

**KLOROFİL a ve b ile FEOFİTİN a ve b'nin  
YAPI KARARLILIKLARININ İNCELENMESİ**

**Sedat YURDAKAL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Ağustos - 2003**

**“Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje no: 011069”**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sedat Yurdakal'ın "Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'nin Yapı Kararlılıklarının İncelenmesi" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 14.09.2003 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. Hüseyin BERBER

Üye : : Doç. Dr. Hayrettin TÜRK

Üye : : Yard. Doç. Dr. Mehmet POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun 11.09.2003 tarih ve 29/4. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

**Prof. Dr. Orhan ÖZER**  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
M ü d ü r ü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KLOROFİL a ve b İLE FEOFİTİN a ve b'NİN YAPI KARARLILIKLARININ İNCELENMESİ

SEDAT YURDAKAL

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin BERBER  
2003, 77 sayfa

Bu çalışmada klorofil a ve b ispanak ve çim bitkilerinden saflaştırılması ile ve feofitin a ve b ise klorofil a ve b'nin demetalasyonu ile hazırlanmış, daha sonra bu yapıların çeşitli ortam ve çözücülerdeki kararlılıkları yanında oksidantsız, hidrojen peroksit, tert-bütül hidroperoksit ve sodyum hipoklorite karşı yapı kararlılıkları 30 °C'de ve farklı pH'larda incelenmiştir. Bu klorofil türevlerinin farklı ortam, çözücü ve oksidantlardaki parçalanma kinetiği UV-Görünür bölge taramalı spektrofotometre kullanılarak elde edilen spektrumlardaki Soret pikinin absorbansındaki azalma takip edilerek araştırılmıştır.

Klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin yapı kararlılıkları incelendiğinde direk güneş ışığında hemen bozdukları, direk güneş ışığından uzak aydınlık ortamda daha yavaş ve karanlık ortamda su çözücüsü hariç bozunmadıkları gözlenmiştir. Klorofil türevlerinin farklı pH'larda ve oksidantsız ortamlarda yapı kararlılıkları incelendiğinde, asidik ortamlarda demetalasyonla birlikte porfirin halkalarının parçalanması, bazik ortamlarda ise defitolasyonla birlikte feofitin a hariç asidik ortamdan daha yavaş halka parçalanması gözlenmiştir. Bu oksidantsız ve bazik ortamda feofitin a'nın hidrolizi ile fitol grubunun ayrılması ile oluşan feoforbid a yapısının bozunmadığı gözlenmiştir. Klorofil yapılarının oksidantlara karşı yapı kararlılığı incelendiğinde klorofil a'nın yapı kararlılığının  $\text{NaOCl} < \text{H}_2\text{O}_2 < (\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  yönünde, klorofil b'nin  $\text{NaOCl} < (\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2$  yönünde, Feofitin a'nın  $\text{NaOCl} < (\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2$  yönünde, feofitin b'nin  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2 < \text{NaOCl}$  yönünde arttığı belirlenmiştir. Bu klorofil türevlerinin parçalanma reaksiyonlarının yalancı-birinci dereceden hız denklemine uyduğu belirlenmiş ve hız sabitleri hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Klorofil, feofitin, yapı kararlılığı, kinetik, oksidasyon

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF THE STRUCTURAL STABILITIES OF  
CHLOROPHYLL a AND b AND PHEOPHYTIN a AND b****SEDAT YURDAKAL****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Program****Supervisor: Asst. Prof. Hüseyin BERBER  
2003, 77 pages**

In this study, chlorophyll a and b were purified from grass and spinach, pheophytin a and b were prepared with demetalation of chlorophyll a and b, and then their structural stabilities in different medium and solutions, under nonoxidant condition and toward hydrogen peroxide, tert-butyl hydroperoxide and sodium hypochlorite were studied in various pH's at 30 °C. The degradation kinetics of these chlorophyll derivatives were determined by following the decrease of the Soret band intensities in the UV-Vis spectra.

When chlorophyll a and b and pheophytin a and b were investigated in direct sun light, they were degraded very fast. When they were investigated in indirect sun light, they were degraded slower than in direct sun light, and in darkness no degradation was observed except in water. When chlorophyll derivatives were investigated in different pH's, in nonoxidant medium and in acidic media, they had demetalation and degradation of their porphyrin ring. In addition in basic medium, their phytol group was broken and very slow degradation than in acidic medium except pheophytin a. In basic medium, pheophytin a was hydrolysed and changed into pheophorbide a and it showed non degradation. When chlorophyll derivatives were investigated toward oxidants, their structural stabilities increased as follow  $\text{NaOCl} < \text{H}_2\text{O}_2 < (\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  for chlorophyll a,  $\text{NaOCl} < (\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2$  for chlorophyll b,  $\text{NaOCl} < (\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2$  for pheophytin a,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH} < \text{H}_2\text{O}_2 < \text{NaOCl}$  for pheophytin b. The degradation kinetics of these reactions showed the pseudo-first order rate kinetics and the degradation rate constants were calculated.

**Keywords:** chlorophyll, pheophytin, structural stability, kinetics, oxidation

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalıőmalarımı yapıcı ve eleőtirel olarak yönlendiren danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin BERBER'e teşekkür ederim. Bu çalıőmalarımın yapılabilmesi için maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu yönetimine ve bölüm imkanlarını kullanmamda yardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Lale ZOR'a teşekkür ederim.

Ayrıca Tez savunma jürimde bulunma nezaketini gösteren Sayın Doç. Dr. Hayrettin TÜRK'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet POYRAZ'a ve Őu ana kadar bana emeği geçen tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tüm bunların yanında çalıőmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arő. Grv. Turgay TAY'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sabri ÇEVİK'e, Sayın Arő. Grv. Levent ÖZCAN'a, Sayın Arő. Grv. İlhami ÇELİK'e, Sayın Arő. Grv. Murat ERDEM'e ve tüm arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

**Sedat YURDAKAL**

## İÇİNDEKİLER

|   | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| <b>ÖZET</b> .....   | <b>I</b>     |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>II</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....   | <b>III</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....  | <b>IV</b>    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....  | <b>VI</b>    |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....  | <b>VIII</b>  |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....   | <b>X</b>     |
| <br>  |              |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....   | <b>1</b>     |
| 1.1. Klorofillerin ve Bakterioklorofillerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması.....        | 7            |
| 1.1.1. Doğal Maddelerden Fotosentetik Pigmentlerin Ekstraksiyonu.....                             | 8            |
| 1.1.2. Fotosentetik Pigmentlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Saflaştırılması.....              | 13           |
| 1.1.3. Fotosentetik Pigmentlerin Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması.....                    | 14           |
| 1.1.4. Fotosentetik Pigmentlerin HPLC ile Analizi.....  | 15           |
| 1.2. Klorofillerin Yapı Kararlılıkları.....   | 16           |
| <br>  |              |
| <b>2. DENEYSEL KISIM</b> .....  | <b>29</b>    |
| 2.1. Kimyasal Maddeler ve Reaktifler.....   | 29           |
| 2.2. Aletler ve Analizler.....  | 29           |
| 2.3. Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'nin Hazırlanması.....                                    | 30           |
| 2.3.1. Klorofil a ve b'nin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması.....                                  | 30           |
| 2.3.2. Feofitin a ve b'nin Hazırlanması.....  | 32           |
| 2.4. Klorofil a, Klorofil b, Feofitin a ve Feofitin b'nin Yapı Kararlılıklarının İncelenmesi..... | 33           |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>   | <b>38</b> |
| 3.1. Klorofil a ve b'nin Ekstraksiyonu.....                              | 38        |
| 3.2. Klorofil a ve b'nin Saflaştırılması.....                            | 40        |
| 3.3. Feofitin a ve b'nin Hazırlanması.....                               | 41        |
| 3.4. Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'nin Yapı Kararlılıkları.....    | 41        |
| 3.4.1. Klorofil a ve b'nin Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılıkları..... | 43        |
| 3.4.2. Feofitin a'nın Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılığı.....         | 45        |
| 3.4.3. Feofitin b'nin Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılığı.....         | 47        |
| 3.4.4. Klorofil a'nın Farklı pH' lardaki Yapı Kararlılığı.....           | 49        |
| 3.4.5. Klorofil b'nin Farklı pH' larda Yapı Kararlılığı.....             | 50        |
| 3.4.6. Feofitin a'nın Farklı pH' larda Yapı Kararlılığı.....             | 51        |
| 3.4.7. Feofitin b'nin Farklı pH' larda Yapı Kararlılığı.....             | 52        |
| 3.4.8. Klorofil a'nın Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı.....      | 53        |
| 3.4.9. Klorofil b'nin Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı.....      | 58        |
| 3.4.10. Feofitin a'nın Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı.....     | 62        |
| 3.4.11. Feofitin b'nin Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı.....     | 63        |
| 3.5. Klorofil a ve b'ye Ait Sonuçlar.....                                | 65        |
| 3.5.1. Klorofil a ve b'ye Ait Sonuçlar.....                              | 65        |
| 3.5.2. Feofitin a ve b'ye Ait Sonuçlar.....                              | 66        |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>  | <b>68</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.1.  | Demir(III) protoporfirin IX un yapısı.....   | 2  |
| 1.2.  | Pirofeoforbit a'nın kromik asitle reksiyonu ile bilin türevlerinin oluşumu.....  | 21 |
| 1.3.  | Klorofillerin sıcaklıkla ve ortam asitliği ile meydana gelen bozunma ürünleri.....   | 22 |
| 1.4.  | Klorofil a ve b ile bozunma ürünlerinin yapı formülleri.....   | 23 |
| 2.1.  | Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ait UV-Görünür bölge spektrumları.....   | 36 |
| 2.2.  | Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ait $\ln A = f(t)$ grafiği.....  | 37 |
| 3.1   | Klorofil a'nın Soret bantlarının absorbans şiddetine göre sırasıyla metanol, metanol/su ve petrol eterindeki spektrumları.....         | 44 |
| 3.2   | Klorofil b'nin Soret bantlarının absorbans şiddetine göre sırasıyla petrol eteri, metanol ve metanol/su daki spektrumları.....         | 44 |
| 3.3.  | Feofitin a'nın; su, petrol eteri, metanol, aseton çözücülerindeki spektrumları.....  | 46 |
| 3.4.  | Feofitin b'nin; su, petrol eteri, metanol, aseton çözücülerindeki spektrumları.....  | 48 |
| 3.5.  | Klorofil a'nın $H_2O_2$ ortamında $[OH^-]=1,2$ M'da, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları.....       | 56 |
| 3.6.  | Klorofil a'nın $(CH_3)_3COOH$ ortamında $[OH^-]=1,2$ M'da, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları..... | 57 |
| 3.7.  | Klorofil a'nın $NaOCl$ ortamında $pH=12,63$ 'de, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları.....           | 57 |
| 3.8.  | Klorofil b'nin $H_2O_2$ ortamında $pH=9,02$ 'de, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları.....           | 60 |
| 3.9.  | Klorofil b'nin $(CH_3)_3COOH$ ortamında $[OH^-]=1,2$ M'da, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları..... | 61 |
| 3.10. | Klorofil b'nin $NaOCl$ ortamında $[OH^-]=1,2$ M'da, $30$ °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları.....        | 61 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| 1.1. Klorofil ve bozunma ürünlerinin absorbans ve dalga boyu değerleri.....  | 7  |
| 2.1. Çim ve ıspanak bitkilerinden elde edilen ekstrenin ince tabaka kromatografisi ile yürütülmesi ile pigmentlerin farklı yürütücü fazlardaki hesaplanan $R_f$ değerleri.....           | 31 |
| 2.2. Klorofil a ve b'nin çeşitli çözücülerdeki absorbans değerleri.....  | 32 |
| 2.3. Feofitin a ve b'nin absorbans ve dalga boyu değerleri.....  | 33 |
| 2.4. Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ait absorbans ve zaman verileri....   | 35 |
| 3.1. Klorofil a'nın çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 45 |
| 3.2. Klorofil b'nin çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 45 |
| 3.3. Feofitin a'nın çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 47 |
| 3.4. Feofitin b'nin çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 48 |
| 3.5. Klorofil a'nın farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 50 |
| 3.6. Klorofil b'nin farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....   | 51 |
| 3.7. Feofitin a'nın pH'a karşı bozunma hız sabitleri.....  | 52 |
| 3.8. Feofitin b'nin pH'a karşı bozunma hız sabitleri.....  | 53 |
| 3.9. Klorofil a'nın $H_2O_2$ 'li, NaOCl'li ve $(CH_3)_3COOH$ 'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri.....  | 55 |
| 3.10. Klorofil b'nin $H_2O_2$ 'li, NaOCl'li ve $(CH_3)_3COOH$ 'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin $\lambda_{max}$ değeri..... | 59 |

- 3.11. Feofitin a'nin  $H_2O_2$ 'li,  $NaOCl$ 'li ve  $(CH_3)_3COOH$ 'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{max}$  değeri..... 63
- 3.12. Feofitin b'nin  $H_2O_2$ 'li,  $NaOCl$ 'li ve  $(CH_3)_3COOH$ 'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{max}$  değeri..... 64

## SİMGELER ve KISALTMALAR

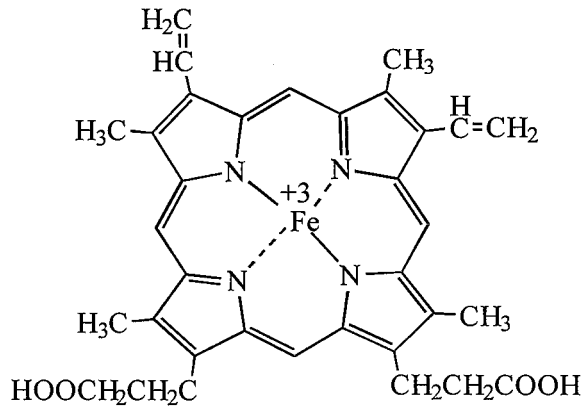
|                         |  |
|-------------------------|--|
| ZnTPP                   | :Çinko tetra fenil porfirin  |
| TPPS <sub>4</sub>       | :meso-tetrakis(4-sülfofenil)porfirin   |
| Triton-x100             | :izooktilfenoksipolietoksietanol   |
| HPLC                    | :Yüksek performanslı sıvı kromatografisi   |
| MnTSPP                  | :5,10,15,20-tetra(4-sülfonatofenil)porfinatomangan(III) klorür (sodyumtuzu)  |
| MnTDCSPP                | :5,10,15,20-tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan(III)klorür (sodyum tuzu)                                 |
| MnTDCSPPBr <sub>8</sub> | :2,3,7,8,12,13,17,18-Oktabromo-5,10,15,20-tetrakis-(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan(III) klorür (sodyum tuzu) |
| MnTSPPBr <sub>8</sub>   | :2,3,7,8,12,13,17,18-Oktabromo-5,10,15,20-tetrakis (4-sülfonatofenil) porfinatomangan(III) klorür (Sodyum tuzu)            |
| FeTDCPP                 | :5,10,15,20-Tetrakis(2,6-diklorofenil)porfinatodemir(III)  |
| FeTPP                   | :5,10,15,20-tetrafenilporfinatodemir(III)  |

## 1. GİRİŞ

Klorofiller ve klorofillerin bozunma reaksiyonları bilim alanında çok geniş yer tutmaktadır. Örneğin bir Rus botanikçisi olan Tswett'in bitki pigmentleri çalışmaları kromatografi biliminin doğmasını sağlamıştır. Biyokimyacılar ve biyofizikçiler klorofille çalışarak fotosentezin mekanizmasını açıklamaya büyük ilgi göstermişlerdir [1]. Yeryüzünde klorofil miktarının belirlenmesi, yeryüzündeki kirliliği ve düzensizliği anlamamızı sağladığından önemlidir. Gıda teknolojisinde de besin maddelerinin bozunmaları ve bu besin maddelerinin bozunmadan uzun süre depolanabilmesi klorofillerin bozunması baz alınarak dolaylı olarak izlenebildiğinden bitkiler, algler ve bakterilerin içindeki klorofillerin bozunma reaksiyonları ile ilgili bir çok çalışma yayınlanmıştır [2-27]. Tüklenen enerji kaynakları nedeniyle, günümüzde ve gelecekte güneş enerjisinin önemi artmakta olup, foto sistemler üzerine pek çok çalışma vardır [28-36]. Porfirin sentezi zor ve zaman alıcı olduğundan, klorofil türevleri porfirin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkilerden ekstre edilerek saflaştırılıp, istenilen porfirin türevleri ve metal kompleksleri incelenmek üzere klorofillerin kullanıldığı yayınlara literatürde rastlanmaktadır [26,37-41].

Katalizörler endüstriyel önemi büyük olan maddelerdir ve birçok kimyasal dönüşümün gerçekleşmesi için katalizöre gereksinim vardır. Katalizör olarak kullanılan maddeler reaksiyon için seçici (spesifik) olup çıkış maddelerine göre çok az miktarda kullanılırlar. Ayrıca kendileri reaksiyon tarafından harcanmayan, reaksiyonun hızını arttıran ve dengenin yönünü değiştirmeyen maddelerdir. Canlı organizmalardaki reaksiyonların yürümesini sağlayan enzimler de birer katalizördür. Enzimler yapısal olarak çok kompleks olup, reaksiyonlarda son derece etkin ve seçicidirler. Doğal katalizörler olan enzimlere göre insan yapısı katalizörler reaksiyonlarda daha az etkin ve seçicidirler.

Bir enzim sınıfı olan Sitokrom P-450 canlı sistemlerde dioksijen ve elektronlar kullanarak hidroksilasyonlara, epoksidasyonlara ve diğer oksidasyonlara etkin ve çok hızlı bir şekilde aracılık eder. Sitokrom P-450'nin aktiflik gösteren merkezinde dioksijeni bağlayan, indirgeyen ve aktif hale getiren demir(III)protoporfirin IX prostetik grubu bulunur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Demir(III) protoporfirin IX un yapısı

Yaklaşık son 30 yıldır Sitokrom P-450'nin aktifliğini canlı sistemler dışında taklit edebilecek bir metal kompleksi olan metallo tetraarilporfirinler üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmalar sırasında mangan, demir, kobalt ve benzeri metaller içeren ve aril grupları ile pirollerin  $\beta$ -konumlarında çeşitli sübstitüentler içeren metallo tetraarilporfirinler sentezlenmiş ve alkenlerin ve alkanların çeşitli oksidantlar ile oksidasyonlarında katalizör olarak kullanılmışlardır [42,43]. Oksidant olarak hipoklorit, iodozilbenzen, hidrojen peroksit, alkil hidroperoksit, persülfat, perklorat, periyodat, ozon, amin N-oksit indirgeyici bir ajanla birlikte dioksijen gibi oksidantlar kullanılmıştır. Ayrıca çok çeşitli reaksiyon koşulları ile bu reaksiyonlarda çeşitli desteklere bağlanmış metallo tetraarilporfirinler de kullanılmıştır. Ancak bütün bu çalışmalar laboratuvar ölçeğinden öteye gidememiş ve bugün metallo tetraarilporfirinlerin endüstride katalizör olarak kullanımı henüz gerçekleştirilememiştir. Bunun nedeni de başta metallo tetraarilporfirinlerin kullanılan oksidantlar tarafından kolayca parçalanmalarıdır. Ayrıca katalitik olarak aktif olmayan  $\mu$ -okzo dimer yapısının oluşması ve N-alkilhemim oluşumu da etkin bir katalizör için istenilmemektedir.

Tetraarilporfirinlerin oksidant tarafından parçalanmaları, fenil gruplarının özellikle orto-konumlarına (C(2) ve C(6)) elektron çeken ve/veya büyük yapı

sübstitüentler yerleştirilerek kısmen de olsa engellenebilmiştir [44-46]. Ayrıca büyük gruplar parçalanmayı güçleştirmenin yanında metallo tetraarilporfirini deaktive hale getiren  $\mu$ -okzo dimerlerin oluşumunu ve pirol halkasının N-alkillasyonu da engellemektedirler [47,48].

Porfirinler aromatik makrosiklik bileşiklerdir. Bir porfirin molekülü 4 pirol halkası içerir. Porfirinin merkezi 4 koordinasyona sahip ligand özelliği göstermesine ve maksimum 3,7 Å yarıçaplı metallerle koordinasyon yapabilmesine olanak verir. Koordinasyon meydana geldiğinde 2 proton piroldeki azottan ayrılır ve 2 negatif yük bırakır. Porfirin halkası çok kararlı olup aromatik özellik gösterir. Porfirinlerin geçiş metalleri ile yaptığı kompleksler çok karardır. Örneğin ZnTPP (çinko tetrafenilporfirin) için kararlılık sabiti  $10^{29}$ 'dır [49].

$\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Ni}^{2+}$ 'nin porfirin komplekslerinin başka bir liganda karşı ilgisi düşüktür. Buna karşın  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  nın porfirin kompleksleri, bir ligantla daha kompleks yaparak 5 koordinasyonlu kare piramit yapı oluşturabilirler.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  gibi bazı kationların porfirin kompleksleri ise 2 tane daha ligantla kompleks yaparak oktahedral yapıda kompleks oluşturabilirler. Porfirinler biyolojik olaylarda önemli roller üstlenirler. Örneğin hem bir Fe-porfirin; klorofil Mg- porfirin; vitamin B<sub>12</sub> kobalt-porfirin kompleksleridir. Günümüzde de doğal porfirinlerin biyolojik aktivitelerini ve formasyonlarını anlamak için çalışılmaktadır. Örneğin klorofil, fotosentezde oksijen transferi ile glikoz depolama gibi hayati önem taşıyan biyolojik proseslerde rol oynarlar [49].

Koordinasyon kimyası perspektifinde porfirin ligantlarının seçicilikleri düşüktür. Atomik yarıçapı 3,7 Å'dan küçük olan tüm metal iyonları porfirinlerle kompleks yapabilir. Benzer komplekslerin biyolojik elektron transferinde, oksijen transferinde ve metalo enzimler için bir model oluşturma üzerinde çeşitli uygulamaları vardır [49].

Bir çok porfirin, metal iyonlarının spektroskopik metotla belirlenmesi için uygun bir liganttır. Bu porfirinlerin en büyük dezavantajı, metaloporfirin oluşma hızının çok düşük olması ve metaloporfinlerin oluşum reaksiyonunda metaloporfirinlerin derişim oranının normalden düşük olmasıdır. Düşük formasyon hızı, porfirin halkasının deformasyonunun güçlüğü nedeniyle. Porfirinlerin pirol azotunda N-alkil ve N-benzil gibi grupların bulunması

durumunda, porfirinler substitüe olmamış analoglarından çok daha reaktiftirler. Pirel azotunun herhangi bir alkillenmesi makrosiklik halka düzleminde bir sapmaya sebep olur ve bu da reaksiyon hızının daha hızlı olmasının sebebidir [49].

Organik ligantlarla birlikte imidazol veya bipiridin gibi  $\pi$  elektron bulutuna sahip moleküller ve L-triptofan molekülü, metalporfirin oluşumunu arttıran bir eğilim gösterir. Örneğin triptofan varlığında  $Zn^{2+}$  ile TPPS<sub>4</sub> (meso-tetrakis(4-sülfofenil)porfirin)'in kompleksleşme hızı, yokluğuna göre 100 kat daha hızlıdır [49].

Spektroskopik ligant olarak kullanılan porfirinlerin metal iyonların belirlenmesinde karşılaşılan bir problem, ligantın spektrumunun sık sık bu metal şelatlarla çakışmasıdır. Bu girişimleri engellemenin bir yolu, asidifikasyonla serbest ligantın spektrumunu kullanmaktır.  $Cu^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  gibi iyonlarla kararlı metalporfirinler oluştuğunda, asidik ortamda çözünmezler ve ligantın absorblamadığı bölgede kuvvetli bir absorpsiyon bantı verirler. Bu sorunun çözümünde ikinci bir yaklaşım,  $Pb^{2+}$ 'nin serbest ligantın fazlası ile yapacağı şelatın spektral değişiminden yararlanarak gerçekleştirilmesidir. Bu özellik  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  veya  $Zn^{2+}$ 'nin metalporfirinleri gibi asidik ortamda çözünmeye meyilli olan komplekslere de uygulanabilir. Spektral girişimlerden sakınmanın bir diğer yolu ise; absorpsiyon bantı ile kompleksinin absorpsiyon bantı çakışmayan N-substitüe porfirin kullanmaktır [49].

Bir çok metalporfirin, yüksek kararlılıkları ve katalitik davranışları nedeniyle kimyasal analizlerde çeşitli uygulamaları vardır. Atık sulardaki siyanürün dolaylı bir şekilde spektroskopik belirlenmesi, gümüş iyonu ile tetrakis (1-metil-2-piridin) porfirinin inhibisyon reaksiyonu temel alınarak bulunabilir. Tetrakis (4-aminofenil) porfirin ve 5-(4-aminofenil) terakis (4- (piridin)-porfirinin nitrat iyonu ile diazolaşma reaksiyonunun temeli, nitritin spektroskopik olarak belirlenmesinde spesifik olarak geliştirilmiştir. Tetrakis(1-metil-4-piridin)porfirin ile Fe(III) kompleksi, hidrojen peroksitin spektroskopik olarak belirlenmesi için kullanılabilen indamin boyar maddesi için katalizör olarak uygulanılmıştır. Oxo[tetra (4-piridin)porfirinato]titanyum (IV) kompleksi, hidrojen peroksit ve okzalot iyonlarının eser miktarlarının belirlenmesi için kullanılabilir.

Hidrojen peroksitin belirlenmesi için bir yöntem, TPPS<sub>4</sub> ile Mn(III) kompleksinin sabitlenmesi ile katalitik verimi temeline dayandırılmıştır [49].

Metaloporfirinler, C<sub>n</sub> dönme eksenine dik dört tane C<sub>2</sub> eksenine ile yatay ayna düzlemine sahip olduğu için D<sub>4h</sub> simetrisine sahiptirler ve bu yüzden iki tane Q (soret) bandı ve iki tane de B ayırık bantları içerirler. Soret bantı 350-453 nm arasında gelirken, B bantı 500-700 nm arasında gelmektedir. Ayrıca Soret bantının molar absorptivitesi 10<sup>5</sup>'lerdedir. Klorofil a ve feofitin a D<sub>4h</sub>'dan daha düşük bir simetriye sahiptir. Bu yüzden bu moleküllerin spektrumunda 4 tane eksitasyon (uyarılma) bantı bekleriz. Klorofil a yapısı fitol zinciri bulunduğunda, bulunmadığı duruma göre spektrumları çok benzer olmaktadır. Fitol grubu nedeniyle klorofil a, 490 nm'de zayıf bir pike sahiptir. Klorofil a'nın onuncu spektrumu 442 nm'de gelirken, fitol zincirini kaybettiğinde bu spektrum 421 nm'ye kayar [50].

Feofitin a ile klorofil a'nın spektrumları kıyaslandığında klorofil a'nın birinci Q bandı hesaplamalara göre % 50 daha şiddetlidir. Ayrıca feofitin a'nın 500 nm bölgesinde bulunan iki tümsek klorofil a'daki gibi ayırık değildir. 320-450 nm bölgesinde 4 ayırık pik varken, feofitin a'da 2 tanedir [50].

Tatlı sulardaki klorofil a ve b'nin spektrofotometrik metodla belirlenmesini misel oluşumu temelinde inceleyen bir çalışmada klorofil a ve b'nin floresans değerleri sırasıyla, 431, 673 nm ve 462, 654 nm olduğu belirtilmiştir. Klorofillerin suda çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle Triton-x100 (izooktilfenoksipolietoksietanol) yüzey aktif maddesinin klorofil çözeltisine eklenmesiyle, misel oluşumu sonucu floresans spektrumunda önemli bir artış görülmüştür. Ayrıca çözeltilerde misel oluşumu klorofil a için 0,6 mM, klorofil b için 0,4 mM derişimlerinde olması gerektiği bulunmuştur [51].

