

BATI KARADENİZ BÖLGESİNDEKİ ORMANGÜLÜ HUMUSUNDAN TOPLANAN HUMİK ASİTİN KARAKTERİZASYONU

Ahmet TUTAR^a, Abdil ÖZDEMİR^a, Mümin DİZMAN^a, Ayhan HORUZ^b

^aKimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Sakarya Üniversitesi

^bToprak Bölümü, Ziraat Fakültesi, 19 Mayıs Üniversitesi
atutar@sakarya.edu.tr

ÖZET

Ormangülü muhteşem çiçekleri, türlerinin zenginliği, çoğaltılma kolaylığı ve geniş bir coğrafi yelpazede bulunması sebebi ile meşhur bir süs bitkisi cinstir. Yaklaşık 1000 türü tropikal bölgelerden kutuplara ve dağlardan deniz seviyesine geniş coğrafi alanda yaşamaktadır. Ormangülü Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak bulunmaktadır. Ormangülünün yetiştiği toprağın önemli miktarda humik asit içerdiği tespit edildi. Bu çalışmada, humik asit fraksiyonları ormangülü humusundan ekstrakte edildi ve bunların karakterizasyonu ESI-MS, solid-state ¹³C NMR, Fourier-transformed infrared (FTIR) spektroskopileri ve HPLC ile gerçekleştirildi. Değişik bölgelerin numuneleri için yapılan ve spektroskopik çalışmalardan elde edilen spektral özellikler birbirleri arasında ve toprak humik asitleri ile kıyaslandığında belirgin bir benzerlik göstermiştir.

Anahtar kelimeler: humik asit, ormangülü, ESI-MS, ¹³C NMR, FTIR, HPLC

CHARACTERIZATION OF HUMIC ACID FROM HUMUS SOIL COLLECTED UNDER THE *RHODODENDRON PONTICUM L.* IN THE WESTERN KARADENİZ REGION

ABSTRACT

Rhododendron is a highly celebrated ornamental genus because of its spectacular flowers, species-richness, ease of hybridization and broad geographical range. Approximately 1000 species inhabit a vast geographical range, from the tropics to the polar zone and alpine to sea level. Rhododendron ponticum L. has been documented throughout the Black Sea Region of Turkey. It was found that Rhododendron contains an important amount of humic acids. In this study, humic acid fractions were isolated from humus soil collected under the

Rhododendron ponticum L. in the Western Black Sea and characterization of those was performed by a combination of spectroscopic techniques comprising ESI-MS, solid-state ¹³C NMR, and Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopies. The spectral features obtained from the spectroscopic studies for samples of different regions showed a distinct similarity amongst themselves and in comparison to soil humic acids.

Key words: humik acid, Rhododendron, ESI-MS, ¹³C NMR, FTIR, HPLC

1. Giriş

Humik asit karakterizasyonu çalışmaları dünya genelinde su, toprak ve bitki menşei üzerine devam etmektedir. Tabiattaki humik maddelerin rolü ve fonksiyonlarının tam olarak anlaşılması için bunların temel yapılarının bilinmesi gerekmektedir. Fakat humik maddelerin birçok molekülden meydana gelmesi ve bununla birlikte birçok bağ ile değişik moleküllere bağlanması kesin bir yapısal formül geliştirmeye imkân vermemektedir. NMR, GS-MS, LC-MS, kromatografi, elemental analiz yöntemleri gibi birçok teknik araştırmalarda kullanılmaktadır (Helal, 2011).

