İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLOROFİL A VE B'NİN TÜREV SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Emel ERGÜN

Anabilim Dalı : KİMYA

Programı : KİMYAGERLİK

OCAK 2003

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLOROFİL A VE B'NİN TÜREV SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Emel ERGÜN
509001258

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 24 Aralık 2002
Tezin Savunulduğu Tarih : 22 Ocak 2003

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Süleyman AKMAN
Prof.Dr. Hüseyin AFŞAR (Y.T.Ü.)

OCAK 2003

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin başlangıcından sonuçlandırılmasına kadar her türlü bilgi ve desteğini esirgemeden beni yönlendiren çok değerli hocam Doç. Dr. Birsen Demirata Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm Analitik Kimya Anabilim Dalındaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak 2003 Emel Ergün

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
ÖNSÖZ		ii
İÇİNDEKİLER		iii
ŞEKİL LİSTESİ		vi
TABLO LİSTESİ		viii
ÖZET		ix
SUMMARY		x
1. GİRİŞ VE AMAÇ		1
2. LİTERATÜR ÖZETİ		2
2.1.	Klorofil ve Türevleri	2
2.2.	Klorofilin İsimlendirilmesi	4
2.3.	Klorofillerin Bitkilerdeki Konumu	5
2.4.	Klorofillerin Fotosentezdeki Rolü	5
2.5.	Klorofil a ve b'nin Fiziksel Özellikleri	6
2.5.1.	Spektral Özellikleri	6
2.5.2.	Çözünürlükleri ve Asit, Baz Etkileşimleri	7
2.5.3.	Bazı yapısal özellikleri	9
2.6.	Klorofil Stabilizasyonu	10
2.6.1.	Klorofil a ve b'nin Degredasyon Kinetiği	10
2.6.2.	Stabilite Korunumuna İlişkin Çalışmalar	11
2.7.	Klorofil Analiz Yöntemleri	12
2.7.1.	Ekstraksiyon Yöntemleri	12
2.7.2.	Spektroskopik Yöntemler	13
2.7.2.1.	AOAC Yöntemi	14
2.7.3.	Kolon Kromatografisiyle Yapılmış Çalışmalar	14
2.7.4.	İnce Tabaka Kromatografisiyle (TLC) Yapılmış Çalışmalar	16
2.7.5.	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) Yapılmış Çalışmalar	16

2.8. Klorofilin Kullanım Alanları 16
2.8.1. Gıda Boyası Olarak Klorofil 17
2.9. Türev Spektroskopisi Hakkında Genel Bilgi 17
2.10. Türev Spektrumları 18
2.11. Kantitatif Analizler için Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi 19
2.12. Türev Spektrofotometrisinin Kullanımı 20
2.12.1. λ_{max} 'ın Kesin Olarak Belirlenmesi 20
2.12.2. Rezolüsyonda Artış 20
2.12.3. Spektral Farklılıkları Arttırmak 21
2.12.4. Saflık Kontrolü 22
2.12.5 Karışımların Simultane Analizi 22
2.12.6. Bulanık Çözeltilerin Kantitatif Analizi 22
2.13. Türev Spektrofotometrisinin Uygulamaları 23

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 24

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler 24
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 24
3.3. Standart Çözeltilerin hazırlanması 24
3.4. Yapılan Deneyler 25
3.4.1. Materyal tanıtımı 25
3.4.2. Çözücü seçimi ve ekstraksiyon 25
3.4.3. Klorofil a ve b'nin absorpsiyon spektrumlarının çizilmesi 26
3.4.3.1. Molar absorptivite katsayılarının hesaplanması 26
3.4.4. Türev spektrumlarının çizimi ve analizde kullanılacak dalga boylarının seçimi 26
3.4.4.1. Birinci derece türev absorbans değerleri ile çalışma eğrilerinin hazırlanması 27
3.4.5. Ispanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b miktarının tayini 27
3.4.5.1. Konvensiyonel spektrofotometrik yöntem ile 28
3.4.5.2. Birinci Türev spektrofotometrik yöntem ile 28

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR 29

4.1. Çözücü tayini sonuçları 29

4.2. Klorofil a ve b çözelti serilerinin absorpsiyon spektrumları 32

4.3. Birinci türev spektrofotometrik yönetemle simultane klorofil a ve b tayini 35

4.4. Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması 39

4.5. Analiz yönteminin gerçek örneklere uygulanması 42

4.5.1. Konvensiyonel spektrofotometrik yöntem sonuçları 43

4.5.2. Türev spektrofotometrik yöntem sonuçları 44

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 47

KAYNAKLAR 49

EKLER 53

ÖZGEÇMİŞ 61

ŞEKİL LİSTESİ Sayfa

Şekil 2.1.	Klorofil a ve b'nin yapısı	2
Şekil 2.2.a,b.	Klorofil ve türevlerine ait yapılar.	
a)	Klorofil a, Klorofil b, Piroklorofil a, Feofitin a, Metilfeoforbid	
b)	Bakteriyoklorofil	3
Şekil 2.3.a,b.	Klorofilin isimlendirilmesinin şematik olarak gösterimi	
a)	Fischer sistemi	
b)	IUPAC-IUB sistemi	5
Şekil 2.4.	Klorofil a ve b'ye ait absorpsiyon spektrumu	7
Şekil 2.5.	Aseptik olarak paketlenmiş ıspanak püresinde klorofil a ve b'ye ait degredasyon grafiği.	11
Şekil 2.6.	Türev Spektrumları	18
Şekil 2.7.	Orjinal spektrumun genliğinin 2. ve 4. türevlerdeki azalması	21
Şekil 2.8.	Orjinal spektrumda ve türev spektrumlarında üst üste çakışan piklerin görünümü	21
Şekil 4.9.	Klorofil a ve b'nin değişik çözücülerdeki absorpsiyon/zaman grafiği.	30
Şekil 4.10.	1g çimenin propanol+aseton(1:1) çözücü karışımı ile ekstraktının absorpsiyon spektrumu	31
Şekil 4.11.	1g ıspanağın propanol+aseton(1:1) çözücü karışımı ile ekstraktının absorpsiyon spektrumu	32
Şekil 4.12.	2,8x10-6, 5.6x10-6, 8.4x10-6, 11.2x10-6, 14x10-6, 16.8x10-6 M Klorofil a çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları.	34
Şekil 4.13.	$2.55x10^{-6}$, $5.1x10^{-6}$, $7.65x10^{-6}$, $10.12x10^{-6}$, $12.75x10^{-6}$, $15.3x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları.	35
Şekil 4.14.	$5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları	36
Şekil 4.15.	$5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 1.türev spektrumları	37
Şekil 4.16.	$2,8x10^{-6}$, $5.6x10^{-6}$, $8.4x10^{-6}$, $11.2x10^{-6}$, $14x10^{-6}$, $16.8x10^{-6}$ M Klorofil a çözeltilerinin 1.türev spektrumları	38
Şekil 4.17.	$2.55x10^{-6}$, $5.1x10^{-6}$, $7.65x10^{-6}$, $10.12x10^{-6}$, $12.75x10^{-6}$, $15.3x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 1.türev spektrumları	39
Şekil 4.18.	Klorofil a'nın çalışma eğrisi	41
Şekil 4.19.	Klorofil b'nin çalışma eğrisi	42
Şekil A.1.	Klorofil a için 431.5 nm'de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.	53
Şekil A.2.	Klorofil a için 646.9 nm'de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.	53
Şekil A.3.	Klorofil a için 663.2 nm'de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.	54

Şekil A.4. Klorofil b için 460.0 nm'deki absorpsiyon/konsantrasyon grafiği. 54
Şekil A.5. Klorofil b için 646.9 nm'deki absorpsiyon/konsantrasyon grafiği. 55
Şekil A.6. Klorofil b için 663.2 nm'deki absorpsiyon/konsantrasyon grafiği. 55
Şekil A.7. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 2.türev spektrumları 56
Şekil A.8. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 3.türev Spektrumları 57
Şekil A.9. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 4.türev Spektrumları 58
Şekil A.10. Klorofil a analizi için alınan 1.türev spektrumu. 59
Şekil A.11. Klorofil b analizi için alınan 1.türev spektrumu. 60

TABLO LİSTESİ Sayfa

Tablo 2.1.	Klorofil türevlerine ait yapılar	4
Tablo 2.2.	Klorofil ve türevlerinin farklı çözücülerdeki maksimum absorbansa sahip olduğu dalga boyları ve absorptivite değerleri	8
Tablo 2.3.	Klorofil ve türevlerine ait özellikler	10
Tablo 4.4.	Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: aseton-propanaol)	29
Tablo 4.5.	Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: aseton)	29
Tablo 4.6.	Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: propanaol)	29
Tablo 4.7.	Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: kloroform)	30
Tablo 4.8.	Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: etil alkol)	30
Tablo 4.9.	Absorbansın klorofil a konsantrasyonuna göre değişimi.	33
Tablo 4.10.	Absorbansın klorofil b konsantrasyonuna göre değişimi.	33
Tablo 4.11.	$^1D_{401.3}$ değerlerinin klorofil a konsantrasyonuna göre değişimi	40
Tablo 4.12.	$^1D_{474.0}$ değerlerinin klorofil b konsantrasyonuna göre değişimi.	40
Tablo 4.13.	1 g ıspanak ve 1 g çimenin 10'ar ml çözücü ile ekstraktlarındaki klorofil a ve b konsantrasyonları (N=4)	43
Tablo 4.14.	Ispanak ve çimende bulunan klorofil miktarları (mg/kg)	44
Tablo 4.15.	1 g ıspanak ve 1 g çimenin 10'ar ml çözücü ile ekstraktlarındaki klorofil a ve b konsantrasyonları (N=4)	44
Tablo 4.16.	Ispanak ve çimende bulunan klorofil miktarları (mg/kg)	45
Tablo 4.17.	Ispanak ekstraktında klorofil a tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması	45
Tablo 4.18.	Ispanak ekstraktında klorofil b tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması	45
Tablo 4.19.	Çimen ekstraktında klorofil a tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması	46
Tablo 4.20.	Çimen ekstraktında klorofil b tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması	46

ÖZET

Klorofil a ve b'nin türev spektrofotometrik yöntem ile tayini

Bu çalışmada klorofil a ve b'nin tayini için türev spektrofotometrik yöntem uygulandı. Klorofil a ve b analizi spektral çakışma nedeniyle doğrudan absorpsiyon ölçülerek yapılamaz. Türev spektrofotometrisi ise bu şekilde absorpsiyon spektrumu çakışan maddelerin kolaylıkla analizini sağlar.

Bu iki pigmentin türev spektrofotometrik analizi için en uygun çözücüyü saptayabilmek amacıyla, önemli klorofil a ve b kaynağı olan ıspanak ve çimen örnekleriyle çalışıldı. Bu örneklerin belli miktarları, belli miktar farklı çözücülerde ekstrakde edilerek, en yüksek absorbansı veren ve bu absorbans değerinin zamanla en az düştüğü çözücü seçilmeye çalışıldı. Kullanılan çözücüler, aseton, propanol, aseton+propanol (1:1) çözücü karışımı, etil alkol ve kloroformdu. Bunlardan en uygun olanının aseton+propanol (1:1) çözücü karışımı olduğu saptandı.

Daha sonra hazırlanan klorofil a ve b çözeltilerinin üst üste 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları alındı. 1. türev spektrumunda 401.3 nm'nin klorofil a ölçümü için, 474.0 nm'nin de klorofil b ölçümü için en uygun nokta olduğu saptandı. Kalibrasyon grafikleri, klorofil a için $5.6x10^{-6}$-$14x10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin 401.3 nm'de, klorofil b için $5.1x10^{-6}$-$20.4x10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin 474.0 nm'de türev absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasında oluşturuldu. Bu doğrulara ait regresyon eşitlikleri;

$^{1}D_{401.3} = 1.3808c - 0.635$ (klorofil a)

$^{1}D_{474.0} = 0.31 - 3.4029c$ (klorofil b)

Ispanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b analizi, aseton+propanol (1:1) çözücü karışımı ile ekstraksiyon, süzme, uygun seyreltme ve türev absorbanslarının ilgili dalga boylarında ölçümü ile gerçekleştirildi. Ekstraktlardaki klorofil a ve b miktarı, ilgili kalibrasyon grafikleri denklemlerinde yararlanılarak hesaplandı. Ispanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b analizi için başka bir yöntem olarak klorofil a ve b'nin belli dalga boylarındaki molar absorptivite katsayılarından yararlanıldı. Her iki yöntemle yapılan 4'er analiz üzerinden ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmeler, her iki yöntemde ortalamalar ve prezisyonlar açısından anlamlı fark olmadığını gösterdi.

SUMMARY

Chlorophyll a and b analysis by derivative spectrophometric method

In this study, chlorophyll a and b pigments were assayed by derivative UV spectrophotometry without using any seperation techniques.

The simulteneous determination of these pigments mixture is not possible by direct UV absorption measurement because of the spectral overlap. Derivative spectrophotometry allows the quantitative analysis of such mixture.

For the selection of the optimum solvent, spinach and grass that are source of chlorophyll a and b, were used. Certain quantities of these samples dissolved in certain quantities of different solvents and the solvent which gives the highest absorbance is selected. The selected solvent's absorbance value is desired to vary a litte in the course of time. Aceton-propanol (1:1) solvent mixture were selected as the most suitable solvent for the analysis of chlorophyll a and b.

For the chlorophyll a and b mixture zero-crossing wavelengths of 401.3 nm in the first derivative spectrum was chosen as the optimal wavelength for the determination of chlorophyll a, and zero-crossing wavelengths of 474.0 nm in the first derivative spectrum was chosen as the optimal wavelength for the determination of chlorophyll b respectively. Calibration curves were constructed by plotting derivative absorbance values measured at selected zero-crossing wavelengths against corresponding concentration of standart chlorophyll a and b solution in 5.6 $x10^{-6}$-$14x10^{-6}$ M range for chlorophyll a and $5.1x10^{-6}$-20.4 $x10^{-6}$ M range for chlorophyll b. Regression equation of the calibration curves were as follows;

$^{1}D_{401.3} = 1.3808c - 0.635$ (chlorophyll a)

$^{1}D_{474.0} = 0.31 - 3.4029c$ (chlorophyll b)

Chlorophyll a and b analysis in the spinach and grass samples were made by extracting of these samples with aceton-propanol (1:1) solvent mixture, filtration, appropriate dilution and measurement of derivative absorbances at corresponding zero-crossing wavelengths. Chlorophyll a and b contens of extracts were calculated using the corresponding calibration curves. Another method is also used to analyse chlorophyll a and b in the spinach and grass samples which uses coefficient of molar extinction at certain wavelenghts. Mean values and standart deviations were calculated from four determinations for both methods. The statistical evaluations indicated that there was no significant difference between the mean values and precisions of two methods for mixtures at 95 % confidance level.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klorofil yeşil bitkilerde bulunan, fotosentez prosesi için gerekli olan pigmentler karışımı olup, bitkilerin hücre duvarlarındaki kloroplastın içinde yer alır. Doğal klorofil mavi-yeşil renkli klorofil a ve sarı-yeşil renkli klorofil b olmak üzere başlıca iki komponentten oluşur.

Klorofil bileşikleri pigment olarak sanayide birçok alanda kullanılmaktadır. Sabun, mum, mürekkep ve reçinelerin renklendirme işlemlerinde, koku absorpsiyon özelliğinden dolayı diş hekimliği ve tıp alanında ağız kokusu giderici tablet yapımında, kandaki eritrosit oluşumunu arttırması nedeniyle anemiye karşı yapılan ilaçlarda, gıda sanayinde boyar madde ve tatlandırıcı olarak kullanım alanları vardır. Aynı zamanda çevre kirliliğinin belirlenmesinde de indikatör olarak davrandıklarından analizleri büyük önem taşır. Bu kadar geniş çalışma alanı olan klorofilde bulunan pigmentlerin türünü ve miktarını belirlemek önemlidir.

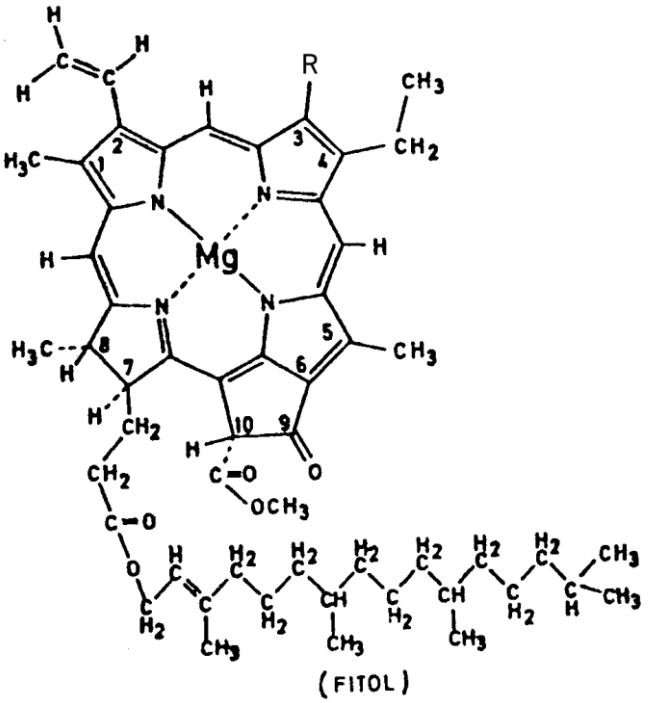
Çalışmamızda klasik absorpsiyon spektrumlarının yerine türev spektrumları kullanılmıştır. Türev spektrofotometrisinin oldukça yaygın kullanım alanı, absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple konvansiyonel absorpsiyon spektrofotometrisi ile bir ön ayırma yapmaksızın tayin edilemeyen karışımların analizidir

Klorofil a ve b'nin UV absorpsiyon spektrumları alındığında bu iki pigmentin absorpsiyon spektrumlarının çakıştığı görülmektedir. Bu sebeple, bu çalışmada, klorofil a ve b'nin bir ayırma yöntemi kullanılmadan analizi için bir yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemle ıspanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b miktarının bulunması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Klorofil ve Türevleri

Klorofiller, bitkilerin, alglerin ve bazı fotosentetik bakterilerin fotosentezinde görev alan başlıca pigmentlerdir (Agostiano ve ark.1996). Bitkilerin genellikle yaprak ve gövdelerinde bulunarak onlara yeşil renk verirler. Klorofil, porfirin halkası ve fitol grubu olmak üzere iki temel parçadan oluşur (Streitweiser ve Heathcock, 1981). Porfirin halkası, dört nitrojen atomunun Mg merkez metal atomuna sıkıca bağlanmasıyla oluşmuş kare düzlem yapıda bir liganttır (Şekil 2.1.).



Klorofil a, R=CH_3
Klorofil b, R=CHO

Şekil 2.1. Klorofil a ve b

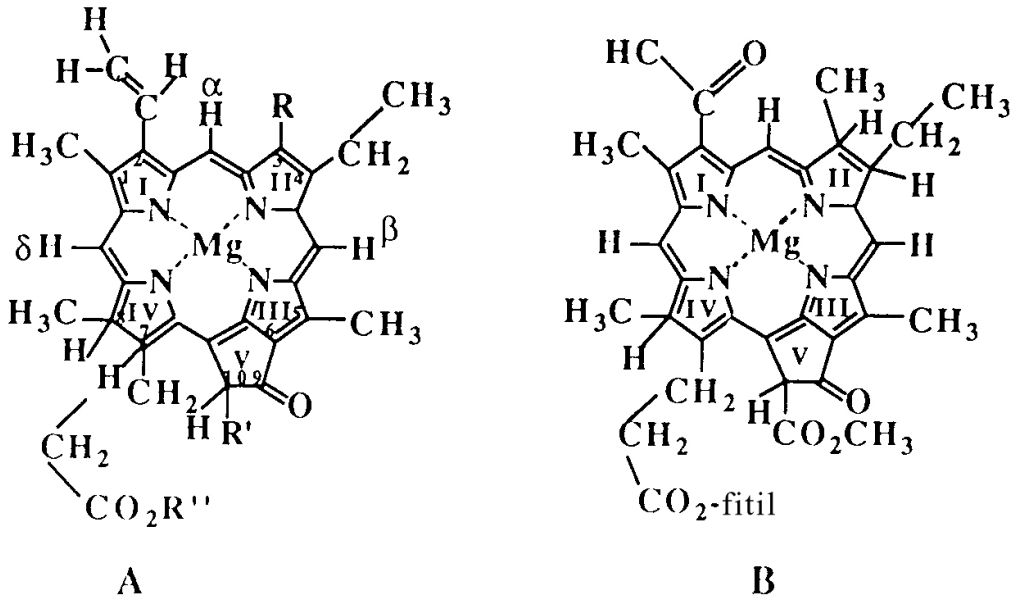
Önceleri klorofilin tek bir bileşen olduğu düşünülmüş, fakat daha sonra spektroskopik yöntemle klorofilin bir karışım olduğunu saptamıştır. Günümüzde klorofilin bilinen pek çok türevi olup bunlardan en önemlileri klorofil a ve b'dir.

Doğal klorofilde klorofil a:b oranı 3:1 şeklindedir. Fakat bu oran bitkinin türüne, yetiştirildiği toprağın cinsine, hasat zamanına göre değişebilir (Steer).

Klorofil a, 1, 3, 5, ve 8 pozisyonlarında metil bileşenleri 2 pozisyonunda vinil, 4 pozisyonunda etil, 7 pozisyonunda fitil alkolün propiyonat esteri, 9 pozisyonunda keto formu ve 10 pozisyonunda karbometoksil grubunun bağlanmasıyla oluşmuştur.

Klorofil b, Klorofil a ile aynı konfigürasyonda olup 3 pozisyonunda metil yerine formil grubu bulunmaktadır.

Klorofil ve bazı türevlerine ait yapılar Şekil 2.2 a,b'de görülmektedir (Kendrick, 1992).



