

**HALOJENLİ FENOLLERİN  
KROMATOĞRAFİK AYRILMASI**

**Aysegül YILMAZ ÇALIK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**İSPARTA 2004**

**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HALOJENLİ FENOLLERİN**  
**KROMATOĞRAFİK AYRILMASI**

**Aysegül YILMAZ ÇALIK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**  
**İSPARTA 2004**

**DANISMAN: Yrd. Doç. Dr. A.Hakan AKTAS**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından KIMYA ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Baskan :.....

Üye :.....

Üye :.....

ONAY

Bu tez ...../...../.....tarikhinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof. Dr. Remzi KARAGÜZEL  
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TESEKKÜR.....	v
SIMGELER DIZINI.....	vi
SEKİLLER DIZINI.....	vii
ÇİZELGELER DIZINI.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kuramsal Temeller.....	3
1.1.1. Fenoller hakkında genel bilgi.....	3
1.1.2. Kromatografide temel kavramlar.....	6
1.1.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC).....	11
1.1.3.1. HPLC' nin kapsamı.....	12
1.1.3.2. Sıvı kromatografide kolon verimliliği.....	13
1.1.3.2.1. Dolgu maddesi tanecik boyutunun etkileri.....	14
1.1.3.2.2. Sıvı Kromatografide kolon-dışı bant genişlemesi.....	14
1.1.3.2.3. Kolon verimliliğine numune miktarının etkisi .....	15
1.1.3.3. Sıvı kromatografi cihazları .....	15
1.1.3.4. Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri.....	17
1.1.4. Mobil fazda pH standardizasyonu.....	19
1.1.5. Kromatografik ayırmalara giriş.....	21
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	23
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Genel Bilgi.....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.2.1. Yüksek performans sıvı kromatografi cihazı (HPLC).....	33
3.2.2. UV-Görünür spektrofotometre cihazı.....	33
3.2.3. İyon analiz cihazı.....	33
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
3.3.1. Kullanılan çözeltiler.....	34
3.3.2. Primer standart pH referans çözeltisi.....	36

3.3.3. Kartus.....	36
3.4. Metot.....	36
3.4.1. UV-Görünür bölge spektrofotometresi çalışmaları.....	36
3.4.2. Mobil faz pH standardizasyonu.....	36
3.4.3. Sivi kromatografik ayırma çalışmaları.....	36
4. ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA.....	38
4.1. Numune Çalışması.....	51
5. SONUÇLAR.....	54
6.KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİS.....	60

## ÖZET

Halojenli fenoller baslica kirleticiler arasinda yer almaktadır. Bu nedenle bu tip maddelerin özellikle içme sularındaki tayinleri önem kazanmaktadır ve bu amaçla bir çok analitik metot geliştirilmektedir. Bu çalışmanın amacı 3-bromofenol, 3-klorofenol, 4-florofenol, 4-klorofenol ve 4-iyodofenol gibi halojenli bileşiklerin ayrılması için metot geliştirmek ve bu maddelerin bulunduğu bir matriste bu maddeleri tayin etmektir. Halojenli fenollerin ayrılması için uygulanan HPLC tekniklerinde, mobil fazın pH'si ve sıcaklık önemli parametrelerdir. Bu çalışmada halojenli fenollerin ayırma işlemlerinde en uygun mobil faz bulunmuş ve ortam pH'si fosforik asit ile 4,552' ye ayarlanmıştır. Ve sıcaklık çalışmalarından da ayırma için en uygun sıcaklık 25°C olarak bulunmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Halojenli fenoller, HPLC, ayırma, kromatogram

## ABSTRACT

Halogenated phenols are priority pollutants. Their determination in drinking waters is, therefore, of great importance and many analytical methods have been developed. Chromatographic methods are suitable for the selective determination of individual phenolic compounds. It was aim of this study to develop a method for separating halogenated phenols such as 3-bromophenol, 3-chlorophenol, 4-fluorophenol, 4-chlorophenol, and 4-iodophenol in complex matrices that both sensitive and selective. At the application of HPLC technique in the separation of halogenated phenols, pH of the mobile phase and heat are crucial parameters. The most suitable mobile phase at the separation of halogenated phenols that are studied is water that its pH was adjusted 4.552 values with phosphoric acid, and, optimum heat is 25°C.

Key words: Halogenated phenols, HPLC, separation, chromatogram

## TESEKKÜR

Bu çalısmayı bana öneren ve çalısmalar sırasında her türlü desteğini esirgemeyen danisman hocam SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan AKTAS'a, deneysel çalısmalarımda yardımcı olan S.D.Ü Merkezi Arastırma laboratuari müdürü Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ayrıca Merkezi Arastırma Laboratuvarında çalısmalarımda emegi geçen arkadaşlarıma, bana destek olan esime ve beni bugünlere yetistiren aileme sonsuz tesekkürlerimi sunarım.

Aysegül YILMAZ ÇALIK

Isparta - 2004



## SIMGELER DIZINI

HPLC	: Yüksek performans sivi kromatografi
RPHPLC	: Ters faz yüksek performans sivi kromatografi
UV-VIS	: Ultra viyole görünür bölge spektrofotometresi
K	: Kapasite faktörü
$t_r$	: Bilesige özgü alikonma zamani
$t_0$	: Kolonda tutulmayan pikin alikonma zamani
$\alpha$	: Seçicilik faktörü
$R_s$	: Ayırma gücü
$W_{0,5}$	: Pikin yari yüksekliğindeki pik genişligi
N	: Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayisi
?	: Dalga boyu
DAD	: Diyot array dedektör
ppm	: Milyonda bir derisim

## SEKILLER DIZINI

Sekil 1.1. Sivi kromatografinin uygulamaları .....	13
Sekil 1.2. Sivi kromatografide tabaka yüksekliği H' a dolgu maddesinin tanecik boyutunun ve akis hizinin etkisi .....	14
Sekil 1.3. Tabaka yüksekligine bagil numune kütlesinin etkisi.....	16
Sekil 1.4. Bir HPLC cihazinin semasi.....	17
Sekil 1.5.Gradyent elüsyon ile ayirma verimliliginin iyilestirilmesi.....	19
Sekil 2.1. Çalismada muamele edilen atik sulardaki eluatlarin HPLC ve UV kromatogramlari.....	24
Sekil 2.2. Bartak ve Cap tarafından çalisilan fenollerin tipik kromatogrami.....	25
Sekil 2.3. 25°C de 2,4-diklorofenolün çözünürlüğüne pH'nin etkisi.....	26
Sekil 2.4. 25°C de 2,4,6-triklorofenolün çözünürlüğüne pH'nin etkisi.....	26
Sekil 2.5. 25°C de 2,3,4-6-tetraklorofenolün çözünürlüğüne pH'nin etkisi.....	26
Sekil 2.6. 25°C de pentaklorofenolün çözünürlüğüne pH'nin etkisi.....	27
Sekil 2.7. Su numunesinin HPLC kromatogrami.....	27
Sekil 2.8. Shimadzu HPLC dizayni için desorpsiyon zamaninin optimizasyon sekileri.....	29
Sekil 2.9. Atik su örneğinin SPME-HPLC metodu ile bulunan kromatogrami.....	30
Sekil 2.10. Çalismada tayin edilen 19 klorofenolün kromatogrami.....	31
Sekil 2.11. Halojenli fenol-PFBB türevinin kütle spektrum örneği .....	32
Sekil 4.1. 3-klorofenolün 200-900 nm araligindaki absorbands taramasi.....	38
Sekil 4.2. 3-bromofenolün 200-900 nm araligindaki absorbands taramasi.....	38
Sekil 4.3. 4-klorofenolün 200-900 nm araligindaki absorbands taramasi.....	39
Sekil 4.4. 4-florofenolün 200-900 nm araligindaki absorbands taramasi.....	39
Sekil 4.5 4-iyodofenolün 200-900 nm araligindaki absorbands taramasi.....	40
Sekil 4.6. Halojenli fenollerin 25°C'de alinan kromatogrami.....	41
Sekil 4.7. 25°C ve 232 nm de halojenli fenollerin kromatogrami.....	42
Sekil 4.8. Halojenli fenollerin 30°C'de alinan kromatogrami.....	43
Sekil 4.9. Halojenli fenollerin 35°C'da alinan kromatogrami.....	44
Sekil 4.10. Halojenli fenollerin 40°C'da alinan kromatogrami.....	45
Sekil 4.11. KBr için 40°C'da alinmis kromatogram.....	45
Sekil 4.12. 4-floro fenol için derisim-alan grafigi.....	46

Sekil 4.13. 4-kloro fenol için derisim-alan grafiği.....	47
Sekil 4.14. 3-kloro fenol için derisim-alan grafiği.....	48
Sekil 4.15. 3-bromo fenol için derisim-alan grafiği.....	49
Sekil 4.16. 4-iyodo fenol için derisim-alan grafiği.....	50
Sekil 4.17. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karışımın kartustan ilk 1 mL metanol ile alınmış kısmının kromatogramı.....	51
Sekil 4. 18. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karışımın kartustan ikinci 1 mL metanol ile alınmış kısmının kromatogramı.....	52
Sekil 4. 19. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karışımın kartustan üçüncü 1 mL metanol ile alınmış kısmının kromatogramı.....	52
Sekil 4. 20. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karışımın kartustan alt faza geçen sulu kısmının kromatogramı.....	53

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Asetonitril-su karisimlerinde Debye-Hückel solvatokromik parametre degerleri, $pK_{ap}$ degerleri ve silika kolon pH degerleri.....	9
Çizelge 1.2. Asetonitril-su karisiminde 0,05 m KHPH için $pH_{RVS}$ degerleri.....	20
Çizelge 3.1 Kullanilan kimyasallar ve özellikleri.....	34
Çizelge 4.1 UV-Görünür bölge spektrofotometresinde 200-900 nm dalga boyu araliginde taranan halojenli fenollerin saptanan maksimum dalga boylari.....	40
Çizelge 4.2. Halojenli fenollerin 25°C de alikonma zamanlari.....	41
Çizelge 4.3. Halojenli fenollerin 30°C de alikonma zamanlari.....	42
Çizelge 4.4. Halojenli fenollerin 35°C de alikonma zamanlari.....	43
Çizelge 4.5. Halojenli fenollerin 40°C de alikonma zamanlari.....	44
Çizelge 4.6. 4-floro fenol için derisim (ppm) – alan verileri.....	46
Çizelge 4.7. 4-floro fenol için derisim (ppm) – alan verileri.....	47
Çizelge 4.8. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri.....	48
Çizelge 4.9. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri.....	49
Çizelge 4.10. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri.....	50
Çizelge 4.11. Halojenli fenoller için geri kazanmalar ve analitiksel veriler.....	50



## 1.GIRIS

Insan sagligini olumlu veya olumsuz sekilde etkileyebilecegi düşünölen bir çok maddenin tayini her geçen gün önem kazanmaktadır. Belirlenen kriterler sayesinde özellikle insan sagligi üzerinde zararli etkileri saptanabilen tüm parametrelerin düzenlenmesi alısmalari tüm dünyada sürdürölmektedir. Eser düzeylerde bir çok maddenin tayini gelisen teknoloji ile son zamanlarda basari ile yapilabilmektedir.

Halojenli fenollerin kromatografik sartlarda ayirimi günümüzde büyük önem kazanmistir. Fenolik bileşikler esitli endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Bunların büyük bir ogunlugu çevreye kirlilik vermektedir. Fenoller; pestisitler, yiyecek koruyuculari, tekstil ve deri sanayinde önemli miktarlarda kullanılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, sularda, toprakta ve sedimentlerde bunlara siklikla rastlanmaktadır. Fenolik bileşiklerden özellikle klorofenollerin toksik yapida oldugu ve bunun çevreye verdigi zararlar bilinmektedir. Bu sebeple bunlardan bazilari esitli ölkelerde kirleticiler listelerinin baslarına yerlesmistir.

Halojenli fenoller esitli yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Bunlar, spektrofotometrik, amperometrik, potansiyometrik, ve kromatografik yöntemlerdir. Son yıllarda halojenli fenollerin tayini için ters faz yüksek performans sivi kromatografisi (RPHPLC) yöntemi, diger yöntemler içerisinde daha çok tercih edilmektedir. RPHPLC alısmalarında analitik kosullar deneysel olarak belirlenebilir. Ancak bunun çok zaman alıcı oldugu ve bu esnada kolon etkinliginin azaldigi bilinmektedir. RPHPLC' de asetonitrilin kullanilmasi durumunda, pH ve çözücü bileşimi disinda kolon bozunma etkileri yüzünden, ölçüm zamani da bir diger önemli faktördür. Bu nedenle son yıllarda RPHPLC alısmalarında organik modifiyer bulunduran mobil fazin özellikleri esas alinarak ayirmanın optimizasyonu amaçlanmaktadır.

Sivi kromatografide yöntem gelistirmede üzerinde durulacak en önemli husus yeterli ayirmaya ulasmaktır. Bu durum uygun alikonma zamani, uygun kolon etkinligi ve özellikle yeterli ayirma gücüdür. Kromatografik ayirmalarda seçiciligi optimize

etmek için birçok sistematik ve kısmen de otomasyona uygun yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu RPHPLC' ye de uygulanabilir. Bu yöntemler, genellikle mobil fazın bileşiminin (su- organik faz oranı) optimize edilmesinde kullanılır. İyi bir kapasite faktörü ne çok düşük ne de çok yüksek olmalıdır. Log k değerleri ile çözünenin  $E_T^N$  değeri arasındaki ilişki, log k nin organik modifiyerin mol kesrine olan ilişkisinden daha iyi bir doğruluk gösterir ( $\log k = C + e E_T^N$ ). Bu bağıntı, kompleks karışımların ayrılmasında deneysel çalışmayı önemli ölçüde azaltır. Log k -  $E_T^N$  lineerliği nedeniyle birçok durumda iki k değeriyle bu bağıntı kullanılarak mobil faz optimize edilebilir. iyonik ve iyonlaşabilen çözünenlerin ayrılmasında mobil fazın pH' sindaki değişim çok büyük değişikliklere yol açabilir, zira bu bileşiklerin alıkonma zamanları, dolayısıyla kapasite faktörleriyle ortamın hidrojen iyonu derisimi arasında belli bağıntılar vardır. Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH' si, genellikle sulu çözelti pH' si olarak alınmaktadır, oysa RPHPLC çalışmalarında su-organik modifiyer karışımı hareketli faz olarak kullanılır. RPHPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonytril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Asetonytril düşük absorpsiyonu, düşük viskozitesi ve simetrik pik şekli verebilmesinden dolayı organik modifiyer olarak kullanılabilir. Asetonytril-su ortamında ( % 70' e kadar) potasyum hidrojen ftalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir. pH'nin sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

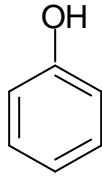
Optimizasyon, pH ve çözücü kuvvetini ( sulu faz /organik faz ) aynı anda değiştirmekle mümkün olur. pH ve çözücü kuvvetine ek olarak tampon tipi ve derisimi, toplam iyon siddeti ve kuyruklanmayı azaltıcı diğer reaktiflerin düşünülmesi yararlıdır.

Yukarıda belirtildiği üzere halojenli fenoller toksik özellikleri nedeniyle karışıma her alanda çıkmaktadır. Bu çalışmada seçilen halojenli fenollerin kromatografik (HPLC ile) ayrılması amaçlanmaktadır. Literatürde çeşitli çalışmalar bulunmakla beraber ayırmanın optimizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

## 1.1. Kuramsal Temeller

### 1.1.1. Fenoller hakkında genel bilgi

Hidroksil grubu benzen halkasındaki karbon atomuna bağlandığı zaman oluşan bileşik, fenol olarak adlandırılır. Bu sınıfın en basit üyesi olan hidroksibenzen, fenol olarak bilinir (Pine, 1987).

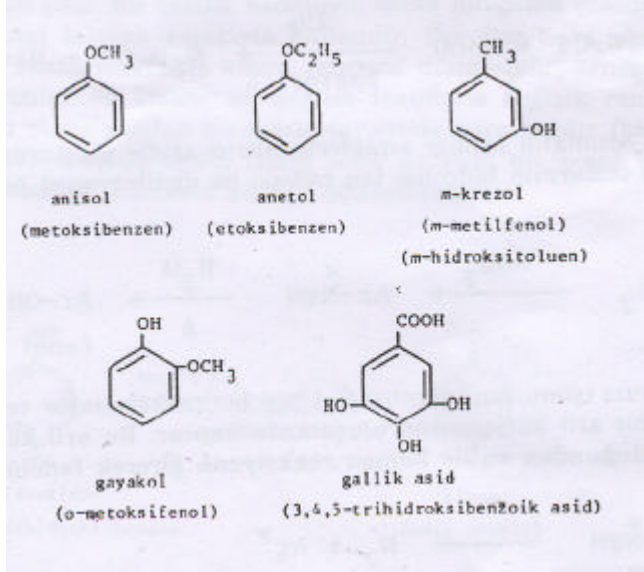


Hidroksibenzen (Fenol)

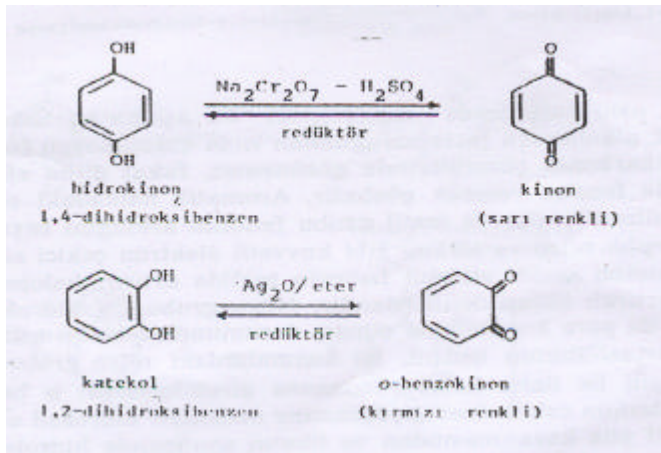
Fenol sözcüğü, fenil sözcüğünün ilk harfi ile çifte bağa bağlı karbon üzerinde hidroksil grubu bulduran yapıların adı olan enol sözcüğünden türetilmiştir (Chemical Abstracts, IUPAC sistemini kullanarak süstitüe fenolleri benzenol şeklinde adlandırmakta ve örneğin o-nitrofenol yerine o- nitrobenzenol demektir ). Hidroksil sayısı birden fazla ise hidroksi ön eki kullanılır, 1,2-dihidroksibenzen gibi. Aromatik halkada hidroksil yanında karboksil, sülfonik asid gibi gruplar varsa isimlendirmede öncelik sırasını bu gruplar alır ve böyle yapılar örneğin m- hidroksibenzoik asid, p- hidroksibenzaldehid, 2- hidroksibenzensülfonik asid vb. şeklinde adlandırılır.

Fenoller serbest yada esterleşmiş halde doğada da yaygın olarak bulunur ve bu doğal maddeler, özel adları ile anılır: anisol, anetol, o-, m-, p- kresol'ler, gayakol, gallik asit gibi.