Misel oluşumunu, asit ve ısı muamelesiyle yapılan ıspanak ekstresinde ve ZnCl<sub>2</sub> muamele edilmiş ıspanak ekstresinde inceleyen bir çalışmada miselleşme ayrıntılı bir şekilde klorofillerde, feofitinlerde ve Zn-feofitinlerde incelenmiş, klorofil a'nın asit ve ısı muameleli ıspanak ekstresinde klorofil b'den daha düşük derişimlerde miselleştiği buna karşın ZnCl<sub>2</sub> muamele edilmiş ekstre ortamında bu durumun tersini gösterdiği bulunmuştur [26].



Tatlı sulardaki klorofil a ve b'nin spektrofotometrik belirlenmesini misel oluşumu temelinde inceleyen bir çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir [51]: % 1 aseton içinde klorofiller 5-65 °C arasında çalışıldığında klorofil a'nın spektrumu 20°C'ye kadar artmış, 65°'ye kadar ise sabit kalmıştır. Buna karşın klorofil b'nin sıcaklık artışına karşılık floresans değeri yavaşça azalmıştır. Triton-X100 ile yapılan kararlılık çalışmalarında ise floresans şiddeti bir saat kadar değişmemiştir [51]. Klorofiller ile yapılan çalışmalarda Triton-X100, klorofillerin suda çözünürlüğünü arttırmak için kullanılmaktadır [51,52].

Klorofil türevlerinin çeşitli çözücülerdeki UV-Görünür bölge spektrumlarının absorbans değerleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Klorofil türevlerinin ve izomerlerinin UV-Görünür bölge spektrumları absorpsiyon ve dalga boyu değerleri

| No | Pigment       | Çözücü      | Absorbans (nm) | Ref.  |
|----|---------------|-------------|----------------|-------|
| 1  | Klorofil a    | Dietil eter | 430, 662       | 35    |
|    |               | Dietil eter | 430, 615, 661  | 6     |
|    |               | Aseton      | 428, 616, 662  | 6     |
| 2  | Klorofil a'   | Dietil eter | 428, 614, 661  | 6     |
|    |               | Aseton      | 428, 616, 662  | 6     |
| 3  | Klorofil b    | Dietil eter | 453, 643       | 35    |
|    |               | Dietil eter | 453,593,642    | 6     |
|    |               | Aseton      | 454, 596, 644  | 6     |
| 4  | Klorofil b'   | Dietil eter | 453, 592, 642  | 6     |
|    |               | Aseton      | 454, 596, 644  | 6     |
| 5  | Feofitin a    | Dietil eter | 408, 667       | 35    |
|    |               | Dietil eter | 408, 503, 667  | 6     |
|    |               | Aseton      | 410, 468, 668  | 6     |
| 6  | Feofitin b    | Dietil eter | 525, 599, 654  | 35    |
| 7  | Klorofillid a | Dietil eter | 428, 662       | 6, 35 |
|    |               | Aseton      | 428, 616, 652  | 6     |
| 8  | Klorofillid b | Dietil eter | 458, 594, 653  | 35    |
| 9  | Feoforbit a   | Dietil eter | 408, 665       | 35    |
|    | Feoforbit b   | Aseton      | 430, 523, 656  | 35    |

### 1.1. Klorofillerin ve Bakterioklorofillerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması

Klorofiller ve bakterioklorofiller alg, bakteri ve bitkilerde fotosentezden sorumlu porfirin yapısında pigmentlerdir. Bu pigmentler porfirin yapısında ve merkezinde magnezyum atomu içermekle birlikte, diğer porfirinlerden farklı olarak beşinci (E) izosiklik karakteristik halkaya ve fitol grubuna sahiptirler. Bitkilerdeki en önemli klorofil türleri klorofil a ve klorofil b olup, bu pigmentlerin bitkilerdeki oranı sırasıyla yaklaşık 3:1'dir [6,53,54]. Yapraklar, algler ve bakteriler sadece klorofil türevlerini değil, karetenoid ve ksantofil gibi yardımcı pigmentleri de içerirler. Bu pigmentler için kromatografik yöntem seçimindeki

güçlük klorofillerin kararsız oluşu nedeniyle bozunabilirliklerinden ve zincir reaksiyonları verebilmelerinden kaynaklanır. Örneğin zayıf asitle klorofil muamele edilirse merkez atomu yerinden çıkarabilir ve ayrıca trans esterleşme veya fitolün hidrolizi ile üçlü kromatografik banda sebep olabilir. Oksijenin varlığında bazla muamele edildiğinde ise çeşitli kimyasal değişimler görülebilir. Yapılan çalışmalarda hangi kromatografi türünün seçileceği spesifik ihtiyaca bağlıdır. Bu amaç klorofilin basitçe belirlenmesi, çeşitli su örneklerinde çevresel ihtiyaca göre belirlenmesi, analitik saflıkta eldesi veya miligramdan grama kadar büyük miktarlarının izolasyonu olabilir [53].

Klorofillerin saflaştırılması için ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi ve HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) en uygun metotlardır. Bu metotlarla saflaştırılan klorofiller daha sonra spektroskopik veya florometrik metotlarla kanıtlanır. Yaprak pigmentlerinin ilk kez saflaştırılması Tswett'in çalışmalarında sunulmuştur. Ayrıca pigmentlerin renklerine göre dağılımları, kolon kromatografisi adı altında yeni bir saflaştırma metodunun oluşmasını sağlamıştır [53].

### **1.1.1. Doğal Maddelerden Fotosentetik Pigmentlerin Ekstraksiyonu**

Pigmentlerin ekstraksiyonunda çok yaygın olarak aseton, metanol veya etanol kullanılır. Bununla birlikte kloroform, dimetil sülfoksit veya petrol eteri de kullanılmaktadır. Literatürdeki çalışmalara göre metanolün çözücü olarak kullanılması çeşitli problemlere neden olmaktadır. Örneğin metanolün kullanılması durumunda klorofillerin aktivasyonu ile klorofillerin bozunması gerçekleşir [7].

Çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinde aseton ve metanolü kıyaslayan bir çalışmada metanolün prob sonifikasyon yönteminde çok iyi sonuç verirken; aseton kullanarak both sonifikasyon, mikser ve havanda ezilerek yapılan ekstraksiyon yöntemlerinde metanolden çok daha üstün olduğu görülmüştür [7].

Klorofiller ile ilgili yapılan çalışmalarda klorofiller en çok ıspanaktan izole edilmiştir [1,5,8,16,26,55-59]. Bunun nedeni ıspanağın yüksek bir oranda

klorofilleri içermesidir. Örneğin kuru ıspanağın % 1'ini klorofiller teşkil eder [60].

İspanağın dondurularak proteinlerden uzaklaştırılması ile ekstraksiyonu yapılan bir çalışmada ekstraksiyon ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır [8]: Dondurularak kurutulan ıspanaklar havanda ezilerek toz haline getirilmiş daha sonra tekrar suda çözülerek (ıspanak:su, 1:9 v/v) bir gün bekletilmiştir. Bu çözeltiliye 4 ml soğuk aseton katılıp suda çözünmeyen proteinlerin santrifüjleme ile çöktürülmesi sağlanmıştır. Ekstre  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika karanlıkta saklanıp sonifikasyonla proteinlerle birlikte çökmüş olan klorofillerin çözeltiliye geçmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan ekstrenin hemen analizi yapılması veya  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de maksimum 48 saat bekletilmesi önerilmektedir.

Nematic (ipliksi) bir sıvı kristal içindeki klorofil a'nın konum ve hareketini inceleyen bir çalışmada Terpstra ve Lambers tarafından tanımlanan ekstraksiyon metoduyla klorofil a ıspanaktan ekstre edilerek, ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılan bir çalışma yayınlanmıştır [56].

Paralel Faktör (PARAFAC) yöntemi ile ıspanak ekstaktındaki klorofil a ve b'nin bozunma kinetiğini inceleyen bir çalışmada klorofillerin ekstraksiyonu; damarlarından arındırılmış 20 g kadar ıspanak numunesi ince şeritler halinde kesildikten sonra uygun miktarda asetonda 30 dakika kadar havanda ezilerek gerçekleştirilmiştir [1].

İspanaktan ince tabaka kromatografisi ile yapılan bir pigment belirleme işlemi şöyle gerçekleşmiştir [61]: Derin dondurucuda dondurulan ıspanaklar, soğuk asetonla havanda hızlı bir şekilde öğütülerek santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım bir ayırma hunisine alınarak üzerine hekzan ve su eklenmiştir. Aseton ve sudan oluşan faza pigmentlerin alınması ile ekstraksiyon tamamlanmıştır.

Çilek meyvesindeki klorofillerin bozunmasına peroksidaz enzim aktivitesinin etkisini inceleyen bir çalışmada klorofil a ve b'nin hazırlanması için yapılan ekstraksiyon işlemi şöyle hazırlanmıştır [16]: Birkaç ıspanak yaprağı 60 ml aseton içinde mikserle homojenize edilmiş ve vakumda süzülmüştür. Bu süzüntü ayırma hunisine alınarak 50 ml petrol eteri ve 50 ml doygun NaCl çözeltisi eklenmiş ve eter fazı diğer fazlardan ayrılıp, 2 kez doygun NaCl çözeltisi ile yıkanarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Lahana ekstresindeki klorofillerin bozunmasına klorofilliz ve polifenol oksidaz enzimlerinin aktivitesini inceleyen bir çalışmada ekstraksiyon işlemi şöyle gerçekleştirilmiştir [19]: Lahana yaprakları yıkanarak süzgeç kağıtları arasında kurutulmuş ve 4 °C sıcaklığındaki % 80 aseton (suda) eklenerek mikser yardımıyla hamur haline getirilmiştir. Süzgeç kağıdı arasından süzülüp ayırma hunisine konulan ekstre üzerine dietil eterle distile su eklenmiştir. Sonra su ve asetonun oluşan faz atılmış ve su ile birkaç kez eter fazı yıkanmıştır. Daha sonra eter fazına Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile eterin suyu kurutularak ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

Zeytin meyvesindeki klorofil ve karatonoid türevlerindeki değişimi inceleyen bir çalışmada zeytin meyvesindeki pigmentlerin ekstraksiyonu şöyle gerçekleştirilmiştir [2]: Pigmentler çekirdeği çıkartılıp homojenize edilen zeytinden dimetil formamid ile Minguez-Mosquera ve Garrido Fernandez metoduyla ekstre edilmiştir. Bu metot ekstredeki pigmentlerin dimetil formamid ile hekzan fazındaki farklı çözünürlüklerine dayanır. Hekzan fazında yağlar, karotenler ve diesteriye ksantofiller yer alırken; dimetil formamid fazı klorofillerle serbest ve mono esterifiye ksantofilleri içerir. Karatonoidler sabunlaşma ile esterifiye ksantofillerden ayrılmıştır. Daha sonra ince tabaka kromatografisi ile izole edilecek olan dimetil formamid fazındaki pigmentler 100 ml dietil eterde çözülmüş, % 20 KOH (metanolde) ile bir saat muameleden sonra distile su ile faz ayrımı oluşturulmuştur. Böylece pigmentler eter fazına geçerken sabun formları sulu fazda yer almıştır. Eter fazı üç kez su ile yıkanmış, üç kez de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile nötrleştirilmiştir. Daha sonra 30 °C'nin altında bir sıcaklıkta kuruluğa kadar derişikleştirilmiş ve -30 °C'de karanlıkta saklanmıştır. Bu çalışmada tüm işlemler yeşil ışık altında yapılmıştır.

Zeytindeki klorofil bozunmasını inceleyen başka bir çalışmada da klorofil a ve b yine ıspanaktan asetonla ekstre edilmiştir [5].

HPLC ile tallus alglerinden klorofillerin ve karotenoidlerin kromatografisini inceleyen bir çalışmada, tallus alglerinden yapılan ekstraksiyon şöyle gerçekleştirilmiştir [3]: Tallus algleri birkaç saniye içinde Whatman marka süzgeç kağıdı ile kurutulmuş ve tartılmıştır. Tallus alglerindeki pigmentlerin foto oksidatif bozunmalarını önlemek için soğuk ve karanlık bir ortamda, klorofilin

bozunma olasılığına karşı, bunu önlemek için de küçük bir miktar  $MgCO_3$  eklenmiştir. Daha sonra tallus algleri % 100 asetonla renksiz kalıncaya kadar ekstre edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ekstre 25 °C'de derişikleştirilip küçük bir hacim organik çözücünde çözümlüp uygun bir kromatografik metotla analizi yapılacak duruma getirilmiştir.

Sararan yapraklardaki klorofillerin değişimini inceleyen bir çalışmada aseton:metanol (3:1 v/v) karışımı kullanarak ilk ekstraksiyon yapıldıktan sonra ortam pH= 4'e tamponlanmış ve ikinci ekstraksiyon metilen klorür ile yapılmıştır [20].

Yerba Mate bitkisinin kurutulması ve kesilmesi işlemlerinden sonra zamanla klorofil a ve b'nin bozunmasını inceleyen bir çalışmada ekstraksiyon işlemi şöyle gerçekleştirilmiştir [62]: 1 gram yerba mate bitkisi üzerine 10 ml % 80 aseton (suda) çözeltisi ilave edilerek 25 °C'de ultrasonik banyoda 5 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra gözenek boyutu 0,22 µm olan şırınga süzgeci ile ekstre süzülerek kromatografi için hazır hale getirilmiştir.

Brokoli ekstresinin sıcaklık ile bozunmasını ve renk değişimini inceleyen bir çalışmada brokoli suyundan klorofillerin ekstraksiyonu, % 80 aseton kullanarak karanlık ortamda yapılmıştır [6]. Ekstre 15 dakika sonra süzülüp santrifüj edilerek işlem tamamlanmıştır.

Tatlı sulardaki klorofil a ve b'nin spektrofotometrik olarak misel oluşumunu arttırarak belirlenmesini inceleyen bir çalışmada, deniz ve tatlı sularda klorofil a ve b'nin belirlenmesi filtrasyon işleminden sonra bir organik çözücü yardımıyla (genellikle % 90 aseton (suda)) ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir [51].

Klorofil a'nın fotooksidasyon kinetiğini inceleyen bir çalışmada klorofil a, klorofil b'yi çok az içeren mutasyona uğramış klorina f2 alginden % 80 aseton (suda) kullanılarak ekstre edilmiştir [28].

Alg gelişimi sırasında inhibisyon testlerinde floresans metotla pigment miktarını belirlemeyi inceleyen bir çalışmada pigmentlerin ekstraksiyonu, dimetil sülfoksit /aseton karışımıyla alglerden ekstre edilmiştir [27].

Klorofil a'nın deniz suyunda ve sediment içinde bozunmasını inceleyen bir çalışmada, klorofil a % 100 aseton kullanılarak sedimentten ekstre edilmiştir [63].

Bakterioklorofil g'nin klorofil a'ya ışık etkisiyle izomerizasyonunu inceleyen bir çalışmada da pigmentler H. Chlorum'dan ekstre edilmiştir [64].

Brokoli bitkisindeki klorofillerin antioksidant enzim aktivitesi ile değişimini inceleyen başka bir çalışmada ise, pigmentlerin bu bitkiden ekstraksiyonu % 85 aseton kullanılarak gerçekleştirilmiştir [18].

Arpa yapraklarının yeşillenmesi sırasında fotosentetik pigmentlerin HPLC ile değişimini inceleyen bir çalışmada, arpa yapraklarından pigmentlerin ekstraksiyonu, aseton/metanol (1:1, v/v) karışımı kullanılarak yapılmıştır [38].

Bakteriler fotosentetik pigmentlerini sadece aseton veya metanol gibi bir organik çözücü yardımıyla muamele edilerek çözücü fazına bırakırlar. Buna karşın bir alg olan spirulina maxima bu şekilde bir muamelede klorofil a'yı çözücü fazına vermekte direnir. Bu alg'in dondurulması ve daha sonra asetonda kaynatılması ile pigmentler ekstre edilebilir. Bu ekstraksiyon çok enerjik bir ortamda yapılmamalı ve klorofilin 10-hidroksi türevi ile aynı ortamda bulundurulmamalıdır. Spirulina maxima alginin en büyük üstünlüğü sadece klorofil a'yı içermesidir. Bu yüzden bu alg'den klorofil a büyük miktarlarda izole edilebilir [53].

Klorofillerin spektroskopik olarak belirlenmesinde ve ekstraksiyonundaki problemleri inceleyen bir çalışmada epilitik mikrobial biyofilmlerdeki pigmentlerin ekstraksiyonu için en etkili çözücünün metanol olduğu bulunmuştur. Epilitik mikrobial biyofilmlerdeki pigmentlerin bir ekstraksiyonu işleminde saf metanol kullanılarak, toplam klorofillerin % 96'sı ekstre edilebilirken, sıcak etanolle % 86'sı ve asetonla ise % 50'den daha azı ekstre edilebilmiştir [65].

Bazı çalışmalarda ekstraksiyondan sonra klorofiller dioksanla çöktürülerek diğer pigmentlerin çoğundan ayrılıp, daha sonra kendi aralarında ayrımları gerçekleştirilmiştir [53,66,67]. Bu şekilde ön saflaştırma işlemi, önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca mavi ve yeşil algler sadece klorofil a'yı içerdiğinden, klorofil a'nın bu alglerden eldesi daha kolay gerçekleştirilebilmektedir.

### 1.1.2. Fotosentetik Pigmentlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Saflaştırılması

İnce tabaka kromatografisinde adsorban olarak şeker veya selüloz kullanılarak, kağıt kromatografisine benzer bir ayırım yapılabilir. Adsorban olarak silikajel kullanılması ile klorofilin bir kısmı magnezyum atomunu kaybederek feofitin oluşabilir. Ancak bu durum klorofillerin belirlenmesi için bir avantaj oluşturmaktadır [53].

İnce tabaka kromatografisi metoduyla klorofiller ve türevlerinin ters faz adsorban kullanılarak saflaştırılması bir çok makalede yayınlanmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir [2,5,20,28,29,53,54,56].

Klorofil a ve b epimerleri ve bakterioklorofillerin çeşitli alkollerle esterleşmesiyle oluşan yapılar ince tabaka kromatografisinde trigliserid ve bitki yağı ile doyurulmuş selüloz tabakasından ayrılmıştır [53].

İnce tabaka kromatografisinde klorofillerin ve diğer pigmentlerin belirlenmesi için, çözücü karışımı olarak petrol eteri / aseton / dietil amin (10:4:1, (v/v/v)) kullanılmış; GF<sub>254</sub> silikajel 0,7 mm kalınlığında 20x20 cam plaka üzerinde absorblandırılarak hazırlanan plakalarla yapılan saflaştırma yöntemi bir çok çalışmada kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [2,5].

İspanaktan ince tabaka kromatografisi ile yapılan bir pigment belirleme çalışmasında ekstre edilen pigment çözeltisi ince tabaka kromatografisinde % 70 hekzan, % 30 aseton varlığında yürütülmüş ve iyi bir ayırım gerçekleştirilmiştir. Silikajel plakada yürüyen pigmentler sırasıyla karotenler, feofitin a, feofitin b, klorofil a, klorofil b ve üç spot ta ksantofiller şeklinde sıralanmıştır [61].

Sararan yapraklardaki klorofillerin bozunmasını inceleyen bir çalışmada pigmentlerin saflaştırılması, silikajel adsorblanmış tabaka yardımıyla ince tabaka kromatografisi metoduyla gerçekleştirilmiştir [20]. Bu işlemde yürütücü faz olarak metilen klorür:aseton:metanol (8:1:1, v/v/v) kullanılmıştır.

Olgun elma meyvesindeki pigmentlerin fotokararlılık çalışması içinde pigmentlerin saflaştırılması ince tabaka kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [29]. Pigmentler, silikajel adsorblandırılmış plakalarda



aseton/hekzan/benzen (10:20:1, v/v/v) yürütücü fazında yürütülerek saflaştırılmıştır.

### 1.1.3. Fotosentetik Pigmentlerin Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Kolon kromatografisi daha fazla miktarda saf pigment elde etmek için kullanılmaktadır. Kolon kromatografisinde pigmentlerin saflaştırılması için daha çok toz haline getirilmiş şeker kullanılmaktadır [66]. Elüsyonda petrol eteri en az polariteli çözücüdür. Buna benzen veya daha küçük molekül ağırlıklı alkollerin eklenmesi klorofilleri karatonoidlerden ve diğer pigmentlerden ayırır. Kolon kromatografisinde adsorban olarak polietilen kullanıldığında ise elüsyon sırası tersine döner. Böyle bir kolona % 80 aseton (suda) çözeltisindeki yaprak ekstresi yüklendiğinde ise klorofil a ve b karotenlerden önce gelerek saf olarak ayrılırlar [53].

Çilek meyvesindeki klorofillerin bozunmasına peroksidaz enzim aktivitesinin etkisini inceleyen bir çalışma kolon kromatografisi ile yapılmıştır [16]. Bu çalışmada ıspanaktan ekstre edilen pigmentlerin aseton:hekzan (1:20, v/v) yürütücü fazında şeker kolonunda yürütülerek saflaştırılmaları gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde yapılan işlemde klorofil a ve b sırasıyla % 98 ve % 93 saflıkta elde edilmiştir.

Çeşitli çözücülerdeki klorofil a'nın floresans sistemlerin modifiye Kennard-Stepanon analizini inceleyen bir çalışmada klorofil a, ıspanaktan izole edilmiş ve sabit fazı şeker olan kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır [57].

Bir çok çalışmada, yaprak ekstresini kolondan yürütmeden önce dioksanla muamele edip, klorofilleri çözünmeyen polimerik yapı haline dönüştürülerek diğer pigmentlerin çoğundan ayrılması sağlanmıştır [53,66,67]. Bu şekilde yapılan bir ön işlem, saflaştırma için önemli bir avantaj oluşturur.

Feoforbit a ve b ile feofitin a ve b'nin 20 g'a kadar büyük miktarlarının saflaştırılmasında Girad'ın T belirteci  $(H_2N-NH-COCH_2N^+(Me)_3)$  kullanılmaktadır [53]. Bu belirteç, bu pigmentlerin b serileri (karbonil grubuna sahip olduğu için) ile kompleks yaparken, a serileri ile kompleks yapmadığından a serileri kolondan daha hızlı geçerken, b serilerinin tutulma süreleri artarak,

birbirlerinden ayrımları sağlanır. a serileri kolondan ayrıldıktan sonra çok polar çözücü kullanarak, b serilerinin de kolondan ayrılmaları sağlanır ve daha sonra da kompleks eski haline dönüştürülür.

#### 1.1.4. Fotosentetik Pigmentlerin HPLC ile Analizi

Son yıllarda pigment analizlerinde HPLC önemli bir yer tutmakta olup en yaygın kullanılan ve en iyi sonuçların elde edildiği metottur. Ters faz destekle C<sub>18</sub> kolonları kullanılmakla birlikte, özellikle basamaklı elüsyon kullanılması çok iyi sonuçlar vermektedir [3,8,14,15,17,21,23,28,26,51,53,56,58,59,62,63,66].

HPLC ile yapılan bir çalışmada  $\beta$  karoten ve klorofillerin ayrılması mikroPaksilika ve ters faz  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> kolonuyla veya basit sepPak filmi ile belirlenmiştir. Analiz birkaç dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştirilmiştir [53].

Silikajel kolonlu izokrotik HPLC'de 20-25 mg kadar klorofil a , a' ve b , b' ve benzer feofitinler hızlı bir şekilde ayrılmıştır. Ayrıca mavi ve yeşil alglerden alınan ekstredeki klorofil a'nın dioksanla muamelesi ile dioksan kompleksi yapılarak çöktürülmüş, ve daha sonra da  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> kolonlu HPLC ile saflaştırılarak diğer standart metotlarla kıyaslanmıştır. Ayrıca dioksan komplekslerinin HPLC'si klorofil a ve b'nin ayrılması ve belirlenmesinde kullanılmıştır [53].

HPLC'de A C<sub>10</sub> ters faz kolonu klorofil a ve b'nin radyo kimyasal olarak belirlenmesi ve saflaştırılması için kullanılmıştır [1]. Bu metotta diğer kromatografi metotlarındaki kadar girişim ve engelleme görülmez.

Yapılan bir HPLC analizinde klorofil a ve b, klorofil izomerleri, feofitin a ve b,  $\alpha$  ve  $\beta$  karoten, rutein, violaksantin, lutein-5,6-epoksit, antreksantin, neoksantin ve çeşitli karotenler kısa bir zamanda bir enjeksiyonla ayrılmıştır [53]. Klorofil a, 17 pigmentin bulunduğu ekstretenin içinden, C<sub>18</sub> kolonlu izokrotik HPLC kullanılarak çok saf olarak elde edilmiş ve florimetrik yöntemle kanıtlanmıştır. Bu yöntemde 50  $\mu$ g/L standardın, 10 kez tekrarlanan ölçümleri % 3 doğrulukta ve belirlenme sınırı klorofil a için 84 pg bulunmuştur. Belirli hızlarda benzer ayrımlar başarılı bir şekilde yapılmış olmakla birlikte, floresans seçiciliği pmol aralığında belirlenmiştir.

Çerimoya (*annola cherimola*) meyvesinin depolanması süresince bozunmasını inceleyen bir çalışma, fotodiyot dedektörlü ters faz HPLC kromatografisi kullanarak incelenmiştir [14]. Bu çalışmada doğrusal elüsyonla metanol, aseton ve amonyum asetat çözücü karışımında klorofillerin ve bozunma ürünlerinin (klorofil, klorofillid, feofitin ve feoforbit pigmentlerinin a ve b yapıları) analizi yapılmıştır.

## 1.2. Klorofillerin Yapı Kararlılıkları

Yapı kararlılığı üzerine yapılan çalışmalarda bir porfirin olan klorofillerin yapı kararlılıklarına ilişkin ayrıntılı çalışmalar bulunmamaktadır. Ancak porfirinlerle özellikle oksidasyon katalizörü olarak kullanılmaları sırasında yapı kararlılıklarına ilişkin bazı yayınlarda nitel veya nicel bazı değerlendirmelere rastlanmaktadır. Metallo tetraarilporfirinlerin oksidantlar tarafından parçalanmaları genellikle oksidantın, tetraarilporfirinin *meso* konumundaki karbonlarına saldırması veya oksitlenmiş metalden oksijenin liganta aktarılması sonucu olmaktadır. Ayrıca liganttaki azotların da oksitlendiği görülmektedir [68].

Klorofiller asidik ortamda Mg atomunu iki hidrojen atomuyla yer değiştirerek feofitine dönüşürler. Buna karşın bazik ortamda ise hidrolize uğrayarak fitol grubundan ayrılırlar [10,60,69]. Klorofillerin asit-baz etkisi dışında enzimatik, sıcaklık etkisi, ışık etkisi ve moleküler oksijenin etkisi gibi etkenlerle bozularak çeşitli ürünlere dönüşürler. Klorofiller de aydınlıkta, özellikle de güneşle doğrudan temasta çok çabuk parçalanmaktadır. Bu parçalanma klorofilin güneşten aldığı fotonla, moleküler oksijenin varlığında meydana gelmekte ve C-5, C-10, C-15 atomlarından radikalik şekilde parçalanmaları şeklinde gerçekleşmektedir. Bu parçalanma sonunda bilin türevleri oluşmaktadır (Şekil 1.2). Benzer parçalanma asitlerle muamelesi ile de meydana gelmektedir [67].