Bu güçlü tekniklerin uygulanmasına rağmen moleküler seviyede humik maddelerin yapısal olarak aydınlatılmalarında başarı tam anlamı ile sağlanamamıştır (Frimmel, 1998; Leenheer, 2003). Humik maddelerin her fraksiyonunun (humik asit, fulvik asit, humin, vs) farklı boyutlarda molekül serisi içerdiği, birkaç tanesinin aynı yapısal konfigürasyona veya bir dizi reaktif fonksiyonel gruba sahip olduğu kabul edilmektedir. NMR ve IR, humik madde karakterizasyonunda birbirlerinin tamamlayan metotlar olarak kullanılabilir. ¹³C NMR son yirmi yıldan fazla süredir organik molekül çalışmalarında kullanılmaktadır. Humik madde yapısı çalışmalarında en çok kullanılan yöntemdir (Wilson, 1987). Fakat CP/MAS spektra kantitatif değildir (Wilson, 1987; Mao et al., 2002). Humik maddeleri belirlemede HPLC kullanımı son birkaç yıldır öne çıkan bir gelişme kaydetmiştir. FTIR ise kompleks bileşikleri tanımlamada kullanılan oldukça güçlü bir yöntemdir. FTIR spektra humik maddelerin kimyasal gruplarını ve bantlarını izlemede kalite bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. FTIR spektroskopisi humik madde oluşumunun yapısal değişiklikleri hakkında derinlemesine bilgi sunmaktadır.

2. Humik Asit Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu

2.1. Orman Gülü Humusundan Humik Asidin Ekstraksiyonu

Farklı lokasyonlardan toplanan dövülüp elenmiş ormangülü humusundan 10'ar gram tartılarak 5 ayrı erlene koyuldu. Örneklerin üzerine 1 M NaOH

çözeltilisinden 50'şer ml eklendi ve bir gece boyunca çalkalayıcıda 200 devir/dakikada (rpm) çalkalandı. Ertesi gün her bir numune 2'şer adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edilerek çökeltildi. Her bir numuneye ait birinci süzüntüler koruyucu bir kap içerisinde birleştirilerek saklandı. Ekstraksiyon için aynı işlem 2 kez daha tekrar edilerek humik ve fulvik asit ekstraksiyonu ile humin madde çökeleği birbirlerinden ayrıştırıldılar. Her bir numuneye ait çökeltmeyen süzüntüler daha öncekilerle birleştirildi. Bu süzüntüler humik ve fulvik asitlerin karışımını içerirken çökelti kısmı humini ifade etmektedir.

2.2. Humik ve Fulvik Asit Karışımından Humik Asidin Çöktürülerek Ayrılması

Her bir numune için ayrı ayrı elde edilen humik ve fulvik asitlerin karışımına 25'er ml %37'lik konsantre HCl katıldı. Çökeltme gözlemlendi ve karışımlar çalkalayıcıda 6 saat boyunca 200 devirde (rpm) çalkalandı. Daha sonra her bir numune 2'şer adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 11000 devirde (rpm) 20 dakika santrifüj edildi. Çöken kısım humik asit, süzüntü ise fulvik asittir. Humik asit yıkama işlemi için ayrıldı.

2.3. Humik Asidin Yıkaması

Çöktürülerek fulvik asitten ayrılan humik asitler 1 M NaOH çözeltisinin 20 ml'de çözüldü ve saf su ile 200 ml'ye tamamlandı. Karışıma humik asidi çöktürmek için 3 ml %37'lik konsantre HCl eklendi. Çökeltmenin başladığı gözlemlendi ve çalkalayıcıda 30 dakika 200 devirde (rpm) çalkalandı. Sonra her bir numune 4'er tane 50 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde santrifüj edildi. Süzüntüler atılırken, aynı numune ye ait çökelttiler birleştirilerek ikinci yıkama işlemine geçildi. İkinci yıkamada humik asit çökelttileri 1 M NaOH çözeltisinin 10 ml'si ile çözülerek saf su ile 200 ml'ye tamamlandı. Humik asidi çöktürmek için 1,5 ml %37'lik konsantre HCl çözeltisi eklendi. Çöken humik asidi ayırmak için her bir numune 4'er tane santrifüj tüpüne alınarak 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Süzüntüler atılırken aynı numuneye ait çökelttiler birleştirilerek üçüncü yıkamaya geçildi. Çökelttilere bu defa 80'er ml saf su eklendi ve humik asidi çöktürmek için 10 damla %37'lik konsantre HCl eklendi. Çöken humik asit 30 dakika 11000 devirde (rpm) santrifüj edildi. Süzüntüler atılırken elde edilen humik aside içerisindeki safsızlıkların giderilmesi için kurutma işlemi uygulandı.