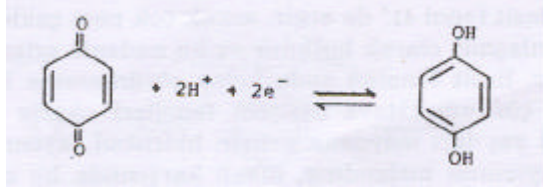




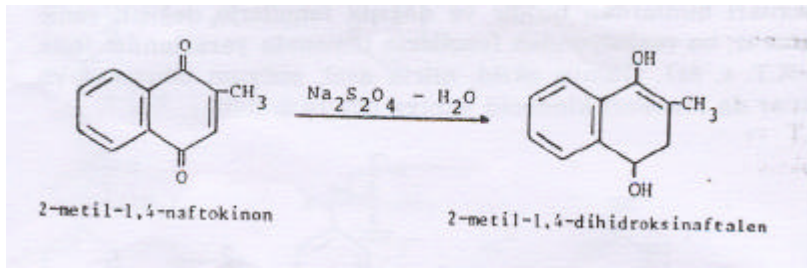
Fenollerin özellikleri: Fenoller, keskin ve nüfuz edici kokuda billur maddelerdir. Basit fenol  $41^0$  de ergir, ancak çok nem çekici olduğundan kısmen sivilasmis olarak bulunur ve bu nedenle erime derecesi daha da düşer. Basit fenolün suda kolay çözünmesine karşılık alkil fenoller güç çözünür. Hava oksijeni fenolleri okside ederek kinon denen renkli yapıları meydana getirir; hidroksil sayısının artması hava oksidasyonunu hızlandırır, alkali karsısında bu oksidasyon daha da hızlı olur. Bu özellik nedeniyle alkali pirogallol çözeltisi havanın oksijenini tutmak amacıyla kullanılır. Fenoller hava oksijeninden başka oksidanlarla da kinon yapısına dönüşebilir, örneğin ferri iyonları bunlardan biridir ve değişik fenollerle değişik renkler oluşturur, bu reaksiyondan fenollerin tanisından yararlanılır. Gümüş oksit, nitrik asit, sodyum bikromat vb. oksidanlar da fenolleri kinonoid yapıya dönüştürebilir:



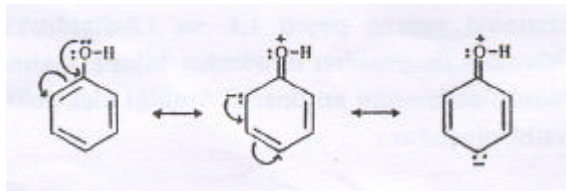
Oksidanlarla kinonoid yapıya geçen 1,4- ve 1,2- dihidroksibenzenler, redüksiyon ajanları ile yeniden dihidroksi bileşiği haline dönüşebilir; yani bu redoks sisteminin en önemli özelliği elektrokimyasal bakımdan geri dönüşümlü olmasıdır:

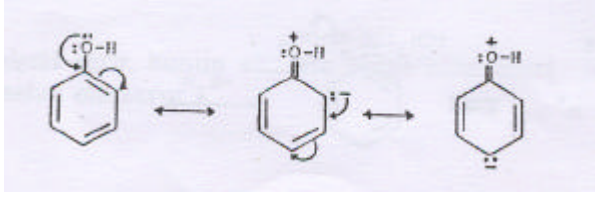


Örneğin 1,4-kinon bileşiği olan menadion (K<sub>3</sub> vitamini), redüksiyonla 2-metil-1,4-dihidroksinaftalen verir:



Fenoller, asit karakterde maddelerdir. Bu asitlik karboksilik asitlerden az, alkollerden fazla olduğundan suda çözünmeyen fenoller, alkali bikarbonat çözeltilerinde çözünmez, fakat seyreltik alkali hidroksitlerde fenolat vererek çözünür. Aromatik halkadaki elektron veren sübstitüentler ve metil grubu fenolün asitliğini zayıflatır; buna karşılık nitro ve siyano gibi kuvvetli elektron çekici sübstitüentler fenolün asidik etkisini belirgin şekilde artırır; halojenlerde asitliği artıran sübstitüentlerdir. Nitro grubunun hidroksile göre orto ya da para konumunda olması durumunda fenolün asitliği daha fazla artar. Bunu nedeni, bu konumlardaki nitro grubunun fenol hidroksili 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. Aşağıda fenolün iki kanonik yapısında bu rezonans durumu görülmektedir:





Halkadaki nitro sayısının fazlalığı asitliği artırır, örneğin 2,4-dinitrofenolün  $pK_a$  değeri 4.09, 2, 4, 6-trinitrofenolün (pikrik asit)  $pK_a$  değeri 0.25 dir (fenol  $pK_a=10.0$ ).

Fenol hidroksili halojenle değiştirilebilir. Ancak OH ile halojenin yer değiştirmesi alkollerden zor olduğu için fosfor pentaklorür ya da fosfor pentabromür kullanmak gerekir:



Hidroksil grubu, 1. sınıf bir süstitüent olduğu için halojen, nitro, sülfonik asit gibi grupları orto- ve para- konumlarına yöneltir ve örneğin o- ya da p- bromofenol, p- nitrofenol, 4- hidroksibenzen-1,3-disülfonik asit gibi süstitüe fenol bileşikleri elde edilir. Pikrik asit sentezinde kullanılan 4hidroksibenzen-1,3- disülfonik asidi elde etmek için,  $100^\circ C$  de derişik sülfürik asitle muamele edilir. Bu maddenin nitrik asitle buz banyosunda etkileştirilmesi, fenole göre orto- konumunu nitrolar, sonra nitrik asitli karışım ısıtarak nitro gruplarının sülfonik asit gruplarının yerine geçmesi sağlanır. Elektrofilik bir süstitüsyon olan bu reaksiyon, halkadaki hidrojenin süstitüsyonu gibi yürür; halkadan ayrılan parçanın proton yerine  $SO_3H^+$  kasyonu olmasıdır; ancak nihai ürün,  $SO_3H^+$  grubunun da protonunu hemen atması ile, nötral bir molekül olan  $SO_3$  tür.

### 1.1.2. Kromatografide temel kavramlar

Kromatografide bazı önemli kavramlar kapasite faktörü, seçicilik, ayırma gücü ve etkin tabaka sayısidir. Kromatografide bir pik, alikonma zamanı,  $t_R$ , ile tanımlanır. Ters faz sıvı kromatografide mobil fazın organik modifiyeri arttikça, mobil faz polaritesi ve çözünenin alikonması azalır. Bu değer, mobil fazın akış hızı ve kolon

uzunluğu ile de degisir.  $t_0$  , durgun fazda hiç tutulmayan bir türe ait pikin gelis süresi veya ölü hacmidir ve hareketli fazin ortalama göç hizini verir.

Kromatografide karsilastirmalarda alikonma zamani yerine kapasite faktöründen,  $k$ , yararlanilir.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \dots(1)$$

olarak verilir.

Burada  $t_R$  , bilesene,  $t_0$ , kolonda tutunmayan türe ait alikonma zamanlaridir,  $k$  degerinin büyük olusu, bilesenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavas ilerledigini;  $k$  degerinin küçük olmasi, bilesenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasindan dolayi kolon boyunca hizli ilerledigini gösterir. HPLC ayirmalarında, mümkün oldugunca 1-10 arasinda tutulmalidir,  $k$  çok küçükse, bilesik, çözücü pikinden ayrilamaz,  $k$  çok büyürse ayirma islemi çok zaman alır.  $k$  degerlerinin bu aralikta olmasi, hareketli faz ve durgun faz bilesimlerinin degistirilmesi ile saglanır.

Iyonlasabilen bir türe ait kapasite faktörü, türlerin mobil fazdaki mol kesirlerine bagli olarak çözünenin iyonik ve nötral formlarinin agirlikli ortalamasi olarak verilebilir (Horvathvd., 1977).

$$k = x_{HA} \cdot k_{HA} + x_{A^-} \cdot k_{A^-} \quad \dots(2)$$

Esitlik 2' de monoprotik bir asit (HA) için türlerin mol kesirleri yerine molar derisimleri yazildiginda:

$$k = \frac{[HA]k_{HA} + [A^-]k_{A^-}}{[HA] + [A^-]} \quad \dots(3)$$

esitligi elde edilir. RPHPLC de yüklü türlerin tutulması, genellikle nötrallerden daha azdır. Zayıf bir monoproitik asitin ODS veya polimer esaslı kolonda tutulması ile ilgili kapasite faktörü ve mobil faz pH'si arasındaki ilişki eşitlik 3'deki bağıntı ile verilir (Poole ve Poole, 1997).

Monoproitik asitler için termodinamik ayrışma sabiti;

$$K_a = \frac{[A^-] \mathbf{g} a_{H^+}}{[HA]} \quad \dots(4)$$

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

$$k = \frac{k_{HA} + k_{A^-} K_a / \mathbf{g} a_{H^+}}{1 + K_a / \mathbf{g} a_{H^+}} \quad \dots(5)$$

esitligi elde edilir. Eşitlik 5 doğrusal olarak;

$$k(1 + K_a / \mathbf{g} a_{H^+}) = k_{HA} + k_{A^-} K_a / \mathbf{g} a_{H^+} \quad \dots(6)$$

ifade edilebilir. Molar aktivite katsayısı,  $\mathbf{g}$ , klasik Debye-Hückel esitligi ile bulunabilir.

$$\log g = \frac{-AI^{1/2}}{1+a_0BI^{1/2}} \quad \dots(7)$$

Burada A ve B degerleri Debye-Hückel sabitleri ve  $a_0$  ise organik çözücü-su karisimlerinde iyon çapi parametresidir. Esitlik 7'deki iyon çapi parametresinin degeri IUPAC' n tavsiyeleri dogrultusunda Bates-Guggenheim esitligi ile bulunabilir.

$$(a_0B)_T = 1.5[e^w r^s / (e^w r^s)]_T^{1/2} \quad \dots(8)$$

w ve s üst indisleri sirasiyla su ve organik karisimini, T alt indisi uygun sicakligi, e, dielektrik sabitini,  $\rho$ , yogunlugu ifade eder (Rondinini vd., 1987)

Çizelge 1.1. Asetonitril-su karisimlerinde Debye-Hückel solvatokromik parametre degerleri,  $pK_{ap}$  degerleri ve silika kolon pH degerleri

%(w/w) ACN	A	$a_0B$	$pK_{ap}$	Silika kolon pH araligi
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

Kullanilan mobil fazlarin iyonik siddeti, I, her bir mobil faz bilesimindeki yük ve kütle denkliklerinden, pH ayarlamalarında kullanılan asit veya bazin analitik konsantrasyonundan ve okunan pH degerlerinden hesaplanarak bulunabilir (Barbosa vd., 1998A; Barbosa vd. , 1998B).

İki pikin birbirinden ayrilmasi seçicilik faktörü,  $\alpha$ , ile verilir.

$$\mathbf{a} = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad \dots(8)$$

dir.  $\alpha$ , 1,15 ise iki bileşinin birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

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

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

$$N = 5,54 \left[ \frac{t_R}{W_{0,5}} \right]^2 \quad \dots(9)$$

Burada ;

N : Teorik tabaka sayısı

$t_R$  : Bileşene ait alıkonma zamanı

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

dir.

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.

$$R_s = (1/4)\sqrt{N} [(a-1)/a] [k/(1+k)] \quad \dots(10)$$

Burada,

$R_s$  : Pik çifti için ayırma gücü,

$\sqrt{N}$  : Etkin tabaka sayısı,

$\alpha$  : Seçicilik faktörü

$k$  : Kapasite faktörü

dir.

Ayırma gücü için geliştirilen diğer bir bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R = 1,18x \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}} \quad \dots (11)$$

Burada;

$R$  : Pik çifti için ayırma gücü.

$t_1$  : Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

$t_2$  : İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

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

$W_{p0,5}$  : İkinci pikin zaman ekseninde yan genişliği

dir.

### 1.1.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)

İlk sıvı kromatografi, çapı 1-5 cm ve uzunluğu 50-500 cm olan cam kolonlarında uygulanmıştır. Uygun akış hızları temin etmek için, katı durgun fazı oluşturan partiküllerin çapı, genellikle 150- ila 200- µm aralığındaydı. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü ve analitin kolondaki ilerleme hızı dakikada milimetrenin birkaç ondalık kesri kadar oluyordu. Böylece ayırma zamanları çok uzundu ve çoğu zaman birkaç saat alıyordu. Bu klasik kromatografi işlemlerini hızlandırmak için vakum veya basınç uygulama girişimleri de pek yararlı olmadı; çünkü akış hızı artınca,



teorik tabaka yüksekligi, akis hizi –tabaka yüksekligi egrisindeki minimum noktasinin ötesinde yükseklik artirlarina yol açiyor, sonuçta ayirma verimi düşüyordu.

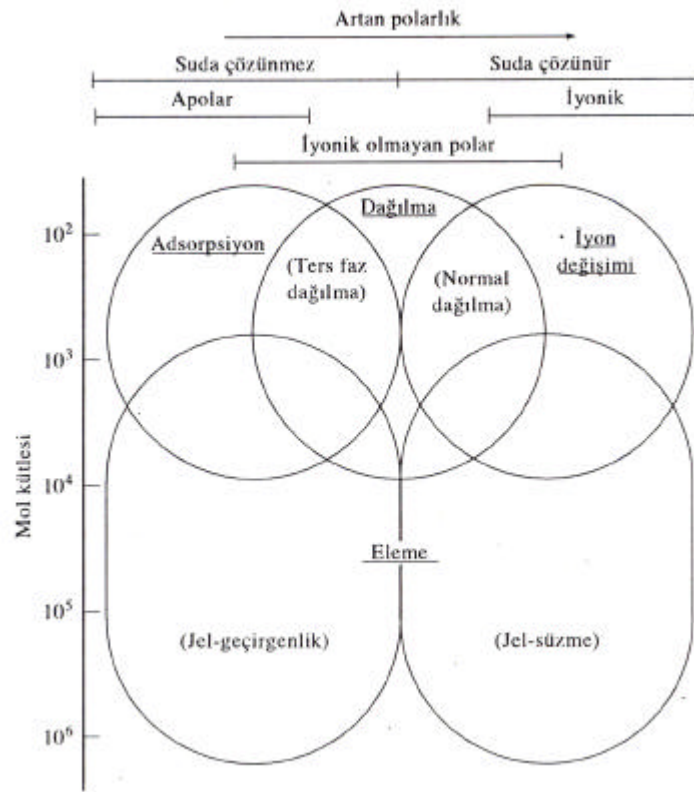
Sivi kromatografinin gelistigi ilk yillarda, bilim adamlari, kolon veriminin, dolguda kullanılan taneciklerinin boyutunun azaltilmasi ile önemli ölçüde artacagini fark ettiler. Ancak, tanecik çapi 3-10 µm kadar küçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisinin gelismesi ve kullanilmasi 1960’li yillarin son dönemlerine kadar basarilamadi. Bu teknoloji, klasik yerçekimi- akisli sivi kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalisan, gelismis cihazlara ihtiyaç göstermektedir. Yüksek Performansli sivi kromatografi (HPLC) ismi, preparatif amaçla halen kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni islemlere ayirt etmek için kullanilmaktadır.

#### **1.1.3.1. HPLC’nin kapsamı**

Yüksek performansli sivi kromatografi bütün analitik ayirma teknikleri arasında bir milyar dolar’ a yaklasan yıllık satisiyla en yaygin kullanılanidir. Yöntemin bu kadar yaygin olmasinin sebepleri, duyarlıligi, dogru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olmasi, uçucu olmayan türlerin veya sicaklikla kolayca bozunabilen türlerin ayrilmasina uygun olmasi ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalinin ve halkin birinci derecede ilgilendigi maddelere genis bir sekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal- organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayilabilir.

Sekil 1.1, sivi kromatografi islemlerinin, uygulama alanlari bakımından birbirini tamamlama egiliminde oldugunu göstermektedir. Örneğin, mol kütleli 10000’den daha büyük maddeler için, her ne kadar simdilerde bu gibi maddeleri ters- faz

dağılma kromatografisi ile de incelemek mümkün ise de, eleme kromatografisi daha çok kullanılır. Daha küçük mol kütleli iyonik türler için, iyon değişimi kromatografisi yaygın bir şekilde kullanılır. Küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler, en iyi dağılma yöntemleri ile incelenebilir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. Adsorpsiyon kromatografisi çoğu zaman polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir.



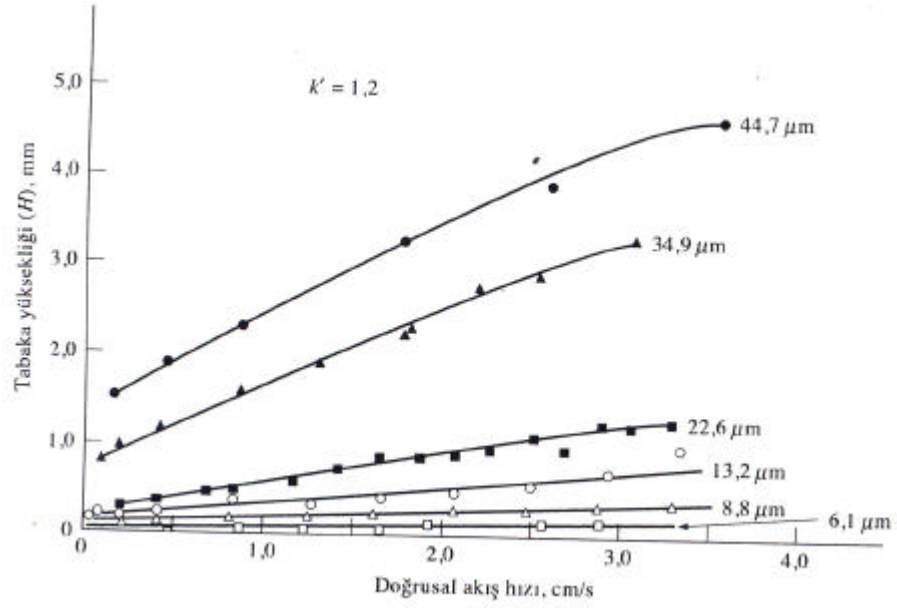
Sekil 1.1 Sivi kromatografinin uygulamaları

### 1.1.3.2. Sivi kromatografide kolon verimliliği

Bu bölümde, durgun fazın tanecik boyutunun önemli etkisi açıklanacak ve sivi kromatografide bazen pik genişleme sine yol açan üç önemli faktör ele alınacaktır.

### 1.1.3.2.1 Dolgu maddesi tanecik boyutunun etkileri

HPLC kolonunun verimliliği, tanecik boyutu azaldığında çarpıcı bir biçimde artmalıdır. Sekil 1.2, tanecik boyutunun  $45 \mu\text{m}$ ' den  $6 \mu\text{m}$ ' ye düşmesiyle tabaka yüksekliğinin 10 kat veya daha fazla azaldığını gösteriyor ki, bu, söylenenin deneysel bir kanıtıdır.



Sekil 1.2 Sivi 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 klorür, isopropil alkol karışımı

### 1.1.3.2.2. Sivi kromatografide kolon-disi bant genişlemesi

Sivi 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, dedektör bölgesinde ve sistemin farklı parçalarını birbirine bağlayan boru bağlantılarında akışı sırasında meydana gelir. Buralarda, borunun merkezindeki ve çevresine yakın

bölgedeki sivi tabakalarının akis hızları arasında farktan dolayı genişleme olur. Sonuç olarak, çözünen maddenin oluşturduğu bantın merkezi, dis kısmından daha hızlı hareket eder. Gaz kromatografide, kolon dis genişleme difüzyonla büyük ölçüde dengelenir. Ancak, sıvılardaki difüzyon önemli ölçüde yavaştır ve bu tip bant genişlemesi çoğu zaman önemsenecek duruma gelir. Toplam tabaka yüksekliğine kolon dis etkilerinin katkısı ( $H_{dis}$ ) aşağıda verilen eşitlikle gösterilmiştir:

$$H_{DIS} = \frac{\pi r^2 u}{24 D_M} \quad \dots(12)$$

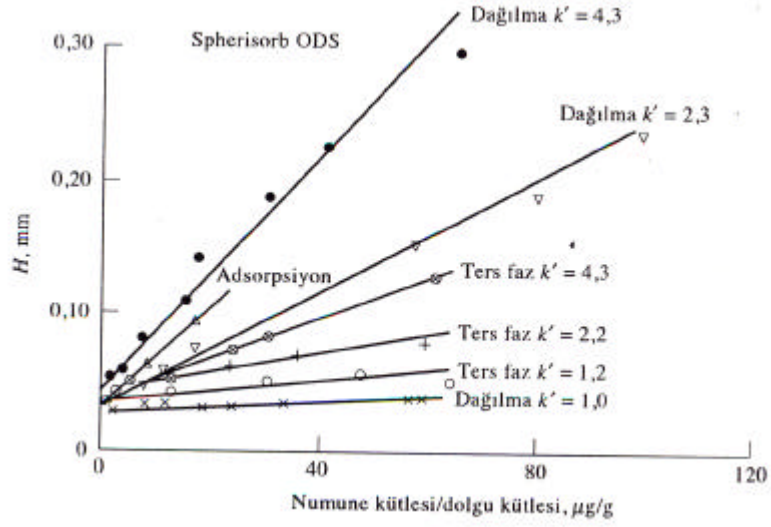
Burada  $u$ , doğrusal akis hızı, cm/s ;  $r$ , borunun yarıçapı, cm; ve  $D_M$ , çözünen maddenin hareketli fazdaki difüzyon katsayısı,  $cm^2/s$ 'dir. Küçük çaplı kolonlar kullanıldığında kolon dis genişleme oldukça ciddi boyutlara ulaşılabilir. Burada, kolon bağlantılarının yarıçapını 0, 25 mm'nin altına düşürmek için her türlü gayret gösterilmelidir.

