

BİTKİ NUMUNELERİNDE KANTİTATİF VE KALTİTATİF OLARAK KARBON- HİDRAT, ORGANİK ASİT ANALİZ METODLARI

Zekâi ERKAN 1

1) Karbon Hidrat Analiz Metodu:

Kalitatif ve kantitatif olarak karbonhidratların analizinde Sweeley(1963) tarafından yayınlanmış gazkromatografi metodu kullanılmakta olup, bu metodu Willams ve Martin (1967) kültür bitkilerinde karbonhidrat analizinde somutlaştırılmışlardır.

Prensip olarak karbonhidrat moleküllerindeki hidroksil grubunun eterleşmesine dayanır. Eterleşme karışımı olarak Hexametildisilazan ($(CH_3)_3SİNH_2$) ve Trimetilklorsilan ($(CH_3)_3SİCI$) kullanılır. Bu reagenz ile Trimetilsilil-karbonhidrat gazkromatografide ayırma uğrar.

Bu metod Sweeley diğerleri (1963) tarafından yazıldığı şekilde Bağ-Bahçe bitki numunelerinde de Mattusch (1968), Buchlon ve Neubeller (1969) aynı şekilde Erkan (1969) tarafından da uygulanmış olup, iyi neticeler alınmıştır.

Numunenin hazırlanışı; 100-200 mg kurutulmuş ve öğütülmüş numune cam santrifüj kablarına konur. Üzerine 0.50-0,75 ml sudan arınmış piridin, 0.3-0.4 ml Hexametildisilazan ve

0.14-0.20 ml Trimetil klorsilan ilâve edilir. Ve oda sıcaklığında 30 dakika beklemeye terk edilir.

Bu bekleme eşasında bir çok defa elle sallanır. Bunu takiben 30 dakika 5000 u/dak. santrifüjde bırakılır. Hitamında üstde kalan sıvıdan 0.005 ml alınarak gazkromatografiye enjekte edilir.

Elde edilen piklerin alanı planimetre ile saptanır ve saf karbonhidretlerin pik alanları ile orantılandıktan sonra numune içindeki karbonhidrat miktarları hesaplanır.

2)Organik asit analiz metodları:

Analizler Scheffer ve diğerleri (1965) göre yapılır.

a) Kurutulmuş numunede titrasyon asidi tayini :

2 g kurutulmuş ve öğütülmüş numune saf su ile $4C^{\circ}$ de ekstrakt edilir filtreden geçirildikten sonra yakanır ve filtrat 250 ml'e tamamlanır. Bu süzükten 10 ml alınarak bir pH metrede 0.01 N NaOH ile pH 7.0 gelene kadar titre edilir.

Tablo 1: Karbonhidrat analizinde gazkromatografinin çalışma şartları

Çalışma şartları	Monosakkarid ve şeker alkolleri (Hexit) için	Di-ve Trisakkaridler için
Kolon hacmi	5 m x 4 mm (metal)	3 m x 4 mm (Cam)
Kolondaki tutucuları	Reoplex 400 Kieselgurlu (0,2-0,3 mm)	Silicongummi (SE 30)
Kolon ısısı	175 C°	250 C°
Enjekte .ısısı	300 C°	300 C°
Akış hızı		30 ml Azot/dak.
Kağıdın hızı(bir noktadan)		8,5 mm/dak.
Enjekte edilen Numune miktarı		0.005 ml

b) Kurutulmuş numunede total organik asit tayini :

Yukarıdaki şekilde hazırlanmış numuneden 10 ml alınarak katyon tutucudan (Amberlite-120) H- Formunda geçirilir. Daha sonra yukarıdaki işlem tekrarlanır.

c) Yaş numunede titrasyon asidi ve toplam organik asit tayini:

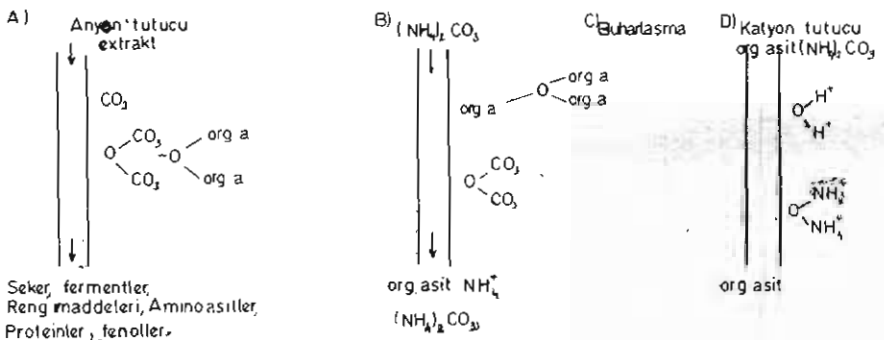
75 g kadar yaş numune havanda ezilir, 10 dakika 100 ml etanol ile kaynatılır ve 250 ml. lik cam balona süzülür, yukarıdaki işlemler tekrarlanır.

d) Asit karışımının kalitatif olarak ayrışımı :

Bu ayrışım işlemi kağıt kromatografisi yardımı ile yapılır. Yukarıdaki şekilde hazırlanmış ekstrat aşağıdaki işlemler ile kağıt kromatografisi için hazırlanır.

