ClC ₆ H ₄ OH	33	214	2,6
4-klorofenol	p-ClC ₆ H ₄ OH	43	220	2,7
2-Nitrofenol	o-O ₂ NC ₆ H ₄ OH	45	217	0,2
3-Nitrofenol	m-O ₂ NC ₆ H ₄ OH	96	194	1,4
4-Nitrofenol	p-O ₂ NC ₆ H ₄ OH	114	279	1,7

1.2.3 Fenollerin kimyasal özellikleri

Fenolün kimyasal özellikleri, hidroksil grubuyla aromatik halkanın birbiri üzerine birbiri üzerindeki etkileri ile belirlenir. Fenoldeki hidroksil grup fenil grubuna yüksek bir reaktivite kazandırır. Bu nedenle fenol, kuvvetli bazlarla reaksiyona girerek fenoksitler, fenolatlar ve fenatları meydana getirir.

Fenoller yapısal olarak alkollere benzemesine rağmen, onlardan çok daha farklı moleküllerdir. Fenollerde benzen halkasına bağlanmış olan hidroksil grubu, alkoldekinden daha güçlü biçimde kutuplaşmış olduğundan, fenoller hidrojenle daha sıkı bağlar kurmaktadır. Fenoller su içerisinde, su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Fenollerle alkolleri ayıran bir diğer önemli fark ise fenollerin zayıf asidik özellik taşımasıdır. Bu asitlik karboksilik asitlerden az, alkollerden fazla olduğundan suda çözünmeyen fenoller, alkali bikarbonat çözeltilerinde çözünmez, fakat seyreltik alkali hidroksitlerde fenolat vererek çözünür. Aromatik halkada elektron veren süstitüentler ve metil grubu fenolün asitliğini zayıflatır; buna karşılık nitro ve siyano gibi kuvvetli elektron çekici süstitüentler fenolün asidik etkisini belirgin bir şekilde artırır; halojenlerde asitliği artırıcı etki yapan süstitüentlerdir. Nitro grubunun ise hidroksile göre orto ya da para konumda olması durumunda fenolün asitliği daha fazla artar. Bunun nedeni bu konumdaki nitro grubunun fenol hidroksiti ile daha kolay rezonansa girebilmesidir; o halde hidroksil grubunun asidik özelliği, rezonans nedeniyle hidroksil oksijeninin pozitif yük kazanmasından ve bunun sonucunda hidrojenin proton halinde atılabilmesinden ileri gelmektedir. Zayıf asidik özellik taşıyan bazı fenollere ait örnekler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 1.3: Fenollerin asitlik sabitleri[43].

Adı	pKa (25°C'da, H ₂ O içerisinde)
Fenol	10.02
2-Klorofenol	8.52
3-Klorofenol	8.80
4-Klorofenol	9.41

Deneyssel ve teorik sonuçlarda, fenolün daha kuvvetli asit olmasının başlıca nedeni olarak, -OH oksijeninin daha fazla pozitif olmasına yol açan elektrik yükü

dağılımı, dolayısıyla protonun daha gevşek tutulması gösterilmektedir. Gerçekte fenolün benzen halkası, sikloheksanolün sikloheksan halkasıyla karşılaştırıldığında, sanki elektron çekici bir grupmuş gibi davranır. Elektron dağılımını etkileyen diğer bir etken olarak, toplam rezonans melezine gösterilen rezonans yapıları katkı sağlar. Fenolün rezonans yapıları aşağıdaki şekilde gösterilebilir. Bu rezonans aynı zamanda fenolün asidik karakterini destekleyen elektron sirkülasyonunu da belirtmektedir.

1.2.4 Fenollerin sınıflandırılması

Fenoller, aromatik bileşikler arasında önemli bir sınıftır. Başlıca 3 tipte bulunabilirler.

1.2.4.1 Monohidroksifenoller

Aromatik bileşikler arasında en önemli organikler olarak bilinir. Aslında bu bileşikler ilk bakışta alkol izlenimi verse de, suda çok sınırlı olan ($K_a = 1,2 \times 10^{-10}$) hidrolizi sırasında az miktarda H^+ ve fenil köküne ayrışır ve bu nedenle zayıf bir asit gibi davranır.

1.2.4.2 Krezoller

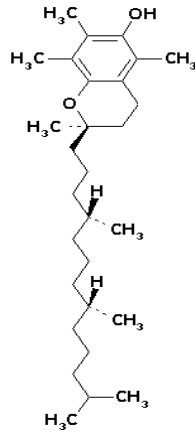
Kömür katranı ve petrolün parçalanma ürünleri içinde bulunan aromatik hidrokarbon bileşikleridir. Fenollere bir metil gurubu bağlanmasıyla oluşan kresolün üç türü bulunmaktadır. Bunları; ortokresoller, metakresoller ve parakresoller olarak sınıflandırabiliriz.

Sentezlenme yolları: Kömür katranının veya petrolden elde edilen naftanın, rafinasyonu ile elde edilir. Kresoller sentetik olarak ise; toluenin sülfatlanmasıyla veya klorlandırılması ile de elde edilebilmektedir.

Kullanım alanları: Antiseptik olarak (lizoller gibi), plastiklerin kırılgenliğini önlemede ve bazı böcek türlerinin yok edilmesinde kullanılmaktadır.

1.2.4.3 Polihidroksifenoller

Tıbbi bitkiler ve gıdalardaki fenolik bileşikler polifenoller veya polihidroksifenoller adıyla bilinmektedir. Polifenoller kolayca okside olma özelliği sayesinde antioksidan aktiveye sahiptirler. Örneğin E vitaminin yapısında yer alan alfa tokoferoller bu yapıya örnektir.

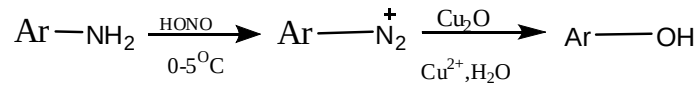


Şekil 1.2: E vitaminin yapısı

1.2.5 Fenollerin sentezleri

1.2.5.1 Labaratuvar sentezleri

Fenollerin en önemli laboratuvar sentezi, arendiazonyum tuzlarının hidrolizidir. Diazolama basamağı ve hidroliz basamağı için gerekli koşullar ılımandır. Yani, halkadaki diğer gruplar fazla etkilenmez. Genel tepkime diazonyum tuzları üzerinden gerçekleşir.

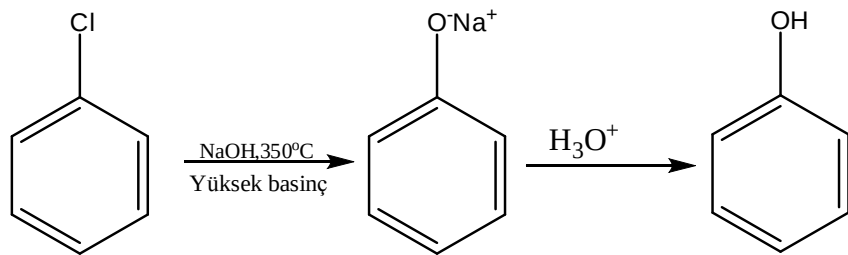


Şekil 1.3: Fenolün labaratuvar sentezi

1.2.5.2 Endüstriyel Sentezleri

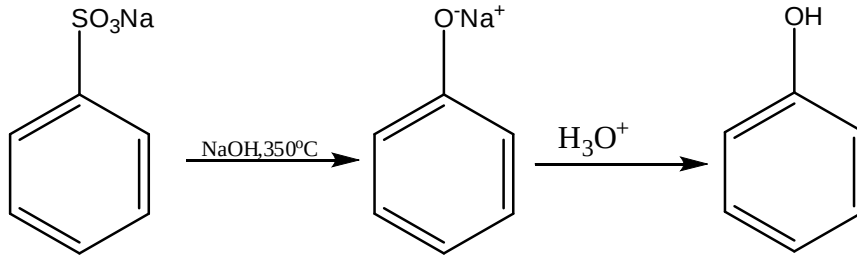
Fenol oldukça önemli bir endüstriyel kimyasaldır; aspirinden çeşitli plastitlere kadar pek çok ticari ürünün ham maddesidir. Dünyada yıllık üretimi 3 milyon tondan fazladır. Fenolün ticari sentezinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

a-) Dow işlemi.



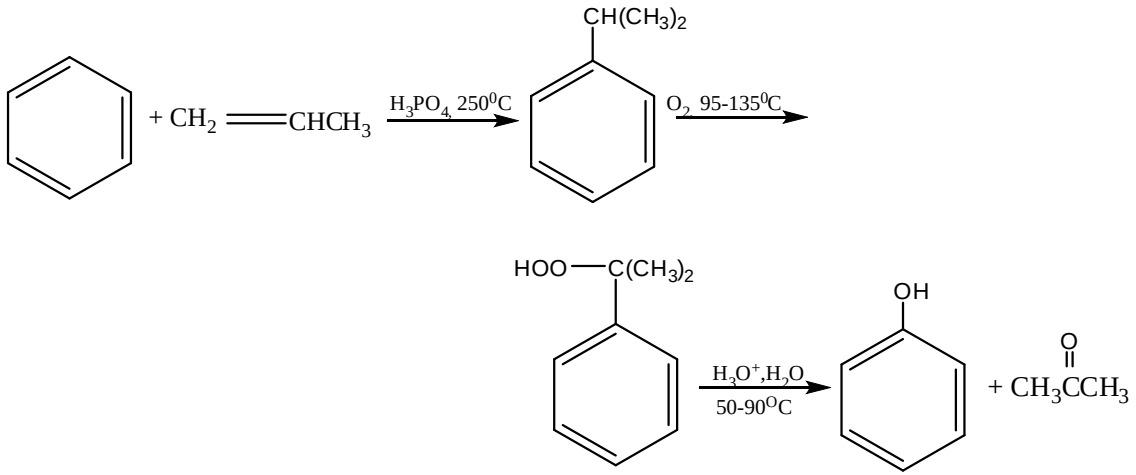
Şekil 1.4: Fenolün endüstriyel sentezi

b-) Sodyum benzensülfonatlardan,



Şekil 1.5: Sodyum benzensülfonatlardan fenol sentezi

c-) Kümen sentezi

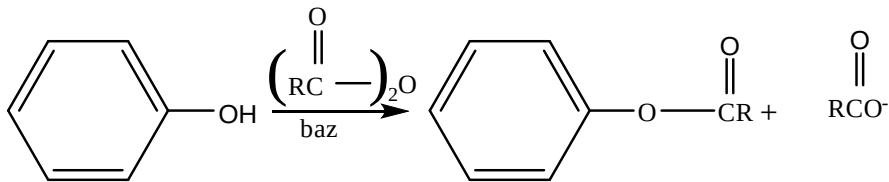


Şekil 1.6: Kümen sentezi

1.2.6 Fenollerin tepkimeleri

1.2.6.1 Esterleşme tepkimesi

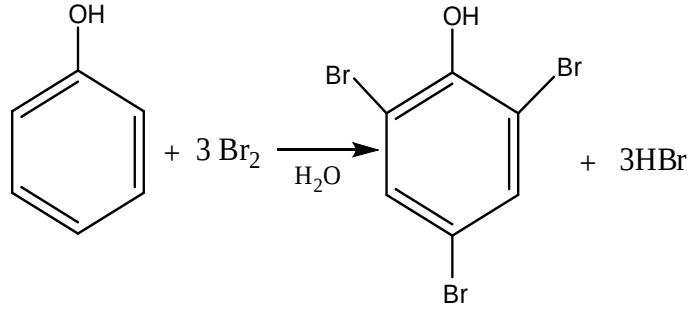
Fenoller karboksilik asit anhidritleri ve asit klorürlerle tepkimeye girerek esterleri verirler. Bu tepkimeler alkollerin tepkimelerine çok benzer.



Şekil 1.7: Fenollerin esterleşme tepkimesi

1.2.6.2. Benzen halkasının tepkimeleri

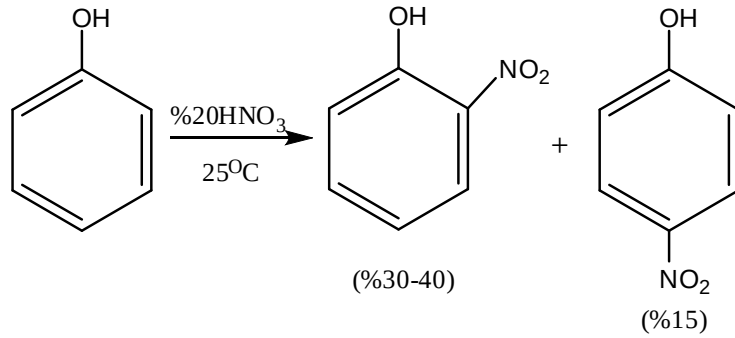
Bromlama: Hidroksil grubu elektrofilik yer değiştirmelerde güçlü bir etkinleştirici ve orto-para yönlendirici bir gruptur. Fenol kendiliğinden sulu çözeltideki brom ile etkileşir ve 2.4.6 tribromfenol ' e dönüşür.



şekil 1.8: Fenolün bromlanması

Nitrolama:

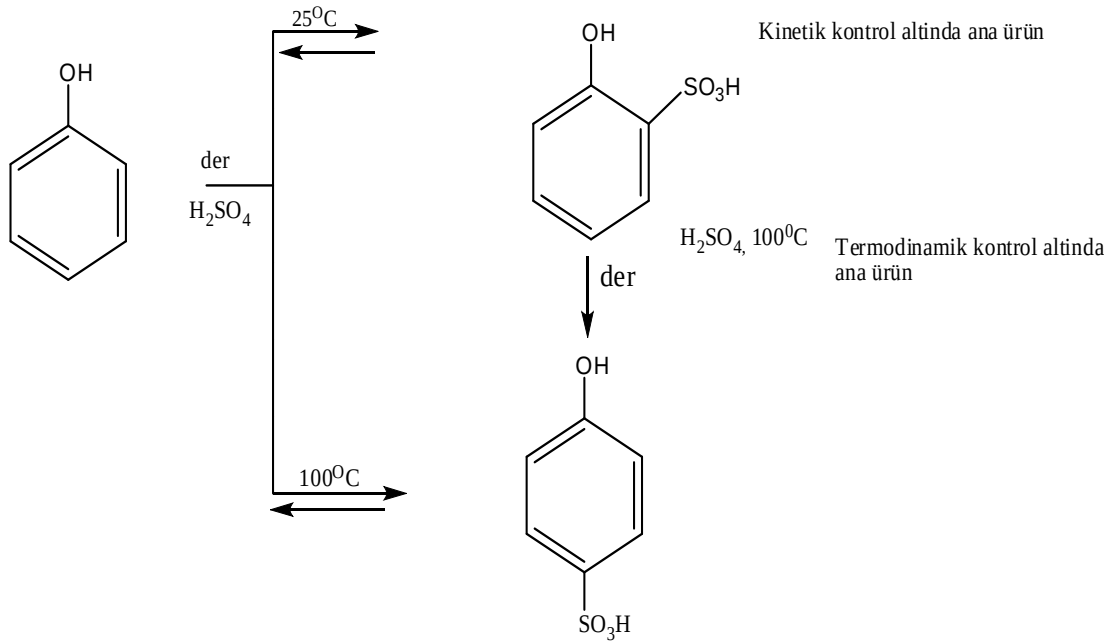
Fenolün seyreltik nitrik asitle tepkimeye girerek o- ve p-nitrofenolün bir karışımını vermesi işlemidir.



şekil 1.9: Fenolün nitrolanması

Sülfolama:

Fenol, derişik sülfürik asitle 25 C' da tepkimeye girerek başlıca orto-sülfolanmış ürünü; 100 C' da ise başlıca para-sülfolanmış ürünü verir.



Şekil 1.10: Fenolün sülfolanma tepkimeleri

1.2.7 Fenollerin kullanım alanları

1930'lu yıllarda bakalit gibi fenol-formaldehit reçinelerin üretiminde kullanılan fenol, Birinci Dünya Savaşı yıllarında patlayıcı yapımında kullanılan pikrik asit üretiminde kullanılmıştır. Günümüzde ise pikrik asit, ilaç, boya ve patlayıcı sanayinde kullanılmaktadır.

Plastiklerin en önemli bileşenlerinden olan fenoller, dünyada ve Türkiye'de en çok fenolik reçine üretiminde, kauçuk işleme, izolasyon ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Fenoller ayrıca ilaç boya ve pestisitlerde de ham madde olarak kullanılır[10].

Fenolün ticari olarak en çok kullanıldığı alan, formaldehitler ile girdikleri kondenzasyon reaksiyonu sonucu oluşturdukları Bisfenol A (difenil propan) üretimidir. Epoksi reçinelerin üretiminde ise orta derecede kullanım alanına sahiptir[11].

Fenol ve fenolün klorlanmış formları pestisit olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. 4-klorofenol, kimyasal aracı madde olarak, mineral yağların arıtımında seçici çözücüdür. 4-klorofenol tuzları gazolin için anti yapıştırıcı ajan, yakıt gazlarının saflaştırılmasında yıkama sıvısı ve mikrop öldürücü (germisit) olarak kullanılır. 4-klorofenol ve onun alkali metal tuzları m-kresol ya da fenolden daha iyi mikrop öldürücü güce sahiptir[12].

Fenol ve türevlerin kullanım alanları çizelge 1.4' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4: Fenollerin kullanım alanları

Fenol	Fenolik Reçineler	Kağıt sanayii Kauçuk işleme sanayii Kalıplama Tabaka haline getirilmiş reçineler Bağlayıcı olarak İzolasyon malzemesi
	Bisfenol A	Epoksi Reçineler Polikarbonat reçineler Fenoksi reçineler Polisülfon reçineler Korozyona dirençli poliestерler
	Klorofenoller	Boya sanayii İlaç sanayii
	Siklohekzanon	Adipik asit Kaproaktam Çözücü olarak
	Alkil Fenoller	Fenolik reçineler Antioksidanlar Plastikleştiriciler
	Oktil Fenoller	Yüzey aktif maddeler Plastikleştiriciler Antioksidanlar
	Dallanmış Nonil Fenol	Yüzey aktif maddeler Yağlama yağı katkıları Fenolik reçineler
	Sodyum Fenat	Salisilik asit → aspirin, boya, ilaç Anisol → insektisit, parfüm, çözücü
	Pikrik Asit	Boya İlaç Patlayıcılar
	2,4-Diklorofenoksiasetikasit	Esterler Amin tuzları → Herbisitler
	Dallanmış Dodesil Fenol	Yağlama yağı katkıları Yüzey aktif maddeler
	Fenil Fosfatlar	Plastikleştiriciler Yüzey aktif maddeler
	Anilin	İzosiyanatlar Boya sanayii Kauçuk sanayii İlaç sanayii

1.2.8 Çevresel fenol kaynakları

Fenolün, doğal ve antropojenik (insan kaynaklı) olmak üzere iki kaynağı bulunmaktadır. Doğal kaynaklı fenol, yiyeceklerin, insan ve hayvan atıklarının, bazı organik maddelerin çürümesi ve orman yangınları sonucunda ortama bırakılır. Benzenin güneş ışığı vasıtasıyla atmosferik olarak parçalanması, bir diğer doğal fenol kaynağıdır.