Harriman ve ark. bitkilerde suyun O<sub>2</sub>'ne yükseltgenmesi ile sonuçlanan fotosentezi *in vitro* model bir sistemde gerçekleştirebilmek için suda çözünür mangan(III) tetraarilporfirinlerin yükseltgenme-indirgenme dengelerini araştırmışlardır [70-73].

H. Berber'in yaptığı bir çalışmada, MnTSPP (5,10,15,20-tetra(4-sülfonatofenil)porfinatomangan(III) klorür (sodyum tuzu), MnTDCSPP (5,10,15,20-tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan(III)klorür (sodyum tuzu)), MnTDCSPPBr<sub>8</sub> (2,3,7,8,12,13,17,18-oktabromo-5,10,15,20-tetrakis(2,6-dikloro-3-sülfonatofenil)porfinatomangan(III) klorür (sodyum tuzu)), MnTSPPBr<sub>8</sub> (2,3,7,8,12,13,17,18-oktabromo-5,10,15,20-tetrakis(4-sülfonatofenil)porfinatomangan(III) klorür (sodyum tuzu)) porfirinlerinin yapı kararlılıkları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOCl, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH peroksitlerinde çeşitli pH değerlerinde incelenmiş ve ayrıca bu porfirinlerin desteklere bağlanması ile oluşan yapıların yapı kararlılıkları aynı oksidantlara karşı ve aynı pH değerlerinde incelenmiş ve kıyaslanmıştır [74].

Porfirin bileşikleri bitki ve bakterilerdeki fotosentetik reaksiyon merkezleri gibi önemli biyolojik sistemlerin modelleri oldukları kadar, hidrokarbon oksidasyonu için katalizör olarak uygulamaları da vardır. Metaloporfirinlerin oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında, PhIO ile sikloheksanın yükseltgenmesi reaksiyonunda, katalitik davranışını inceleyen bir çalışmada, asetilglükozlanmış metaloporfirinlerin katalitik dönüşümü, şeker grubu içermeyen metaloporfirinlerle kıyaslandığında 2 kat daha verimli katalitik etki yaptığı bulunmuştur [75]. Metaloporfirinlerle alkanların yükseltgenmesi ile ilgili bir çalışmada; kolloid TiO<sub>2</sub> ile Fe-porfirin kompleksinin oluşturduğu yapının, oksijen gazının varlığında alkanların yükseltgenmesinde katalizleme etkisi incelenmiştir [76]. Bu yapı, alkanların yükseltgenmesine yeni bir reaktivite getirmiştir. Ayrıca bu demir porfirin kompleksinin alkollerin ketona yükseltgenme oranını arttırdığı görülmüştür.

Traylor ve ark. tarafından FeTDCPP (5,10,15,20-Tetrakis(2,6-diklorofenilporfinatodemir)'in yapı kararlılığını test etmek için yapılan bir çalışmada FeTDCPP oda sıcaklığında iyodosilbenzenin CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>'daki süspaniyonunda 1 saat tutulmuş ve bu sürenin sonunda FeTDCPP'in hemen hemen parçalanmadan kaldığı görülmüştür [77]. Bir başka deneyde ise iyodosilbenzen yerine m-kloroperbenzoik asit kullanılmıştır. Oda sıcaklığında yürütülen bu deneyde ise 30 dakika içinde FeTDCPP in Soret pikinde önemli azalma görülmüş, bu anda ortama norbornan ilave edilmiş ve 8 gün sonra orjinal

Soret pikinin % 83 oranında durduğu gözlenmiştir. Bu koşullarda FeTDCPP yerine FeTPP (5,10,15,20-tetrafenilporfinatodemir(III)klorür (sodyum tuzu)) kullanıldığı zaman hemen FeTPP'in parçalandığı gözlenmiştir [77].

Traylor ve ark. tarafından daha sonra elde edilmiş olan 2,3,7,8,12,13,17,18-oktabromo-5,10,15,20-tetrakis(2,6-diklorofenil)porfinatodemir(III) klorür, norbornanın pentafloridosilbenzen ile oksidasyonunda katalizör olarak kullanılmış ve reaksiyon sonunda % 75 verimde norbornanoller elde edilmiştir. Reaksiyon süresince bu metallo tetraarilporfirinin oksidanta karşı dirençli olduğu ve hiç parçalanmadığı görülmüştür. Aynı reaksiyon için ve aynı koşullarda bu metallo tetraarilporfirin yerine 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diklorofenil)porfinatodemir(III) klorür kullanıldığı zaman bu demir tetraarilporfirinin % 75 oranında parçalandığı gözlenmiştir [78].

Banfi ve ark. mangan tetraarilporfirin katalizörleri yardımıyla 0 °C'de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O sisteminde NaOCl ile alken epoksidasyonunu çalışmışlar ve kullanılan katalizörlerin katalitik aktiviteleri ile yapısal kararlılıklarına ilişkin bulgularını yayınlamışlardır [44]. Araştırmacılar bu sonuçlara göre metallo tetraarilporfirinlerin yapı kararlılığının sadece sterik etki ile sağlanamayacağı, hem sterik hemde elektron çekici etkinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir [79].

Klorofil ve türevlerinin metabolizmasını inceleyen bir çalışmada bir klorofil türevi olan 13<sup>2</sup>-S-hidroksi feofitin a, tümörler için fotodinamik terapide ilaç olarak önerilmektedir [59]. Ayrıca klorofillerin ve porfirinlerin kanser tedavisinde fotodinamik terapi (PDT) ajanı olarak kullanılmalarının deneniyor olması nedeniyle, bu maddelerin oksidasyonla parçalanması sonucu oluşan ürünlerinin neler olduğunun bilinmesinin gerekli olduğu Gaular ve ark.'nın çalışmasında belirtilmiştir. Bu amaç için bir PDT ajanı olan hematoporfirinin kromik asit ile parçalanması çalışılmış ve parçalanma ürünlerinin maleimid türevleri olduğu belirlenmiştir [81]. Klorofillerin ise sırasıyla bozunma reaksiyonları olan demetalasyonu, defitolasyonu ve metilasetat grubunun ayrılma reaksiyonları vermesi ile oluşan pirofeoforbit'in kromik asitle reaksiyonu sonucunda halkanın parçalandığı ve bilin türevlerinin elde edildiği gözlenmiştir [66].

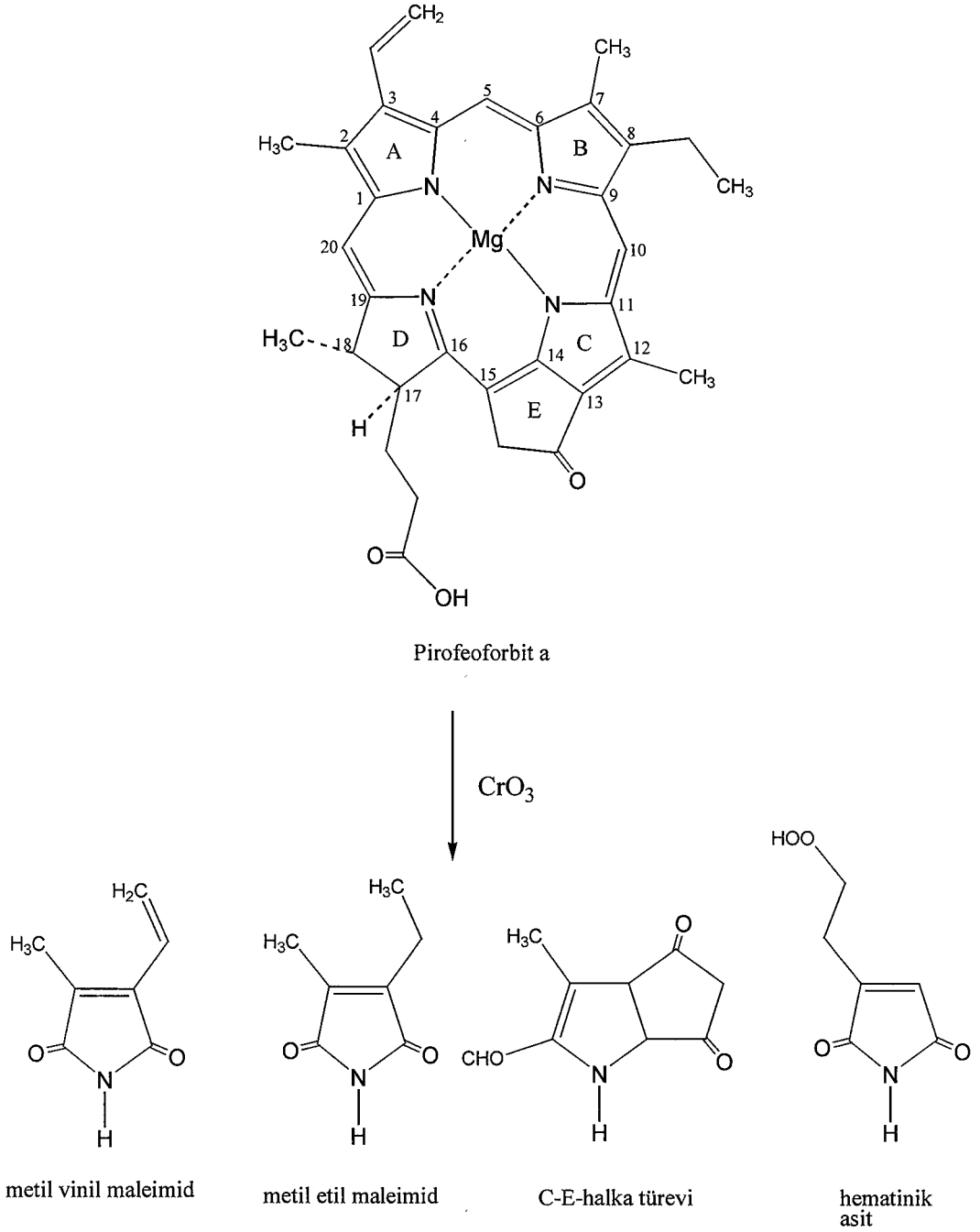
Metallo tetraarilporfirinlerin sentezi ve  $H_2O_2$ , iodozilbenzen ve pentafloriodozilbenzene karşı kararlılıkları ile ilgili bir çalışma ise 1995 yılında yayınlanmıştır [81]. Araştırılan metallo tetraarilporfirinler içinde oksidantlara karşı en dirençli olanlarının 5,10,15,20-tetrakis(pentaflorofenil)porfinatomdemir ile 5,10,15,20-tetrakis(2,6-diklorofenil)porfinatomangan olduğu görülmüştür. Buna karşılık aynı oksidantlara karşı yapı kararlılığının en düşük olduğu metallo tetraarilporfirin ise 5,10,15,20-tetrafenilporfinatomangan olarak bulunmuştur.

Işık illüminasyonlarında (floresans ışıkla muamelesinde) serbest klorofil a ve klorofil a'nın bir kaç konjuge yapısının kararlılıklarını inceleyen bir çalışmada, klorofil a konjuge sistemlerin ışık illüminasyonunda yüksek kararlılığa sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada klorofil a-poli(vinilpirolin)-smektite konjuge sistemin metil viologenin redüksiyonunun katalizlenmesi için fotoindüktif aktivitesine sahip olduğu görülmüştür [82].

Klorofil a,  $\alpha,\omega$ -diollerle FSM tipi mezoporoz silikaya modifiye edilmiş yapıya adsorbe edilebilmiştir [83]. Bu sonuçlar gözenekli madde tasarımlarında, fotoaktif molekül kimyasında, fotokimya ve fotofizik gibi alanlara katkıda bulunmaktadır.

Asit ve su arayüzeyinde saf su ve çeşitli yağ tabakalarındaki klorofil a'nın kararlılığını Langmuir ve HPLC teknikleri ile inceleyen bir çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir [7]: Saf su ile klorofil a'nın oluşturduğu yüzeyde pH 8'den düşük olduğunda klorofil a'nın hızlı bir şekilde feofitin a'ya dönüştüğü buna karşın pH 8'den büyük olduğu durumda ise hidrolize uğrayarak fitol grubundan ayrıldığı saptanmıştır. Ayrıca yağ-su yüzeyinde klorofil a'nın kararlılığına yüklü ve farklı baş gruplu yağlar, pH 8'den düşük ve büyük değerlerde benzer baş grupların etkisini incelemek için kullanılmıştır. Negatif baş gruplu L- $\alpha$ -dioleilposfatidil-DL-gliserol kullanıldığında hidronyum derişimi artmış ve bunun sonucunda feofitinizasyon (demetalasyon) görülmüşken, defitolasyona rastlanmamıştır. Buna karşın pozitif yüklü baş gruplu dioleoil-N-(3-trimetil amonyum propil)karbomoilgliserol kullanıldığında defitolasyon görülürken feofitinizasyona rastlanmamıştır. Bu çalışmada olduğu gibi tek tabakalı sistemlerde yaygın olarak klorofil çalışmaları ve benzeri çalışmalarla klorofilin asitliğe karşı kararlılığı çalışılmıştır.

Porfirinlerde halka parçalanması moleküler oksijenin varlığında meydana gelmektedir. Bozunma ürünleri bilin türevleri olarak bilinmektedir. Örneğin klorofillerin oksidasyon ürünlerinin HPLC ile belirlenmesini inceleyen bir çalışmada, klorofillerin oksidasyonu kromik asitle gerçekleştirilmiştir [66]: pH 1,2'de gerçekleştirilmiş olan bu oksidasyon, 25 °C'de % 1 (w/v) CrO<sub>3</sub> çözeltisi içinde klorofil a 15 dakikadan 1 saate kadar, klorofil b 1 saatten 15 saate kadar bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Klorofil a'nın 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'deki oksidasyonu, 25°C'de 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren % 1 CrO<sub>3</sub> çözeltisinde 1 saat bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiliye denge hacmi kadar aseton eklenerek klorofiller çözülmüş, reaksiyondan sonra aseton düşük basınç altında uçurulmuş, oksidasyon ürünleri etil eterle ekstre edilmiş ve kromatografi için deriştirilmiştir. Klorofillerin demetalasyonu, defitolasyonu ve metil asetat (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) grubunu vermesi ile oluşan pirofeoforbitin kromik asitle halka parçalanma reaksiyonu ve bilin türevi ürünleri Şekil 1. 2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Pirofeoforbit a'nın kromik asitle reaksiyonu ile bilin türevlerinin oluşumu

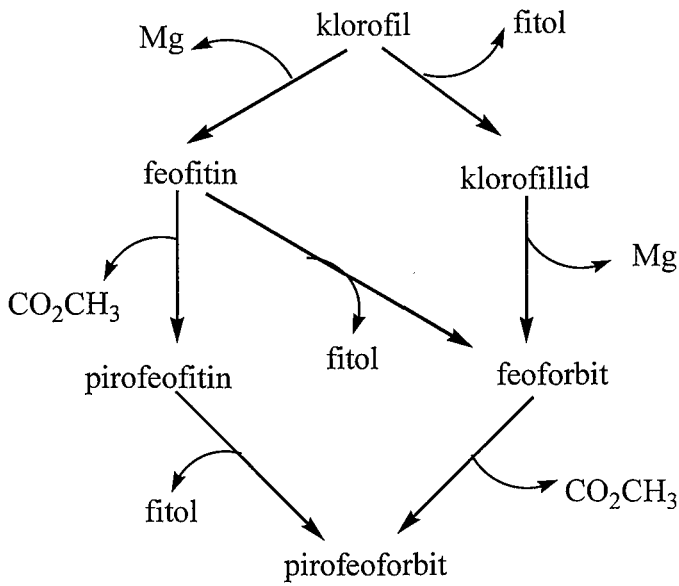
Lahana, zeytin ve salatalıktaki klorofillerin bozunmasını inceleyen bir çalışmada bozunma kinetiği birinci dereceden olduğu bulunmuştur [17]. Feofitinizasyon kinetiği  $0,54 \pm 0,06 \text{ gün}^{-1}$  ile en hızlı olarak coleslawda



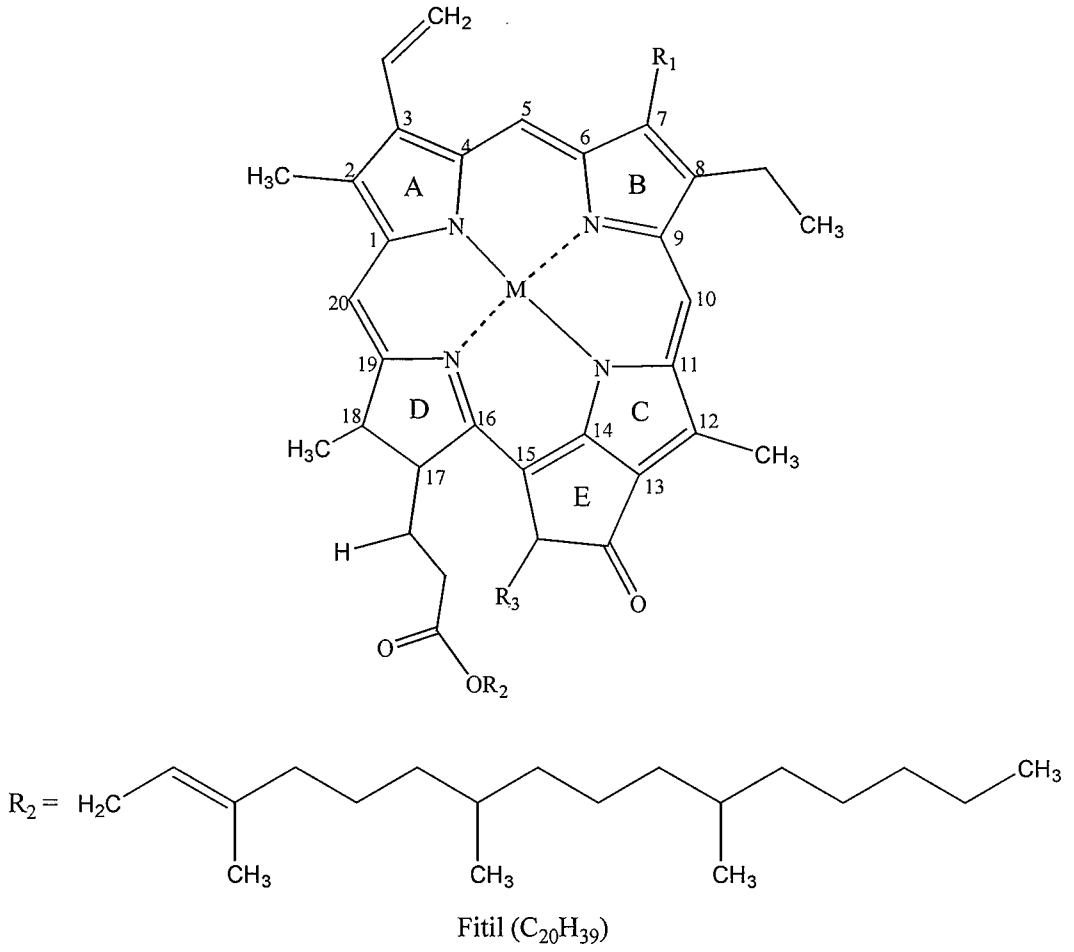
görülmüştür. Bunu  $0,084 \pm 0,015 \text{ gün}^{-1}$  ile pickles izlerken en yavaş feofitinizasyon  $0,033 \pm 0,013 \text{ gün}^{-1}$  ile zeytin meyvesinde görülmüştür.

Yiyecek maddelerindeki klorofilin bozunma çalışmalarında ise klorofilin feoforbide dönüşümünün feofitin veya klorofillid oluştuktan sonra meydana geldiği gösterilmiştir (Şekil 1.3). Ancak son yıllardaki çalışmalar, bitkilerdeki bozunmanın, feoforbitten sonra da devam ederek, renksiz ürünlere kadar sürdüğünü göstermektedir [7].

Meyvelerin olgunlaşması sırasında klorofillerin bozunması periyodik olarak meydana gelmektedir. Çeşitli enzimlerle katalizlenen reaksiyonlarda bu bozunma prosesi klorofillerin fitol, magnezyum ve makro ve izosiklik halkasının karbometoksi gruplarının ayrılmasını içerir (Şekil 1.3) [66].



Şekil 1.3. Klorofillerin sıcaklıkla ve ortam asitliği ile meydana gelen bozunma ürünleri [13]



|                  |       |              |                      |                  |
|------------------|-------|--------------|----------------------|------------------|
| Klorofil a;      | M= Mg | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Klorofillid a;   | M= Mg | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = H$            | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Feofitin a;      | M= 2H | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Feoforbid a;     | M= 2H | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = H$            | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Pirofeofitin a;  | M= 2H | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = H$        |
| Pirofeoforbid a; | M= 2H | $R_1 = CH_3$ | $R_2 = H$            | $R_3 = H$        |
| Klorofil b;      | M= Mg | $R_1 = CHO$  | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Klorofillid b    | M= Mg | $R_1 = CHO$  | $R_2 = H$            | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Feofitin b;      | M= 2H | $R_1 = CHO$  | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Feoforbid b;     | M= 2H | $R_1 = CHO$  | $R_2 = H$            | $R_3 = CO_2CH_3$ |
| Pirofeofitin b;  | M=2H  | $R_1 = CHO$  | $R_2 = C_{20}H_{39}$ | $R_3 = H$        |
| Pirofeoforbid b; | M= 2H | $R_1 = CHO$  | $R_2 = H$            | $R_3 = H$        |

Şekil 1.4. Klorofil a ve b ile bozunma ürünlerinin yapı formülleri [84]

Sebze ve meyveler sıcaklık ile muamele edildiğinde demetalasyon ve epimerizasyon görülür. Sıcaklık ile muamele sürdürülürse demetalokarboksilasyona uğrar. Demetalokarboksilasyon ayrıca konservelelerde de görülebilmektedir. Fermantasyon, depolama gibi enzimatik reaksiyonlarda defitolasyon reaksiyonunun meydana geldiği görülmüştür. Defitolasyon sık sık, demetalasyonla birlikte görülmüştür. Allomerizasyon reaksiyonu da kaynatma esnasında meydana gelmektedir [8].

Çilek ekstresinde 50 °C’de yapılan bir demetalasyon aktivite çalışmasında optimum pH, fosfat tamponunda 7,1’de ve tris-tripsin tamponunda 8,8’de gerçekleşmektedir. Ayrıca iyonik şiddet (I) arttıkça aktivitenin de arttığı görülmüştür [9].

Çerimoya meyvesinin depolanması süresince bozunmasını inceleyen bir çalışma, fotodiyot dedektörlü ters faz HPLC kullanarak incelenmiştir [14]. Bu çalışmada ekstre, fosfat tamponuyla pH 6,5’a tamponlanmış, % 0,2 Triton-x-100 ile % 33 aseton (suda) eklenerek bozunma kinetiği incelenmiş ve bu meyvenin depolanması sürecinde demetalasyon aktivitesinin defitolasyon aktivitesinin % 25-30’u kadar olduğu bulunmuştur.

Dünya’da her yıl 10<sup>9</sup> ton klorofilin biyosentezi canlılar tarafından yapılmakta ve yok olmaktadır [22]. Ancak hangi ara ürünlerle parçalandığı uzun yıllar bilinmemiş ancak klorofilin analogu olan hem molekülünün oksitlenerek bozunması klorofilin bozunması hakkında fikir vermiştir. Yapılan çalışmalarda çürümeye başlayan yapraklarda bozunmanın  $\alpha$  karbonundan kopan çeşitli ürünlere dönüştüğü saptanmıştır [20,22]. Örneğin dalından kopmuş Liquidambar styraciflua ve L. Orientalis bitki yapraklarındaki klorofillerin katabolizma ürünlerini inceleyen bir çalışmada 5-formilbilinon’un, ana katabolizma ürünü olduğu bulunmuştur [20].

İspanak ekstresindeki klorofil a ve b’nin bozunma kinetiği ile ilgili yapılan bir çalışma, paralel faktör yöntemi ile incelenmiştir [1]. Bu çalışmada klorofil a ve b’nin feoforbite a ve b’ye dönüşüm kinetiği birinci dereceden olduğu belirlenmiştir.

Bezelye ekstresindeki klorofil a ve b’nin çeşitli sıcaklık ve pH değerlerinde bozunma kinetiğinin incelendiği bir çalışma yayınlanmıştır [11]. Bu

çalışmada pH 5,5-7,5 arasında 80 °C, 90 °C, 100 °C sıcaklıklarda klorofil a ve b'nin bozunması incelenmiş, kantitatif analizleri HPLC ile yapılmıştır. Beklenildiği gibi yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde daha hızlı bozunma görülmüştür. Klorofil a ve b en yavaş bozunma değerini çalışılan en düşük sıcaklık olan 80 °C ve en yüksek pH olan 7,5'ta almıştır. Klorofil a ve b sırasıyla birince dereceden hız sabitleri, 0,004 dak<sup>-1</sup>, 0,002 dak<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu ekstrenin pH ve sıcaklığa bağımlı klorofil a ve b bozunma kinetiği incelendiğinde klorofil a'nın b'den 2,5 kat daha hızlı bozunmaya uğradığı görülmüştür.

Klorofillerin ve türevlerinin metabolizmasını inceleyen bir çalışmada tetrapiroollerin antioksidant aktivitesi, metal şelatlaşması ile meydana geldiği belirtilmiştir. Örneğin 30 °C'de klorofil a'nın, çok iyi bir antioksidant olarak bilinen 2 mM'ı 2,6-di-t-butil-4-metil fenol 8BHT'den çok daha etkin olduğu bulunmuştur [60].

Brokoli suyundaki klorofilin sıcaklığa ve enzim aktivitesine bağlı olarak bozunma kinetiğinin incelendiği bir çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir [6]: Bozunma 60 °C'yi aşan sıcaklıklarda incelendiğinde klorofil a ve b'nin bozunma reksiyonu birinci dereceden kinetik reaksiyon olduğu ve klorofil a'nın sıcaklığa duyarlılığının klorofil b'den çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Örneğin 80 °C'de klorofil a ve b'nin birinci derece hız sabitleri sırasıyla 0,0101 dak<sup>-1</sup>, 0,0055 dak<sup>-1</sup>'dir. Klorofil a ve b'nin bozunma reksiyonlarının Arrhenius tarafından tanımlanan denge sabitleri sırasıyla 71,04 ± 4,89 ve 67,11±6,82 kJ/mol olarak bulunmuştur. Toplam klorofilin, feofitinizasyon kinetiği için aktivasyon enerjisi yaklaşık 69 kJ/mol olarak belirlenmiştir. İkinci basamak olan feofitinlerin dekompozisyonu için aktivasyon enerjisi 105,49 ± 4,74 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Yerba Mate bitkisinin kurutulması ve kesilmesi işlemlerinden sonra zamanla klorofil a ve b'nin bozunmasını inceleyen bir çalışmada klorofil a'nın klorofil b'den çok daha hızlı bozunduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada 2-4 dakika süren kesilme işleminden sonra suyun bozunmayı katalizleyici etkisiyle sıcaklık etkisinden dolayı klorofil a ve b miktarları % 70-80 oranında azalmış, daha sonra

yapılan ilk kurutma işleminde % 20 ve ikinci kurutma işleminde % 45 oranında azalma görülmüştür [62].