Şekil 2.2.a, b. Klorofil ve türevlerine ait yapılar

Tablo 2.1. Klorofil türevlerine ait yapılar

	Yapı	R	R’	R’’	Mg^{2+}
Klorofil a	A	CH_3-	-$COCH_3$	fitil	+
Klorofil b	A	-CHO	-$COCH_3$	fitil	+
Piroklorofil a	A	CH_3-	-H	fitil	+
Feofitin a	A	CH_3-	-$COCH_3$	fitil	-
Metilfeoforbid	A	CH_3-	-$COCH_3$	-CH_3	-
Bakteriyoklorofil	B				

Fitil=$CH_2CHC(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH(CH_3)CH_3$

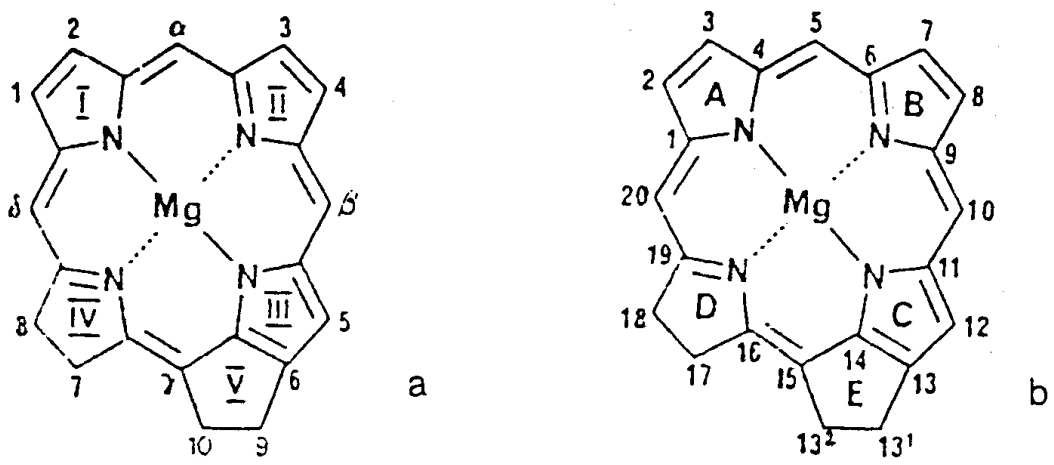
2.2. Klorofilin isimlendirilmesi

Klorofil kimyasında başlıca iki tip isimlendirme kullanılmıştır:

1. Fischer isimlendirmesi (Eski)
2. IUPAC-IUB Birleşmiş Komitesinin İsimlendirmesi (Yeni ve tavsiye edilen) (Şekil 2.3.a,b).

IUPAC-IUB Komitesi ilk olarak Fischer tarafından pirollerin dış karbonlarının Romen rakamıyla veya metin köprü karbonlarının Yunan rakamlarıyla isimlendirildiği karışık sistem yerine, her bir karbon atomunun tek tek numaralandırıldığı bir adlandırma sistemi oluşturmuştur. Öncelikle I, II, III şeklinde numaralandırılan pirol halkalarına A, B, C, D harfleri verilmiş ve 5. siklopentanon halkası E ismini almış, 9. ve 10. pozisyonlar 13^1 ve 13^2 şeklinde gösterilmiştir. İndirgenme reaksiyonları D halkası üzerinde gerçekleşmektedir ve klorofil a, ‘17, 18 dihidroporfirin’ olarak adlandırılır. Bütün doğal klorofillerde E halkası ve ortada Mg atomu mevcuttur (Hendry ve Houghton, 1992).

Klorofillerin isimlendirilmesinin şematik olarak gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 2.3.a,b).



Şekil 2.3.a,b. Klorofilin isimlendirilmesinin şematik olarak gösterimi
(Hendry ve Houghton, 1992)

a) Fischer Sistemi
b) IUPAC-IUB Sistemi

2.3. Klorofillerin Bitkideki Konumu

Klorofilleri içinde barındıran kloroplastlar, bitki ve ökaryotik alglerin fotosentetik organlarıdır. Genellikle çok tabanlı membran sistemli, fotosentetik elektron taşıma ve enerji dönüşümü kapasitesine sahip bir çift zarla (iç ve dış) kaplı, yeşil renkli, mikroskopla görünebilen yapılardır (Hinterstisser,1988). Çift zarlarının içinde ribozomların bulunduğu stromalar yer alır. Stromalar içinde de 0.01-0.02 µm genişliğindeki lamellerden oluşan 0.2-2 µm çaplı granalar (granum) bulunur. Her bir granum tilakoid denilen yassı keseciklerde oluşmuş olup, yakın granalar birbirine tilakoid zarlarıyla bağlanmıştır. Tilakoidlerde pekçok enzim, kofaktör ve fotosentezin ışık reaksiyonlarında gerekli olan pigmentler yerleşmiş durumdadır. Fotosentezin ışığa bağlı reaksiyonlarında kullanılan enzimler ise stromadadırlar (Hopson ve Wessels, 1990).

2.4. Klorofillerin Fotosentezdeki Rolü

Klorofilin en önemli görevlerinden biri fotosentez sırasında güneş enerjisinin kimyasal enerjiye dönüşümünü sağlamalarıdır. Klorofil a ve b tekli ve çiftli bağ

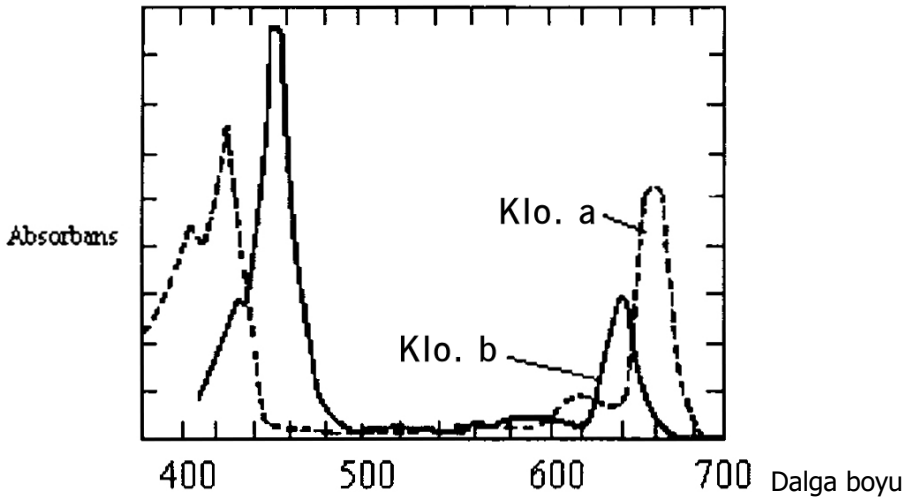
örgüleri içerdiklerinden çok etkili fotoreseptörlerdir. Orbitaller delokolize olarak yapının kararlılığını arttırırlar. Böyle delokalize olmuş polienler görünür bölgede kuvvetli absorpsiyon yaptıklarından güneş enerjisinin absorplanmasını sağlarlar. Fotosentez prosesinde güneş enerjisi klorofil tarafından absorplanarak, CO_2 ve sudan, karbohidrat ve O_2 sentezi için kullanılır (Steer, Streitweiser ve Heathcock, 1981)

Fotonlar halinde gelen ışının enerjisinin, granum tilakoid membranlarına yerleşmiş olan pigmentlerden biri tarafından absorplaması sonucu elektron konfigürasyonu değişir ve molekül fazla enerjisini çarpışma ile komşu pigmentlere, en son olarak da klorofile aktarır. Işık enerjisinin klorofile doğru yol almasının nedeni, sistemdeki tüm pigmentlerin, yüklendikleri ışık enerjisi nedeniyle klorofilden daha yüksek enerjiye sahip olmalarıdır. Klorofilde yakalanan enerji, oksidasyon-redüksüyon reaksiyonlarıyla kimyasal enerjiye dönüşür ve suyu parçalar. Işığa dayalı olarak gerçekleşen bu bölümde enerji fotofosforilasyonla, koenzim olan elektron taşıyıcıları ATP ve NADP'ler halinde tutulur. Fotosentezin ışığa bağlı olmayan ikinci bölümünde de CO_2 yüksek enerjili ATP ve NADP'nin yardımıyla korbohidrata indirgenir (Hopson ve Wessels, 1990).

2.5. Klorofil a ve b'nin Fiziksel Özellikleri

2.5.1. Spektral Özellikleri

Klorofil a ve b'de bulunan farklı gruplar, absorpsiyon spektrumlarını bir parça farklılaştırır. Işık bazı dalga boylarında klorofil a tarafından tam olarak absorplanamaz, bunun yerine bu dalga boyunda ışığı daha kuvvetli şekilde absorplayan klorofil b tarafından kapılır. Böylece güneş ışığı absorplamada iki klorofil birbirini tamamlamış olur. Bitkiler enerji ihtiyaçlarının tamamını spektrumun mavi ve kırmızı bölgesinden karşılarlar. Bununla birlikte şekil 2.4.'de de görüldüğü gibi spektrumun 500-600 nm arasındaki geniş spektral bölgesinde çok az ışın absorpsiyonu yapılır. Işının çoğu yansıtılır. Bu bölge spektrumun yeşil bölgesi olduğu için bitkiler yeşil görünür.



Şekil 2.4. Klorofil a ve b'ye ait absorpsiyon spektrumu.

Daha az şiddetli diğer renkler maskelenir. Bu renklerden bazıları, sonbaharda klorofil yapısı bozunduğu zaman açığa çıkar ve yeşil yapraklar kırmızıya, kavuniçine veya sarıya döner. Klorofil sebzeler pişirildiği zaman da bozunarak rengini kaybeder, çünkü merkezindeki Mg atomunun yerini hidrojen iyonu alır. Bu olay molekülün absorpsiyon spektrumunu değiştirdiği için, moleküldeki enerji seviyesini etkiler. Bundan dolayı, pişirilen sebzeler genellikle sarımsı yeşile döner (Streitweiser ve Heathcock, 1981).

2.5.2. Çözünürlükleri ve Asit, Baz Etkileşimleri

Klorofil a; alkoller, eter, benzen ve asetonda çözünür. Saf haldeyken petrol eterinde çok az çözünür, suda hiç çözünmez. Klorofil b ise alkolde, eterde, aseton ve benzende çözünür, saf haldeyken petrol eterinde çok çok az çözünür, suda hiç çözünmez.

Pekçok araştırmacı, saf pigment veya pigment karışımlarının konsantrasyonlarını hesaplayabilmek veya parçalanma kinetiklerini incelemek amacıyla klorofil ve türevlerinin farklı çözücüler içinde maksimum absorbans değeri verdikleri dalga boylarını saptamışlardır. Bunlardan klorofil a ve b'ye ait olanlar Tablo 2.2'de verilmiştir.

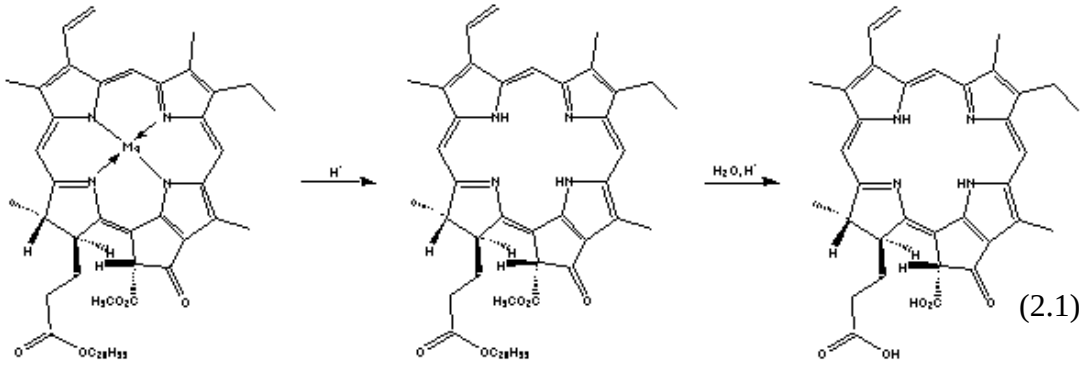
Tablo 2.2. Klorofil ve türevlerinin farklı çözücülerdeki maksimum absorbansa sahip olduğu dalga boyları ve absorptivite değerleri

Klorofiller ve türevleri	Çözgen Çeşitleri	Kaynaklar	Klorofil ve türevlerinin Görünür Bölgedeki Ana Spektral Bantları					
			I	II	III	IV	V	Soretbant
Klorofil a	%80 Aseton	1	665 (*90.8*)					
	%90 Aseton	1	664 (*91.1*)					
	%100Aseton	1,2,3	663(*92.6*)(82.6),662	616				430, 428
	Dietil eter	4,5,6	660 (91.1)	614	576	530	497	428
		7	660	613	573	(532)	494	428
		6	662(90.2)661(91.1)					
		8	660.4 (90.3)	642				
	Petrol eteri	9	661.5	615	577	532	498	429
	P.eterde%5n-propanol	4	661.5	616	578	530	497	429.5
	Etanol	2	665 (74.4)			534		432
Klorofil a’	Dietil Eter	4	661	614	575	532	499	428
		7	660	613	574	533	494	427.5
Klorofil b	%100 Aseton	3	664, 645 (46.9)		596			454, 455
	Dietil Eter	4	642.5, 642	595				452.5
		8	642 (59)	594				451
		6	642.5 (58.5) (52.2)					
	Etanol	2	649 (40)					464
Klorofilb’	Dietil Eter	4	642	592				454.5

Not: Belirli dalga boylarındaki molar absorptivite değerleri (1/mM. cm^{-1}) ait oldukları dalga boylarına (nm) birlikte parantez içinde verilmişlerdir, italik yazı ile yazılanlar ise (L/g.cm^{-1}) cinsinden verilmiştir.

1 Vernon, 1960
2 Hoff ve Amesz, 1991
3 Minquez-Moosquare ve ark., 1991
4 Hynninen, P. H., 1973a
5 Strain ve ark., 1963
6 Clydesdale ve Francis, 1976
7 Hynninen, 1979
8 Gibbs ve ark.,1977
9 Hynninen ve Elfolk, 1973b

Klorofil a’nın asit ile muamelesi sonucu Mg iyonu yerine iki tane hidrojen atomu gelerek feofitin a oluşur. Bunun hidrolizi sonucunda da fitil grubu ayrılarak feoporbid a oluşur. Bu reaksiyon mekanizması 2.1.’ de görülmektedir.

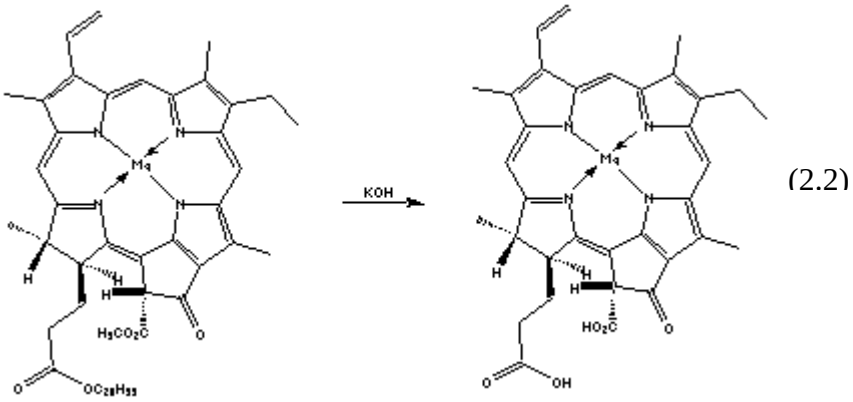


(2.1)

Klorofil a Feofitin a Feoforbid a

*Klorofil a'nın asit ile muamelesi sonucu feofitin a oluşumu ve bunun hidrolizi sonucunda feoporbid a oluşumu reaksiyon mekanizması.

Klorofil a bir bazla da muamele edildiğinde filin serisi ve Mg-porfirin bileşiği verir. Filinlerin asit ile muamelesinde porfirin oluşur. Klorofil a'nın KOH ile verdiği reaksiyonun mekanizması 2. 2.'de görülmektedir.



(2.2)

Klorofil a Klorofilin a

*Klorofil a'nın KOH ile reaksiyon mekanizması (Steer).

2.5.3. Bazı yapısal özellikleri

Klorofil ve türevleri yapılarına göre farklı renklere sahiptir. Klorofil ve bazı türevlerinin kimyasal formülleri, molekül ağırlıkları ve sahip oldukları renkler tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Klorofil ve türevlerine ait özellikler

Klorofil ve Türevleri		Kimyasal Formül	Molekül Ağırlığı	Renkler	Kaynaklar
Klorofil	A	$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$	893.5	Mavi-yeşil	1, 2
	B	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	907.4	Sarı-yeşil	
	A’	$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$	893.5	Mavi-yeşil	
	B’	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	907.4	Sarı-yeşil	
Feofitin	A	$C_{55}H_{74}O_5N_4$	871.2	Gri-kahve	
	B	$C_{55}H_{72}O_6N_4$	885.2	Kahve-yeşil	
	A’	$C_{55}H_{74}O_5N_4$	871.2	Kahve-gri	
	B’	$C_{55}H_{72}O_6N_4$	885.2	Sarı-kahve	
Klorofilid	A	$C_{35}H_{34}O_5N_4Mg$	614.3	Mavi-yeşil	
	B	$C_{35}H_{32}O_6N_4Mg$	628.2	Sarı-yeşil	
Feoforbid	A	$C_{35}H_{34}O_5N_4$	529.1	Gri	3, 4
	B	$C_{35}H_{32}O_6N_4$	606.1	Kahve-yeşil	
Pirofeofitin	A	$C_{35}H_{69}O_3N_4$	812.5	Gri	
	B	$C_{53}H_{67}O_5N_4$	826.3	Kahve-yeşil	

1 Anon, 1991;2 Watanabe ve ark., 1984;3 Breeman ve ark., 1991;4 Minquez-Mosquera ve ark.,1989

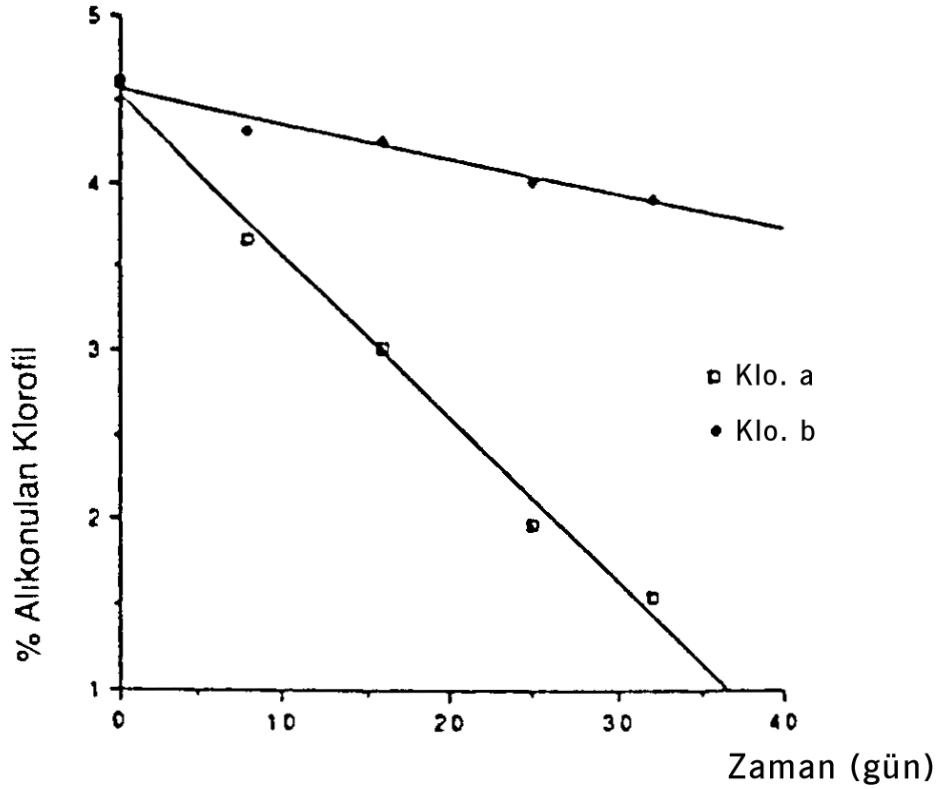
2.6. Klorofil Stabilizasyonu

2.6.1. Klorofilin Degradasyon Kinetiği

Çok kolay parçalanabilen bir yapıya sahip olan klorofilin feofitine dönüşüm kinetiğine ilişkin çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Klorofilin feofitine parçalanma kinetiği, asit ve klorofil konsantrasyonlarına bağlı olarak 1. dereceden reaksiyondur. Klorofil a ve b’ye ait degredasyon grafiği Şekil 2.5’de verilmiştir.

Klorofil a’nın parçalanma hızının klorofil b’ye göre 2.5 kat fazla olduğu bulunmuştur. Fakat kaynaklarda 2-10 kat olarak değişen bilgiler verilmektedir (Schwartz ve Lorenzo, 1990).

Canjura ve ark. tarafından ıspanak püresinde klorofil a ve b için 100-145 ^{0}C’ta 2-25 dk. arasında değişen sürelerde ısıl parçalanma gözlenmiştir. Aktivasyon enerjileri klorofil a için 15 kcal/mol, b için 22 kcal/mol ‘dür (Canjura ve ark. 1991b).



Şekil 2.5. Aseptik olarak paketlenmiş ıspanak püresi klorofil a ve b'ye ait degredasyon grafiği (142 ^{0}C, 19.2 sn ısıl işlem, -4 ^{0}C'da depolama) (Schwartz ve Lorenzo, 1991).

Schwartz ve von Elbe (1983) ise 240 ve 260 ^{0}C arasında konserve edilen ıspanak püresinde klorofilin aktivasyon enerjisini belirledikleri bir çalışmada, klorofil a için aktivasyon enerjisini 25.2 kcal/mol ve b için 22.5 kcal/mol bulmuşlardır. Sonuçların farklılığı araştırmacıların farklı çalışma şartlarından kaynaklanmaktadır.

2.6.2. Stabilite Korunumuna İlişkin Çalışmalar

Önceden yapılan çalışmalar göstermiştir ki; konserve yapımı sırasında, stabiliteyi sağlamak için uygulanan yüksek sıcaklık uygulamaları sonucu klorofil, feofitin ve pirofeofitinlere dönüşerek yeşil rengini kaybeder. Bu reaksiyon yeşil sebzelerin pişirilmesi sırasında da gerçekleşir. Klorofilin parlak yeşil renginin tüketici tarafından feofitin ve pirofeofitinin kahverengi rengine göre daha fazla rağbet duyulmasından dolayı bu reaksiyonun mekanizması üzerinde çok fazla çalışmalar yapılmıştır. Gıdanın işleme ve depolanması sırasında yeşil rengin korunumunda en önemli sonuç pH düzenlenmesiyle elde edilmiştir (Schwartz ve Lorenzo, 1991).