Fenolün antropojenik kaynakları ise, otomobil egzoz gazları, sigara dumanı, ısınma amaçlı yakılan odunlar, kimyasal üretim prosesleri; ilaç endüstrisi ve peptisit üretim tesislerinden kaynaklanan atıklardır.

Çizelge 1.5: Çevresel fenol kaynakları

Kaynak	Fenole Dönüşebilen Bileşikler
Petrol rafineri	Hidrojarbonlar, (alkanlar, sikloalkanlar, poliaromatik hidrokarbonlar). Benzenler, toluenler, substitue benzenler, n-oktanlar, n-dekanlar, naftalinler, bifeniller, fenol, siyanür, sülfat ve amonyak
Petrokimyasallar	Naftalin, heptanlar, benzenler, bütadiyen, C-4 alkoller, fenol ve resorkinol
Temel Organik Kimyasal Üretimi	m-amino fenol, resorkinol, dinitrofenol, P-nitrofenol, trinitrofenol, benzen sülfonik asit, anilin, klorobenzenler, toluenler, benzoik asit
Kömür Arıtım Tesisleri	Fenol, katekol, o-, m-, p- krezoller, resorkinol, hidrokuinon, pirogallol, pollaromatik hidrokarbonlar, pridinler, pikolinler, lutidinler, ksilenler, toluenler, benzoik asit
İlaç Endüstrisi	Toluenler, benzil alkoller, fenil asetik asit, benzenin klorlu ürünü, kloroform, eter, etil alkol
Tabakhane	Tanen, katekhin, fenol, klorofenol, nitrofenoller
Selüloz ve Kâğıt Fabrikaları	Lignin, vanilin, vanillik asit, dehidrovanilin, ferulik asit, kinamik asit, gentisik asit, benzoik asit, katekol, fenoller ve klorofenoller

1.2.9 Fenol ve fenol türevlerinin canlılar üzerine etkisi

Fenoller, düşük konsantrasyonlarda bile organizmalara zararlı oldukları için öncelikli kirleticiler, insan sağlığına olası zararlarından dolayı ise tehlikeli kirleticiler sınıfında

yer almaktadır. Fenoller insan sağlığı üzerinde akut ve kronik etkilere sahiptir. Ağız ya da deri yoluyla fenole maruz kalındığında ağıza, deriye, gözlere ve mukozaya büyük oranda zarar vermektedir. Bu ters etkiler fenolün akut (fenole maruz kalma süresi 14 günden az olduğu durumlar) etkisi olarak bilinmektedir. Kronik maruz kalma sonucunda oluşan etkiler (365 günden daha fazla) ise, iştahsızlık, ileri derecede kilo kaybı, ishal, baş dönmesi, idrarda siyah renk oluşumu, sindirim sisteminde tahriş gözlenmekte, kan basıncındaki değişim sonucu karaciğer ve böbrekte hasar ortaya çıkabilmekte, sinir sistemi negatif olarak etkilenmektedir.

Fenolik bileşikler, WHO tarafından belirlenen 126 öncelikli kirletici arasında 11. sırada yer almaktadır. En önemli nokta zehirli kirleticilerin besin zinciri içinde birikmeleridir. Bu ise insanlar için kanserojen etkiye neden olmaktadır[13].

Fenol deri yoluyla absorbe edildiğinde toksik bir maddedir. Fenolle temas eden deri yüzeyi el veya ön kol kadar küçük bir yüzey dahi olsa ölümle sonuçlanabilir. Deriyle teması da tehlikeli ve açık yanıklara sebep olur[5].

şiddetli fenol zehirlenmelerinde, esas etki merkezi sinir sistemi üzerindedir. [5]. Bu etki, vücut ısısının ani olarak düşmesi ile birlikte merkezi sinir sisteminde felç seklinde kendini gösterir. Bu esnada karakteristik kasılmalar meydana gelir[6]. Fenolün göz ile temas etmesi halinde ise gözler bol sıcak su ile yıkanmalıdır. (Fenolün gözle teması halinde gelen tahribatın önlenmesi mümkün değildir). Bundan sonra ise hemen bir doktora başvurulmalıdır, çünkü bazı durumlarda absorbe edilen fenolün kandan süzülmesi sırasında böbreklere verdiği zarar ölümcül olabilir. Bu tip fenol zehirlenmelerinin karakteristik belirtisi idrarın yeşil, kahverengi ve hatta siyah renkli olmasıdır[5]. Fenol bir lokal anesteziktir, bu nedenle de ilk temasta acı duyulmaz[5]. Çok kısa bir sürede o bölgede uyuşma ve hissizlik baslar ve kişi zehirlenme tehlikesinin farkına bile varmaz. Yanma hissedildiğinde ise fenol derinin içine çoktan nüfuz etmiştir. Acının kaybolması, fenolün vücuttan çıktığı anlamına gelmez[5].

Fenolün yaklaşık 10 cm²'lik bir deri yüzeyinden absorbe olması halinde ölüm meydana gelir. Ölümden önce böbreklere, karaciğere, pankreasa, dalağa ve akciğere tahribat yapabilir. Emilen fenol, böbrekler tarafından kısmen atılır, kısmen okside olur[14]. Vücuttan atılan bölümün bir kısmı sülfürik asit ve glikoronik asitle birleşir, geri kalanı ise değişmeden atılır. Derinin üzerine fenol dökülmesini takiben 15-20

dakika içinde belirtiler hızla gelişir. Bas ağrısı, bas dönmesi, adale zayıflaması, görme bozukluğu, kulak çınlaması, düzensiz ve hızlı nefes alma, zayıf nabız ve hazımsızlık görülür. Bunu takiben şuur kaybı, bayılma ve ölüm gelir[15]. Dâhilen alındığı zaman, kusma ile birlikte veya kusma olmaksızın mide bulantısı, şiddetli karın ağrısı ve dudaklarda, ağızda, boğazda, yemek borusunda ve midede tahribata da yol açar. Delik bile olabilir. Deri yüzeyinde etkilenen bölgeler beyaz, buruşuk ve yumuşamıştır. Genellikle hemen ağrıdan şikâyet edilmez. Daha sonra lokal anesteziyi takiben şiddetli yanma hissedilir. Ağız yoluyla LD50 (sıçanlarda) =530' mg/kg'dır[14].

Ağız yolu ile akut LD 50 deyiminden, deneme sıçanlarına ağız yoluyla bir defada verildiği zaman bunların %50'sini öldüren ve deneme hayvanlarının vücut ağırlığının her kilogramı için miligram olarak ifade edilen o ilacın etkili miktarından bahsedilmektedir.[45]

Uzun süreli düşük buhar konsantrasyonlarına maruz kalma ile ortaya çıkan kronik zehirlenme, kusma, yutkunma zorluğu, aşırı tükürük salgılama gibi rahatsızlıklar; bas ağrısı, bayılma, bas dönmesi, zihin rahatsızlıkları gibi sinirsel bozukluklara sebep olabilir. Kronik zehirlenme karaciğer ya da böbreklere aşırı zarar verdiği durumda ölüm ile sonuçlanabilir [13].

Fenol veya fenol içeren ürünler ile temastan kaynaklanan deri ile ilgili problemler endüstride oldukça yaygındır. Yaygın bir hava kirleticisidir. 1,5 g (ağız yoluyla) kadar çok küçük miktarı bile öldürür[16]. Fenol buharı teneffüs edildiğinde solunum yollarına ciddi şekilde zarar verir. Kapalı çalışma mahallerinde izin verilen maksimum fenol konsantrasyonu 5 ppm'dir. Ancak solunum yolları zehirlenmeleri oldukça seyrektir[6]. Fenol oda sıcaklığında herhangi bir yangın tehlikesi yaratmaz. Fenol buharı için en düşük alev alma sınırı havanın % 1,5'dir. Yüksek sıcaklıklarda alevlenebilir ve toksik buhar çıkartır. Fenolün parlama noktası 85 °C dir .Özellikle endüstri bölgelerinde fenolün yer altı sularına karışması sonucu içme sularının tadı bozulsa dahi bu yolla zehirlenme korkutucu boyutta değildir[6].

Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir konsantrasyon 0,001 mg/L ve izin verilebilecek maksimum konsantrasyon 0,002 mg/L olarak belirlenmiştir.

Fenolün tıbbi kullanımları sonucunda, olumlu etkileri de gözlenmiştir. Deriye az miktarda uygulandığında, antiseptik özellik gösterir. Anestezikler (ağrı dindirir) ve boğaz ağrılarında kullanılan boğaz pastilleri, boğaz spreyleri ve gargaranın içinde bulunur. Sudaki fenolün az miktarda sinir dokusuna enjekte edilmesi acıyı azaltır. Fenol, deriye temas ederse derinin dış tabakalarını yok eder ve az miktarda konsantre fenol çözeltisi bazen siğil ve diğer deri lekelerini gidermek amacıyla kullanılır.

1.2.10 Sularda fenoller ve bulunma şekilleri

Fenollerin sularda çok düşük konsantrasyonlarda (0,01 – 0,1 mg/L) bile bulunmaları sonucu suyun tadı ve kokusu bozulmaktadır. Klorlanmış içme sularında fenolün mevcudiyeti sonucu çok tehlikeli olan ve kanserojen etkiye sahip poliklorlu fenoller oluşabilir.

Kimyasal olarak canlı hücreleri yok etmek için kullanılan klorofenollerin tat ve koku başlangıç değerleri düşüktür. Kokulu birçok klorofenol bileşiğinin (monoklorofenol ve diklorofenol) tat başlangıç değeri olarak içme suyunda 0,1 ng/L den fazla klorofenoller bulunmamalıdır. Yalnız fenol ve pentaklorürler hariç tutulmalıdır, çünkü bu bileşikler tat değeri 100 ng/ L dir. Eğer suda 100 ng/Lnin üstünde fenol varsa bu suya klorlama yapılmaz.Fenollü sular klorlandıktan sonra esas reaksiyon ürünü olarak 2 ve 4-klorofenol, 2, 4 diklorofenol ve 2, 4, 6, triklorfenol meydana gelir.Yeraltı suyunu da içinde bulunduran kirlenmiş ham su 1 - 10 ng/L fenol ve mono, diklorofenol ihtiva eder. İçme suyunda da aynı miktarda bulunur. Ham suda 1 -10 ng/L tri ve tetraklorofenol izlenmiştir. Nadir olarak daha yüksek miktarda olabilir[17].

1.2.10.1 Atık sulardaki fenoller

Endüstriyel proseslerde fenol ve fenol türevleri sıkça kullanılmakta ve bu endüstrilerden çıkan atıklar atık sulardaki fenolik bileşiklerin kaynağını oluşturmaktadır. Fenolik atıklar, özellikle rafineri ve kok fırını atıkları büyük miktarda özel arıtma gerektiren atık gruplarını kapsar. Yağ ve siyanidler genellikle fenolik atık sularda büyük miktarda bulunurlar ve bunların giderilmesi ekonomik dezavantajlarına rağmen fenol giderilmesinden önce istenebilir[7].

Ham su ve içme suyunda bulunan bazı fenollere ait limit değerleri; aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge1.6 : Ham su ve içme suyunda bulunan bazı fenollere ait limit değerler

Bileşikler	İzlenen maksimum kons.		Koku başlangıç kons. (µg/L t)*	Tat başlangıç kons. (µg/L t)*	Tipik limitler	
	Ham suda (µg/L t)	İçme suyunda (µg/L t)			Zehir yapıcı kons.	Kanser yapıcı kons.
Fenol	100	1	1000	100	3000	-
2 klorofenol	10	1	1	1	-	-
4 Klorofenol	10	1	1	1	-	-
2,4 Diklorofenol	10	10	1	1	3000	-
2,6 Diklorofenol	10	1	10	1	-	-
2.4.5 Triklorofenol	1	<0,1	100	1	2600	(X)
2.4.6 Triklorofenol	1	1	100	-	1	12
2.3.4.6 Tetraklorofenol	<0,1	<0,1	1000	1	-	-
Pentaklorofenol	1	1	1000	100	21	-

Pentaklorofenol istisna kabul edilerek zehirlilik limitleri hesaplanmıştır.

(X) : Çevrede bu bileşiğin davranışı farklıdır. Ayrı tasfiye edilmelidir.

(*): Literatürde başlangıç değerleri değişiklik göstermektedir.

1.2.11 Fenol arıtma yöntemleri

Fenol içeren atık suların arıtımlarında, biyolojik yöntemler, organik çözücüler ile ekstraksiyon, adsorpsiyon prosesleri, kimyasal oksidasyon ve koagülasyon, flokülasyon gibi fiziksel ve kimyasal yöntemler sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin birbirlerine göre avantajları ve dez avantajları vardır. Ayrıca bu yöntemler tek başına uygulanabilirlerse de, genellikle arıtım tesislerinde bu yöntemlerin iki ya da daha fazlası bir arada uygulanmaktadır.

1.2.11.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon sulardan kirleticilerin uzaklaştırılmasında etkin bir yoldur[18]. Pek çok araştırmacı adsorpsiyon prosesinin fenol giderilmesi için temel mekanizma olduğunu göstermiştir[19]. Özellikle çok büyük yüzey alanına sahip olduğu için sulardan giderilmesi mutlaka gerekli olan organiklerin adsorpsiyonunda kullanılır.

Adsorpsiyon Vander-Waals kuvvetlerinin bir sonucu olarak ve/veya aktif karbon yüzeyi üzerindeki diğer adsorpsiyon yüzeylerinde oluşan daha zayıf yük transferi komplekslerinin bir sonucu olarak oluşur[20].Çözünmüş moleküller karbonun yapısındaki gözeneklere nüfuz ederek çözeltiden ayrılır. Aktif karbon ile adsorpsiyon, geleneksel arıtma yöntemleriyle giderilmesi zor olan organiklerin sulardan uzaklaştırılmasında tercih edilir[21].

1.2.11.2 Elektrokimyasal arıtım

Elektrokimya endüstriyel atık su arıtımında yeni ve ilginç yaklaşımlar sunmaktadır. Özellikle elektrokimyasal dönüşüm kirletici konsantrasyonu düşük, çok toksik atıklar için cazip bir arıtma yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Elektrokimyasal arıtımda kullanılan ana reaktif elektrondur ve ayrıca bir kimyasal madde ilavesi gerektirmeden reaksiyon elektrotlar vasıtasıyla yürütülmektedir[22]. Elektrokimyasal arıtım tekniği çoğunlukla kullanılan anodun tipine bağlı olsa da, atık suyun özelliklerine ve işlem şartlarına da bağlıdır ve son yıllarda pilot ölçekli fabrikalarda denenmektedir[23].

1.2.11.3 Kimyasal oksidasyon

Kimyasal oksidasyon, serbest veya bir bileşik yapısında bulunan bir elementin oksidasyon düzeyinin diğer bir deyimle değerliğinin yükseltilmesiyle sağlanır. Bazı kimyasal arıtım metotları ile (ultraviyole ışın, ozon ya da hidrojen peroksit ile muamele) sudaki klorlu hidrokarbonlar parçalanabilmektedir. Ancak bu proseslerin yüksek işletme ücretlerine rağmen oluşan düşük arıtma verimleri kullanım alanlarını sınırlamaktadır[24].

1.2.11.4 İleri oksidasyon prosesleri (İOP)

İOP oldukça etkili hidroksil radikallerinin ($\text{OH}\cdot$, redoks potansiyeli=2.8 V) oluşumuna dayalı bir yöntem olup, toksik ve kalıcı özellikteki organik maddeleri

zararsız son ürünlere dönüştürebilmektedir. Hidroksil radikalleri hemen hemen hiç organik madde ayrımı yapmadan oksidasyon reaksiyonuna girerek, uygun reaksiyon şartlarında organik kirleticinin tamamen mineralizasyona uğramasını, CO₂ ve H₂O gibi son ürünlerin oluşmasını sağlamaktadır[25].

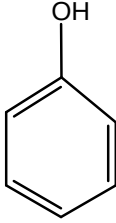
1.2.11.5 Biyolojik arıtım

Biyolojik arıtım birçok atık türünün arıtılmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Doğada kendiliğinden var olan bu arıtım yöntemi teknolojik imkanlar kullanılarak çok miktarda atığın hızlı ve kontrollü olarak arıtılmasını temin etmektedir. Biyolojik arıtım aerobik ve anaerobik arıtım olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmakta ve aktif çamur, damlatmalı filtreler, stabilizasyon havuzları, lagünler ve oksidasyon hendekleri gibi çeşitli prosesler kullanılabilmektedir[26].

2.KURAMSAL TEMELLER

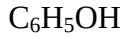
2.1 Çalışmada Kullanılan Maddelerin Fiziksel Özellikleri

2.1.1 Fenol



Şekil 2.1:Fenolün yapısı

Kapalı Formül



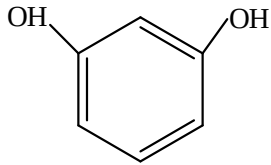
Sistemik Adı

Benzenol

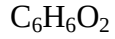
Fiziksel Özellikleri

Fenoller renksiz prizmalar halinde kristallenebilen; düşük erime noktasına sahip, keskin kokusu olan bir bileşiktir. Basit fenol 41⁰C de erir, ancak çok nem çekici olduğundan kısmen sıvılaşmış olarak bulunur ve bu nedenle erime noktası daha da düşer. Etil eter, metil alkol, etil alkol, karbon tetraklorür, asetik asit, gliserin, sıvı kükürtdioksit ve benzende çözünür. Molekül kütlesi 94,144 g/mol dır.

2.1.2 Rezorsinol



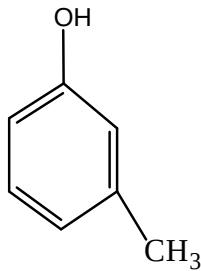
Şekil 2.2: Rezorsinolün yapısı

Kapalı Formül**Sistemantik Adı**

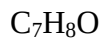
m-dihidroksibenzen

Fiziksel Özellikleri

Rezorsinol kokusuz katı beyaz renkli bir bileşiktir. pH değeri 20 °C de 100 g/Lde 4-6 arasındadır. Parlama noktasına 127 °C dir . Su içerisindeki çözünürlüğü 20°C’ de 1.000 g/L dir. Erime noktası 109-111 °C ve Molekül kütlesi 110.11 g/mol dür.