Klorofil b ve allomerlerinin sıvı kromatografisi ile ayrımını ve kütle spektroskopisi ile belirlenmesini inceleyen bir çalışmada metanolun oksijeni nedeniyle tüm klorofillerin C-13<sup>2</sup>'de oksidasyon meydana geldiği belirtilmektedir [54]. Oksijen bağlandığı halkada β-keto ester yapısı yapar. Bu allomerizasyon klorofil b'nin C-13<sup>2</sup>'deki karbonuna oksijen bağlanması ile gerçekleşir. Bu reaksiyonun serbest radikal mekanizması ile gerçekleştiğine dair güçlü deliller olmasına karşın mekanizması hala araştırılmaktadır. Bu çalışmada klorofil b'nin allomerizasyon reaksiyonu ise şöyle gerçekleştirilmiştir: Katı klorofil b metanolde çözülerek 2 mg/ml çözeltisi hazırlanarak alüminyum folyo ile kapalı kapta, oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile yeterli süre karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Bennigton'un uyguladığı yöntem takip edilerek gerçekleştirilen benzer bir allomerizasyon yöntemde 0,1 mg klorofil a, saf oksijenle suyundan uzaklaştırılmış, 3,5 ml metanolde çözülmüş, karanlıkta ve oda sıcaklığında yeterli süre karıştırılarak elde edilmiştir [8]. Yapılan bu çalışmada saf oksijenle sağlanan susuz metanoldeki allomerizasyon reaksiyonu oldukça hızlıdır. Çünkü suyun bulunduğu durumda ilk reaksiyon metanol yerine su ile gerçekleşir. Bu durumda hidrojen bağlanması nedeniyle enol formunun kararlılığı artar ve allomerizasyon reaksiyonu yavaşlar.

Yapılan başka bir çalışmada klorofil b'nin allomerizasyonu yine metanolde gerçekleştirilmiş ve % 8 oranında başka bir allomerizasyon ürünü olan 13<sup>2</sup>(S)-Hidroksi-10-Metoksiklorofil b belirlenmiş ve bu ürünün UV-Görünür, FAB-MS, <sup>1</sup>H NMR ve 2D ROESY NMR spektrumları ile karakterizasyonu yapılmıştır [84].

Klorofil a'nın illüminasyon ile bozunma kinetiğini inceleyen bir çalışmada, bozunma gözlenirken, bu esnada epimerizasyona rastlanmamıştır [85]. Yine aynı çalışmada, bozunmanın sıcaklıkla değişimi incelendiğinde, oda sıcaklığında yüksek sıcaklıklardan daha fazla klorofil a'nın epimerizasyon ürünü olduğu gözlenmiştir. Klorofil a'nın illüminasyonu ise şöyle gerçekleşmiştir: 3 mg klorofil a, 100 ml asetonda çözülerek -5,4 °C'de sabit tutulmuş ve floresans

ışık altında gerçekleştirilmiştir. İllüminasyonla bozunma reaksiyonu birinci dereceden hız kinetiği olup,  $k=0,084 \text{ sa}^{-1}$  bulunmuştur.

Çeşitli çözücü ortamlarında klorofil b monomerlerinin çözücü dinamiğini inceleyen bir çalışmada klorofil b'nin kinetik değişimini ölçmek için geliştirilen bir yöntem 3-metil pentan içindeki klorofil b'nin piridinle titre edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir [86].

Klorofil kararlılık değeri (CPI) yardımıyla bitkilerin çeşitli ortamlardaki kararlılık kapasitesini göstermektedir. Pirinç bitkisinin tazelik uyumu CPI ile anlayabileceğimiz bu konu üzerinde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [24].

$$\text{CPI} = \frac{\text{1 mg örneğin } 55 \text{ }^\circ\text{C}'\text{de, suda, 1 saat bekletilerek alınan } 652 \text{ nm spektrumu}}{\text{başlangıçtaki } 652 \text{ nm'deki spektrumu}}$$

Yapılan çalışmalarda klorofil a ve b ile türevleri için standartlar şöyle hazırlanmıştır: feofitin a ve b, klorofil a ve b'nin oksalik asit [14] ve HCl [16] ile muamelesi ile; klorofillid a ve b, klorofil a ve b'nin enzimatik deesterifikasyonu ile [14]; feoforbiter, feofitin enzimatik deesterifikasyonu ile hazırlanmıştır [14].

Klorofil a ve b'nin ekstre içinde saflaştırılmadan kantitatif analizinin yapılabilmesi için çeşitli yöntemler vardır [6,12,18]. Vernon tarafından tanımlandığı gibi gerçekleştirilen işlemde, önce klorofilleri içeren çözelti iki eşit kısma ayrılmış, birinci kısma % 80 aseton içinde doymuş oksalik asit (% 2, suda, v/v) eklenerek klorofillerin feofitine dönüşmesi sağlanmıştır. Asidifiye ve nonasidifiye pigment çözeltileri 3 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Asidifiye ve nonasidifiye pigment çözeltilerinde 662 ve 645 nm absorbanslar baz alınmıştır. Daha sonra da aşağıdaki formüle göre derişimler hesaplanmıştır.

$$[\text{Cha}] = 25,38\Delta A_{662} + 3,64 \Delta A_{645}$$

$$[\text{Chb}] = 30,38 \Delta A_{645} - 6,58 \Delta A_{662}$$

$$[\text{Toplam klorofil}] = 18,80 \Delta A_{662} + 34,02 \Delta A_{645}$$

Burada  $\Delta A_{662}$ , 662 nm'deki asidifiye ve nonasidifiye klorofil çözeltilerinin spektrumlarının absorbanları farkı,  $\Delta A_{645}$  ise, 645 nm'deki asidifiye ve nonasidifiye klorofil çözeltilerinin spektrumlarının absorbanları farkıdır.

Literatürde bitkilerdeki klorofillerin bozunma prosesini incelemek için klorofil metre (SPAD) kullanarak yapılmış olan bir çok çalışma vardır [87-91]. Bazı çalışmalarda ise analitik yöntemlerle klorofil metre ölçümleri birlikte yapılmış ve cihazın doğruluğu belirlenmiştir [87,88,90,91]. Klorofil metre ile hızlı bir şekilde ve bitkiye zarar vermeden ölçümler yapılabildiğinden zor ve zaman alıcı olan analitik yöntemlere göre ölçümü çok daha kolay olmasına karşın, doğruluğu analitik yöntemlerden daha düşüktür ancak çok hassas çalışılmıyorsa kabul edilebilir değerlerdedir.

## 2. DENEYSEL KISIM

### 2.1 Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Metanol (Merck), petrol eteri (J.T. Baker), aseton (Riadel-de-Haen), dietil amin (Fluka), fosforik asit (% 85'lik, Merck), hidroklorik asit (% 37'lik, Riedel-de Haen), sodyum hidroksit (Merck), hidrojen peroksit (% 35'ik, Merck), *tert*-butil hidroperoksit (% 70'lik, Merck), sodyum hipoklorit (% 13'lik, Fluka), sodyum nitrat (Merck), Boraks (Carlo Erba), sodyum fosfat (Aldrich), disodyum hidrojen fosfat (Merck), sodyum bihidrojen fosfat (Merck) firmalardan sağlandıkları şekilde kullanılmışlardır. İnce tabaka kromatografisi için partikül boyutu 15 µm olan 60 GF<sub>254</sub> (Merck) marka silikajelle kaplanmış 20x20 boyutunda cam plakalar kullanılmıştır.

### 2.2. Aletler ve Analizler

Görünür bölge spektrumları Shimadzu UV-2101PC UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometre kullanılarak alınmıştır. Cihazın küvet (hücre) tutucusunun sıcaklığı termostatlı su sirkülasyonlu banyo (Phywe T/P) kullanılarak  $30,0 \pm 0,1$  °C'de tutulmuş ve 10 mm ışık yollu kuartz küvetler kullanılarak spektrumlar alınmıştır. Bu spektrumlar cihaza bağlı bilgisayarda hafızaya kaydedilmiş ve gerektiğinde çıktıları alınmıştır. Spektrumlardan elde edilen veriler PC bilgisayarında SPSS 10,0 ve Minitab 13.20 programlarının lineer regresyon programı kullanılarak değerlendirilmiş ve bu şekilde her bir deney için parçalanma hız sabiti hesaplanmıştır. pH ölçümleri Orion marka 420 model pH-metre kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca bütün süzme işlemleri 2, 3, 4 numara Gooch krozeleri ile yapılmış ve deneylerde laboratuvarında bulunan diğer araç ve gereçler kullanılmıştır.



## 2.3. Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'nin Hazırlanması

### 2.3.1. Klorofil a ve b'nin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Klorofilin yapı kararlılığının belirlenmesi için kullandığımız klorofil a ve b'nin bir kısmı ıspanak bitkisinden sağlanmıştır Taze ıspanaklar damarlarından kesilerek ayrılmış ve süzgeç kağıtları arasında kurutulmuştur. Havanda asetonla birlikte ezilerek pigmentlerin asetonla ekstraksiyonu sağlanmış ve bu işlem ıspanak iyice renksizleşinceye kadar, ortalama 3-4 kez tekrarlanarak, her bir işlemde 2 numaralı Gooch krozesi ile süzölmüştür. Aseton ve suyun homojen fazından oluşan ekstre 100 ml'lik ayırma hunisine konularak petrol eteri ile pigmentlerin ekstraksiyonu, her defasında 30 ml petrol eteri ile üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. 30 °C sıcaklıkta rotari evaporatörde deriştirilen ekstre, hızlı bir şekilde 20x20 boyutundaki, 0,75 mm kalınlığındaki silikajel tabakalarda ince tabaka kromatografisiyle, petrol eteri/aseton/dietil amin (10:4:1, v/v/v) çözücü fazında yürütölerek, pigmentlerin saflaştırılması sağlanmıştır [2,5]. Bu şekilde yapılan yürütme işleminde, en önde turuncu renkli karotenler tek spot olarak yürümüş, ardından az miktarda siyahımsı renkte feofitin a ve b, daha sonra mavimsi yeşil renkli klorofil a, sarımsı yeşil renkli klorofil b en son olarak ta ksantofiller dört spot olarak sırasıyla turuncu, koyu sarı, sarı ve açık sarı renkli olarak plakalarda yer almışlardır [61]. Tabakalardan silikajelle birlikte birbiriyle karışmamış klorofil a ve b plakalardan kazandıktan sonra asetonla klorofil a ve b silikajellerinden arındırılmıştır. Saflaştırılan klorofil a ve b ikinci kez ince tabaka kromatografisiyle aynı yöntemle yürütölmüş ve tekrar klorofiller asetonla çekilip, 4 numaralı Gooch krozesi ile süzölmüş ve renkli şişe içinde – 20 ° C'de derin dondurucuda saklanmışlardır.

Klorofilin yapı kararlılığının belirlenmesi için kullandığımız klorofil a ve b'nin büyük bir kısmı ise çim bitkisinden sağlanmıştır. Asetonla yeterli miktarda çim bitkisi havanda ezilerek, çim bitkisi renksiz kalıncaya kadar, ortalama 3-4 kez tekrarlanarak, her bir işlemde 2 numaralı Gooch krozesi ile süzölmüştür. Buradan elde edilen ekstre, deriştirilmeye gerek görölmeden hızlı bir şekilde 20x20 boyutundaki, 0,75 mm kalınlığındaki silikajel tabakalarda ince tabaka

kromatografisiyle, petrol eteri/aseton/dietil amin (10:4:1, v/v/v) çözücü fazında yürütülerek, pigmentlerin saflaştırılması sağlanmıştır [2,5]. Yürütme sırasında pigment içeriği ve pigmentlerin yürütme sırasında sıralanışları ıspanak bitkisi ile aynı bulunmuştur. Saflaştırılan klorofil a ve b ikinci kez ince tabaka kromatografisiyle aynı yöntemle yürütülmüş ve tekrar asetonla çekilip, 4 numaralı Gooch krozesi ile süzölmüş ve renkli şişe içinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmışlardır.  $R_f$  değerleri ölçölerek kaydedilmiştir (Çizelge 2.1).

Deneyssel çalışmalarımız için yeterli miktarda klorofil a ve b çim ve ıspanak bitkilerinden sağlandıktan sonra  $30^{\circ}\text{C}$ 'de rotari evaporatörde bir kaç ml kalacak şekilde deriştirilen klorofil a ve b, vakum etivünde  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat kurutulup,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda renkli şişe içinde saklanmıştır. Saf olarak elde edilen klorofil a ve b, analizler için eksiltme yöntemiyle buradan alınarak gerekli çözeltileri hazırlanmıştır.

Saflaştırılan klorofil a ve b'nin UV-Görünür bölge spektrumları alındığında, absorbens değerlerinin literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu görölmüştür (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Çim ve ıspanak bitkilerinden elde edilen ekstrenin ince tabaka kromatografisi ile yürütölmesi ile pigmentlerin farklı yürütücü fazlarda hesaplanan  $R_f$  değerleri

| No | Adı         | Rengi         | $R_f$ değeri, çim<br>(Petrol eteri, aseton,<br>dietil amin, 10:4:1, v/v/v) | $R_f$ değeri, ıspanak<br>(Dietil eter, aseton,<br>dietil amin, 10:4:1, v/v/v) |
|----|-------------|---------------|--|---|
| 1  | Karotenler  | Turuncu       | 0,978  | 1,000   |
| 2  | Feofitin a  | Siyahımsı gri | 0,733  | 0,750   |
| 3  | Klorofil a  | Mavimsi yeşil | 0,633  | 0,650   |
| 4  | Klorofil b  | Sarımsı yeşil | 0,522  | 0,580   |
| 5  | Ksantofil 1 | Turuncu       | 0,422  | 0,460   |
| 6  | Ksantofil 2 | Koyu sarı     | 0,367  | 0,310   |
| 7  | Ksantofil 3 | Sarı          | 0,333  | 0,280   |
| 8  | Ksantofil 4 | Açık sarı     | 0,200  | 0,186   |

Çizelge 2.2. Klorofil a ve b'nin çeşitli çözücülerdeki absorbands değerleri

| No | Pigment    | Çözücü            | Absorbans (nm)    | Ref. |
|----|------------|-------------------|-------------------|------|
| 1  | Klorofil a | Dietil eter       | 430, 662          | 35   |
|    |            | Dietil eter       | 430, 615, 661     | 6    |
|    |            | Petrol eteri      | 428, 615,5, 663   | *    |
|    |            | Metanol           | 422,5, 618,5, 665 | *    |
|    |            | %15,40 Metanol/Su | 431,5, 626, 671   | *    |
|    |            | Aseton            | 428, 616, 662     | 6    |
| 2  | Klorofil b | Dietil eter       | 453, 643          | 35   |
|    |            | Dietil eter       | 453,593,642       | 6    |
|    |            | Petrol eteri      | 449, 638,5        | *    |
|    |            | Aseton            | 454, 596, 644     | 6    |
|    |            | Metanol           | 468,5, 603,5, 653 | *    |
|    |            | %15,62 Metanol/Su | 454,5, 596, 641,5 | *    |

\* Yaptığımız çalışmada saflaştırılan klorofil a ve b'nin UV-Görünür bölge spektrumlarının absorbands değerleridir

### 2.3.2. Feofitin a ve b'nin Hazırlanması

Bölüm 2.3.1'de anlatıldığı gibi klorofil a ve b saf olarak elde edildikten sonra, bu pigmentlerin literatürde belirtildiği gibi demetalasyonu ile feofitin a ve b hazırlanmıştır [92]. Bir miktar klorofil a ve b alınarak, asetonda çözülmüştür. Her bir pigment çözeltisinin içine aseton çözeltisinin on katı hacminde 1 M HCl ilave edilerek çalkalanmıştır. Çözeltilerin renginin yeşilden tamamen kahverengiye dönüşümü sağlandıktan sonra her bir defasında 10 ml petrol eteri ile üç kez aseton çözeltisinden pigmentler ekstre edilmiştir. Sonra ortam asitliği  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile nötrleştirilmiş ve beş kez saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra rotari evaporatörde 40 °C'de deriştirildikten sonra ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Daha sonra klorofiller asetonla silikajelden kurtarılıp, 40 °C'de deriştirildikten sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 24 saat vakum etüvünde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tartılmıştır. Feofitin a ve b'nin çeşitli çözücüler içinde alınan spektrumları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Feofitin a ve b'nin UV- Görünür bölge spektrumlarının absorbans değerleri

| No | Pigment    | Çözücü       | Absorbans (nm)    | Ref. |
|----|------------|--------------|-------------------|------|
| 1  | Feofitin a | Dietil eter  | 408, 667          | 35   |
|    |            | Dietil eter  | 408, 503, 667     | 6    |
|    |            | Petrol eteri | 410,5, 611, 669,5 | *    |
|    |            | Aseton       | 410, 468, 668     | 6    |
|    |            | Aseton       | 409, 472, 666,5   | *    |
|    |            | Metanol      | 409, 505, 666     | *    |
|    |            | Su           | 415, 511,5, 677   | *    |
| 2  | Feofitin b | Dietil eter  | 525, 599, 654     | 35   |
|    |            | Petrol eteri | 434, 600,5, 656,5 | *    |
|    |            | Aseton       | 433, 598, 653     | *    |
|    |            | Metanol      | 437, 600, 655     | *    |
|    |            | Su           | 439, 603,5, 660   | *    |

\* Yaptığımız çalışmada ekstre edilerek saflaştırılan klorofil a ve b'nin UV-Görünür bölge spektrumlarıdır

#### 2.4. Klorofil a, Klorofil b, Feofitin a ve Feofitin b'nin Yapı Kararlılıklarının İncelenmesi

Saflaştırılan klorofil a ve b ile bu pigmentlerin demetalasyonu ile oluşan feofitin a ve b'nin  $H_2O_2$ ,  $(CH_3)_3COOH$  ve  $NaOCl$  oksidantları içeren çözeltilerde ve çeşitli pH'larda 300-750 nm arasında UV-Görünür bölge spektrumları alınmış ve spektrumlardaki Soret pikinin zamana bağlı absorbansındaki azalma izlenerek bu pigmentlerin parçalanma hız sabitleri hesaplanmıştır.

Örnek bir çalışma şu şekilde yapılmıştır. Deney çözeltisi  $(CH_3)_3COOH$  ( $2,50 \times 10^{-2}$  M; 1,00 ml) çözeltisine  $Na_3PO_4$  (1M; 2,00 ml) ve  $NaOH$  (1M; 1,00 ml) çözeltileri ilave edildikten sonra toplam hacim saf suyla 10 ml'ye tamamlanarak pH = 12,73'e tamponlanmış, iyonik şiddet 0,2'den küçük olmayacak şekilde ve  $(CH_3)_3COOH$  derişimi klorofil derişiminin 1000 katı olacak şekilde hazırlanması sağlanmıştır. Oksidant derişiminin 1000 katı kullanılması bozunma reaksiyonun yalancı birinci dereceden reaksiyon kinetiği olması içindir. Daha sonra bu çözelti 30 °C'deki su banyosunda sıcaklığı sabitleninceye kadar

bekletilmiştir. Ardından bu çözeltiye 0,100 ml  $2,50 \times 10^{-3}$  M klorofil b ilave edilmiş ve bu an  $t=0$  kabul edilmiştir. Oksidant içeren bu çözelti spektrofotometrenin küvet tutucusundaki kuvars küvete aktarılmış ve belli zaman aralıklarında spektrum alınmıştır. Soret pikindeki azalmanın zamana bağlı değişimine ait spektrumlar cihaza bağlı bilgisayardaki hafızaya kaydedilmiştir. Kör çözeltisi  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  ( $2,5 \times 10^{-2}$  M; 1 ml),  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (1M; 2 ml), NaOH (1M; 1 ml) ve metanol (saf 0,1 ml) çözeltileri karıştırılarak toplam hacim saf su ile 10 ml'ye seyreltilerek hazırlanmıştır.

Elde edilen spektrumların  $\lambda_{\text{mak}}$  dalga boyundaki absorbanları için pikin tepe noktası ile taban çizgisi arasındaki uzaklık alınmış ve uzaklık absorban değerine dönüştürülerek  $(A_t - A_\infty)$  değeri olarak kaydedilmiştir. En küçük kareler yöntemi ile  $\ln(A_t - A_\infty) = f(t)$  fonksiyonuna ait doğru denklemi bulunmuş ve eğimden klorofil b'nin parçalanma hız sabiti (k) belirlenmiştir. Ayrıca eğimin standart sapmasından yararlanarak parçalanma hız sabitindeki belirsizlik belirlenmiştir. Bu hız sabitleri ile bu sabitlere ait belirsizlik değerleri PC bilgisayarında istatistiksel programlar olan SPSS 10.0 ve minitab 13.20 programları ile hesaplanmıştır.

Parçalanma hız sabitinin ve belirsizliğinin bulunmasına bir örnek olarak spektrumları Şekil 2.1'te ve absorban ve zaman verisi Çizelge 2.4'de verilen klorofil b'nin 14 nolu deneyine ait yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.4. Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidantına karşı, pH=12,73'te 30 °C'de ve karanlıkta) ait absorbands ve zaman verileri

| Spektrum | t         | (A <sub>t</sub> -A <sub>∞</sub> )/Abs | ln(A <sub>t</sub> -A <sub>∞</sub> ) |
|----------|-----------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1        | 0         | 0,546                                 | -0,60514                            |
| 2        | 172 sn.   | 0,551                                 | -0,59602                            |
| 3        | 13 dak.   | 0,544                                 | -0,60881                            |
| 4        | 71dak.    | 0,489                                 | -0,71539                            |
| 5        | 131dak.   | 0,466                                 | -0,76357                            |
| 6        | 672 dak.  | 0,285                                 | -1,25527                            |
| 7        | 1566 dak. | 0,123                                 | -2,09557                            |

En küçük kareler yöntemi ile bu verilere ait doğru denklemi:

$$\ln(A_t - A_\infty) = -0,000948t - 0,616$$

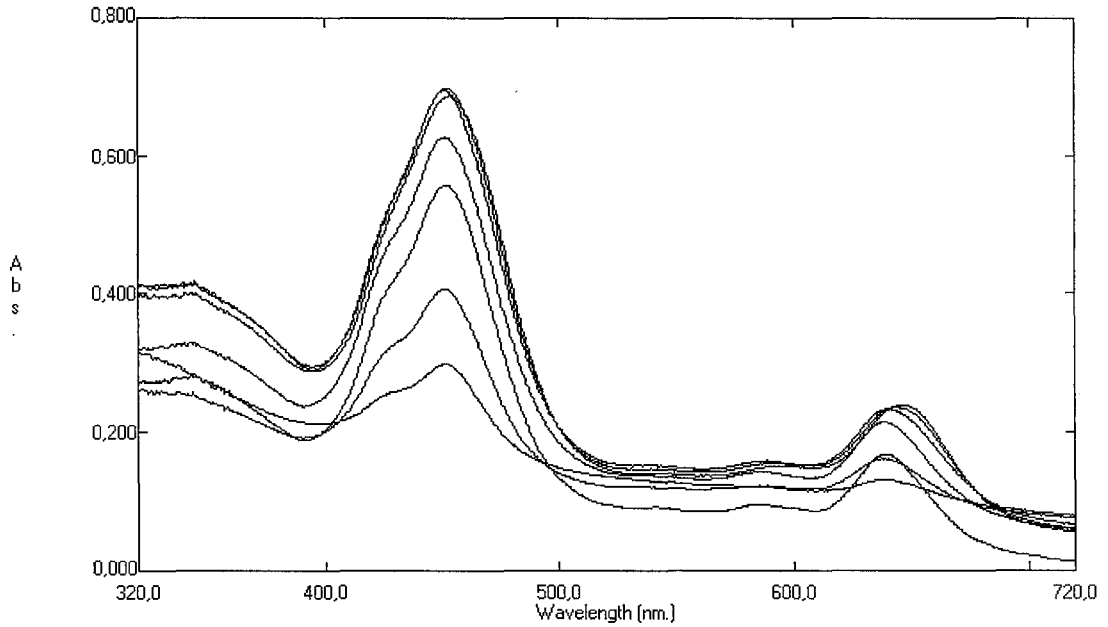
olarak bulunmuştur. Buradaki eğim (m) parçalanma hız sabitinin ters işaretli değeri olduğundan parçalanma hız sabiti (k)  $9,48 \times 10^{-4} \text{ dak}^{-1}$ 'dir. Hız sabitindeki belirsizlik ise

$$\sigma_m = 1,590 \times 10^{-5}$$

olarak hesaplanmıştır. Sonuçta bu deneye ait parçalanma hız sabiti ve bu sabitteki belirsizlik:

$$k = (9,475 \pm 0,159) \times 10^{-4} \text{ dak}^{-1}$$

olarak bulunmuştur. Deneye ilişkin, istatistiksel bir program olan Minitab 13.20 hesaplaması, Excelle çizilen grafik ve UV-Görünür bölge spektrumları aşağıdaki gibidir.



Şekil 2.1. Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidantına karşı, pH=12,73'te 30 °C'de ve karanlıkta) ait UV-Görünür bölge spektrumları

The regression equation is

$$\ln A = -0,616 - 0,000948t$$

| Predictor | Coef        | SE Coef    | T      | P     |
|-----------|-------------|------------|--------|-------|
| Constant  | -0,61599    | 0,01028    | -59,91 | 0,000 |
| C1        | -0,00094753 | 0,00001590 | -59,59 | 0,000 |

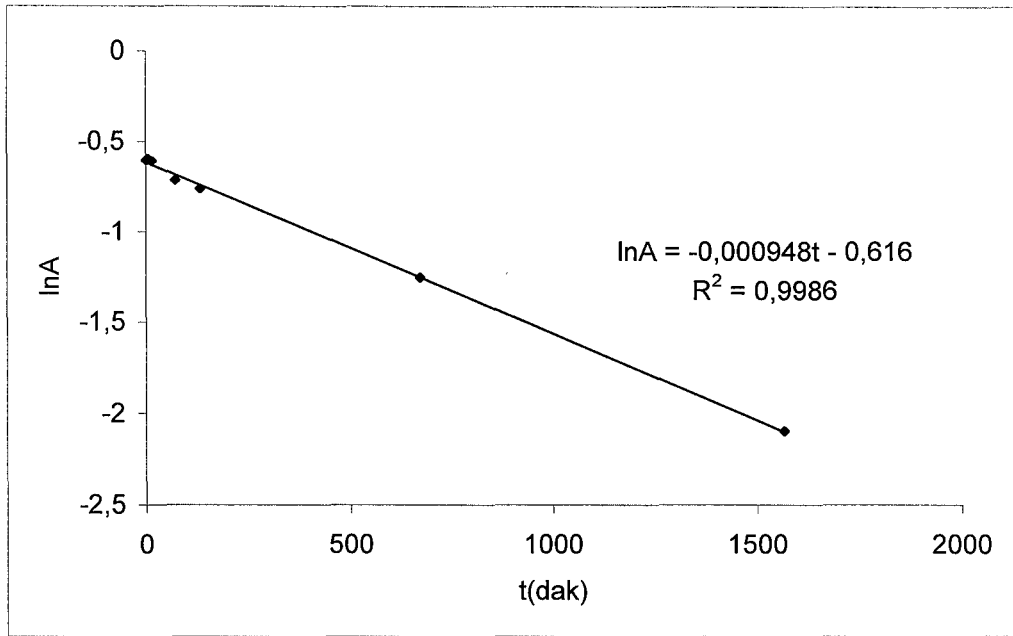
$$S = 0,02285 \quad R\text{-Sq} = 99,9\% \quad R\text{-Sq(adj)} = 99,8\%$$

Analysis of Variance

| Source         | DF | SS     | MS     | F       | P     |
|----------------|----|--------|--------|---------|-------|
| Regression     | 1  | 1,8533 | 1,8533 | 3550,48 | 0,000 |
| Residual Error | 5  | 0,0026 | 0,0005 |         |       |
| Total          | 6  | 1,8559 |        |         |       |

Unusual Observations

| Obs | C1   | C3       | Fit      | SE Fit  | Residual | St Resid |
|-----|------|----------|----------|---------|----------|----------|
| 7   | 1566 | -2,09557 | -2,09983 | 0,02116 | 0,00426  | 0,49 X   |



Şekil 2.2. Klorofil b'nin 14 nolu deneyine ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidantına karşı, pH=12,73'te 30 °C'de ve karanlıkta) ait lnA = f(t) grafiği



### 3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ıspanak yüksek oranda klorofil a ve b'yi içerdiğinden (kuru ıspanağın % 1'ini klorofil a ve b teşkil eder [13]), çim bitkisi ise daha az su içerdiğinden (yaklaşık % 75'i sudur ) tercih edilmiştir. Klorofil a ve b ıspanak ve çim bitkilerinden literatürdeki gibi ekstre edilerek ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmış [5]; feofitin a ve b ise Jose' ve arkadaşları tarafından yapılan yöntemle göre klorofil a ve b'nin HCl ile muamelesiyle meydana gelen demetalasyon reaksiyonu ile hazırlanmıştır [92]. Elde edilen klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin karanlık ve aydınlık ortamlarda aseton, metanol, petrol eteri ve su çözücülerinde, feofitin a ve b'nin direkt güneş ışığı ortamında aseton ve metanol çözücüsünde, klorofil a ve b'nin doğrudan güneş ışığı ortamında % 15 aseton/su çözeltisinde, klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin karanlık ortamda oksidantsız ancak pH'a bağlı yapı kararlılıkları ve son olarak ta klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin karanlık ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH ve NaOCl oksidantlarına karşı pH'a bağlı yapı kararlılıkları incelenmiştir.