Clydesdale ve Francis (1968, 1976) yaptıkları çalışmada klorofilidlerin klorofillere göre daha stabil olduklarını varsaymışlar ve klorofillerin klorofilidlere dönüşümünü sağlamaya çalışmışlardır. Çalışmada ıspanak püresinde klorofilidlerin kısmen stabil oldukları görülmüş fakat renk stabilizasyonu sağlayacak kadar klorofilid elde edilememiştir. Bunların yaptığı diğer bir çalışmada ise ıspanak püresine Triton X-100 veya digitonin gibi yüzey aktif maddeler konularak klorofilin kloroplast içinde bağlı olduğu lipoproteinlerden ayrılması sağlanarak, bozunması geciktirilmiştir. Bu uygulama 100 ^{0}C üzerinde etkili olamamıştır.

Amonyum bileşenlerinin dondurulmuş yeşil sebzelerde feofitin oluşumunu geciktirdiği bulunmuştur. Dondurulmuş brokolinin amonyum hidroksit ile mikrodalgada haşlanılmasında klorofilin alıkonduğu görülmüş, ayrıca dondurulmuş yeşil sebzelerin amonyum bikarbonat ile haşlanmasında klorofil alıkonmasının %27 arttığı gözlenmiştir. (Eskin, 1979).

Yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılacağı gibi işlenmiş gıdalarda parlak yeşil rengin korunumunu sağlayabilecek bir metot henüz bulunmamıştır, ancak çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde renk korunumuyla ilgili dikkat edilecek en önemli unsurlar; yüksek kalitede hammadde kullanımı, uygun depolama koşullarının sağlanması ve uygun işleme metodunun seçilmesidir (Clydesdale ve Francis , 1976).

2.7. Klorofil Analiz Yöntemleri

2.7.1. Ekstraksiyon Teknikleri

Klorofiller ticari olarak çimen, ıspanak, yonca, ısırgan otu gibi yeşil bitkilerden elde edilmektedir. Klorofilin ekstrakde edilmeden önce bitkinin öğütme veya karıştırma ile homojenize edilmesi gerekir. Öğütme havanda kuartz kum ile yapılırsa daha başarılı olur. Bazı bitkiler öğütülmeden önce kaynatılıp ardından buzlu suya daldırılarak ekstrakde edilebilirlikleri arttırılır.

Klorofillerin ekstraksiyonu için etanol, metanol, aseton, propanol, aseton-metanol, etilasetat-heksan, etanol-petrol eteri, metanol-petrol eteri diklormetan gibi çözücüler kullanılabilir. Alifatik ve aromatik hidrokarbonlar klorofili ekstrakde edemezler.

Kloroplasttaki pekçok klorofil protein ve karbohidratlara bağlı olduğundan klorofili bunlardan ayırabilecek çözücülerin kullanılması gerekmektedir (Schwartz ve Lorenzo, 1990).

2.7.2. Spektroskopik Yöntemler

Klorofil pigmentlerinin spektrofotometrik yolla miktar tespitine ilişkin çalışmalar, 1940'lı yıllarda başlamıştır.

Sağlıklı bitki dokularında birçok durumda sadece ana pigmentlerin (klorofil a ve b) olduğu, diğer klorofil türlerinin az bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu durum göz önüne alınarak önerilen yöntemlerde, fotometre kullanılarak, lineer eşitlikler geliştirilmiştir (Küpper ve Spiller, 2000).

Çeşitli çözücülerle, ekstrakde edilen klorofillerin tayini amacıyla pekçok denklem geliştirilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda denklem oluşturmak için, belirli çözücü içerisinde çözülmüş pigmentlerin maksimum dalga boylarındaki absorpsiyon katsayılarından faydalanılmıştır (Laval-Martin, 1985).

Herhangi bir çözücü için hazırlanmış denklem başka çözücü ekstraktı içinde kullanılabilmekte, burada her iki çözücü içindeki ekstrakların spektrumları alınarak, ana bantlardaki absorbansları oranlanır ve bulunan katsayı denklemdeki faktörlerle çarpılarak yeni bir faktör bulunabilmektedir (Martin ve Sweeney, 1958).

Van Norman'ın 1957 yılında yaptığı çalışmada, klorofil a:b oranının, absorptivite katsayılarını etkilediğini bulmuş, Vernon ise 1960'da ilk kez klorofil a:b oranından bağımsız denklemler oluşturmayı başarmıştır. Yöntem yüksek oranlarda feofitinizasyona uğramış ekstraklarda bile ölçüme imkan tanımıştır (Vernon, 1960). Klorofil a:b oranı bitkilerin tamamen yeşil yapraklarında kararlı olmasına rağmen, bitkilerin fizyolojik durumuna bağlı olarak çok değişir. Oran genellikle spektrofotometrik ölçümlerle belirlenebilir, fakat oranın 5/8'in üzerinde olduğu durumlarda standart yöntemler hatalı olur. Bu problemin üstesinden gelebilmek için Ogawa-Shibata (1965), yüksek klorofil a:b oranlarının belirlenmesinde özel klorofil-b-oksim spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Ayrıca yüksek klorofil a:b oranlı örnekler standart spektrofotometrik yöntemlere nazaran daha duyarlı olan spektroflurometrik yöntemlerle daha iyi incelenir (Kouril ve Naus 1999).

Ölçümlerde en yüksek absorbans değerine ulaşabilmek için taze ekstrakt kullanımı çok önemlidir. Ayrıca absorbans ölçümleri ekstraksiyon sırasında pigmentlerin değişime uğramasından veya çözücüdeki bulanıklıktan da etkilenmektedir. Vernon bulanıklık problemini pigmentleri asetondan etere transfer etmekle önlemiştir. Yine klorofilin eterdeki çözeltisinin ölçüldüğü bir yöntem, AOAC tarafından önerilmektedir (Anon, 1990a).

AOAC yönteminde taze ekstraktın ölçümü eterde yapılırken, Vernon yönteminde ekstrakt oksalik asit muamelesiyle feofitinizasyon gerçekleştirilmiş ve belirli dalga boylarında asitlendirme ile oluşan farklar ele alınmıştır. Asitlendirme ile yapılan ölçüm yönteminde çeşitli nedenlerle kullanılan asidin tüm klorofilleri feofitinize edememesi durumunda hatalı sonuçlar alınabilmektedir. AOAC yönteminde ise öncelikle yeşil bitkilerde klorofil tayininde standart yöntem olması ve yüksek tekrar edilebilirliği nedeniyle tercih edilmektedir.

2.7.2.1. AOAC Yöntemi

Yeşil yapraklı taze sebzelerde klorofil miktarının tespiti klorofilin %85'lik aseton ile ekstraksiyonundan sonra, ayırma hunisinde asetonun su ile yıkanmasıyla eter içerisine alınan pigmentlerin renk intensitesinin spektrofotometrede ölçümü prensibine dayanmaktadır.

Klorofil miktarı, ölçümü yapılan dalga boylarındaki absorbans değerlerinin aşağıdaki denklemlere yerleştirilmesiyle mg/L cinsinden hesaplanır.

$$\text{Toplam klorofil} = 7.12\ A_{660} + 16.8\ A_{642.5} \quad (2.3.)$$

$$\text{Klorofil a} = 9.93\ A_{660} - 0.777\ A_{642.5} \quad (2.4.)$$

$$\text{Klorofil b} = 17.6\ A_{642.5} - 2.81\ A_{660} \quad (2.5.)$$

2.7.3. Kolon Kromatografisi ile Yapılmış Çalışmalar

Klorofil analizi için uygulanan en eski yöntem olarak Tswett'in şeker kolonunda klorofiller ile karotenoidleri ayırdığı çalışma bilinmektedir. Günümüzde şeker kolonu 1-10 mg'a kadar klorofilin a ve b türlerine ayrılmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan adsorbantların pigmentler ve çözücülerle reaksiyona

girmemeleri gerekir. Uygun adsorbantlar; nişasta, selüloz, toz veya pudra şekeri, insülin, polietilen, silika, kalsiyum fosfat ve aluminadır (Schwartz ve Lorenzo, 1990).

Toz şeker ve yıkama çözücüsü olarak kloroformun kullanıldığı Sephadex LH 20 kolonu ile yapılan çalışmalarda pigment karışımı genellikle (dietileter:heksan) (1:9) (Iriyama ve ark.,1980) (dietileter: petrol eteri) (son konsantrasyon 10:90) gibi çözücü karışımlarında veya peroksitsiz dietileterde çözülmektedir. Toplanan eluatların spektrofotometrede uygun dalga boylarında taranmalarıyla madde tanınması yapılır. Bu kolonda klorofil a, b ve karotenler birbirinden başarıyla ayrılabilmişlerdir (Iriyama ve Yoshiura, 1979b).

Adsorbans olarak pudra şekerinin kullanıldığı ayırımlarda nem, şekerin kolonda düzgün dağılımını önleyeceği için pudra şekerinin +80 ^{0}C'da 1 saat kurutulması, ayrıca kullanımdan önce %3'den %10'a varan miktarlarda nişasta katılımı önerilmektedir (Hynninen, 1977)

2.7.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Yapılmış Çalışmalar

TLC yöntemi klorofil ve türevlerinin ayırımında kullanılan ucuz ve yaygın bir yöntemdir. Adsorbant olarak silikajel, silikatla, selüloz, şeker ve oktadesil bağlı silikajel kullanılabilir. Bu yöntemin getirdiği dezavantajlar ise; ışık oksidasyonu, silikanın asitliği, kullanılan kurutma metotları, çözücü tipi gibi etkilerin bir veya birkaçının biraraya gelerek klorofilin parçalanmasına neden olmasıdır.

Hazır silikajel plakalara eterde çözülmüş örneklerin enjekte edilip, tersiyer bütilalkol:pentan karışımında ilerletildiği çalışmalarda vardır. Bu çalışmada klorofil a, b, neosaktin, violaksantin, lutein, zeaksantin, ksantofillerin ayırımı başarıyla sağlanmıştır. Başka bir çalışmada ise klorofil ve türevlerinin ayırımı için silikajel tabakaları üzerine benzende çözülmüş örnekler enjekte edilip, azot gazı altında kurutulmuş ve UV ışık altında (365nm'de) kontrol edilmiştir (Iriyama ve ark., 1980).

1991 yılında 1:20 oranında kloroformda çözülmüş pigment karışımının (heksan:kloroform:etanol) (50:45:5) oranında hazırlanmış çözücü karışımında ilerletilmesiyle klorofil a, b, feofitin a, b, ayrıca karoten ve ksantofillerin ayırımı sağlanabilmiştir. Ayrıca pigment renkleri de belirtilmiştir (Anon 1990b).

2.7.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Yapılmış Çalışmalar

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sağladığı ayırım gücü, kolaylığı nedeniyle son yıllarda klorofille ilgili yapılan çalışmaların büyük bölümünde kullanılmaktadır. Gerek normal, gerekse ters fazın kullanıldığı sistemlerde çalışabilmek mümkün olup, ters faz daha çok tercih edilmektedir. Ters fazda elüsyon sırası klorofil b, a ve feofitinler şeklindedir. Normal fazda ise bu sıranın tam tersi söz konusudur. Klorofil türevlerinde 658 nm'de, kırmızı bölgede çalışılması klorofillerin karotenler ve ksantofiller ile çakışmasını önlemektedir (Macrae, 1988)

Canjura ve Schwartz (1991a) yılında gradient sistemi ile farklı oranlarda (etil asetat:metanol:su) karışımını kullandıkları yöntemde klorofil, klorofilid ve feoforbidleri ayırmışlardır.

Bir başka çalışmada ise hem ters faz, hem de normal faz kolonda ıspanaktaki klorofil, izomerleri, feofitin ve pirofeofitinlerin yanısıra klorofilid ve feoforbidlerin de hızlı ve duyarlı bir metotla ayırımı gerçekleştirilmiştir. Normal faz ile yapılan denemelerde silika kolonda (heksan:2-propanol) çözücüsü, gradient sistemde A (metanol:su) (98.3:17) ve B (etil asetat:su) (75:25) çözücü karışımı kullanılmıştır. Ters faz ayırımında ise oktadesil C_{18} kolonda (etil asetat:metanol:su) çözücü karışımı kullanılmıştır. Ters fazda ayırım işleminde apolar olan klorofillerinde ayırımı sağlanmıştır ve aseton/su ile ekstraksiyonu mümkündür. Oysa normal fazda, alıkonma sürelerinin değişmesine neden olan suyun uzaklaştırılması için asetonla ekstrakde edilen tüm polar klorofillerin heksan fazına geçirilmesi işlemi güçlük yaratmaktadır. Bu da kantitatif çalışmayı güçleştirmektedir (Canjura ve Schwartz, 1991a).

2.8. Klorofilin Kullanım Alanları

Klorofil yeşil renginden dolayı sabun, mum, mürekkep ve reçinelerin renklendirilmesinde boyar madde olarak, koku adsorpsiyon özelliği dolayısıyla diş hekimliği ve tıp alanında ağız koku giderici tablet yapımında, kandaki eritrosit oluşumunu arttırması dolayısıyla anemiye karşı yapılan ilaçlarda, gıda sanayinde

boyar madde ve tat verici madde olarak kullanılır (Steer). En önemli kullanım alanı gıda boyası olarak kullanımıdır.

2.8.1. Gıda Boyası Olarak Klorofil

Klorofile ait, porfirin sınıfında iki tip boya bulunmaktadır. Bunlardan biri, doğal yeşil veya kahvemsi yeşil renkli magnezumklorofil diye adlandırılan mumsu katılıkta bir maddedir. Boyanın rengi içerdiği magnezumklorofil miktarına göre kahverengiden yeşile doğru değişiklik gösterir. Diğer klorofil boyası ise mavi-siyah renkli bakırklorofil olarak adlandırılan, Na veya K tuzları da içeren maddedir (Humphrey, 1979).

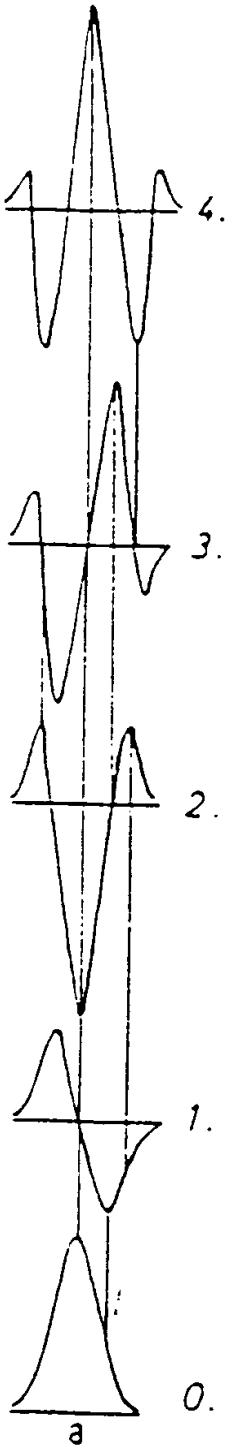
Klorofil boyasına ilişkin en eski patentlerden birisi 1956 yılında Dr. Oetker firmasınca alınmıştır. Burada yağda çözünen boyalara uygulanan, nişasta ve yağ çevresinde boyanın kılıf oluşturarak tutulması işlemi klorofilin asidik ortamda çökerek topak oluşturması nedeniyle sonuç vermediğinden klorofil boyasının taşıyıcı bir madde ile çok ince öğütülerek gıdanın mekanik olarak ayrılamayan tek fazlı bir sistem haline getirilmesi tavsiye edilmektedir (Koch ve Traut, 1952).

Her iki gıda boyası da çimen, yonca, çam iğnesi, ısırgan otu ve diğer bitkilerin çözücülerle ekstraksiyonu sonucu elde edilmektedir. Bakırklorofil ise ekstrakta bakırın organik tuzunun ilave edilmesiyle elde edilmektedir. Ekstraksiyon sırasında klorofilden doğal yollarla magnezyumun bir bölümü veya tamamı uzaklaştığından, ana boyar madde magnezyumklorofil ve feofitinlerdir. Bakırklorofil boyasında ise renkten yalnızca bakırklorofil maddesi sorumludur. Bu maddelerin gıda sanayinde kullanılabilmesi için feofitin ve magnezyum kompleksi toplamı ile bakırklorofil miktarı toplamının toplam boyanın %10'undan az olmamalıdır.

2.9. Türev Spektroskopisi Hakkında Genel Bilgi

Türev spektrofotometrik yöntemi, ilk defa 1920'li yılların başlarında Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanmasında kullanılmıştır (Hommod,1953). Türev spektrumlarının oluşturulması için gerekli matematiksel işlemlerin uzun ve güç olması nedeniyle, yöntemin analitik kimyadaki önemi ve uygulamaları ancak

1970'li yıllarda analitik cihazların bilgisayar ile donanımından sonra büyük gelişme göstermiştir. Günümüzde bu teknik, UV-VIS absorpsiyon spektrofotometrisi, IR ve Raman spektrometrisi, NMR spektrometrisi, ESR spektrometrisi, Alev Emisyon ve Absorpsiyon spektrometrisi, Lüminesans spektrometrisi, Gaz kromatografisi, Polorografi, Elektroanalitik yöntemler ve reaksiyon kinetiklerinin incelenmesi gibi çeşitli analitik işlemlerde kullanılmaktadır.



2.10. Türev Spektrumları

Türev spektrofotometrisinin prensibi; dalga boylarına karşılık absorbans değerlerinin türevlendirilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde analizi yapılacak maddenin dalga boylarına karşılık gelen absorbans değerlerinin 1. veya daha yüksek dereceli türevleri dalga boyuna karşı alınarak spektrum elde edilir. Bilindiği gibi bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dy/dx 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda ise türev dA/dλ olacaktır. (A= Absorbans, λ= Dalga boyu genişliği) 1. ve daha yüksek mertebeden türevler şu şekilde genelleştirilebilir; (Owen, 1987)

$$A = f(\lambda) \quad (2.6.)$$

$$dA / d\lambda = f'(\lambda) \quad (2.7.)$$

$$d^2A / d\lambda^2 = f''(\lambda) \quad (2.8.)$$

Spektrumun herbir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp, dalga boyunun fonksiyonu olarak grafik edildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2., 3.,.... n. türev spektrumları sırasıyla $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$,....., $d^nA/d\lambda^n$ değerleri ile dalga boyu arasında oluşturulabilir. Şekil 2.6'da basit bir pikin 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir.

Şekil 2.6. Türev spektrumları

Görüldüğü gibi 1. derece türev alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif pikler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstramumlar oluşmakta , orjinal pikteki ekstramumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir. Orjinal spektrumdaki bir pike karşılık n. türev spektrumunda n+1 adet pik oluşmakta, türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır. Orijinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minumum, 4. türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir. Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla rezolüsyon artmaktadır.

2.11. Kantitatif Analizler için Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Absorpsiyon spektrumlarında herhangi bir dalga boyunda Lambert-Beer Yasası geçerli ise (A= abc), n. dereceden türev spektrumlarında türev genliği yada türev absorbansı D_n aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$$D_n = d^nA/d\lambda^n = (d^n\varepsilon / d\lambda^n)\, bc \qquad (2.9.)$$

A= Absorbans

λ= Dalga boyu genişliği (cm)

ε = Molar absorptivite katsayısı ($L.cm^{-1}.mol^{-1}$)

b = Işın yolu (cm)

c = Konsantrasyon (mol/L)

Görüldüğü gibi Lambert-Beer Yasasının geçerli olması koşuluyla türev absobans eğrisi ile konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometresiyle kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Konvansiyonel spektrofotometride konsantrasyon ile absorbans arasında oluşturulan standart eğriler türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin konsantrasyonu (c) ile karşılık olan türev absorbans değeri ($D_{n)}$ arasında hazırlanır.

2.12. Türev Spektrofotometrisinin Kullanımı

Bir spektrumun türevinin alınmasının en büyük sebebi, orjinal spektrumda görülmeyen zayıf bazı spektral özelliklerin türevde görünür hale gelmesidir. Bunun yanı sıra birbirine benzer ve yakın olan spektrumdaki çok küçük değişimleri de ortaya çıkararak ayırt eder. Türev spektrumunun özellikleri birçok yolla kullanılabilir. Bunlardan bazıları şunlardır (Mayring, 1978) :

2.12.1. λ_{max}' ın Kesin Olarak Belirlenmesi

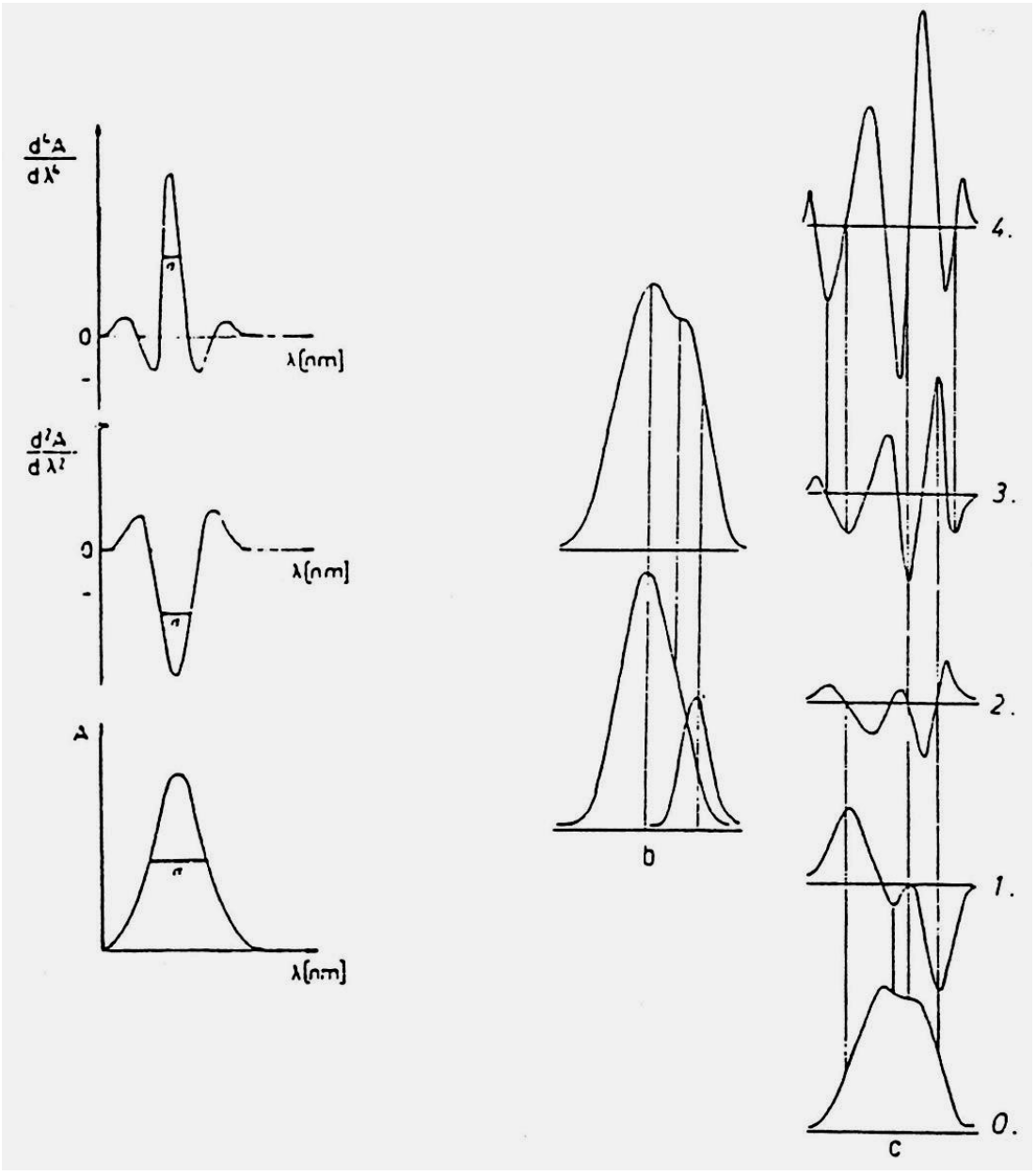
Özellikle geniş absorpsiyon bantlarının bulunduğu absorpsiyon spektrumlarında, absorpsiyonun maksimum olduğu dalga boyunun kesin bir şekilde saptanmasında 1. türev spektrumu çok yararlıdır. Orjinal spektrumda A_{max}'ın bulunduğu dalga boyunda 1. türev eğrisi sıfırdan geçeceği için bu dalga boyu çok daha kesin bir şekilde kolayca saptanabilir.