2.1.3 m- Krezol**Formül**

Şekil 2.3: m-Kresolün yapısı

Kapalı Formül**Sistemantik Adı**

4-Metil fenol; 4- hidroksitoluen

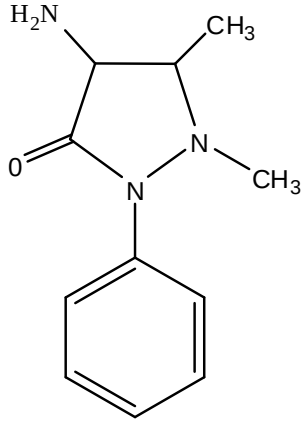
Fiziksel Özellikleri

Kresol kömür katranı ve petrolün parçalanma ürünleri içinde bulunan araomatik bir bileşiktir. $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ kapalı formülü bulunan bileşiğin, orto, para ve meta olmak üzere üç izomeri bulunmaktadır. Meta kresol, sıvı olduğu halde orto ve para kresol kristal haldedir. Su içerisindeki çözünürlüğü 20 °C’ de 20 g/L dir. Parlama noktası 86 °C dir.

Erime noktası 32-34 °C ve Molekül Kütlesi 108.14 g/mol dür.

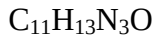
2.1.4 4-Aminoantipirin

Formül



Şekil 2.4: 4-aminoantipirinin yapısı

Kapalı Formül



Sistemik Adı

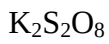
4-Amino-1,5-dimetil-2-fenil-3-pirazolon

Fiziksel Özellikleri

4-aminoantipirin kokusuz sarı renkli bir tozudur. Soğuk suda çözünmemekte, metanol ve dietileter içerisinde ise kısmen çözünmektedir. Parlama noktasına sahip değildir. Erime noktası 108 °C (226,4 °F) ve Molekül ağırlığı 203,24 g/mol dır.

2.1.5 Potasyum peroksidisülfat

Kapalı Formül



Fiziksel Özellikleri

Potasyum peroksidisülfat kokusuz beyaz renkli bir tozudur. Sudaki çözünürlüğü 50 g/L 20 °C'de, 210 g/L 60 °C dir. Molekül ağırlığı 270,3 g/mol dır.

2.2 Fenolün Kantitatif Analizinde Kullanılan Yöntemler

- Yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC)
- Elektrokimyasal kapiler elektroforez (CE)
- Kâğıt elektoroforezi
- İnce tabaka kromatografisi (İTK)
- Gaz kromatografisi (GC)
- Mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopi (MIP-ES)

2.3 Kromatografi

Kromatografi genel anlamda bir karışımı oluşturan bileşiklerin veya maddelerin iki ayrı faz arasında ve bu fazlardaki hareket hızlarının veya alıkoma sürelerinin farklılıklarına dayanarak hem nitelik hem de nicelik olarak ayrıştırılması işlemidir.

Modern kromatografide karışımın ayrıştırılmasında iki farklı faz kullanılır, bunlar sabit faz ve hareketli fazlardır. Sabit faz sıvı da olabilir katı faz da olabilir. Hareketli veya taşıyıcı denilen faz ise hem sıvı hem de gaz fazında olabilir. Hareketli fazın gaz olması durumunda, sistem Gaz Kromatografisi (GC) diye tanımlanmaktadır. Taşıyıcı ya da hareketli kısmın sıvı olması durumunda ise Sıvı Kromatografisinden (LC) söz etmek mümkündür.

Kromatografide bazı önemli kavramlar kapasite faktörü, seçicilik, ayırma gücü ve etkin tabaka sayısıdır. Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı, t_R , ile tanımlanır. Ters faz sıvı kromatografide mobil fazın organik modifiyeri arttıkça, mobil faz polaritesi ve çözünenin alıkonması azalır. Bu değer, mobil fazın akis hızı ve kolon uzunluğu ile de değişir. t_0 , durgun fazda hiç tutulmayan bir türe ait pikin geliş süresi veya ölü hacmidir ve hareketli fazın ortalama göç hızını verir. Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen 'k', yararlanılır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

olarak verilir. Burada t_R , bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma

$$k = x_{HA} \cdot k_{HA} + x_{A^-} \cdot k_{A^-} \quad (2.2)$$

Eşitlik 2' de monopratik bir asitin kapasite faktörü yazıldığında;

$$k = \frac{[HA] k_{HA} + [A^-] k_{A^-}}{[HA] + [A^-]} \quad (2.3)$$

eşitliği elde edilir. RPHPLC de yüklü türlerin tutulması, genellikle nötrallerden daha azdır. Zayıf bir monopratik asitin ODS veya polimer esaslı kolonda tutulması ile ilgili kapasite faktörü ve mobil faz pH'sı arasındaki ilişki eşitlik 2'3'deki bağıntı ile verilir[27]. k değerinin büyük olması, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında k , mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır, k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz, k çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır. İyonlaşabilen bir türe ait kapasite faktörü, türlerin mobil fazdaki mol kesirlerine bağlı olarak çözünenin iyonik ve nötral formlarının ağırlıklı ortalaması olarak verilebilir[28].

Monopratik asitler için termodinamik ayrışma sabiti;

$$K_a = \frac{[A^-] \gamma_{A^-}}{[HA]} \quad (2.4)$$

olarak verilebilir. Eşitlik 4'ü eşitlik 3'de yerine yazdığımızda;

$$k = \frac{k_{HA} + k_{A^-} \cdot K_a / \gamma_{A^-}}{1 + K_a / \gamma_{A^-}} \quad (2.5)$$

Eşitlik 5 doğrusal olarak;

$$k (1 + K_a / \gamma^{a_{H^+}}) = k_{HA} + k_{A^-} \cdot K_a / \gamma^{a_{H^+}} \quad (2.6)$$

ifade edilebilir. Molar aktivite katsayisi, γ , klasik Debye-Hückel esitligi ile bulunabilir.

$$\log \gamma = \frac{-AI^{1/2}}{1+a_0BI^{1/2}} \quad (2.7)$$

Burada A ve B değerleri Debye-Hückel sabitleri ve a_0 ise organik çözücü-su karışımlarında iyon çapı parametresidir. Esitlik 7'deki iyon çapı parametresinin değeri IUPAC' n tavsiyeleri doğrultusunda Bates-Guggenheim eşitliği ile bulunabilir.

$$(a_0 B)_T = 1,5 [\epsilon^w \rho^s / (\epsilon^w \rho^s)]_T^{1/2} \quad (2.8)$$

w ve s üst indisleri sırasıyla su ve organik karışımını, T alt indisi uygun sıcaklığı, ϵ , dielektrik sabitini, ρ , yoğunluğu ifade eder[29].

Çizelge 2.1: Asetonitril-su karışımlarında Debye-Hückel solvatokromik parametre değerleri, pK_{ap} değerleri ve silika kolon pH değerleri

%(w/w) ACN	A	a ₀ B	pK _{ap}	Silika kolon pH aralığı
0	0,5103	1,5000	14,00	1-8,00
10	0,5404	1,5206	14,26	1-8,26
30	0,6476	1,5918	14,94	1-8,94
40	0,7227	1,6369	15,33	1-9,33
50	0,8107	1,6859	15,73	1-9,73
70	1,0181	1,7880	16,81	1-10,81
100	1,4463	1,9531	33,60	1-27,60

Kullanılan mobil fazların iyonik şiddeti, I, her bir mobil faz bileşimindeki yük ve kütle denkliklerinden, pH ayarlamalarında kullanılan asit veya bazın analitik konsantrasyonundan ve okunan pH değerlerinden hesaplanarak bulunabilir

İki pikin birbirinden ayrılması seçicilik faktörü α , ile verilir.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R_2} - t_R}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (2.9)$$

bağıntısıyla verilir. α , 1,15 ise iki bileşiğin birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pikçiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün 1,5 olması gerekir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.

$$N = 5,54 \left[\frac{t_R}{W_{0,5}} \right]^2 \quad (2.10)$$

Burada;

N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Bilesene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

Bir kromatografi kolonunun boyu, L , ile hesaplanan N değeri kullanılarak, kolondaki bir kuramsal plakanın yüksekliği, H hesaplanır, t_R 'nin değeri, L ile doğru orantılı, t_R/t_w 'nin değeri ise $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olduğundan, bir pikin genişliğinin ölçüsü olan t_w değeri de $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olarak artar. Bir kolonda N değeri ne kadar büyük ise, yani H değeri ne kadar küçük ise kolonun verimi o kadar yüksektir. H 'nin değerini büyüten her etken, kolonun verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplama yapılabilir.

$$R_s = (1/4) \sqrt{N} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{1+k} \right] \quad (2.11)$$

Burada;

R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

$\sqrt{N}$: Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k : Kapasite faktörü dür.

Ayırma gücü için geliştirilen diğer bir bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R=1,18 \times \frac{(t_2-t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}} \quad (2.12)$$

Burada;

R : Pik çifti için ayırma gücü.

t_1 : Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0,5}$: Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği,

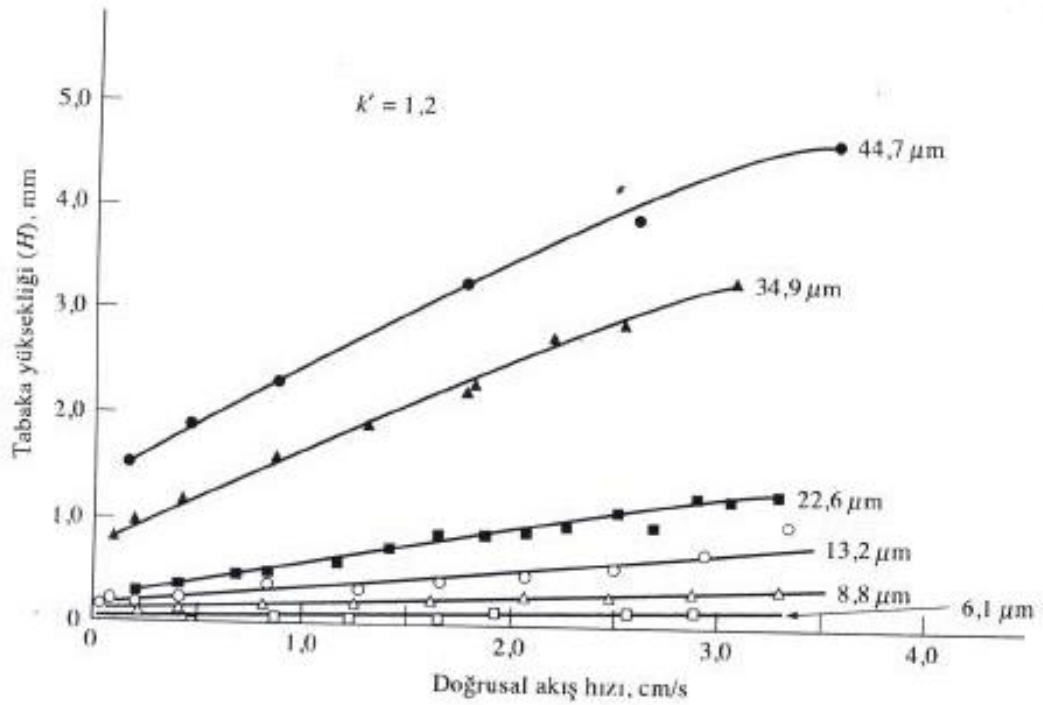
$W_{P0,5}$: İkinci pikin zaman ekseninde yan genişliğidir.

2.3.1 Sıvı kromatografi

Hareketli fazın sıvı olduğu bu kromatografi türünde sabit faz bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş sıvı film ise bu kromatografi türüne sıvı-sıvı kromatografisi denir. Hareketli ve sabit fazdaki sıvıların polarlıkları farklı olmalıdır. Genellikle hareketli faz olarak hekzan gibi apolar bir sıvı, dolgu maddesi olarak etilen glikol gibi polar bir sıvı kullanılır. Bunun tersi özellikte sıvılar kullanılırsa buna “ **ters faz sıvı-sıvı kromatografisi** ” denir. Sabit sıvı faz süzgeç kâğıdına emdirilmiş ve bu kâğıt kolon olarak kullanılırsa bu kromatografi türü “ **kâğıt kromatografisi** ” adını alır. Kâğıt kromatografisinde hareketli sıvı faz kâğıt üzerinde kılcallık etkisiyle ilerler. Sabit faz sıvı kaplanmamış katı dolgu maddesi ise “**sıvı-katı kromatografisi**” elde edilebilir.

2.3.1.1 Sıvı kromatografide kolon verimliliği

HPLC kolonunun verimliliği, tanecik boyutu azaldığında çarpıcı bir biçimde artmalıdır. Sekil 1,2, tanecik boyutunun 45 μm ' den 6 μm ' ye düşmesiyle tabaka yüksekliğinin 10 kat veya daha fazla azaldığı gözlenmektedir.

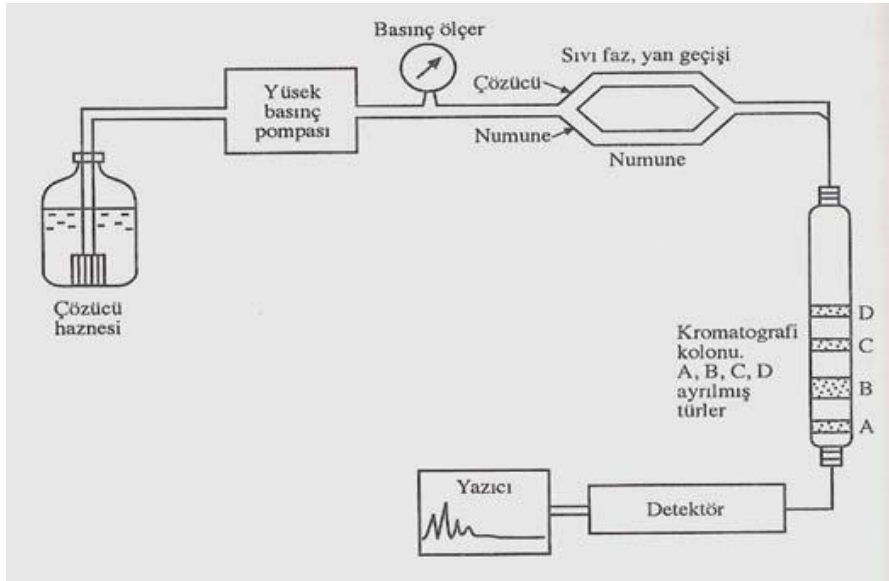


Sekil 2.5: Sıvı kromatografide tabaka yüksekliği (H)'a dolgu maddesinin tanecik boyutunun ve akış hızının etkisi. Kolon boyutları: 30cm x 2, 4mm. Çözünen madde: N, N-dietil-n-aminoazobenzene. Hareketli faz: hekzan, metilen klorürisopropil alkol karışımı)

2.3.1.2 Sıvı kromatografide kolon dışı bant genişlemesi

Sıvı kromatografide, kolon dolgusunun dış kısmında bazen önemli bant genişlemesi meydana gelmektedir. Kolon dışı bant genişlemesi olarak adlandırılan bu olay, çözülmüş maddenin, enjeksiyon sisteminde bulunan açık borularda, detektör bölgesinde ve sistemin farklı parçalarını birbirine bağlayan boru bağlantılarında akışı sırasında meydana gelir. Buralarda, borunun merkezindeki ve çeperine yakın bölgedeki sıvı tabakalarının akış hızları arasında farktan dolayı genişleme olur. Sonuç olarak, çözünen maddenin oluşturduğu bandın merkezi, dış kısmından daha hızlı hareket eder.

2.4 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)



Şekil 2.6: HPLC cihazının şematik görünümü

HPLC genelde uçucu olmayan organiklerin tespitinde kullanılan bir cihazdır. Bu yöntemle amino asitlerin, proteinlerin, nukleik asitlerin, hidrokarbonların, yağ asitlerin, karbonhidratların, fenollerin, pestisitlerin ve antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Burada taşıyıcı sıvı, sisteme yaklaşık 400 atm basınçta verilir. Bazen kolon öncesinde bir ön kolon bulunabilir. Bu ön kolonun amacı mevcut analizin gerçekleştirildiği kolonun ömrünü uzatmak ve girişim yapabilecek kirletici parametreleri önlemek amacı ile kullanılmaktadır. HPLC’ de analitik kolondan çıkan numuneler detektörde tutulur ve tayin edilerek kaydedilir. Ölçüm aralığının hassasiyetine ve tespit edilecek bileşiğin türüne göre uygun taşıyıcı solvent, kolon ve detektör tasarımı yapılmalıdır. Kullanılan çözücüler su, hekzan veya metanol olabilir.

HPLC’de kolon uzunluğu 10 ile 30 cm arasında değişir. GC deki gibi uzun değildir. Kolon çapları ise 4-10 mm arasındadır. Kolon içinde kullanılan dolgu malzemesi üniform yapıda ve çapı ise 3-10 mm arasındadır. Genelde kullanılan dolgu malzemesi inert karakterdeki silika türündendir.

2.4.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazlarının yapısı ve kısımları

2.4.1.1 Hareketli faz haneleri

Hazne : Camdan veya çelikten yapılabilir 200-1000 ml hacminde çözücü içermeye elverişli yapıdır. Hazne çoğu zaman gaz giderici ve süzme düzeneği denilen ancak ana parça olmayan cihazlarla donatılmış olabilir. Gaz giderici, kolonda ve dedektörde gaz oluşturarak bant genişlemesi, dedektör performansına olumsuz etki gibi bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesini sağlar[30-35].

Gaz giderme düzeneği: Pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi için kullanılır. Vakum pompa sistemi, damıtma sistemi, çözücüü ısıtıp karıştıran bir sistem, çözünmüş gazları inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla üfleyen bir sistem ve süzme düzeneğinden oluşan bir yapıya sahip olabilir. Süzme düzeneği, çözücü içinde bulunabilecek toz ve parçacıkların pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi için kullanılır.

İzokrattik elüsyon: Sabit bileşimde tek bir çözücü veya çözücü karışımı kullanılarak yapılan ayırma yöntemidir.

Gradyent elüsyon: Ayırma etkililiği izokrattik elüsyona göre daha fazla olan bu yöntemde iki yâda üç çözücü kullanılmaktadır ve bu çözücülerin polariteleri birbirinden farklıdır. Ayırım başladıktan sonra çözücülerin oranı ve cinsleri belli bir programa göre değiştirilir. Böylece karışım halinde bulunan maddelerin birbirlerinden kolayca ayrılmaları sağlanmış olur[30-35].

2.4.1.2 Pompalama sistemleri

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha önce de belirtildiği gibi, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeniyle farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Çözücü pompalama sistemi belki de HPLC sisteminin en önemli kısmıdır. Pompanın performansı, analitik sonuçların tekrarlanabilirliği, nicel değeri ve gözlenebilme sınırını büyük ölçüde etkiler. Pompaların aynı zamanda çözücü oranlarını da değiştirebilecek şekilde programlanabilmesi, çözücü programlaması adı verilen ve çok daha etkin bir ayırmayı sağlayan tekniğin uygulamasına olanak verir.

Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki ve daha fazla hareketli faz için, iki ve daha fazla yüksek

basınç pompasına sahiptir. Bu amaçla kullanılabilecek hareketli fazların tamamen karıştırılabilir özellikte olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimlerdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar.

HPLC’de pompa çeşitleri üçe ayrılmaktadır.

Pistonlu pompalar

En yaygın olarak kullanılan pompa sistemidir. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden oluşmuştur. Sırasıyla açılıp kapanan iki küresel motor musluğu çözücünün silindir içine giriş çıkışı kontrol eden parçadır[30,31].

Sürgülü pompalar

Viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üreten sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan silindirik kaptan ibarettir. Sınırlı çözücü kapasitesi (yaklaşık 250mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlükler sakıncalı taraflarıdır[30].

Pnömatik pompalar

Pahalı olmayan, pulssuz, ancak kapasitesi sınırlı olan bu tür pompalarda çıkış basıncı düşük olup, çıkış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Gradyent elüsyona uygun değildirler[30].

2.4.1.3 Akış kontrolü ve programlama sistemleri

HPLC cihazlarında bilgisayarla kontrol eden, pompa çıkışına yerleştirilmiş geri tepme tıkaçı boyunca basınç düşmesini belirlemek suretiyle akış hızını tespit eden sistemler mevcuttur. Ayrıca cihazlar çözücü bileşimini sürekli ya da basamaklı olarak değiştiren sistemlere de sahiptir

2.4.1.4 Numune enjeksiyon sistemleri

Sıvı Kromatografik ölçümlerin kesinliği, kolon dolgu maddesine aşırı yükleme yapmadan dolayısıyla bant genişlemesine neden olmadan, ayrıca sistemin basıncını düşürmeden numune sevkini tekrarlanabilmesiyle bağlantılıdır. İlk ve en basit numune verme düzeneği elastomerik septumlardan şırınga ile enjeksiyon sistemiydi. Bu sistem basit olmasından dolayı avantajlı olmasına rağmen tekrarlanabilirlik

oranının düşük olması nedeniyle yeni yöntemlerin gelişmesine sebep olmuştur. Sıvı kromatografisinde numune vermek için kullanılan en yaygın yöntem değiştirilebilir nitelikte numune giriş sarımlarının kullanılması yöntemidir. Bu sarımlarda numune hacmi 5 µL den 500 µL ye kadar olabilir. Ayrıca mikronumune enjeksiyon muslukları da mevcuttur.

2.4.1.5 HPLC de kullanılan kolonlar ve kolon dolgu maddeleri

Kullanılan HPLC ayırma modülleri arasında normal faz (NP-HPLC), ters faz (RP-HPLC) ve jel geçirgen sıvı kromatografisi (SEC) bulunmaktadır. HPLC ayırma modüllerinden RP-HPLC % 80-90 daha yaygın olarak kullanılmaktadır . Analizlerin birçoğu için uygulanan HPLC yönteminde de ters faz (RP) seçici ayırmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen zıt faz kolonları ayırmayı hızlı, seçici, etkili ve verimli bir şekilde yaparak çözücü tüketimini düşürmekte kimyasal ve termal etkilere karşı daha kararlı yapıda olmaktadır. Günümüzde en fazla kullanılan ters faz HPLC kolonları silika esaslıdır. Silika esaslı kolonların ayırma gücünün fazla olması çözücülere karşı yüksek mekanik özellik göstermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yüksek pH ve sıcaklık etkisinde çözünmeye uğraması istenmeyen özelliğidir. Bu durumun önüne geçmek için silika temelli sabit fazlara organik polimerler sentezlenerek modifiye edilmekte kimyasal ve termal yönden daha kararlı yapı kazandırılmaktadır. Ayrıca çeşitli deney şartlarında daha kararlı olan zirkona ve alümina esaslı sabit faz üzerinde de çalışılmaktadır.

Analiz edilecek maddelerin asidik, bazik ve nötral özelliklerine, kolonların bağlantı şekillerine, uzunluğuna, iç çapına, tanecik boyutuna ve omurga yapısına göre RP kolonları üretilmektedir

Organik moleküllerin çoğu non-polar yapıya sahip oldukları için, yüzeyinde non-polar fonksiyonel gruplar olan sorbentlerde ayrılan maddenin alıkonulmasında non-polar etkileşimlerden yararlanılabilir. Kromatografik şartlar altında, alkil bağlı kısımlar kısmen veya tamamen mobil fazdaki organik molekülleri ile solvate edilmiş olabildiğinden ODS materyalindeki serbest silanol grupları hidrate haldedir. Sulu organik mobil fazlar kullanıldığı zaman sabit fazın alkil bağlı grupları ile analitin dispersif etkileşimi ve analitin hidrofilik etkisi nedeniyle alıkonulması kolaylaşır. Bileşiklerin alıkonulması pH'a, sıcaklığa, katı fazla etkileşime ve mobil fazın bileşimine bağlıdır

Kolonlarda Bulunması Gereken Genel Özellikler şunlardır:

- 1) Analiz edilecek örneğe göre seçici olmalı,
- 2) LC-MS gibi spesifik uygulamalar için çözücü tüketimi minimum olmalı, su oranı yüksek eluentlerde performansı artırmalı,
- 3) Akış karakteristikli yeni formlara özellikle düşük basınç şartlarında hız artışı için monolitik fazları karşılayabilme özelliğine sahip olmalı,
- 4) Parçacık sentez metodu tekrarlanabilir özelliğe sahip olmalı,
- 5) Parçacık büyüklük dağılımında katının çökme ve aşınma özelliğinin sınırlı olması,
- 6) Yeni dizayn edilecek yeni nesil kolon teknolojisine uyumlu olmalı
- 7) Polimer omurgalı ya da polimer esaslı sabit fazlarda minimum simse özelliğinin sergilenmesi,
- 8) Kimyasal modifiyeli yüzeyin kolon boyunca homojen olması,
- 9) İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir
- 10) Gözenekler analitin molekül büyüklüğü için uygun büyüklükte olmalı ve bağlantı kısımlarının hızlı kütle akısına müsaade edebilecek derecede iyi bağlantı özelliğine sahip olmalıdır.

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama tanecik çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından analiz edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya konulmuştur. Analitik uygulamalarda, 2.1 mm, 3.2 mm ve 4.5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar. Bu tür kolonların teorik plaka sayısı 40.000 – 60.000 plaka/m civarındadır.

Silika Esaslı Kolonlar:

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler için bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Bu katının cam boncuk olması durumunda bu ince tabaka, yüzeye kimyasal bağlarla bağlanır. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de alüminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır. Silika esaslı kolonlarda taneciklerin düzgün dağılması mekanik dayanımının fazla olması, yüksek yüzeye sahip olması, gözenek dağılım büyüklüğünün kolaylıkla tolare edilmesi, silanol gruplarının yüzeylerinin zıt faz, normal faz, iyon değiştirme ve jel geçirgen kromatografisi için seçici grupların kovalent bağlanarak modifikasyona izin verebilmesi ve silika partikül sentezi, sabit faz sentezi ve silika kimyası hakkında fazla miktarda araştırmaların olması silika esaslı kolonların avantajlarıdır. Silika esaslı kolonların çalışma pH aralığının dar olması nedeniyle silikaya alternatif olarak alümina, polimer ve poröz grafit esaslı destek maddeleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. pH 1-12 aralığında dayanıklılığa sahip olabildikleri için divinilbenzen (DVB), polistiren divinilbenzen (PS-DVB), polivinilalkol (PVA) gibi polimerik destek materyalleri ve bunlara alkil zincirleri bağlanmış kolon dolgu maddeleri ile ilgili yoğun çalışmalar vardır.

Alümina ve zirkona destek maddeleri silikayla karşılaştırıldığında daha kararlı kimyasal özelliğe sahiptir, pH aralıkları 2-13 arasındadır. Ayrıca termal kararlılıkları da oldukça yüksektir (150-200 °C).

Poröz polimerler genellikle geniş pH aralığında yüksek örnek yükleme kapasitesine sahiptir. Non-polar polistiren divinilbenzen kopolimeri (PS-DVB) değiştirilebilir gruplar içermeyen polimer matrikslerde hidrofobik etkileşimlerle adsorplar. Bileşiklerin analizinde alkali mobil faz kullanılması gerektiği zaman, yüksek pH'larda PS-DVB'nin stabil kalma avantajı vardır. Fakat ODS'a göre düşük ayırım, düşük pik kararlılığı ve zayıf basınç direnci gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bazı çözücülerle şişebilir veya büzülebilirler.

2.4.1.6 Kolon termostatları

Kolonların sıcaklığını kontrol etmek gerekli olmakla birlikte genellikle kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak kolon sıcaklığı sabit tutulduğu zaman elde edilen kromatogramların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Buna dayalı olarak, kolonların sıcaklığını 100-150°C' ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ve kolonların bağlı bulunduğu sabit sıcaklıktaki bir su banyosu tarafından beslenen su ceketini kullanımı mümkündür[30-32].

2.4.1.7 Dedektörler

Sıvı kromatografik yöntemlerin gelişmesinde yaşanan en büyük güçlüklerden biri ideal dedektör bulabilmektedir. Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 başlık altında toplanabilir.

a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

b) Analit Özellikli Dedektörler: U.V absorbanı, floresans şiddeti, ...vb.analitin sahip olduğu ama hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan dedektör tipleri; UV absorbanı, floresans, kırma indisi, elektrokimyasal ve kütle spektrometresi dedektörleridir.

Absorbans Dedektörler

Bu tip dedektörlerde kromatografik kolondan çıkan elementlerin takip ettiği akış hücresinin, hacimleri, kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek amacıyla olabildiğince düşük tutulmaktadır. Örneğin; Hacimler 1-10 µL ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sıralandırılmıştır. Bu tipteki hücrelerin büyük kısmı yaklaşık 60 psi'den daha büyük basınçlarda çalışamazlar, basınç düşürme düzeneğine gereksinim duyarlar. Absorbans dedektörlerinin çoğunluğu çift ışın yolludur. Bu ışınlardan birisi eluent hücresinden geçerken diğeri şiddetinin azaltılması amacıyla bir filtreden geçirilir. Daha sonra bu iki ışın şiddetinin karşılaştırılması amacıyla birbirleriyle uyumlu fotoelektrik dedektörler kullanılır. Kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmanın zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelir. Ayrıca tek ışın

demetli cihazlar da vardır. Burada çözücü sisteminin şiddet ölçümleri bir bilgisayarın hafızasında depolanır ve sonunda absorbans hesabı için bu değer tekrar kullanılır.

Absorbans Dedektörleri;

a) Filtreli UV Absorbans Dedektörü

b) Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörü

c) İnfrared Absorbans Dedektörü

a) Filtreli UV Absorbans Dedektörü

Işın kaynağı olarak cıva lambasının kullanıldığı filtreli fotometreler en basit ultraviyole absorpsiyon dedektörleridir. En yaygın kullanılan filtreli UV absorbans dedektörleri 254 nm dalga boyundaki ışını filtrede izole etme özelliğine sahip olanlardır. Ancak; 250, 313, 334 ve 365 nm dalga boyundaki ışınların da kullanımı vardır. Bu tip dedektörlerin kullanımı kullanılan dalga boyundaki ışınlardan birini absorblama özelliğine sahip analitlerle sınırlıdır. Bir kolondan elde edilen absorblayıcı türlerin teşhisinde ışın kaynağı olarak girişim filtreli döteryum veya tungsten telli ışın kaynaklarının da kullanımı vardır.

b) Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörleri

Piyasada; sadece UV ışınları kullanılan veya hem UV hem de görünür bölge ışınlarını kullanan optik ağırlı spektrofotometreden oluşan dedektörler vardır. Bu dedektörlerde kromatogramın tamamı tek bir dalga boyundan alınabildiği gibi zamanla eluent pikleri birbirinden yeterince ayrıldığında her bir pike ait madde için uygun dalgaboyu seçilmesi mümkündür. Filtre seçimi çoğunlukla bilgisayar kontrolü ile yapılır. En güçlü UV spektrofotometrik dedektörler fotodiyod dizisi dedektörleridir. Bu cihazlar yaklaşık 1 saniyede spektrumun tamamı için gerekli verileri toplayabilir ve üç boyutlu bir grafik halinde türlerin teşhis ve kantitatif tayini için gerekli şartların seçimine yardımcı olacak bir spektrum sunar [30-35].

c) İnfrared Absorbans Dedektörleri:

İki tip infrared absorbans dedektörü vardır. Bunlar;

i) Dalga boyu taramasını 3 tane yarı dairesel filtre kanatları ile yapılan ve çalışma aralığı 2,5-14,5 μm veya 4000-690 cm^{-1} olan dedektörler.

ii) Fourier dönüşümlü cihaza benzer infrared dedektörleridir. Bunların yapısı daha karmaşıktır. İnfrared dedektör hücreler kullanılan NaCl pencereler hariç yapılış bakımından UV ışınlı hücrelere benzemektedirler. Hücre uzunlukları 3,2 – 1 mm ve hücre hacmi 1,5- 10 μ L arasında değişmektedir. İnfrared dedektörlerin kullanımındaki dezavantajı – birçok kullanışlı çözücünün düşük geçirgenliğidir. Örneğin; su ve alkollerin geniş infrared absorbtasyon bantları, bu dedektörlerin birçok uygulamada kullanımını engellemektedir[30,32]

Floresans Dedektörler

Floresans dedektörlerin çoğunun yapısı florometre ve spektrofotometrelere benzer şekilde tasarlanmıştır. Bu tip dedektörlerde floresans, uyarıcı ışına 90 derece açı ile yerleştirilmiş bir dedektör yardımıyla gözlenir. Daha gelişmiş cihazlardan floresans ışımalarını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Yine çoğunlukla uyarıcı ışın kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bandını izole etmek içinde filtre kullanılır. Gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası kullanılır. Floresans dedektörlerde ayarlanabilir lazer ışın kaynağı kullanarak duyarlılığı ve seçiciliği artırma çalışmaları yapılmaktadır. Floresans dedektörlerin üstünlükleri duyarlı olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı floresans özelliği bulunan numunelerdeki bileşiklerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografi de kullanılmaktadır.

Kırılma İndisi Dedektörü

Kırılma indisi dedektöründe çözücü kolunun yolu üzerinde bulunan hücrenin bir yarım bölmesinden geçer, eluat ise daha sonra diğer bölmesinden geçer. Bu iki bölme bir cam plakayla ayrılmıştır. Bu cam plaka, iki çözeltinin kırılma indisi birbirinden farklı ise gelen ışının kırılmasını sağlayacak açıda yerleştirilmiştir. Fotoduyarlı dedektörün yüzeyine gelen ışın demetinin yolundan sapması çıkış sinyalinin değişmesine sebep olur ve bu değişiklik yükseltilerek kaydedildiğinde kromatogram elde edilir. Kırılma indisi dedektörleri hemen hemen bütün analizlenecek maddelere cevap verebilmesi, güvenilirliği, akış hızından etkilenmemesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak bu tip dedektörlerle çalışılırken sıcaklığın sabit tutulması gereklidir. Sıcaklığa oldukça duyarlıdırlar ve hassasiyetleri diğer dedektörlere göre daha düşüktür.

Buharlaştırılmalı Işık Saçma Dedektörleri

Son yıllarda HPLC için geliştirilmiş olan bu tip dedektörlerde kolondan çıkan çözelti sisleştirici denilen yapı içinden geçirilerek azot veya hava akımı ile ince bir sis haline dönüştürülür. Sis halindeki çözücü sıcaklık kontrollü sürüklenme borusuna gönderilir. Oradan lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik olarak saçılan ışınlar bir silisyum fotodiyod dizi dedektör yardımıyla ölçülür. Bu tip dedektörlerin diğerlerine göre üstünlüğü buharlaşmayan bütün analitlere aynı cevabı vermesidir.

Ayrıca kırma indisi dedektörlerine göre duyarlılığı daha fazladır[30].

Elektrokimyasal Dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler polarografik, kondüktometrik, kulometrik ve amperometrik olarak bölümlere ayrılabilir ve amperometrik dedektörler daha çok kullanılmaktadır. Amperometrik dedektörlerde kontrollü potansiyelde elektrokimyasal değişikliğe uğrayan bileşikler elektrod yüzeyinde yükseltgenme ya da indirgenme uğradığında elektrodaki elektron akımı zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Bu tip dedektörlerin kullanılabilmesi için hareketli fazın elektriği iletmesi gerekmektedir. Organik çözücüler kullanıldığında hareketli faza mutlaka akımı iletme üzere bazı maddeler katılmalıdır. Uygulanan potansiyelde çözücülerin elektrokimyasal inaktif olması gerekir. Bu dedektörde en büyük problem elektrot (camsı karbon) yüzeyinin kirlenmesidir. Optik dedektörler kadar kullanımı yaygın olmasa da duyarlılık, basitlik, kullanışlılık bakımından daha avantajlıdır.

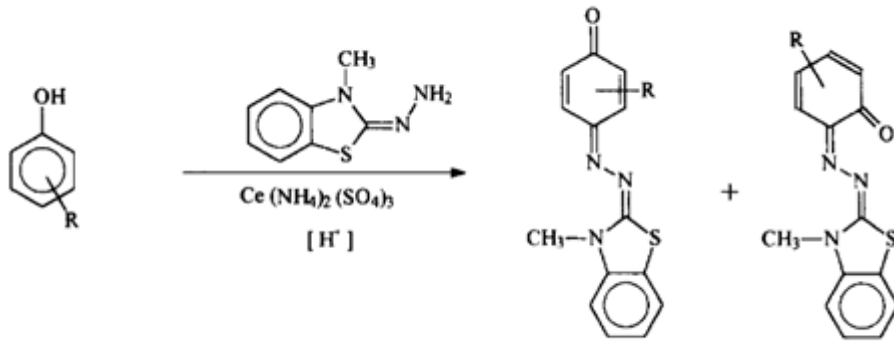
Kütle Spektrometrik Dedektörler

HPLC ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamada ortaya çıkan temel problem, HPLC'nin büyük çözücü hacimleri ile çalışması ve kütle spektrometrisinin de vakum gerektirmesidir. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan piyasada mevcut olan bir tanesinde kolondan çıkan eluat iki kısma ayrılır ve çok az bir kısım kütle spektrometreye gönderilir. Akış hızları 10-50 µL/dk olan yeni mikrogözenekli kolonların kullanılmaya başlaması ile birlikte sıvı kromatografi sistemleri doğrudan kütle spektrometrik dedektöre bağlanır. Termosprey olarak adlandırılan yeni ve ümit veren bir bağlantı şu an piyasada bulunmaktadır.