#### 1.1.3.2.3. Kolon verimliliğine numune miktarının etkisi

Şekil 1.3, farklı tipteki sivi kromatografileri için kolon verimliliğine bağlı numune kütlesinin ( $\mu g$  numune /g dolgu maddesi) etkisini göstermektedir. Burada, diğer tip dolgu maddeleri ile karşılaştırıldığında, ters faz tipi bağlanmış dolguların olagan üstü performansına dikkat edilmelidir.

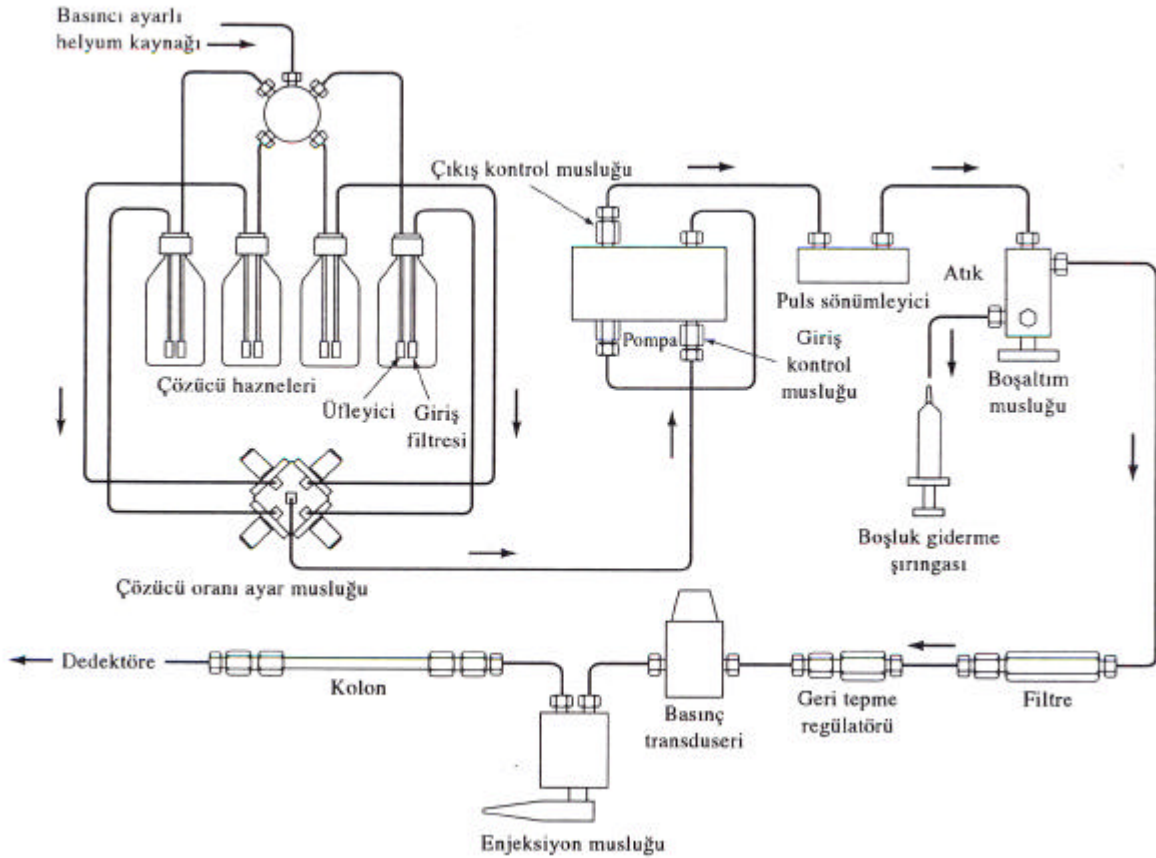
#### 1.1.3.3. Sivi kromatografi cihazları

Modern sivi kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2- ile 10-  $\mu m$  arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sivi akis hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate



Sekil 1.3 Tabaka yüksekliğine bağıl numune kütlesinin etkisi

alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Sekil 1.4, her biri aşağıdaki paragraflarda tartışılan, tipik bir yüksek-performanslı sıvı kromatografinin önemli parçalarını sematik olarak göstermektedir.



Sekil 1.4 Bir HPLC cihazının seması

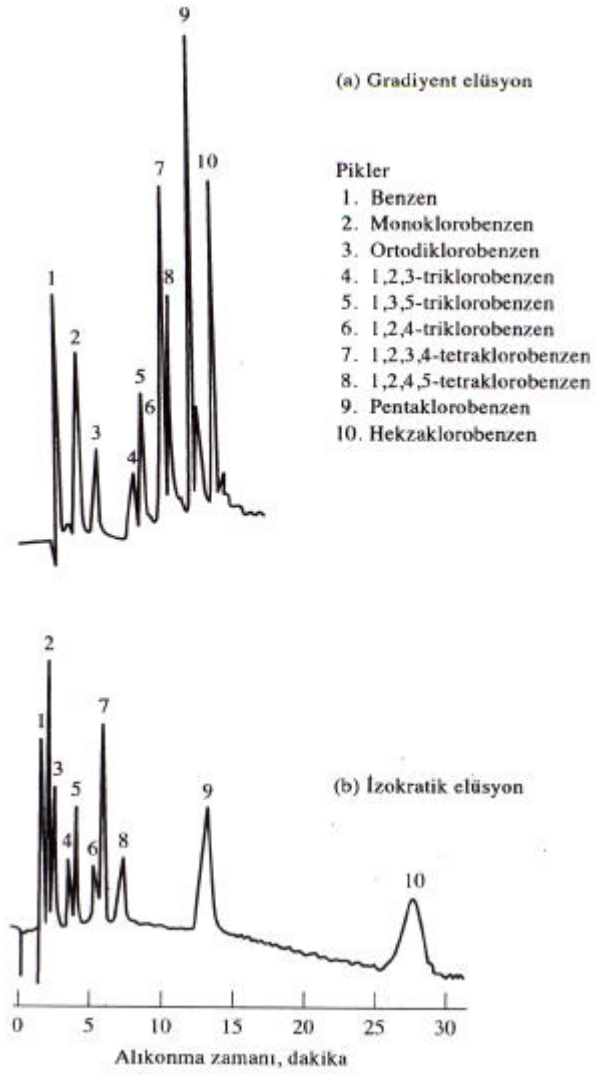
#### 1.1.3.4. Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 ml çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman dedektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar. Gaz giderme düzenegi, vakum pompası sistemi, damıtma sistemi ve çözücüü ısıtıp karıştırılan bir parçadan oluşabileceği gibi, Sekil 1.4'teki gibi düşük çözünürlükteki inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla, çözünmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki

maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri sürmeye yarayan bir süzme düzenegi de içerirler. Gaz gidericilerin ve süzme düzeneginin, Sekil 1.4'de görüldüğü gibi, HPLC sisteminin ana parçası olması gerekli değildir. Örneğin, çözücü hazneye doldurmadan önce uygulanacak uygun bir yol, çözücü, vakum altında bir milipor süzgeçten süzmektir. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Siklikla, ayırma etkinliği gradiyent elüsyonu ile büyük ölçüde artırılır. Burada polariteleri önemli derecede birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. Modern HPLC ekipmanları çoğu zaman, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla haznedenden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getirilen sistemlerle donatılmıştır.

Sekil 1.5, bir klorbenzen karışımının ayrılmasında gradiyent elüsyonun avantajını açıklamaktadır. Metanol / su oranı 50:50 (v/v) olan bir çözelti ile yapılan izokratik elüsyon Sekil 1.5 (b)'deki eğriyi vermiştir. Sekil 1.5 (a)'daki eğri, iki çözücünün 40:60 oranlarındaki karışımı ile başlatılan ve daha sonra metanol derişimi %8 /dakika hızla artırılan gradiyent elüsyon içindir. Burada gradiyent elüsyon ile ilk çıkan piklerdeki ayrılmadan ödün vermeden, ayırma zamanının önemli ölçüde kısaltıldığına dikkat edilmelidir.



Sekil 1.5 Gradyent elüsyon ile ayırma verimliliğinin iyileştirilmesi. Numune: 5  $\mu$ L, izopropanolde hazırlanmış klörlanmış benzenler. Kolon: 1 m x 2, 1 mm iç çap paslanmaz çelik boru. Dolgu maddesi: %1 Permaphase. Dedektör: UV fotometre (254 nm). Kosullar 60 , 82 atm.

#### 1.1.4. Mobil fazda pH standardizasyonu

Kromatografik ayırmada mobil faz pH'si, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin mobil fazda bu formların mol kesirlerine göre



agirlikli ortalamasidir. Mol kesirleri, çözünenin pK ve mobil fazin pH degerinden hesaplanir.

Sivi kromatografide kullanılan mobil fazların pH'si, önceleri sulu çözelti pH'si olarak alınmıştır. Oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek basına mobil faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer olarak asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Sulu faz pH'sinin ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlidir ve çözüneneye göre değişir. Bu nedenle HPLC mobil fazına ve su ortamına ait  $pK_a$  değerleri farklıdır. Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nin sudaki pH yerine mobil fazdaki degerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir. (J. Barbosa ve V. Sanz-Nebot, 1993 ).

Referans deger pH standart çözeltisi (RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi seçilmiş ve 0,05 mol/kg esas alınmıştır. (Rondinini et al. 1987). Metanol-su ve asetonitril-su ortamında (% 70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH degerleri belirlenmiştir. 0,05 m potasyum hidrojen fitalatin (KHPH) su asetonitril karışımlarında çeşitli sıcaklıklardaki pH degerleri (Rondinini et al. 1987, Rondinini ve Nese, 1987). Çizelge 1.2'de verilmistir. PH standardizasyonunda çok noktali kalibrasyon da önerilmektedir (Baucke et al. 1993 ).

Çizelge 1.2 Asetonitril su karışımında 0,05 m KHPH için  $pH_{RVS}$  degerleri

$t$ °C	Asetonitril kütlece yüzdesi , %(w/w) ve mol kesri				
	5;0,0226	15;0,0719	30;0,1583	50;0,3050	70;0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

Çözücü karisimlerinde (metanol-su, asetonitril-su ) standart tampon çözeltilerinin referans pH degerleri,  $pH_s$  bilindiği için bu karisimlerde pH ölçümleri pH'nin tanımına uygun olarak  $p$  asagidaki baginti dikkate alınarak yapilir.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g} \quad \text{.....(13)}$$

Bu baginti, sivi temas potansiyeli,  $E_j$ , referans çözeltilinin, PS, degismesi ile degisiyorsa asagidaki sekle dönüşür.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g} + \frac{(E_j)_x - (E_j)_s}{g} \quad \text{.....(14)}$$

Burada;  $(E_j)_x - (E_j)_s$  artık sivi temas potansiyelidir ve pH ölçülmesinde dikkat edilmesi gerekir (Barbosa et al. 1991; Barbosa et al. 1996). PH ölçümünün yapıldığı hücre asagidaki gibi sematize edilebilir.

Referans elektrot | Tuz köprüsü || S çözücüsünde numune |  $H^+$  duyarli elektrot  
çözeltilisi veya tampon çözelti

Mobil fazın pH'si alikonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Mobil faz pH'si çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve mobil faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Mobil fazın pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha komplikedir. Zira pH'nin değişmesi ile sadece iyonlaşan çözünen yapıların seçicilik ve alikonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişliği ve pik simetrisinde değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik genişlik ve şekillerinin de göz önüne alınması gerekir.

### 1.1.5. Kromatografik ayırmalara giriş

Genellikle, kimyasal tayin yöntemleri seçici olup belki çok azı spesifiktir. Bunun sonucu olarak, maddelerden ayrılması çoğu zaman zorunludur. Yirmibirinci yüzyilini ortalarına kadar analitik ayırmalar çöktürme, damıtma ve ekstraksiyon gibi klasik

yöntemlerle yapılıyordu. Günümüzde, analitik ayırmalar, özellikle numune çok bileşenli ve karmaşık ise çoğunlukla kromatografi ve elektroforez ile yapılmaktadır.

Kromatografi, bilimin tüm dallarında uygulaması bulunan güçlü bir ayırma yöntemidir. Kromatografi yirminci yüzyilin başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır. (Yunancada **chroma** “renk” ve **graphein** “yazma” anlamına gelmektedir).

Son bes yılda hem birçok yeni kromatografik teknik geliştiği ve hem de bilimcilerin karmaşık karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik uygulamalar çok büyük oranda artmıştır. Bu yöntemlerin bilime büyük katkılar yapması sonucu bu alandaki buluşlarına karşılık 1952 yılında A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge'ye Nobel ödülü verilmiştir. Daha da önemlisi 1937 ile 1972 yılları arasında alınan 12 Nobel Ödülü kromatografinin önemli rol aldığı çalışmalara verilmiştir<sup>1</sup>. (L.S. Ettre, High-performance Liquid Chromatography, C. Horwath. Ed., Vol. 1, p. 4. New York: Academic Press, 1980). Şüphesiz, günümüze kadar bu sayı daha da artmıştır.

## 2. KAYNAK BILGISI

Pocurull ve arkadaşlarının 1995 yılında yaptıkları çalışmada, çalışmacılar çevresel sularda bulunan fenolik bileşikleri ön zenginleştirme işlemi yapmak suretiyle HPLC vasıtasıyla tayin etmişlerdir. Çalışmacılar çalışmalarında musluk suyu ve nehir suyu olmak üzere gerçek örneklerle analiz yapmışlardır. Musluk suyunun 4 mililitresi ön deristirme yapılarak fenolik bileşikler tutulmuş ve 1 ng/L seviyesinde tayin yapılmıştır. Bu numunede dedeksiyon limiti 1-10 ng/L olarak belirlenmiştir. Nehir suyu analiz edilirken sadece 1 mL örnek ön deristirilmiştir, çünkü humik ve fulvik asitler bu numunede engelleme yapmışlardır.

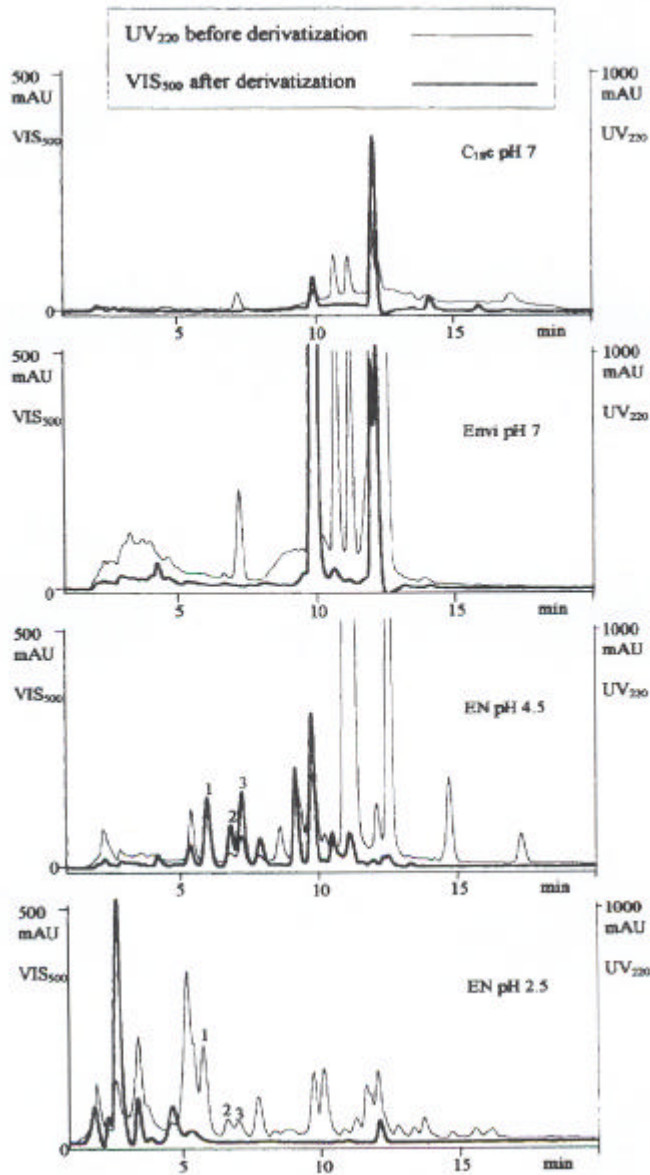
Yine Pocurull ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada doğal sulardaki fenolik bileşikleri ön zenginleştirme işleminden sonra, ultraviyole ve elektro kimyasal dedeksiyonlu sıvı kromatografide tayin etmeyi başarmışlardır. Çalışma sonucunda tayin edilen fenolik bileşiklerin tayin sınırının 0,1 µg/L olduğu belirlenmiştir.

Jauregui ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada çalışmacılar, musluk suyu ve deniz suyundaki klorlu ve nitrofenolik bileşikleri kütle spektrofotometresinde tayin etmişlerdir. Çalışmada isokratik mobil faz olarak % 0,05 asetik asit-asetonitril (50:50 v/v) kullanılmıştır. Tayin limiti olarak 0,02 - 20 ng saptanmıştır.

Puig ve Barcelo 1997 yılında yaptıkları çalışmada sulardaki fenollerini sıvı-sıvı ekstraksiyonu takiben kulometrik dedeksiyonlu sıvı kromatografide tayin etmişlerdir. Çalışmacılar sadece 5 mL su kullanılarak yapılan analizlerde tayin limitinin trilyonda bir kısım olduğunu belirtmişlerdir.