2.12.2. Rezolüsyonda Artış

Türev spektrumlarının ikinci bir avantajı, orjinal spektrumda zor görülebilen ince yapının ortaya çıkması yani rezolüsyonun artmasıdır. Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla rezolüsyon artmaktadır. Böylece spektrumun ince yapısı aydınlatılır ki bu durum saflık testlerinde önemlidir. Orjinal spektrum bant genişliği 1. türev ile %53, %41 oranında azalırken, 2., 3., 4. türevler için orjinal bant genişliği % 34 azalır (Owen, 1987). Şekil 2.7'de görüldüğü gibi orjinal absorpsiyon pikinin yarı genişliği %30-40 oranında azalmaktadır. Orjinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstramumlara dönüşmektedir. Bundan çakışan piklerin çözümlenmesinde yararlanılır. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman, orjinal spektrumda küçük pik omuz şeklinde görünür. Bu omuzdan tek dereceli türev spektrumlarında oluşan ekstramumlar, her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın kantitatif tayinine olanak sağlar. Bu durum eser analizlerde önemlidir.

2.12.3. Spektral Farklılıkları Arttırmak

Türev spektrumları ile oluşturulan bir spektral arşiv organik maddelerin tanınmasında kolaylık sağlayabilir. Ancak burada göz ardı edilmemesi gereken nokta, bu arşivin enstrümantal parametrelerden bağımsız olması için spektrumların kaydedilmesi sırasında çözücünün yanında tarama hızı gibi parametrelerin de aynı olması gerektiğidir.



Şekil 2.7. Orjinal spektrumun genliğinin 2. ve 4. türevlerdeki azalması

Şekil 2.8. Orjinal spektrumda ve türev spektrumunda üst üste çakışan piklerin görünümü

Kimyasal yapıları çok yakın olan bileşiklerin türev spektrumlarında bulunan piklerin dalga boylarının da birbirine yakın olduğu durumlarda ekstramumların dalga boylarının değerlendirilmesi bu maddenin farklandırılmasında yeterli olmayabilir. Böyle durumlarda komşu piklerin yüksekliklerinin oranından da yararlanılmaktadır.

2.12.4. Saflık Kontrolü

Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin saflık testlerinde de avantaj sağlamaktadır. Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Bu spektrumların, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla ham madde, ana ürün ve nihai ürünlerde saflık kontrolü yapılır.

İlaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır.

2.12.5. Karışımların Simultene Analizi

Türev spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple konvansiyonel absorpsiyon spektrofotometrisi ile bir ön ayırma yapmaksızın tayin edilemeyen karışımların simultene analizidir.

2.12.6. Bulanık Çözeltilerin Kantitatif Analiz

Bulanık çözeltiler ve süspanse yada emülsifiye katı veya sıvı maddeler içeren çözeltilerle spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle UV alanda ışın saçılması sebebiyle analitin spektrumu kuvvetli veya zayıf bir zemin absorpsiyonu ile çakışır. Bulanıklığın sebep olduğu zemin absorpsiyonu dalga boyu ile yavaş bir değişim gösterir. Türev spektrumundaki uygun pik-pik uzaklıkları değerlendirilerek bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir.

2.13. Türev Spektrofotometrisinin Uygulamaları

Türev spektrofotometrisi gıda endüstrisinde meyve sularında polienlerin ölçülmesinde, sütlerde protein (Bertrant ve ark. 1982), sıvı yemeklik yağlarda doymamış yağ asitlerinin bileşimi ve miktarı tayininde ve bazı besinlerdeki sorbik asit ve benzoik asit tayininde (Sorbihsid ve ark. 1984) kullanılmaktadır.

Kan ve idrarda porfirin analizi, serumda protein analizi (Demchenko ve ark. 1979), protein saflık kontrolü, fermantasyon ortamlarında anilin tayini, kanda hemoglobin (Sanderink ve ark. 1985), metalbumin (Bertrant ve ark. 1982) ve fenilalanin tayini (Kullmann ve ark. 1982), hemoglobin yanında karboksihemoglobin tayini (Parks ve Worth, 1985) gibi kilinik analizlerde de çok kullanılır.

Türev spektrofotometrisinin kullanıldığı diğer bir alan ise ilaç analizleridir. Bu çalışmalara örnek olarak tranilsprominsülfat ve triflüoperazindihidroklorür içeren tabletler (Moises ve ark. 1989), sefalosporin karışımlarının analizi (Basiko, 1988), çok bileşenli preparatlarda efedrin hidroklorür tayini (Davidson ve Elskikh, 1982) ve ilaçlarda renk maddelerinin analizi verilebilir.

Türev spektrofotometrisi ayrıca amonyak, azot monoksit, azot dioksit (Matthews ve ark., 1982), ozon, toluen, ksilen, benzaldehit gibi gazların ve uçucu bileşiklerin tayininde, viskozitesi yüksek sıvıların, jellerin ve katıların analizinde, sularda fenol ve anilin (Talsky ve ark., 1978; Shibata ve ark, 1976), petrol fraksiyonlarında naftelenlerin tayininde (Siya ve ark., 1986), kopolimerlerin özellikle azopolikarbonakların tayininde, azo bileşiğinin termal bozunmasıyla ilgili çalışmalarda, kolon eluatlarının tayininde kullanılmaktadır.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Alet: Unicam 8700 model UV/VIS spektrometre
Kaydedici: Unicam Plotter
Küvet: Hellma marka kuarts küvet
Otomatik Pipet: Rundolf Brand
Çalkalayıcı: Edmunt Bühler (7400 Tübingen)
Analitik Terazi: Gec Amery
Etüv: Heraeus

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Klorofil a ve klorofil b (Aldrich Chem. Co. P.O. Box 355), aseton, propanol, etil alkol, kloroform (Merck).

3.3. Standart çözeltilerin hazırlanması

5 mg klorofil a içeren kapalı ampul kırıldıktan sonra 100 ml'lik balon jojenin içine aktarıldı. Boşaltılan ampul aseton-propanaol (1:1) karışımı ile yıkanarak, yıkama çözeltileri de balon jojeye alındıktan sonra aynı çözücü karışımı ile 100 ml'ye tamamlandı. Klorofil b içinde aynı işlemler yapılarak 5mg/100ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler koyu renkli şişelere alındı ve hazırlandığı gün kullanıldı.

.

3.4. Yapılan Deneyler

3.4.1. Materyal tanıtımı

Ispanak ve çimene ilişkin bilgi aşağıda özetlenmiştir;

Ispanak: Pazı ve pancar gibi bitkileri kapsayan iki çenekliler familyası olan ıspanakgiller familyasından bir bitkidir. Taçsız, çiçekli bitkiler takımı olarak tanımlanırlar. Sanayide doğal boya yapımında kullanılır (Kavas ve ark.).

Çimen: Buğdaygiller familyasından, Lolium türlerine verilen addır. Park ve bahçelerin yeşillendirilmesinde yararlanılan, ayrıca yem bitkisi olarak kullanılan İngiliz çimi ve İtalyan çimi en önemli türleridir. Çalışmada kullanılan çimen İngiliz çimi tipinde olup Lolium perenne'dir. Sivri yada küt uçlu tüysüz yaprakları vardır. Çiğnenmeye ve biçilmeye dayanıklı olup, nemli topraklarda yetişir (Anon, 1994).

Çimenler İ.T.Ü. kampüsünden, ıspanaklar ise İstanbul'daki semt pazarlarından temin edildi. Bunların taze olmasına, renk ve şekil bakımından bozulmamış olmasına dikkat edildi.

3.4.2. Çözücü seçimi ve ekstraksiyon

Geliştirilen yöntemde kullanılacak olan en uygun çözücünün belirlenmesi amacıyla, homojene edilmiş çimen örneklerinin değişik çözücülerdeki ekstraktlarının 665 nm dalga boyundaki absorpsiyonları zamana karşı ölçüldü.

100 ^{0}C'de etüvde kurutulduktan sonra mikserle küçük parçalara ayrılarak homojenize edilmiş çimenden 1'er gram tartılarak erlenlere alındı. Üzerlerine 10'ar ml çözücüler ilave edilerek, Edmunt Bühler marka çalkalayıcıya konulup 420 min^{-1} devirde herbiri yarım saat çalkalandı ve aynı anda whatman tipi süzgeç kağıdından süzülerek çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin 665 nm dalga boyundaki absorbansları 10 dakika arayla ölçüldü . Bunun için, aseton, propanol, aseton-propanol (1:1), etil alkol, ve kloroform çözücüleri kullanıldı.

Ispanak örnekleri 100 ^{0}C de kurutulduktan sonra çok ince öğütülüp homojenize edildi. Bu örneklerden alınan 1g yukarıda anlatıldığı gibi sadece aseton-propanol (1:1) çözücü karışımı ile ekstrakte edildi. Çimen ve ıspanak örneklerinin aseton-propanol (1:1) çözücü karışımındaki ekstraksiyon çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları çizildi.

3.4.3. Klorofil a ve b' nin absorpsiyon spektrumlarının çizilmesi

Stok klorofil a çözeltisinden (5mg/100ml), 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 ml, 10 ml'lik balon jojelere alınarak aseton-propanol (1:1) çözücü karışımı ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin 350 – 700 nm dalga boyu aralığında, 2.0 nm bant genişliğinde, 2000 nm/min hızda absorpsiyon spektrumları çizildi.

Stok klorofil b çözeltisinden 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 ml, 10 ml'lik balon jojelere alınarak aseton-propanol (1:1) çözücü karışımı ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin 350 – 700 nm dalga boyu aralığında, 2.0 nm bant genişliğinde, 2000 nm/min hızda absorpsiyon spektrumları çizildi.

3.4.3.1. Molar absorptivite katsayılarının hesaplanması

Bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan klorofil a ve klorofil b seri çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları alınırken, klorofil a'nın 431.5, 646.9 ve 663.2 nm'lerdeki, klorofil b'nin 460, 646.9 ve 663.2 nm'lerdeki absorpsiyon değerleri okundu. Elde edilen absorpsiyon değerleri ile klorofil konsantrasyonları arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Bu doğruların eğimlerinden molar absorpsiyon katsayıları tespit edildi.

3.4.4. Türev spektrumlarının çizimi ve analizde kullanılacak dalga boylarının seçimi

$5.6x10^{-6}$ M klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M klorofil b ile $2.8 x10^{-6}$ M klorofil a+ $2.55x10^{-6}$ M klorofil b çözelti karışımının absorpsiyon spektrumları ile 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları saf çözücüye karşı çizildi. Analiz için incelenen spektrumlardan 1.türev spektrumu seçildi. Çalışma dalga boylarının seçimi için 1. türev spektrumlarında klorofil a'nın türevinin 0 olduğu ve klorofil b analizinin mümkün olabileceği;

klorofil b'nin türevinin 0 olduğu ve klorofil a analizinin mümkün olabileceği dalga boyları tespit edildi. Klorofil a ve klorofil b'nin bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı gibi değişik konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinin 1. türev spektrumları üst üste çizildi.

3.4.4.1. Birinci derece türev absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması

10 ml'lik balon jojelere stok klorofil a çözeltisinden 1, 1.5, 2, 2.5 ml ve herbirine klorofil b stok çözeltisinden 2 ml ilave edilerek propanol+aseton (1:1) çözücü karışımı ile 10 ml' ye tamamlandı. Bu çözeltilerin 350-700 nm aralığında 1. derece türev spektrumları alındı ve 401.3 nm'deki türev değerleri ölçüldü. Klorofil a' nın konsantrasyonları ile bunlara karşılık gelen türev değerleri arasında kalibrasyon grafiği çizildi.

10 ml'lik balon jojelere stok klorofil b çözeltisinden 1, 2, 3, 4 ml ve herbirine klorofil a stok çözeltisinden 2 ml ilave edilerek propanol+aseton (1:1) çözücü karışımı ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin 350-700 nm aralığında 1. derece türev spektrumları alındı ve 474.0 nm'deki türev değerleri ölçüldü. Klorofil b' nin konsantrasyonları ile bunlara karşılık gelen türev değerleri arasında kalibrasyon grafiği çizildi.

3.4.5. Ispanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b miktarının tayini

İ.T.Ü. kampüsünden toplanan çimenler ile İstanbul'daki semt pazarlarından temin edilen ıspanak örneklerinden 1'er gram alınıp 10 ml aseton+propanol (1:1) çözücü karışımında Edmunt Bühler marka karıştırıcıda 420 min^{-1} devirde yarım saat çalkalanarak ekstrakde edildi. Uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra elde edilen ekstraklarda klorofil a ve klorofil b miktarları konvensiyonel spektrofotometrik ve bu çalışmada geliştirilen türev spektrofotometrik yöntemle tayin edildi.

3.4.5.1. Konvensiyonel spektrofotometrik yöntem ile

Konvensiyonel spektrofotometrik yöntem kullanılırken literatürde verilen çözücülerden farklı çözücülerle çalıştığımız için ve alet farkından dolayı bu çalışmada tespit edilen maksimum dalga boyları literatür değerlerinden farklı olmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, belirlenen dalga boyları ve bu dalga boylarında hesaplanan molar absorptivite katsayıları kullanılmıştır. Yöntemin temeli absorbansın toplamsal olma özelliğine dayanır ve farklı iki dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerinin aşağıdaki denklemlerde yerine konulmasıyla klorofil a ve b konsantrasyonları hesaplanır.

$$A_{663.2} = \varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 \quad (3.1.)$$

$$A_{646.9} = \varepsilon_1' c_1 + \varepsilon_2' c_2 \quad (3.2.)$$

3.1. ve 3.2. denklemlerindeki ε_1, klorofil a için 663.2 nm'de hesaplanan absorptivite katsayısı, ε_2 klorofil b için 663.2 nm'de hesaplanan absorptivite katsayısı, ε_1' klorofil a için 646.9 nm'de hesaplanan absorptivite katsayısı, ε_2' klorofil b için 646.9 nm'de hesaplanan absorptivite katsayısı, c_1 klorofil a'nın konsantrasyonu, c_2 klorofil b'nin konsantrasyonudur.ε_1, ε_2 , ε_1' ve ε_2' bölüm 3.4.3.1.'de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

Hazırlanan ıspanak ve çimen ekstraklarının 663.2 ve 646.9 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek bulunan değerler 3.1 ve 3.2. denklemlerinde yerine konulup klorofil a ve b'nin konsantrasyonları hesaplandı. Bu sonuçlardan yola çıkarak kilogram ıspanak ve çimendeki klorofil a ve b miktarları hesaplandı.

3.4.5.2. Birinci türev spektrofotometrik yöntem ile

Hazırlanan ıspanak ve çimen ekstraklarının bölüm 3.4.4.' de seçilen dalga boylarında 1.türev absorbans değerleri ölçüldü. Bu değerlerden ve kalibrasyon grafiklerinden yararlanarak klorofil a ve b'nin konsantrasyonları saptandı. Bu sonuçlardan yola çıkarak kilogram ıspanak ve çimendeki klorofil a ve b miktarları hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çözücü tayini sonuçları

Çimen örneği aseton, propanol, aseton-propanol (1:1), kloroform ve etil alkol çözücü karışımlarında ekstrakte edilip, ekstraktların 665 nm' deki absorpsiyon değerleri 10'ar dakika arayla ölçüldü (Tablo 4.4.- 4.8.). Bekleme süresi ile ölçülen absorbanslar arasında eğriler çizildi (Şekil 4.9.). Şekilde görüldüğü gibi her çözücü ile alınan ekstraktların absorpsiyon değerleri zamanla azalmaktadır.

Tablo 4.4. Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: aseton-propanaol)

Zaman	0.dk	10.dk	20.dk	30.k	40.dk	50.dk	60.dk	70.dk	80.dk	90.dk
Abs.	1.468	1.451	1.432	1.45	1.407	1.404	1.398	1.396	1.385	1.374

Tablo 4.5. Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: aseton)

Zaman	0.dk	10.dk	20.dk	30.dk	40.dk	50.dk	60.dk	70.dk	80.dk	90.dk
Abs.	0.740	0.732	0.724	0.712	0.700	0.691	0.685	0.677	0.670	0.660

Tablo 4.6. Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: propanaol)

Zaman	0.dk	10.dk	20.dk	30.dk	40.dk	50.dk	60.dk	70.dk	80.dk	90.dk
Abs.	0.553	0.526	0.522	0.513	0.509	0.498	0.491	0.485	0.482	0.476

Tablo 4.7. Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: kloroform)

Zaman	0.dk	10.dk	20.dk	30.dk	40.dk	50.dk	60.dk	70.dk	80.dk	90.dk
Abs.	0.188	0.184	0.175	0.170	0.168	0.163	0.158	0.155	0.151	0.149

Tablo 4.8. Çimen ekstraktının λ_{665} deki absorbansının zamanla değişimi. (çözücü: etil alkol)

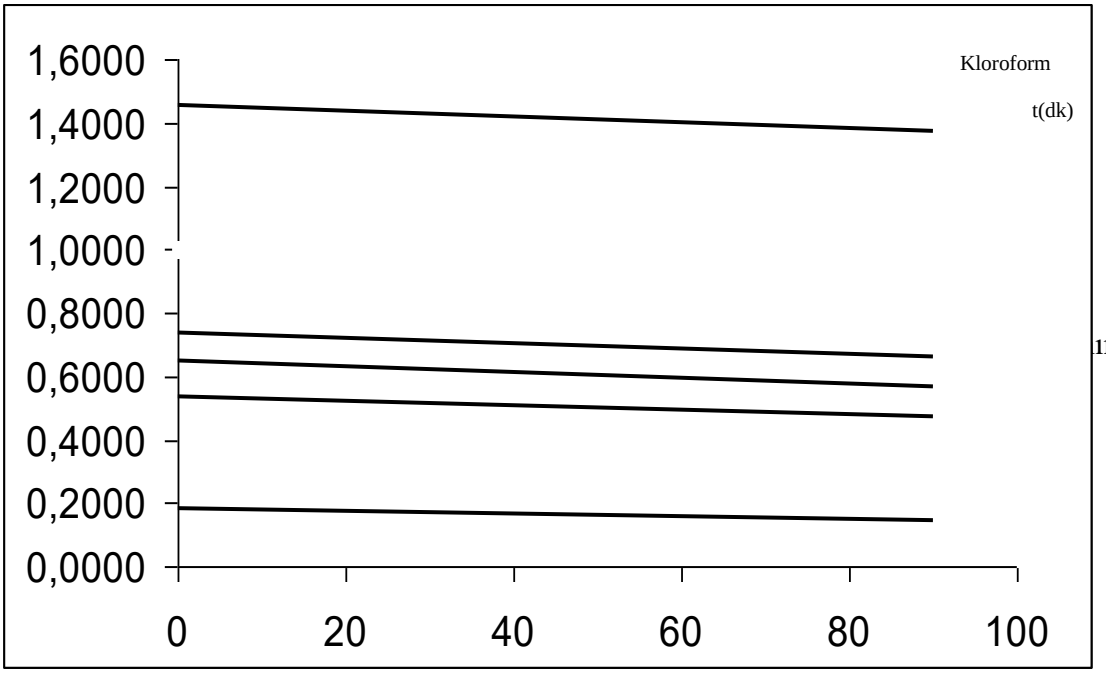
Zaman	0.dk	10.dk	20.dk	30.dk	40.dk	50.dk	60.dk	70.dk	80.dk	90.dk
Abs.	0.645	0.641	0.635	0.626	0.612	0.603	0.600	0.592	0.575	0.568