2.5 Fenolün Kantitatif Analiz Yöntemlerine Ait Çalışmalar

Kazahiro kuwata ve arkadaşlarının 1980’de yaptıkları çalışmada kirli havada fenol tayini yapabilmek için p-nitrobenzendiazonyumtetrafloroborat türevlendirilmesi yapılmış ve HPLC de analiz edilmiştir. Yöntemde fenol pH=11.5 da fenolat iyonu haline getirilip; p-nitrobenzendiazonyum tetrafloroborat ile türevlendirilmiş ve HPLC ile 365 nm dalga boyunda tayin edilmiştir[36].

Fiehn ve Jekel 1997’de yaptıkları çalışmada ön kolon reaksiyon dedeksiyonu ve HPLC ile endüstriyel atık sulardaki fenolik bileşiklerini analiz etmişlerdir. [37].Çalışmacalar hayli karmaşık bir kompleks de bile RP-HPLC ayırmasından sonra fenolleri tanımlayan yeni bir metot geliştirmişlerdir. Bunun için güçlü asidik ortamda $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_3$ ve N-metilbenzotioazol-2-hidrazon ilavesinden sonra fenoller 500 nm dalga boyunda tayin edilmişlerdir.



Şekil 2.7: Fenolik bileşiklerin MBTH- Ce^{IV} ile reaksiyonu

Song ve arkadaşlarının Ocak 1996 ‘de yaptığı çalışmada su ve atık suda fenolün tanımlanmasına yönelik yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde XAD-4 Amberlite Reçine ile doldurulmuş kolona yüklenen bir asidik numunedeki fenolün ön konsantrasyonu temel alınarak çalışılmıştır. Çalışmada fenoller, 4-aminoantipyrine (4-AAP) ve Potasyum ferrisiyanür ile reaksiyona sokularak HPLC ile 490 nm ‘de kantitatif analizi yapılmıştır. Yapılan analizde çok basamaklı akış enjeksiyon sistemi (FIA) kullanılmıştır[38].

Patsias ve Mourkidou tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada, tamamen oto matize edilmiş kati faz ekstraksiyon yüksek performans sıvı kromatografik metot,

sulu matriste düşük mg/L seviyesinde süstitüe olmuş fenollerin ve anilin türevlerinin bire bir analizi için geliştirilmiştir[44].

Tsuruta ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada, ürede fenol ve orto kresol tayini için 4-(N-ftalimidinil)benzensülfonil klorür ile türevlendirme yapılarak HPLC de analiz edilmiştir. Metotta ürenin asit hidrolizi yapıldıktan sonra fenol ve m-kresol ekstrakte edilip; difosfoetileter ve 4-(N-ftalimidinil) benzensülfonil klorür ile florosan sülfonil esterlerine dönüştürülmüş ve 300-410 nm arasında HPLC ile analiz edilmiştir. Fenol ve m-kresol için tespit sınırı enjeksiyon başına sırasıyla 0,17 ve 0,25 pmol olarak bulunmuştur[39].

Mayıs 2009’da su ve atık sulardaki fenolü belirlemek için sulu iki fazlı sistem (ATPS) kullanılmıştır. Metodun temeli orta baziklikteki bir ortamda fenol, sodyum nitropruzit (NPS), hidroksilamin hidroklorür (HL) ile reaksiyona girerek mavi rekli kompleks olan $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{-10}$ dönüştürülmüş ce 700-800 nm arasındaki dalga boyunda tayin edilmiştir. Fenol için alt tespit sınırı (LOD) $1,27 \mu\text{g kg}^{-1}$, kantitatif tespit sınırı(LOQ) $4,22 \mu\text{g kg}^{-1}$; o-kresol için alt tespit sınırı(LOD) $1,88 \mu\text{g kg}^{-1}$, kantitatif tespit sınırı(LOQ) $6,28 \mu\text{g kg}^{-1}$ olarak bulunmuştur[45].

Isler ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada İlaçlarda bulunan gallocatechin ve gallic acidin eş zamanlı olarak HPLC’ de belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada % 3 fenolik bileşikler (gallic acid ve gallocatechin) su ve etil asetat ile ekstrakte edilerek, asetonitril su ve metonal karışımı kullanılan mobil fazla birlikte HPLC sistemine gönderilmiştir[40].

3.MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1) Sodyum hidroksit, NaOH, Merck
- 2) 4-Aminoantipirin, $C_{11}H_{13}N_3O$, Merck
- 3) m-Krezol, $C_7H_6O_2$, Sigma Aldrich
- 4) Rezorsinol, $C_6H_6O_2$, Sigma Aldrich
- 5) Fenol, C_6H_5OH , Sigma Aldrich,
- 6) Kloroform, $CHCl_3$, Sigma Aldrich,
- 7) Hekzan, C_6H_{14} , Merck
- 8) Diklorometan, CH_2Cl_2 , Sigma Aldrich
- 9) Dietileter, $CH_3CH_2OCH_2CH_3$, Merck
- 10) Potasyum Peroksidisülfat, $K_2S_2O_8$, Merck
- 11) Amonyum klorür, NH_4Cl , Merck
- 12) ODS
- 13) Amonyak, NH_3 , Merck
- 14) Asetonitril, CH_3CN , Sigma Aldrich
- 15) Metanol, CH_3OH , Sigma Aldrich

3.2 Kullanılan Cihazlar

- 1) Shimatzu UV-1800 spektrofotometre
- 2) pH metre, pH-Electrode Sentix-41 (WTW ino lab pH level 1)
- 3) Manyetik karıştırıcı (MR Hei-Tec)

- 4) Saf su cihazı (Milli-Q® Direct Water Purification System)
- 5) Hassas terazi (Precisa XB 220 A marka 0,0001 g hassaslıkta)
- 6) Eveparatör (RV 10 digital rotary eveparator)
- 7) HPLC (Shimatzu LC-20), sistem kontrol ünitesi (CBM 20 A), pompa (LC-20 AD), dedektör (SPD-M20A), kolon fırını (CTO-20AC), gaz giderme ünitesi (DGU-20 A) ve otosampler (SIL-20AC) sistemi kullanılmıştır.
- 8) HPLC Kolonu olarak GL Science Inertsil C₁₈ (5µm, 250mm x 4,6 mm ID) kullanılmıştır.
- 9) Vorteks (Dragon med)

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

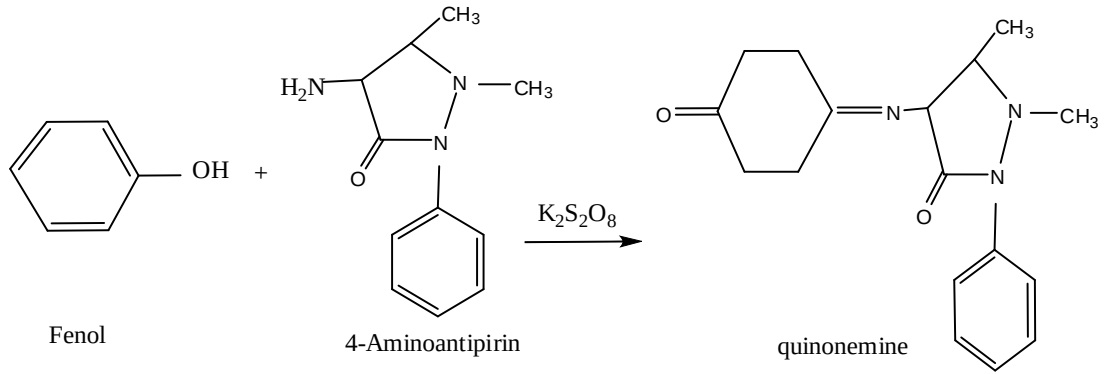
Her bir fenolden 100 mg tartılarak deiyonize suda çözüldü ve 50 mL'lik stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiler karanlıkta saklandı ve daha seyreltik çözeltiler bu stok çözeltilerden deiyonize su ile seyreltilerek elde edildi. Stok çözeltiler haftalık olarak hazırlandı ve çalışma süresince hazırlanan çözeltiler, membran mikrofiltre süzme sisteminden süzülerek kullanılmıştır.

3.4.Deneysel Çalışmalar

3.4.1 Fenol ve fenolik bileşiklerin türevlendirilme çalışmaları

Fenoller üzerinde yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlar, fenol ve fenol türlerinin görünür bölgedeki absorbanlarının yok denecek kadar az olduğunu göstermektedir. Bu nedenle fenollerin görünür bölgedeki absorbanlarını artırmak amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar ışığında, birçok literatür taraması yapılmış ve türevlendirmeyi sağlayacak en uygun reaktifin potasyum peroksidisülfat varlığında 4-aminoantipirin olduğu belirlenmiştir. Bu türevlendirme reaksiyonun temeli bazik ortamda peroksidisülfat varlığında fenollerin 4-aminoantipirin reaktifi ile tepkimesiyle oluşan ve “quinoneimine” olarak adlandırılan renkli komplekse dönüşmesine dayanmaktadır.

Fenollerin türevlendirme reaksiyonu şekil 3.1 de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.1 Fenollerin 4-aminoantipirin ile reaksiyonu

Bu yöntemle fenolik bileşiklerin ters-faz yüksek basınç sıvı kromatografisi ile ayrımını sağlamak için pre-kolon derivatizasyon işleminin gerçekleşmesi gerekir. Bu nedenle çalışmanın ilk bölümünde türevlendirme çalışmalarının optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla en uygun pH, en uygun reaktif miktarı, en uygun ekstraksiyon yöntemi ve diğer parametreler ayrı ayrı test edilerek derivatizasyon reaksiyonu optimum hale getirilmiştir.

Bu optimizasyon çalışmalarında ilk olarak Lambert-Beer yasasına uygun absorbans değerini verebilecek fenolik bileşiklerin derişimleri belirlenmiştir. Bu amaçla aşağıdaki parametreler belirlenmiştir.

3.4.1.1 pH Etkisi: Derişimi önceden belirlenmiş olan ve fenol bileşikleri içeren çözeltiler üzerine, derişimi sabit tutulmak kaydıyla 4-Aminoantipirin ve Peroksidisülfat eklenmiş ve pH 7, 8, 9, 10, 11 olacak şekilde NH_3/NH_4 tamponu ile pH ayarlaması yapılmıştır. Yapılan türevlendime işlemi sonrası oluşan kompleks bileşiğe sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve UV spektrum taraması yapılmıştır. Yapılan spekturm taraması sonucunda oluşan derivatizasyon reaksiyonu için maksimum absorbans değeri belirlenmiştir.

3.4.1.2 En uygun reaktif miktarı: Derişimi ve pH'sı belirlenmiş olan ve fenol bileşikleri içeren çözeltiler üzerine, sırasıyla peroksidisülfat derişimi sabit tutularak, artan derişimlerde 4-Aminoantipirin çözeltilisi eklenmiş ve derivatizasyon reaksiyonu sonucu elde edilen kompleksin UV spektrum taraması yaptırılmıştır. Elde edilen sonuçların ardından aynı işlemler 4-Aminoantipirin miktarı sabit

tutularak,peroksidisülfatın artan hacimleri için uygulanmış ve maksimum absorbens değerleri belirlenmiştir.

3.4.1.3 En uygun süre: Derişimi, reaktif miktarı ve pH'sı belirlenmiş olan ve fenol bileşikleri içeren çözeltiler üzerine, derivatizasyon reaksiyonu sonucu oluşan absorbens değerlerini tespit etmek amacıyla farklı sürelerde spektrumlar alınmış ve maksimum absorbensı veren en uygun süre belirlenmiştir.

3.4.1.4 En uygun ekstraksiyon yöntemi: Maksimum absorbens değeri elde etmek amacıyla gerekli optimizasyon şartları belirlenmiş ve derivatizasyon işlemi tamamlanmıştır. Derivatizasyon işleminin ardından sulu fazda bulunan kompleks bileşiğin inorganik safsızlıklardan arındırmak amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve türevi sulu fazdan en iyi verimle ekstrakte eden organik faz belirlenmiştir. Maksimum absorbens değerini belirlemek için organik fazın ve organik faz sonrası sulu fazın spektrum taraması yapılmıştır.

3.4.1.5 Katı sıvı ekstraksiyon: Fenolik bileşiklerin derivatizasyon tepkimelerini gerçekleştirebilmek için belirlenen kriterlerin ardından katı sıvı ekstraksiyon ile sıvı sıvı ekstraksiyon arasındaki karşılaştırma yapılmıştır. Bu amaçla bir miktar ODS silika tartılarak cam damlalıktan yapılmış olan bir cam kolon içerisine yerleştirilmiştir. Hazırlanmış olan kolondan önce deiyonize su, sonra etilalkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir fenol çözeltisinden farklı derişimlerde hazırlanarak ODS kolondan geçirilmiştir. Ardından kolonda tutulan her bir fenol bileşiği kloroform ile geri alınmıştır. Geri alınan çözelti oda sıcaklığında kuruluğa kadar evedaporatörde buharlaştırılarak tüverlendirme işlemine geçilmiştir.

3.4.2.Kromatografik çalışmalar

DeneySEL çalışmaların ilk basamağında oluşturulan yöntem kullanılarak fenolik bileşiklerin tespitine yönelik çalışmalar başlatılmıştır. Fenolik bileşiklerden fenol, rezorsinol ve m-kresol bileşikleri alınarak optimizasyonu yapılan metodla türevlendirilmesi sağlanmıştır. Türevlendirilen maddelerin organik çözücülerini (kloroform) evaparatörde 40 °C' de 20 dakika uçurulmuş ve elde edilen saf maddelerden 50 µL kromatografi cihazına enjekte edilerek ters faz sıvı kromatografi tekniğiyle ayrılması sağlanmıştır. Kromatografik ayrımın maksimum düzeyde

gerçekleşmesi oldukça önemlidir ve bu ayrımın tam olarak gerçekleşebilmesi için HPLC yöntemi optimize edilmiştir.

3.4.2.1 HPLC yönteminin optimizasyonu

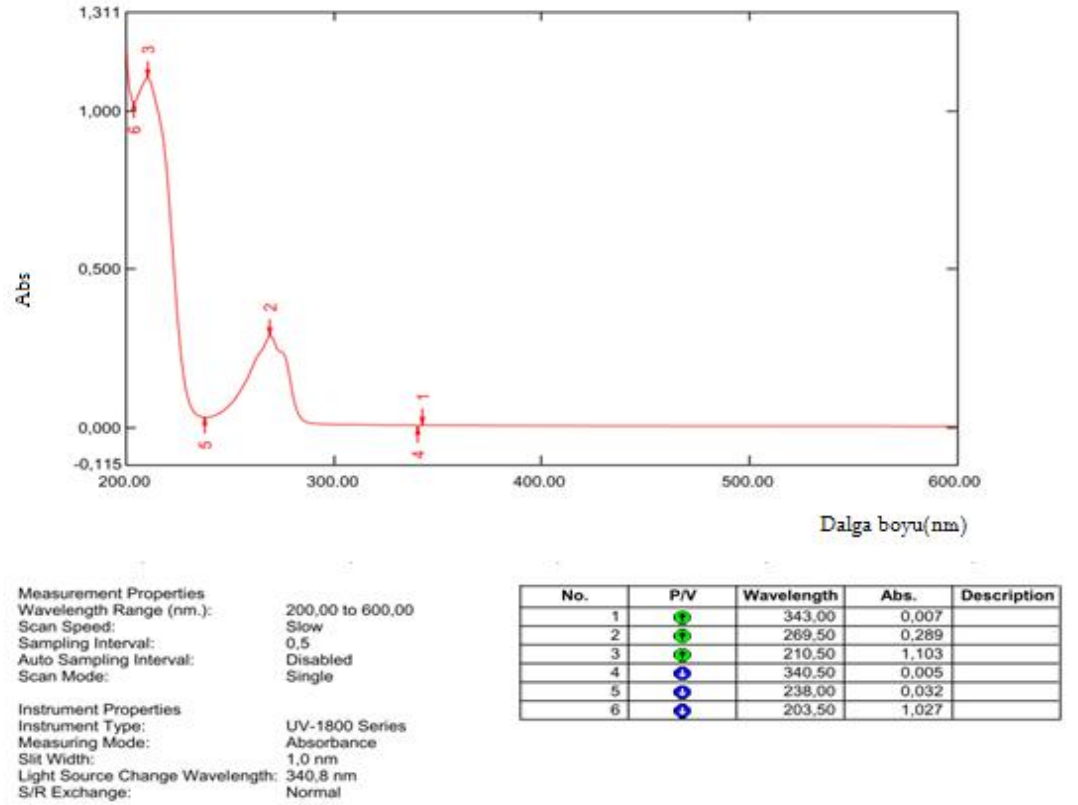
Fenol, rezorsinol ve m-kresol bileşiklerinin en iyi ayrımını gerçekleştirebilmek için optimum şartlar araştırılmıştır. Bu ayrımın gerçekleşebilmesi için akış hızı, hareketli faz kompozisyonu ve en iyi alıkonma zamanı belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ekstraksiyon İşlemleri

4.1.1 Sıvı ekstraksiyonu

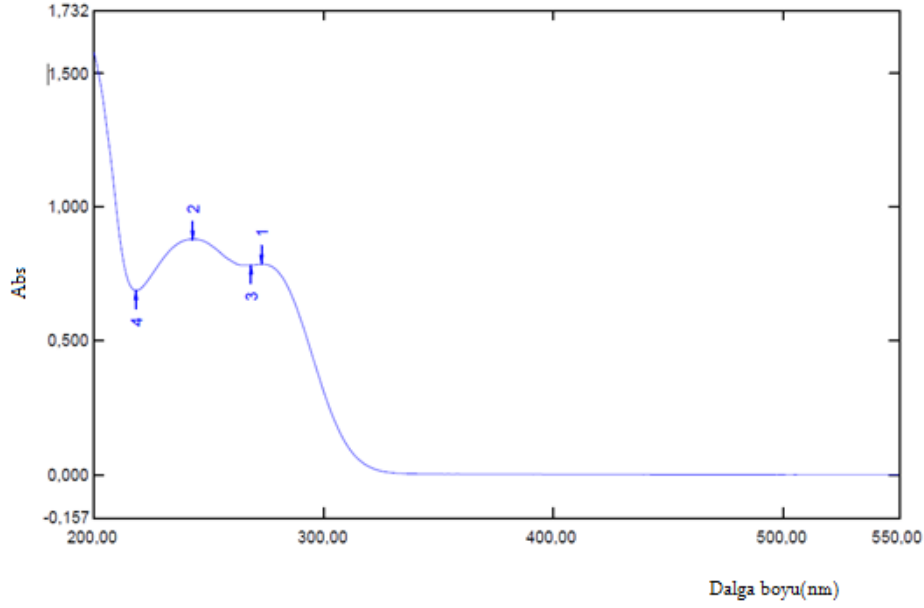
Fenolik bileşiklerin 4- aminoantipirin derivatizasyonu yoluyla HPLC' de tayin edilmelerinde, en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi amacıyla çözücü ve kolon ekstraksiyonu yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu amaçla daha önce hazırlanan stok çözeltiden yararlanarak fenolik bileşiklerin ve kullanılan reaktiflerin 1×10^{-4} M 100 mL'lik çözeltileri hazırlanmış ve UV-Gör spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır.