1) Na₂ CO₃ ile aktiflenmiş anyon tutucusundan (IRA-400) 300 ml lik ekstrat çok yavaş şekilde (203 ml/dak) geçirilir. Organik asitler tutucuda CO₃'a bağlanarak kalırlar. Renk maddeleri, şeker, fenoller fermentler, proteinler ve aminoasitler geçer.

2) Organik asitler (NH₄)₂ CO₃ yardımı ile alınır. Şimdi çözeltide organik asitler, NH₄⁺, (NH₄)₂ CO₃ bulunmaktadır.



3) Rotasyon evaprotör yardımı ile buharlaştırılarak fazla NH_4 atılır ve sadece asitler ile tuzlara bağlanmış olan Amonyak kalır.

4) Bu artık NH_4 ; HCl asit ile aktive edilmiş katyon tutucusundan H—Formunda uzaklaştırılır. Bu halde organik asitler tamamen serbesttirler.

5) Organik asitler tamamen buharlaştırılır (40 Co° ve vakumda).

6) 5 ml saf su ilâve edilir. Buzdolabında muhafaza edilir.

7) Farklı miktarlarda (S+S 2043 b mgl) kağıt üzerine taşınır.

8) Kağıt yukardan delinir, cam çubuk geçirilir ve ipler ile cam küvete asılır. Yarım saat küvet içinde bekletilir. n—Butanol: asetik asit : Su (4: 1:5) karışımının üst fazına daldırılır.

9) Kağıt küvetten alınır ve kurşun kalem ile akış yüksekliği işaretlendikten sonra 105 C° de kurutma dolabında asetik asitin uçması sağlanır.

10) kurutulan kağıt mandallandıktan sonra, 2 g glikoz, 2 ml anilin 20 ml su 20 ml olkol ve 60 ml n—Butanol karışımı çözelti püskürtülür.

11) 15 dakika tekrar 105 C° de kurutulmaya bırakılır.

12) Rf— değerinin hesaplanması. Numune taşıma noktası ile asit merkezi arası mesafenin, numune taşıma noktası ile çözelti akış yüksekliği mesafesine bölümü bize Rf değerini verir.

e) Kantitatif olarak asit komponentlerinin tayini:

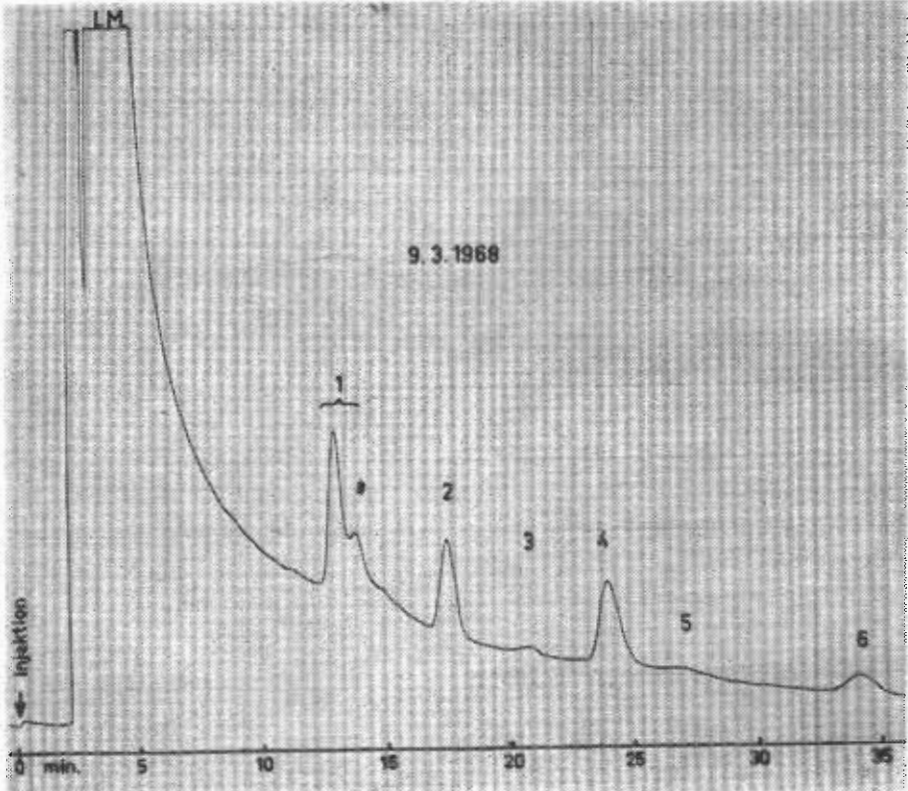
Yukarıdaki şekilde hazırlanmış 2ml numune sefadeks kolon (Sephadex 25) ve fraksiyon kolektör yardımı ile ayrıştırma bırakılır. 5 ml lik tüplere frakte olan numune, kuru hava ile kurutulur ve fenolfitalin damlatılarak 0.01 n NaOH ile titre edilir. Fraksiyonlar toplanarak asit komponentleri saptanmış olur.