Abs

Aseton
Propanol

Aseton

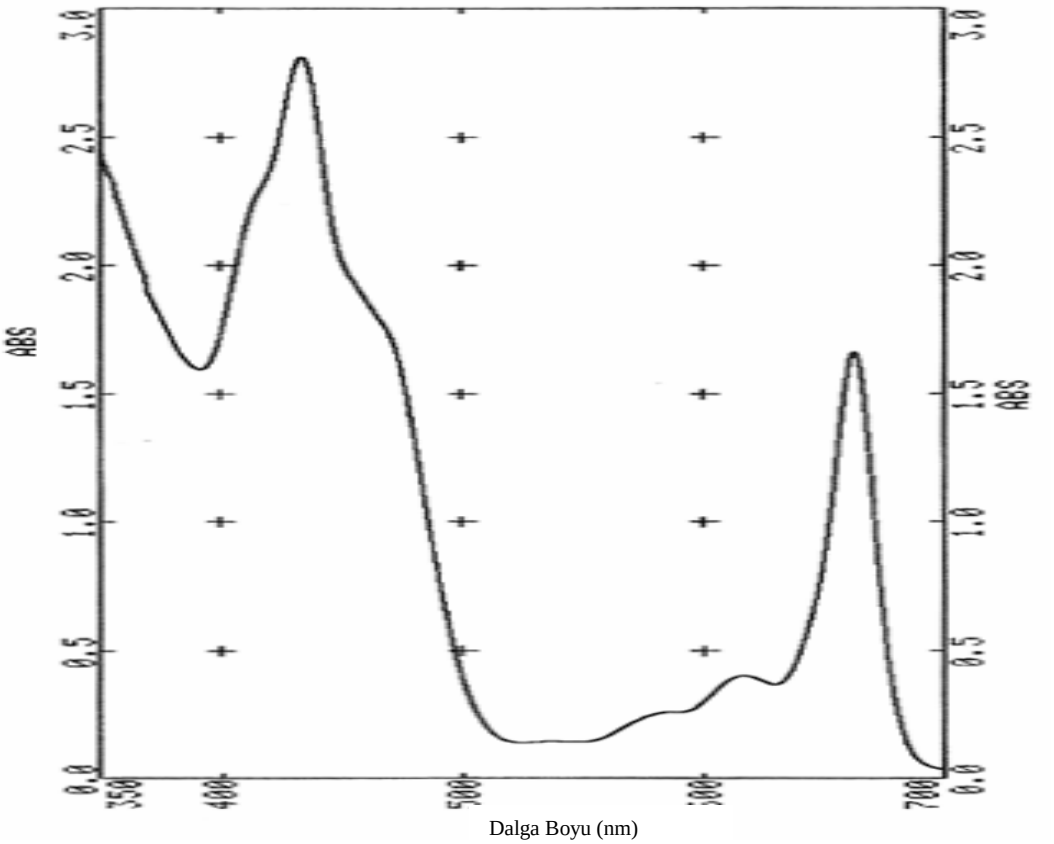
Etil Alkol
Propanol



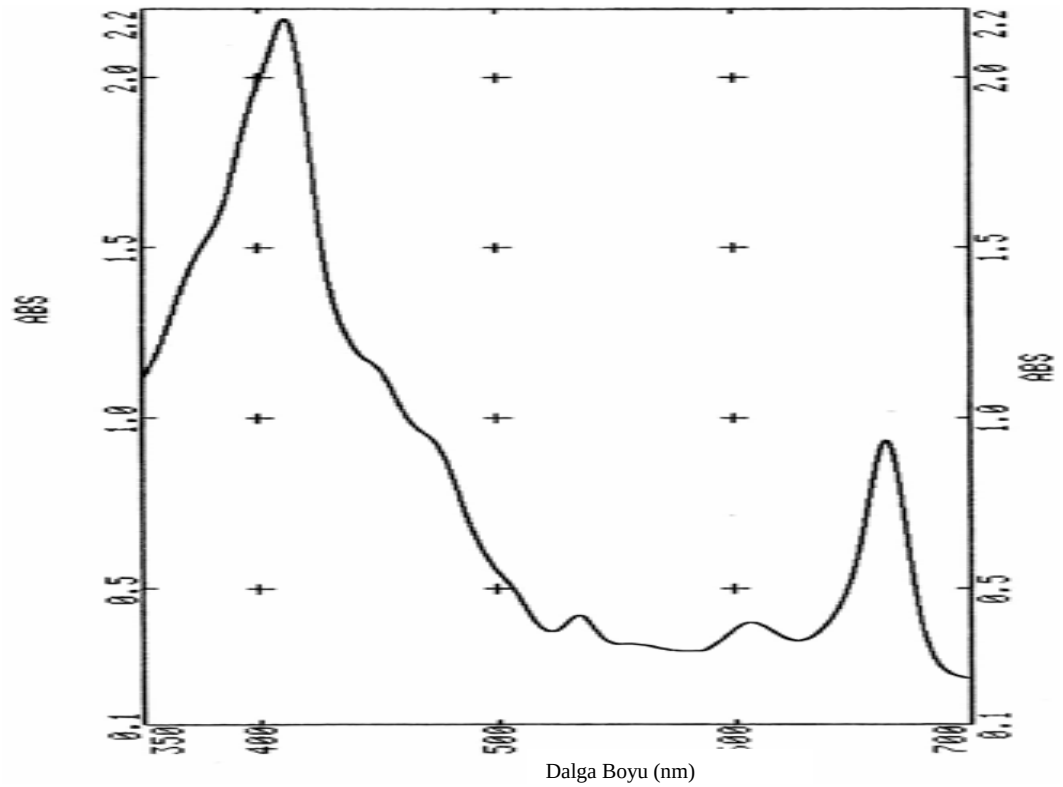
ın

Yukarıda verilen grafikten de görüldüğü gibi değişik çözücülerle yapılan ekstraktlar içinde en yüksek absorbans değeri aseton-propanol (1:1) çözücü karışımı ile elde edildi. Bu nedenle standart çözeltilerin hazırlanmasında ve gerçek örneklerin ekstraktında çözücü olarak aseton-propanol (1:1) karışımı kullanıldı.

Seçilen en uygun çözücü karışımı olan aseton-propanol (1:1) çözücü karışımında ıspanak ve çimen ekstraklarının absorpsiyon spektrumları şekil 4.10. ve şekil 4.11'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.10. 1g çimenin propanol+aseton (1:1) çözücü karışımı ile ekstraktının absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.11. 1g ıspanağın propanol+aseton(1:1) çözücü karışımı ile ekstraktının absorpsiyon spektrumu.

4.2. Klorofil a ve b çözelti serilerinin absorpsiyon spektrumları

Bölüm 3.4.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan klorofil a ve b çözelti serilerinin absorpsiyon spektrumları şekil 4.12. ve şekil 4.13.'de görüldüğü gibidir. Absorpsiyon spektrumları çizilirken klorofil a'nın 431.5, 646.9 ve 663.2 nm'lerdeki, klorofil b'nin 460, 646.9 ve 663.2 nm'lerdeki absorpsiyon değerleri okundu (Tablo 4.9. ve 4.10.). Elde edilen absorpsiyon değerleri ile konsantrasyonlar arasında kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil A.1-A.6.). Şekillerde görüldüğü gibi klorofil a ve klorofil b için elde edilen eğriler birer doğru olup denklemleri aşağıda verimiştir.

Klorofil a için,

$A_{431.5} = 7.57 \times 10^4 \, C \quad (r^2 = 0.985)$ (4.1.)

$A_{646.9} = 1.58 \times 10^4 \, C \quad (r^2 = 0.998)$ (4.2.)

$A_{663.2} = 6.61 \times 10^4 \, C \quad (r^2 = 0.989)$ (4.3.)

Klorofil b için,

$A_{460} = 8.82x10^4\ C$ $(r^2 = 0.998)$ (4.4.)

$A_{646.9} = 3.13x10^4\ C$ $(r^2 = 0.999)$ (4.5.)

$A_{663.2} = 0.96x10^4\ C$ $(r^2 = 0.996)$ (4.6.)

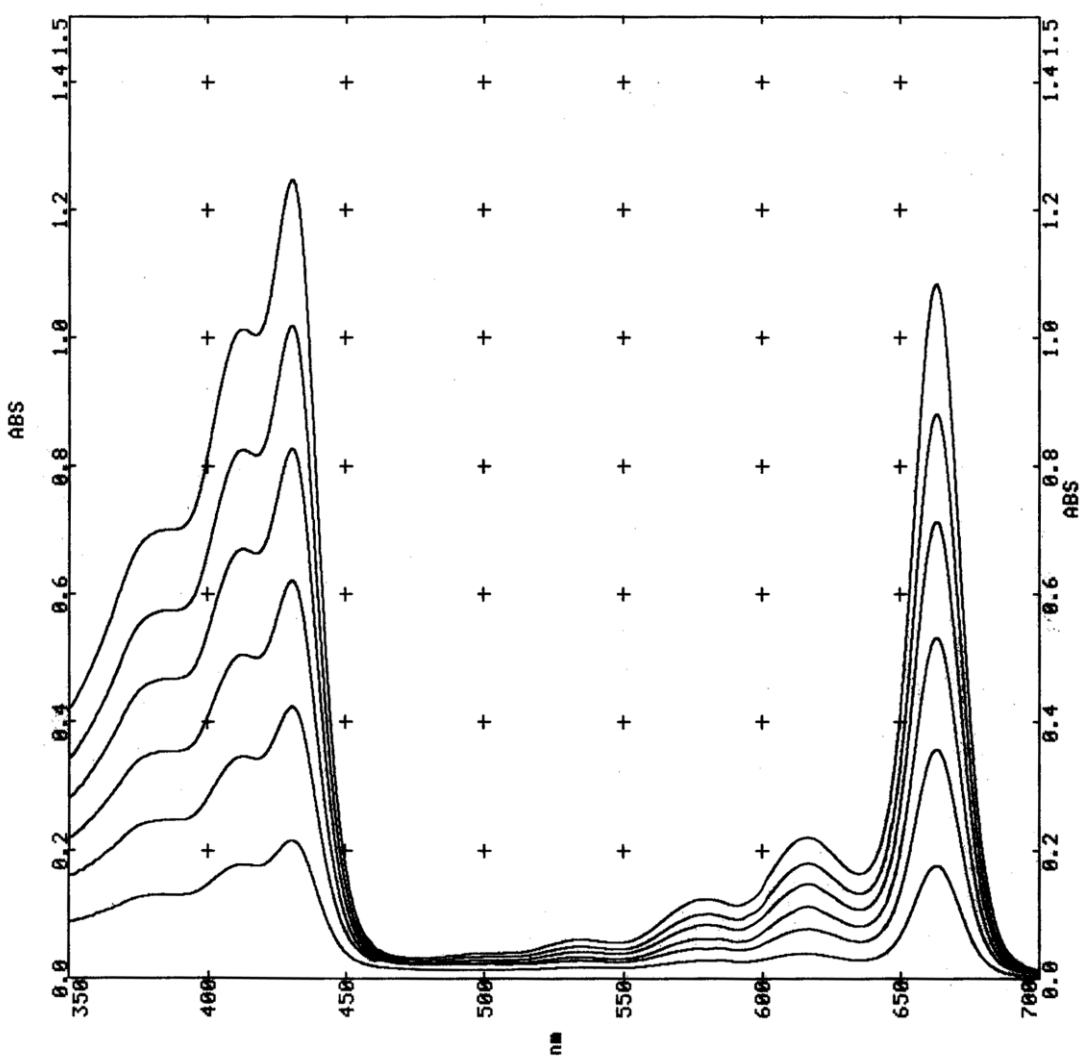
Bu doğruların eğimlerinden molar absorptivite katsayıları klorofil a için, $\varepsilon_{431.5}$=75700 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, $\varepsilon_{646.9}$=15800 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, $\varepsilon_{663.2}$=66100 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, klorofil b için ε_{460}=88200 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, $\varepsilon_{646.9}$=31300 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ve $\varepsilon_{663.2}$=9600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ olarak tespit edildi.

Tablo 4.9. Absorbansın klorofil a konsantrasyonuna göre değişimi.

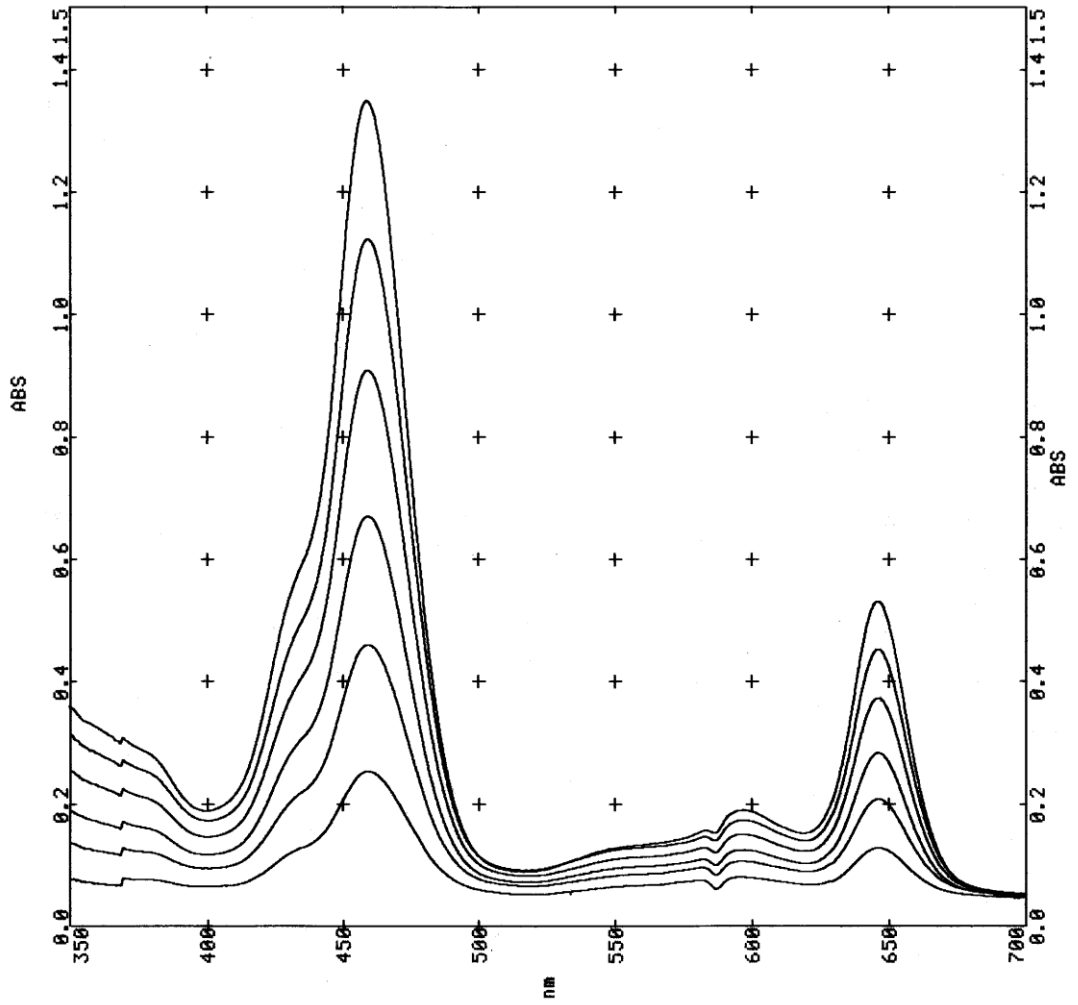
Konsantrasyon ($x10^{-6}M$)	Absorbans		
	431.5 nm	646.9 nm	663.2 nm
2.8	0.240	0.046	0.204
5.6	0.477	0.092	0.414
8.4	0.699	0.131	0.602
11.2	0.837	0.176	0.718
14	1.060	0.217	0.925
16.8	1.224	0.269	1.084

Tablo 4.10. Absorbansın klorofil b konsantrasyonuna göre değişimi.

Konsantrasyon ($x10^{-6}M$)	Absorbans		
	460 nm	646.9 nm	663.2 nm
2.55	0.253	0.084	0.028
5.1	0.459	0.159	0.053
7.65	0.669	0.232	0.071
10.12	0.907	0.321	0.098
12.75	1.120	0.400	0.132
15.3	1.342	0.481	0.147



Şekil 4.12. 2,8x10^{-6}, 5.6x10^{-6}, 8.4x10^{-6}, 11.2x10^{-6}, 14x10^{-6}, 16.8x10^{-6} M Klorofil a çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları.

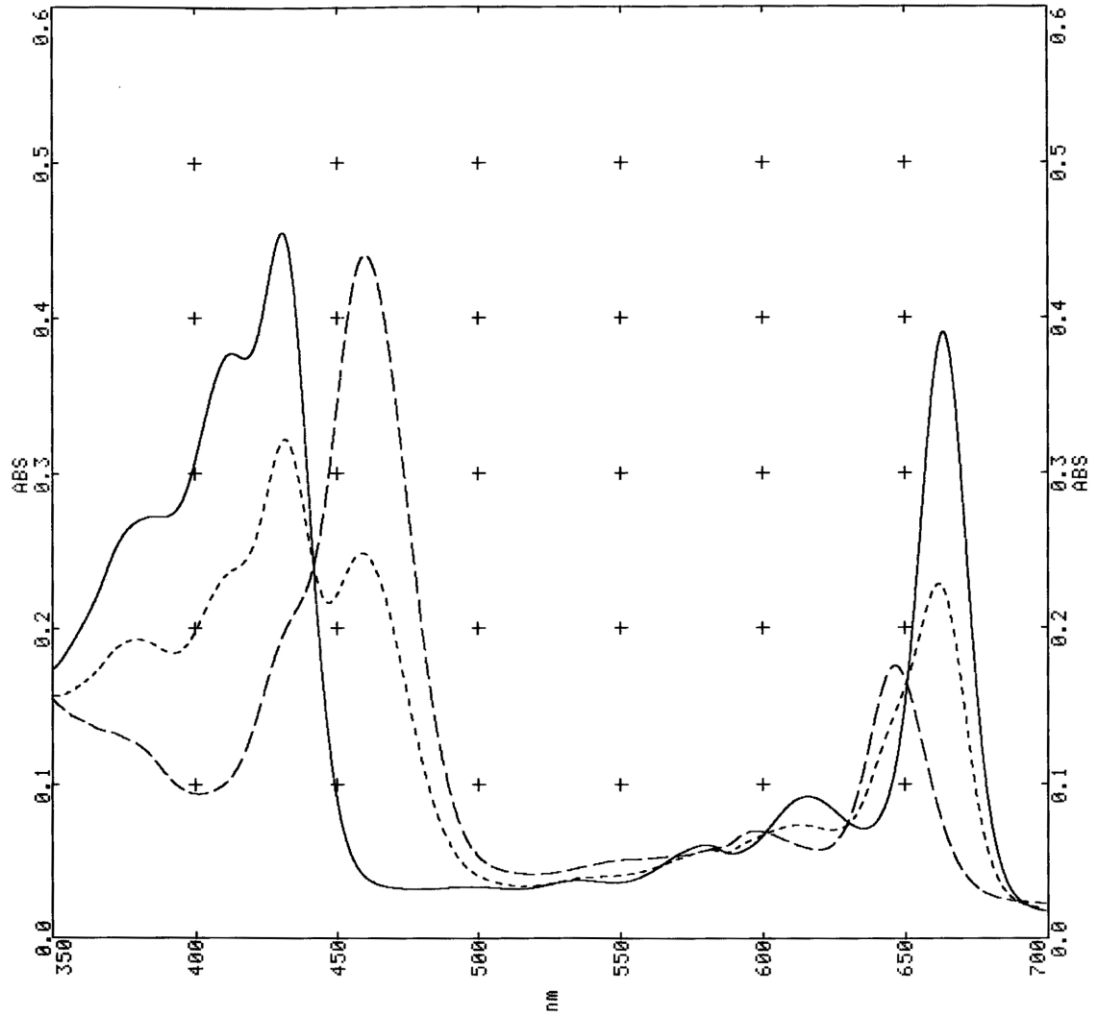


Şekil 4.13. $2.55x10^{-6}$, $5.1x10^{-6}$, $7.65x10^{-6}$, $10.12x10^{-6}$, $12.75x10^{-6}$, $15.3x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları.