İncelenen bu porfirin yapıları suda çözünmediğinden, ortama eklenen çok az metanol veya asetonla bu yapıların çözünmesi sağlandıktan sonra sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Aksi halde suda çözünmeyen bu klorin yapılarının suda çözünür oksidantlara karşı yapı kararlılıklarını incelemek için iki fazlı bir sistemle çalışmak ve ortama faz transfer ajanı bulundurmak gerekir. Bu durumda faz transfer ajanının karakteri, organik faza oksidantların aktarım hızı ve organik fazdaki oksidantların derişimi klorin yapılarının yapı kararlılığını dolaylı olarak etkileyecektir [73].

#### 3.1. Klorofil a ve b'nin Ekstraksiyonu

Klorofiller fotosentetik pigmentler olup, ekstraksiyon sırasında gerek enzimatik, gerekse ışık etkisiyle bozunmaya uğrar. Öncelikle ekstraksiyon için yüksek oranda klorofil içeriği nedeniyle ıspanak bitkisi tercih edilmiştir. Ispanaktan % 100 asetonla havanda ezilerek klorofil a ve b'nin aseton fazına alınması sağlanmıştır. Ancak ıspanak bitkisi yüksek oranda su içerdiğinden ve

klorofillerin yüksek sıcaklıkta daha kolay bozunması nedeniyle rotari evaporatörde 30 °C'de deriştirilmeye çalışılmış, bu işlemde aseton kolayca çekilirken su ortamda kalıp, ortamdaki enzimler ve moleküler oksijen nedeniyle klorofillerin bir kısmı bozunmuştur. Dolayısıyla bu şekilde elde edilen ıspanak ekstresi ince tabaka kromatografisi için uygun olmamış, iyi bir ayırım elde edilememiştir. Ancak daha sonra asetonla yapılan ekstraksiyon ürününe petrol eteri ile yapılan ikinci bir ekstraksiyonla pigmentler eter fazına geçerken, suyun eterdeki düşük çözünürlüğü nedeniyle su asetonla birlikte kalmıştır. Ardından ekstre, rotari evaporatörde 30 °C deriştirilmiş ve içindeki pigmentler ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmışlardır. Sudan kurtulmak için geliştirdiğimiz bir başka yöntem ise, karanlıkta ıspanakların kurutulması ve daha sonra asetonla çekilerek, ekstrenin derin dondurucuda -20 °C'de bir gün bekletilmesi ile sağlanmıştır. Derin dondurucuda enzimlerin denatüre olarak çökmesi sağlanmış ve 4 numara gooch krozesi ile süzülerek uzaklaştırılmıştır. Kuru ıspanaktan ekstraksiyon yapıldığında ekstre oldukça derişik olduğundan deriştirilmesine ve petrol eteri ile ikinci bir ekstraksiyonuna gerek görülmemiştir. Kurutma sırasında da klorofillerin bir kısmının bozunması nedeniyle daha kolay ve daha çabuk bir yöntem araştırılmıştır. Bu amaç için çim bitkisinden yararlanılmıştır. Çim bitkisinin su yüzdesi ıspanaktan çok daha düşük olduğundan, hızlı bir şekilde asetonla yapılan ekstraksiyondan sonra deriştirilmesine ve petrol eteri ile ikinci bir ekstraksiyonuna gerek görülmeden o sırada hazır bulunan plakalara yüklenerek hızlı bir şekilde saflaştırılmıştır. İlk yapılan ekstraksiyon ürünü yüksek oranda su içerdiğinden ve çimin üzerindeki safsızlıklardan kurtulmak amacıyla dökülmüş, ardından çim bitkisi renksiz kalıncaya kadar, üç-dört kez, ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrenin uzun süre bekletilmesi halinde klorofillerin dimerleşme ile yüzeyde birikebileceği ve bir kısmının da bozunabileceğinden hızlı bir şekilde ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılmışlardır. Ayrıca tüm çalışmalarda ışığın bozucu etkisinden sakınmak için karanlıkta çalışılmaya dikkat edilmiştir. Yeterince çim bitkisinin kesilmesi ile ince tabaka kromatografine yüklenmesine kadar geçen tüm aşamalar 15-20 dakika gibi kısa sürede yapılmıştır.

### 3.2. Klorofil a ve b'nin Saflaştırılması

Yaptığımız çalışmalarda fotosentetik pigmentlerin saflaştırılması işlemi ince tabaka kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Ispanak veya çim ekstreleri çok sayıda pigment içerdiğinden ve klorofillerin hızlı bozunmaları nedeniyle saflaştırılmaları oldukça zordur. Ayrıca benzer yapılar olan klorofil a ve klorofil b'nin birbirinden ayrılmalarının zorluğu nedeniyle birden fazla yürütme işlemine gerek olması ve bu sırada klorofillerin büyük bir kısmının bozunması oldukça büyük bir problemdir. Bu yüzden uygun bir çözelti karışımıyla mümkün olduğunca az basamakta saflaştırılma yönteminin bulunmasına çalışılmıştır. Bu amaç için öncelikle ekstraksiyonda kullandığımız aseton denenmiş ancak ayırım gerçekleştirilememiştir. Benzer şekilde metanol, dietil eter, benzen, n-hekzan, N,N-dimetil formamid saf bir şekilde yürütücü faz olarak kullanıldığında da saflaştırılamamışlardır. Daha sonra yukarıdaki çözücülerin farklı oranlarında ikili karışımları yürütücü faz olarak denenmiştir. Ancak bu durumda da karotenler veya ksantofiller gibi bazı pigmentler ayrılrsa da klorofillerin saflaştırılması gerçekleştirilememiştir. Bunun üzerine literatürdeki gibi, çözücü karışımı olarak petrol eteri / aseton / dietil amin (10:4:1 (v/v/v)) oranında kullanılmış; GF<sub>254</sub> silikajel 0,75 mm kalınlığında 20x20 cam plaka üzerinde yüklenerek hazırlanan plakalarla yürütülmüş ve iyi sonuçlar elde edilmiştir [2,5]. Bu yürütme işleminde pigmentlerin R<sub>f</sub> değerleri not edilmiştir (Çizelge 2.1). Başlangıçta yukarıda verilen çözücü karışımındaki petrol eteri yerine dietil eter kullanılmış ve zaman zaman başarılı ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Bu karışımındaki R<sub>f</sub> değerleri de not edilmiştir (Çizelge 2.1). Ancak bu çözücü karışımında petrol eteri dietil eterden daha iyi sonuçlar verdiği için tercih edilmiştir. Yürütmeler sırasında klorofillerin ışıktaki bozunmaması için karanlık ortamda yürütme yapılmıştır. Bu işlemlerle saf olarak elde edilen klorofil a ve b yine aynı yürütücü fazında ince tabaka kromatografisinde ikinci kez yürütülerek tamamen saf hale getirilmiştir. Daha sonra kinetik çalışmalarımız için yeterli miktarda klorofil a ve b elde edilene kadar -20 °C'de derin dondurucuda biriktirilen klorofil a ve b, rotari evaporatörde 30 ° C'de çözücüsünün uçurulması sağlanmış, karanlıkta ve oda sıcaklığında 24 saat vakum etüvünde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Ardından saf

olarak elde edilen mavimsi yeşil renkli klorofil a ve sarımsı yeşil renkli klorofil b'nin UV-Görünür bölge spektrumu alındığında, literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür (Çizelge 2.2).

### 3.3. Feofitin a ve b'nin Hazırlanması

Klorofil a ve b Bölüm 2.3.1'de belirtildiği gibi saf olarak elde edildikten sonra, bu pigmentlerin demetalasyonu ile feofitin a ve b hazırlanmıştır [92]: Buna göre bir miktar klorofil a ve b asetonda çözülmüş ve her bir pigment çözeltisinin içine aseton çözeltisinin on katı hacminde 1 M HCl ilave edilerek çalkalanmıştır. Çözeltilerin renginin yeşilden tamamen kahve rengine dönüşümü sağlandıktan sonra her bir defasında 10 ml petrol eteri kullanarak üç kez tekrarlanmak üzere pigmentler aseton çözeltisinden ekstre edilmiştir. Çözeltinin renginin kahve rengine dönüşümü, demetalasyonun bittiğinin göstergesidir. Sonra ortam asitliği  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile nötrleştirilmiş ve beş kez saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra rotari evaporatörde 40 °C'de mümkün olan en küçük hacime kadar deriştirilmiş, ardından karanlıkta ve oda sıcaklığında 24 saat vakum etüvünde sabit tartıma gelinceye kadar kurutularak tartılmıştır. Daha sonra standart çözeltisi hazırlanarak -20 °C'de saklanmışlardır. Feofitin a ve b'nin asetondaki spektrumlarının absorbanlarının, literatürdeki değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür (Çizelge 2.3).

### 3.4. Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'nin Yapı Kararlılıkları

Bu çalışmada öncelikle klorofil a ve b ile feofin a ve b'nin karanlık ve aydınlıkta aseton, metanol, petrol eteri ve su çözücülerinde yapı kararlılıkları incelenmiştir. Ardından feofitin a ve b'nin doğrudan güneş ışığı ortamında aseton ve metanol çözücülerinde ve klorofil a ve b'nin doğrudan güneş ışığı ortamında % 15 metanol/su çözeltisinde yapı kararlılıkları incelenmiştir. Sonra klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin karanlık ortamda oksidantsız ancak pH'a bağlı yapı kararlılıkları ve son olarak ta klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin karanlıkta, sulu ortamda 1000 katı derişiminde bulunan  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  ve  $\text{NaOCl}$

oksidantlarına karşı, 30 °C'de pH'a bağlı yapı kararlılıkları incelenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda bir porfirin yapısında olan klorofillerin yapı kararlılıklarına ilişkin ayrıntılı çalışmalar bulunmamaktadır. Sadece bazı yayınlarda metallo tetraarilporfirinlerin oksidasyon katalizörü olarak kullanımı sırasında oksidant tarafından parçalandığı belirtilmektedir [44,77-79,81,93]. Metallo tetraarilporfirinlerin oksidantlar tarafından parçalanmaları genellikle oksidantın, tetraarilporfirinin *meso* konumundaki karbonlarına saldırmasıyla veya oksitlenmiş metalden oksijenin liganda aktarılmasıyla olmaktadır. Ayrıca liganttaki azotların da oksitlendiği belirlenmiştir.

Klorofil türevlerinde parçalanma moleküler oksijenin varlığında meydana gelmekte ve C-5, C-10, C-15 atomlarından radikalik parçalanmaları şeklinde gerçekleşmektedir. Bu çalışmada klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin hidrojen peroksit, *tert*-butilhidroperoksit ve sodyum hipoklorit ortamlarında yapı kararlılıklarının incelenmesi UV-Görünür bölge spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır. Çeşitli pH'larda tamponlanmış klorofiller ile 0,025 M hidrojen peroksit, 0,025 M *tert*-butilhidroperoksit ve 0,02 M sodyum hipoklorit içeren reaksiyon karışımlarının iyonik şiddeti 0,2'ye eşit veya büyük olarak hazırlanmış, 30 °C'de belli zaman aralıklarında görünür bölge spektrumları alınmış ve görünür bölge spektrumunda ilgili klorofil a ve b ile feofitin a ve b'ye ait karakteristik temel pikin absorbansındaki azalma takip edilmiştir. İyonik şiddet NaNO<sub>3</sub> ile 0,2 değerinden küçük olmayacak şekilde ayarlanmış ve tampon olarak pH 1-2 için H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/HCl, pH 4-4,5 için NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6-7,5 için NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 9-9,5 için Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, pH 11-11,5 için Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaOH ve pH 12,5-13 için Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ NaOH tamponları kullanılmıştır. Ayrıca pH 14 için ortam asitliği, 4 M NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır. Reaksiyonlarda [oksidant]/[pigment] oranı 1000 değerinde tutulmuş ve bu şekilde reaksiyon hız denkleminde oksidant derişiminin değişken olmaması sağlanmıştır. Bu reaksiyon koşullarında, görünür bölge spektrumlarındaki zamana bağlı olarak klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin temel pikindeki azalmanın yalancı-birinci mertebeden reaksiyon hız denkleminde uyduğu belirlenmiştir. Klorofil a ve b ile feofitin a ve b'nin gözlenen parçalanma hız sabiti ve spektrumlardan elde edilen verilerin hız sabitindeki belirsizlik, klorofil a ve klorofil b için istatistiksel bir yöntem olan Minitab 13.20 lineer regresyon

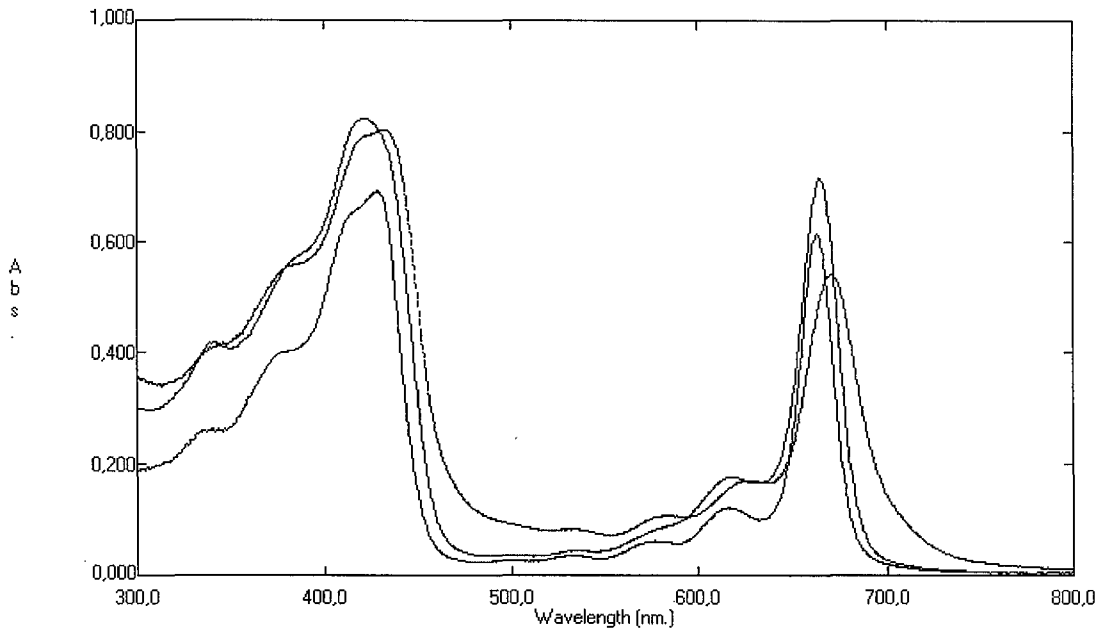
yöntemi ile feofitin a ve feofitin b için ise SPSS 10.0 lineer regresyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.4.1. Klorofil a ve b'nin Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılıkları**

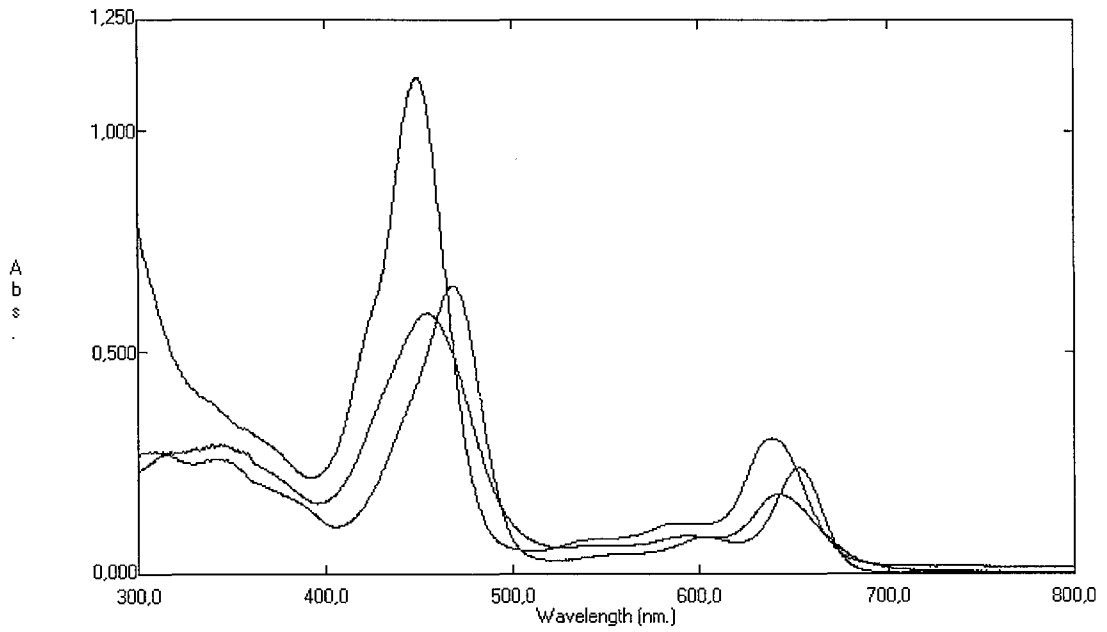
Klorofil a ve b'nin karanlıkta metanol, petrol eteri ve metanol/su çözücü ve çözeltilerindeki yapı kararlılıkları incelendiğinde, bu pigmentlerin metanol ve petrol eterinde bozunmadıkları ancak metanol/su çözeltisinde bozunduğu ve ayrıca bu ortamda klorofil a'nın klorofil b'den daha hızlı bozunduğu saptanmıştır.

Klorofil a ve b'nin aydınlıkta metanol/su karışımında yapı kararlılıkları incelendiğinde bozunmanın gerçekleştiği ve klorofil b'nin klorofil a'dan daha hızlı bozunduğu saptanmıştır.

Klorofil a ve b'nin doğrudan güneş ışığı ortamında metanol/su karışımında yapı kararlılıkları incelendiğinde ise klorofilin porfirin halkasının hızlı bir şekilde parçalandığı görülmüş ve bu parçalanma kinetiğinin yarı ömrü klorofil a için 80 dakika ve klorofil b için 38 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Klorofil a'nın, Soret bantlarının absorbans şiddetine göre sırasıyla metanol, metanol/su ve petrol eterindeki spektrumları



Şekil 3.2. Klorofil b'nin, Soret bantlarının absorbans şiddetine göre sırasıyla petrol eteri, metanol ve metanol/su daki spektrumları

Çizelge 3.1. Klorofil a'nın çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret pikinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | Çözücü         | Ortam       | k (dak <sup>-1</sup> )         | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}/\text{nm}^b$ |
|----|----------------|-------------|--------------------------------|------------------|------------------------------|
| 1  | Petrol eteri   | Karanlık    | c                              |                  | 428,0                        |
| 2  | Metanol        | Karanlık    | c                              |                  | 422,5                        |
| 3  | %15,40 Metanol | Karanlık    | $(2,93\pm 0,45)\times 10^{-6}$ | 164 gün          | 431,5                        |
| 4  | %15,40 Metanol | Aydınlık    | $(1,59\pm 0,08)\times 10^{-4}$ | 73 sa.           | 419,5                        |
| 5  | %15,40 Metanol | Güneş ışığı | $(8,70\pm 0,67)\times 10^{-3}$ | 80 dak.          | 419,0                        |

<sup>a</sup>[Klorofil a]= $2,50\times 10^{-5}$  M; t= 30 °C; V=10 ml

<sup>b</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>c</sup>Bozunma olmamaktadır

Çizelge 3.2. Klorofil b'nin çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret pikinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | Çözücü         | Ortam       | k (dak <sup>-1</sup> )         | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}/\text{nm}^b$ |
|----|----------------|-------------|--------------------------------|------------------|------------------------------|
| 1  | Petro eteri    | Karanlık    | c                              |                  | 449,0                        |
| 2  | Metanol        | Karanlık    | c                              |                  | 468,5                        |
| 3  | %15,62 Metanol | Karanlık    | $(1,63\pm 0,40)\times 10^{-6}$ | 295 gün          | 454,5                        |
| 4  | %15,62 Metanol | Aydınlık    | $(3,10\pm 0,22)\times 10^{-4}$ | 37 sa.           | 455,0                        |
| 5  | %15,62 Metanol | Güneş ışığı | $(1,82\pm 0,10)\times 10^{-2}$ | 38 dak.          | 455,0                        |

<sup>a</sup>[Klorofil b]= $2,50\times 10^{-5}$  M; t= 30 °C; V=10 ml

<sup>b</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

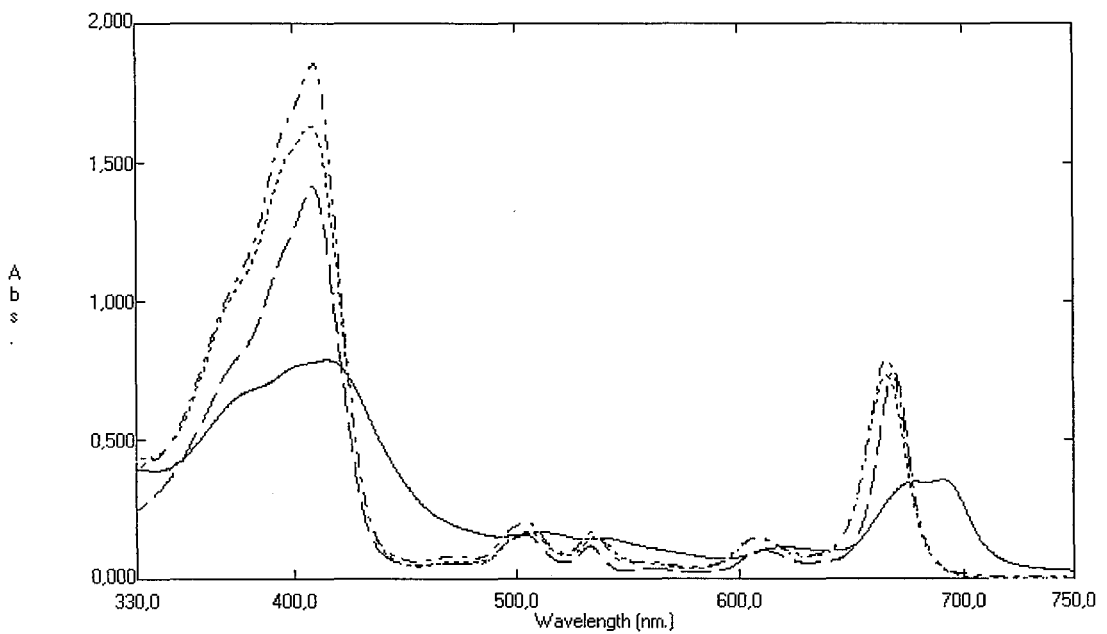
<sup>c</sup>Bozunma olmamaktadır

### 3.4.2 Feofitin a'nın Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılığı

Feofitin a'nın karanlıkta petrol eteri, aseton, metanol ve su çözücülerinde bozunma kinetiği incelendiğinde, bu çözücülerde su hariç bozunmadıkları ancak feofitin a'nın dimerleştiği, dimerleşmeye bağlı olarak ta feofitin a'nın Soret pikinin yayvanlaşarak omuzlar oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.1). Ancak çözücü



su olduğunda dimerleşme oranı ve hızı fazla olduğu bulunmuş ve sulu ortamda az da olsa fitol grubunun ayrıldığı ve böylece oluşan feoforbid a'nın asidik özelliğinden dolayı çok yavaş bir şekilde bozunduğu bulunmuştur. Aynı çözücülerde işlem aydınlıkta tekrarlandığında feofitin a en hızlı suda bozunurken, diğer çözücülerde sırasıyla aseton, metanol ve petrol eterinde bozunmuştur (Çizelge 3.3). Feofitin a'nın aseton ve metanol çözücülerinde direkt güneş ışığı ile etkileşimindeki yapı kararlılığı incelendiğinde halkanın hızlı bir şekilde parçalandığı görülmüş ve bu parçalanma kinetiği yarı ömrü, asetonunda 15 dakika, metanolde ise 564 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3).



Şekil 3.3. Feofitin a'nın; su (—), petrol eteri (---), metanol (....), aseton (-.-) çözücülerindeki spektrumları.