Fraksiyon işleminde % 0.25, 1.5 n ve 5.0 n asetik asit (250, 500, 500 ml) karışımı ve en son alarakta 6 n asit formik kullanılır.

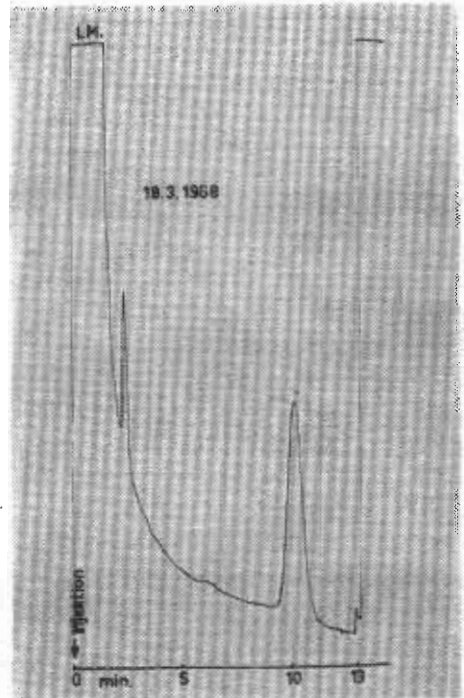
DIE QUALITÄTIVE UND QUANTITÄTIVE BESTIMMUNGSMETHODEN VON KOHLENHYDRATEN UND ORGANISCHEN SAUREN BEI PFLANZENPROBEN

Die einzelnen Zucker wurden QW-Qualitativ und Quantitativ mit Hilfe der von Sweeley (1963) Publizierten gaschromatographischen Methode analysiert. Diese methode, die bereits bei Williams und Martin (1967) für die Zucker analyse bei Kulturpflanzen verwendung fand. Für den verwandeten Gaschromatographen wurden in Abwandlung der von Swweley it. al. (1963) beschriebenen Methode Analysenbedingungen die Mattusch (1968) Buchloh und Neubeller (1969) sowie Erkan (1969) beschrieben haben, erprobt.

Zur Quantitativen Bestimmung der einzelnen Saeurekomponenten wurde nach einem leicht abgeänderten Verfahren von Scheffer et. al (1965) an eiener sephadexaeulu (sephadex 25) getrennt.



Resim 1: Gazkromatografik şeker analiz fraktogramı
 (Lm:çözelti maddesi, 1:Fruktoz,2:-D-Glitoz, 3:
 Mannit, 4: B-D-Glikoz, 5-Bilinmiyen, 6: İnosit
 (Göbekli Marulda, Erkan 1969 S.47)



Resim 2 Gazkromatografik sakkarozanaliz Fraktogramı
 (Lm: çözelti maddesi— Göbekli Mamulda-Erkan
 S. 48)



- | | |
|--------------------|--------|
| 1. Galakturon asit | : 0.09 |
| 2. China asit | : 0.26 |
| 3. Shikimi asit | : 0.34 |
| 4. Sitrik asit | : 0.42 |
| 5. Malik aist | : 0.49 |
| 6. Malon asit | : 0.55 |
| 7. Kehruber asit | : 0.71 |
| 8. Fumarik asit | : 0.81 |
| 9. Bilinmiyen asit | : 0.87 |

Resim 3: Organik asitlerin kağıt kromatografideki ayrımı ve Rf değerleri (Göbekli Marulda, Erkan 1969, S. 59)

Literatür :

- Buchloh, G.J. Neubeller. 1969. Zur Qualitativen und Quantitativen Bestimmung von Zuckern und Zuckeralkoholen in einigen Obstfuchten mittels Gaschromatographie. Erwerbsobstbau 2, 22-27
- Erkan, Z. 1969. Die Wirkung iener CO₂-Begasung im Gewachshaus auf die Entwicklung und auf verschiedene Inhaltstoffe des Kopfsalats. Diss. Hopenheim (LH)
- Mattusch, P. 1968. Untersuchungen über einige für den Anbau von süsskirschen zu Brennwecken wichtige kriterien. Diss. Hohenheim (LH)
- Scheffer, F., R. Kickuth und H. Lorenz. 1965. Metpodische Untersuc hungen zur Trennung und Bestimmung von organischen Saeurin in Pflanzenmaterial. Qualities plantarum et Material vegetabiles 12, 342-348
- Sweeley, C.C., R. Bentley, M.Makita and W.W.Fells. 1963. Gasliquid Chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substanves. 1.Amer. Chem. Soc. 85,2497-2507
- Willams, M.W. and G.C. Martin. 1967. Quantitative gaschromatography of sugars and related polyhydroxy compounds in horticultural crops. HoJtscience 2, (2), 68 - 69.