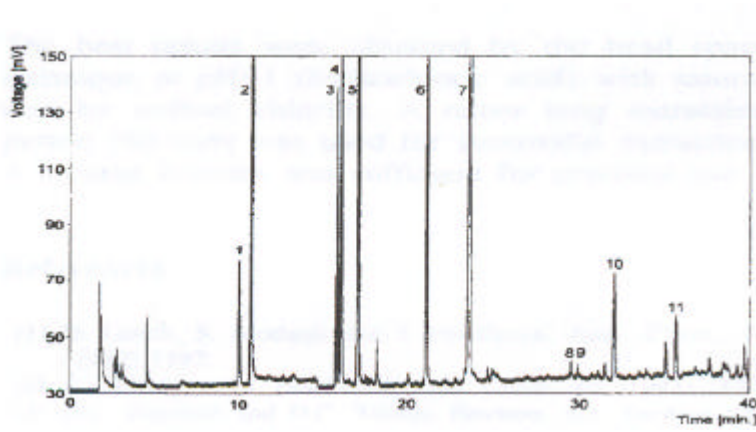
Fiehn ve Jekel 1997'de yaptıkları çalışmada ön kolon reaksiyon dedeksiyonu ve HPLC ile endüstriyel atık sulardaki fenolik bileşiklerini analiz etmişlerdir. Çalışmacılar hayli karmaşık bir kompleks de bile RP-HPLC ayırmasından sonra fenollerini tanımlayan yeni bir metot geliştirmişlerdir. Bunun için güçlü asidik ortamda

$Ce(NH_4)_2(SO_4)_3$  ve N-metilbenzotioazol-2-hidrazon ilavesinden sonra fenoller 500 nm dalga boyunda tayin edilmişlerdir. Su içeriğinin görünür spektrumları ve yoğunluğu tipik HPLC eluentleri kullanılarak bağımsız hale getirilmiştir. 30 bilinen hidroksi aromatik bileşik tayin edilmiştir. Fenollerin hemen hemen hepsi maksimum absorbanlarını 500 nm civarında göstermişlerdir. Nitro fenoller hariç, belirlenme dedeksiyonu 1-20 ng arasındaadır. Bu şartlar altında aldehitler reaksiyon vermemişlerdir. Şekil 2.1 de muamele edilen atık sulardaki eluatların HPLC ve UV kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Çalışmada muamele edilen atık sulardaki eluatların HPLC ve UV kromatogramları

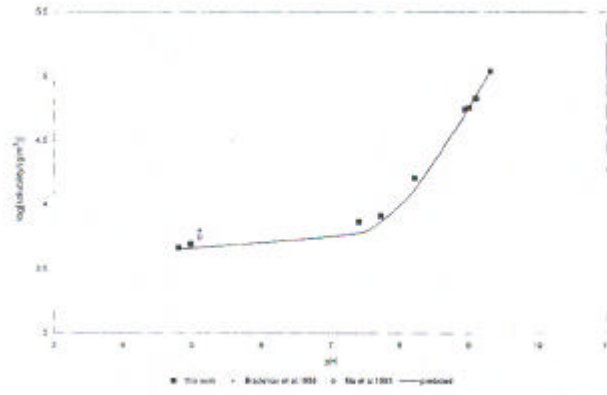
Bartak ve Cap 1997 yılında yaptıkları çalışmada katı faz mikroekstraksiyon metoduyla fenollerin tayin etmişlerdir. Çalışmacılar, analitleri çok ince eritilmiş silika fiber üzerine uygun sorbentlerle kaplanmış ince tabaka vasıtasıyla ekstrakte etmişlerdir. Bu fiber gaz kromatografisinin enjeksiyon bölümüne verildiğinde, analitler gaz kromatografisinde isisal desorpsiyonla analiz edilmişlerdir. Çalışmacılar en iyi sonuçları poliakrilat kaplamada elde ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışma şartları, ekstraksiyon zamanı 60 dakika, desorpsiyon zamanı 250°C de 8 dakika olarak belirlenmiştir. Hidroklorik asit ile asitleştirme ve tuzların uzaklaştırılmasıyla en iyi geri kazanma şartları elde edilmiştir. Çalışmacıların elde ettiği fenollerin kromatogramı Şekil 2.2’de verildiği gibidir.



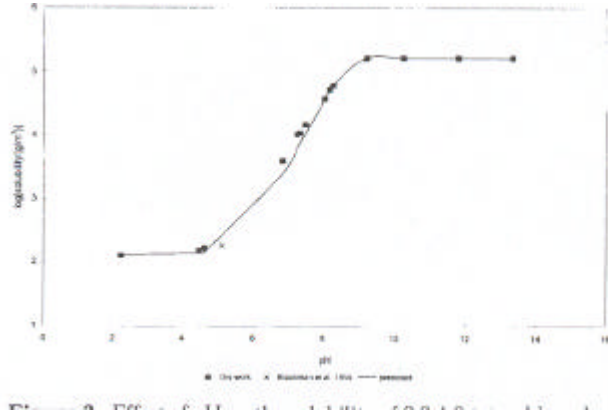
Şekil 2.2 Bartak ve Cap tarafından çalışılan fenollerin tipik kromatogramı

Huang ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada, bazı seçilmiş klorlu fenollerin sudaki çözünürlüğüne pH' nin etkisi incelenmiştir. Klorlu fenolik bileşikler zayıf asitlerdir. Yüksek toksik özelliğinden dolayı hasere ilacı, tarım ilacı ve dezenfektan olarak kullanılırlar. Suda çözünürlük kimyasalların toksik özelliğini etkileyeceğinden; sıcaklık, pH gibi çevrel faktörlerin bu maddeler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Suda çözünürlük pH 2 ile 4 arasında iken, 25°C’de UV tayini ile HPLC ile ölçülerek 2,4-diklorofenol ; 2,4,6-triklorofenol; 2,3,4,6-tetraklorofenol ve pentaklorofenol için yapılmış ölçümlerdir. pH’ in bu 4 maddeye etkisi hemen hemen aynıdır. Düşük pH değerinde (pKa’ nin altında bir değer) çözünürlük aşağı yukarı sabit iken pKa civarında, ortamdaki iyonik etkenlerden dolayı artar. pH, pKa’ ya eşit olduğunda toplam çözünürlük ikiye katlanır, bu durumda iyonik ve iyonik olmayan

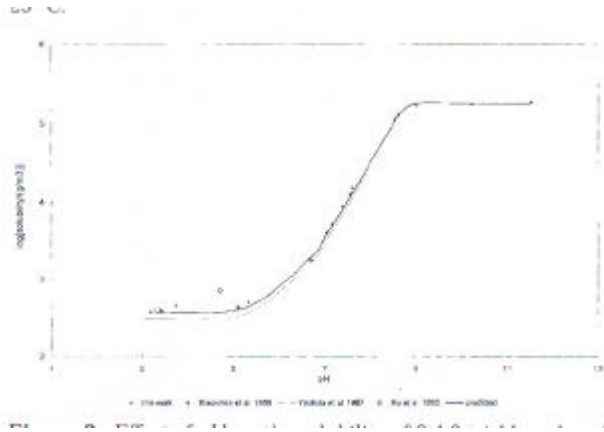
formlar esit derisimde bulunmaktadir. alısmada kullanılan maddelerin çözünürlüğüne pH' nin etkisi grafikleri asagidaki sekillerde görülmektedir.



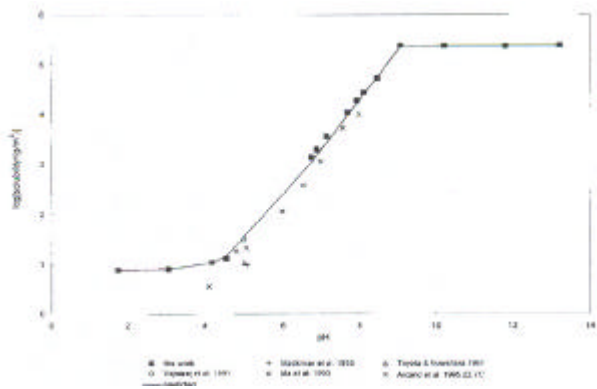
Sekil 2.3 25°C de 2,4-diklorofenolün çözünürlüğüne pH' nin etkisi



Sekil 2.4 25°C de 2,4,6-triklorofenolün çözünürlüğüne pH' nin etkisi

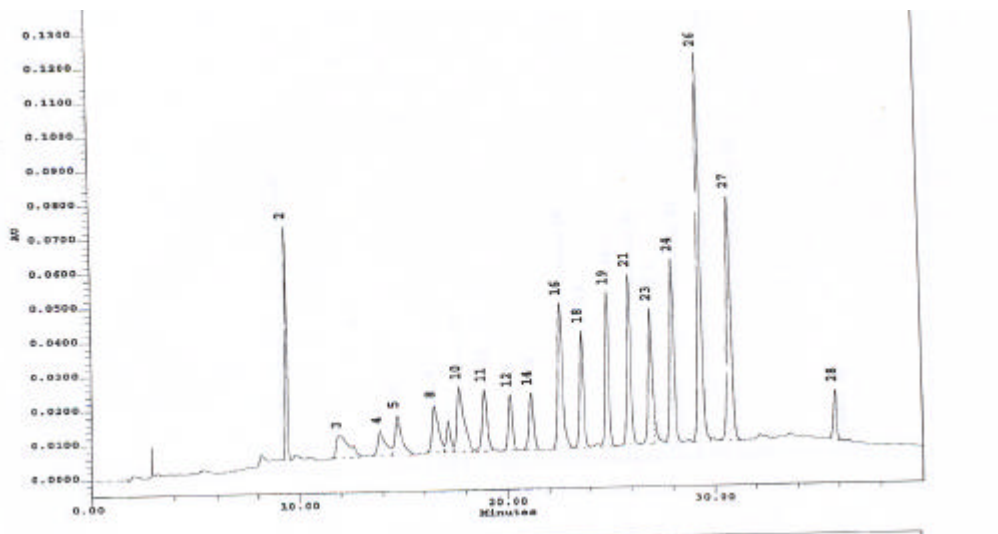


Sekil 2.5 25°C de 2,3,4,6-tetraklorofenolün çözünürlüğüne pH' nin etkisi



Sekil 2.6 25°C de pentaklorofenolün çözünlüğüne pH'nin etkisi

Patsias ve Mourkidou tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada, tamamen otomatize edilmiş katı faz ekstraksiyon yüksek performans sıvı kromatografik metod, sulu matriste düşük mg/L seviyesinde süstitüe olmuş fenollerin ve anilin türevlerinin bire bir analizi için geliştirilmiştir. Diod isini ve elektro kimyasal tayin yöntemi analit tayininde çalışmacılar tarafından kullanılmıştır. Axios nehrinden alınan su örneğinde (endüstriyel, tarımsal atıklar bulunan örnek) bu bileşiklerin analizinde bu analitik metodlar uygulanmıştır. Anilin ve fenol haricinde bütün bileşiklerin tayin limiti 0,05 ve 0,2 mg/L olarak bulunmuştur. Fenolün pik şeklinin, saklama zamanı ile değiştiği gözlenmiş olup, 3 aylık bir saklama süresinin sonunda pik dağılması gözlenmiştir. Analitik metod da bütün test edilecek bileşiklerin tayin limiti 0,05 – 0,2 mg/L aralığında çalışmacılar tarafından bulunmuştur. Çalışmada yapılan su numunesinin HPLC kromatogrami Sekil 2.7'de verilmiştir.



Sekil 2.7 Su numunesinin HPLC kromatogrami

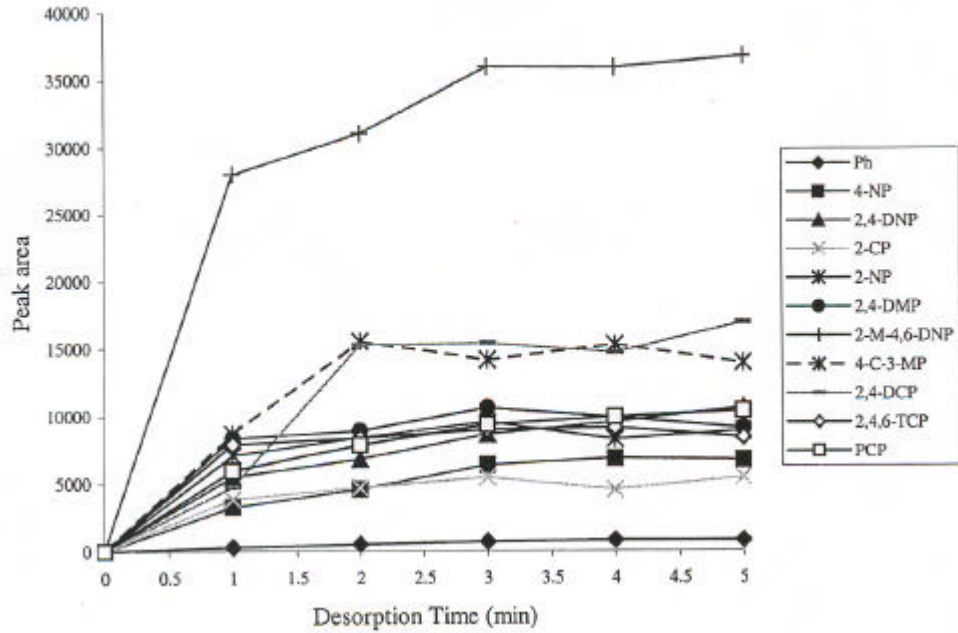


Denizli ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada sulu sistemlerdeki klorofenollerin boya sever mikro boncuklar yardımıyla ayrılması araştırılmıştır. Cibacron mavisi F3GA PHEMA mikro boncuklar klorofenollerin uzaklaştırılmasında (örneğin fenol, m-klorofenol, p-klorofenol ve 2,4,6-triklorofenol) boya sever sorbent olarak araştırılmıştır. PHEMA mikro boncukları, HEMA'nin polimerizasyonunun bir başlatıcı (azobisisobetonitril) varlığında modifiye edilmesi ile hazırlanır. Bu mikro boncuklar sulu ortamdan klorofenolleri uzaklaştırmak için kullanılır. Klorofenollerin absorpsiyon hızları oldukça yüksektir ve 20 dakikada dengeye ulaşılır. Mikro boncukları taşıyan cibacron mavisinden klorofenollerin maksimum absorpsiyonu fenol için 88,8 µmol/g ; 2,4,6-triklorofenol için 94,6 µmol/g; p-klorofenol için 97,6 µmol/g ve m-klorofenol için 109,1 µmol/g olarak çalışmacılar tarafından bulunmuştur. Çalışılan bileşiklerin affinite sırası ise şöyle bulunmuştur. m-klorofenol > p-klorofenol > 2,4,6-triklorofenol > fenol. pH arttıkça klorofenollerin adsorpsiyonunun azaldığı ifade edilmiştir. Çalışmacılar klorofenollerin desorpsiyonunu % 30 (v/v) metanol çözeltisi kullanarak basarmışlardır. Çalışmada cibacron mavisi F3GA'nin gözle görülür bir adsorpsiyon kapasite kaybı olmadan bes döngüden fazla kullanım uygunluğuna sahip olduğunu belirtmişlerdir.

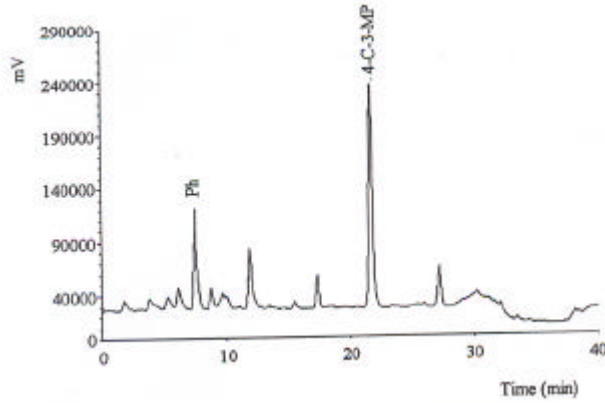
Takeda ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada, iyonlaşabilen diklorofenollerin analizleri kapiler elektroforez ve kütle spektrofotometreleri ile yapılmıştır.

Penalver ve arkadaşları 2002 yılında su numunelerindeki fenolik bileşikleri, Yüksek performans sıvı kromatografisi ve kati faz mikro ekstraksiyonunu eşleştirerek tayin etmeye çalışmışlardır. Kati faz mikro ekstraksiyon (SPME), HPLC ile birleştirilerek (UV ve elektrokimyasal tayin yöntemiyle) bir fenolik bileşimin tayininde kullanılmaktadır. 85 µm poliakrilat fiber, sulu numuneden analiti ekstrakte etmek için kullanılmıştır. SPME kombinasyonunda iki farklı sıvı kromatografi dizayni kıyaslaması yapılmıştır. Dinamik ve statik dizaynları kıyaslanmış ve SPME-HPLC deki absorpsiyon ve desorpsiyona karşı olan çeşitli etkenler optimize edilmiştir. Fenol bileşikleri için statik desorpsiyonun daha iyi sonuç vereceği bulunmuştur. Bu

metot nehir ve atik sulardan alınan numunelere uygulanmıştır. Bu su numunelerinde, düşük seviyedeki fenol bileşiklerinin tayini de yapılabilmıştır. SPME absorpsiyon işlemine etki eden faktörlerin optimize edilmesi için; 30 dakika, 50°C, 360 g/L ve pH 2,5 da tutulmuş, cevabin lineerliği 0,005-30 mg/L aralığında UV dedektörü ile 0,05-100 mg/L aralığında elektrokimyasal dedektörle ölçülmüş, her iki durumda da lineerliğinin ( $R^2 > 0,9925$ ) iyi olduğu bulunmuştur. yalnız fenolde 0,1-30 mg/L olduğu görülmüş (UV'de), 10-100 mg/L (elektrokimyasal dedektörle) olduğu görülmüştür. Kısaça modifiye edilmiş HPLC dizaynında elde edilen sonuçların, SPME-ticari HPLC eşleştirilmesinden elde edilen sonuçlarda daha iyi olduğu bulunmuştur. Bu sistemde iyileştirmenin yüksek ve elde edilen piklerin dağılık olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen Shimadzu HPLC dizayni için desorpsiyon zamanının optimizasyon şekilleri ve atık su örneğinin SPME-HPLC metodu ile bulunan kromatogramları Şekil 2.8 ve 2.9'da gösterilmiştir.