2.4. Humik Asidin Kurutulması

Elde edilen humik aside, içindeki çeşitli çözücü ve safsızlıkların uzaklaştırılması için düşük basınç altında kurutma işlemi yapıldı. Elde edilen

humik asit örneği çift boyunlu vidalı balona alındı. Balonu bir boynuna septum takılırken diğer boynuna vidalı kapak takıldı ve vakum koluna vakum pompası bağlandı. Isıtıcının üzerine yağ banyosu koyularak sıcaklık 70°C'ye sabitlendi. Vakum destilasyonu metoduyla humik asit içerisindeki çeşitli çözücü ve safsızlıklar humik asidin bozunmadığı bir sıcaklıkta uzaklaştırıldı. Kurutma işlemi 3-4 saat boyunca devam ettirildi. Kuruyan humik asitlerin nem kapmaması için balonun septum takılı olan boynuna azot balonu takılarak, kuru humik asit azot atmosferi altında kahverengi şişelere alınıp desikatörde saklandı.

2.5. Spektroskopik Sonuçlar

Humik maddelerle ilgili yapısal ve bileşim özellikleri konusunda en genel bilgiler kütle, elementel analiz, UV-Visible, IR, HPLC ve ¹³C NMR teknikleri ve bazı bozulma metotları kullanılarak elde edilmektedir.

Humik maddelerin karbon hidrojen oksijen ve azot bileşimleri onların yapısı ve nereden geldikleri konusunda bilgiler verir. Burada elde edilen veriler H/C, O/C ve N/C şeklinde ele alınmaktadır. Buradan farklı humik asitler konusunda bilgi edinilmektedir. Topraktaki ve sedimentlerdeki humatların yapısal değişimleri konusunda spektroskopik yöntemler önemli yer almaktadır. Ayrıca, humik maddelerin yapısal formülleri konusunda da aydınlatılmaktadır.

2.5.1. UV-Visible Spektroskopisi ile Yapılan Çalışmalar ve Elde Edilen Sonuçlar

UV-Visible spektroskopisi farklı fonksiyonel grupların verdiği bantların oluşturduğu spektrumlarda piklerin çok fazla örtüşmelerinden dolayı fazla önerilen bir teknik olmamasına rağmen humik maddelerin karakterize edilmesinde ve belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Seyreltik humik madde çözeltilerinin 446 ve 665 nm dalga boyu absorpsiyonlarının oranı, E4/E6 humik maddelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Elde edilen oran miktarı humik maddelerin toplam karbon miktarı, aromatik grup miktarına karşı alifatik grup miktarını ve molekül ağırlıkları konusunda bilgi vermektedir.

Tüm humik maddeler sahip oldukları molekül yapısı gereği birçok fonksiyonel gruplar içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar farklı bölgelerde absorpsiyon göstermektedir. Bu absorpsiyon değerleri yüksek dalga boylarına doğru azalmaktadır. Elde edilen absorpsiyon spektrumlarında genel olan dalga boyu 270-280 nm dalga $\pi \rightarrow \pi^*$ boyu aralığındaki geçişleridir. Bu dalga boyu aralığında tüm aromatik gruplar absorpsiyon vermektedir. Burada ölçülen değerler humik asit moleküllerindeki aromatik yapıların miktarlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Humik asitin yapısındaki (fenolik bileşikler, anilin türevleri, benzoik asit, polienler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar) çeşitlilik, farklı bölgelerdeki absorpsiyon piklerinden anlaşılabilir. Bu yapıların belirlenmesinde

numunelerin nerelerden geldiği konusunda bir fikir verecektir. Molar absorptivite ler humik asitlerin aromatiklik derecelerini, humikleşme miktarlarını ve molekül ağırlıkları konusunda bilgi verecektir. Yapılarında barındırdıkları çok farklı gruplardan dolayı humik asitler çok farklı maddelerle etkileşim yapabilirler. Bunlar, polar olmayan maddeler, organik kirleticiler, metaller ve radyoaktif çekirdekler şeklinde sıralanabilir.