Şekil 4.1: 1×10^{-4} M fenol çözeltisinin UV-Gör. spektrumu

Aynı şekilde, türevlendirme reaktifi olarak kullanılan 4-aminoantipirinin

UV-Gör spektrumu şekil 4.2 de olduğu gibidir.



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 200.00 to 550.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 1.0
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

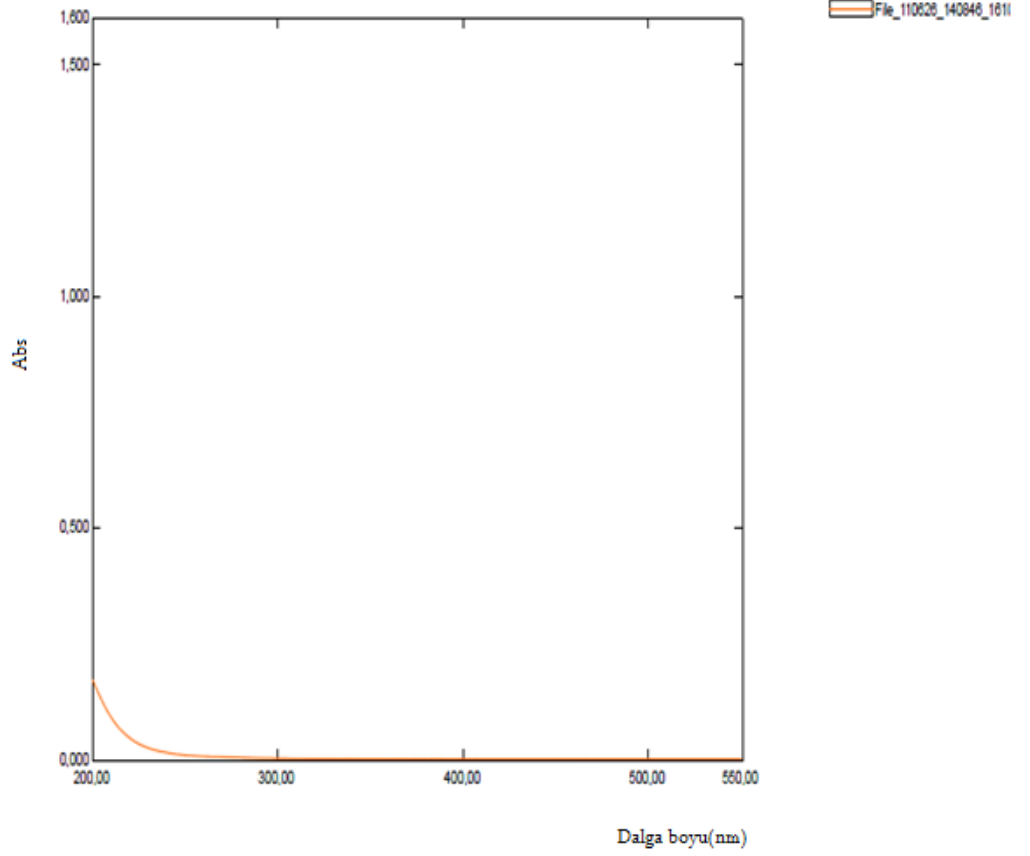
Attachment Properties
Attachment: None

Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⬆	273.00	0.786	
2	⬆	243.00	0.880	
3	⬆	268.00	0.782	
4	⬆	218.00	0.687	

Şekil 4.2: 1×10^{-4} M 4-Aminoantipirin çözeltisinin spektrumu

Benzer şekilde, türevlendirme reaksiyonunun oluşumunu hızlandıran peroksidisülfat çözeltisi için elde edilen spektrum şekil 4.3' de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.3: 1×10^{-4} M Peroksidisülfat çözeltisinin spektrumu

Daha sonra 1×10^{-4} M 100 mL olarak hazırlanan fenol ve fenolik bileşikler içeren çözeltiler üzerine 5×10^{-4} M olacak şekilde peroksidisülfat ve 5×10^{-4} M olacak şekilde 4-aminoantipirin katısı ilave edilmiştir. Elde edilen karışımı manyetik karıştırıcı üzerinde 500 rpm hızda 1 saat karanlıkta karıştırılarak reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır. Su örneklerinden fenollerin ekstraksiyonu için en iyi çözücülerin dietileter, diklorometan, kloroform ve hekzanın olduğu olarak kullanıldığı bilinmektedir[41].

Aynı zamanda seçilen bu organik çözücüler, eser miktardaki organik maddelerin ekstraksiyonu için en uygun çözücülerdir. Bu nedenle, bu çözücüler kullanılarak iki basamaklı ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Reaksiyon çözeltisinden 10 mL alınarak üzerine 5 mL organik çözücü ilave edilmiş ve iyice çalkalanmıştır. Çalkalama işleminin ardından su fazında oluşan fenol-4-aminoantipirin türevlerinin organik faza geçmesi için 5 dakika beklenmiş ve organik faz başka bir tüpe alınmıştır. Geride kalan sulu faz kısmı üzerine tekrar 5 mL organik çözücü ilave

edilmiş ve iyice karıştırılarak yaklaşık 5 dakika daha bekletilmiştir. Daha sonra organik faz tekrar alınarak önceki örnekle birleştirilmiştir. Birleştirilen organik faz içerisinde kalabilecek su miktarını ortadan kaldırmak için üzerine sodyum karbonat katısı eklenmiş ve süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece sulu ortamda oluşan fenol-4-aminoantipirin türevlerinin organik faza çekilmesi sağlanmış ve ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Ekstraksiyon işlemlerinden sonra geride kalan sulu fazın UV-Gör. spektrofotometrik ölçümü alınarak ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Bütün fenol türevleri için aynı işlemler kloroform, diklorometan, heksan ve dietil eter ile gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.1 de görülmektedir.

Çizelge 4.1: Fenolik bileşiklerin 4-Aminoantipirin derivatizasyonunda çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstraksiyon verimleri *

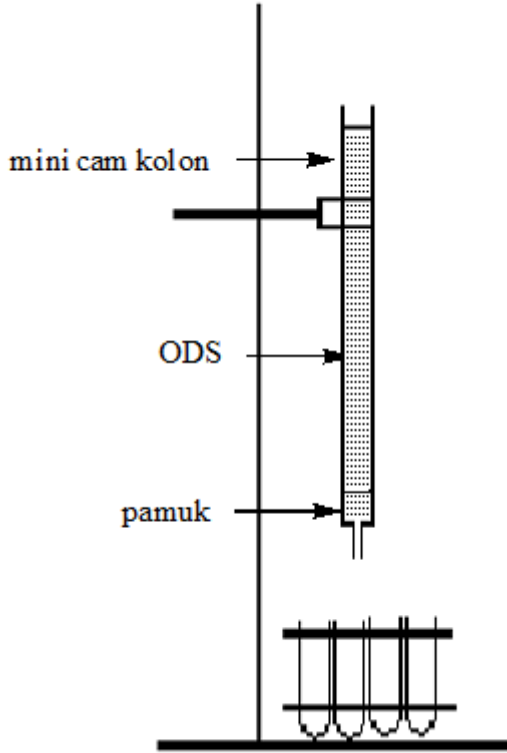
Madde	Ekstraksiyon verimi (%)			
	Dietileter	Kloroform	Hekzan	Diklorometan
Fenol	51	93	64	73
m-krezol	43	86	68	78
Rezorsinol	40	81	61	76

* Üç deneyin ortalaması

Çizelgeden de görüldüğü gibi, oda sıcaklığında gerçekleştirilen bu ekstraksiyon sonunda kloroformun ekstraksiyon veriminin diğerlerinden daha yüksek olduğu tespit edilerek çalışma boyunca ekstraksiyon için bu çözücü kullanılmıştır.

4.1.2 Katı sıvı ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyonun yanısıra katı sıvı ekstraksiyonu da yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bunun için laboratuvarında şekil 4.4 de görülen katı faz mini ekstraksiyon kolonu hazırlanmıştır.



Şekil 4.4: Katı –sıvı ekstraksiyon kolonu

Bu amaçla 1 gram ODS silika jel tartılarak cam damlalıktan yapılmış olan kolon içerisine yerleştirilmiştir. Hazırlanmış olan kolon önce 2 mL deiyonize su, sonra 2mL etil alkol ve tekrar 2 mL deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir fenol çözeltisinden 10^{-4} M 10 mL ve 10^{-4} 100 mL standart çözeltiler hazırlanarak ayrı ayrı hazırlanan ODS kolonlardan geçirilmiştir. Daha sonra kolonda tutulan her bir fenol bileşiği üç kez tekrarlı olarak 5 mL organik çözücü ile toplamda 15 mL olarak geri alınmıştır. Geri alınan bu karışımdaki çözücü oda sıcaklığına kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve kalan kısım 10 mL suda çözülerek daha önce açıklanan derivatizasyon işlemleri yapılmıştır.

Organik çözücülerle ekstraksiyon işlemlerinin benzer şekilde yapılmasının ardından; ekstraksiyon yapılan su fazının tekrar UV.Gör spektrofotometrik ölçümü alınmış ve elde edilen sonuçlar daha önceki sonuçlarla bağl olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2: 10 mL standart fenol çözeltileri kullanarak 4-aminoantipirin derivatizasyonunda kolon ekstraksiyonu yapıldığında elde edilen ekstraksiyon verimleri *

Madde	Ekstraksiyon verimi (%)			
	Dietileter	Kloroform	Hekzan	Diklorometan
Fenol	33	69	26	54
m-krezol	45	65	21	63
Rezorsinol	55	50	18	57

* Üç deneyin ortalaması

Çizelge 4.3: 100 mL standart fenol çözeltileri kullanarak 4-aminoantipirin derivatizasyonunda kolon ekstraksiyonu yapıldığında elde edilen ekstraksiyon verimleri *

Madde	Ekstraksiyon verimi (%)			
	Dietileter	Kloroform	Hekzan	Diklorometan
Fenol	48	77	38	69
m-krezol	46	74	36	68
Rezorsinol	42	67	32	69

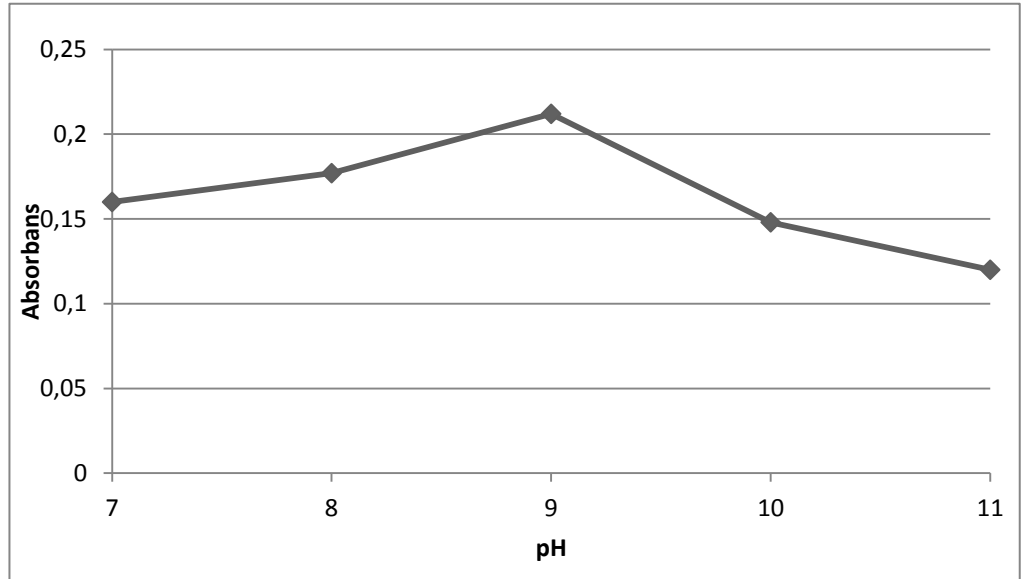
* Üç deneyin ortalaması

Sıvı-sıvı ve sıvı-katı ekstraksiyon sonuçları karşılaştırıldığında fenollerin ekstraksiyonu için en uygun yöntemin sıvı-sıvı ekstraksiyonu olduğu belirlenmiştir.

Sıvı-katı ekstraksiyonda ise ODS kolonda ya fenolik bileşiklerin tutunamadıkları (su ile birlikte ilerledikleri) ya da kolonda tutulan fenolik bileşiklerin bu kadar hacimde organik çözücü ile geri alınamadıkları sonucu oluştuğu söylenebilir.

4.2 Derivatizasyon Reaksiyonuna pH'nın Etkisi

Fenolik bileşiklerin 4-Aminoantipirin ile derivatizasyon reaksiyonu bazik ortamda gerçekleşmektedir. Derivatizasyon reaksiyonu sonucu oluşan ürünün verimi üzerine ortamın bazikliğinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 1×10^{-4} M 100 mL fenol çözeltisi üzerine, 5×10^{-4} M olacak şekilde 4-Aminoantipirin ve 5×10^{-4} M olacak şekilde peroksidisülfat katısı eklenerek oluşturulan çözeltinin pH değerleri, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ tampon çözeltisi ile ayrı ayrı 7, 8, 9, 10, 11 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen karışım manyetik karıştırıcı üzerinde karanlıkta 1 saat karıştırılmış ve kloroform ile ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucu fenol-4-Aminoantipirin türevinin UV-Gör.spektrumu alınmış ve elde edilen absorpsiyon değerleri şekil 4.5 de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 : Fenol -4-Aminoantipirin derivatizasyonunda ortamın pH'sının ürün oluşumuna etkisi

Şekilde görüldüğü gibi en uygun derivatizasyon pH'sı 9 olduğu için tüm çalışma boyunca türevlendirme için bu pH değeri kullanılmıştır.

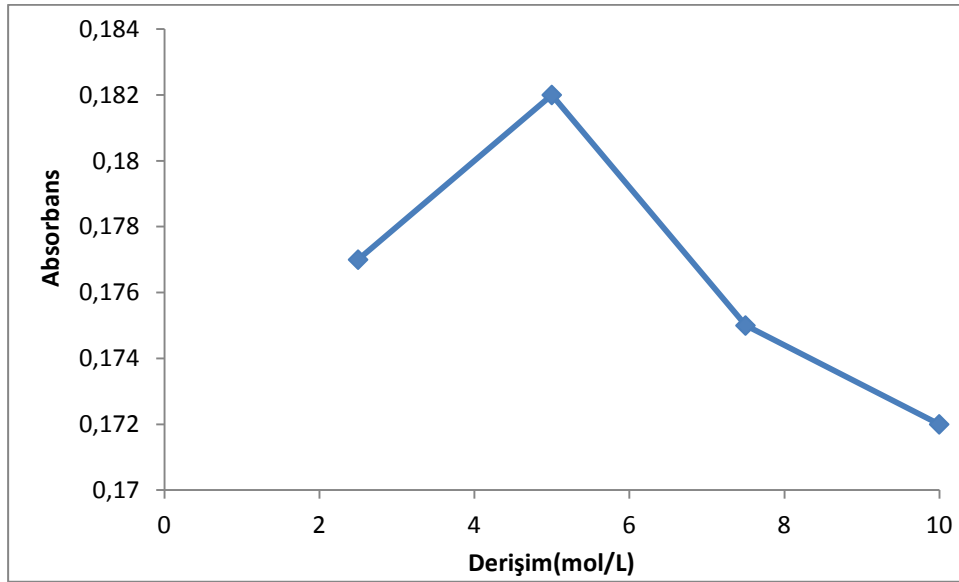
4.3 Derivatizasyon Reaksiyonuna En Uygun Reaktif Miktarı Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarının ilk kısmı olan pH değeri belirlendikten sonra, fenolik bileşiklerin derivatizasyonunda en uygun reaktif madde miktarının tespiti için çalışmalara başlanmıştır. İlk olarak 4-aminoantipirin derişimi sabit tutulmuş ve artan peroksidisülfat derişimine bağlı olarak oluşan fenol türevlerinin, kloroform fazında ekstraksiyonu yapılmıştır (Çizelge 4.4). Aynı çalışma peroksidisülfat derişimi sabit

tutularak artan derişimlerdeki 4-aminoantipirin kullanılarak da uygulanmıştır. (çizelge 4.5).

Çizelge 4.4Türeve ait En uygun Peroksidisülfat derişimi verileri

Fenol (mol/L)	4-aminoantipirin (mol/L)	Peroksidisülfat (mol/L)	Dalgaboyu (nm)	Absorbans
1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	458	0,177
1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	455	0.182
1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$	456	0.175
1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-3}	456	0.172

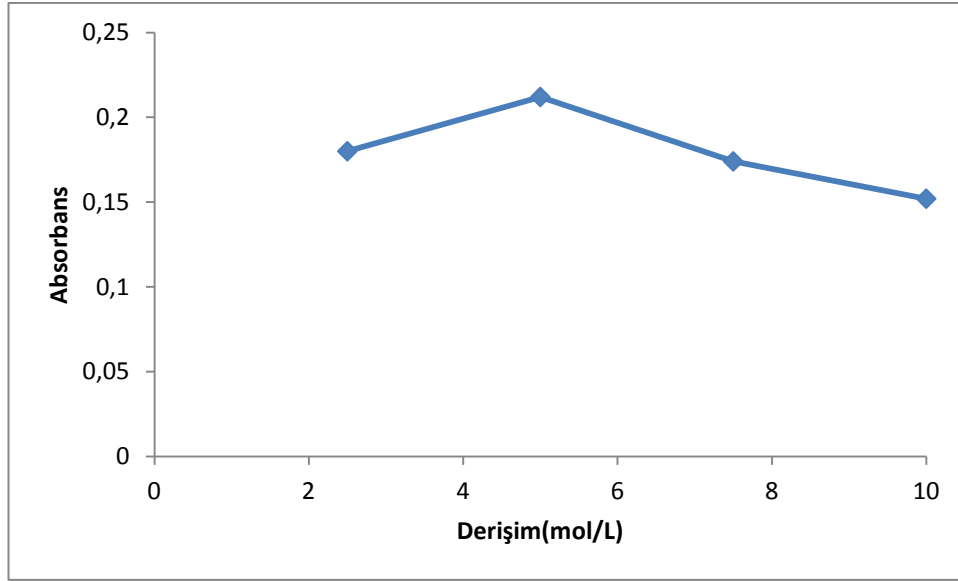


Şekil 4.6 Derivatizasyon reaksiyonu için reaktif konsantrasyonu- Absorbans grafiğı (peroksidisülfat derişiminin)

Daha sonra peroksidisülfat derişimi 5×10^{-4} M değerinde sabit tutularak farklı derişimlerde ortama ilave edilen 4-aminoantipirin miktarı arasındaki optimum reaktif konsantrasyonu belirlendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.5 ve şekil 4.7 de görölmektedir.