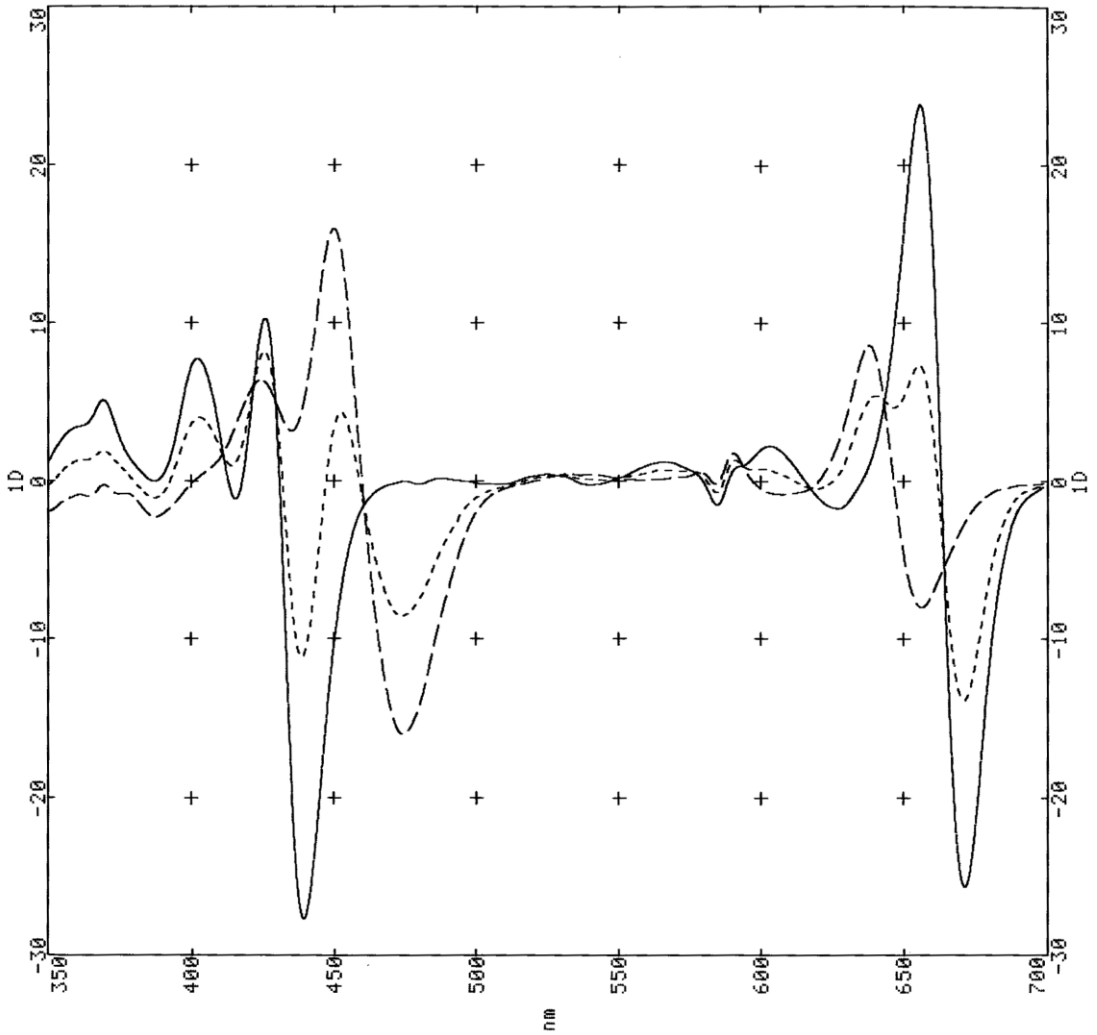
4.3. Birinci türev spektrofotometrik yönetemle simultane klorofil a ve b tayini

Klorofil a, klorofil b ve bunların karışımlarının bölüm 3.4.4.' de anlatıldığı gibi üst üste çizilen absorpsiyon spektrumlarında klorofil a ve b' nin spektrumlarının çakıştığı görülmektedir (Şekil 4.14.). Sıfırıncı derece absorpsiyon spektrumları çakışan karışımların türev spektofotometrik yöntemle simultane tayini, maddelerden birinin türev absorbansının sıfır olduğu noktada diğer maddenin türev absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada da kullanılacak dalga boylarının ve türev derecesinin saptanması için bölüm 3.4.4.' de yapılan deneyler sonucu elde edilen türev spektrumları incelendi (Şekil 4.15. ve şekil A.7.-9). Klorofil a' nın türev absorbans değerinin sıfır olup, aynı zamanda klorofi b ölçümü için uygun olan dalga boyları 1. derece türev spektrumunda 474.0 ve 637.1 nm, 2. derece türev

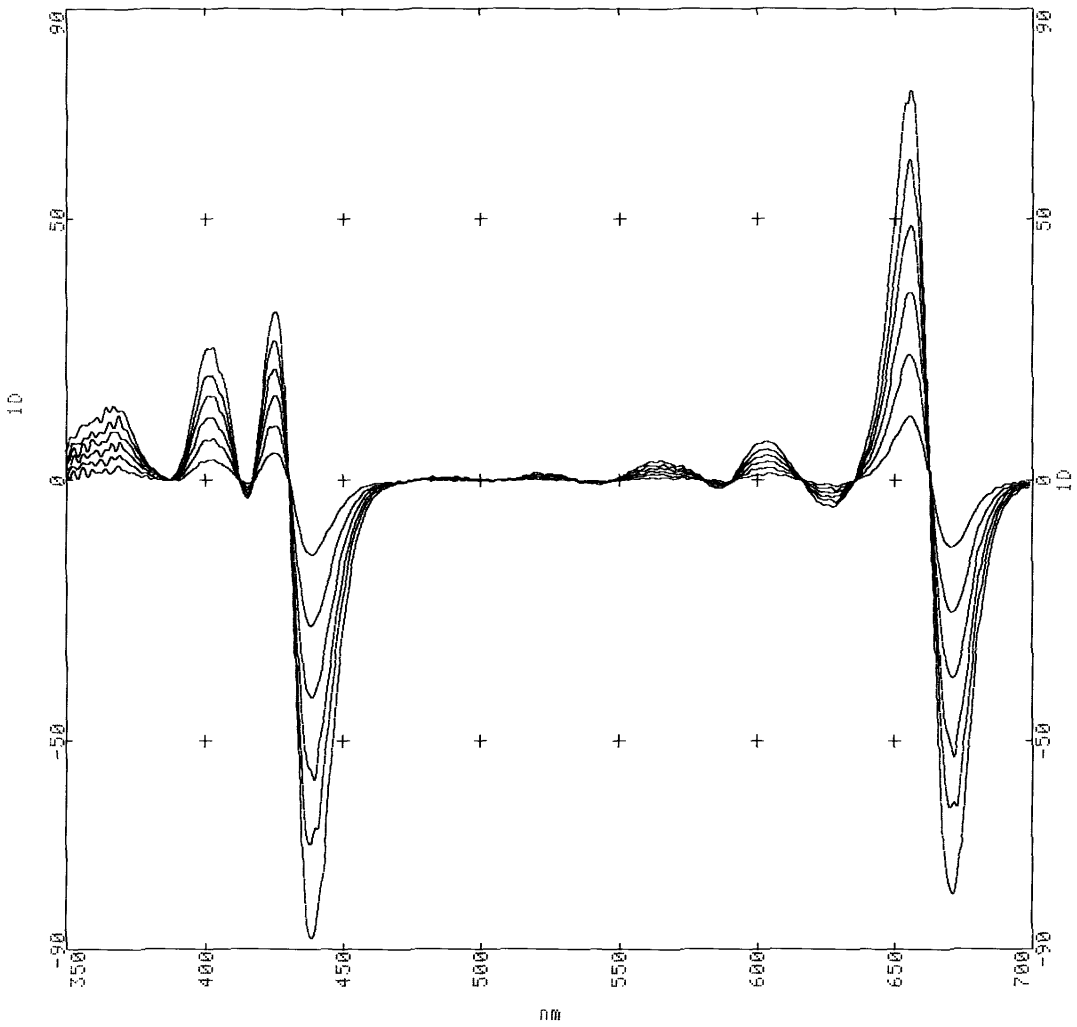
spektrumunda ise 450.3 nm olarak bulundu. Klorofil b'nin türev absorbans değerinin sıfır olup, aynı zamanda klorofil a ölçümü için uygun olan dalga boyları olarak da 1. derece türev spektrumunda 401.3 ve 646.9 nm, 2. derece türev spektrumunda ise 490.3 nm olarak tespit edildi. 3. ve 4. derece türev spektrumlarına bakıldığında klorofil a ve b tayini yapılabilecek uygun noktalar bulunamadı. Bu çalışmalar sonucu klorofil a ve b' nin simultane analizi için birinci derece türev spektrumlarının kullanılmasına karar verildi. Klorofil a için çalışma dalga boyu 401.3 nm, klorofil b için 474.0 nm olarak seçildi. Bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan klorofil a ve b çözelti serilerinin 1. türev spektrumları da şekil 4.16. ve 4.17'de görüldüğü gibidir.



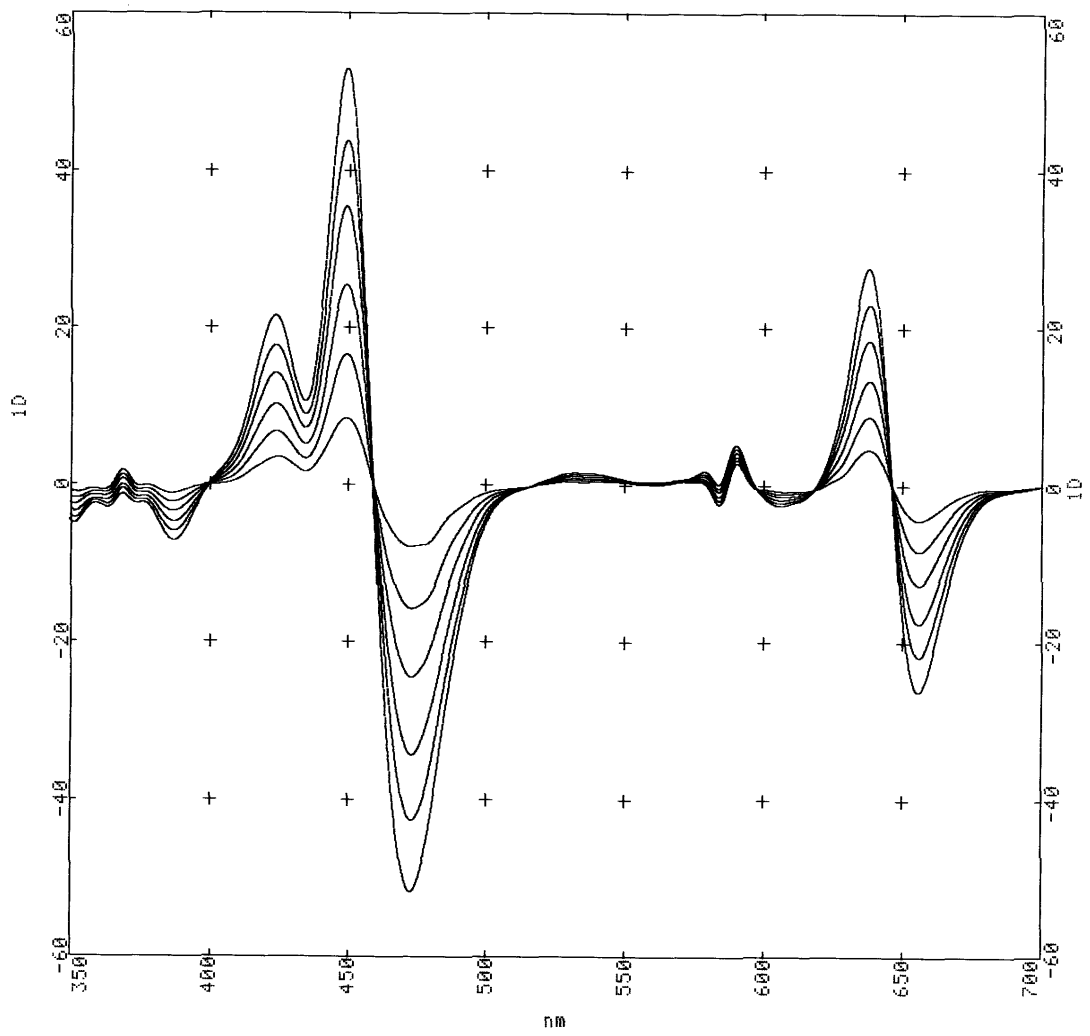
Şekil 4.14. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin absorbsiyon spektrumları.(———) Klorofil a, (– – –) Klorofil b, (·····) Klorofil (a+b).



Şekil 4.15. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 1.türev spektrumları.(———) Klorofil a, (– – –) Klorofil b, (·····) Klorofil (a+b).



Şekil 4.16. 2,8x10^{-6}, 5.6x10^{-6}, 8.4x10^{-6}, 11.2x10^{-6}, 14x10^{-6}, 16.8x10^{-6} M Klorofil a çözeltilerinin 1.türev spektrumları.



Şekil 4.17. $2.55x10^{-6}$, $5.1x10^{-6}$, $7.65x10^{-6}$, $10.12x10^{-6}$, $12.75x10^{-6}$, $15.3x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 1.türev spektrumları.

4.4. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

Bölüm 3.4.4.1. de anlatıldığı gibi gittikçe artan konsantrasyonlarda hazırlanan klorofil a ve klorofil b çözeltilerin birinci türev spektrumları şekil A.10 ve şekil A.11'de gösterilmiştir. Klorofil a tayini için 401.3 nm'de okunan 1. türev absorbans değerleri ($^1D_{401.3}$), klorofil b tayini için 474.0 nm'de okunan 1. türev absorbans değerleri ($^1D_{474.0}$) sırasıyla tablo 4.11. ve tablo 4.12'de verilmiştir. Bu değerler ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar arasında çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 4.18 ve şekil 4.19.'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi elde edilen eğriler birer doğru olup, denklemleri aşağıda verilmiştir. Bu denklemler ıspanak ve çimendeki klorofil a ve b tayini için kullanılmıştır.

Klorofil a için,

$^1D_{401.3} = 1.3808x10^6c - 0.635$ $(r^2 = 0.9965)$ (4.7.)

Klorofil b için,

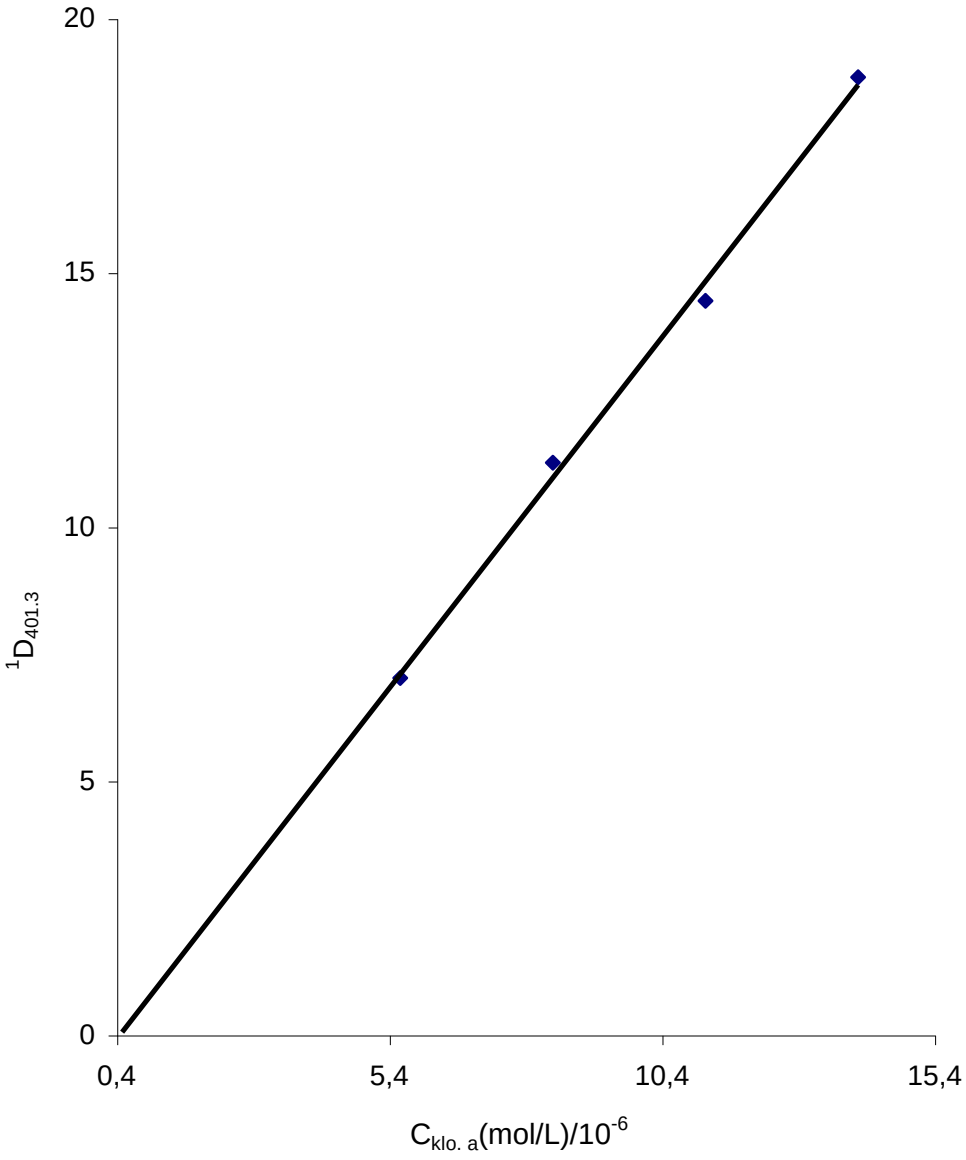
$^1D_{474.0} = 0.31 - 3.4029\ x10^6c$ $(r^2 = 0.9935)$ (4.8.)

Tablo 4.11. $^1D_{401.3}$ değerlerinin klorofil a konsantrasyonuna göre değişimi.

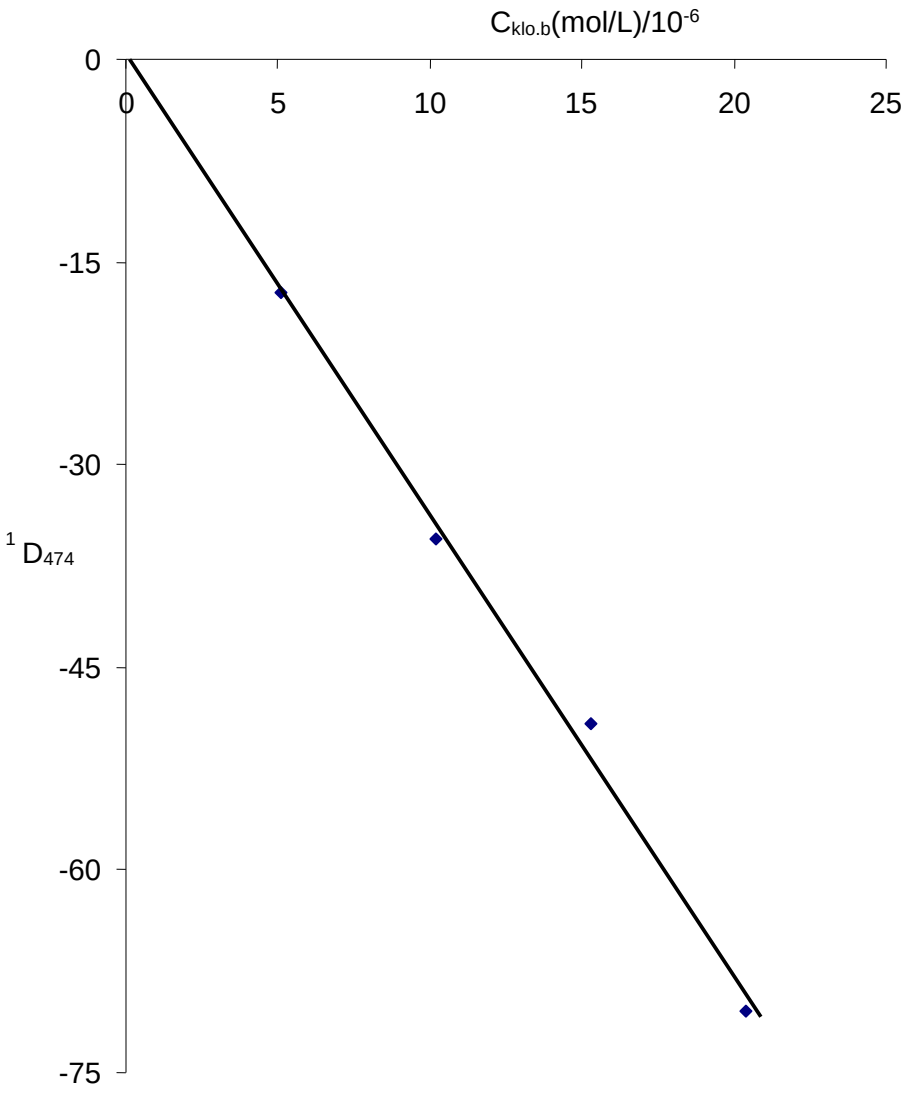
Örnek No	mL klorofil b ($5.1x10^{-5}$ M)	mL klorofil a ($5.6x10^{-5}$ M)	mL çözücü	[klorofil a]$x10^{-6}$	$^1D_{401.3}$
1	2	1.0	7.0	5.60	7.026
2	2	1.5	6.5	8.40	11.26
3	2	2.0	6.0	11.2	14.45
4	2	2.5	5.5	14.5	18.85

Tablo 4.12. $^1D_{474.0}$ değerlerinin klorofil b konsantrasyonuna göre değişimi.

Örnek No	mL klorofil a ($5.6x10^{-5}$ M)	mL klorofil b ($5.1x10^{-5}$ M)	mL çözücü	[klorofil b]$x10^{-6}$	$^1D_{474.0}$
1	2	1.0	7.0	5.10	-17.21
2	2	2.0	6.0	10.2	-35.46
3	2	3.0	5.0	15.3	-49.14
4	2	4.0	4.0	20.4	-70.50



Şekil 4.18. Klorofil a'nın kalibrasyon grafiği



Şekil 4.19. Klorofil b'nin kalibrasyon grafiği

4.5. Analiz yönteminin gerçek örneklere uygulanması

Geliştirilen yöntemin gerçek örneklere uygulanmasında bölüm 3.4.5.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ıspanak ve çimen ekstrakları kullanıldı. Hazırlanan ekstraktlara uygun seyreltmeler yapılarak bu ekstratlardaki klorofil a ve b miktarları aşağıda verilen hem konvensiyonel bir yöntem olan sıfırıncı derece absorpsiyon spektofotometrik yöntemle, hemde bu çalışmada geliştirilen birinci derece türev spektrofoyometrik yöntemle yapıldı.

4.5.1. Konvensiyonel spektrofotometrik yöntem sonuçları

Klorofil a' nın 663.2 ve 646.9 nm' de, klorofil b' nin 663.2 ve 646.9 nm' de hesaplanan absorptivite katsayıları bölüm 4.2.'de verilmiştir. Bu değerler ve örneklerin bu dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri 3.1. ve 3.2. denklemlerinde yerine konularak klorofil a ve klorofil b değerleri bulunmuştur.

Ispanak : $0.945 = 66\,100\ c_1 + 9\,600\ c_2$ (4.9.)

$0.282 = 15\,800\ c_1 + 31\,300\ c_2$ (4.10.)

Çimen : $1.650 = 66\,100\ c_1 + 9\,600\ c_2$ (4.11.)

$0.685 = 15\,800\ c_1 + 31\,300\ c_2$ (4.12.)

Tablo 4.13. 1 g ıspanak ve 1 g çimenin 10'ar ml çözücü ile ekstraktlarındaki klorofil a ve b konsantrasyonları (N=4)

Örnek	Ispanak ekstraktı		Çimen ekstraktı	
	Klorofil a kons. (mg/L)	Klorofil b kons. (mg/L)	Klorofil a kons. (mg/L)	Klorofil b kons. (mg/L)
x_1	59.25	11.23	116.3	46.64
x_2	60.90	7.870	114.1	51.13
x_3	57.95	9.800	116.6	45.33
x_4	61.60	9.780	120.5	45.23
$\bar{x}$	61.00	9.640	116.9	47.08
s	1.644	1.378	2.661	2.773
$\bar{x} \mu ts/\sqrt{N}$	61.00 μ 2.61	9.64 μ 2.19	101.90 μ 4.25	47.08 μ 4.40

* $\bar{x}$ μ %95 güvenirlilik aralığında

Bu miktarlardan yola çıkarak elde edilen kilogramdaki konsantrasyonlar tablo 4.14.'de verildiği gibidir.