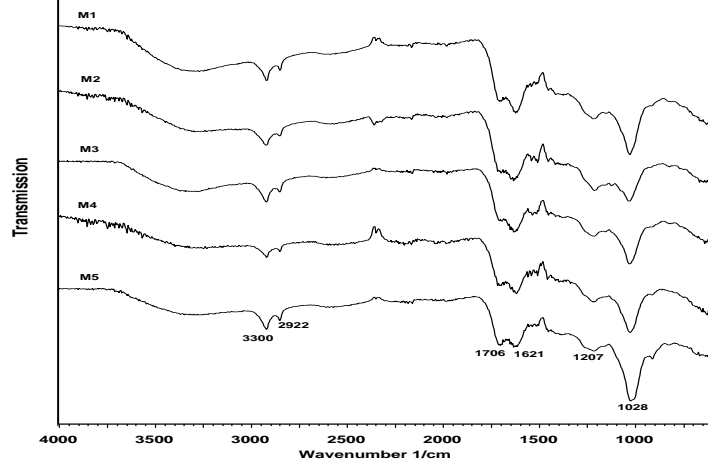
Bu çalışmada izole edilen humik asitler için absorpsiyon spektrumları 200 nm ile 700 nm aralığında kaydedildi. Literatürde aromatik miktarların belirlenmesinde farklı yöntemlerin takip edildiği görülmektedir. Bunlardan birincisi molar absorbanların belirlenmesinde sonra 280 nm numunelerin absorbanlarının ölçülmesi ve aromatiklik derecesinin hesaplanması için türetilmiş formülün kullanılmasıdır. Bu formül Traina ve arkadaşlarının (1990) kullandığı değeri molar ϵ formüle yakın bir formüldür. Formülde verilen absorptiviteyi gösterir.

$$\text{Aromatiklik} + 6.74\epsilon = 0.05$$

Aromatiklik derecesini belirlemede kullanılan ikinci bir yol ise ve 665 ve 465 nm dalga boylarında absorpsiyonların ölçülmesi ve bu dalga boylarına göre $E4/E6$ oranların bulunması esasına dayanır. Yu-Ping ve arkadaşları bu ikinci yöntemden elde edilen veriler arasındaki korelasyonun birinciye göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Fakat birinci yöntemin tam doğru olduğunu söyleyebilmek için molar absorptivitenin nasıl belirlendiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Humik asitler çok farklı molekül yapıları içerdiğine göre hangi yapıya göre ve hangi molekül ağırlığına göre molar absorptivitenin belirlenmesi gerektiği bilinmelidir.

2.5.2. FTIR Spektroskopisi ile Yapılan Çalışmalar

FTIR spektroskopisi ölçümleri IR Prestige-21 kullanılarak MID IR bölgesinde 600 ile 4000 cm^{-1} aralığında ve her numune için 25 tarama yapılarak gerçekleştirildi. Değişik bölgelerden toplanan numuneler ait FTIR spektrumları bir birine benzerlik gösterdiği belirlendi. Genel olarak 3600–2000 cm^{-1} bölgesinde geniş ve örtüşmüş pikler ortaya çıkmış durumdadır. 3400–3000 cm^{-1} aralığındaki geniş bant hidrojen bağı yapmış hidroksil gruplarını göstermekte. 3100–3000 bölgesinde ortaya çıkması gereken aromatik C-H gerilme titreşimleri ise geniş bant içerisine kaybolmuş durumdadır. 2920–2850 cm^{-1} bölgesindeki pikler aromatik gruplara bağlı olan alifatik CH, CH₂, CH₃ gruplarına ait gerilme titreşimlerini göstermektedir. 2570 cm^{-1} bölgesindeki omuz karboksil gruplarındaki OH titreşimidir.