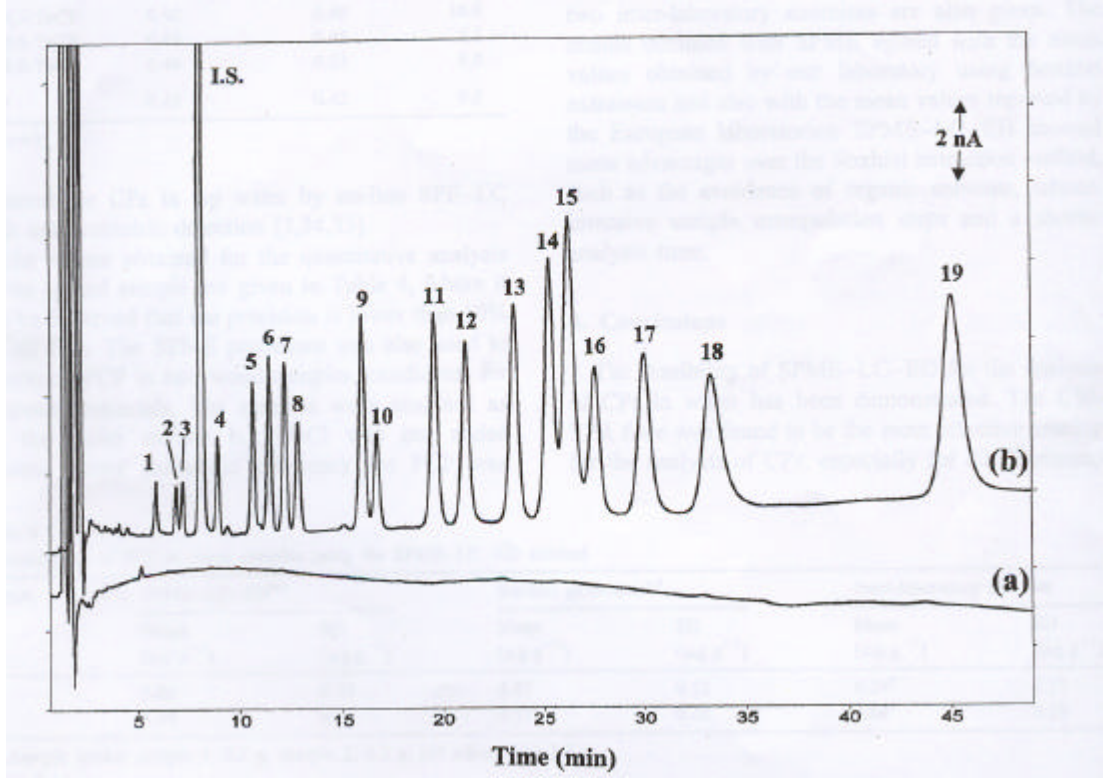


Şekil 2.8 Shimadzu HPLC dizayni için desorpsiyon zamanının optimizasyon şekilleri



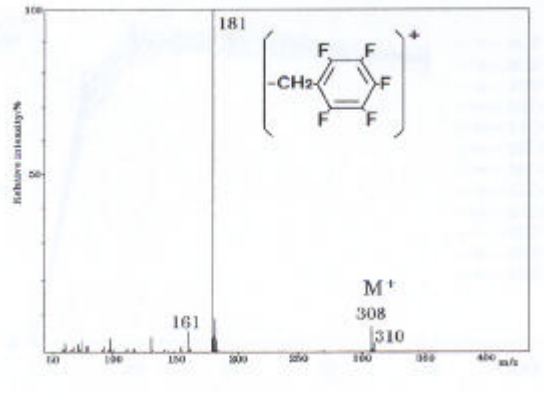
Sekil 2.9 Atik su örneğinin SPME-HPLC metodu ile bulunan kromatogramı

Sarrion ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada katı faz mikroekstraksiyon ve sıvı kromatografi ile klorofenollerini tayin etmişlerdir. Katı faz mikroekstraksiyon metodu, çevreden alınan numunelerde bulunan 19 klorofenolün (CPs) tayini için geliştirilmiştir. Analitik prosedür CPs'in direkt olarak sudan numunelendirilmesine dayanır. Bunun için katı faz mikroekstraksiyon (SPME) kullanılarak ve elektrokimyasal tayinli sıvı kromatografi (LC-ED) yöntemi ile tespit edilmiştir. CPs analizinde üç çeşit fiber [ 50  $\mu$ m karbomaks-templated reçine (CW-TPR), 60  $\mu$ m polidimetilsiklookzan-divinilbenzen (POMS-DVB) ve 85  $\mu$ m poliakrilat (PA)] kullanılmıştır. Bu fiberlerin içinden, CW-TPR'in sudaki CPs analizi için en uygunu bulunmuştur. hem desorpsiyon hem de absorpsiyon için optimal koşullar belirlenmiştir. Buna göre desorpsiyon çözücüsünün bileşeni (su-asetonitril-metanol 20:30:50), desorpsiyon zamanının 5 dakika, ekstraksiyon zamanının 50 dakika, sıcaklığın 40°C, pH'in 3,5 ve iyonik kuvvetin 6 g NaCl olduğu sonucuna çalışmacılarca varılmıştır. Bu metot 3/4 değerinde lineer olup tayin limiti 3 ile 8 ng/L olarak bulunmuştur. bu değer aralığı Avrupa komitesinin içme suları için belirttiği değerden daha küçüktür. Bu metot su ve odun numunelerinde CPs analizi için uygulanmıştır.Çalışmada tayin edilen 19 klorofenolün kromatogramı Sekil 2.10'da gösterilmiştir.



Sekil 2.10 Çalışmada tayin edilen 19 klorofenolün kromatogramı

Hanada ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada su, hava ve toprak örneklerindeki halojenli fenoller, pentaflorobenzil bromid ile türevlendirme metodu ile gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) ile tayin edilmiştir. Çalışmacılar su, hava ve toprak örneklerindeki kloro-, bromo- ve diklorofenolleri pentaflorobenzil bromid ile türevlendirerek gaz kromatografisi/kütle spektrometresinde tanımlamış ve tayin etmişlerdir. Hava örneğindeki fenoller PS-2 Sep-PAK kartusunda tutulmuş ve 2-propanol ile elute edilmiştir. Su ve toprak örnekleri diklorometan ile sivi-sivi ekstraksiyonuna tabi tutulmuş ve çözelti 2-propanol ile yer degistirilmiştir. Çözeltideki fenoller pentaflorobenzil bromid ile reaksiyona sokulmuş ve pentaflorobenzil esterlerine benzetilmiştir. Ekstraksiyondan sonra hekzan ile türevlendirilmiş ve GC/MS ile tayin edilmiştir. Su, hava ve topraktaki fenollerin tayin limitleri  $0,0033-0,0073 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ,  $0,0066-0,0147 \mu\text{g}/\text{L}$  ve  $0,33-0,73 \mu\text{g}/\text{mg}$  olarak sırasıyla bulunmuştur. gerçek çevre örneklerinde halojenli fenollerin geri kazanması % 90'ın üzerinde bulunduğu çalışmacılar tarafından belirtilmiştir. Sekil 2.11 de halojenli fenol-PFBB türevinin kütle spektrum örneği gösterilmiştir.



Sekil 2.11 Halojenli fenol-PFBB türevinin kütle spektrum örneği

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Genel Bilgi**

Bu bölümde halojenli fenollerin kromatografik analizlerinde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

##### **3.2.1. Yüksek performans sivi kromatografi cihazı (HPLC)**

Halojenli fenollerin kromatografik ayırmaları, Shimadzu HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz, sistem kontrol ünitesi (SCL 10 A VP), pompa (LC10 ADVP), dedektör (SPDM 10A VP Foto Diod Array), oto enjektör (SIL 10 ADVP (70 Vial Model Rack 7)), kolon fırını (CTO 10 AVP) ve gaz giderme biriminden (DGU 14 A) oluşmaktadır.

Çalışmada RP C<sub>18</sub>, Luna (250x4,6mm, 5µm I.D.) kolon kullanılmıştır.

##### **3.2.2. UV-Görünür spektrofotometre cihazı**

Halojenli fenollerin kromatografik ayırmalarında hangi dalga boylarında çalışılacağını saptamak amacıyla Perkin-Elmer Lambda 20 UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır.

##### **3.2.3. İyon analiz cihazı**

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH / İyon analiz cihazı kullanılmıştır. Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık su banyosu kullanılarak, 25°C±0,1°C sıcaklıkta çalışılmıştır.

### 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik veya HPLC saflıktadır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de verilmistir.

Çizelge 3.1 Kullanılan kimyasallar ve özellikleri

Kimyasal Madde	Özellik
3-bromofenol	Avocado Research Chemicals Ltd.
3-klorofenol	Fluka
4-florofenol	Merck
4-klorofenol	Fluka
4-iyodofenol	Avocado Research Chemicals Ltd.
Metanol	Merck
Fosforik asit	RDH
Potasyum hidrojen fitalat	Merck

#### 3.3.1. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada halojenli fenollerin ayırımı için % 30 ve % 50 (v/v)’ lik metanol-su olmak üzere iki tip mobil faz hazırlanmıştır. Sivi kromatografik ayırmada kullanılan çözücü karışımının pH’si, metanol-su ikili karışımlarında pH standardizasyonuna uygun şekilde  $H_3PO_4$  çözeltisi ilave edilerek istenen pH değerine ayarlanmıştır.

#### Mobil Faz 1

75 mL Metanol alınarak hacim saf suyla 250 mL’ye tamamlanmış ve böylece %30-%70’lik Metanol-Su mobil fazi hazırlanmıştır. Bu çözelti 0,0037 M fosforik asit içermektedir. pH’nin 4’e ayarlanması için bu çözeltiliye 1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir.

**Mobil Faz 2**

125 mL Metanol alınarak hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlanmış ve böylece %50-%50'lik Metanol-Su mobil fazi hazırlanmıştır. Bu çözelti 0,0037 M fosforik asit içermektedir. pH'nin 4'e ayarlanması için bu çözeltiliye 1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir.

**1 M NaOH çözeltisi**

0,5 g NaOH tartılıp 25 mL mobil fazda (%50-%50) mobil fazda çözülerek hazırlanmıştır.

**Halojenli fenollerin standart çözeltileri****3-bromofenol çözeltisi, 1000 ppm**

0,025 g tartılarak 25 mL lik balon jöjeye konmuş ve hacim saf su ile tamamlanmıştır.

**3-klorofenol çözeltisi, 1000 ppm**

0,025 g tartılarak 25 mL lik balon jöjeye konmuş ve hacim saf su ile tamamlanmıştır.

**4-florofenol çözeltisi, 1000 ppm**

0,025 g tartılarak 25 mL lik balon jöjeye konmuş ve hacim saf su ile tamamlanmıştır.

**4-kloro fenol çözeltisi, 1000 ppm**

0,025 g tartılarak 25 mL lik balon jöjeye konmuş ve hacim saf su ile tamamlanmıştır.

**4-iyodofenol çözeltisi, 1000 ppm**

0,025 g tartılarak 25 mL lik balon jöjeye konmuş ve hacim saf su ile tamamlanmıştır.

**KBr çözeltisi, %0,01'lik**

0,010 g KBr 100 mL suda çözülmüştür.

Hazırlanan tüm standart çözeltiler enjeksiyondan önce mobil faz ile seyreltilerek cihaza verilmiştir.



### 3.3.2. Primer standart pH referans çözeltisi

Potasyum hidrojen fitalat,  $C_6H_4(COOK)(COOH)$  (0,05 mol/kg) 2 saat  $120^{\circ}C$ 'da kurutulmuştur. Bu katıdan gerekli miktar tartılarak suda çözülmüştür.

### 3.3.3. Kartus

Çalışılan halojenli fenollerin seçilen su numunesinde analizi için Sep-Pak  $C_{18}$  marka kartus kullanılmıştır.

## 3.4. Metot

### 3.4.1. UV-Görünür bölge spektrofotometresi çalışmaları

İlk olarak hazırlanan 1000 ppm'lik standart halojenli fenollerin 200-900 nm dalga boyları arasında absorpsiyon taraması yapılarak, hangi bileşimin hangi dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan faydalanarak bu maddelerin kromatografik ayırmaları için uygun dalga boyu belirlenmiş ve HPLC çalışmalarına ondan sonra geçilmiştir.

### 3.4.2. Mobil faz pH standardizasyonu

Mobil faz olarak kullanılan Metanol-Su karışımlarında primer standart referans çözeltilerin pH değerlerinin belirlenmesi, 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat çözeltisi kullanılarak ve 298,15 K referans alınarak kombine pH elektrodu ile yapılmıştır. Her bir durum için başlangıç pH değeri teorik olarak hesaplanmış, cihaz bu değer dikkate alınarak kalibre edilmiştir.

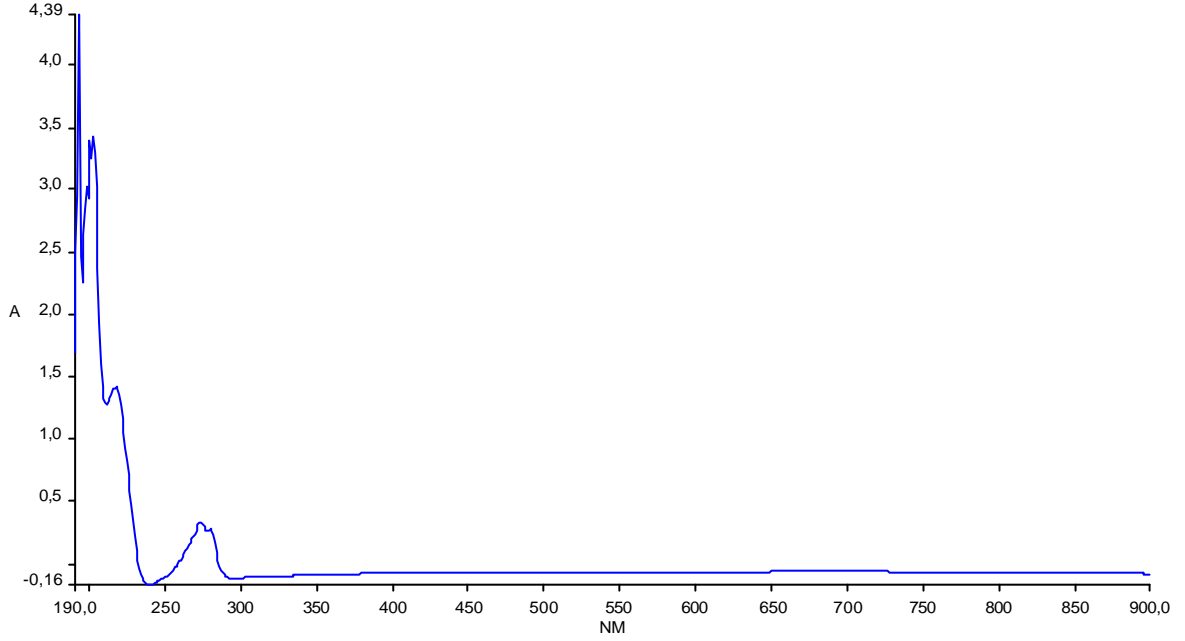
### 3.4.3. Sivi kromatografik ayırma çalışmaları

HPLC çalışması, her bir bileşimin çözeltisinden 10  $\mu$ L enjekte edilerek yapılmıştır. Çalışmada iki farklı akış hızı 0,5 mL/dak ve 1,0 mL/dak denmiştir. 0,5 mL/dak akış

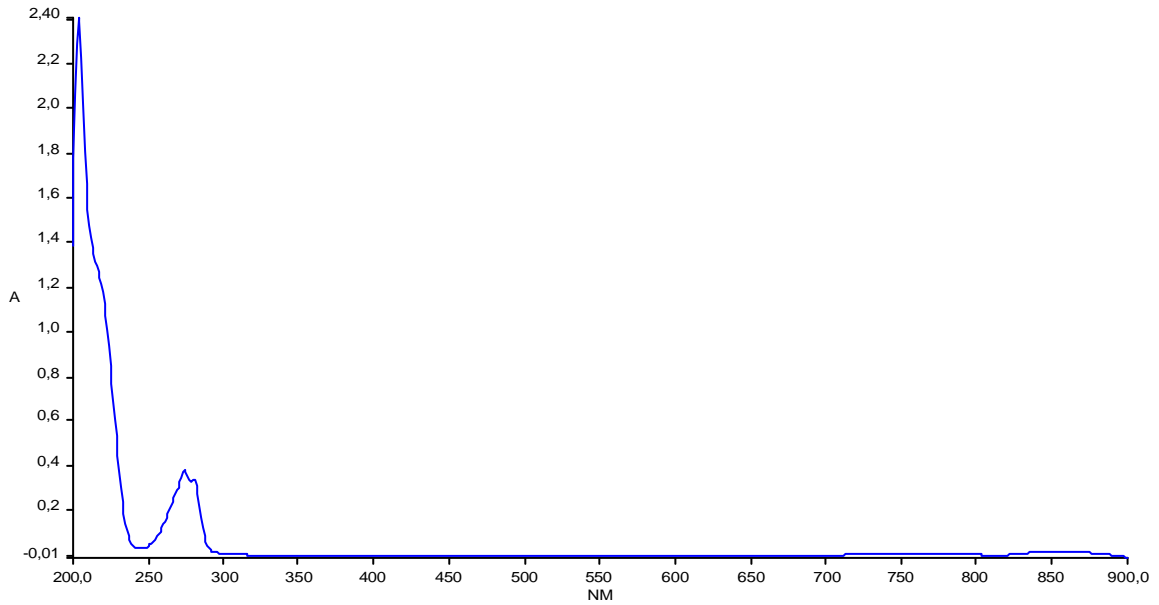
hizinda gerekli ayirma saglanamamis ve çalismanin bütününde 1,0 mL/dak akis hizi kullanilmistir. Yine çalismada sicaklik etkisi bir parametre olarak arastirilmistir. 25°C ile 40°C arasi 5°C'lik farklarla çalisilmiss, en iyi ayirma yapilan sicakligin 40°C oldugu belirlendikten sonra bu sicaklikta çalismalara devam edilmistir. HPLC çalismasinda kapasite faktörleri,  $t_0$  dikkate alinarak hesaplanmistir. Halojenli fenollerin kapasite faktörlerinin belirlenmesinde KBr çözeltisi kullanilarak  $t_0$  degeri belirlenmistir. Çalismada KBr ve halojenli fenollerin alikonma zamanlari, üçer enjeksiyonla belirlenmis ve 3 ölçümün ortalamasi alinarak belirlenen alikonma zamanlari, kapasite faktörlerinin hesabinda kullanilmistir.

#### 4. ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA

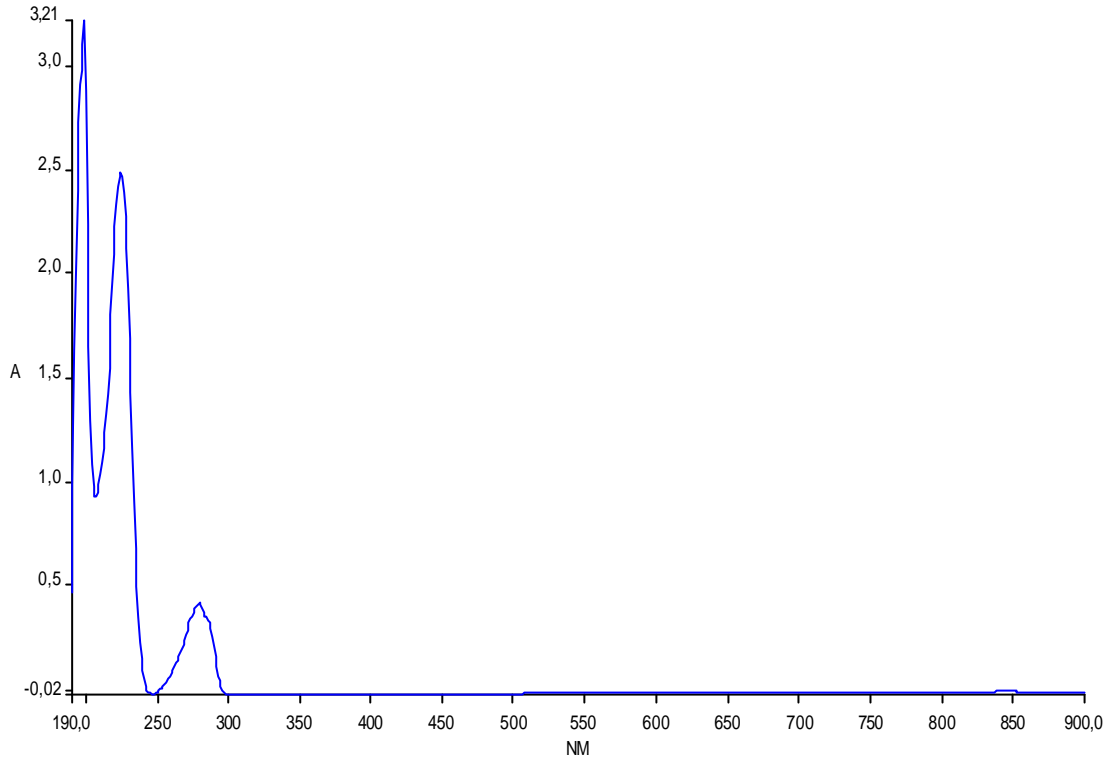
Halojenli fenollerin ilk olarak 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanarak UV-Görünür bölge spektrofotometresinde 200-900 nm dalga boyları arasında absorpsiyon taraması yapılmış, hangi bileşimin hangi dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.