Tablo 4.14. Ispanak ve çimende bulunan klorofil miktarları (mg/kg)

Klorofil konsantrasyonu	Ispanak	Çimen
Klorofil a (mg/kg)	244	407
Klorofil b (mg/kg)	40	188

4.5.2 Türev spektrofotometrik yöntem sonuçları

Bir önceki yöntemde hazırlanan ıspanak ve çimen ekstraktlarının 401.3 nm ile 474.0 nm'deki türev absorpsiyon değerleri ölçüldü. Bu değerler 4.7. ve 4.8. denklemlerinde yerine konularak ekstraklardaki klorofil a ve b konsantrasyonları hesaplandı. Deneyler 4 kere tekrarlanarak klorofil a ve b miktarları %95 güven aralığına göre hesaplandı. Bulunan sonuçlar tablo 4.15.'de verilmiştir.

Tablo 4.15. 1 g ıspanak ve 1 g çimenin 10'ar ml çözücü ile ekstraktlarındaki klorofil a ve b konsantrasyonları (N=4)

Örnek	Ispanak ekstraktı		Çimen ekstraktı	
	Klorofil a kons. (mg/L)	Klorofil b kons. (mg/L)	Klorofil a kons. (mg/L)	Klorofil b kons. (mg/L)
x_1	59.90	10.80	118.5	48.16
x_2	58.20	11.28	116.6	47.28
x_3	60.10	11.31	117.7	47.17
x_4	62.20	11.18	118.8	48.21
$\bar{x}$	58.95	11.14	117.8	47.68
s	0.176	0.047	0.983	0.111
$\bar{x} \pm ts/\sqrt{N}$	58.95 ± 1.64	11.14 ± 0.24	127.80 ± 0.98	47.68 ± 0.56

* $\bar{x}$ ± %95 güvenirlilik aralığında

Bu miktarlardan yola çıkarak elde edilen kilogramdaki konsantrasyonlar tablo 4.16.'da verildiği gibidir.

Tablo 4.16. Ispanak ve çimende bulunan klorofil miktarları (mg/kg)

Klorofil konsantrasyonu	Ispanak	Çimen
Klorofil a (mg/kg)	236	511
Klorofil b (mg/kg)	44	191

Gerçek örneklerin her iki yöntem ile bulunan analiz sonuçlarının karşılaştırması için aşağıda verilen eşitlik kullanılarak 'null hipotezi' uygulandı. 't' değerleri bu denklem yardımıyla hesaplandı. Bulunan değerler %95 güven aralığı için verilen 2.45 kritik değerinden daha küçüktür. Bu nedenle hesaplanan ortalamalar kıyaslanabilir kesinliktedir. Yani geliştirilen yöntemde sistematik hata olmadığı ve konvensiyonel yöntemle benzer doğrulukta olduğu söylenebilir (Tablo 4.17-20).

$$\overline{X_1} - \overline{X_2} = \mu t.s.\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1.N_2}} \qquad (4.13.)$$

Tablo 4.17. Ispanak ekstraktında klorofil a tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması

	Konvensiyonel yöntem	Geliştirilen yöntem
Ortalama Değer	61.00	58.95
Standart sapma	1.644	0.176
Varyans	2.702	0.031
Ölçüm sayısı(N)	4	4
t-Test (% 95güvenaralığı)	1.39 < 2.45	

Tablo 4.18. Ispanak ekstraktında klorofil b tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması

	Konvensiyonel yöntem	Geliştirilen yöntem
Ortalama Değer	9.640	11.14
Standart sapma	1.378	0.047
Varyans	1.898	0.002
Ölçüm sayısı(N)	4	4
t-Test (% 95güvenaralığı)	2.14 < 2.45	

Tablo 4.19. Çimen ekstraktında klorofil a tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması

	Konvensiyonel yöntem	Geliştirilen yöntem
Ortalama Değer	101.9	127.8
Standart sapma	2.678	0.187
Varyans	2.702	0.031
Ölçüm sayısı(N)	4	4
t-Test (% 95güven aralığı)	0.63 < 2.45	

Tablo 4.20. Çimen ekstraktında klorofil b tayini için geliştirilen yöntemin konvensiyonel yöntemle karşılaştırılması

	Konvensiyonel yöntem	Geliştirilen yöntem
Ortalama Değer	47.08	47.68
Standart sapma	2.773	0.111
Varyans	2.702	0.031
Ölçüm sayısı(N)	4	4
t-Test (% 95güven aralığı)	0.43 < 2.45	

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada klorofil a ve b bir ön ayırma yapmaksızın çabuk ve hassas bir yöntem olarak bilinen türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir.

Klorofil a ve b'nin UV absorpsiyon spektrumları çakıştığından dolayı tayinleri kantitatif absorpsiyon spektrofotometri yöntemi ile yapılamaz. 1970'li yıllarda analitik kimyada kullanılmaya başlanan türev spektrofotometrisi bu şekilde absorpsiyon spektrumları çakışan maddelerin analizinde başarıyla uygulanmaktadır. Bu şekilde bir kimyasal reaksiyon yada bir ayırma yapmaksızın kısa zamanda analiz mümkün olmaktadır.

Türev spektrofotometrik yöntem ile klorofil a ve b analizi için çalışmalara çözücünün saptanması ile başlandı. Klorofil a; alkoller, eter, benzen ve asetonda çözünür. Saf haldeyken petrol eterinde çok az çözünür, suda hiç çözünmez. Klorofil b ise alkolde, eterde, aseton ve benzende çözünür, saf haldeyken petrol eterinde çok çok az çözünür, suda hiç çözünmez. Çalışmada önemli klorofil a ve b kaynağı olan ıspanak ve çimen örnekleri farklı çözücülerde ekstrakde ederek bu ekstraksiyon çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları incelendi. En uygun çözücünün aseton+propanol (1:1) çözücü karışımı olduğu saptandı. Analiz için en uygun türev derecesi ve dalga boyunun seçimi yapılırken, klorofil a için klorofil b'nin türev absorbansının sıfır olduğu, klorofil b için klorofil a'nın türev absorbansının sıfır olduğu dalga boyu araştırıldı. Sonuçta, klorofil a klorofil b karışımının analizi için, klorofil a'nın 1. derece türev spektrumunda 401.3 nm'de, klorofil b'nin 1. derece türev spektrumunda 474.0 nm'de yapılacak türev absorbans ölçümlerinin en uygun olduğu sonucuna varıldı.

Saptanan bu koşullarda, önemli klorofil a ve b kaynağı olan ıspanak ve çimen örneklerindeki klorofil a ve b miktar tayini yapıldı. Bu örneklerdeki klorofil a ve b miktar tayini için bir de klorofil a ve b'nin bazı dalga boylarındaki molar absorptivite

katsayılarından yararlanarak yapıldı. Her iki yöntemle elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldığında gerek doğruluk gerekse prezisyon yönünden anlamlı bir fark bulunamadı. Bu durum, klorofil a ve b analizi için türev spektrofotometrik yöntemin uygun ve avantajlı olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Agostiano, A., Catucci, L., 1996. Chlorophyll a self-organization in microheterogeneous surfactant systems, Biophysical Chemistry, 60, 17-27.

Anon, AOAC, 1990a. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, K. Heinrigh (Edt)., 15th Edn.

Anon, 1990b. Joint FAO/WHO Food Standarts Programme, Codex Alimentarius commission, Barry L. Smith (Edt)., 1190.

Anon, 1991. Compendium of food additive specification, Vol. 1, FAO Food and nutrition paper, 52/1, 425-436, Annex 3.1.

Basiko, M., 1988. Journal of Pharm. Sci., 77, 1042-1056.

Bertrand, A. , Foucart, P. and Buret, J., 1982. Clin. Chim. Acta, 123 (1-2), 121-126.

Breeman, R. B., Canjura, F.L. and Schwartz S.J., 1991. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1452-1456.

Canhill, J.E. and Padera, F.G., 1980. Amer. Lab., 12, 101.

Canjura, F.L. and Schwartz, S.J., 1991a. Speration of chlorophyll compouns and their polar derivatives by high performance liquid chromatography, J. Agric. Food Chem., 39, 110-115.

Canjura, F.L. and Schwartz, S.J., Nunes, R.V., 1991b. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophillides, Journal of Food Science, 56 (6), 1639-1643.

Clydesdale, F.M. and Francis, F.J., 1968. Chlorophyll changes in thermally processed spinach as influenced by enzyme conversion and pH adjustment, Food Tech., 22 (793), 135-138.

Clydesdale, F.M. and Francis, F.J., 1976. Pigments In: Food Chemistry, O.R. Fennema (Eds), Marcel Dekker Inc., New York, 385-392.

Daood, H.G., Czinkotal, B., Hoschke, A. and Biacs, P., 1989. High performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables, Jo. of Chromatography, 472, 296-302.

Davidson, A.G. and Elskikh, H., 1982. Analyst, 107 (1277), 879-884.

Demchenko, P., Sandrovskii, A.K. and Korobkov, M.E.,1979. 89, 142780r

Eskin, M.N.A., 1979. Tetrapyrrole derivatives: Chlorophylls. In: Plant Pigment Flavors and Texture. The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds, Acedemic Press, USA, 3-16, 211.

Freeman ve ark., 1975, Biochemistry, San Francisco

Gibbs, E., Jones, I.D., White, R.C. and Butler, L.S.,1977. Estimation of zinc, pheophytins, chlorophylls and pheophytins in mixture in dietil ether or 80 % acetone by spectrophotometry and fluoromtry, J. Agric. Food Chem. 25 (1), 146-149.

Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. and Brown, S. B., 1987. The degradation of chlorophyll a biological enigma, New Phytol, 107, 255-302.

Hinterstisser, B. and Missbichler, A., 1988. Detection of chlorophyllide in chlorophyll-free plasma membrane preparations from anacystis nidulans, Biochemical and Biophysical Research Communications, 154, 839-846.

Hommod, V.J. and Price, W.C., 1953. J.Opt. Soc. Amer., 43.

Humphrey, A.M., 1979. Chlorophyll, Food Chem., 5, 57-67.

Hynninen, P. H., 1973a. Chlorophylls III-Keto-Enol Tautomerism of chlorophylls a and b. The nature of Chlorophylls a and b, Acta Chemica Scandinavia, 275, 1487-1495.

Hynninen, P. H., and Elfolk, N., 1973b. Chlorophylls I. Seperation and isolation of chlorophylls a and b by multiple liquid-liquid partition, Avta Chemica Scandinavica, 27(5), 1463-1477.

Hynninen, P.H., 1977. Chlorophylls V. Isolation of chlorophylls a and b using an improved two-phase extraction method followed by a precipitation and separation on a sucrose column, Acta Chemica Scandinavica, 31 (10), 829-835.

Hynninen, P.H., Wasielewski, M.R. and Katz, J.J., 1979. Chlorophylls. VI. Epimerization and enolization of chlorophyll a and its magnesium-free derivatives, Acta Chemica Scandinavica, 33 (9), 637-648.

Hopson, J.L. and Wessels, N.K., 1990. Essentials of Biology, Mc Graw-Hill Publishing Company, New York.

Hoff, A.J. and Amesz, J., 1991. Visible absorption spectroscopy of chlorophylls. In: Chlorophylls, H., Scheer (Edt), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 723-738.

Iriyama, K. Yoshiura, M., 1979. Seperation of chlorophyll a and chlorophyll b by a column chromatography with Sephadex LH-20 powdered sugar, Jou. Of Chomatography, 117, 154-156.

Iriyama, K., Yoshiura, M., Shiraki, M., Yano, S. and Saito, S., 1980. An improved method ffor the rapid and easy seperation of leaf pigments and their derivatives by thin-layer chromatography, Analytical Biochemistry, 106, 322-326.

Kendrick, 1992. Metals in Biological Systems, Ellis Horwood Limited, England, 1992.

Koch, H. and Traut, H., 1952. Patent für Dr. August Oetker, British Patent No, 112886, USA Patent No. 2535 538, Deutsche Patent No. 1013953.

Kouril, R., Naus, J., 1999. On the limits of applicability of spectrofluorimetric methods for the determinations of chlorophyll a/b ratio, Photosynthesis Research, 62, 107-116.

Kullmann, K., Endres, W., Kirzinger, S. and Schmidt, H.C., 1982. Jour. Clin. Chem. Biochem, 20(4), 181-183.

Küpper, H. and Spiller, M., 2000. Photometric method for the Quantification of chlorophylls and their derivatves in complex mictures:fitting with gauss-peak spectra, Analytical Biochemistry, 286, 247-256.

Laval-Martin D.L., 1985. Spectrophotometric method of controlled pheophytinization for the determination of both chlorophylls and pheophytins in plant extracts, Analytical Biochemistry, 149, 121-129.

Levillain, P., Fompeydie, D. 1986. Analusis, 14, 1-20.

Macrae, R., (Edt)., 1988. HPLC in Food Analysis, 2nd edition, Academic Press, London.

Martin, M. and Sweeney, J.P., 1958. determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures, Food Resea., 23, 635-656.

Matthews, T.G., Howhorme, A.R. and Gammage, R.B., Report 1982. ORNL/TM 8007, Order No: D.C. 82010335.

Mayring, G.T.L., 1978. High Revolution Higer Order. UV/VIS., Derivative Spektro., Angew Chem., 17, 785-874.

Minquez-Mosquera, M.; Garrido-Fernandez, J.; Gandul-Rojas B., 1989. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37, 8-11

Minquez-Mosquera, M.; Garrido-Fernandez, J., Gandul-Rojas, B. and Montana-Asquerino, A., 1991. determinatins of chlorophylls and carotenoids by hig performance liquid chromatography during olive lactic fermentation, 585, 259-266.

Moises, K., Carmen, A. and Isabel, D.I., 1989. Analyst, 114, 1303-1305.

Morrey, J.R., 1968. Anal. Chem., 40, 905.

Owen T. Advances in UV-VIS spectroscopy: Derivative spectroscopy, 1987 October. L. Laboratory, 58-64.

Parks, J. and Worth, H.G., 1985. Clin. Chem., 31(2), 279-281.

Sanderink, G.J.C. and Van Rijn, H.J.M., 1985. Clin. Chim. Acta, 146(1), 65-73.

Siya Ram, Gupta, R.B., Chandola H.C. and Kumar, F., 1986. Analyst, 111, 291-296.

Schwarz, S. J. and von Elbe J.H., 1983. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegatables, Journal of Food science, 48 (4), 1303-1306.

Schwarz, S. J. and Lorenzo, T. V., 1990. Chlorophylls in foods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 29, 1-17.

Schwarz, S. J. and Lorenzo, T. V., 1991. Chlorophlls stability during continions aseptic processing and storage, Journal of Food Science, 56 (4), 1059-1062.

Shibata, S., Furukawa, M. and Nakashima, R., 1976. Anal. Chim. Acta, 81, 26-210.

Sorbihsid, L.A.J: and Lopez-Roca, M., 1984. Saences Des Aliments, 4, 37-44.

Steer, J., Structure and reactions of chlorophyll (http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm)

Strain, H. H., Thomas, M. R. and Karz, J.J., 1963. Spectral absorption properties of ordinary and fully deuteriated chlorophylls a and b. Biochim. Biophyd. Acta, 75, 306-311.

Streitweiser and Heathcock, 1981, Introduction to Organic Chemistry, MacMillan, New York.

Talsky, G., Mayring, L. and Kreuzer, H., 1978. Angew. Chem., 90, 840-854.

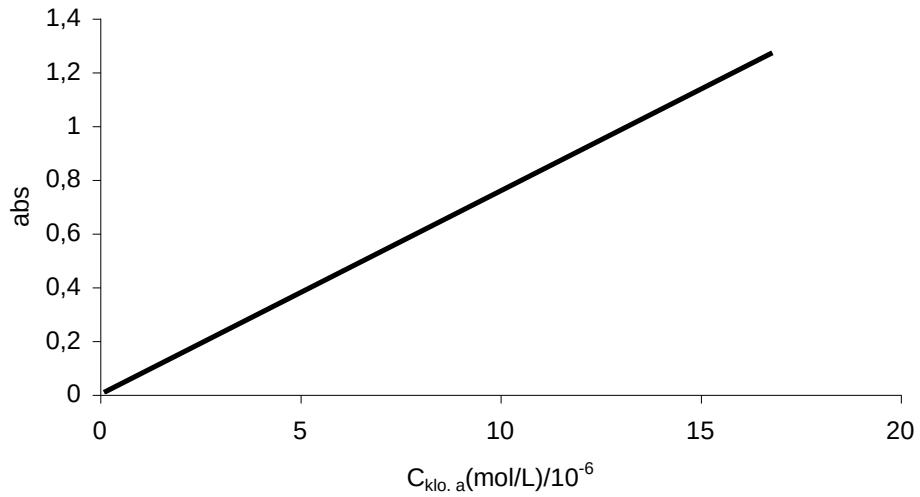
Vernon L. P., 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extract, Analytical Chemistry, 32, 54, pp. 1144-1151.

Wahbi, A.M., Ebel, S., 1974. Anal. Chem. Acta Pharm., 70 57-63.

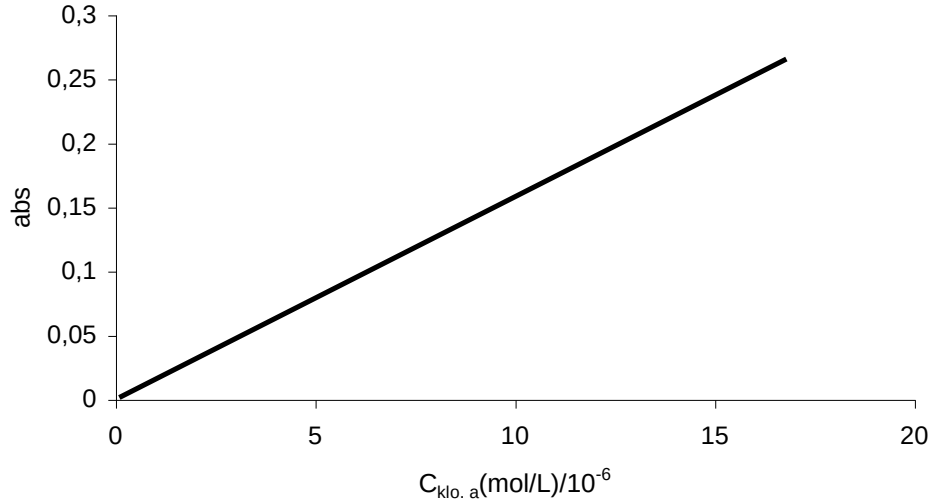
Watenabe, T.; Hongu, A.; Honda, K.; Nakazato, M.; Konno, M. and Saitoh, S., 1984. Preparation of chlorophylls and pheophytins by isocratic liquid chromatography, Anal. Chem. 56, 251-256.

EKLER

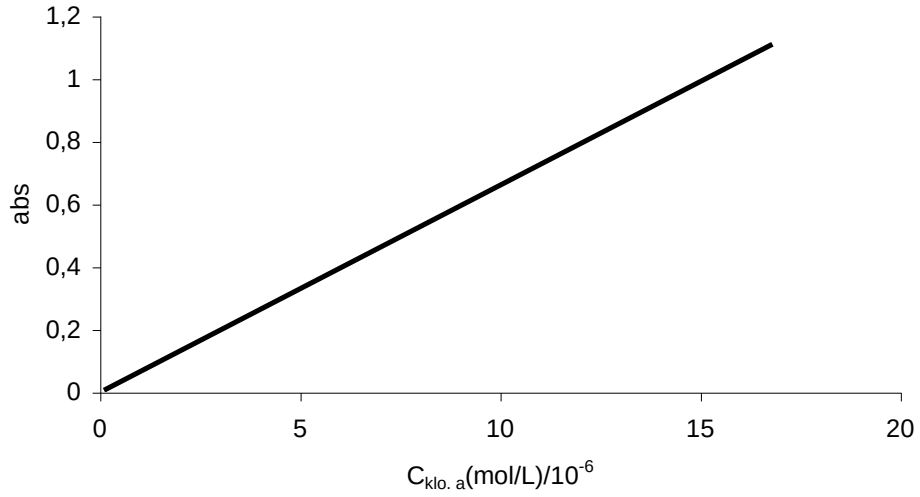
A.Şekiller



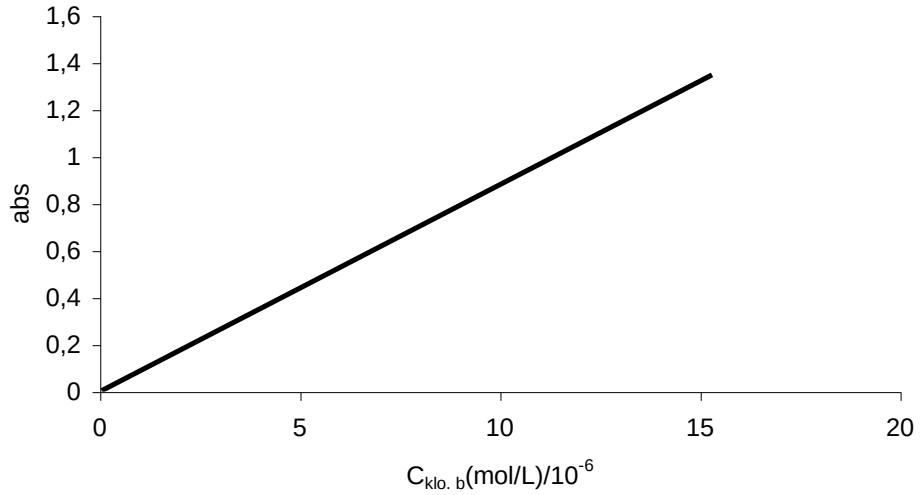
Şekil A.1. Klorofil a için 431.5 nm‘de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.