Şekil 2.1. Farklı bölgelerden alınan ormangülü humuslarından ekstrakte edilen humik asitlerin FTIR spektrumları

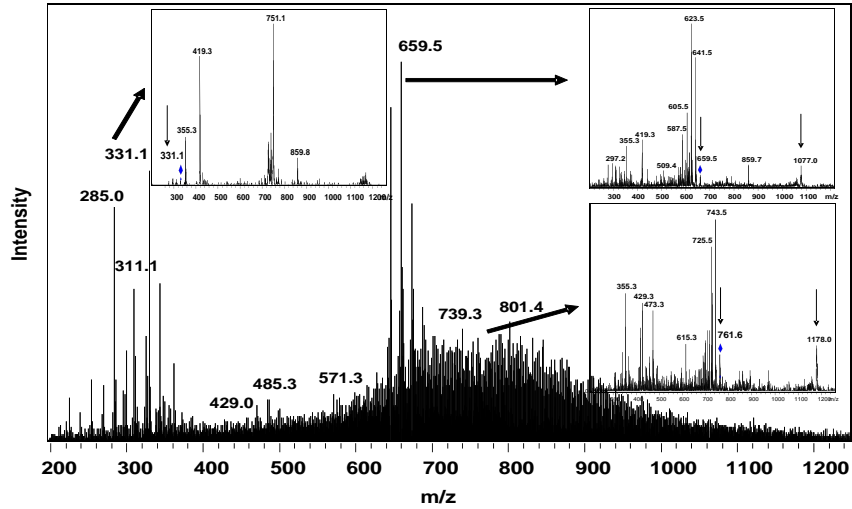
Spektrumlarında ortak görülen bantlardan 1712 cm^{-1} bandı karboksil, aldehit ve keton karbonillerine ait piki göstermekte, ama karboksil grubunun durumuna göre bu pikin yüksekliği hidrojen bağlanmış durum veya iyonlaşmış duruma göre değişimler görülmekte ve değişik bölgelerden izole edilen humik asitlerde bu pik yükseklikleri bazılarında farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık COOH grubunun asit ve tuz formlarının titreşim farklılıklarından kaynaklanmaktadır. COOH gruplarının COO^- ye dönüşmesi durumunda 1380 cm^{-1} pikinin yüksekliğinde 1712 cm^{-1} pikine göre artmalar meydana gelmektedir. Bu durumda farklı bölgelerden elde edilen numunelerdeki karboksil grup miktarları arasında farklar olacağını göstermektedir. Çünkü humik asitlerin ayrılmasında aynı basamaklar ve aynı kimyasallar kullanılmıştır. 1620 cm^{-1} piki ise amit gruplarına ait karbonil gurupları, kinonlar ve nitratlardan gelmektedir. 1600 cm^{-1} deki pik ise aromatik yapıda yer alan $\text{C}=\text{C}$ grubundan ve hidrojen bağlı $\text{C}=\text{O}$ grubundan ortaya çıkmaktadır. Yaklaşık 1540 civarında ortaya çıkan bant ise peptid gruplarından ortaya çıkan amit bantları ve 1510 civarındaki pik ise aromatik $\text{C}=\text{C}$ grubu olabilir. 1460 cm^{-1} piki ise alifatik $\text{C}-\text{H}$ eğilme titreşiminin kaynaklandığı düşünülmektedir. $1290-1220\text{ cm}^{-1}$ civarındaki pik grubu ise $\text{C}-\text{O}$ gerilme ve OH bozulmasından ortaya çıktığı kabul edilebilir. 1120 cm^{-1} deki pik ise alifatik CH_2 , OH veya $\text{C}-\text{O}$ gurupları ve 1028 deki geniş pik grubu ise karbonhidratlara ait $\text{C}-\text{O}$ gerileme titreşiminden ve silikatlara ait $\text{Si}-\text{O}$ ortaya çıkmaktadır.