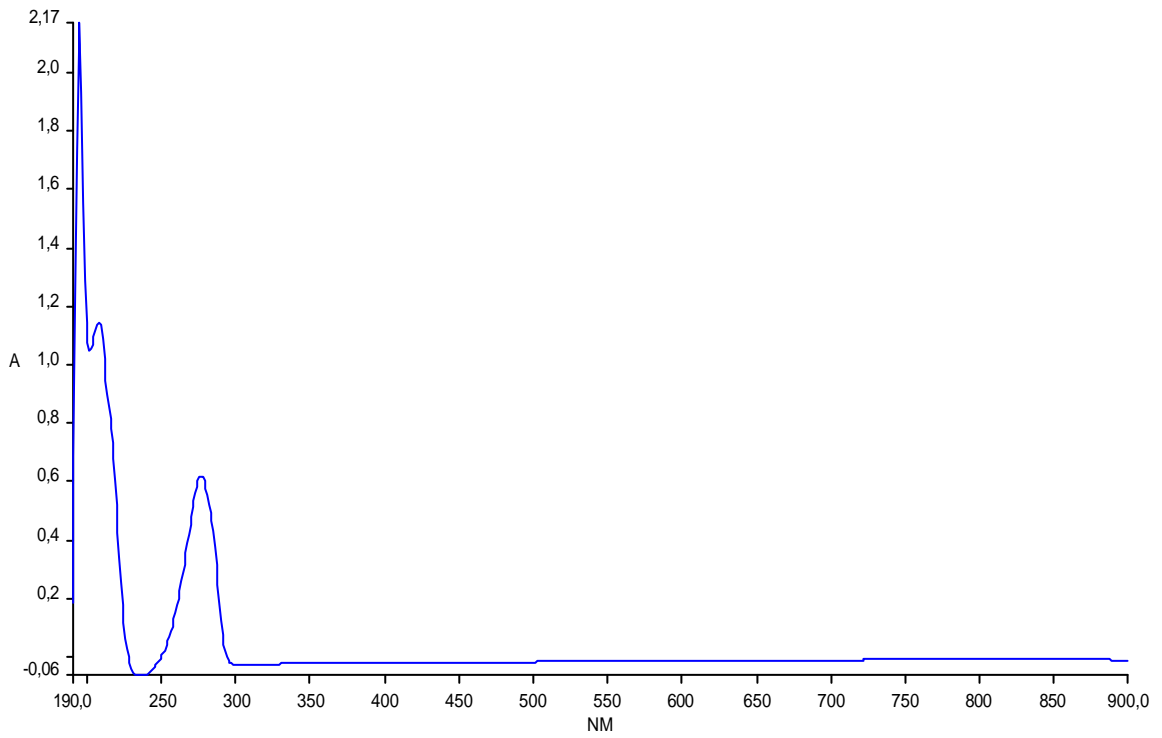
Sekil 4.1 3-klorofenolün 200-900 nm aralığındaki absorpsiyon taraması



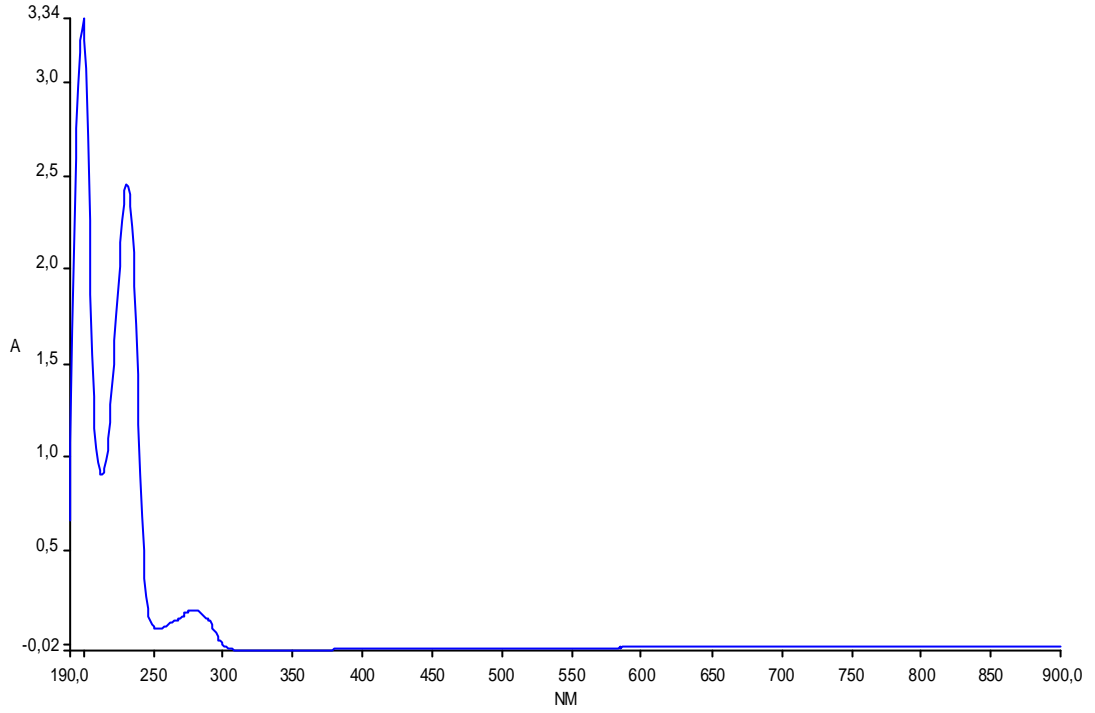
Sekil 4.2 3-bromofenolün 200-900 nm aralığındaki absorpsiyon taraması



Sekil 4.3 4-klorofenolün 200-900 nm araligindaki absorbans taramasi



Sekil 4.4 4-florofenolün 200-900 nm araligindaki absorbans taramasi



Sekil 4.5 4-iyodofenolün 200-900 nm aralıgındaki absorbanstaraması

Gerekli taramalar yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmistir.

Çizelge 4.1 UV-Görünür bölge spektrofotometresinde 200-900 nm dalga boyu aralıgında taranan halojenli fenollerin saptanan maksimum dalga boyları

Halojenli Fenol	Maksimum absorbanst
3-kloro fenol	273,53
3-bromo fenol	273,31
4-kloro fenol	279,64
4-floro fenol	277,60
4-iyodo fenol	280,66

Uygun dalga boyu saptandıktan sonra 280 nm ortak dalga boyu olarak kabul edilmiş ve bu dalga boyunda HPLC ayırmalarına geçilmiştir.

Çalışılan bileşiklerin farklı sıcaklıklardaki ayırmaları incelenerek ayırma üzerine sıcaklığın etkisi parametresi incelenmiştir. Çalışmalarda enjeksiyon edilen halojenli fenollerin standart karışımları hazırlanarak her bir enjeksiyon bu derişimlere göre yapılmıştır. Karışımı oluşturan maddeleri derişimleri şöyledir. 4-floro fenol 125 ppm;

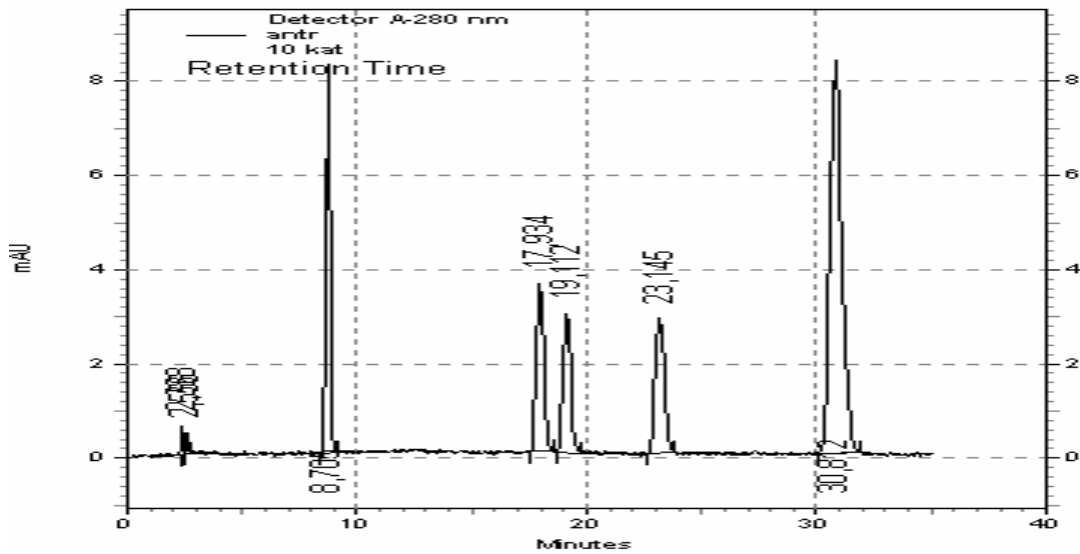
4-kloro fenol 200 ppm ; 3-kloro fenol 100 ppm ; 3-bromo fenol 50 ppm ve 4-iyodo fenol 525 ppm.

İlk olarak 25°C'da 1,0 mL/dak akis hizıyla ayırma yapılmaya çalışılmış ve bulunan degerler Çizelge 4.2' de verilmistir.

Çizelge 4.2. Halojenli fenollerin 25°C de alikonma zamanlari (Mobil faz: Metanol – su (%50-% 50 (v/v)); Akis Hizi: 1,0 mL/dak ; Kolon : RP C<sub>18</sub>, Luna (250x4,6mm, 5µm I.D.) ; Kolon sicakligi 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL ; Halojenli fenoller için λ=280 nm ; KBr için λ=200 nm )

Elüsyon sirasi	t <sub>r,ort</sub> , dakika	K	α
4 floro	8,705	2,290	-
4 kloro	17,937	5,779	2,523
3kloro	19,112	6,223	1,077
3bromo	23,145	7,747	1,245
4iyot	30,812	10,645	1,374
t <sub>0</sub>	2,646		

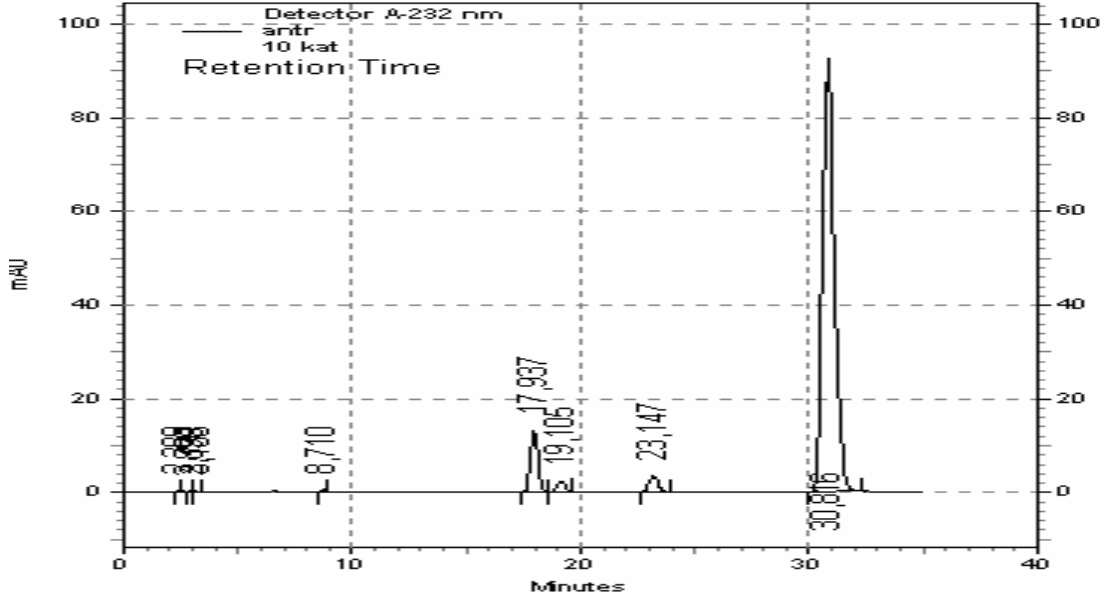
Bu sartlarda alinan kromatogram Sekil 4.6'da verilmistir.



Sekil 4.6. Halojenli fenollerin 25°C'de alinan kromatogrami. 8,710 nolu pik 4-floro fenölü ; 17,934 nolu pik 4-kloro fenölü ; 19,112 nolu pik 3-klor fenölü ; 23,145 nolu pik 3-bromo fenölü ve 30,812 nolu pik de 4-iyodo fenölü göstermektedir.

Bu sartlarda alinan kromatogramdan'da görüldüğü bu sicaklik sartinda halojenli fenoller kromatografik olarak ayrilmaktadir. Yapilan UV taramasinda 4-iyodo fenölün 232 nm de maksimum absorbans verdigi belirlenmisti (Sekil 4.5). Bundan

dolayısı 25°C’de ve 232 nm de bu halojenli fenollerin bir kromatogrami alınmış ve bu kromatogram Şekil 4.7’de verilmiştir. Bu kromatogramdan görüldüğü gibi 25°C ve 232 nm de 4-iyodo fenolün pik siddetinin büyüdüğü belirlenmiştir. Pik siddetinin büyüklüğü nedeniyle 25°C ve 232 nm şartları halojenli fenollerin ayrılması için uygun koşul değildir.



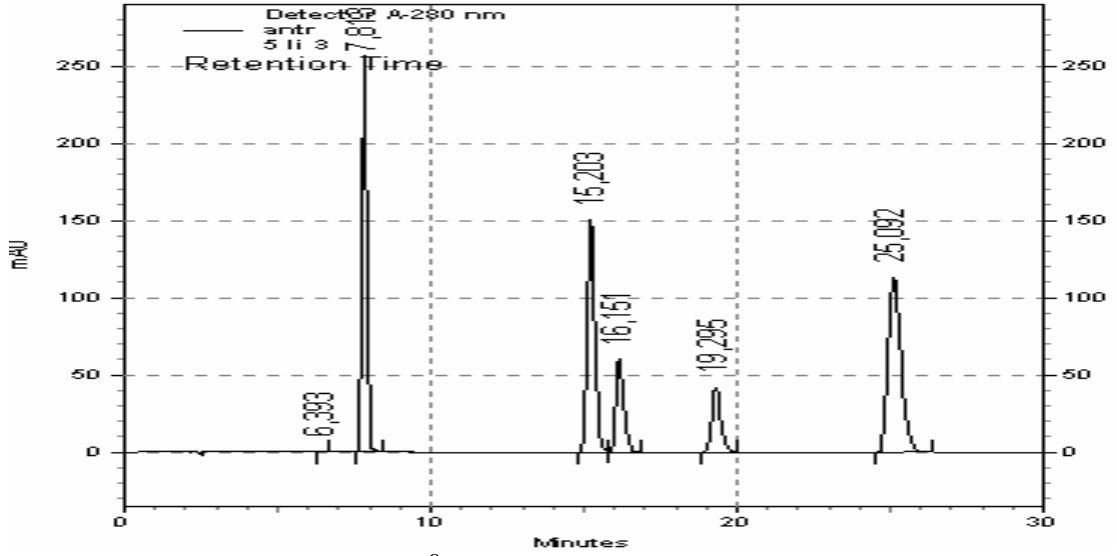
Şekil 4.7. 25°C ve 232 nm de halojenli fenollerin kromatogrami. 8,710 nolu pik 4-floro fenolü ; 17,937 nolu pik 4-kloro fenolü ; 19,105 nolu pik 3-kloro fenolü ; 23,147 nolu pik 3-bromo fenolü ve 30,816 nolu pik de 4-iyodo fenolü göstermektedir.

Bu şartlardan sonra 280 nm dalga boyunda çalışılmaya devam edilmiş ve sıcaklık etkisinin belirlenebilmesi için bir sonraki sıcaklık olan 30°C denenmiştir. 30°C ve 280 nm de yapılan ayırma şartları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Halojenli fenollerin 30°C de alıkonma zamanları (Mobil faz: Metanol – su (%50-% 50 (v/v)); Akis Hizi: 1,0 mL/dak ; Kolon : RP C<sub>18</sub>, Luna (250x4,6mm, 5µm I.D.) ; Kolon sıcaklığı 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL ; Halojenli fenoller için λ=280 nm ; KBr için λ=200 nm )

Elüsyon sırası	t <sub>r,ort</sub> , dakika	K	α
4 floro	7,813		-
4 kloro	15,203	1,747	2,487
3kloro	16,152	4,346	1,077
3bromo	19,295	4,679	1,236
4iyot	25,092	5,784	1,358
t <sub>0</sub>	2,844	7,858	

Bu şartlarda alınan kromatogram Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Halojenli fenollerin 30°C’de alınan kromatogramı. 7,813 nolu pik 4-floro fenölü ; 15,203 nolu pik 4-kloro fenölü ; 16,151 nolu pik 3-klor fenölü ; 19,295 nolu pik 3-bromo fenölü ve 25,092 nolu pik de 4-iyodo fenölü göstermektedir.

Bu şartlarda alınan kromatogramdan’da görüldüğü 30°C’ye çıkıldığında piklerin siddetlerinde ve alikonma zamanlarında önemli değişimler olmuştur. Sıcaklığın artışı organik modifiyer artışı gibi etki göstermiş alikonma zamanlarında değişim gözlenmiştir. Bu sıcaklık şartında da halojenli fenollerin yeteri kadar ayrılabilirdi ancak alikonma zamanlarında bir düşme olduğundan uygun bir parametre olarak görülmemiştir.

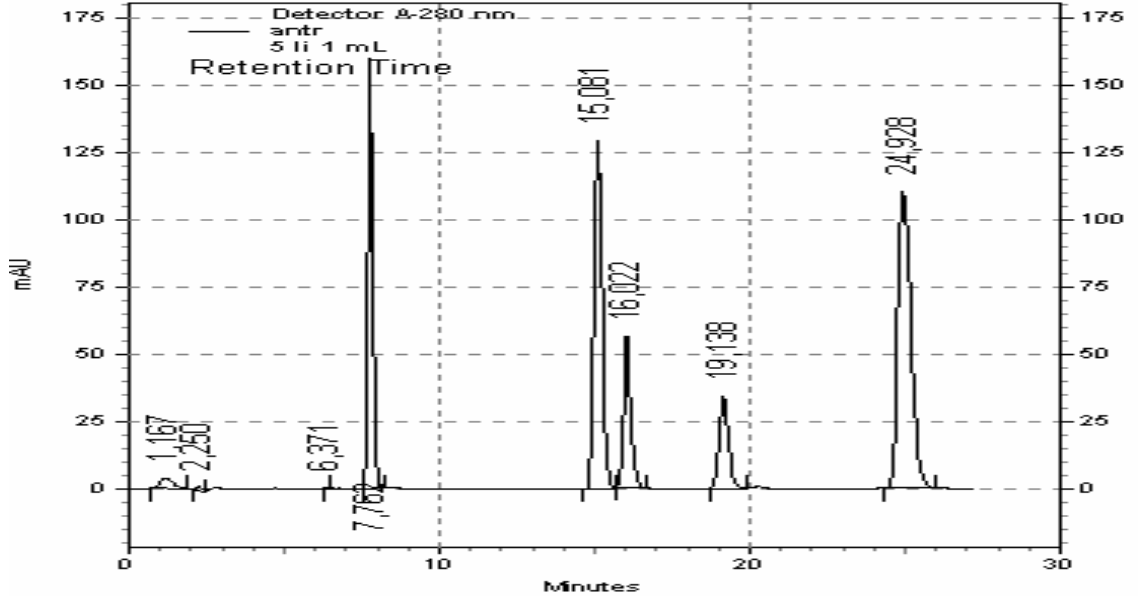
Sıcaklık parametresinin ve yeterli ayırma şartlarının belirlenebilmesi için bu defada 35°C sıcaklık ve 280 nm de çalışma yapılmıştır. Bu şartlara ait elüsyon sırası Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Halojenli fenollerin 35°C de alikonma zamanları (Mobil faz: Metanol – su (%50-% 50 (v/v)); Akis Hizi: 1,0 mL/dak ; Kolon : RP C<sub>18</sub>, Luna (250x4,6mm, 5µm I.D.) ; Kolon sıcaklığı 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL ; Halojenli fenoller için λ=280 nm ; KBr için λ=200 nm )

Elüsyon sırası	t <sub>r,ort</sub> , dakika	K	α
4 floro	7,762	1,894	-
4 kloro	15,081	4,623	2,441
3kloro	16,022	4,974	1,076
3bromo	19,138	6,136	1,234
4iyot	24,928	8,295	1,352
t <sub>0</sub>	2,682		



Bu şartlarda alınan kromatogram Şekil 4.9’da verilmistir.