Çizelge 3.3. Feofitin a'nın çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{max}$  değeri<sup>a</sup>

| Deney | Çözücü       | Ortam       | k (dak <sup>-1</sup> )         | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{max}/nm$ <sup>b</sup> |
|-------|--------------|-------------|--------------------------------|------------------|---------------------------------|
| 1     | Petro eteri  | Karanlık    | c                              |                  | 409                             |
| 2     | Aseton       | Karanlık    | c                              |                  | 409                             |
| 3     | Metanol      | Karanlık    | c                              |                  | 409                             |
| 4     | Su           | Karanlık    | $(2,64\pm 0,38)\times 10^{-5}$ | 18 gün           | 415                             |
| 5     | Petrol eteri | Aydınlık    | $(1,31\pm 0,11)\times 10^{-5}$ | 34 gün           | 410                             |
| 6     | Aseton       | Aydınlık    | $(2,63\pm 0,53)\times 10^{-4}$ | 44 sa.           | 409                             |
| 7     | Metanol      | Aydınlık    | $(2,62\pm 0,24)\times 10^{-5}$ | 18 gün           | 404                             |
| 8     | Su           | Aydınlık    | $(3,70\pm 0,16)\times 10^{-4}$ | 31 sa.           | 415                             |
| 9     | Aseton       | Güneş ışığı | $(4,54\pm 0,45)\times 10^{-2}$ | 15 dak.          | 409                             |
| 10    | Metanol      | Güneş ışığı | $(1,23\pm 0,01)\times 10^{-3}$ | 564 dak.         | 405                             |

<sup>a</sup>[Feofitin a]= $3,32\times 10^{-5}$  M; t= 30 °C; V=10 ml

<sup>b</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>c</sup>bozunma olmamaktadır

### 3.4.3. Feofitin b'nin Farklı Çözücülerdeki Yapı Kararlılığı

Feofitin b'nin karanlıkta petrol eteri, aseton, metanol ve su çözücülerinde yapı kararlılığı incelendiğinde, feofitin b'nin bu çözeltilerde su hariç bozunmadığı, ve ayrıca bu ortamlarda absorbans şiddetinin azaldığı görülmüş ve bu azalmanın dimerleşmeden ve agregasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 3.2). Suda fitol grubunun ayrıldığı ( fitol grubunun ayrılma hız sabiti (k) =  $(2,68\pm 0,76)\times 10^{-4}$  ) ve oluşan feoforbid b'nin asidik özelliğinden dolayı çok yavaş bir şekilde feoforbid b halkasının parçalandığı belirlenmiştir. Bu işlem aynı çözücülerde aydınlıkta tekrarlandığında, feofitin b'nin en hızlı su çözücüsünde sonra sırasıyla aseton, petrol eteri ve en yavaş ta metanolde bozunmuştur (Çizelge 3.4). Aseton ve metanol çözücülerinde ve güneş ortamında feofitin b'nin kararlılığı incelendiğinde ise halkanın hızlı bir şekilde parçalandığı bu çözücülerdeki parçalanma reaksiyonları hızının yarı ömürlerinin asetonda 8 dakika, metanolde ise 568 dakika olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

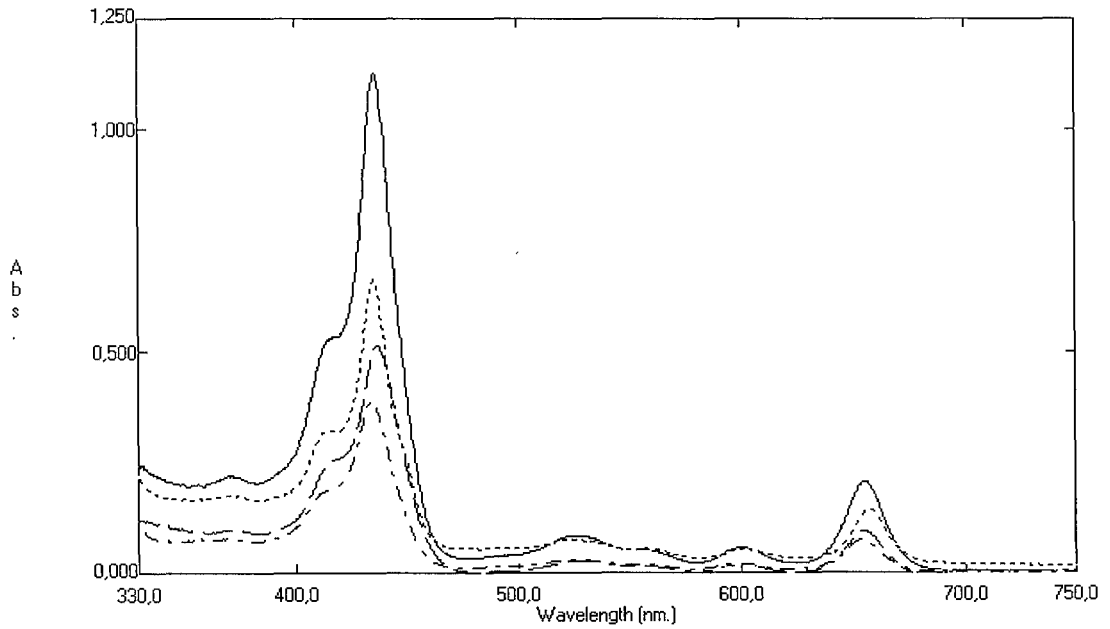
Çizelge 3.4. Feofitin b'nin çözücülere karşı bozunma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| Deney | Çözücü       | Ortam       | k (dak <sup>-1</sup> )           | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}/\text{nm}$ <sup>b</sup> |
|-------|--------------|-------------|----------------------------------|------------------|---|
| 1     | Petrol eteri | Karanlık    | c                                |                  | 436                                     |
| 2     | Aseton       | Karanlık    | c                                |                  | 436                                     |
| 3     | Metanol      | Karanlık    | c                                |                  | 437                                     |
| 4     | Su           | Karanlık    | $(2,68 \pm 0,76) \times 10^{-4}$ | 43 sa.           | 445                                     |
| 5     | Petrol eteri | Aydınlık    | $(3,07 \pm 0,21) \times 10^{-5}$ | 16 gün           | 434                                     |
| 6     | Aseton       | Aydınlık    | $(3,30 \pm 0,51) \times 10^{-4}$ | 35 sa.           | 435                                     |
| 7     | Metanol      | Aydınlık    | $(3,31 \pm 0,44) \times 10^{-5}$ | 15 sa.           | 435                                     |
| 8     | Su           | Aydınlık    | $(1,21 \pm 0,14) \times 10^{-3}$ | 573 dak.         | 439                                     |
| 9     | Aseton       | Güneş ışığı | $(9,08 \pm 0,81) \times 10^{-2}$ | 8 dak.           | 435                                     |
| 10    | Metanol      | Güneş ışığı | $(1,22 \pm 0,14) \times 10^{-3}$ | 568 dak.         | 435                                     |

<sup>a</sup>[Feofitin b]= $4,92 \times 10^{-5}$  M; t= 30 °C; V=10 ml

<sup>b</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>c</sup>bozunma olmamaktadır



Şekil 3.4. Feofitin b'nin; su (-.-.), petrol eteri (....), metanol (----), aseton (—) çözücülerindeki spektrumları

### 3.4.4. Klorofil a'nın Farklı pH' lardaki Yapı Kararlılığı

Klorofil a'nın karanlıkta pH 1-14 arasında oksidant olmadığı durumda yapı kararlılığı incelendiğinde bu pigment asidik ortamlarda magnezyum metalini vermiştir. Ayrıca pH<10,67 olduğunda klorofil a'nın bozunduğu belirlenmiştir. Ancak pH>10,67 olduğunda fitol grubu ayrılarak klorofillid a yapısına dönüşmüş ve bu yapının bu pH aralığında kararlı olduğu belirlenmiştir. Klorofil a pH<10,67 olduğunda dimerleşme olmaksızın klorofil halkası bozunurken, pH>10,67 olduğunda öncelikle dimerleşme hızlı bir şekilde gerçekleşmekte ve dimerleşme dengeye ulaştığında fitol grubunun ayrılması ön plana çıkmaktadır. Fitol grubunun ayrılması dengeye ulaştığında ise yayvan pik tek ve keskin pike dönüşmektedir. Ayrıca dimerleşmenin bozulmasıyla UV-Görünür bölge spektrumlarında artış gözlenmiştir. (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Klorofil a'nın farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret pikinin  $\lambda_{\max}$  değerleri<sup>a</sup>

| No | pH <sup>b</sup>                       | k/dak <sup>-1</sup>            | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}$ /nm <sup>c</sup> |
|----|---------------------------------------|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | 1,80                                  | (2,54 ± 0,49)x10 <sup>-2</sup> | 27 dak.          | 422,5                             |
| 2  | 4,78                                  | (4,49 ± 0,77)x10 <sup>-3</sup> | 154 dak.         | 441,5                             |
| 3  | 6,46                                  | (1,55 ± 0,66)x10 <sup>-3</sup> | 447 dak.         | 442,5                             |
| 4  | 9,27                                  | (1,96 ± 0,14)x10 <sup>-4</sup> | 59 sa.           | 433,5                             |
| 5  | 10,67                                 | e                              |                  | 433,0                             |
| 6  | 12,56                                 | e                              |                  | 418,0                             |
| 10 | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>d</sup> | e                              |                  | 419,5                             |

<sup>a</sup>[Klorofil a]= 2,5x10<sup>-5</sup> M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

<sup>e</sup>Bozunma olmamaktadır

### 3.4.5. Klorofil b'nin Farklı pH'lardaki Yapı Kararlılığı

Klorofil b'nin karanlıkta pH 1-14 arasında ve oksidant olmadığı durumda yapı kararlılığı incelendiğinde asidik ortamda magnezyum metalini vermiş ve ayrıca pH<11,30 olduğunda klorofil b halkasının parçalandığı belirlenmiştir. Ancak pH>11,30 olduğunda fitol grubu ayrılarak klorofillid b yapısına dönüşmüş ve bu yapının pH>11,30 olduğunda kararlı olduğu belirlenmiştir. Klorofil b, pH<11,30 olduğunda dimerleşme olmaksızın halkasının parçalanması gerçekleşirken, pH>11,30 olduğunda öncelikle dimerleşme hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Dimerleşme dengeye ulaştığında ise fitol grubunun ayrılması ön plana çıkmaktadır. Fitol grubunun ayrılması dengeye ulaştığında ise yayvan pik tek ve keskin pike dönüşmektedir. Ayrıca dimerleşmenin bozulmasıyla UV-Görünür bölge spektrumlarında artış gözlenmiştir. (Çizelge 3.6). Klorofil b'nin porfirin halkasının pH>11,30 olduğunda bozunmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Klorofil b'nin farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | pH <sup>b</sup>                       | k/dak <sup>-1</sup>            | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}$ /nm <sup>c</sup> |
|----|---------------------------------------|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | 1,55                                  | (7,14± 1,57)x10 <sup>-3</sup>  | 97 dak.          | 449,5                             |
| 2  | 4,67                                  | (3,74 ± 0,50)x10 <sup>-3</sup> | 186 dak.         | 470,5                             |
| 3  | 6,52                                  | (6,33± 1.19)x10 <sup>-3</sup>  | 109 dak.         | 473,5                             |
| 4  | 9,17                                  | (1,55 ± 0,28)x10 <sup>-4</sup> | 75 sa.           | 463,5                             |
| 5  | 11,30                                 | e                              |                  | 462,0                             |
| 8  | 12,96                                 | e                              |                  | 457,0                             |
| 11 | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>d</sup> | e                              |                  | 452,0                             |

<sup>a</sup>[Klorofil b]= 2,5x10<sup>-5</sup> M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

<sup>e</sup>Bozunma olmamaktadır

### 3.4.6. Feofitin a'nın Farklı pH' larda Yapı Kararlılığı

Feofitin a'nın karanlıkta pH 1-14 arasında ve oksidant olmadığı durumda yapı kararlılığına bakıldığında, pH<7,00 olduğunda feofitin a halkasının parçalandığı, ancak bu pH değerlerinin üzerinde feofitin a'nın bozunmayıp fitol grubunun ayrıldığı ve oluşan feoforfid a'nın pH 9,25-12,50 arası kararlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.7).

Feofitin a'nın yapı kararlılığı incelendiğinde, öncelikle dimerleşme hızlı bir şekilde gerçekleşmekte (pH=12,50, k=(5,84±0,10)x10<sup>-4</sup> dak<sup>-1</sup>), dimerleşme dengeye ulaştığında fitol grubunun ayrılması ön plana çıkmakta (pH 12,50 k=(4,03±0,65)x10<sup>-5</sup> dak<sup>-1</sup>) ve bu da dengeye ulaştığında yayvan pik tek ve keskin pike dönüşmektedir. Oluşan feoforbid a'nın da pH 9,25-12,50 de bozunmadığı ancak [OH<sup>-</sup>] = 1,2 M değerinde bozunma kinetiğinin yarı ömrü 27 gün olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Feofitin a'nın farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | pH <sup>b</sup>         | k (dak <sup>-1</sup> )       | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}$ /nm <sup>c</sup> |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | 1,25                    | (1,30±0,25)x10 <sup>-3</sup> | 533 dak.         | 450                               |
| 2  | 4,10                    | (1,16±0,19)x10 <sup>-2</sup> | 60 dak.          | 455                               |
| 3  | 7,00                    | (7,85±0,99)x10 <sup>-4</sup> | d                | 445                               |
| 4  | 9,25                    | (3,01±0,76)x10 <sup>-5</sup> | d                | 415                               |
| 5  | 10,70                   | (4,40±0,99)x10 <sup>-5</sup> | d                | 406                               |
| 6  | 12,50                   | (4,03±0,65)x10 <sup>-5</sup> | d                | 410                               |
| 7  | [OH]=1,2 M <sup>e</sup> | (1,76±0,99)x10 <sup>-5</sup> | 27 gün           | 410                               |

<sup>a</sup>[Feofitin a]= 3,32x10<sup>-5</sup> M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>Fitol grubunun ayrılma hız sabiti

<sup>e</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

### 3.4.7. Feofitin b'nin Farklı pH' larda Yapı Kararlılığı

Feofitin b'nin farklı pH'larda, karanlıkta ve oksidant olmadığı ortamda kararlılığı incelendiğinde, feofitin b halkasının düşük pH'larda (pH<7,26) parçalandığı ancak pH arttıkça bozunma hızının yavaşladığı, fakat bu bozunma pH 9,70 de en yavaş, pH 14 ise en hızlı olacak şekilde gerçekleşmektedir (Çizelge 3.8). Örneğin pH 9,70'de 15 günde ve pH 10,80'de 14 günde feofitin b halkasının yarısının bozunduğu görülmektedir. Düşük pH'larda agregasyon oluşturmamasından dolayı feofitin oksidantlarla daha az etkileşeceğinden düşük pH'larda daha yavaş bozunmaktadır. Ayrıca pH arttıkça fitol grubunun ayrılmasıyla agregasyon oluşmamaktadır. Fitol grubunun ayrılmasıyla oluşan feoforbid b bazik ortamda (pH 10,80-13,30) yavaş bozunmaktadır. Örneğin pH 13,30'da 12,34 günde ve pH 10,80'de 14,41 günde feoforbid b'nin yarısının bozunduğu bulunmuştur (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Feofitin b'nin farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret pikinin  $\lambda_{\max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | pH <sup>b</sup>                       | k (dak <sup>-1</sup> )       | t <sub>1/2</sub> | $\lambda_{\max}/\text{nm}^c$ |
|----|---------------------------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|
| 1  | 1,85                                  | (1,78±0,69)x10 <sup>-3</sup> | 389 dak.         | 445                          |
| 2  | 4,80                                  | (1,40±0,27)x10 <sup>-2</sup> | 50 dak.          | 448                          |
| 3  | 7,25                                  | (1,21±0,26)x10 <sup>-3</sup> | 573 dak.         | 449                          |
| 4  | 9,70                                  | (3,17±0,13)x10 <sup>-5</sup> | 15 gün           | 445                          |
| 5  | 10,80                                 | (3,34±0,45)x10 <sup>-5</sup> | 14 gün           | 444                          |
| 6  | 13,30                                 | (3,90±0,05)x10 <sup>-5</sup> | 12 gün           | 440                          |
| 7  | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>d</sup> | (7,78±0,91)x10 <sup>-5</sup> | 15 sa.           | 440                          |

<sup>a</sup>[Feofitin b]=4,92x10<sup>-5</sup> M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

### 3.4.8. Klorofil a'nın Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı

Asidik ortamda klorofil a'nın yapı kararlılığı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOCl ve (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidantlarına karşı pH 1-14 arasında incelenmiştir (Çizelge 3.9).

Klorofil a'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantına karşı yapı kararlılığı incelendiğinde, en kararlı klorofil a yapısının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantına karşı [OH<sup>-</sup>] = 1,2 M'da (k=(2,046±0,0076)x10<sup>-4</sup> dak<sup>-1</sup>) olduğu, en kararsız ise pH 1,51'de (k=(3,859 ± 0,511)x10<sup>-2</sup> dak<sup>-1</sup>) olduğu belirlenmiştir. Ortam pH > 11,27'den büyük olduğunda önce dimerleşme daha sonra fitol grubunun ayrılması ve klorofilid a halkasının bozunma reaksiyonları oluşmaktadır. Bu pH aralığında klorofil a'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantına karşı kararlılığı oksidantsız durumla kıyaslandığında, asidik bölgede her ikisinde kararlılığı düşük ve birbirine yakındır. Bazik bölgede ise oksidantsız durumda klorofil a kararlı iken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantında kararsız ancak asidik bölgeye kıyasla daha kararlı olduğunu görürüz.

Klorofil a'nın pH 1-14 arasında (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidantına karşı yapı kararlılığının en iyi [OH<sup>-</sup>] = 1,2 M olduğunda (k=(1,311±0,142)x10<sup>-4</sup> dak<sup>-1</sup>) ve en kararsız ise pH 4,92'de (k=(8,950 ± 0,479)x10<sup>-3</sup> dak<sup>-1</sup>) olduğu bulunmuştur. Bu



oksidantta da  $\text{pH} > 12,71$  olduğunda önce dimerleştiği sonra fitol grubunun ayrılması ve daha sonra da feofitin a halkasının parçalandığı belirlenmiştir. Bu pH aralığında klorofil a'nın  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantına karşı kararlılığı oksidantsız durumla kıyaslandığında, asidik bölgede her ikisinde kararlılığı düşük ve birbirine yakındır. Bazik bölgede ise klorofil a bozunmazken, bu oksidantta asidik bölgeye göre daha yavaş bozunma gerçekleşir.

Klorofil a'nın NaOCl oksidantı varlığında yapı kararlılığı incelendiğinde ise asidik ortamda ölçülemeyecek kadar hızlı bir şekilde klorofil a halkasının parçalandığı belirlenmiştir. Bazik ortamda ise yine hızlı bir şekilde bozunma olmuş ancak  $\text{pH} = 12,63$ 'te hızlı bir şekilde oluşan dimerleşmenin bozunması ile UV-Görünür bölge spektrumunda bir artış gözlenmiş, daha sonra yapının bozunması gerçekleşmiştir. Ayrıca NaOCl oksidantına karşı klorofil a yapısının  $\text{pH} = 12,63$  değerinde en kararlı olduğu belirlenmiştir ( $k = (4,584 \pm 0,326) \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ) (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Klorofil a'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li, NaOCl'li ve (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin λ<sub>max</sub> değeri<sup>a</sup>

| No | Oksidant                             | pH <sup>b</sup>                       | k/dak <sup>-1</sup>               | t <sub>1/2</sub> | λ <sub>max</sub> /nm <sup>c</sup> |
|----|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 1,51                                  | (3,859 ± 0,511)x10 <sup>-2</sup>  | 18 dak.          | 423,0                             |
| 2  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 4,15                                  | (2,689 ± 1,117)x10 <sup>-2</sup>  | 26 dak.          | 440,5                             |
| 3  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 5,91                                  | (6,929 ± 0,835)x10 <sup>-3</sup>  | 100 dak.         | 441,5                             |
| 4  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 9,01                                  | (1,204 ± 0,109)x10 <sup>-3</sup>  | 576 dak.         | 433,0                             |
| 5  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 11,27                                 | (1,297 ± 0,375)x10 <sup>-2</sup>  | d                | 432,5                             |
| 6  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 11,27                                 | (6,318 ± 1,383)x10 <sup>-4</sup>  | 18 sa.           | 433,5                             |
| 7  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 12,73                                 | (1,297 ± 0,375)x10 <sup>-2</sup>  | d                | 417,5                             |
| 8  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 12,73                                 | (1,596 ± 0,0015)x10 <sup>-3</sup> | 434 dak.         | 419,5                             |
| 9  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (2,046 ± 0,0076)x10 <sup>-4</sup> | 56 sa.           | 414,5                             |
| 10 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 1,92                                  | (5,517 ± 0,924)x10 <sup>-3</sup>  | 126 dak.         | 430,5                             |
| 11 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 4,92                                  | (8,950 ± 0,479)x10 <sup>-3</sup>  | 77 dak.          | 443,0                             |
| 12 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 6,46                                  | (4,987 ± 0,650)x10 <sup>-3</sup>  | 139 dak.         | 442,5                             |
| 13 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 9,31                                  | (7,048 ± 0,711)x10 <sup>-4</sup>  | 983 dak.         | 432,0                             |
| 14 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 10,95                                 | (1,664 ± 0,117)x10 <sup>-3</sup>  | 417 dak.         | 432,5                             |
| 15 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 12,71                                 | (4,001 ± 1,919)x10 <sup>-3</sup>  | d                | 418,5                             |
| 16 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 12,71                                 | (1,313 ± 0,101)x10 <sup>-3</sup>  | 528 dak.         | 418,5                             |
| 17 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (3,402 ± 0,221)x10 <sup>-3</sup>  | d                | 422,0                             |
| 18 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (1,311±0,142)x10 <sup>-4</sup>    | 88 dak.          | 415,5                             |
| 19 | NaOCl                                | 1,01                                  | Kararsız <sup>f</sup>             |                  |                                   |
| 20 | NaOCl                                | 5,20                                  | Kararsız <sup>f</sup>             |                  |                                   |
| 21 | NaOCl                                | 6,21                                  | Kararsız <sup>f</sup>             |                  |                                   |
| 22 | NaOCl                                | 9,09                                  | (3,019±0,338)x10 <sup>-1</sup>    | 138 sn.          | 437,5                             |
| 23 | NaOCl                                | 10,85                                 | (4,894±0,563)x10 <sup>-2</sup>    | 14 dak.          | 434,0                             |
| 24 | NaOCl                                | 12,63                                 | (4,249±1,168)x10 <sup>-3</sup>    | d                | 419,5                             |
| 25 | NaOCl                                | 12,63                                 | (4,584±0,326)x10 <sup>-3</sup>    | 151 dak.         | 421,0                             |
| 26 | NaOCl                                | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (1,561±0,219)x10 <sup>-2</sup>    | 44 dak.          | 425,5                             |

<sup>a</sup>[Klorofil a]= 2,5x10<sup>-5</sup> M; [NaOCl]=0,025 M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,025 M; [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH]=0,025 M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile;

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

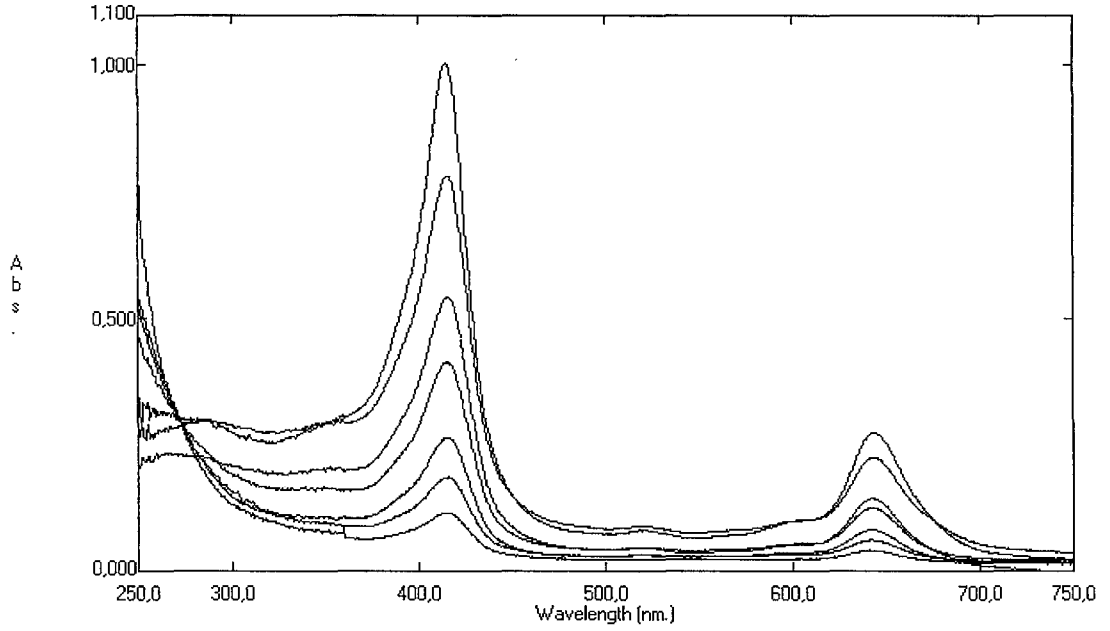
<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>Fitol grubunun ayrılma hız sabiti

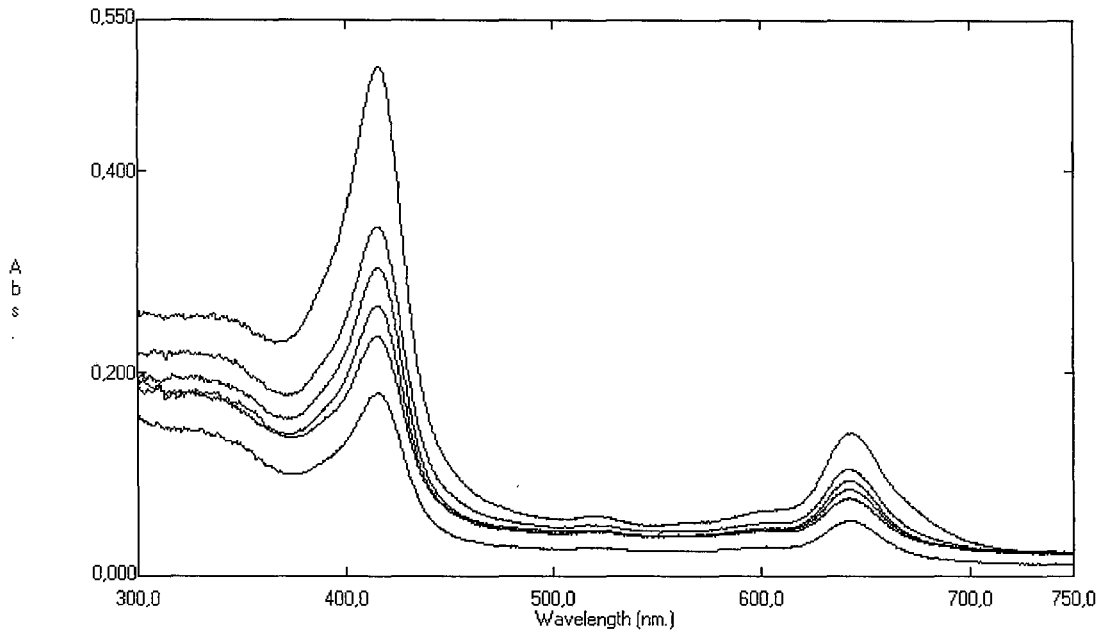
<sup>e</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

<sup>f</sup>Soret piki 1 dakikadan daha kısa bir sürede ortadan kaybolmuştur

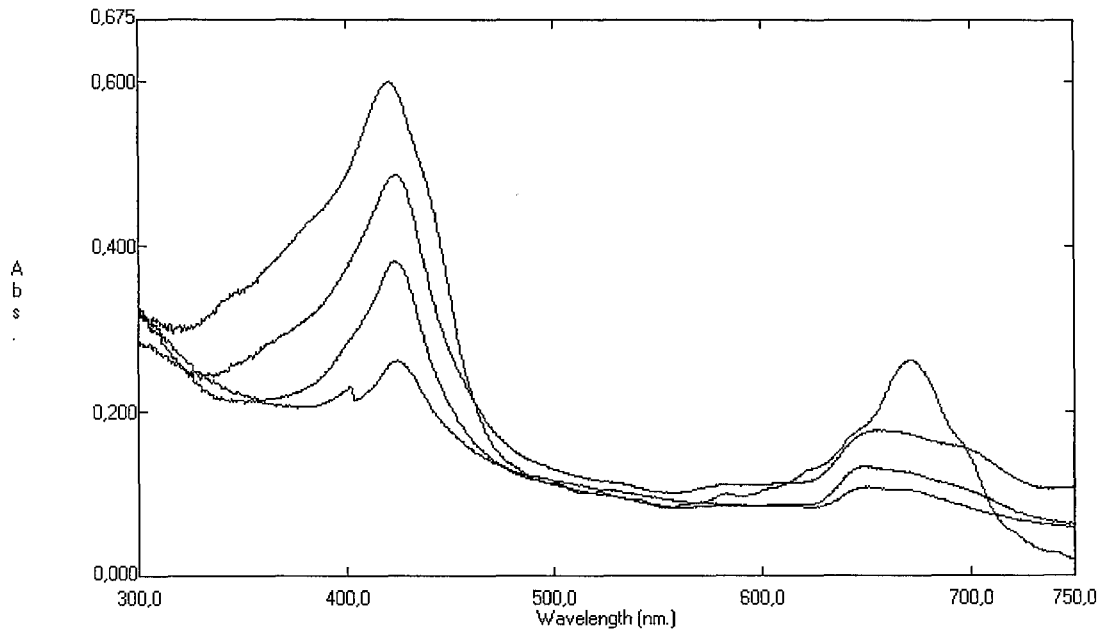
Aşağıda yapı kararlılığına ait deney sonuçlarından yararlanarak, klorofil a için  $H_2O_2$ ,  $(CH_3)_3COOH$ ,  $NaOCl$  oksidantlarına karşı en kararlı oldukları belirlenen pH'a ait UV-Görünür bölge spektrumları verilmiştir.