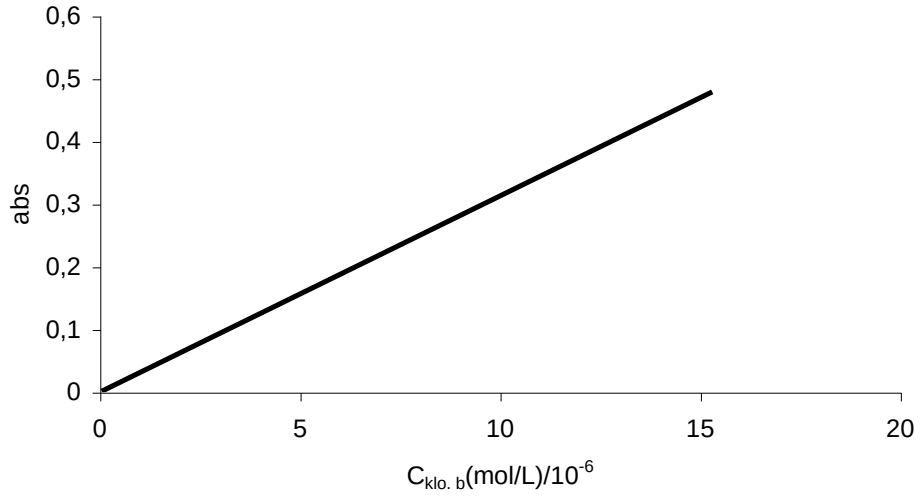
Şekil A.2. Klorofil a için 646.9 nm‘de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği



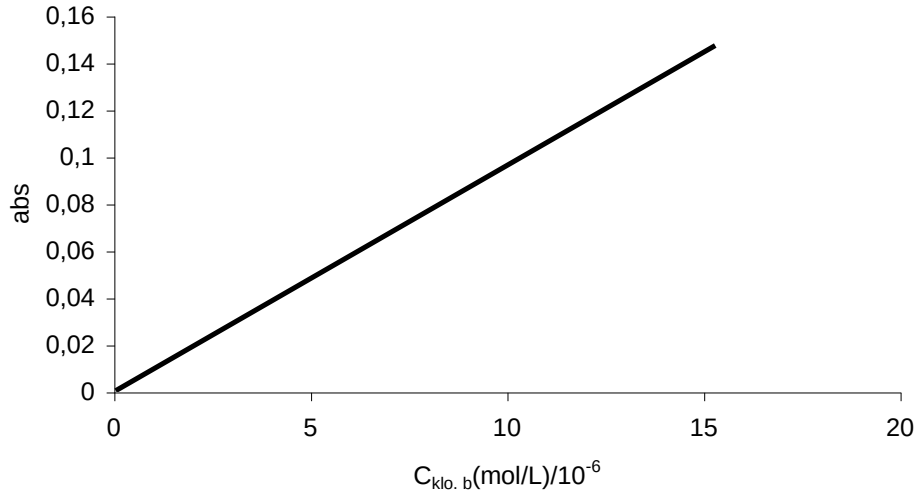
Şekil A.3. Klorofil a için 663.2 nm‘de absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.



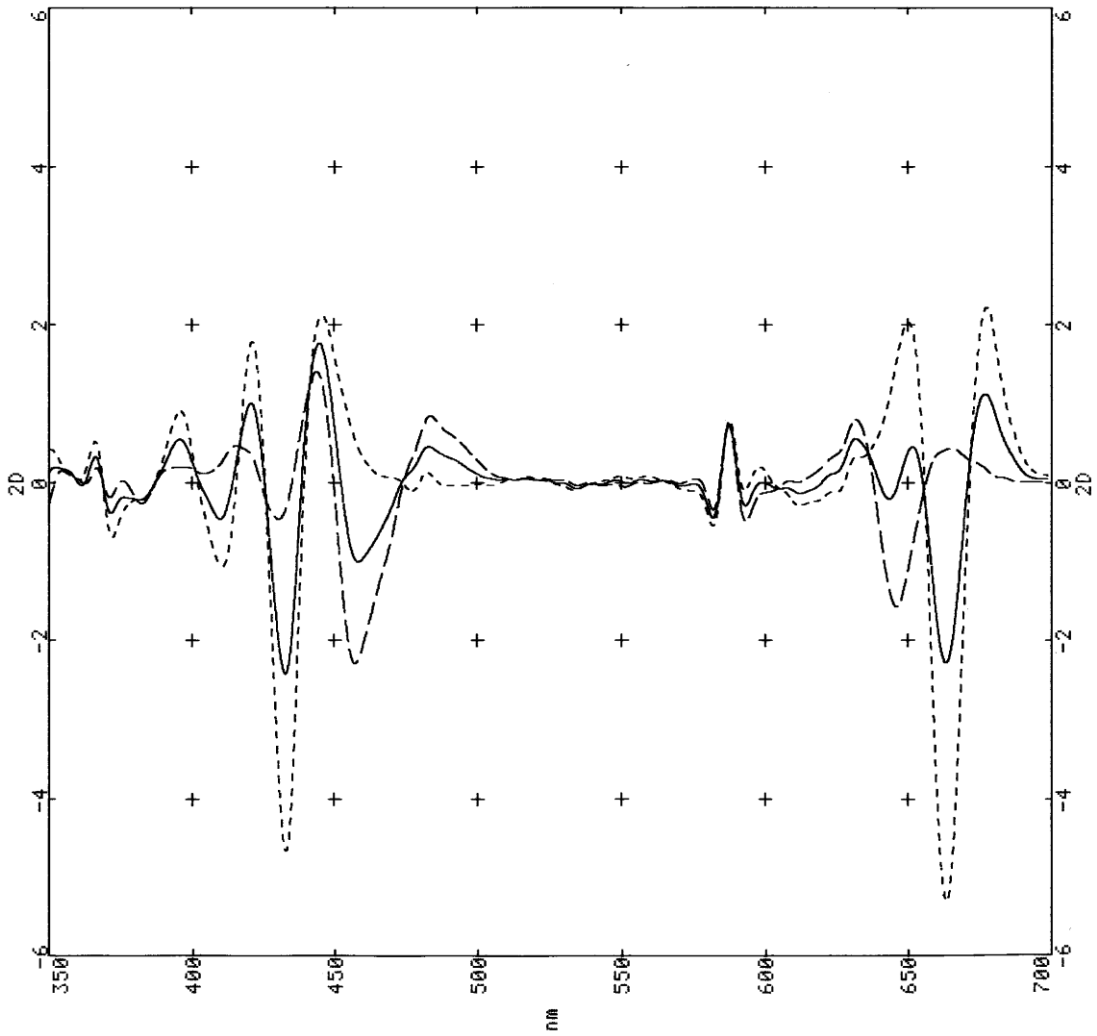
Şekil A.4. Klorofil b için 460.0 nm’deki Absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.



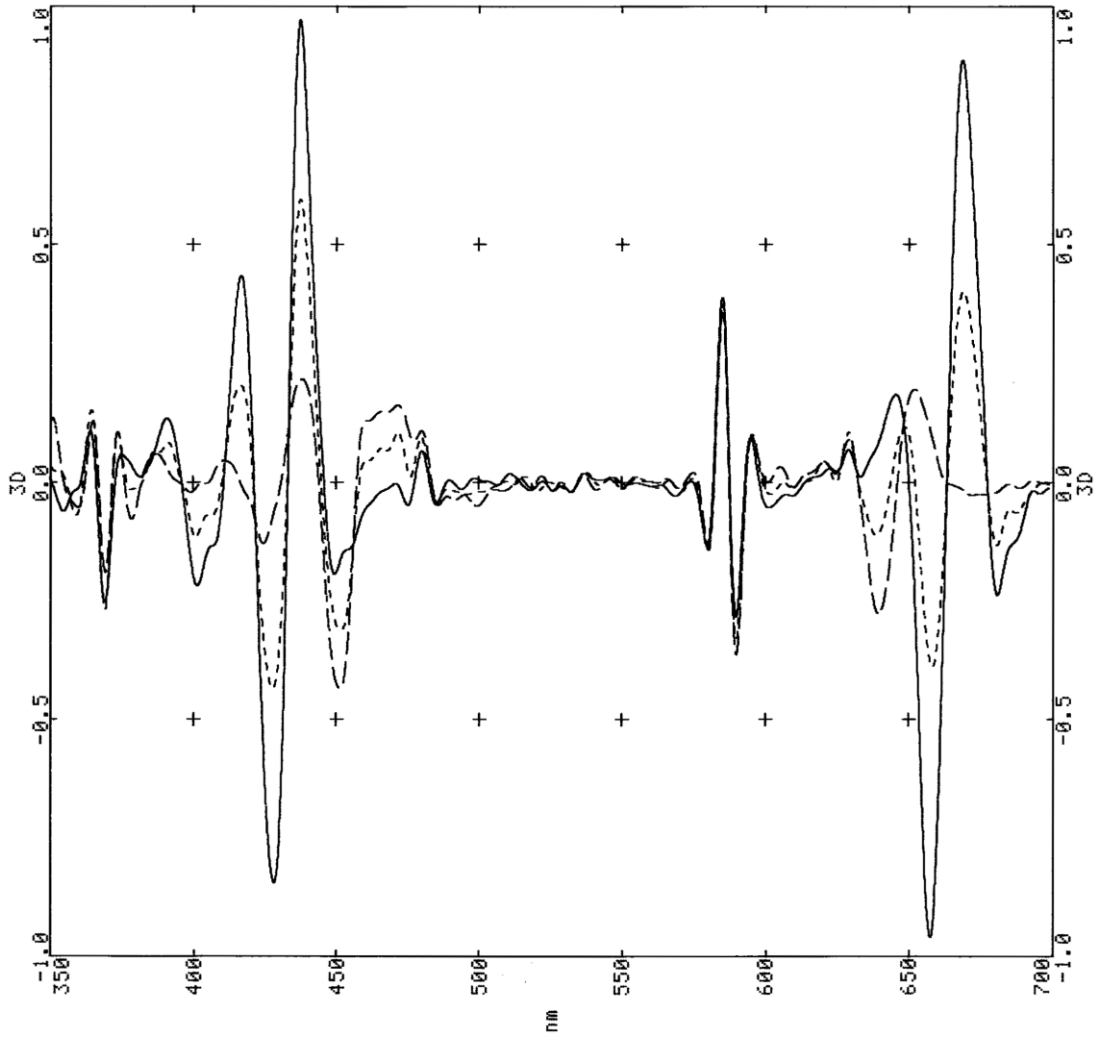
Şekil A.5. Klorofil b için 646.9 nm'deki Absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.



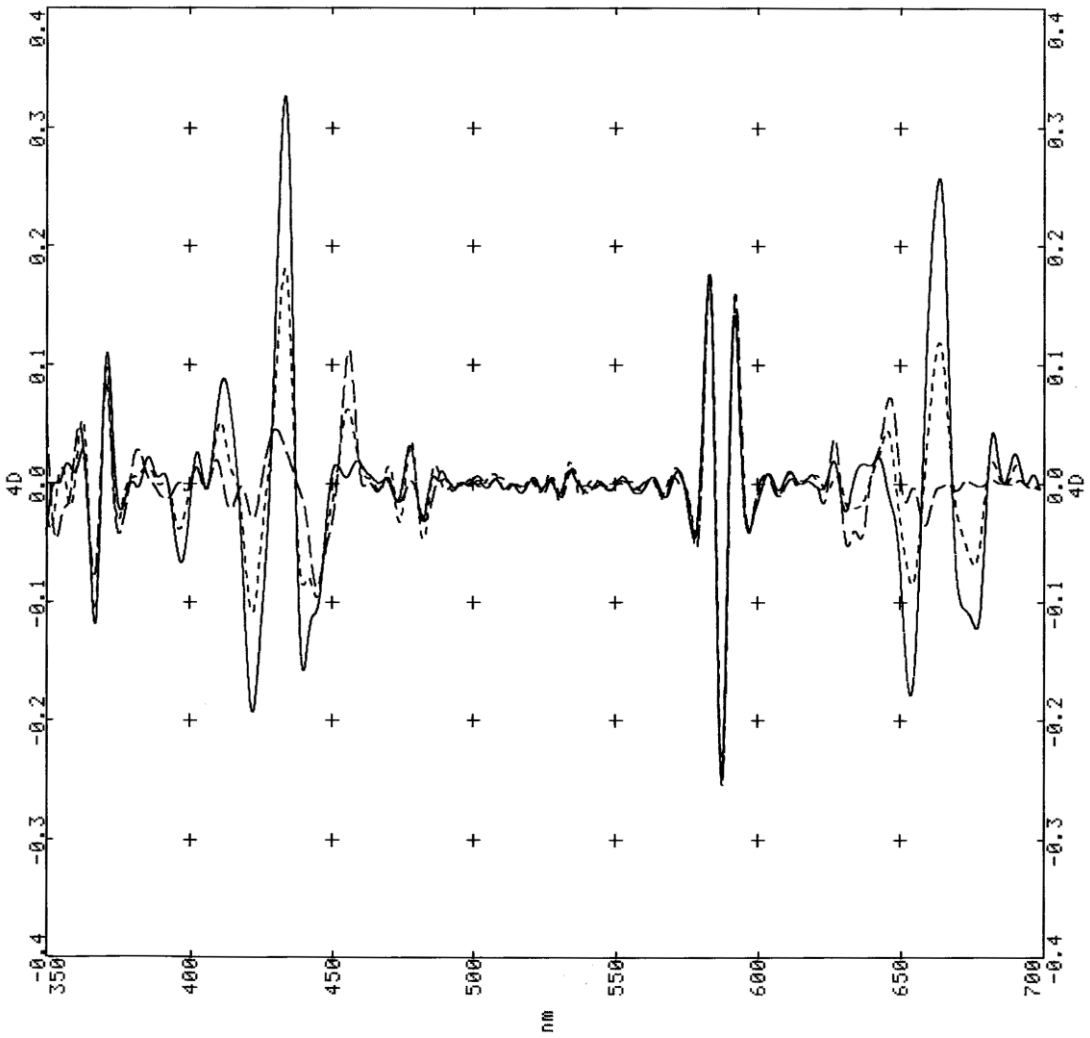
Şekil A.6. Klorofil b için 663.2 nm'deki Absorpsiyon/konsantrasyon grafiği.



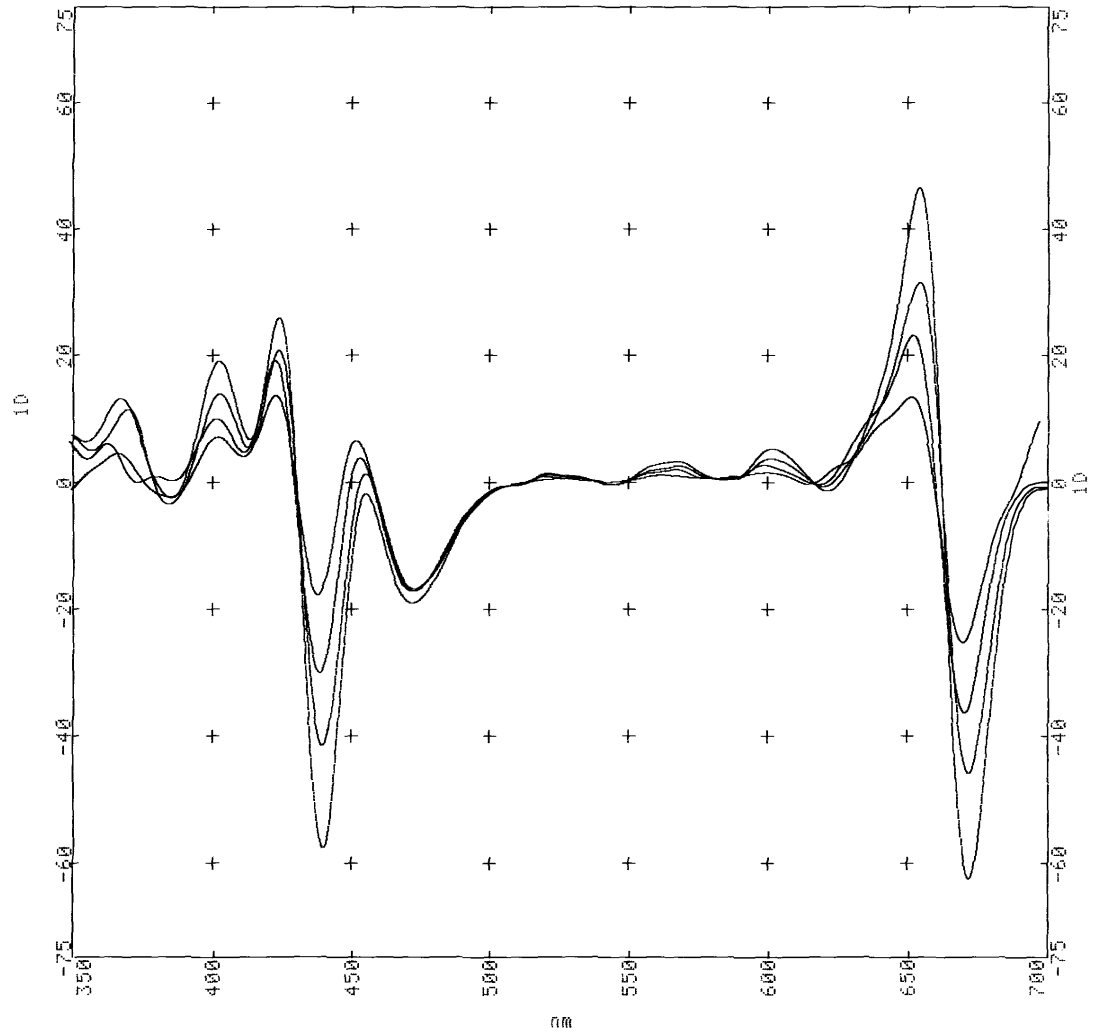
Şekil A.7. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 2.türev spektrumları.(———) Klorofil (a+b), (– – –) Klorofil b, (·····) Klorofil a.



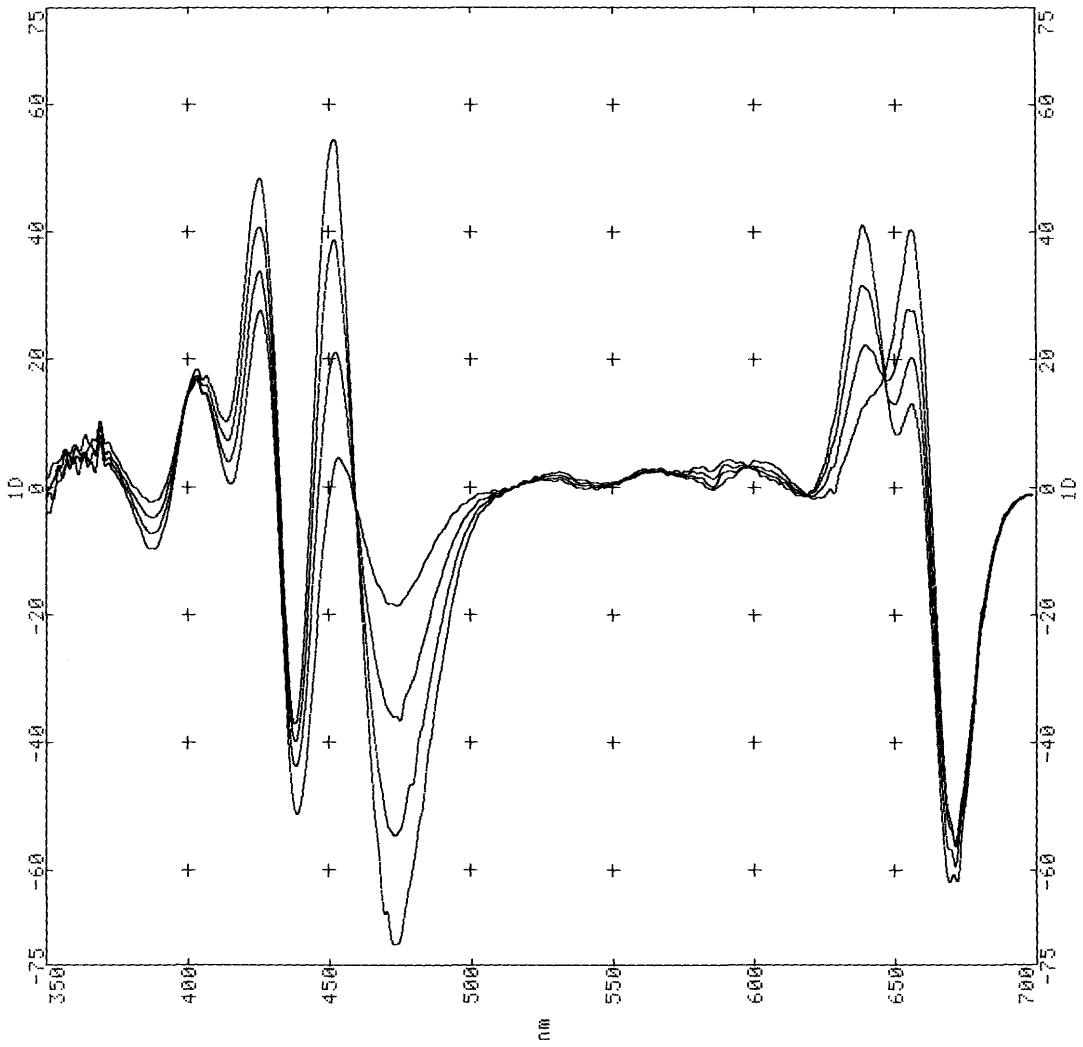
Şekil A.8. 5.6x10^{-6} M Klorofil a, 5.1x10^{-6} M Klorofil b, 2.8x10^{-6} M Klorofil a + 2.55x10^{-6} M Klorofil b çözeltilerinin 3.türev spektrumları.(———) Klorofil a, (– – –) Klorofil b, (·····) Klorofil (a+b).



Şekil A.9. $5.6x10^{-6}$ M Klorofil a, $5.1x10^{-6}$ M Klorofil b, $2.8x10^{-6}$ M Klorofil a + $2.55x10^{-6}$ M Klorofil b çözeltilerinin 4.türev spektrumları.(———) Klorofil a, (– – –) Klorofil b, (·····) Klorofil (a+b).



Şekil A.10. Klorofil a analizi için alınan 1.türev spektrumu. ($10.12x10^{-6}$ M Klorofil b + sırasıyla $5.6x10^{-6}$, $8.4x10^{-6}$, $11.2x10^{-6}$, $14x10^{-6}$ M Klorofil a)



Şekil A.11. Klorofil b analizi için alınan 1.türev spektrumu. ($8.4x10^{-6}$ M Klorofil a + sırasıyla $5.1x10^{-6}$, $10.2x10^{-6}$, $15.3x10^{-6}$, $20.4x10^{-6}$ M Klorofil b

ÖZGEÇMİŞ

Emel Ergün 1978 yılında İstanbul'da doğdu. 2000 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. Aynı sene İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Kimyagerlik programında yüksek lisans öğrenimine başladı.