Elde edilen spektrumlar karşılaştırıldığında alifatik grupların yapıdaki miktarları bölgesel farklılıklar göstermektedir. Bu durumda büyük olasılıkla bazı numunelerde tam humik madde oluşumunun tamamlanmamış olması olabilir. Ayrıca, 1028 cm^{-1} piki yüksekliğinde ise belirgin bir farklılık ortaya çıkmaktadır.

Bu pik büyük olasılıkla izolasyon işleminde numune içerisindeki kil minerallerinden gelen piklerdir.

2.5.3. Kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmalar

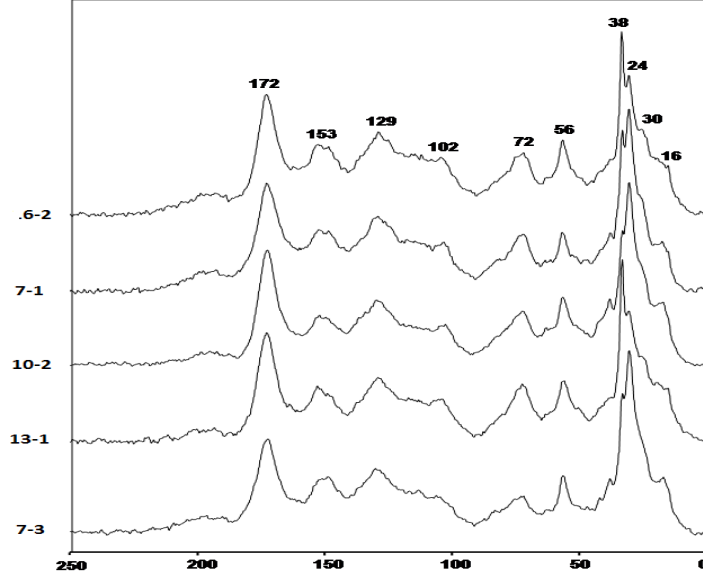
Kütle spektrumlarından elde edilen sonuç, moleküllerin çoklu iyonlar oluşturarak daha düşük m/z iyonları vermeleri olabilir. Buna rağmen literatürde verilen değerlere göre boyut eleme kromatografisine göre değişik çalışmalarda farklı moleküler ağırlıklarda olduğu belirtilmiştir. Literatürlerde molekül ağırlığı 1500-5000 amu ya da 800-18000 amu olarak verilmektedir. Bazı araştırmacılar ise humik asitin bu derece makro moleküler yapıda görüşündedirler. Kütle spektrumlarında büyük molekül parçacıklarının görünmesinin nedeni, humik asitlerin yapısında çok fazla miktardaki OH ve COOH grupları olması ve bunların da kuvvetli hidrojen bağları yapmasıdır.



Şekil 2.2. Farklı bölgelerden alınan ormangülü humuslarından ekstrakte edilen humik asitlerin kütle spektrumları

2.5.4. NMR Spektroskopisi ile Yapılan Çalışmalar

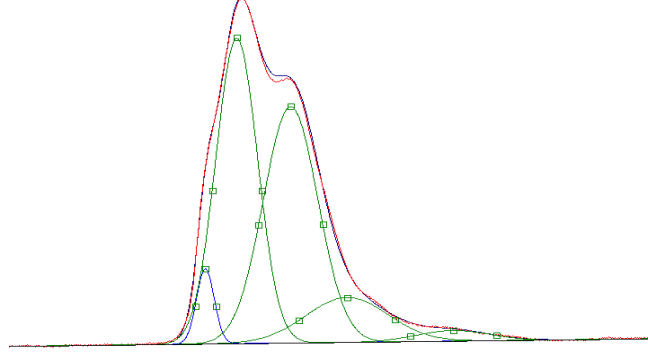
Kantitatif çalışmalar için FTIR ve NMR spektrumlarına pik ekstraksiyonu uygulandı (GRAMS 32) ve her bir grubun pik alanları çıkartıldı. Şekil 2.1 FTIR pik spektrumun gösterirken Şekil 2.3 katı hal ¹³C NMR pik spektrumunu vermektedir. Bu spektrumlardaki her bir pike ait pik alanları hesaplanarak aromatik ve alifatik gruplara ait oranlar tespit edildi.