Çizelge 4.5 Türeve ait en uygun aminoantipirin derişimi verileri

Fenol (mol/L)	4-aminoantipirin (mol/L)	Peroksidisülfat (mol/L)	Dalgaboyu (nm)	Absorbans
1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	455	0,180
1×10^{-4}	$5,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	455	0,212
1×10^{-4}	$7,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	456	0,174
1×10^{-4}	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$	456	0,152



Şekil 4.7: Derivatizasyon reaksiyonu için reaktif konsantrasyonu- absorbans grafiğı (Aminoantipirin için)

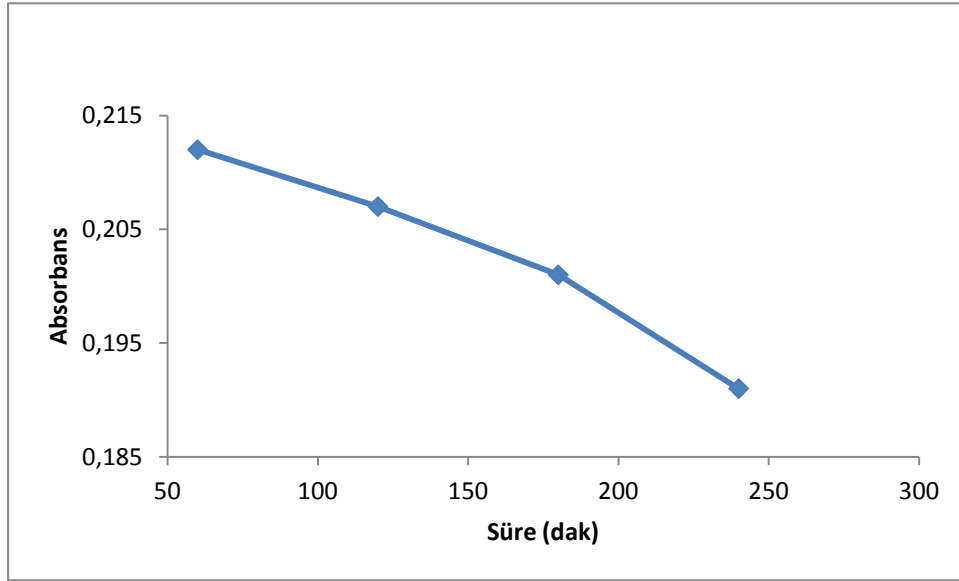
Türevlendirme için yapılan çalışmalarla ilgili sayısal veriler ve grafik incelendiğinde, en uygun derişim 100 mL lik çözeltide 1×10^{-4} M fenol kullanıldığında, peroksidisülfat için 5×10^{-4} M ve 4-aminoantipirin için ise 5×10^{-4} M olarak belirlenmiştir.

4.4 Derivatizasyon Reaksiyonuna Sürenin Etkisi

Derivatizasyon reaksiyonu optimize etmek için pH 9'a tamponlanan 1×10^{-4} M fenol çözeltisi için 5×10^{-4} M peroksidisülfat ve 5×10^{-4} M 4-aminoantipirin içeren karışım için reaksiyon tamamlanma süresi araştırılmıştır. Bunun için eş zamanlı olarak türevlendirme tepkimesi yapılmış ve belli zamanlarda absorpsiyonlar okunmuştur. Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8'den de görüleceğı gibi en uygun süre 60 dakika olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6 : Türeve ait Süre-Absorbans verileri

Süre (dak)	Dalga boyu (nm)	Absorbans
60	455	0,212
120	455	0,205
180	455	0,201
240	455	0,191



Şekil 4.8: Fenollerin 4- aminoantiprin ile türevlendirilmesine zamanın etkisi

4.5 Kromatografi Çalışmaları

Fenolik bileşiklerin tespiti amacıyla oluşturulan metot'dan faydalanılarak fenol, rezorsinol ve m-kresol bileşiklerinin türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen türevlerden 10 mL alınarak, 10 mL kloroform çözeltisi ile ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon sonrası organik faz alınan türevlenmiş bileşikler bir balona aktarılmıştır. Balona aktarılan fenolik bileşikler evedaratörde 40⁰C ' de 20 dakika çözücüsü tamamen uçuruluncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen fenol, rezorsinol ve m-kresol türevleri asetonitril-su karışımlarında çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası elde edilen kromatogramda maksimum düzeyde ayırım ve diğer parametrelerin belirlenmesi için kromatografik şartların optimizasyonu yapılmasına yönelik çalışmalara başlanmıştır.

4.5.1 Kromatografik şartların optimizasyonu

En iyi kromatografik ayırımın gerçekleşebilmesi için asetonitril-su karışımı için değişik mobil faz kompozisyonları tespit edilmiştir. Test edilen bu kompozisyonlar içinden hem en iyi pik ayırımı hem de en kısa alıkonma zamanı dikkate alındığında asetonitril-su oranının hacimce 45:55 olarak belirlenmiştir.. En uygun hareketli faz kompozisyonu olarak çalışma boyunca asetonitril-su (45:55 v/v) karışımı kullanılmıştır.

4.5.1.1 Hareketli fazın belirlenmesi

Kromatografik ayırımın temel hedefi en kısa sürede en iyi ayırımı gerçekleştirmektir. Bu amaca yönelik olarak akış hızları 1,2 mL/ dak, 1,0 mL/dak 0,8 mL/dak ve 0,5 mL/dak olarak denemeler yapılmıştır. Gerek pik şekilleri ve gerekse pik boyları dikkate alındığında optimum akış hızının 1mL/dak olduğu belirlenmiştir.

4.6 Kromatografik Şartlar

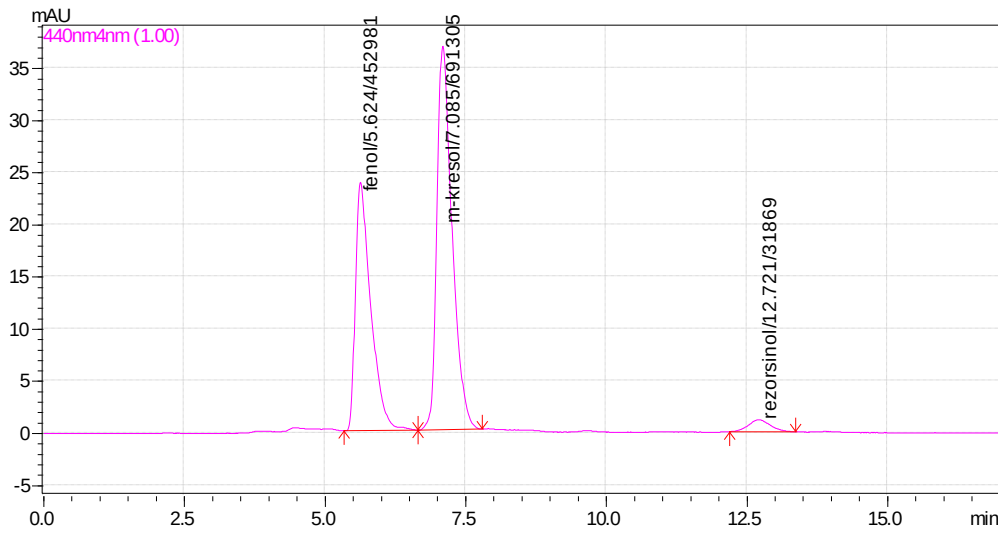
Metod gerçek numunelere uygulanmadan önce, standart fenol çözeltileri ile çalışılarak ayırımın en uygun olduğu şartlar(akış hızı, süre, hareketli faz kompozisyonu) araştırılmıştır.

Fenollerin 4-aminoantiprin derivatizasyonu ile tayinlerinde en iyi ayırım ters-faz C₁₈ analitik kolonuyla,1 mL/dak akış hızında asetonitril-su (55:45 v/v) hareketli faz kompozisyonu kullanarak elde edilmiştir. Bu şartlarda ayırımın 14 dakikadan daha kısa sürede gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle çalışma süresince, belirlenen bu akış hızı ve hareketli faz kompozisyonu kullanılmıştır.

4.7 Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması için Yapılan Çalışmalar

Yukarıda açıklanan ekstraksiyon işlemleri, içinde 1×10^{-4} M fenol, 1×10^{-4} M m-kresol ve 1×10^{-3} M rezorsinol bulunan 100 mL çözeltiye uygulanmıştır. Çözeltilerin türevlendirme işleminin tamamlanmasının ardından, her örnekten 10 mL alınarak iki kez 5 mL kloroform ile ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır. Elde edilen organik faz evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılmış ve kalan kısım, asetonitril-su (55:45 v/v) olacak şekilde 1 mL' hareketli fazda çözülmüştür. Çözünme işleminin gerçekleşmesinin ardından hareketli faz asetonitril-su (55:45 v/v) olacak şekilde ters

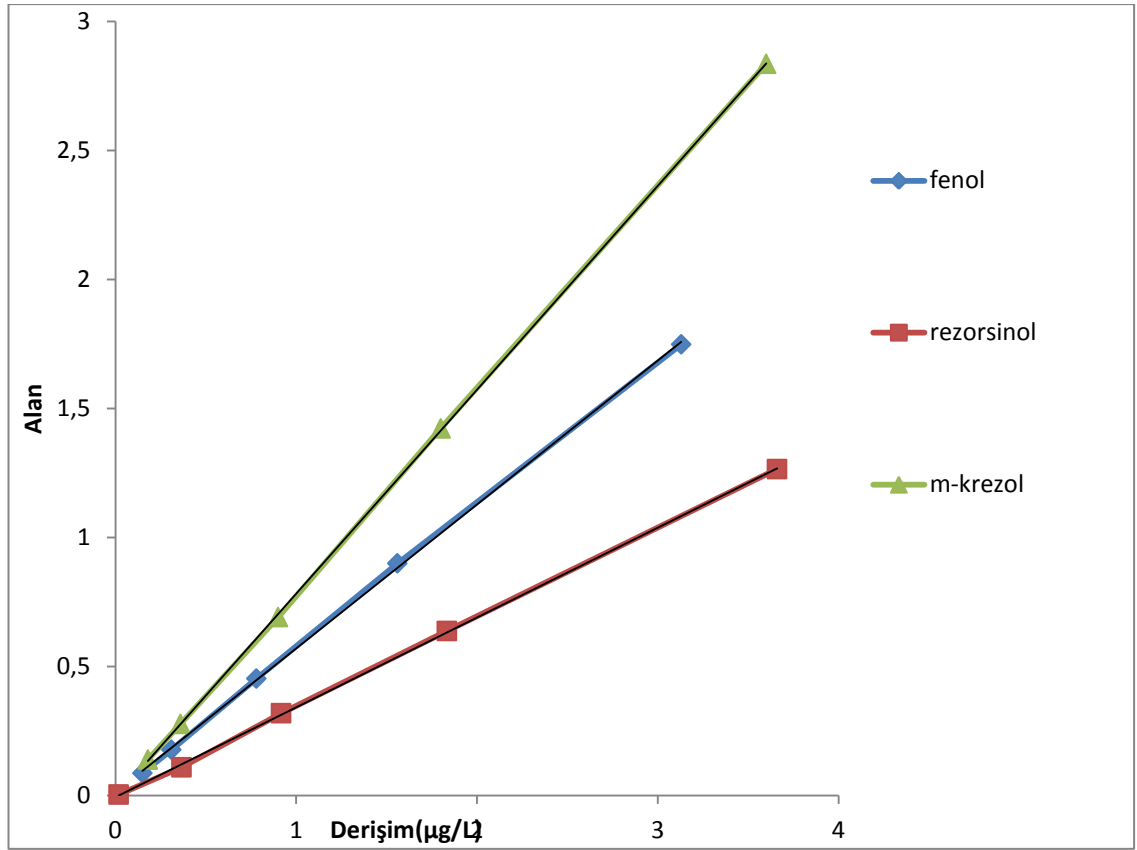
faz HPLC sistemine 50 µL enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon işleminin tamamlanmasının ardından fenolik bileşikler için alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Bütün fenollerin standart karışımının kromotogramını elde etmek için yukarıda hareketli faz karışımında çözünen her bir fenol çözeltisinden 100 µL alınmış ve toplam 300 µL'lik bir karışım elde edilmiştir. Bu karışımdan HPLC sistemine 50 µL'lik enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyon işlemi sonrası fenoller için standart kromotogram elde edilmiştir. Elde edilen kromotogram şekil 4.9 de görülmektedir.



Şekil 4.9: Fenollerin 4-aminoantipirin derivatizasyonu sonucu elde edilen standart HPLC kromotogramı (Fenol, 0.080 µg/L; m-Kresol, 0.087 µg/L ve Rezorsinol 9,23 µg/L olarak bulunmuştur. Asetonitril-su (55:45 v/v); akış hızı : 1,0 ml/dak; 50 µL enjeksiyon)

4.8 Kantitatif Analiz

Değişik miktarlarda fenolik bileşik içeren standart çözeltiler hazırlanarak, daha önce açıklanan derivatizasyon işlemleri uygulanmıştır. Uygulanan işlemler sonucu her bir çözeltiden kromotogram elde edilmiştir. Elde edilen kromotogramların pik alanlarından faydalanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve bu eğrilerden faydalanılarak gerçek numunelerdeki fenol miktarları tayin edilmiştir. Şekil 4.10 da üç fenol bileşiği için kalibrasyon grafiği verilmiştir. Verilen kalibrasyon grafiklerinde fenol ve m-kresol için alandeğeri “10⁶” ve konsantrasyon değeri “10²” olarak verilmiş iken rezorsinol için alandeğeri “10⁶” ve konsantrasyon değeri “10³” olarak verilmiştir.



Şekil 4.10: 50 µL standart fenol çözeltilerinin 4-Aminoantipirin derivatizasyonundan elde edilen kalibrasyon grafikleri.

Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen regrasyon eşitlikleri ve regrasyon katsayıları çizelge 4.7' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7: Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen regrasyon eşitlikleri ve regrasyon katsayıları

Madde	$y = ax+b$	r^2
Fenol	$y = 0,5582x+0,0109$	0,9997
Rezorsinol	$y = 0,3482x+0,0066$	0,9998
m-kresol	$y = 0,7904x +0,0081$	0,09999

Çizelge 4.8: Fenollerin 4-Aminoantiprin derivatizasyonunda ters-faz HPLC ve asetonyitril-su (55:45 v/v) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak elde edilen alkonma zamanları ve tayin limitleri*

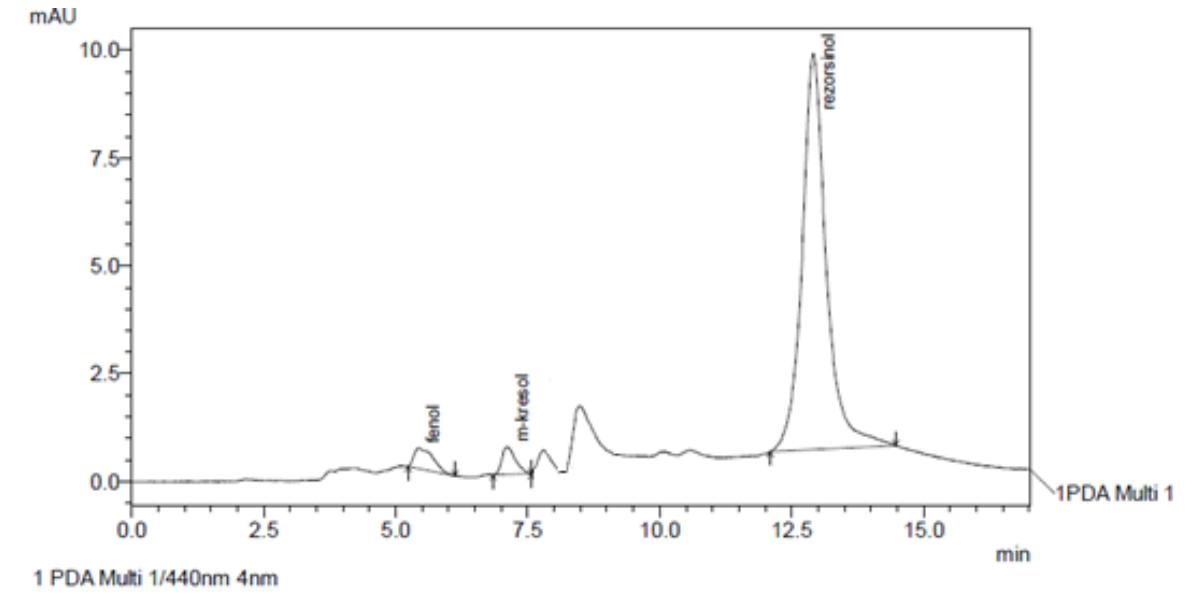
Madde	Alkonma Zamanı (dak)	En DüşükTayin Limiti (µg/L)
Fenol	6.1	0.015
m-Kresol	7.2	0.017
Rezorsinol	12.6	0,101

* sinyal/gürültü oranının 3 katı dikkate alınmıştır.

4.9 Gerçek Numuneler İçin Yapılan Çalışmalar

Fenolik bileşiklerin kalibrasyon grafiği oluşturulmasından sonra, Artvin Borçka Barajı ve Murgul Çayı üzerinden su örnekleri alınmıştır. Artvin Borçka barajı elektrik santrali önünden ve Murgul çayı üzerindeki amar beldesine 11 km mesafedeki akarsu üzerinden 500 ml lik pet şişelerde 3 adet olacak şekilde örnekler alınmıştır. Alınan su örneklerine, çalışmada optimizasyonu sağlanan türevlendirme ve kromatografi metodu uygulanarak örneklerin fenolik bileşik miktarları hesaplanmıştır.

Alınan su numunelerine ait krotogramlar şekil 4.11 ve şekil 4.12 de görülmektedir.