Şekil 3.5. Klorofil a'nın  $H_2O_2$  ortamında  $[OH^-] = 1,2 M$ 'da,  $30\text{ }^\circ C$ 'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları



Şekil 3.6. Klorofil a'nın  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  ortamında  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları



Şekil 3.7. Klorofil a'nın  $\text{NaOCl}$  ortamında  $\text{pH}=12,63$ 'de,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları

### 3.4.9. Klorofil b'nin Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı

Asidik ortamda klorofil b'nin yapı kararlılığı  $H_2O_2$ , NaOCl ve  $(CH_3)_3COOH$  oksidantlarına karşı pH 1-14 arasında incelenmiştir (Çizelge 3.10).

Klorofil b'nin  $H_2O_2$  oksidantına karşı yapı kararlılığı incelendiğinde, en kararlı klorofil b yapısının pH 9,02'de ( $k=(1,89 \pm 0,15) \times 10^{-4} \text{ dak}^{-1}$ ) ve en kararsız klorofil b yapısının ise pH 4,15'te ( $k=(6,50 \pm 0,92) \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ) olduğu belirlenmiştir. Ortam pH > 11,30'den büyük olduğunda önce dimerleşme daha sonra fitol grubunun ayrılması ve klorofillid a halkasının bozunma reaksiyonları oluşmaktadır. Ancak bu durum pH > 12,73 olduğunda iyice belirgin olmaktadır. Bu pH aralığında klorofil b'nin  $H_2O_2$  oksidantına karşı kararlılığı oksidantsız durumla kıyaslandığında, asidik bölgede her iki ortamda da kararlılığı düşük ve birbirine yakın olmakla birlikte, klorofil b bazik bölgede oksidantsız durumdayken kararlı olduğunu görürüz.

pH 1-14 arasında  $(CH_3)_3COOH$  oksidantına karşı en kararlı klorofil b yapısı  $[OH^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da ( $k=(2,54 \pm 0,17) \times 10^{-4} \text{ dak}^{-1}$ ) ve en kararsız ise pH 4,84'de ( $k=(6,80 \pm 0,64) \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ ) görülmüştür. Yine bu pH'ta öncelikle hızlı bir şekilde dimerleşme oluşmuş ve bu dimerleşmenin bozunması ile UV-Görünür bölge spektrumunda bir artış gözlenmiştir (Çizelge 3.10). Bu pH aralığında klorofil b'nin  $(CH_3)_3COOH$  oksidantına karşı kararlılığı oksidantsız durumla kıyaslandığında, asidik bölgede her iki ortamda da kararlılığı düşük ve birbirine yakın olmakla birlikte, klorofil b bazik bölgede kararlı olduğunu görürüz.

pH 1-14 arasında NaOCl oksidantına karşı kararlılığına bakıldığında, klorofil a'da olduğu gibi asidik ortamda ölçüleyecek kadar hızlı bir şekilde klorofil b halkası tamamen parçalanmıştır. Bu oksidanta karşı klorofil b  $[OH^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da en kararlı olduğu belirlenmiştir. Bu pH'ta öncelikle hemen oluşan dimerleşmenin, klorofil b'nin hidrolizi ile fitol grubunun ayrılmasıyla UV-Görünür bölge spektrumunda bir artış gözlenmiş, daha sonra da yapının bozunması gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.10. Klorofil b'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li, NaOCl'li ve (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin λ<sub>max</sub> değeri<sup>a</sup>

| No | Oksidant                             | pH <sup>b</sup>                       | k/dak <sup>-1</sup>             | t <sub>1/2</sub> | λ <sub>max</sub> /nm <sup>c</sup> |
|----|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 1,51                                  | (3,55 ± 0,65)x10 <sup>-3</sup>  | 196 dak.         | 458,5                             |
| 2  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 4,15                                  | (6,50 ± 0,92)x10 <sup>-3</sup>  | 107 dak.         | 481,0                             |
| 3  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 5,92                                  | (6,05± 0,57)x10 <sup>-3</sup>   | 115 dak.         | 473,5                             |
| 4  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 9,02                                  | (1,89 ± 0, 15)x10 <sup>-4</sup> | 61 sa.           | 455,0                             |
| 5  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 11,30                                 | (3,79±0,09)x10 <sup>-4</sup>    | 30 sa.           | 455,5                             |
| 6  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 12,73                                 | (4,10 ± 0,07)x10 <sup>-4</sup>  | 28 sa.           | 450,5                             |
| 7  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (2,15 ± 0,16)x10 <sup>-3</sup>  | d                | 454,0                             |
| 8  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (4,37 ± 0,24)x10 <sup>-4</sup>  | 26 sa.           | 450,5                             |
| 9  | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 1,74                                  | (6,15± 0,67)x10 <sup>-3</sup>   | 113 dak.         | 449,0                             |
| 10 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 4,84                                  | (6,80 ± 0,64)x10 <sup>-3</sup>  | 102 dak.         | 475,0                             |
| 11 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 6,83                                  | (5,29 ± 0,65)x10 <sup>-3</sup>  | 131 dak.         | 473,0                             |
| 12 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 9,22                                  | (3,75 ± 0,32)x10 <sup>-4</sup>  | 31 sa.           | 456,0                             |
| 13 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 11,06                                 | (9,82± 0,40)x10 <sup>-4</sup>   | 12 sa.           | 455,5                             |
| 14 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 12,73                                 | (9,47 ± 0,29)x10 <sup>-4</sup>  | 12 sa.           | 452,0                             |
| 15 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (1,48±0,08)x10 <sup>-3</sup>    | d                | 452,5                             |
| 16 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (2,54± 0,17)x10 <sup>-4</sup>   | 45 sa.           | 449,0                             |
| 17 | NaOCl                                | 1,36                                  | Kararsız <sup>f</sup>           |                  |                                   |
| 18 | NaOCl                                | 5,32                                  | Kararsız <sup>f</sup>           |                  |                                   |
| 19 | NaOCl                                | 6,35                                  | Kararsız <sup>f</sup>           |                  |                                   |
| 20 | NaOCl                                | 9,20                                  | (6,82±0,72)x10 <sup>-1</sup>    | 61 sn.           | 461,0                             |
| 21 | NaOCl                                | 11,07                                 | (3,28±0,21)x10 <sup>-2</sup>    | 21 dak.          | 457,5                             |
| 22 | NaOCl                                | 12,54                                 | (2,73±0,17)x10 <sup>-3</sup>    | 254 dak.         | 451,5                             |
| 23 | NaOCl                                | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (1,02±0,20)x10 <sup>-3</sup>    | d                | 453,5                             |
| 24 | NaOCl                                | [OH <sup>-</sup> ]=1,2 M <sup>e</sup> | (7,21±1,39)x10 <sup>-4</sup>    | 16 sa.           | 452,5                             |

<sup>a</sup>[Klorofil b]= 2,5x10<sup>-5</sup> M; [NaOCl]=0,025 M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,025 M; [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH]=0,025 M; t= 30

<sup>c</sup>C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

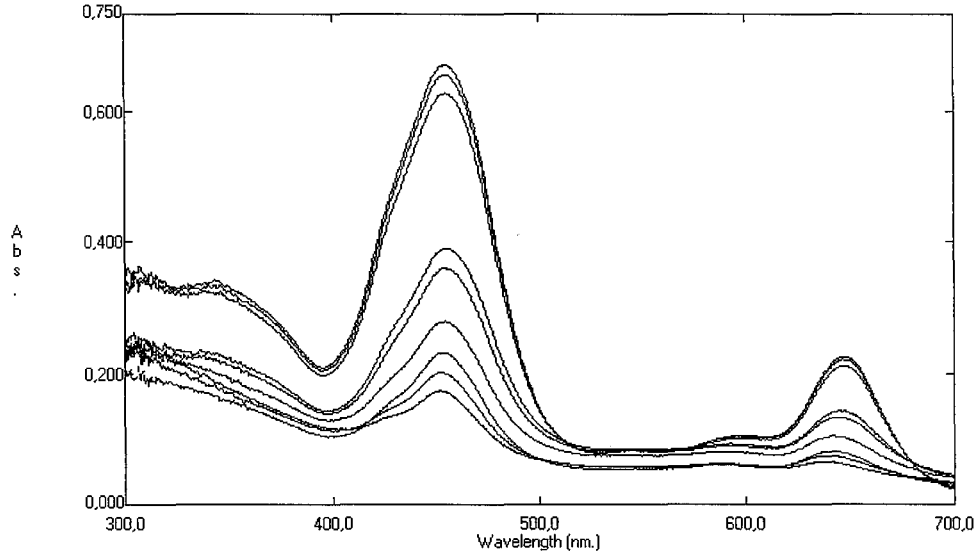
<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>Fitol grubunun ayrılma hız sabiti

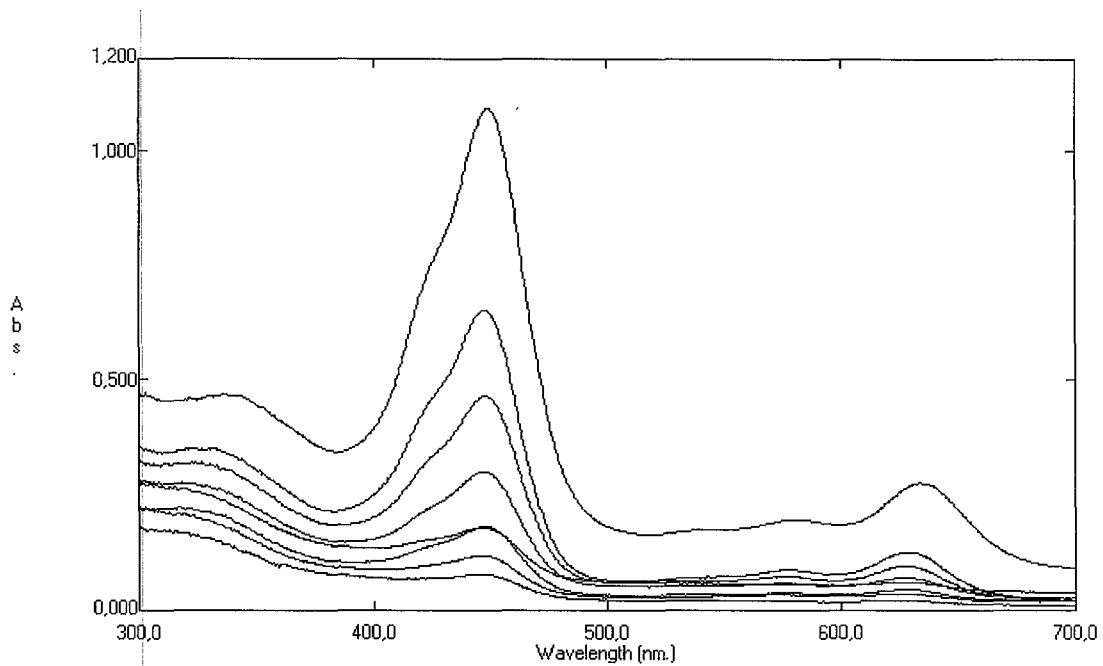
<sup>e</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

<sup>f</sup>Soret piki 1 dakikadan daha kısa bir sürede ortadan kaybolmuştur

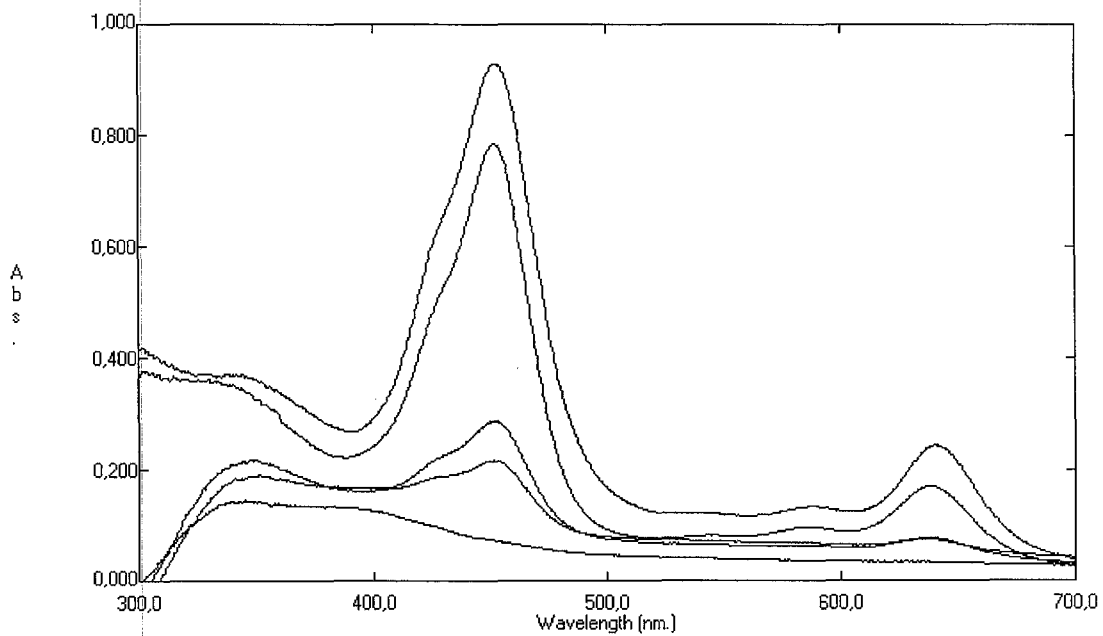
Aşağıda yapı kararlılığına ait deney sonuçlarından yararlanarak, klorofil b için  $H_2O_2$ ,  $(CH_3)_3COOH$ ,  $NaOCl$  oksidantlarına karşı en kararlı oldukları belirlenen pH'a ait UV-Görünür bölge spektrumları verilmiştir.



Şekil 3.8. Klorofil b'nin  $H_2O_2$  ortamında pH=9,02'de, 30 °C'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları



Şekil 3.9. Klorofil b'nin  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  ortamında  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları



Şekil 3.10. Klorofil b'nin  $\text{NaOCl}$  ortamında  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve karanlıkta bozunmasına ait UV-Görünür bölge spektrumları



### 3.4.10. Feofitin a'nın Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı

Asidik ortamda feofitin a'nın bozunması nedeniyle  $H_2O_2$ , NaOCl ve  $(CH_3)_3COOH$  oksidantlarına karşı yapı kararlılığı pH 9 ile 14 arasında incelenmiştir (Çizelge 3.11).

Feofitin a'nın  $H_2O_2$  oksidantına karşı yapı kararlılığı incelendiğinde, en hızlı pH 9,40'da en yavaş ise pH 12,95'de yapının bozunduğu belirlenmiştir. pH 9,40-14 aralığında önce dimerleşme daha sonra fitol grubunun ayrılması ve feofitin a halkasının bozunma reaksiyonları oluşmuştur. Bu oksidanta karşı pH 11,05'de feofitin a'nın fitol grubunun ayrıldığı ( $k=2,15\pm 0,42$ ) $\times 10^{-5}$   $dak^{-1}$ ) ve böylece oluşan feoforbid a'nın 30 gün takip edildiğinde, bu sürede bozunmadığı görülmüştür (Çizelge 3.11).

Feofitin a'nın pH 9-14 arasında  $(CH_3)_3COOH$  oksidantına karşı kararlılığı incelendiğinde en hızlı pH 9,40'da ve en yavaş ise pH 11,35'de bozunduğu bulunmuştur. Bu oksidanta karşı pH 11,35-12,95'de önce dimerleştiği sonra fitol grubunun ayrılması ve daha sonra feofitin halkasının parçalandığı, pH 14'de ise fitol grubunun daha hızlı ayrıldığı için dimerleşme görülmemiş ancak oluşan feoforbid a yapısının bozunduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.11).

Feofitin a'nın NaOCl oksidantı varlığında yapı kararlılığı incelendiğinde ise, en hızlı pH 9,45'de ve en yavaş pH 12,50'de bozunduğu belirlenmiştir. pH 9,45'de dimerleşmekte ve oluşan feofitin a dimeri de bozunmaktadır. pH 11,20-14 arasında ise dimerleşme olmamış, sadece fitol grubunun ayrılmış ve halka bozunmuştur (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Feofitin a'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li, NaOCl'li ve (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin λ<sub>max</sub> değeri<sup>a</sup>

| No | Oksidant                             | pH <sup>b</sup>         | k (dak <sup>-1</sup> )       | t <sub>1/2</sub> | λ <sub>max</sub> /nm <sup>c</sup> |
|----|--------------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1  | NaOCl                                | 9,45                    | (2,46±0,99)x10 <sup>-5</sup> | 20 gün           | 416                               |
| 2  | NaOCl                                | 11,20                   | (4,23±0,75)x10 <sup>-5</sup> | 11 gün           | 416                               |
| 3  | NaOCl                                | 12,80                   | (2,13±0,39)x10 <sup>-4</sup> | 54 sa.           | 410                               |
| 4  | NaOCl                                | 13,51                   | (7,26±0,01)x10 <sup>-4</sup> | 16 sa.           | 415                               |
| 5  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 9,40                    | (1,57±0,26)x10 <sup>-3</sup> | 442 sa.          | 418                               |
| 6  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 11,05                   | (2,15±0,42)x10 <sup>-5</sup> | d                | 409                               |
| 7  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 12,95                   | (2,00±0,31)x10 <sup>-5</sup> | 24 gün           | 410                               |
| 8  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 13,61                   | (2,43±0,30)x10 <sup>-5</sup> | 20 gün           | 415                               |
| 9  | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 9,40                    | (2,08±0,78)x10 <sup>-4</sup> | 56 sa.           | 457                               |
| 10 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 11,35                   | (4,62±0,33)x10 <sup>-5</sup> | 10 gün           | 410                               |
| 11 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | 12,95                   | (7,54±0,67)x10 <sup>-5</sup> | 153 sa.          | 410                               |
| 12 | (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COOH | [OH]=1,2 M <sup>e</sup> | (9,17±0,53)x10 <sup>-5</sup> | 127 sa.          | 405                               |

<sup>a</sup>[Feofitin a]= 3,32x10<sup>-5</sup> M; [NaOCl]=0,033 M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,033 M; [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH]=0,033 M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı ± 0,01'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>Fitol grubunun ayrılma hız sabiti

<sup>e</sup>pH yerine ortamdaki [OH<sup>-</sup>] derişimi verilmiştir

### 3.4.11. Feofitin b'nin Bazı Oksidantlara Karşı Yapı Kararlılığı

Asidik ortamda feofitin b'nin bozunması nedeniyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaOCl ve (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH oksidatlarına karşı yapı kararlılığı pH 9 ile 14 arasında incelenmiştir (Çizelge 3.12).

Feofitin b'nin pH 9-14 arasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantına karşı kararlılığı incelendiğinde, feofitin b halkasının en hızlı pH 9,40'de parçalandığı ancak baziklik arttıkça fitol grubunun daha hızlı ayrıldığı ve böylece agregasyonun olmadığı görülmüştür. Fitol grubunun ayrılması dengeye ulaştığında ise Soret pikinde oluşan omuzların tek pike dönüştüğü ve absorbans şiddetinin arttığı

saptanmıştır. Daha sonra oluşan feoforbid b parçalanmaya devam etmiş ve bu parçalanma hızı oksidant olmasına rağmen yavaş olmuştur. Örneğin pH 13,10'de feoforbidin 78 günde yarısının parçalandığı belirlenmiştir (Çizelge 3.12).

pH 9-14 arasında NaOCl oksidantına karşı kararlılığı incelendiğinde pH 11,30 da feofitin b'nin en kararlı olduğu ve  $[OH^-] = 1,2 M$ 'da ise daha hızlı parçalandığı bulunmuştur. Bu oksidantta da fitol zinciri hızlı kırılmakta ve böylece oluşan feoforbid b bozunmaktadır (Çizelge 3.12).

Feofitin b'nin pH 9-14 arasında  $(CH_3)_3COOH$  oksidantına karşı kararlılığı incelendiğinde, pH 9,55'te en hızlı, pH 11,10'da ise en yavaş bozunmuştur. Feofitin b halkasının parçalanma reaksiyonunun yarı ömrü pH 11,10'da 95 saat, pH 12,85'de 400 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Feofitin b'nin  $H_2O_2$ 'li, NaOCl'li ve  $(CH_3)_3COOH$ 'li ortamda farklı pH'lardaki parçalanma hız sabitleri, yarılanma süreleri ve Soret piklerinin  $\lambda_{max}$  değeri<sup>a</sup>

| No | Oksidant                      | pH <sup>b</sup>  | k (dak <sup>-1</sup> )           | t <sub>1/2</sub> /dak | $\lambda_{max}$ /nm <sup>c</sup> |
|----|-------------------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 9,40             | $(9,13 \pm 0,42) \times 10^{-3}$ | 76 dak.               | 442                              |
| 2  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 11,30            | $(3,10 \pm 0,30) \times 10^{-5}$ | 16 gün                | 442                              |
| 3  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 13,10            | $(6,21 \pm 0,55) \times 10^{-6}$ | 78 gün                | 443                              |
| 4  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | $[OH^-]=1,2 M^d$ | $(4,69 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ | 10 gün                | 445                              |
| 5  | NaOCl                         | 9,81             | $(1,32 \pm 0,16) \times 10^{-5}$ | 36 gün                | 445                              |
| 6  | NaOCl                         | 11,30            | $(9,64 \pm 0,60) \times 10^{-6}$ | 50 gün                | 442                              |
| 7  | NaOCl                         | 13,05            | $(8,17 \pm 0,77) \times 10^{-5}$ | 141 sa.               | 443                              |
| 8  | NaOCl                         | $[OH^-]=1,2 M^d$ | $(1,66 \pm 0,10) \times 10^{-4}$ | 70 sa.                | 440                              |
| 9  | $(CH_3)_3COOH$                | 9,55             | $(4,93 \pm 0,46) \times 10^{-3}$ | 141 dak.              | 442                              |
| 10 | $(CH_3)_3COOH$                | 11,10            | $(1,22 \pm 0,11) \times 10^{-4}$ | 95 sa                 | 443                              |
| 11 | $(CH_3)_3COOH$                | 12,85            | $(1,73 \pm 0,19) \times 10^{-3}$ | 401 dak.              | 441                              |
| 12 | $(CH_3)_3COOH$                | $[OH^-]=1,2 M^d$ | $(4,67 \pm 0,56) \times 10^{-4}$ | 25 sa.                | 439                              |

<sup>a</sup>[Feofitin b]= $4,92 \times 10^{-5} M$ ; [NaOCl]=0,05 M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,05 M; [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COOH]=0,05 M; t= 30 °C; V=10 ml; I=0,2 NaNO<sub>3</sub> ile

<sup>b</sup>Deneyler sırasında kullanılan pH-metrenin duyarlılığı  $\pm 0,01$ 'dir

<sup>c</sup>Soret pikinin maksimum dalga boyu

<sup>d</sup>pH yerine ortamdaki  $[OH^-]$  derişimi verilmiştir

### 3.5. Klorofil a ve b ile Feofitin a ve b'ye Ait Sonuçlar

#### 3.5.1. Klorofil a ve b'ye Ait Sonuçlar

Işık absorblayıcısı olarak bilinen klorofil a ve b'nin farklı ortamlarda ve çözücülerde yapı kararlılığını belirlemek için yapılan deneyler sonucunda karanlıkta su içinde hariç bozunmadıkları, aydınlıkta daha hızlı bozdukları, doğrudan güneş ışığında ise diğer ortamlara göre çok daha hızlı bir şekilde bozdukları gözlenmiştir. Çözücü olarak su kullanılmasının bozunma kinetiği hızını arttırdığı belirlenmiştir.

Klorofil a ve b'nin asidik ortamlarda demetalasyon reaksiyonu ile magnezyum atomundan ayrılırken, bazik ortamda hidrolize uğrayarak fitol grubundan ayrıldığı belirlenmiştir. Bu durumlar oksidantlı veya oksidantsız tüm şartlarda gözlenmiştir. Ayrıca tüm koşullarda bozunma kinetiği birinci dereceden olarak belirlenmiştir.

Klorofil a'nın farklı pH'lardaki kararlılığı incelendiğinde, pH 6,46'dan 1,80'e düştükçe artan hızda halkasının parçalandığı, pH 10,67 değerinden büyük asitlik değerlerinde porfirin halkasının parçalanmadığı belirlenmiştir. Klorofil b'nin farklı pH'lardaki kararlılığı incelendiğinde ise, pH 6,52'den 1,55'e düştükçe artan hızda halkanın parçalandığı, pH 11,30 değerinden büyük değerlerde klorofil a'nın porfirin halkasının parçalanmadığı belirlenmiştir. Klorofil a ve b'nin farklı asitliğe sahip ortamlarda yapı kararlılıkları yakın olmakla birlikte, genellikle klorofil b'nin klorofil a'dan daha kararlı olduğu belirlenmiştir.

Klorofil a'nın  $H_2O_2$ , NaOCl ve  $(CH_3)_3COOH$  oksidantlarının varlığında, yaklaşık pH 1,5-13,5 aralığında yapı kararlılığı incelendiğinde  $(CH_3)_3COOH$ 'ye karşı en dayanıklı iken  $H_2O_2$ 'ye karşı dayanıklılığı azalmakta olduğu ve NaOCl oksidantına karşı en dayanıksız olduğu belirlenmiştir. Örneğin  $[OH^-] = 1,2$  M değerinde,  $(CH_3)_3COOH$  ortamında 88 saatte,  $[OH^-] = 1,2$  M'da  $H_2O_2$  ortamında 56 saatte ve pH 12,63'de NaOCl ortamında 151 dakikada yarılandığı belirlenmiştir. Klorofil b'nin pH'a bağlı olarak oksidantlardaki kararlılığı ise  $H_2O_2$  oksidantında en dayanıklı olduğu,  $(CH_3)_3COOH$  oksidantında daha az ve NaOCl oksidantında ise oldukça dayanıksız olduğu görülmüştür. Örneğin pH 9,02'de  $H_2O_2$  ortamında 61 saatte yarılandığı,  $[OH^-] = 1,2$  M'da  $(CH_3)_3COOH$

ortamında 45 saatte yarılındığı ve  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da NaOCl ortamında 26 saatte yarılındığı belirlenmiştir. Oksidatlara karşı yapı kararlılığı klorofil a ve b arasında kıyaslandığında,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantlarında klorofil a daha kararlı iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve NaOCl oksidantında klorofil b'nin daha kararlı olduğu belirlenmiştir.

Klorofil a ve b oksidantsız durumla,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidantlarına karşı kıyaslandığında asidik ortamdaki yapı kararlılıklarının yakın olduğu belirlenirken, bazik ortamda oksidantsız durumda bu yapılar kararlı iken, oksidantlı durumda kararsız oldukları belirlenmiştir. NaOCl oksidantında ise klorofil a ve b asidik bölgede ölçülemeyecek kadar hızlı bozunurken, bazik bölgede de düşük kararlılık göstermişlerdir.