Şekil 2.3 Farklı bölgelerden alınan ormangülü humuslarından ekstrakte edilen humik asitlerin katı hal ^{13}C NMR spektrumları

2.5.5. HPLC ile Yapılan Çalışmalar

Genel olarak boyut eleme HPLC metodu, maddelerin molekül ağırlıkları konusunda bilgiler verirken HPLC spektrumu ile de ekstraktın saflık derecesi anlaşılır. Çalışmalarımız esnasında yapılan saflaştırma işlemi çok sayıda bilim adamı tarafından kabul edilen bir ekstraksiyon işlemidir. Ekstraksiyon işlemleri nasıl yapıldığı ilgili kısımlarda anlatılmıştır. Çalışmamızda Shimadzu HPLC sistemi kullanıldı. Bu alet dörtlü bir pompa sistemine ve DAD dedektörüne sahip olan bir sistemdir. Kolon olarak TSK BIOGEL (7,8 mm x 30 cm, ve 5 μm boyutlu parçacıklar) boyut eleme kolonu kullanıldı. Sistemde mobil faz olarak 0,01 M Fosfat tamponu (pH=8, 0,1 M NaCl) ile asetonitril (30/60 v/v) kullanıldı. Tüm yapılan enjeksiyonlarda 0,5 mL/dak akış hızı ayarı kullanılmıştır. Her bir analiz için 5 μl örnek enjekte edilmiştir. Tüm numunelerin pH değerleri enjeksiyondan önce 8,0 civarına NaOH ya da gerek görüldüğünde HNO_3 ile ayarlandı.



Şekil 2.4. Farklı Humik asit NMR spektrumları

Humik asidin belirli molekül ağırlığı bölgelerinde gruplaşmış moleküller olarak düşünülmesi gerekir. Bu farklılaşma tamamen önceden belirttiğimiz gibi humik asidin oluşum sürecinden kaynaklanmaktadır. Fulvik asit ve humik asit moleküllerinin birbirinden ayrılmasında ayrı bir problem oluşturur. Bu durum moleküllerin yapısındaki polar gruplar arasındaki güçlü etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Literatürde şu ana kadar saf olarak humik asit ve fulvik asidin tam olarak bir birlerinden ayrıldığını belirten bir çalışma rapor edilmemiştir.

3. Sonuç

Batı Karadeniz bölgesi ormanlarında bolca yetişen ormangülü bitkisinin lokasyonlarındaki humuslu toprak üzerinde humik madde karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma spektroskopik analizler olan FTIR, NMR, kütle ve HPLC ile yürütülmüştür. Sonuçta, elde edilen verilen literatürdeki verilerle yakın benzerlik oluşturmuştur.

Kaynaklar

- Frimmel, 1998. Characterization of natural organic matter as major constituents in aquatic systems, Contam, J., 1998. Hydrol. 35, 201.
- Helal, A.A., 2011. Characterization of different humic materials by various analytical techniques, Arabian Journal of Chemistry, 4 , 51–54.
- Leenheer, J.A., Croue, J.P., 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter, Environ. Sci. Technol. 37, 18A.
- Mao, J., Hu, W., Ding, G., Rohr, K., Davies, G., Ghabbour, E., Xing, B., 2002. Int. J. Environ. Anal. Chem. 82/4, 183
- Traina et al., 1990. An ultraviolet absorbance method of percent aromatic carbon content of humic substances, J. Envir. Qual., 19: 151-154.

A.TUTAR, A.ÖZDEMİR, v.d. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi (2012-1)
Wilson, M.A., 1987. NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil
Chemistry. Pergamon Press, Oxford.