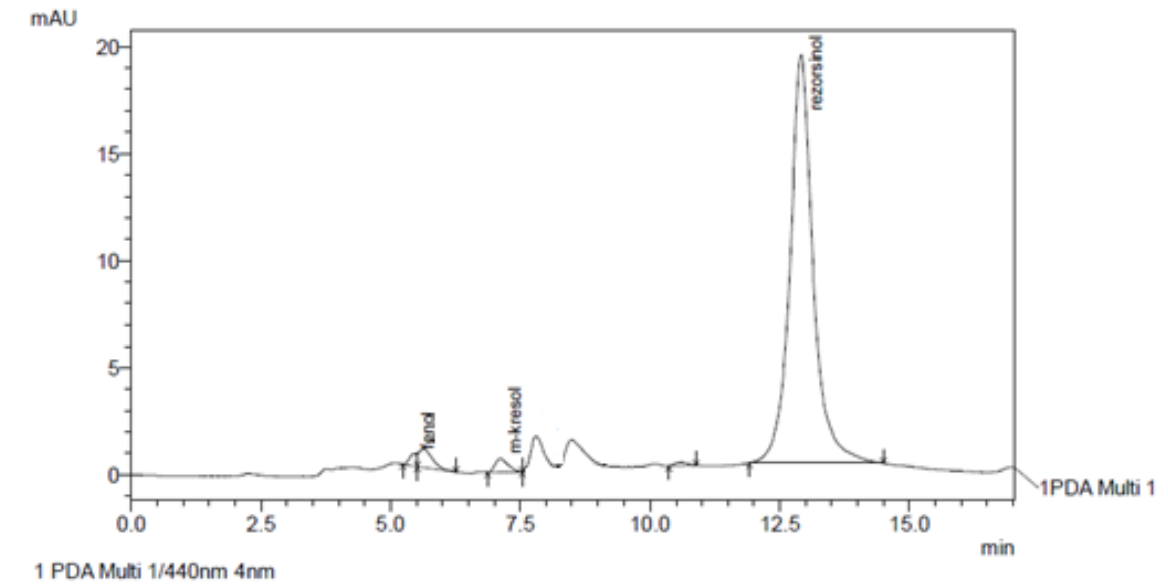


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	fenol	5.420	12390	Not calculated	2.204	ppb
2	m-kresol	7.085	20291	--	2.578	ppb
3	rezorsinol	12.900	294053	Not calculated	8523.177	ppb

Şekil 4.11 : Artvin-Borçka Barajından alınan su numunelerinden elde edilen kromotogram



<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	fenol	5.624	21454	--	3.816	ppb
2	m-kresol	7.085	38991	--	4.953	ppb
3	rezorsinol	12.906	598605	Not calculated	17350.666	ppb

Şekil 4.12: Murgul Çayından alınan su numunesinden elde edilen kromotogram

Elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde baraj ve murgul su örneklerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları çizelge 4. 9 da verilmiştir.

Çizelge 4.9: Baraj ve Murgul su örneklerinden elde edilen fenolik bileşiklerin miktarları

Madde	Birimi	Baraj		Murgul	
		$\bar{x}$	ts	$\bar{x}$	ts
Fenol	µg/L	2,2	0.13	3,8	0.16
m-krezol	µg/L	2,5	0.14	4,9	0.17
Rezorsinol	mg/L	8,5	0.16	17,3	0.13

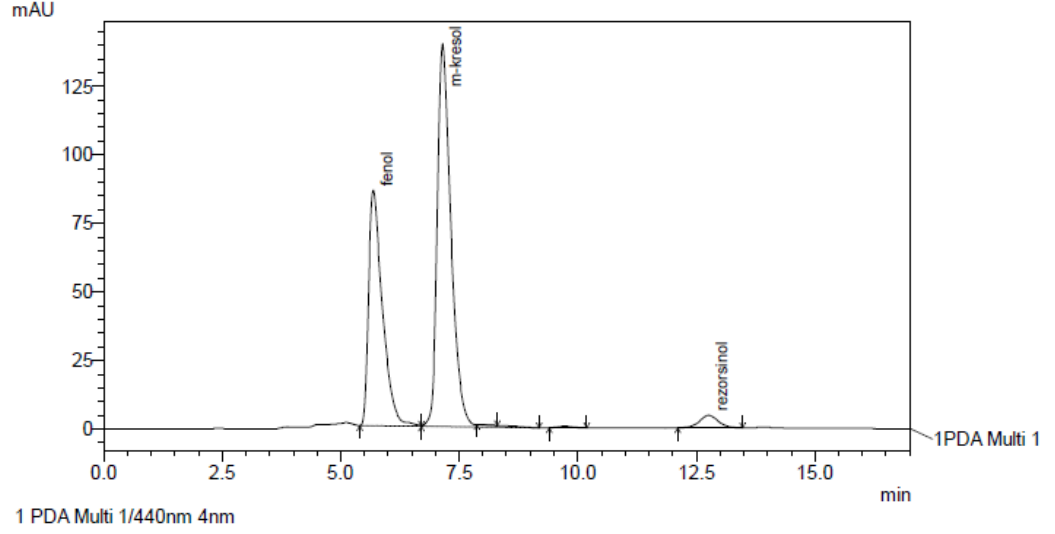
* ($\bar{x}$ =µg/L ve mg/L) standart sapma ($\frac{ts}{\sqrt{N}}$), n= 3 için % 95

güvenirlilik seviyesinde elde edildi.

4.10 Geri Kazanım Çalışmaları

Fenolik bileşiklerin tespitine yönelik çalışmaların tamamlanmasının ardından geri kazanım çalışmaları başlatılmıştır. Bu çalışmada fenolik bileşik içermeyen ultra saf su ile 1×10^{-4} M 100 mL fenol çözeltisi, 1×10^{-4} M 100 mL m-kresol çözeltisi ve 1×10^{-3} M 100 mL rezorsinol çözeltisi hazırlanarak karıştırılmış ve belirlenen metodla türevlendirilmesi sağlanmıştır. Türevlendirilme sonrası elde edilen renkli kompleks bileşik, kloroformla ekstrakte edilmiş ve çözücüsü evedaratörde uçurularak 3 mL mobil fazda çözülmüştür. Ardından HPLC sistemine 100µL enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon sonucu elde edilen kromatogram değerlendirilerek, derişimi bilinen çözeltilerdeki miktarlarla karşılaştırılmış ve kazanım miktarları bulunmuştur.

<Chromatogram>



<Results>

PDA						
ID#	Name	Ret. Time	Area	Minimum Peak Purity Index	Conc.	Units
1	fenol	5.682	1748692	Not calculated	311.018	ppb
2	m-kresol	7.143	2836150	Not calculated	360.277	ppb
3	rezorsinol	12.754	126487	Not calculated	3666.239	ppb

Şekil 4.13: Fenolik bileşiklerin tespitine yönelik geri kazanım çalışması

Yapılan analiz sonuçları derişimi önceden belirlenmiş olan fenol çözeltileriyle karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçlar 0,311mg/L fenol, 0,360 mg/L m-krezol ve 0,366 mg/L rezorsinol olarak bulunmuştur. Bulunan bu veriler analiz öncesi bilinen standartlar için fenol 0,317 mg/L, rezorsinol için 0,367 mg/L ve 0,378 mg/L rezorsinol olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre geri kazanılabilirlik fenol için $98,10 \pm 0,16$, m-krezol için $98,36 \pm 0,17$ ve rezorsinol için $96,82 \pm 0,13$ olarak bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Artvin Borçka Barajı ve Murgul Çayı üzerinden alınan su örneklerine türevlendirme ve kromatografi açısından optimizasyonu sağlanan metod uygulanarak numunelerin fenolik bileşik miktarları hesaplanmıştır. Bu amaçla ilk olarak saf haldeki fenol, m-kresol ve rezorsinolün türevlendirilme çalışmaları yapılabilmesi için bazik ortamda peroksidisülfat varlığında 4-aminoantipirin Görünür bölgede düşük absorbans değerlerine sahip olan feneolik türlerin, türevlendirilerek aynı dalga boyu aralığındaki absorbanslarını artırmak amacıyla en uygun pH, madde miktarı, ekstraksiyon çözücü/çözücü karışımı ile sıcaklık parametreleri araştırılmış, sonuç olarak maksimum absorbansı sağlayacak olan metod belirlenmiştir.

Bu metod ile fenol, m-kresol ve rezorsinolün türevlendirme çalışmaları tamamlandıktan sonra, türevlerin HPLC ile kromatografik ayırma geçilmiştir. Kromatografik ayırımın tam olarak gerçekleşebilmesi için HPLC için de optimizasyon çalışmaları başlatılmıştır. Bu çalışmalarda mobil faz, akış hızı ve analiz süresi parametreleri değerlendirilmiş ve en iyi kromatogramı oluşturacak olan değerler belirlenmiştir.

Numune ölçümü için standartların alıkonma zamanlarının belirlenmesi işlemi fenol, m-kresol ve rezorsinole ait türevler ile yapılan çalışma sonucu tespit edilmiştir.

Bu üç tip fenolik bileşik için türevlendirme işlemlerinin ardından, farklı derişimlerde çözeltiler cihaza enjekte edilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon grafiklerine göre, farklı bölgelerden toplanan numuneler üzerinde analiz işlemlerine geçilmiştir.

Bu amaçla, Artvin Borçka Barajı ve Murgul Çayı üzerinden su numuneleri alınmıştır. Bölge olarak Artvin Borçka Barajı seçilmesinin başlıca nedeni Artvin merkezinin atık sularının arıtma tesisleri olmadan direk olarak baraja aktarılması ve

barajda bulunan canlı popölasyonu üzerine fenolik bileşiklerin nasıl etki ettiğinin tespit edilmesidir.

Dünya sağık örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir konsantrasyon 0,001 mg/l ve izin verilebilecek üst limit değeri 0,002 mg/l olarak verilmiştir. Fenol konsantrasyonu 2 mg/l'nin üzerine çıktığında deniz faunası üzerinde toksik etki gösterir ve 10 ile 100 mg/l arasındaki konsantrasyonda ise 96 saat içinde sucül yaşamın ölmesiyle sonuçlanır. (1 µg/l gibi düşük konsantrasyonlarda bile içme suyunda önemli tat ve koku problemleri yaratır ve organizmalara zarar verir. Ayrıca ham sular için fenolün bulunabileceğı maksimum konsantrasyon 100 ppm, Fenol için Borçka barajında bulunan madde miktarı 0,022 değeri 8.52 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu değeri, ham sulardaki fenolik bileşiklerin bulunma sınırından bile yüksektir. Borçka barajından alınan numunede rezorsinolün limit değeri üzerinde çıkmasının nedeni, Artvin ili kanalizasyon akıntısının baraja kadar ulaşması ve Murgul Çayından gelen sularla birleşmesi olabilir.

Murgul Çayı üzerinden alınan örnekte fenol miktarı, 0,038 ppm, m-kresol miktarı 0,049 ppm ve rezorsinol miktarı 17,35 ppm olarak tespit edilmiştir. Verilerden açıkça görüleceğı üzere numunelerde belirlenen fenol ve m-kresol tehlike sınırının oldukça altındayken, rezorsinol miktarı diğeri örnekte olduğu gibi yüksek çıkmıştır. Rezorsinolün yüksek çıkmasının nedeninin ise, Murgul çayına dökülen ve numune alınan yere 11 km uzakta bulunan bakır madeninin atıkları olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Korbahtı, B.K., Tanyolaç, A.,2003. Modeling of a continuous electrochemical tubular reactor for pHenol removal. Chemical Engineering Communications, 190:5,749-762.
- [2] Rao, J.R., Viraraghavan, T., 2002. Biosorption of pHenol from an aqueous solution by Aspergillus niger biomass. Bioresource Technology, 85,165-171.
- [3] Pine, H.S., 1987. Organic Chemistry, Fifth Edition, McGraw-Hill,Inc., New york, pp 70-71
- [4] Korkut, Ş., 2003. Kimyasal oksidasyon ile atık sulardan fenol giderimi. Türkiye’de çevre kirlenmesi öncelikleri senpozyumu 4, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze-Kocaeli, 9-10 Ekim 2003
- [5] Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı (DPT), Yayın No: 2174.,1990-1994.
- [6] Ullman., 1962. “Encyklopedia der Techischen chemie” Dritte Auflages urban & Schwarzerber, München, 13.Bond,424-463
- [7] Alpağut, M., 1995.“Atıksulardan Fenol Giderimi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü.
- [8] Hart,H., Hart, D.J.,Craine, L.E., 1998. Organik kimya. (Editör: T Uyar), palme Yayıncılık, 9.Baskı, Ankara, 207-227 s
- [9] Solomons, T.W., 1992. “Organic Chemistry”, 5.Edition, University of South Florida, New York, Chicshester, Brisbane, Toronto, Singapore,936-943.
- [10] Patterson, J.W., 1977. Wastewater Treatment Tecnology, Ann Arbo Science pub. Inc., USA, 532s
- [11] ATSDR 2003 Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Agency for Toxic Substances and Disease Registry4 770 Buford Hwy NEAtlanta, GA 3034
- [12] Yener, J., Aksu, Z., 1997.“Atıksulardaki Fenol ve Klorofenollerin Aktif Karbon ve Kurutulmu Aktif Çamura Adsorpsiyonu”, Journal of Engineering and Environmental Science 23, 93-104.
- [13] Anthony, R.M., 1981.“Determining Maximum Influent Concentrations of Priority Pollutants for Treatment Plants”, Journal WBCF 53, 1457-1468.

- [14] Sax, N. I., 1974. Industrial pollution. Van Nostrand-Reinhold, New York, 702 pp.
- [15] Sax, N.I., 1975. "Dangerous Properties of Industrial Materials", 4 th Edition, Von Nostrand Reinhold Company, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne, 1008.
- [16] Streat, M., Patrick, J.W., Perez, M.J.C., 1995. "Sorption of Phenol and p-Chlorophenol from Water Using Conventional and Novel Activated Carbons", Water Research 29, 467-472.
- [17] www.cem.yildiz.edu.tr/belgeler/dersnotlari/2006-07-2/ck_II/ck2-df10.pdf
- [18] G. McKay, G. M. El Geundi, M.M. Nassar "Equilibrium studies during the removal of dyestuffs from aqueous solutions using Bagasse pith"
- [19] Leyva, R.R., Geankopolis, C.J., 1994. "Diffusion in Liquid-Filled Pores of Activated Carbon. I. Pore Volume Diffusion", The Canadian Journal of Chemical Engineering 72, 262-272.
- [20] Yonge, D.R., Keinath, T.M., Poznanska, K., Jiang, Z.P., 1985. "Single-Solute Irreversible Adsorption on Granular Activated Carbon", Environmental Science Technology, Vol.19, No.2, 467-472
- [21] Vidic, R.D., Suidan, M.T., 1991. "Role of Dissolved Oxygen on the Adsorptive Capacity of Activated Carbon for Synthetic and Natural Organic Matter", Environmental Science Technology Vol.25, 1612-161
- [22] Rajkumar, D., Palanivelu, K., 2004. Electrochemical treatment of industrial wastewater. Journal of Hazardous Materials, B113, 123-129.
- [23] Canizares, P., Martinez, F., Garcia-Gomez, J., Saez, C. ve Rodrigo, M. A., 2002. Combined electrooxidation and assisted electrochemical coagulation of aqueous phenol wastes. Journal of Applied Electrochemistry 32: 1241-1246.
- [24] Jianlong, W., Yi, Q., Horan, N., Stentiford, E., 2000. Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. Bioresource Technology, 75, 157-161.
- [25] Çokay, E., Şengül, F., 2006. Toksik kirleticilerin ileri oksidasyon prosesleri ile arıtımı. Cilt:8, Sayı:2, 1-9.
- [26] Rengaraj, S., Moon, S. H., Sivabalan, R., Arabindoo, B., Murugesan, V., 2002.
- [27] Poole, C. P. And Poole, S. W., 1997. Chromatography Today. Fifth impression. Elsevier Science, B. V., Amsterdam.
- [28] Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. Anal. Chem., 49, 142.
- [29] Rondinindi, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. Electrochimica Acta, 2(10), 1499-1505.

- [30] Kılıç, E., Köseoğlu, F. 1997, Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [31] Kılıç, E., Köseoğlu, F. 1999. Analitik Kimya Temelleri, 7. Baskı, 2. Cilt, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [32] Christian, G.D., 2004. Analytical Chemistry, 6th Edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- [33] Kissinger, p.t., Heineman, w.r. 1996, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.
- [34] Adamovics, J.A. 1997. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.
- [35] Synder, l.r., Kirkland, j.j., Glajch, J.L. 1997 Practical HPLC Method Development. 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [36] Kazuhiro Kuwata, Michiko Uebori and Yoshiaka Yamazaki; Anal.Chem. 1980, 52, 857-860
- [37] O.Fiehn, M.Jekel; J.Chrom.A. 1997, 769, 189-200
- [38] Wen-lu Song, Zheng-liang Zhi, Lian-Sheng Wang ; J.Talanta .1996, 44, 1423-
- [39] Yasuto Tsuruta , Shouji Watanabe and Hirofumi Inoune; Anal. Biochem. 1996, 243, 86-91
- [40] Ana Cristina Isler, Gisely Cristiny Lopes, Mara Lane Carvalho Cardoso, Joao Carlos Palazzo de Mello, L Carlos Margues; Quim.nova. 2010, 33.
- [41] Realini P.A, 1981. Determination of priority pollutant phenols in water by HPLC, Journal of chromatographic science, 19, 124-129
- [42] Solomons, T.W.G, Fryle, C.B, 2002 Organik Kimya 7. Basımdan Çeviri (Editörler: Gural Okay, Yılmaz Yıldırım) Literatür Yayınları: 84, İstanbul, 1258 s
- [43] Molva, M, 2004 Removal of phenol from Industrial Wastewater Using Lignitic Coals, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Teknoloji Enstitüsü, İzmir, 79 s
- [44] T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ziraî Mücadele İlaçlarının Toksikolojik Sınıflandırılmasına Ait Yönerge
- [45] J. Patsias e E. Papadopoulou-Mourkidou, J Chromat A, 904(2), 2000, pp. 171-188

[46] Aparecida Barbosa Magestea, Leandro Rodrigues de Lemos, Guilherme Max Dias Ferreira, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Luis Henrique Mendes da Silva, , Renata Cristina Ferreira Bonomob, Luis Antonio Minimc, J.Talanta. 2009,80,1139-1144

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: M.Umut KONANÇ

Doğum Yeri ve Tarihi: Giresun

Adres: Çamlık tepe Mah.Ali rıza paşa cad. Varan sitesi E blok D:27/ Artvin

E-Posta: Umutkonanc@gmail.com

Lisans: Cumhuriyet üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü

Yüksek Lisans :

Mesleki Deneyim ve Ödüller: 2005-2007 Demirciler Gıda A.Ş Kalite Müdürü

2010-2013 Artvin Çoruh Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında kimyager

Yayın ve Patent Listesi:

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Adem Asan, M.Umut Konanç, Bediha Akmeşe, “Fenollerin yüksek basınç sıvı kromatografisi ile ayrımı ve spektrofotometrik tayinleri”(28) 6-9 Haziran Kromatografi 2012 kongresi, TOKAT