### 3.5.2. Feofitin a ve b'ye Ait Sonuçlar

Işık absorblayıcısı olarak bilinen feofitin a ve b'nin doğrudan güneş ortamında farklı çözücülerdeki kararlılığını görmek için yapılan deneylerde, feofitin halkasının çok hızlı bir şekilde parçalandığı bulunmuştur. Doğrudan güneş ortamından uzak fakat aydınlıktaki kararlılığına bakıldığında feofitin a ve b sırasıyla petrol eteri, metanol, asetón ve suda azalan kararlılık gösterdiği belirlenmiştir. Feofitin a ve b'nin karanlıkta aynı çözücülerdeki kararlılığı incelendiğinde, feofitin a ve b'nin agregasyona uğradığı, çözücü su olduğunda ise çok az da olsa bozdukları bulunmuştur.

Feofitin a'nın farklı pH'lardaki kararlılığı incelendiğinde ise, pH 7,00'den 1,5'e düştükçe artan hızda halkanın parçalandığı, pH 9,40-12,50 ise halkanın parçalanmadığı ancak fitol grubunun ayrıldığı fakat  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$ 'da ise halkanın çok yavaş parçalandığı bulunmuştur. Feofitin b'nin farklı pH'lardaki kararlılığı incelendiğinde ise, düşük pH'larda bozduğu ancak pH arttıkça fitol grubunun ayrıldığı ve oluşan feoforbid b'nin bu bazik ortamda çok yavaş bozduğu bulunmuştur.

Feofitin a'nın  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NaOCl ve  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantlarının varlığında, pH 11,35-14 aralığında kararlılığına bakıldığında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye karşı en dayanıklı olup,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$ 'ye karşı daha az dayanıklı ve NaOCl oksidantına karşı en dayanıksız olduğu belirlenmiştir. Örneğin pH 12,95'de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ortamında 24 günde

yarılandığı, pH 12,95'de  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantına karşı 153 saatte yarılandığı ve pH 12,50'de NaOCl oksidantına karşı 54 saatte yarılandığı görülmektedir. Feofitin b'nin farklı pH'larda oksidantlara karşı kararlılığı incelendiğinde ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidantında en dayanıklı, sonra sırasıyla NaOCl oksidantında daha az dayanıklı ve en dayanıksız yapı ise  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantına karşı olmuştur. Ancak yüksek pH'larda oksidant içermeyen ve oksidant içeren ortamlardaki yapı kararlılıkları kıyaslandığında oksidantların fazla etkili olmadığı bulunmuştur. Örneğin pH 13,31'de feofitin b'nin oksidantsız ortamda 12,34 günde, NaOCl oksidantında pH 11,30'da 49,93 günde,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oksidantında pH 13,04'de 77,51 günde ve  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidantında ise pH 11,10'da 3,95 günde yarısının bozunduğu belirlenmiştir.

Feofitin a ve b oksidantlı durumlardaki ile oksidantsız durumlardaki yapı kararlılıkları kıyaslandığında, feofitin a'nın bazik ortamda oksidantsız durumda  $[\text{OH}^-] = 1,2 \text{ M}$  durumu hariç bozunmazken, oksidantlı durumda bozunmuştur. Feofitin b'nin ise yapı kararlılığı oksidantlı ve oksidantlı durumda birbirine yakın bulunmuş, oksidant varlığı ile kararlılığının çok azalmadığı belirlenmiştir.

Klorofil a ile feofitin a oksidantlara karşı kıyaslandığında, feofitin a'nın klorofil a'dan her üç oksidanta karşı da daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Klorofil b ile feofitin b oksidantlara karşı kıyaslandığında ise,  $(\text{CH}_3)_3\text{COOH}$  oksidana karşı klorofil b, feofitin b'den daha kararlı iken,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve NaOCl oksidantlarına karşı feofitin b, klorofil b'den daha kararlı olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre klorofil türevleri ile mümkünse su hariç bir organik çözücü içinde ve karanlık ortamda çalışılmalı, suda çalışılması gerekiyorsa, klorofil a ve b ile pH=9'dan büyük değerlerde çalışılması gerekirken, feofitin a ile pH 9-12,5 arasında, feofitin b ile pH 9-10 arasında ve karanlıkta çalışılmalı ancak klorofil türevleri sentezlenmek isteniyorsa, öncelikle metalinden ayrılması ve sonra hidrolizle fitol grubundan koparılması sonucunda süstitüe klorofillerin elde edilmesi daha uygun olur.

## KAYNAKLAR

1. TAN, Y.T., JIANG, J.H. ve WU, H.L., *Resolution of Kinetic System of Simultaneous Degradations of Chlorophyll a and b by PARAFAC*, Anal. Chem. Acta, **412**, 195-202, (2000).
2. GANDUL-ROJAS, B., CEPERO, M.R., ve MINGUEZ-MOSQUERA, M.I., *Chlorophyll and Carotenoid Patterns in Olive Fruits, Olea Europaea Cv. Arbequina*, J. Agric. Food Chem., **47**, 2207-2212, (1999).
3. HEGAZI, M.M., RUZAFI, A.P., ALMELA, L. ve CANDELA, M. E., *Separation and Identification of Chlorophylls and Carotenoids from Caulerpa Prolifera, Jaina Rubens and Padina Pavonica By Reserved-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, J.Chromatogr. A, **829**, 153-159, (1998).
4. MARANGONI, A. G., *Kinetic Model for Chlorophyll Degradation in Green Tissue. 2. Pheophorbide Degradation to Colorless Compounds.*, J. Agric. Food Chem., **44**, 3735-3740, (1996).
5. MINGUEZ-MOSQUERA, M.I. ve GALLARDO-GUERRERO, L., *Role of Chlorophyllase in Chlorophyll Metabolism in Olives Cv. Gordal*, Phytochemistry, **41**, 691-697, (1996).
6. WEEMAES, C. A., OOMS, V. LOEY, A.M. ve HENDRICKX, M. E., *Kinetics of Chlorophyll Degradation and Color Loss in Heated Broccoli Juice*, J. Agric. Food Chem., **47**, 2404-2409, (1999)
7. SIMON, D. ve HELLIWELL, S., *Extraction and Quantification of Chlorophyll a from Freshwater Green Algae*, Wat. Res., **32**, 2220-2223, (1998).
8. GAUTHIER-JAQUES, A., BORTLIK, K., HAU, J. ve FAY, L. B., *Improved Method to Track Chlorophyll Degradation*, J. Agric. Food Chem., **49**, 1117-1122, (2001).
9. COSTA, M.L., CIVELLO, P.M., CHAVES, A.R. ve MARTINEZ, G. A., *Characterization of Mg-dechelataze Activity Obtained from Fragaria x Ananassa Fruit*, Plant Physiol. and Biochem., **40**, 111-118, (2002).

10. TIJSKENS, L.M.M., BARRINGER, S.A. ve BIEKMAN, E.S.A., *Modelling the Effect of pH on the Colour Degradation of Blanched Broccoli*, *Innovative Food Science*, **2**, 315-322, (2001).
11. RYAN-STONEHAM, T. ve TONG, C.H., *Degradation Kinetics of Chlorophyll in Peas as a Function of pH*, *J. Food Sci.*, **65**, No:8, (2000).
12. VAN LOEY, A., OOMS, V. ve WEEMAES, C., *Thermal and Pressure-Temperature Degradation of Chlorophyll in Broccoli Juice*, *J. Agric. Food Chem*, **46**, 5289-5294, (1998).
13. BOEKEL, M.A.J.S., *Testing of Kinetic Models: Usefulness of the Multiresponse Approach as Applied to Chlorophyll Degradation in Foods*, *Food Research International*, **32**, 261-269, (1999).
14. ALMELA, L., FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. ve ROCA, M. J., *High-Performance Liquid Chromatographic Screening of Chlorophyll Derivatives Produced During Fruit Storage*, *J.Chromatogr. A*, **870**, 483-489, (2000).
15. NAKAMURA, A. ve WATANABE, T., *HPLC Determination of Photosynthetic Pigments During Greening of Etiolated Barley Leaves*, *FEEBS Letters*, **426**, 201-204, (1998).
16. MARTINEZ, G.A., CIVELLO, P.M., CHAVES, A. R. ve ANON, M. C., *Characterization of Peroxidase-Mediated Chlorophyll Bleaching in Strawberry Fruit*, *Phytochemistry*, **58**, 379-387, (2001).
17. HEATON, J. W., LENCKI, R. W. ve MARANGONI, A.G., *Kinetic Model for Chlorophyll Degradation in Green Tissue*, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 399-402, (1996).
18. TOIVONEN, P. M. A. ve SWEENEY, M., *Differences in Chlorophyll Loss at 13 °C for two Broccoli (Brassica Oleracea L.) Cultivars Associated with Antioxidant Enzyme*, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 20-24, (1998).
19. EDWARDS, E.J. ve COBB, A.H., *Effect of temperature on Glycoalkaloid and Chlorophyll Accumulation in Potatoes (Sodium tuberosum L. Cv. King Edward) Stored at Low Photon Flux Density, Including Preliminary Modeling Using an Artificial Neural Network*, *J. Agric. Food Chem.* 1997, **45**, 1032-1038, (1997).



20. ITURRASPE, J. ve MOYANO, N., *A new 5-formylbilinone as The Major Chlorophyll a Catabolite in Tree Senescent Leaves*, J. Org. Chem., **60**, 6664-6665, (1995).
21. YUAN, J., GONG, X. ve CHEN, F., *Seperation and Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in Haematococcus Lacustris by High Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection*, J. Agric. Food Chem., **45**, 1952-1956, (1997).
22. KRAUTLER, B. ve MATILE, P., *Solving the Riddle of Chlorophyll Breakdown*, Acc. Chem. Res., **32**, 35-43, (1999).
23. WALSH, K., JONES, G. ve DUNSTAN, H., *Effect of Irradiance on Fatty Acid, Carotenoid, Total Protein Composition and Growth of Microcystis Aeruginosa*, Photochemistry, **44**, 817-824, (1997).
24. MOHAN, M. M., NARAYANAN, S.L. ve IBRAHIM, S. M., *Chlorophyll Stability Index (CSI): Its Impact on Salt Tolerance in Rice*, Crop Management: physiology, Tamil Nadu Agricultural University, India, 38-39, (2000).
25. GONS, H. J., RIJKEBOER, M., BAGHERI, S. ve RUDDICK, K. G., *Optical Teledetection of Chlorophyll a in Estuarine and Coastal Waters*, Environ. Sci. Technol., **34**, 5189-5192, (2000).
26. FERRUZZI, M. G., FAILLA, M. L. ve SCHWARTZ, S. J., *Assesment of Degradation and Intestinal Cell Uptake of Carotenoids and Chlorophyll Derivatives from Spinach Puree Using an In Vitro Digestion and caco-2 Human Cell Model*, J. Agric. Food Chem., **49**, 2082-2089, (2001).
27. MAYER, P., CUHEL, R. ve NYHOLM, N., *A Simple in Vitro Fluorescence Method for Biomass Measurements in Algal Growth Inhibition Tests*, Wat. Res. **31**, 2525-2532, (1997).
28. GIUFFRA, E., ZUCHELLI, G., SANDONA, D. ve CROCE, R., *Analysis of Some Optical Properties of a Native and Reconstitued Photosystem II Antenna Complex, CP29: Pigment Binding Sites can be Occupied by Chlorophyll a or Chlorophyll b and Determine Spectral forms*, Biochem., **36**, 12984-12993, (1997).

29. MERZLYAK, M. N. ve SOLOVCHENKO, A. E., *Photostability of Pigments in Ripening Apple Fruit: a Possible Photoprotective Role of Carotenoids During Plant Senescence*, *Plant Sci.*, **163**, 881-888, (2002).
30. UMETSO, M., WANG, Z., YOZA, K., KOBAYASHI, M. ve NOZAWA, T., *Interaction of Photosynthetic Pigments with Various Organic Solvents 2 Application of Magnetic Circular Dichroism to Bacteriochlorophyll a and Light-Harvesting Complex I*, *Biochim. and Biophys. Acta*, **1457**, 106-117, (2000).
31. BOOTH, P.J. ve PAULSEN, H., *Assembly of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex In Vitro. Time-Resolved Fluorescence Measurements*, *Biochem.*, **35**, 5103-5108, (1996).
32. HOOBER, J. K. ve EGGINK, L.L., *A Potential Role of Chlorophylls b and c in Assembly of Light-Harvesting Complexes*, *FEBS Letters*, **489**, 1-3, (2001).
33. ADAMSON, H. Y., HILLER, R. G. ve WALMSLEY, J. *Protochlorophyllide Reduction and Greening in Angiosperms: an Evolutionary Perspective*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **41**, 201-221, (1997).
34. HARTEL, H., REINHARDT, I. ve GRIMM, B., *Relationship Between Energy-Dependent Fluorescence Quenching and Xanthophyll-Cycle-Pigments in transgenic Chlorophyll-Deficient Tobacco Grown Under Different Light Intensities*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **43**, 136-145, (1998).
35. REINSBERG, D., OTTMANN, K., BOTTH, P.J. ve PAULSEN, H., *Effects of Chlorophyll a, Chlorophyll b, and Xanthophylls on the In Vitro Assembly Kinetics of the Major Light-Harvesting Chlorophyll a/b complex, LHCIIB*, *J. Mol. Biol.*, **308**, 59-67, (2001).
36. KIEVIT, O., BRUDVIG ve G. W., *Direct Electrochemistry of Photosystem I*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **497**, 139-149, (2001).
37. TAMIAKI, H., KUBO, M. ve OBA, T., *Synthesis and Self-Assembly of Zinc Methyl Bacteriopheophorbide-f and its Homolog*, *Tetrahedron*, **56**, 6245-6257, (2000).

38. KOZYREV, A.N., SURESH, V. ve DAS, S., *Syntheses and Spectroscopic Studies of Novel Chlorins with Fused Quinoxaline or Benzimidazole Ring Systems and the Related Dimers with Extended Conjugation*, *Tetrahedron*, **56**, 3353-3364, (2000).
39. KUREISHI, Y., SHIRAIISHI, H. ve TAMIYAKI, H., *Self-Aggregates of Synthetic Zinc Chlorins as the Photosensitizer on Carbon Paste Electrodes for a Novel Solar Cell*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **496**, 13-20, (2000).
40. METTATH, S., SHIBATA, M. ve ALDERFER, J.L., *Synthesis and Spectroscopic Properties of Novel Benzochlorins Derived from Chlorophyll a*, *J. Org. Chem.*, **63**, 1646-1656, (1998).
41. KAB. H., LUBITZ, W., HARTWIG, G., SCHEER, H. ve NOY, D., *ENDOR Studies of Substituted Chlorophyll Cation Radicals*, *Spectrochimica Acta Part A*, **54**, 1141-1156, (1998).
42. MEUNIER, B., *Metalloporphyrins as Versatile Catalysts for Oxidation Reactions and Oxidative DNA Cleavage*, *Chem. Rev.*, **92**, 1411-1456 (1992).
43. MANSUY, D. *Cytochrome P-450 and Synthetic Models*, *Pure Appl. Chem.*, **59**, 759-770 (1987).
44. BANFI, S.; MONTANARI, F.; PENSO, M.; SOSNOVSKIKH, V. ve VIGANO, P., *NaOCl Olefin Epoxidations Catalyzed by Mn-Porphyrins Under two-Phase conditions. Influence of Structural Factors on the Stability, Catalytic Activity and Selectivity of Porphyrins*, *Chim. Ital.* **117**, 689-693 (1987).
45. COOK, B. R.; REINERT, T. J. ve SUSLICK, K. S. J., *Shape Selective Alkane Hydroxylation by Metalloporphyrin Catalysts*, *Amer. Chem. Soc.*, **108**, 7281-7286 (1986).
46. GROVES, J. T.; KRISHNAN, S.; AVARIA, G. E. ve NEMO, T. E. *Advances in Chemistry Series, Biomimetic Chemistry*, eds: DOLPHIN, D.; MCKENNA, C.; MURAKAMI, Y. ve TABUSHI, I., *Amer. Chem. Soc.: Washington DC.*, **191**, p. 277. (1980).

47. SMEGAL, J. A.; SCHARDT, B. C.; ve HILL, C. L., *Isolation, Purification, and Characterization of Intermediate (Iodosylbenzene)-metalloporphyrin Complexes from the (Tetraphenylporphinato)manganese(III)-Iodosylbenzene Catalytic Hydrocarbon Functionalization System*, J. Amer. Chem. Soc. **105**, 3510-3515 (1983).
48. MASHIKO, T.; DOLPHIN, D.; NAKANO, T. ve TRAYLOR, T. G. J., *N-Alkylporphyrin Formation During the Reactions of Cytochrome P-450 Model Systems*, J. Amer. Chem. Soc. **107**, 3735-3736, (1985).
49. BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. ve TROJANOWICZ, M., *Porphyrins in Analytical Chemistry.*, Talanta, **51**, 209-224, (2000).
50. SUNDHOLM, D., *Comparison of the Electronic Excitation Spectra of Chlorophyll a and Pheophytin a Calculated at Density Functional Theory level*, Chemical Physics Letters, **317**, 545-552, (2000).
51. SANTANA, J.J., GUNSHEFSKI, M. ve WINEFORDNER, J. D., *Micellar Enhanced Spectrofluorometric Determination of Chlorophyll a and Chlorophyll b in Fresh Waters*, Talanta, **39**, 195-200, (1992).
52. JIQUAN, Z., JINGQUAN, Z., JIE, X., JIANPING, Z. ve LIJIN, J., *Energy Transfer from C-phycoyanin to Chlorophyll a in Triton x100 Reverse Micelles*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **11**, 9-14, (1998).
53. CAVALERIO, J.A.S., ve M. SMITH, K.S., *Chromatography of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*, Talanta, **33**, 963-971 (1986).
54. HYVARINEN, K. ve HYNINEN, P.H., *Liquid Chromatographic Separation and Mass Spectrometric Identification of Chlorophyll b Allomers*, J.Chromatogr. A, **837**, 107-116 (1999).
55. AGOSTIANO, A., CATUCCI, L., COLAFEMMINA, G. ve MONICA, M.D., *Relevance of the Chlorophyll Phytyl Chain on Lamellar Phase Formation and Organisation*, Biophysical Chemistry, **84**, 189-194, (2000).
56. ARCIONI, A., ZANDVOORT, A.M.J., BARTOLINI, P.,TORRE, R., TARRONI, R., RIGHINI, R., ve ZANNONI, C., *Effective Shape and Dynamics of Chlorophyll a In Nematic Liquid Crystals*, J. Phys. Chem., **101**, 1624-1631 (1998).

57. KNOX, R. S., LAIBLE, P. D., SAWICKI, D. A. ve TALBOT, M. F. J., *Does Excited Chlorophyll a equilibrate in solution?*, Journal of Luminescence, **72-74**, 580-581, (1997).
58. FURUKAWA, H., OBA, T., TAMIYAKI, H. ve WATANABE, T., *Diastereoselective Self-Assemblies of Chlorophylls a and a'*, J. Phys. Chem. B, **103**, 7398-7405, (1999).
59. OBA, T., FURUKAWA, H. ve WANG, Z., *Supramolecular Structures of the Chlorophyll a' Aggregate and the Origin of the Diastereoselective Separation of Chlorophyll a and a'*, J. Phys. Chem. B., **102**, 7882-7889, (1998).
60. MA, L. ve DOLPHIN, D., *The Metabolites of Dietary Chlorophylls*, Phytochemistry, **50**, 195-202, (1999).
61. PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M. ve KRIZ, G.S., *Introduction to Organic Laboratory Techniques*, Saunder Collage Publishings, Washington, USA, 1990.
62. SCHMALKO, M. E. ve ALZAMORA, S. M., *Color, Chlorophyll, Caffeine, and Water Content Variation During Yerba Mate Processing*, Drying Tecnology, **19**, 599-610, (2001).
63. STEPHENS M. P., KADKO, D. C. ve SMITH, C.R., *Chlorophyll-a and Pheopigments as Tracers of Labile Organic Carbon at the Central Aquatorial Pacific Seafloor*, Geochimica et Cosmochimica Acta, **61**, 4605-4616, (1997).
64. KOBAYASHI, M., HAMANO, T. ve AKIYAMA, M., *Light-Independent Asomerization pf Bacteriochlorophyll g to Chlorophyll a Catalyzed by Weak Acid in Vitro*, Analytica Chimica Acta, **365**, 199-203, (1998).
65. THOMPSON, R.C., TOBIN, M.L. ve HAWKINS, S.J., *Problems in Extraction and Spectrophotometric Determination of Chlorophyll from Epilithic Microbial Biofilms: Towards a Standard Method*, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, **79**, 551-558, (1999).
66. SUZUKI, Y., TANABE, K. ve SHIOI, Y., *Determination of Chemical Oxidation Products of Chlorophyll and Porphyrin by High-Performance Liquid Chromatography*, J.Chromatogr. A, **839**, 85-91, (1999).

67. OKSANEN, J.A.I., ZENKEVICH, E.I. ve KNYUKSHTO, V.N., *Investigations of Chl a Aggregates Cross-Linked by Dioxane in 3-methylpentane*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1321**, 165-178, (1997).
68. ERDEM, M., *Bazı Porfirinlerin ve Mangan Porfirinlerin Yapı Kararlılıklarının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Bitirme Tezi, Anadolu Üniv., Eskişehir, Haziran, (2001).
69. MINGOTAUD, C., CHAUVET, J., ve PATTERSON, L. K., *Stability of Chlorophyll a at the Gas-Water Interface in Pure and Mixed Monolayers. An Evaluation of Interfacial pH*, *J. Phys. Chem.*, **100**, 18554-18561, (1996).
70. HARRIMAN, A.; CHRISTENSEN, P. A.; PORTER, G.; MOREHOUSE, K.; NETA, P. ve RICHOUX, M-C. J., *Decay of High-Valent Manganese Porphyrin in Aqueous Solution and Catalysed Formation of Oxygen*, *J. Chem., Soc., Faraday Trans. I*, **82**, 3215-3231,(1986).
71. HARRIMAN, A.; PORTER, *Photochemistry of Manganese Porphyrins. Part 1. Characterisation of Some Water Soluble Complexes*, *G. J. Chem. Soc., Faraday Trans. II*, **75**, 1532-1542, (1979).
72. CARNIERI, N.; HARRIMAN, A. ve PORTER, G., *Photochemistry of Manganese Porphyrins. Part 6. Oxidation-Reduction Equilibria of Manganese(III) porphyrins in Aqueous Solution*, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 931-938 (1982).
73. CARNIERI, N.; HARRIMAN, A.; PORTER, G. ve KALYANASUNDARAM, K. J., *Photochemistry of manganese porphyrins. Part 7. Characterisation of Manganese Porphyrins in Organic and Aqueous / Organic Microheterogeneous Systems*, *Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1231-1238 (1982).
74. BERBER, H., *Suda Çözünür ve Desteklere Bağlanmış Bazı Mangan Tetraarilporfirinlerin Hidrojen Peroksitli ve Sodyum Hipokloritli Ortamda Yapı Kararlılıklarına Sübstitüentler ile Desteklerin Etkisinin İncelenmesi*, Doktora tezi, Osmangazi Üniv., Eskişehir, (1998).

75. ZHANG, X. B., GUO, C. C., XU, J. B. ve YU, R. Q., *Synthesis of Acetylglycosylated Metalloporphyrins and Their Catalysis for Cyclohexane Oxidation with PhIO Under Mild Conditions*, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, **154**, 31-38, (2000).
76. MOLINARI, A., AMADELLI, R., ANTOLINI, L. ve MALDOTTI, A., *Photoredox and Photocatalytic Processes on Fe(II)-porphyrin Surface Modified Nanocrystalline TiO<sub>2</sub>*, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, **158**, 521-531, (2000).
77. TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D. ve TRAYLOR, T. G., *Sterically Protected Hemins with Electronegative Substituents: Efficient Catalysts for Hydroxylation and Epoxidation*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 279-280, (1984).
78. TRAYLOR, T. G.; NAKANO, T.; MIKSZTAL, A. R. ve DUNLAP, B. E. J., *Transient Formation of n-Alkylhemins During Hemin-Catalyzed Epoxidation of Nonbornene. Evidence Concerning the Mechanism of Epoxidation*, Amer. Chem. Soc. **109**, 3625-3632, (1987).
79. BANFI, S.; MONTANARI, F. ve QUICI, S., *New Manganese tetrakis(halogenoaryl)porphyrins Featuring Sterically Hindering Electronegative Substituents: Synthesis of Highly Stable Catalysts in Olefin Epoxidation*, J. Org. Chem. **53**, 2863-2866 (1988).
80. GAULER, R.; HESSE, U. ve RISCH, N., *Derivatives of Natural tetrapyrroles for the photodynamic therapy, 3. Oxidative Degradation Studies on Porphyrins with Chromic Acid*, Liebigs Ann. 2227-2230 (1995).
81. PIETZYK, B.; FROHLICH, L. ve GOBER, B., *Analytische Charakterisierung und Stabilität Synthetischer Porphyrine*, Pharmazie, **50**, 747-750 (1995).
82. ITOH, T., ISHII, A., KODERA, Y. ve MATSUSHIMA, A., *Photostable Chlorophyll a Conjugated with poly(vinylpyrrolidone)-smectite Catalyzes Photoreduction and Hydrogen Gas Evolution by Visible Light*, Bioconjugate Chem., **9**, 409-412, (1998).

83. MURATA, S., HATA, H. ve KIMURA, T., *Effective Adsorption of Chlorophyll a by FSM-type Mesoporous Silica Modified with 1,4-butanediol*, *Langmuir*, **16**, 7106-7108, (2000).
84. HYVARINEN, K. ve HYNINEN, P.H., *Liquid Chromatographic Separation and Mass Spectrometric Identification of Chlorophyll b Allomers*, *J.Chromatogr. A*, **837**, 107-116 (1999).
85. CHEN, B. H. ve HUANG, J. H., *Degradation and Isomerization of Chlorophyll a and  $\beta$ -carotene as Affected by Various Heating and Illumination Treatments*, *Food Chemistry*, **62**, 299-307, (1998).
86. OKSANEN, J.A.I., ZENKEVICH, E.I. ve KNYUKSHTO, V.N., *Investigations of Chl a Aggregates Cross-Linked by Dioxane in 3-methylpentane*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1321**, 165-178, (1997).
87. AZIA, F. ve STEWART, K., *Relationships Between Extractable Chlorophyll and Spad Values in Muskmelon Leaves*, *J. Plant Nutr.*, **24** (6), 961-966 (2001).
88. SIMORTE, V., BERTONI, G., DUPRAZ, C. ve MASSON, P., *Assessment of Nitrogen Nutrition of Walnut Trees Using Foliar Analysis and Chlorophyll Measurements*, *J. Plant Nutr.*, **24** (10), 1645-1660, (2001).
89. DURU, M., *Evaluation of Chlorophyll Meter to Assess Nitrogen Status of Cocksfoot Sward*, *J. Plant Nutr.*, **25** (2), 275-286, (2002).
90. YAMAMOTO, A., NAKAMURA, T., ADU-GYAMFI, J. J. ve SAIGUSA, M., *Relationship Between Chlorophyll Content in Leaves of Sorghum and Pigeonpea Determined by Extraction Method and by Chlorophyll Meter (spad-502)*, *J. Plant Nutr.*, **25** (10) 2295-2301, (2002).
91. ESPOSTI, M. D. D., SIQUEIRA, D. L. ve PEREIRA, P. R., *Assesment of Nitrogenized Nutrition of Citrus Rootstocks Chlorophyll Concentrations in the Leaf*, *J. Plant Nutr.*, **26** (6), 1287-1299, (2003).
92. GARRIDO, J.L., RORIGUEZ F., CAMPANA, E. ve ZAPATA, M., *Rapid Separation of Chlorophyll a and b and Their Demetalled and Dephytylated Derivates Using a Monolithic Silica C<sub>18</sub> Column and a Pyridine Containing Mobile Phase*, *J.Chromatogr. A*, **994**, 85-92 (2003).