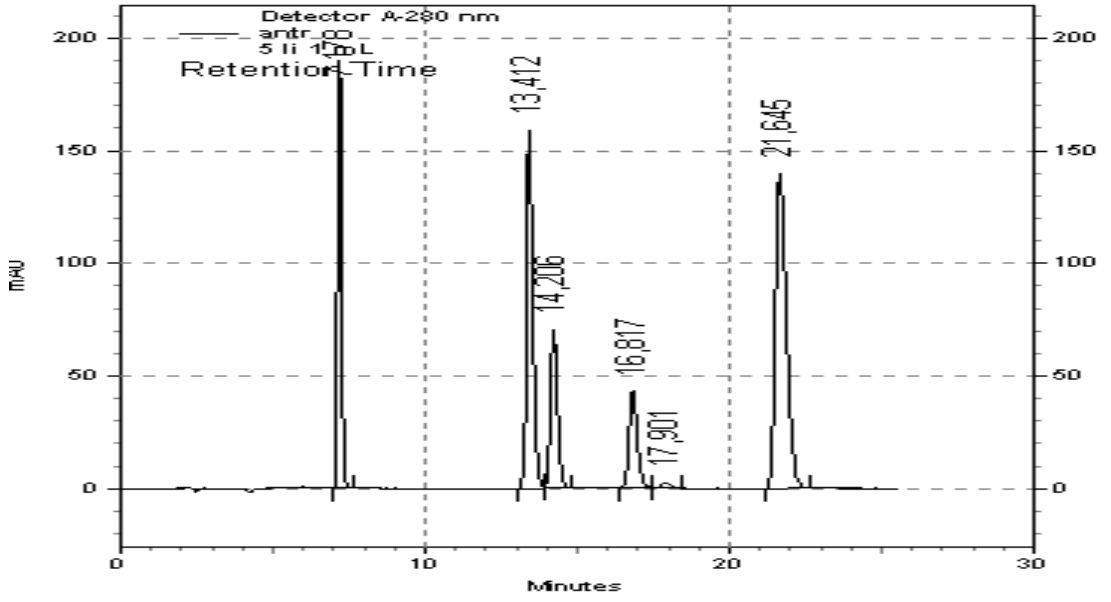


Şekil 4.9. Halojenli fenollerin 35°C’da alınan kromatogrami. 7,762 nolu pik 4-floro fenölü ; 15,081 nolu pik 4-kloro fenölü ; 16,022 nolu pik 3-klor fenölü ; 19,138 nolu pik 3-bromo fenölü ve 24,928 nolu pik de 4-iyodo fenölü göstermektedir.

Sıcaklığın artışı organik modifiyer artışı gibi etki göstermiş alıkonma zamanlarında düşme gözlenmiştir. Bu sıcaklık şartında halojenli fenollerin yeterli bir ayırma gösterdiği saptanmış, ancak sıcaklık parametresinin araştırılması için son sıcaklık olan 40°C’ de denenmeye karar verilmistir. 40°C sıcaklık şartında ve 280 nm dalga boyunda alınan kromatogramin elüsyon sırası Çizelge 4.5’ de verilmistir. Yine bu şartlarda alınan kromatogram da Şekil 4.10’ da verilmistir.

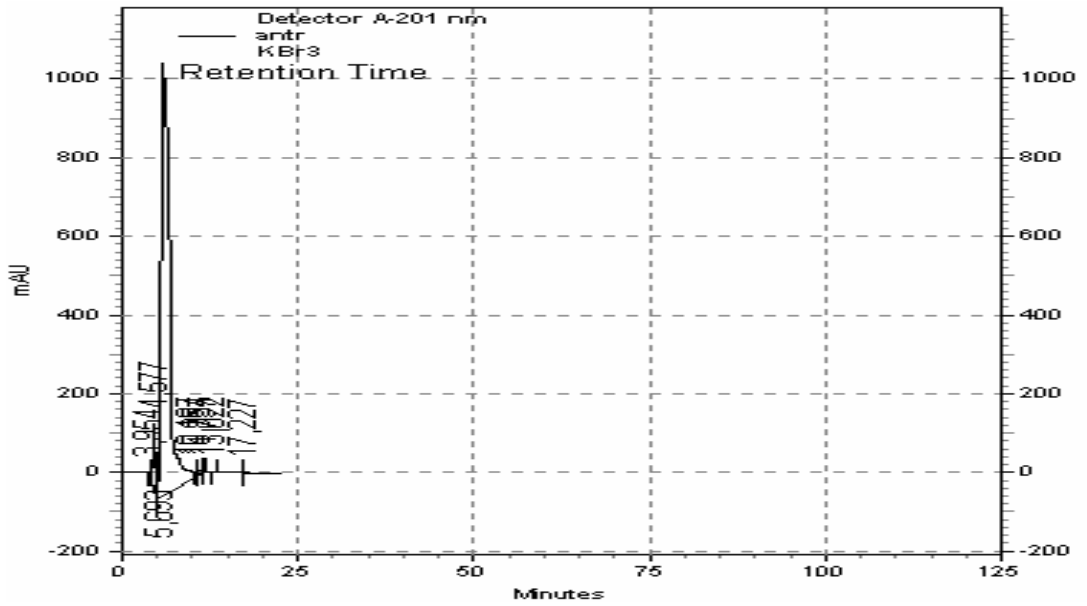
Çizelge 4.5. Halojenli fenollerin 40°C de alıkonma zamanları (Mobil faz: Metanol – su (%50-% 50 (v/v)); Akis Hizi: 1,0 mL/dak ; Kolon : RP C<sub>18</sub>, Luna (250x4,6mm, 5µm I.D.) ; Kolon sıcaklığı 25°C; Enjeksiyon hacmi: 20 µL ; Halojenli fenoller için λ=280 nm ; KBr için λ=200 nm )

Elüsyon sırası	t <sub>r,ort</sub> , dakika	K	α
4 floro	7,178	1,495	-
4 kloro	13,412	3,662	2,449
3kloro	14,206	3,937	1,075
3bromo	16,901	4,835	1,230
4iyot	21,645	6,516	1,345
t <sub>0</sub>	2,877		



Sekil 4.10. Halojenli fenollerin 40°C'da alınan kromatogramı. 7,178 nolu pik 4-floro fenolü ; 13,412 nolu pik 4-kloro fenolü ; 14,206 nolu pik 3-klor fenolü ; 16,901 nolu pik 3-bromo fenolü ve 21,645 nolu pik de 4-iyodo fenolü göstermektedir.

Sicaklığın artışı organik modifiyer artışı gibi etki göstermiş alikonma zamanlarında değişim gözlenmiştir. Yapılan ayırma çalışmalarından en uygun sıcaklık şartının 25°C ve 280 nm dalga boyu olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca KBr için de 40°C sıcaklıkta kromatogram alınmış ve Sekil 4.11 de bu gösterilmiştir.

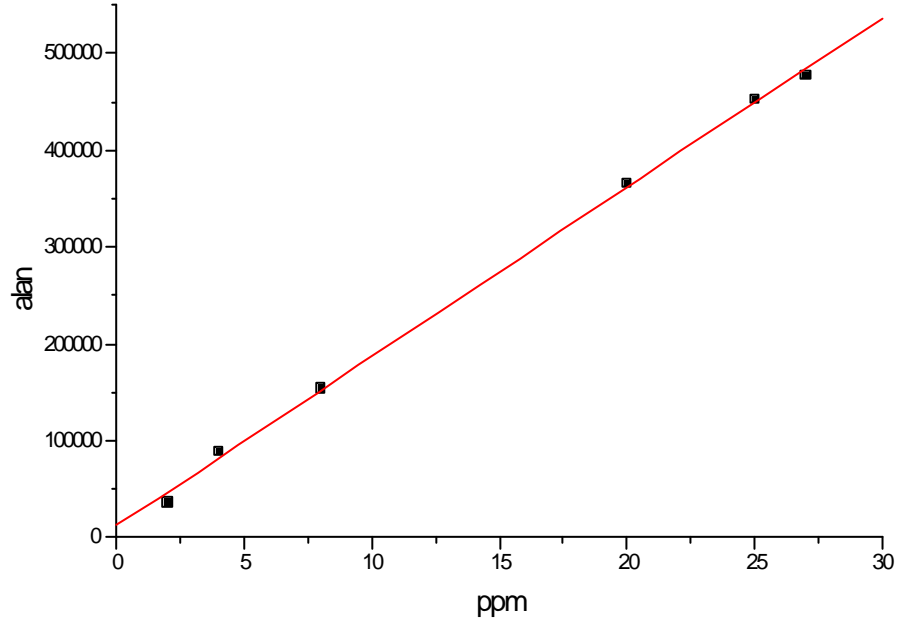


Sekil 4.11. KBr için 40°C'da alınmış kromatogram

En uygun kosul saptanip yeterli ayirma saglandiktan sonra, her bir halojenli fenol için geri kazanmalar hesaplanmis ve analitiksel veriler Çizelge 4.11' de verilmistir. Korelasyon katsayılarından görülecegi gibi her bir bileşik için bu kosulda alan derisim iliskisi lineerdir. Her bir madde için alan-derisim degerleri ve grafikleri asagida gösterilmistir.

Çizelge 4.6. 4-floro fenol için derisim (ppm) – alan verileri

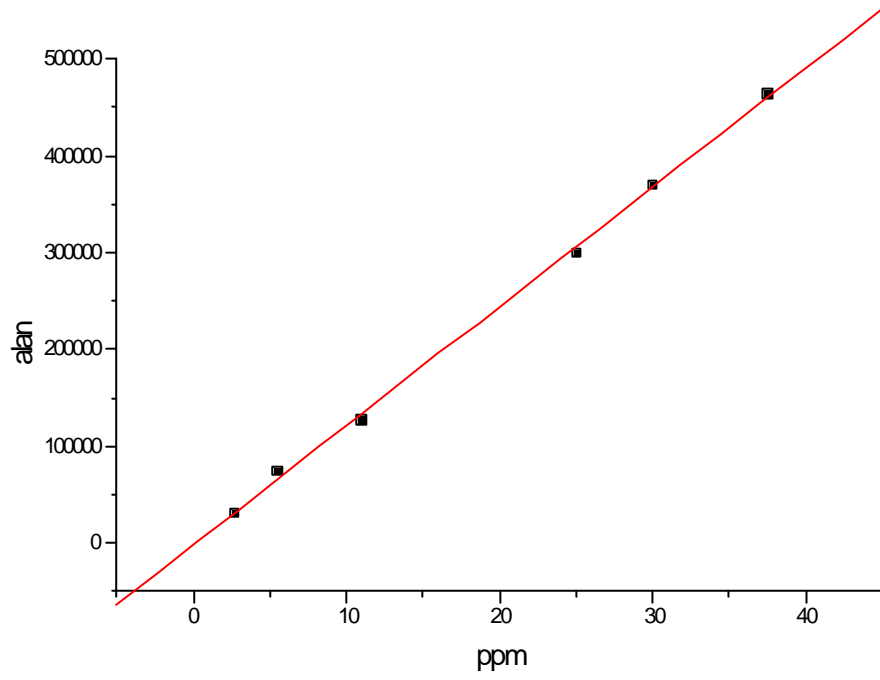
Derisim (ppm)	Alan
2	37240
4	90050
8	154269
20	366113
25	453078
27	476777



Sekil 4.12. 4-floro fenol için derisim-alan grafigi

Çizelge 4.7. 4-floro fenol için derisim (ppm) – alan verileri

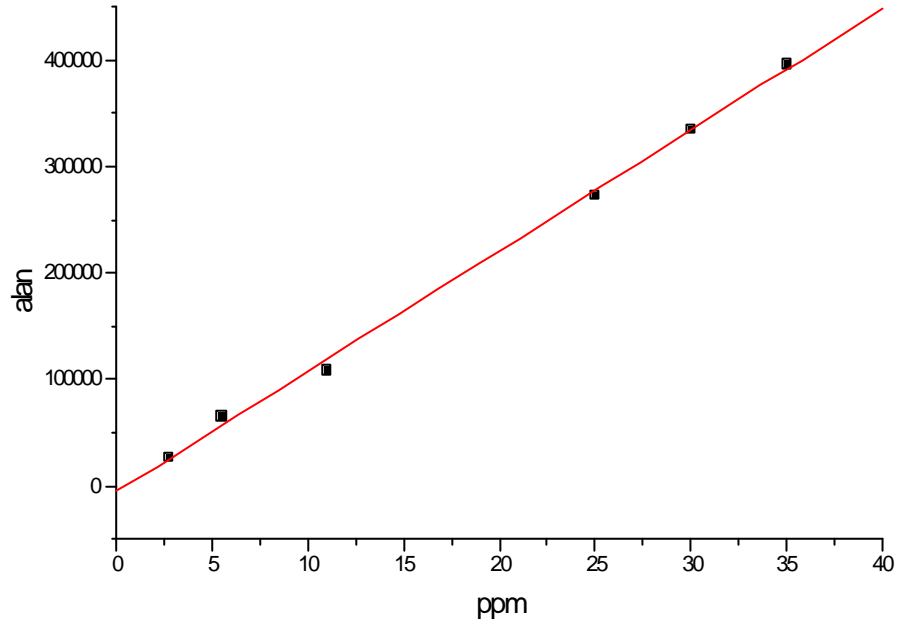
Derisim (ppm)	Alan
2,75	32019
5,5	74450
11	127331
25	299011
30	370105
37,5	463468



Sekil 4.13. 4-kloro fenol için derisim-alan grafiği

Çizelge 4.8. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri

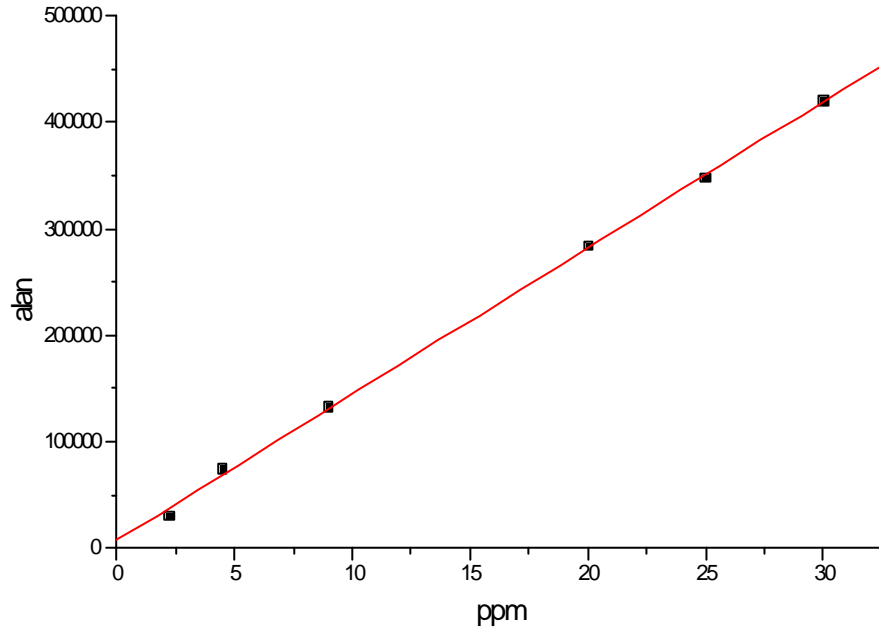
Derisim (ppm)	Alan
2,75	27206
5,5	66207
11	109242
25	272695
30	335086
35	396206



Sekil 4.14. 3-kloro fenol için derisim-alan grafiği

Çizelge 4.9. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri

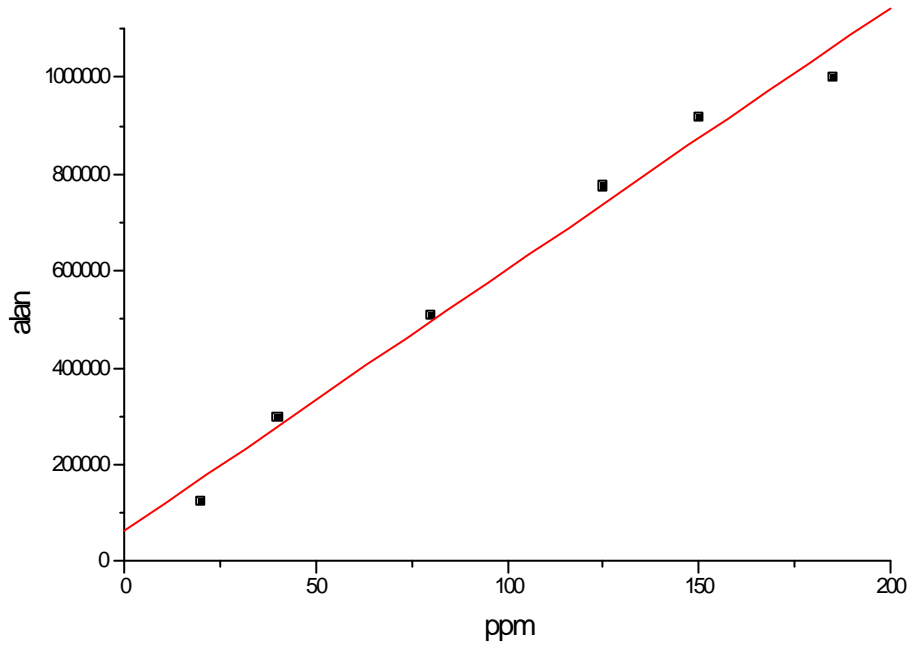
Derisim (ppm)	Alan
2,25	31290
4,5	75064
9,0	133153
20	284308
25	347178
30	419800



Sekil 4.15. 3-bromo fenol için derisim-alan grafiği

Çizelge 4.10. 3-kloro fenol için derisim (ppm) – alan verileri

Derisim (ppm)	Alan
20	124659
40	298331
80	509780
125	775104
150	916193
185	999112



Sekil 4.16. 4-iyodo fenol için derisim-alan grafiği

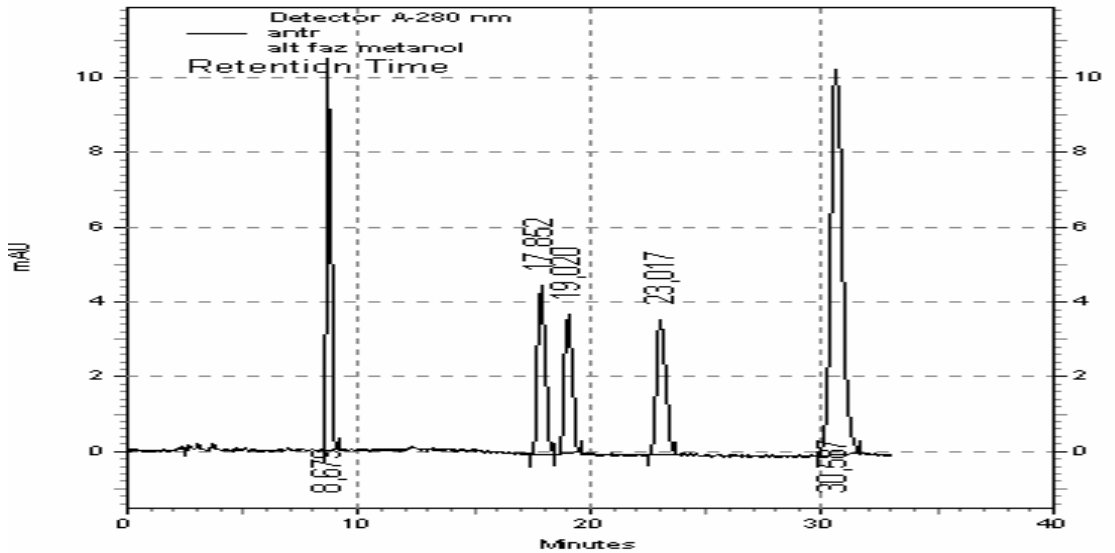
Çizelge 4.11. Halojenli fenoller için geri kazanmalar ve analitiksel veriler

Halojenli fenol	$y=a+bx$	R	Geri kazanma
4-flor	$y=12408,8 + 17477,5x$	0,999	%86
4-Klor	$y=1366 + 12300,5x$	0,999	%89
3-klor	$y=-5007,6 + 11326x$	0,999	%95
3-Brom	$y=7495,2 + 13728,1x$	0,999	%88
4-iyot	$y=3458,9 + 5889,1x$	0,999	%88

#### 4.1. Numune Çalışması

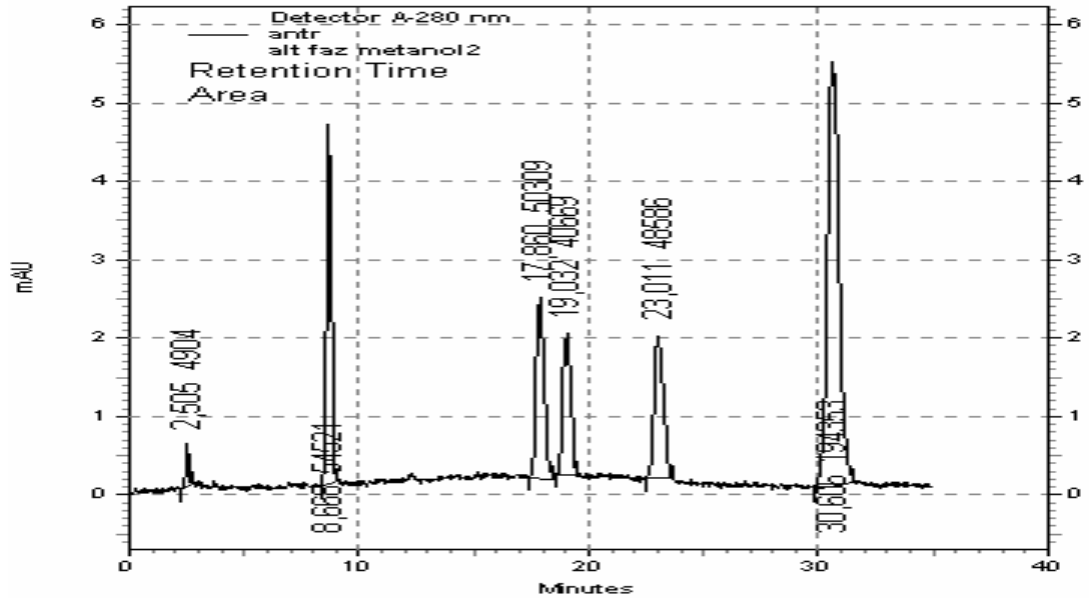
Kromatografik ayırmanın optimizasyonundan sonra halojenli fenollerin (4-floro fenol ; 4-kloro fenol ; 3-kloro fenol ; 3-bromo fenol ; 4-iyodo fenol) tayini için örnek olarak içme suyu seçilmiştir. 0,01 M dipotasyum hidrojen ftalat ile seyreltilen (1:1) karışım numunedan 20 µL enjekte edilmiş ve yapılan analizde su numunesi içinde halojenli fenollerin saptanması çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada halojenli fenollerin pH'si için 4,552 değeri bulunmuştur. Bu numunenin kolona enjeksiyonundan sonra bunların kolonda iyi bir şekilde tutunduğu saptanmış ve bu koşulu ortadan kaldırmak için ortam 0,01 M dipotasyum hidrojen ftalat ile 1:1 oranında seyreltilerek pH'nin bazik bölgeye kayması sağlanmıştır. Bu işlem için de Sep-Pak C<sub>18</sub> kartustan yararlanılmıştır. Asidik bölgede yapılan ayırma çalışmalarında 7-8 mL metanol kullanılırken, bunun ortadan kaldırılması amacıyla C<sub>18</sub> kartus kullanılmış ve harcama miktarının 2-3 mL'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Her bir mL metanol ile alınmış kısmın kromatogramı alınarak su içindeki halojenli fenollerin dedeksiyonu amaçlanmıştır. Aşağıdaki şekillerde bu kromatogramlar görülmektedir.

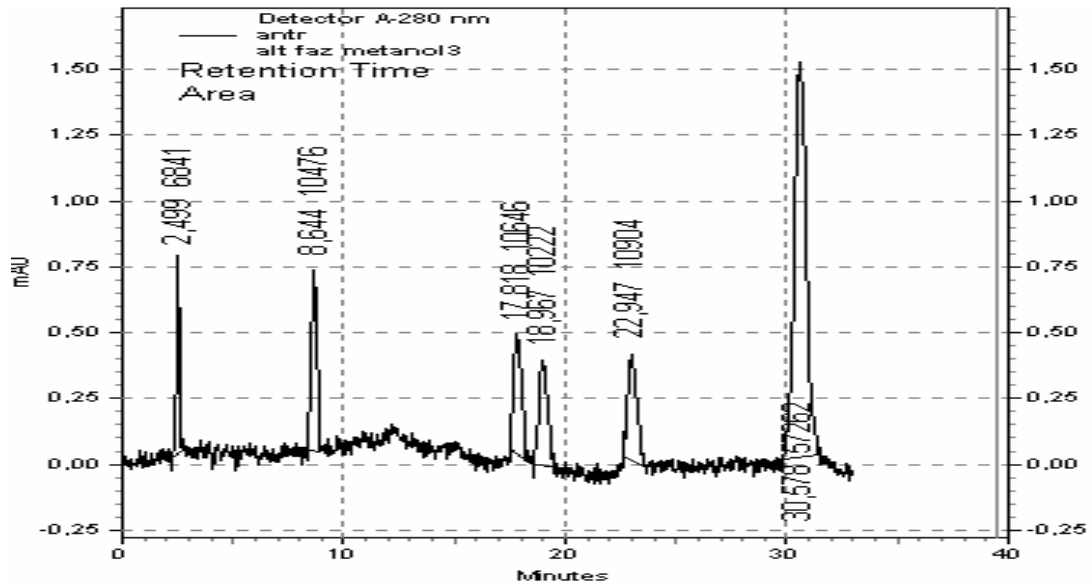


Şekil 4.17. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karışımın kartustan ilk 1 mL metanol ile alınmış kısmının kromatogramı.

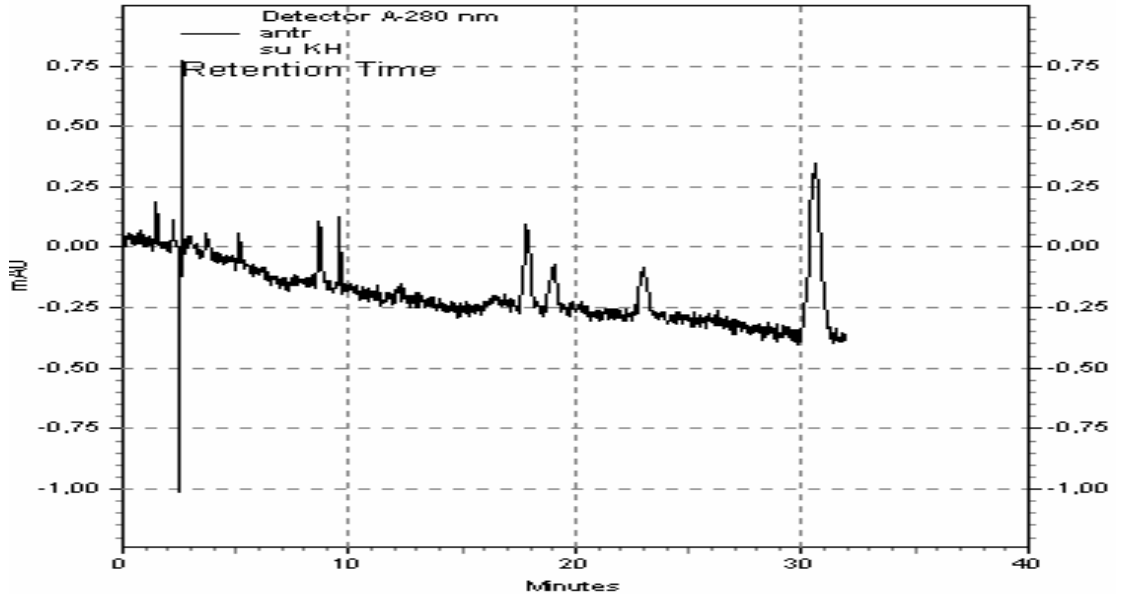




Sekil 4. 18. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karisimin kartustan ikinci 1 mL metanol ile alinmis kisminin kromatogrami.



Sekil 4. 19. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karisimin kartustan üçüncü 1 mL metanol ile alinmis kisminin kromatogrami.



Sekil 4. 20. 0,01 M dipotasyum hidrojen fosfat ile 1:1 seyreltilen standart karisimin kartustan alt faza geçen sulu kisminin kromatogrami.

Hanada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fenoller için dedeksiyon limitinin 0,0033-0,0073  $\mu\text{g}$  olduğu saptanmıştır. Bu dedeksiyon limitinden yararlanarak, yapılan bu çalışmalar neticesinde kartusun altına geçen su numunesinin kromatogramından herhangi bir halojenli fenol dedeksiyonuna rastlanmadığı saptanmıştır.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada halojenli fenollerin (4-floro fenol; 4-kloro fenol; 3-kloro fenol; 3-bromo fenol ve 4-iyodo fenol) sıcaklık parametresi kullanılarak ters faz sivi kromatografik ayırımı gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.

Bir çok kromatografik çalışmada mobil faz pH'si, mobil fazın sulu kısmının pH'si olarak alınmaktadır. Bu yaklaşım son derece yanlıştır. Bazı durumlarda mobil faz pH'si organik modifiyer ile sulu kısmın karıştırılmasından sonra ölçülmektedir. Bu durumda potansiyometrik sistem sulu çözeltiler kullanılarak kalibre edildiği için ölçülen pH, mobil fazın gerçek pH'si değildir. Kromatografide uygun yaklaşım mobil fazın pH'sini su-organik çözücü karışımında belirlemektir. Bu gün su-organik çözücü karışımlarında pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda çalışılan halojenli fenollerin literatürdeki pK değerlerinden yararlanılarak pH 4,552'de çalışmaları sürdürülerek tamamlanmıştır. Seçilen pH değeri herhangi bir negatif deney sonucu vermediği için farklı bir pH'da deneme yapılmamıştır.

Çalışmada ilk olarak halojenli fenollerin 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanmış UV-Görünür bölge spektrofotometresinde 200-900 nm dalga boyları arasında absorpsiyon taraması yapılmış, hangi bileşimin hangi dalga boyunda maksimum absorpsiyon yaptığı belirlenmiştir. Uygun dalga boyu saptandıktan sonra 280 nm ortak dalga boyu olarak kabul edilmiş ve bu dalga boyunda HPLC ayırmalarına geçilmiştir.

Çalışmada iki farklı mobil faz hazırlanmış ve denenmiştir. Birinci mobil faz'la (%30 - % 70 Metanol – Su) yapılan ayırma çalışmalarında, çalışılan maddelerin piklerinde yeterli keskinliğe ulaşamamış ve piklerin yayıldığı görüldüğü için bu mobil fazla çalışılmaktan vazgeçilmiştir. İkinci mobil faz'la (% 50 - % 50 Metanol – Su) yapılan çalışmada yeterli pik yüksekliği ve yeterli ayırma sağlandığı belirlendikten sonra bu mobil faz'la çalışmalara devam edilmiştir.

Çalışılan bileşiklerin farklı sıcaklıklardaki ayırmaları incelenerek ayırma üzerine sıcaklığın etkisi parametresi incelenmiştir. Çalışmalarda enjeksiyon edilen halojenli fenollerin standart karışımları hazırlanarak her bir enjeksiyon bu derişimlere göre yapılmıştır.

İlk olarak 25°C'da 1,0 mL/dak akış hızıyla ayırma yapılmaya çalışılmıştır. Bu şartlarda alınan kromatogramdan da görüldüğü bu sıcaklık şartında halojenli fenoller kromatografik olarak ayrılmaktadır. Yapılan UV taramasında 4-iyodo fenolün 232 nm'de maksimum absorptans verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bundan dolayı 25°C'de ve 232 nm'de bu halojenli fenollerin bir kromatogramı alınmıştır (Şekil 4.7) Bu kromatogramdan görüldüğü gibi 25°C ve 232 nm'de 4-iyodo fenolün pik şiddetinin büyüdüğü belirlenmiştir. Pik şiddetinin büyüklüğü nedeniyle 25°C ve 232 nm şartları halojenli fenollerin ayrılması için uygun koşul değildir. Bu şartlardan sonra 280 nm dalga boyunda çalışılmaya devam edilmiş ve sıcaklık etkisinin belirlenebilmesi için bir sonraki sıcaklık olan 30°C denenmiştir. Bu şartlarda alınan kromatogramdan 30°C'ye çıkıldığında piklerin şiddetlerinde ve alıkonma zamanlarında önemli değişimler olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın artışı organik modifiyer artışı gibi etki göstermiş alıkonma zamanlarında değişim gözlenmiştir. Bu sıcaklık şartında da halojenli fenollerin yeteri kadar ayrılabilirdi ancak alıkonma zamanlarında bir düşme olduğundan uygun bir şart olarak görülmediği düşünülmüştür. Sıcaklık parametresinin ve yeterli ayırma şartlarının belirlenebilmesi için bu defada 35°C ve 40°C sıcaklıklarda ve 280 nm'de çalışma yapılmıştır. Sıcaklığın artışı organik modifiyer artışı gibi etki göstermiş alıkonma zamanlarında değişim gözlenmiştir. Yapılan ayırma çalışmalarından en uygun sıcaklık şartının 40°C ve 280 nm dalga boyu olduğuna karar verilmiştir.

En uygun koşul saptanıp yeterli ayırma sağlandıktan sonra, her bir halojenli fenol için geri kazanımlar hesaplanmış ve analitiksel veriler Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Korelasyon katsayılarından görüldüğü gibi her bir bileşik için bu koşulda alan derişim ilişkisinin lineer olduğu saptanmıştır.

Kromatografik ayırmanın optimizasyonundan sonra 4-floro fenol ; 4-kloro fenol ; 3-kloro fenol ; 3-bromo fenol ; 4-iyodo fenol'ün tayini için örnek olarak içme suyu seçilmiştir. 0,01 M dipotasyum hidrojen ftalat ile seyreltilen (1:1) karışım numuneden 20 µL enjekte edilmiş ve yapılan analizde su numunesi içinde halojenli fenollerin saptanması çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada halojenli fenollerin pH'si için 4,552 değeri bulunmuştur. Bu numunenin kolona enjeksiyonundan sonra bunların kolonda iyi bir şekilde tutunduğu saptanmış ve bu koşulu ortadan kaldırmak için ortam 0,01 M dipotasyum hidrojen ftalat ile 1:1 oranında seyreltilerek pH'nin bazik bölgeye kayması sağlanmıştır. Bu işlem için de Sep-Pak C<sub>18</sub> kartustan yararlanılmıştır. Asidik bölgede yapılan ayırma çalışmalarında 7-8 mL metanol kullanılırken, bunun ortadan kaldırılması amacıyla C<sub>18</sub> kartus kullanılmış ve harcamanın 2-3 mL ye düştüğü gözlenmiştir. Her bir mL metanol ile alınmış kısmın kromatogramı alınarak su içindeki halojenli fenollerin dedeksiyonu amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda kartusun altına geçen su numunesinin kromatogramından (Şekil 4.20) herhangi bir halojenli fenol dedeksiyonu saptanamamıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Barbosa, J. and Sanz-Nebot, V., 1993. Standard pH-Values in non- aqueous mobile phases used in Reversed- Phase Liquid Chromatography, 1993. *Analytica Chimica Acta*, 283, 320-325.
- Barbosa, J., Berges, R., Sanz- Nebot, V., 1998A Retention Behaviour of Quinolone Derivatives in High- Performance Liquid Chromatography; Effects of pH and Evaluation of Ionization Constants. *J. Chromatogr. A.*, 823, 411-422.
- Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V., 1998B. Secondary Chemical Equilibria in High-Performance Liquid Chromatography Influence of Ionic Strenght and pH on Retention of Peptides. *J. Chromatogr. A.*, 823, 497-509
- Bartak P., Cap L., (1997) Determination of phenols by solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, 767, 171-175.
- Denizli, A., Özkan G., Uçar, M., (2001) Removal of chlorophenols from aquatic systems with dye-affinity microbeads, *Seperation and Purification Technology*, 24, 255-262.
- Fiehn O., Jekel M., (1997) Analysis of phenolic compounds in industrial wastewater with high-performance liquid chromatography and post-column reaction detection, *Journal of Chromatography A*, 769, 189-200.
- Hanada Y., Imaizumi I., Kido K., Tanizaki T., Koga M., Shiraishi H., Soma M., (2002) Application of a pentafluorobenzyl bromide derivatization method in gas chromatography/mass spectrmetry of trace levels of halogenated phenols in air, water and sediment samples, *Analytical Sciences*, 18, 655-659.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Sustances with Nonpolar Stationary Phases. *Anal. Chem.*, 49, 142.

- Huang G.L., Xiao H., Chi J., Shiu W.Y., Mackay D., (2000) Effects of pH on the aqueous solubility of selected chlorinated phenols, *J.Chem. Eng. Data*, 45, 411-414.
- Jauregui O., Moyano E., Galceran M.T., (1997), Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of chloro- and nitrophenolic compounds in tap water and sea water, *Journal of Chromatography A*, 787, 79-89.
- Kiliç, E., Köseoglu, F., Yilmaz, H., (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri, *Bilim Yayıncılık*, 674-675 ; 725-732, Ankara.
- Patsias J., Mourkidou E.P., (2000) Development of an automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices, *Journal of Chromatography A*, 904, 171-188.
- Penalver A., Pocurull E., Marce R.M., (2002) Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples, *Journal of Chromatography A*, 953, 79-87.
- Pine, H. S, (1987) *Organic Chemistry*, Fifth Edition, McGraw-Hill, Inc., New York, pp 70-71.
- Pocurull E., Marce R.M., Borrull F., (1996) Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment, *Journal of Chromatography A*, 738, 1-9.
- Pocurull E., Sanchez G., Borrull F, Marce R.M., (1995) Automated on-line trace enrichment and determination of phenolic compounds in environmental

waters by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 696, 31-39.

Poole, C. P. And Poole, s. W., 1997. *Chromatography Today*. Fifth impression. Elsevier Science, B. V., Amsterdam.

Puig D., Barcelo D., (1997) Determination of polar priority phenols at parts per trillion levels in water using on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatography with coulometric detection, *Journal of Chromatography A*, 778, 313-319.

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.

Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water + Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure & Appl. Chem.*, 59 (11), 1549-1560.

Sarrion M.N., Santos F.J., Galceran M.T., (2002) Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 947, 155-165.

Takeda S., Tanaka Y., Yamane M, Siroma Z., Wakida S., Otsuka K., Terabe S., (2001) Ionization of dichlorophenols for their analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 924, 415-420.



**ÖZGEÇMİS**

Adi Soyadi : Aysegül Yılmaz Çalik  
Dogum Yeri : Isparta  
Dogum Yili : 1979  
Medeni Hali : Evli

**Egitim ve Akademik Durumu:**

Lise : 1996 Isparta Sehit Ali Ihsan Kalmaz Lisesi

Lisans :2001 Süleyman Demirel Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce