

Prof. Dr. Gönül Kunt  
Gönül Kunt

67877

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAKAODA KAFEİN VE TEOBROMİNİN  
KİSMİ EN KÜÇÜK KARELER  
SPEKTROFOTOMETRİK KALİBRASYON  
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ KURULU  
DOKÜMANTASYON MÜHÜRÜ

Kimyager Özlem AKSU

F.B.E. Kimya Anabilimdalı Analitik Kimya Programında

hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gönül KUNT

M. Jale  
Prof. Dr. Mehmet Jale

Prof. Dr. Hüseyin Afşar

İstanbul 1997

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	1
2. GENEL BÖLÜM	3
2.1. Kakao Hakkında Genel Bilgi	3
2.1.1. Kafein	4
2.1.1.1. Özellikleri	5
2.1.1.2. Farmakolojik Etkisi	6
2.1.1.3. Tanınma Yöntemleri	6
2.1.1.4. Miktar Tayin Yöntemleri	7
2.1.2. Teobromin	10
2.1.2.1. Özellikleri	10
2.1.2.2. Farmakolojik Etkisi	11
2.1.2.3. Miktar Tayin Yöntemleri	11
2.1.3. Kafein ve Teobrominin Birarada Tayin Yöntemleri	12
2.2. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu	15
3. DENEYSEL BÖLÜM	18
3.1. Maddeler , Çözücüler ve Çözeltiler	18
3.1.1. İlaç Maddeleri ve Analiz Örnekleri	18
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	18
3.1.3. Çözeltiler	18
3.2. Araç ve Gereçler	19
3.3. Yöntemler	20
3.3.1. Kafein ve Teobrominin Yanyana Analizi	20
3.3.1.1. Kısmi En Küçük Kareler Spektrofotometrik Kalibrasyonu ( PLS )	20
3.3.1.1.1.Uygun Koşulların Belirlenmesi ve Kalibrasyonun Hazırlanması	20

3.3.1.1.2. Kakao Örneklerine Uygulanması	20
3.3.1.2. UV Spektrofotometrik Yöntem	24
3.3.1.2.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	24
3.3.1.2.2. Kakao Örneklerine Uygulanması	24
3.3.1.3. Türev Spektrofotometrik Yöntem	25
3.3.1.3.1. Spektrumların Çizilmesi	25
3.3.1.3.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	25
3.3.1.3.3. Kakao Örneklerine Uygulanması	26
3.3.1.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik Yöntem (I)	26
3.3.1.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.3.1.4.2. Kakao Örneklerine Uygulanması	26
3.3.1.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik Yöntem (II)	27
3.3.1.5.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	27
3.3.1.5.2. Kakao Örneklerine Uygulanması	27
3.3.2. Kafein ve Teobromin Toplamının Analizi	27
3.3.2.1. UV Spektrofotometrik Yöntem	27
3.3.2.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	27
3.3.2.1.2. Kakao Örneklerine Uygulanması	28
4. SONUÇLAR	29
4.1. Kısmi En Küçük Kareler Spektrofotometrik Kalibrasyonu (PLS)	29
4.1.1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması ve Diğer Yöntemler ile Kıyaslanması	29
4.2. UV Spektrofotometrik Yöntem (Kafein-Teobromin Yanyana Analizi İçin)	33
4.2.1. Ölçü Eğrileri	33
4.2.2. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması	33
4.3. Türev Spektrofotometrik Yöntem	35
4.3.1. Ölçü Eğrileri	35
4.3.2. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması	36
4.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik Yöntem (I)	39
4.4.1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması	39
4.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik Yöntem (II)	39
4.5.1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması	39

4.6.	UV Spektrofotometrik Yöntem (Kafein-Teobromin Toplam Analizi İçin)	40
4.6.1.	Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması	40
5.	Yöntemlerin Karşılaştırılmasında Kullanılan İstatistiksel Eşitlikler	44
6.	TARTIŞMA	46
	KAYNAKLAR	48
	ÖZGEÇMİŞ	51



## TEŞEKKÜR

Tez alıŐma konumu veren ve çalıŐmam sűresince bilgi , ilgi ve yol gűstericiliĐinden yararlandıĐım hocam Prof. Dr. Gűnűl KUNT'a , bilgi ve fikirleri ile çalıŐmama destek veren Doç. Dr. Abdűrrezzak BOZDOĐAN 'a en içten teŐekkűrlerimi sunarım. Ayrıca , tez çalıŐmam sűresince bilgi ve tecrűbelerinden yararlandıĐım Prof. Dr. Sıdıkı SUNGUR ve Yrd. Doç. Dr. A. Mert ACAR 'a , deneysel çalıŐmalarım sırasında bana destek olan Dr. Gűzin ALPDOĐAN' a ve tezimin hazırlanması sırasında yardımcı olan arkadaŐım ArŐ. Gűr. Banu ERATİK 'e tezimin esasını oluŐturan kakaoyu bize saĐlayan ve bilgi aktarımında bulunan Teknarom A.Ő 'ye ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme teŐekkűrű bir borç bilirim.

Özlem AKSU

## **ÖZET**

Kakaoda kafein ve teobrominin birarada tayini için kısmi en küçük kareler spektrofotometrik kalibrasyon yöntemi ( Partial Least - Squares - PLS ) geliştirildi. Elde edilen sonuçlar literatürde bulunan UV spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Kısmi en küçük kareler analizi için , üç seviyeli tam deneysel tasarıma göre kalibrasyon tablosu oluşturuldu ve modelin kurulması için 9 adet örnek hazırlandı. Bu tasarımda kafein için 1 , 2 , 3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  , teobromin için 10.5 , 11.5 ve 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  seviyeleri seçildi. Kalibrasyon çözeltileri kafein ve teobrominin suda çözülmesi ile hazırlandı. 217 ve 293 nm arasında 4'er nm ara ile absorpsiyonları ölçüldü.

Kakao örnekleri ise su ile kaynatılarak hazırlandı. Çeşitli saflaştırma işlemlerinden sonra her bir örnek çözeltilisinin spektrumu alındı ve kafein - teobromin karışım çözeltilerine uygulanan işlemler tekrarlandı. Yöntemlerin karşılaştırılmasında t ve F testleri kullanıldı.

## ***SUMMARY***

Partial Least Squares Multivariate Spectrophotometric Calibration Method (PLS) were developed for the simultaneous determination of caffeine and theobromine in cacao. The results obtained by this method were compared with those obtained by the UV spectrophotometric and high pressure liquid chromatographic methods which were found in the literature.

The calibration set for the partial least square analysis was generated by using a 3-level full factorial design and 9 samples were used to construct the model. The levels selected for caffeine are 1, 2, 3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and for theobromine 10.5, 11.5 and 12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in this design. Calibration solutions were prepared by dissolving caffeine and theobromine in water. The absorbances were recorded between 217 and 293 nm every 4 nm.

Cacao samples were prepared in boiling water and absorbances were taken for each cacao samples after various purification methods and every stage of procedure which were used for the solution of caffeine and theobromine were repeated for cacao as well. Methods were compared by using tests of t and F.

## **1. GİRİŞ**

### **1.1. Çalışmanın Amacı**

Doğal olarak kafein ve teobromin kakao , çay ve kola bitkilerinin tohumlarında bir arada bulunur. Her ikisinde purin alkaloidi olup yiyecek ve içeceklerle sürekli olarak aldığımız maddelerdir. Ayrıca bu iki maddenin sinir sistemine uyarıcı etkisi vardır. Fakat bu etki teobrominde kafeine oranla oldukça azdır. Literatürde kakao çekirdeğinde ortalama olarak % 1-2.5 teobromin , % 0.17 ' de kafein bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca bazı kaynaklar kakaodaki teobromin ve kafein oranına yaklaşık 9:1 olduğunu açıklamışlardır. Ancak bu miktarlar kakaonun yetiştirildiği yöreye göre değişmektedir.

Bu çalışmada kakao örneği olarak *Teknarom A.Ş.* aracılığıyla Fransa ' dan ithal edilen *Barry* kakao kullanılmıştır. Barry kakaonun yaklaşık olarak bulunabilecek kafein ve teobromin miktarları ile ilgili bir etiket taşıması tüm uygulanan yöntemlerde bu kakaoyu kullanmamıza sebep oluşturmıştır.

Kakaoda kafein ve teobrominin birarada tayini için ya ön ayırmaya dayalı teknikler ya da kromatografik yöntemler uygulanmaktadır.

Kafeinin teobromin yanında oldukça düşük miktarda olması ve her iki alkaloidin gerek kimyasal gerek spektral özelliklerinin birbirine çok benzemesi çeşitli tayin güçlükleri oluşturduğundan tüm bu etkileri en aza indirebilen kısmi en

küçük kareler spektrofotometrik kalibrasyon kakao örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntem pahalı ve zaman alıcı olan diğer yöntemlere karşı hem basit hemde ucuz oluşu nedeniyle alternatif bir yöntem olarak sunulmuştur. Ayrıca kakaoya uygulanan diğer spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle de çalışılarak bu yöntemlerin PLS ile kıyaslanması amaçlanmıştır.



## **2. GENEL BÖLÜM**

### **2.1. Kakao Hakkında Genel Bilgi**

Kakao, Theobroma Cacao adındaki kakao ağaçlarının meyvalarından elde edilir. Bu meyvalar 20-25 mm kalınlıkta 20-40 tane badem şeklinde çekirdek taşırlar. Kakao bu çekirdeklerden elde edilir.

Kakao meyvanın et kısmından ayrılıp ya doğrudan doğruya güneşte kurutulma ya yığın yapılma ya da çukurlara doldurma işlemlerinden sonra birkaç gün mayalanmaya bırakılarak elde edilir. Bu sırada çekirdeklere yapışmış bulunan etli kısımlar gevşer, çekirdeğin acılığı değişir ve renk esmerleşir. Daha sonra çekirdekler temizlenir, yıkanır, kurutulur ve kavrulur. Çekirdekleri örten ince kabuk ayrılarak çekirdek iki yarım parça (kakao baklası) halinde dışarı çıkarılır. Kakao ve çikolata fabrikalarında kakao baklaları yabancı maddelerden kurtarıldıktan sonra kahve gibi fırınlarda kavrulurlar. Bu kavrulma sırasında kakaonun kimyasal bileşiminde değişiklikler olur, çeşni ve lezzeti diasetil oluşumundan dolayı iyileşir. Fırından çıkarılan baklalar ince tabakalar halinde yayılmak suretiyle iyice kurutulur ve kabuğu soyulur. Bu şekilde kabuksuz kakao çekirdeğinde ortalama olarak % 5-6 su, % 14 azotlu maddeler, % 53 yağ, % 9-10 nişasta, % 5-6 tanen, % 2-3 organik asitler, % 15 pentozanlar, % 4 ham lif, % 3 kül, % 0.3-0.5 fosfatidler, % 1-2.5 teobromin ve % 0.17 kafein bulunur.

Elde edilen kakao baklaları ezildikten sonra oluşan akıcı kütle, su buharı ile

ısıtılmış lengerlere dökülür. Bu kakao kütesinin su buharı veya kalevilerle etkileşimiyle çözünen kakao denilen dönüşmüş kakao elde edilir. Kalevi olarak genellikle % 2-2.5 potasyum karbonat kullanılır. Su ısıtılarak uçurulur ve bu kütleli toz haline getirmek için yağının bir kısmı hidrolik preslerden sıkılarak alınır. Yağı alınmış kütle ince toz edilerek kakao tozu adıyla piyasaya sunulur.

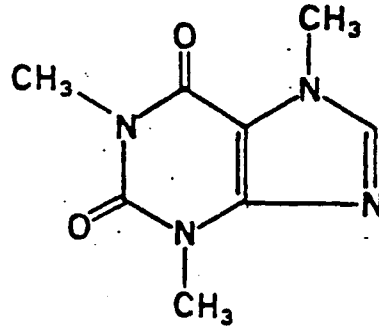
Çözünen kakaonun bileşiminde % 5.5 su , % 26.5 kakao yağı , % 31 karbonhidrat , % 22.3 azotlu madde bulunur. Kakao tozunda en az % 16 yağ bulunmalıdır.

Kakaonun esas bileşeni olan yağ , kakao yağıdır. Yağ asitlerinin % 55-57 'sini doymuş asitler ( palmitik ve stearik ), % 38 'ni oleik asit ve % 2 'ni linoleik asit oluşturur. İyot indeksi 34-36 , sabunlaşma indeksi 194 , erime noktası 32-34°C 'dir. Karbonhidratların % 9-10 'unu nişasta , % 0.17-1.26 'sını indirgen şeker oluşturur. Kakaoda tanenli maddelerin dönüşmesinden oluşan iki boyar madde , kakao kırmızısı ve kakao esmeri vardır. Kakao esmeri mayalanma sırasında oluşur. Organik asitlerden başlıca tartarasidi ve asetasidi bulunur. Kakaonun kokulu maddeleri arasında eterik yağlar , diasetil ve asetilmetil karbinol bulunmuştur. Ayrıca kakaoda eser miktarda A ve D vitaminleri saptanmıştır.

Kakaoda alkaloidli madde olarak bulunan teobrominin yarısı çekirdekte serbest halde diğer yarısı ise kakao glikoziti şeklinde bağlı olarak bulunur. Fakat mayalanma sırasında, enzim yardımı ile bu glikozit parçalanır ve teobromin serbest hale geçer. Teobrominin sinir sistemine tesiri kafeininkine benzer fakat daha zayıftır. Bu nedenle sinir sistemine etkisi çay ve kahveninkinden daha azdır ( Keskin , 1959 ).

### **2. 1. 1. Kafein**

Kafein doğal olarak çay bitkisinin yapraklarında kahve , kakao ve kola bitkilerinin tohumlarında bulunan bir purin alkaloididir ( Karabina , 1995).

**2.1.1.1. Özellikleri (Florey, 1986)****Kapalı Formülü :  $C_8H_{10}N_4O_2$** **Yapısal Formülü :****3,7 - Dihidro- 1,3,7 trimetil - 1H - purin - 2,6 dion****Molekül Ağırlığı : 194.19 g/mol****Elementel Bileşimi : C (% 49.48) , H (% 5.19) , N (% 28.85) , O (% 16.48)****Görünüş ,Renk ,Koku ,Tat : Beyaz , toz şeklinde kristal yapılı , kokusuz ve acı****Erime Noktası : 235 - 237.5°C****Süblimleşme : 178°C****Yoğunluğu :  $d_4^{18}$  1.23** **$pK_a$  : 14.0 (25°C) (Clarke, 1986)****Renk Testi : Amalik Asit Testi - turuncu / menekşe (Clarke, 1986)****Çözünürlüğü : 1 g susuz kafein , 50 ml su , 80°C 'de 6 ml su , 75 ml alkol , 6 ml kloroform, 600 ml eter , 50 ml aseton , 100 ml benzende çözünür.**

**UV Spektrumu :** Metanolde 272 nm ' de , trikloroetilende 278 nm ' de , etanolde 273 nm ' de 0.1 N NaOH ' de 275 nm ' de maksimum absorpsiyon gösterir.

**IR Spektrumu :** Başlıca pikler ( KBr disk ile ) 1658 , 1698 , 747 , 1548 , 1242 , 760  $\text{cm}^{-1}$  dedir.

### **2. 1. 1. 2. Farmakolojik Etkisi**

Bir ksantin türevi olan kafeinin merkezi sinir sistemi ve solunum sistemi üzerine stimülan etkisi vardır. Solunum merkezini uyararak solunumu hızlandırır. Günlük → toz 300 mg ' a kadardır. Tedavi dozlarında verildiğinde fizik ve düşünce aktivitesini ve çalışma kapasitesini artırır ve uyku isteğini azaltır. Daha yüksek dozda alındığında huzursuzluk, sinirlilik , baş ağrısı , uykusuzluk ve reflekslerin şiddetlenmesine yol açar.

Çok yüksek dozlarda ise konvülsiyonlar meydana gelir. Kafeinin bu asıl etkilerine ilaveten çizgili kaslar üzerine olan uyarıcı etkisi ve daha zayıf olmak üzere diüretik , vazodilatör ve kalbe stimülan etkiside bilinmektedir. Kafein ve diğer iki ksantin türevi olan teobromin ve teofilin mide salgısını da arttırırlar, bu yüzden mide ülseri olan kişilerin çay , kahve gibi bu bileşikleri içeren içkileri almaları zararlıdır. Kafeinin absorpsiyonu çok hızlıdır. Ağızdan alımda maksimum plazma konsantrasyonuna bir saatte ulaşır. Kafein % 90 oranında değişmeksizin atılır. Geri kalan % 10 ' u demetilasyon ve oksidasyon ile ürik asit türevine metabolize olur. Çay , kahve gibi içkilerle alınan kafeine karşı alışkanlık oluşur. Ancak bu psişik bir alışkanlıktır , fiziksel bağımlılık yoktur. Oral yoldan  $\text{LD}_{50}$  değeri sıçanlarda 200-250 mg / kg ' dır ( Karabina , 1995 ).

### **2. 1. 1. 3. Tanınma Yöntemleri**

Kafeinin tanınması için kullanılan yöntemlerin birinde tannik asit çözeltisinin kafein çözeltisine ilavesi ile çökelek meydana gelmiş , daha sonra tannik asit ilavesine devam edildiğinde çökeleğin tekrar çözeltiye geçtiği gözlenmiştir. Hidroklorik asitli iyot çözeltisinin kafein çözeltisine ilave edilmesiyle önce kahverengi bir çökelek oluşmuş, daha sonra sodyum hidroksit ilavesiyle çözeltiye geçmiştir ( Florey , 1986 ).

Potasyum klorat ve hidroklorik asit ile oluşan mor renk , USP XXII (1990)' de kafeinin tanınma reaksiyonu olarak gösterilmiştir.

Kafein çözeltisine altın klorür çözeltisi katılmasıyla küçük çubuklar , civa klorür katılmasıyla uzun iğne şeklinde tanecikler meydana gelir ( Florey , 1986 ).

#### **2. 1. 1. 4. Miktar Tayin Yöntemleri**

Kafeinin kantitatif tayininde titrimetrik , spektrofotometrik , elektroanalitik , kromatografik yöntemler kullanılmıştır.

Kafeinin titrimetrik tayini çok çeşitlidir. USP XXII ( 1990 ) 'ye göre kullanılan susuz ortam titrasyonu bu yöntemlerden biridir. Burada kafein glasiyal asetik asit içinde sudan IV ya da nil mavisi indikatörleri kullanılarak 0.1 N HClO<sub>4</sub> ile titre edilmiştir. Bir başka susuz ortam titrasyonu ile kafein tayini ise , asetik anhidrit ve toluen kullanılarak BP ( 1993 )' de yapılmıştır. Ayrıca AOAC ( 1984 )' de kafein, Kjeldahl yöntemi ile tayin edilmiştir.

Demli çay içerisindeki kafein miktarının titrimetrik olarak tayini yapılmıştır Bu amaçla çözeltiye Pb( OAc )<sub>2</sub>, KOH ve KMnO<sub>4</sub> ilave edilip , CHCl<sub>3</sub> ile çalkalanmış, CHCl<sub>3</sub> uçurulduktan sonra H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile asitlendirilip iyot çözeltisi aşırısı ilave edilerek Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> çözeltisi ile geri titre edilmiştir ( Karabina , 1995 ).

Kafein tayini için diğer bir yöntem de , kafein IBr ile kompleks oluşturmuş, IBr 'nin aşırısı KI ile reaksiyona sokulmuş ve açığa çıkan iyot Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile titre edilmiştir ( Florey , 1986 ).

Analjezik tabletler içerisindeki kafein , fenazon , fenasetin ve fenobarbitol yanında asitik çözeltide iyodometrik yöntem kullanılarak tayin edilmiştir ( Karabina , 1995 ).

Dondurma ve kakao içerisindeki kafeinin iyodometrik yöntemle bazik ortamda Pb( NO<sub>3</sub> )<sub>2</sub> kullanılarak tayini yapılmıştır. ( Florey , 1986 ).

Kafeinin analizinde çeşitli spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır.

Kolorimetrik yöntemlerin birinde örnek çözeltiye HCl ve molibdofosforik asit katılmış ve çökelti asetonda çözülerek molar absorptivitesi 440 m $\mu$  ' de ölçülmüştür. Diğer bir kolorimetrik yöntemde kafein , asetilaseton ve NaOH çözeltisinde çözülmüş ve çözeltiye p-dimetil-aminobenzaldehid ve derişik HCl eklenerek mavi çözeltinin molar absorptivitesi 615 m $\mu$  ' de ölçülmüştür ( Florey , 1986 ).

Kafeinin ilaç preparatlarında ve onların diğer ilaçlarla karışımlarında kafein miktarının bulunması için çeşitli UV spektrofotometrik metodlar geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin birçoğunda kafein bir ön ayırma işleminden sonra spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. AOAC (1984 )' de alkolsüz içeceklerde bulunan kafein tayini için kloroform ile çalkalandıktan sonra UV spektrofotometrik yöntem önerilmektedir. Ayrıca kahve , çay ve içeceklerde kafein miktarının bulunması için birçok UV spektrofotometrik metod geliştirilmiştir. Kafein , biyolojik sıvı içinde de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir ( Florey , 1986 ). Bir başka çalışmada kafein ve parasetamol tayini için türev UV absorpsiyon spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde her iki maddenin tayini için " zero - crossing " tekniğinden yararlanılmıştır ( Surmeian et. al. , 1994 ). Diğer bir çalışma da kafein , asetaminofen ve metamizol sodyum içeren ilaç tabletlerinde PLS yöntemiyle tayin edilmiştir ( Bozdoğan et al , 1992 , 1994 ).

Kafeinin analizi için IR spektrofotometrisi de kullanılmıştır. Aminopirin ve fenasetin içeren ilaçlardaki miktarı da bu yöntemle tayin edilmiştir ( Florey , 1986 ). Ayrıca kahvede kafein tayini yakın IR spektrofotometrisi kullanılarak yapılmıştır ( Guyot et. al. , 1993 ).

İlaç preparatlarındaki aspirin , fenasetin ve kafeinin kantitatif analizi için NMR spetrometrisinden yararlanılmıştır ( Florey , 1986 ).

Kafein yine kütle spektrometrisi kullanılarak asetilsalisilik asit ve fenasetin gibi ilaç maddeleri yanında analiz edilmiştir ( Florey , 1986 ).

Kafein elektroanalitik yöntemlerden biri olan polarografik yöntemle tayin edilmiştir. Bu amaçla kafein , civa-damla elektrodta indirgenmemesine rağmen brom ile yükseltgendikten sonra polarografik olarak tayin edilmiştir (Florey, 1986).

Ancak bu yöntemde fenazon, fenasetin ve amidopirinin ortamdan uzaklaştırılması gerektiği bildirilmiştir. Sıvı membran elektrod kullanılarak analjezik tabletlerdeki kafein miktarı tayin edilmiştir ( Karabina , 1995 ). Ayrıca bir başka metotta kafein , anodik diferansiyel faz voltametri ile analiz edilmiştir . Kafeinin oksidasyon ürünlerinin katodik diferansiyel puls polarografisi ile tayini yapılmıştır ( Florey , 1986 ).

Kafeinin tayini için birçok kromatografik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin birinde kafeinsiz kahve örneğinden kafeini ayırmak için başlangıçta kolon kromatografik teknikten yararlanılmış ve sonrada metil viyole indikatörlüğünde 0.01 M HClO<sub>4</sub> ile titre edilmiştir ( Florey , 1986 ).

Kafein tayininde sütun kromatografisinden de yararlanılmıştır. Bu amaçla selit, silikajel , poliamid , alüminyumoksit , magnezyumoksit gibi adsorbanlar kullanılmıştır. Elüsyon , kloroform , metanol , su gibi çözücüler ile yapılmış daha sonra UV adsorpsiyonu ölçülmüştür. Bu yöntemlerle ilaç preparatları , kahve alkollü ve alkolsüz içeceklerde kafein tayin edilmiştir ( Karabina , 1995 ). Kafeinin çeşitli içeceklerdeki tayini için gaz kromatografisi önerilmiş ve yöntemin bir ön ayırma işlemine gerek duymadan yapılan hızlı ve basit bir metod olduğu ileri sürülmüştür ( Wang and Lee , 1995 ).

Çeşitli örneklerdeki kafein tayini için en çok kullanılan yöntem HPLC yöntemidir. USP XXII ( 1990 )' de iki ya da üç bileşenli preparatlarda kafein tayini için bu yöntem önerilmiştir.

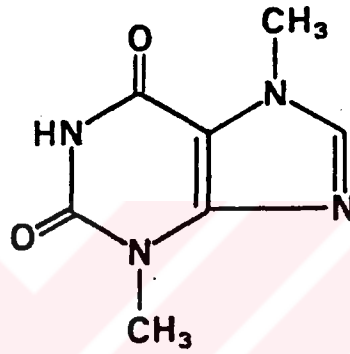
### 2.1.2. Teobromin

Kakao çekirdeğinde bulunan temel alkaloiddir. Kola tohumlarında ve çayda da bulunur ( Merck Index )

#### 2.1.2.1. Özellikleri (Clarke, 1986)

**Kapalı Formülü :**  $C_7H_8N_4O_2$

**Yapısal Formülü :**



3,7 - Dihidro - 3,7 - dimetil - 1H - purin - 2,6 - dion

**Molekül Ağırlığı :** 180.17 g/mol ( Merck Index )

**Elementel Bileşimi :** C (% 46.66 ), H (% 4.48 ), N (% 31.10 ), O (% 17.76)  
( Merck Index )

**Görünüş ve Renk :** Beyaz, mikrokristal toz

**Erime Noktası :** 357<sup>0</sup> C ( Merck Index )

**Süblimleşme :** 290<sup>0</sup> C ( Merck Index )

**pK<sub>a</sub> < 1, 10.0** ( 25<sup>0</sup> C ' de )

**Renk Testi :** Amalik Asit Testi - sarı / menekşe

**Çözünürlüğü :** 1 g teobromin 2000 ml su , 2500 ml etanol , 6000 ml kloroform ve 10 ml sıcak suda çözünür.

**UV Spektrumu :** Asit çözeltisinde 272 nm 'de , alkali çözeltide 274 nm 'de maksimum absorbands gösterir.

**IR Spektrumu :** Teobromin ( KBr disk ile ) 1690 , 1665 , 1221 , 1550 , 1595 , 680  $\text{cm}^{-1}$  'de karakteristik pikler gösterir.

### **2. 1. 2. 2. Farmakolojik Etkisi**

Teobromin kafeinin bir metabolitidir. Alınan dozun %90'ı 48 saat içinde idrarla atılır. Tek dozdan sonra plazma yarılanma ömrü 5-11 saattir. Günlük dozaj 300-600 mg arasındadır ( Clarke , 1986 ).

### **2. 1. 2. 3. Miktar Tayin Yöntemleri**

Teobromin , kafeine oranla daha az çalışılmış bir maddedir. Kantitatif tayini gravimetrik , titrimetrik ve kromatografik yöntemlerle yapılmıştır.

Wadsworth (1921) kakaoda teobromini gravimetrik yöntemle tayin etmiştir. Bu çalışmada kakao MgO ile karıştırıldıktan sonra tetrakloroetan ilavesi ile geri soğutucu altında kaynatılmıştır. Çözeltiye eter ilave edildikten sonra bir gece bekletilmiş  $100^{\circ}\text{C}$  'de kurutulup tartılmıştır. Bu yöntem AOAC (1984) 'de standart yöntem olarak gösterilmiştir.

Teobromin titrimetrik olarak çeşitli şekillerde tayin edilmiştir. Holmes ' un (1950) kakaoda teobromin tayini için geliştirdiği yöntemde kakao tozu , magnezya ve kurşun asetat ilavesiyle saflaştırılmış ve kloroformla çalkalanmıştır. Kloroform uçurulduktan sonra çözelti su ve  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile kaynatılmış , fenol kırmızısı indikatörlüğünde renk sarıya dönene kadar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  katılmış ve  $\text{AgNO}_3$  ilave edildikten sonra renk pempeye dönünceye kadar 0.1 N NaOH ile titre edilmiştir. Gerritsma ve Koers ' da (1953) benzer bir çalışma yapmışlardır. Burada kakao örneği kloroform ile amonyaklı ortamda çalkalanmış susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile dehidrasyon yapıp çökelti su ile

çözöldükten sonra  $AgNO_3$  eklenmiş ve açığa çıkan  $HNO_3$ , fenol kırmızısı indikatörlüğünde alkali ile titre edilmiştir. Diğer bir çalışmada teobromin ve purin türevleri asetik asitli ortamda,  $BrCl$  reaktifi kullanılarak iyodometrik yöntemle tayin edilmiştir ( Chauhan et al , 1993 ).

Spektrofotometrik bir çalışmada teobromin , teofilin , kafein , fenasetin ve amipoprin içeren tabletler CPA-matris spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir ( Xu et al , 1993 ).

HPLC kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise kafeinsiz kahvede ve çayda teobromin , kafein ve diğer purin alkaloidleri , 0.01 M fosfat tamponu ( pH = 7 ) : metanol ( 80 : 20 ) karışımı mobil faz olarak kullanılarak UV detektör ile 276 nm 'de tayin edilmiştir ( Kazi , 1985 ).

### ***2. 1. 3. Kafein ve Teobrominin Birarada Tayin Yöntemleri***

Kakaoda kafein ve teobrominin miktarı çeşitli yöntemlerle total alkaloid ya da % purin olarak tayin edilmiş , birarada analizleri için ; titrimetrik , spektrofotometrik , türev spektrofotometrik , kromatografik , yöntemler kullanılmıştır.

Moir ve Hinks ( 1935 ) kakaoda kafein ve teobromini toplam alkaloid olarak bulmuşlardır. Bu yöntemde toz kakao , alkaloidlerin tanen maddeleri ile oluşturdukları kombinasyonu bozmak ve çeşitli girişim yapan maddelerden uzaklaştırmak için  $MgO$  ile karıştırılıp % 80 ' lik alkol ile çözeltiye alınmıştır. Karışım süzöldükten sonra buharlaştırılmış ve kalıntı suya alınmıştır. Saflaştırma amacıyla çözeltiye çinkoferrosiyanür katıldıktan sonra kloroformla çalkalama yapılmış ve kloroform fazına geçen toplam azot tayin edilmiştir.

Harral ( 1940 ) ise , örnek içindeki teobromini metilsülfat + alkali ile çalkalayarak kafeine dönüştürmüş ve her iki alkaloidi kloroforma daha kolay geçen kafein şeklinde tayin etmiştir.

Dünya kakao üreticilerinin kabul ettiği OICCC ( 1988 ) standart metodu ile yapılan bir çalışmada kakao tozundan teobromin ve kafein , kaynar suyla alınmış bazik kurşun asetat ilavesiyle saflaştırılmış ve santrifüjlendikten sonra

$\text{NaHCO}_3$  katılarak kurşun fazlası uzaklaştırılmıştır. Süzüntü seyreltikten sonra 272 nm ve 306 nm 'de UV spektrofotometrede ölçüm yapılmış , standart teobromin çözeltisine karşı hesaplama yapılarak teobromin cinsinden % purin miktarı bulunmuştur.

Kafein ve teobrominin yanyana analizi için Moores ve Campbell ( 1948 ) bir çalışma yapmışlardır. Burada kakao tozu MgO varlığında su ile kaynatılmış, süzüntüye çinkoasetat - potasyumferrosiyaniür belirteçleri konularak saflaştırılmıştır. Sulu çözelti içindeki alkaloidler özel bir kolon üzerinde adsorplanmış , teobromin seyreltik NaOH ile kolondan alınmıştır. Bu çözeltinin pH 'ı sülfirik asitle 6.4'e getirilip gümüş nitratin aşırısı ilave edilmiştir. Teobromin ve gümüş nitrat arasındaki reaksiyon sonucu açığa çıkan nitrik asit , sodyum hidroksit ile geri titre edilerek bitiş noktası elektrometrik yöntemle tayin edilmiştir. Kafein tayininde ise aynı şekilde çinkoasetat - potasyumferrosiyaniür ile saflaştırılmış ekstrakt sodyumfosfatla alkali hale getirilmiş ve kloroformla çalkalanmıştır. Kloroform fazına geçen kafein miktarı Kjeldahl yöntemi ile bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada Englis ve Miles( 1954 ) teobromin ve kafeini spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Daha az örnek ve çözelti ile yapılan bu çalışmada kakao , benzer saflaştırılma işlemlerinden geçirilmiş , teobromin özel bir kolondan NaOH çözeltisi ile alındıktan sonra HCl ile asitlendirilip UV spektrofotometre kullanılarak 272.5 nm ve 310 nm 'de ölçüm yapılmıştır. Kafein miktarını bulmak için , çözelti amonyumhidroksit ile alkali hale getirildikten sonra kloroformla çalkalanarak kafein kloroform fazına geçirilmiştir. Burada daha önceki çalışmalarda yapılmış Kjeldahl metoduyla kafein tayininin diğer azotlu maddelerin varlığından dolayı hatalı sonuçlar verdiği öne sürülmüştür.

Daha sonraki yıllarda Li ve arkadaşlarının( 1990 ) geliştirdikleri spektrofotometrik metodta toz kakao su ile kaynatılmış protein ve diğer girişim maddelerinin uzaklaştırılması için en iyi saflaştırıcı olarak bazik kurşun asetat ilave edilmiştir. Çözeltiye  $\text{NaHCO}_3$  katılarak kurşun fazlası çöktürülmüş , süzüntünün pH 'ı NaOH çözeltisi kullanılarak 12.5 - 12.7 arasına getirilmiştir. Teobrominin farklı pH 'larda su ve kloroformda dağılımı izlenmiş , kafeinin ise yüksek alkali çözeltiler içinde çabuk bozunduğu bulunmuş ve bu aralığın analiz için en uygun pH aralığı olduğu saptanmıştır. pH 'ı ayarlanan çözelti kloroformla çalkalanarak teobromin sulu kısma , kafein kloroform fazına alınmıştır.

Teobrominin sulu çözeltilerde bir miktar HCl ilavesiyle 272.7 nm ve 310 nm 'de, kafeinin ise kloroformda 275.9 nm ve 310 nm 'de UV spektrofotometresi ile ölçümleri yapılmıştır.

Abuirjeie ve arkadaşları ( 1992 ) kakaoda kafein ve teobromini türev spektrofotometresi ve HPLC kullanarak tayin etmişlerdir.

Türev spektrofotometresi ile yaptıkları çalışmada toz kakao , suya bir miktar amil alkol ilave edilerek kaynatılmış , sulu sodyumhidroksit ile seyreltmeler yapıldıktan sonra 1. türev eğrisinden teobromin tayin edilmiştir. Kafeinin ise sulu çözeltilerde " zero - order " spektrumu kullanılarak kompensasyon tekniği yardımıyla miktarı saptanmıştır.

Diğer bir yöntem olarak kullandıkları HPLC tekniğinde ters faz kolonda çalışılmış , mobil faz olarak 0.01 M sodyumasetat çözeltisi : asetonitril (85:%15) kullanılarak pH : 4 ' de 272 nm ' de ölçüm yapılmıştır.

Hurst ve arkadaşları ( 1985 ) mikrobor HPLC kullanarak kakaoda kafein ve teobromin tayini yapmışlardır. Burada kolon olarak Mikro-B ODS-3 , mobil faz olarak su : metanol : derişik asetik asit (68:31:1) kullanılmış , akış hızı 60 µl / dak ' ya ayarlanarak UV detektör ile 280 nm ' de ölçüm yapılmıştır.

AOAC ( 1984 ) ' de HPLC ile çalışılmış C<sub>18</sub> kolon ve mobil faz olarak MeOH : HOAC : H<sub>2</sub>O (20:1:79) kullanılmış , 2000 psi basınçta 1 ml / dak akış hızıyla UV detektör ile 280 nm ' de tayin yapılmıştır.

Fransa ' da Barry kakao firmasının HPLC ile yaptığı bir çalışmada mobil faz % 85 fosfat tamponu (pH = 3) : % 15 asetonitril olarak kullanılmış , 272 nm ' de 1 ml / dak çıkış hızıyla ölçümler alınmıştır ( CRC-MA-47 ).

Gaz kromatografisi ile yapılan bir çalışmada kakao ürünlerinde kafein ve teobromin , azot / fosfor detektörler kullanılarak tayin edilmiştir (Chen , 1991).

## 2.2. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu

Bu yöntem Herman Wold tarafından teklif edilmiştir. Svante Wold , Martens ve arkadaşları da bu yöntemi geliştirmişlerdir ( Geladi , 1986 a , 1986 b , 1988 ).

Kısmi en küçük kareler yöntemi iki X ve Y matrisinin izdüşümleri arasındaki regresyonu içerir. Karışımların spektroskopik analizi için , X ve Y sırasıyla karışımların spektral ve konsantrasyon matrislerini gösterirse , kısmi en küçük kareler yöntemi aşağıdaki kalibrasyon modelini araştırır.

$$Y = X B \quad (1)$$

n<sub>xp</sub>    n<sub>xm</sub>    m<sub>xp</sub>

Burada B sistem için en iyi kalibrasyon sabitlerini gösterir. X ve Y 'nin satırları örnek karışımlarıdır. X 'in sütunları spektral dalgalıylarıdır. Örnekler fazla bileşenler içerebilmelerine karşın , Y 'nin sütunları sadece " bilinen " bileşenlerden oluşur. B 'nin satırları ve sütunları sırasıyla dalgalıyları ve " bilinen " bileşenlerdir.

Kısmi en küçük kareler X ve Y için ayrı ayrı dış bağıntıları ve her iki matrisi birbirine bağlayan iç bağıntıyı bulma işlemlerini içerir. Dış bağıntılar aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$X = T P' + E \quad (2)$$

n<sub>xm</sub>    n<sub>xa</sub>    a<sub>xm</sub>    n<sub>xm</sub>

$$Y = U Q' + F \quad (3)$$

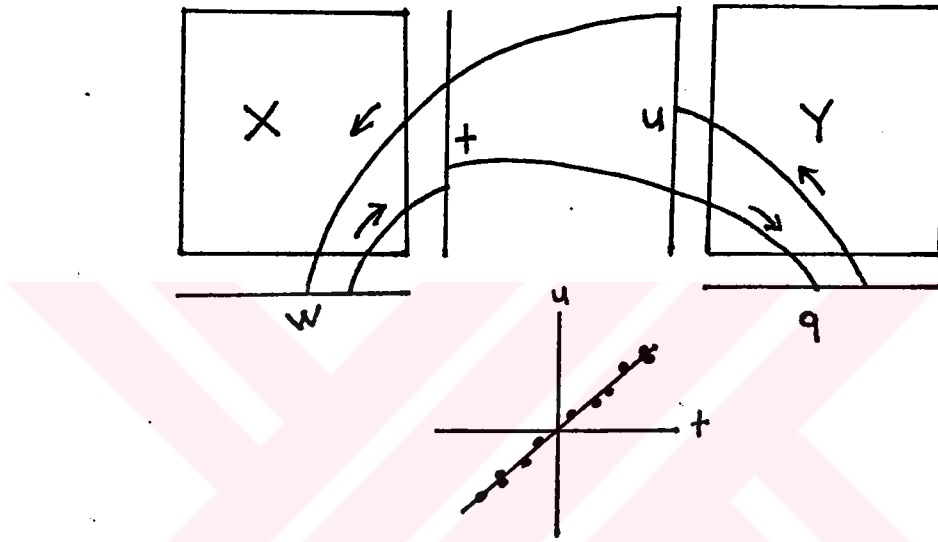
n<sub>xp</sub>    n<sub>xa</sub>    a<sub>xp</sub>    n<sub>xp</sub>

Burada E ve F deneysel belirsizlikten olduğu kadar modelin uygunsuzluğundan ortaya çıkan hata matrisleridir. İç bağıntı ise aşağıdaki şekilde belirtilebilir.

$$U = T W \quad (4)$$

n<sub>xa</sub>    n<sub>xa</sub>    a<sub>xa</sub>

$\Pi X - TP' \Pi$  ve  $\Pi Y - UQ' \Pi$ 'nin her ikisinde minimum oluncaya kadar X ve Y matrisleri hesaplanır. Uygulamada, bu hesaplama sırasıyla  $w_1, t_1, q_1, u_1$  ve  $p_1$ 'in bulunmasıyla olur. Bu ise bir  $w_1$  ile başlayarak yapılır. Daha sonra uygunluk sağlanıncaya kadar işlem tekrarlanır. Bu işlemin esası şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. PLS yönteminin şematik gösterilişi

Daha sonra, bileşen vektörlerinin dış çarpımları X ve Y matrislerinden çıkarılır ve artık matrisleri elde edilir. İkinci ana bileşenleri bulmak için ( $w_2, t_2, q_2, u_2$  ve  $p_2$ ), X ve Y matrisleri artık matrisleri ile yer değiştirildikten sonra, işlem tekrarlanır. artık kareler toplamı yeterli bir minimuma ulaşıncaya kadar üçüncü, dördüncü ve diğer öz vektörler benzer şekilde çıkarılır.

(2), (3) ve (4) eşitlikleri, (1) eşitliğinde kalibrasyon matrisini verecek şekilde birleştirilebilir :

$$B = P (P' P)^{-1} W Q' \quad (5)$$

Kısmi en küçük karelerin çoklu regresyon analizinden en önemli farkı ortogonal vektörler çıkarma yeteneğidir. Böylece çoklu regresyon analizinde en önemli problem olan lineer bağımlılıktan kaçınılmış olur. Çoklu regresyonda kalibrasyon matrisi

$$B = (X'X)^{-1}X'Y \quad (6)$$

eşitliğinden hesaplanır. Görüldüğü gibi,  $X'X$  matrisinin tersi alınmaktadır. Bu ise  $X'$  in sütunlarının lineer olarak bağımsız olmasını gerektirir. Kısmi en küçük kareler yöntemi ortogonal vektörlerin çıkartılmasında ana bileşen regresyonuna benzer. Fakat kısmi en küçük kareler yönteminde ana bileşenler  $X$  matrisinden hesaplanır ve  $Y$  matrisi ile birleştirilir. Ana bileşen regresyonunda ise, ana bileşenler sadece  $X$  matrisinden hesaplanır. Bundan dolayı, kısmi en küçük kareler yöntemi kalibrasyon verilerinin sistemin bütün bileşenlerini içermediği durumlarda daha iyi tahmin gücüne sahip olur.

### **3. DENEYSEL BÖLÜM**

#### **3. 1. Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler**

##### **3. 1. 1. İlaç Maddeleri ve Analiz Örnekleri**

Farmasötik saflıkta kafein ve teobromin ( Bilim A.Ş. ) ile çalışıldı. Analiz örneği olarak Barry kakao ( Teknarom A.Ş. ), Ülker kakao , Sagra kakao kullanıldı.

##### **3. 1. 2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler**

Kurşunoksit , kurşunasetat , sodyumbikarbonat , sodyumhidroksit , potasyumdihidrojenfosfat , kloroform , hidroklorik asit , fosforik asit , metanol , asetonitril , asetik asit ( Merck ) .

##### **3. 1. 3. Çözeltiler**

Kafein stok çözeltisi ( I ) : Kafeinin  $500 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda sudaki çözeltisi hazırlandı.

Kafein stok çözeltisi ( II ) : Kafeinin  $500 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda kloroform içindeki çözeltisi hazırlandı.

Teobromin stok çözeltisi : Teobrominin  $500 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda sıcak sudaki çözeltisi hazırlandı.

Kafein standart çözeltileri : Kafeinin  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  ve  $50 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda sudaki ,  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda kloroformdaki çözeltileri hazırlandı. Standart teobromin çözeltileri : Teobrominin  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  ve  $125 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda sudaki ,  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda 2.7 N HCl 'deki çözeltileri hazırlandı.

Diğer çözeltiler ;

% 10 ' luk ve 2.7 N HCl çözeltisi

1 M NaOH çözeltisi

$\text{H}_3\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{PO}_4^-$  pH = 3 tampon çözeltisi

Bazik kurşunasetat çözeltisi : 1.248 g / l ( 23 g (  $\text{CH}_3\text{COO}$  )<sub>2</sub>Pb. 3H<sub>2</sub>O , 70 ml su ile kaynatıldı. 12 g PbO katıldı ve sıcak olarak süzüldü. 100 ml 'ye suyla tamamlandı.

### 3. 2. Araç ve Gereçler

- 1- Spektrofotometre ( Unicam UV2-100 UV-Visible )
- 2- 1 cm ' lik kuvarts küvetler ( Hellma , 10x10x45 mm ).
- 3- Analitik terazi ( Sartorius analytic A 200B , 0.1 mg ' a kadar duyarlı )
- 4- pH metre ( Metrohm E-510 Herisau ) ve pH elektrodu ( Metrohm AG-CH-9101 Herisau )
- 5- Vakum pompası ( Edwards High vacuum pump E2M5 )
- 6- Ultrasonik banyo ( Azaklı )
- 7- 3.9  $\mu\text{m}$  çapında 30 cm boyunda , 10  $\mu\text{m}$  Bondapak C<sub>18</sub> ters faz kolon , 510 model yüksek basınç pompası , 481 model değişken dalga boylu spektrofotometre, U6K üniversal enjektör , bilgisayar ve yazıcıdan oluşan sıvı kromatografi cihazı( Waters ).
- 8- Hamilton enjektör ( 10  $\mu\text{l}$  ' lik )
- 9- Mobil faz ve örnek çözeltilerinin süzülmesi için , HA ( 0.45  $\mu\text{m}$  ) , HV ( 0.45  $\mu\text{m}$  ) , FH ( 0.5  $\mu\text{m}$  ) tiplerinde milipor filtreler
- 10- Santrifüj ( MSE Mıstral 2000 )
- 11- Elektrikli ısıtıcı ( Nüve HP 121 )

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Kafein ve teobrominin Yanyana Analizi**

##### **3.3.1.1. Kısmi En Küçük Kareler Spektrofotometrik Kalibrasyonu (PLS)**

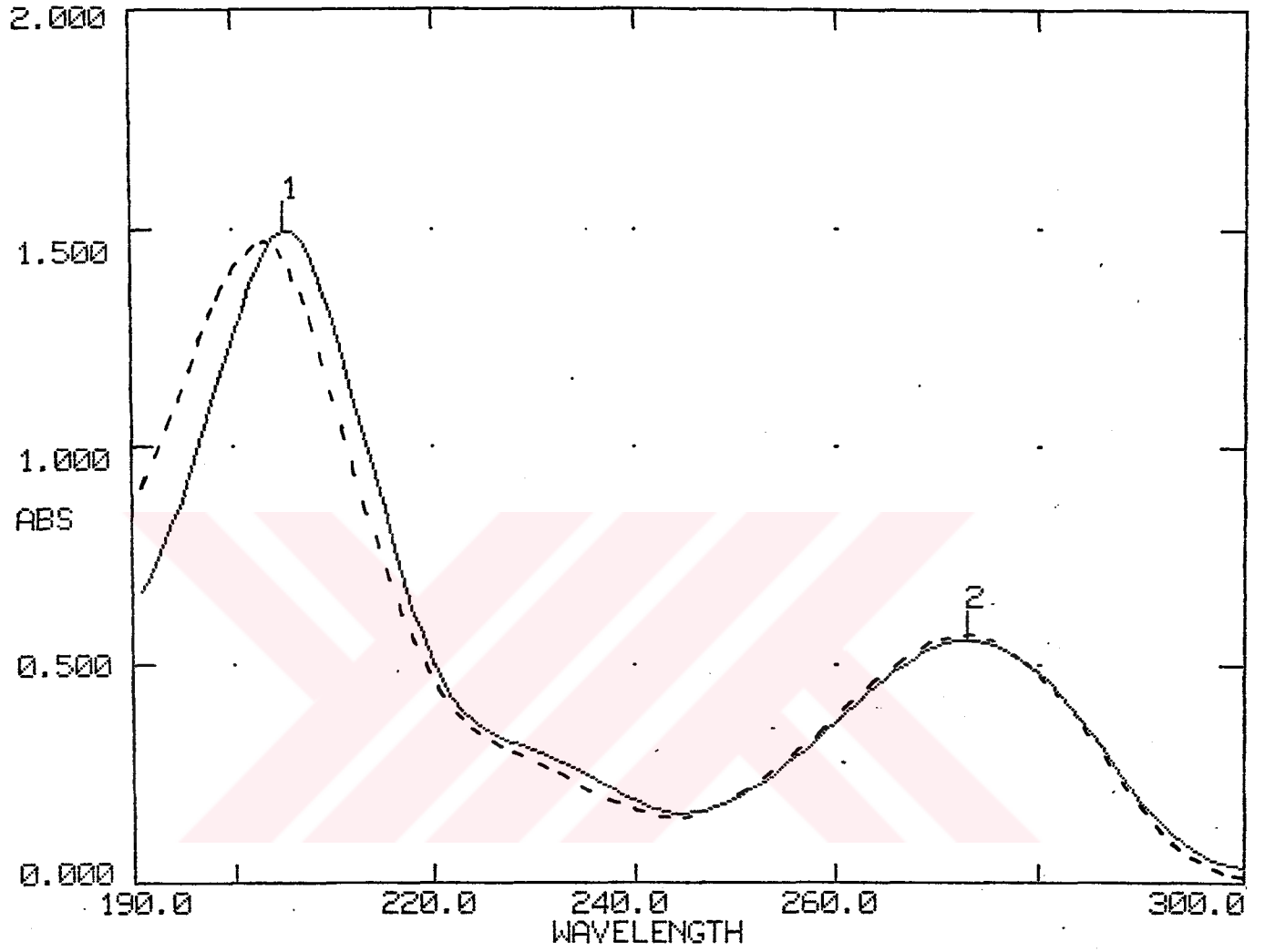
###### **3.3.1.1.1. Uygun Koşulların Belirlenmesi ve Kalibrasyonun Hazırlanması**

İki faktörlü üç seviyeli tam deneysel tasarıma göre kalibrasyon hazırlanmıştır. Uygun koşulların saptanması için  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda kafein ve teobrominin suda (şekil 3.1. ),  $0.1 \text{ N HCl}$  'de (şekil 3.2. ) ve  $0.1 \text{ N NaOH}$  'de (şekil 3.3. ) spektrumları çekildi. Su , bu çalışmada en uygun çözücü olarak saptandı.

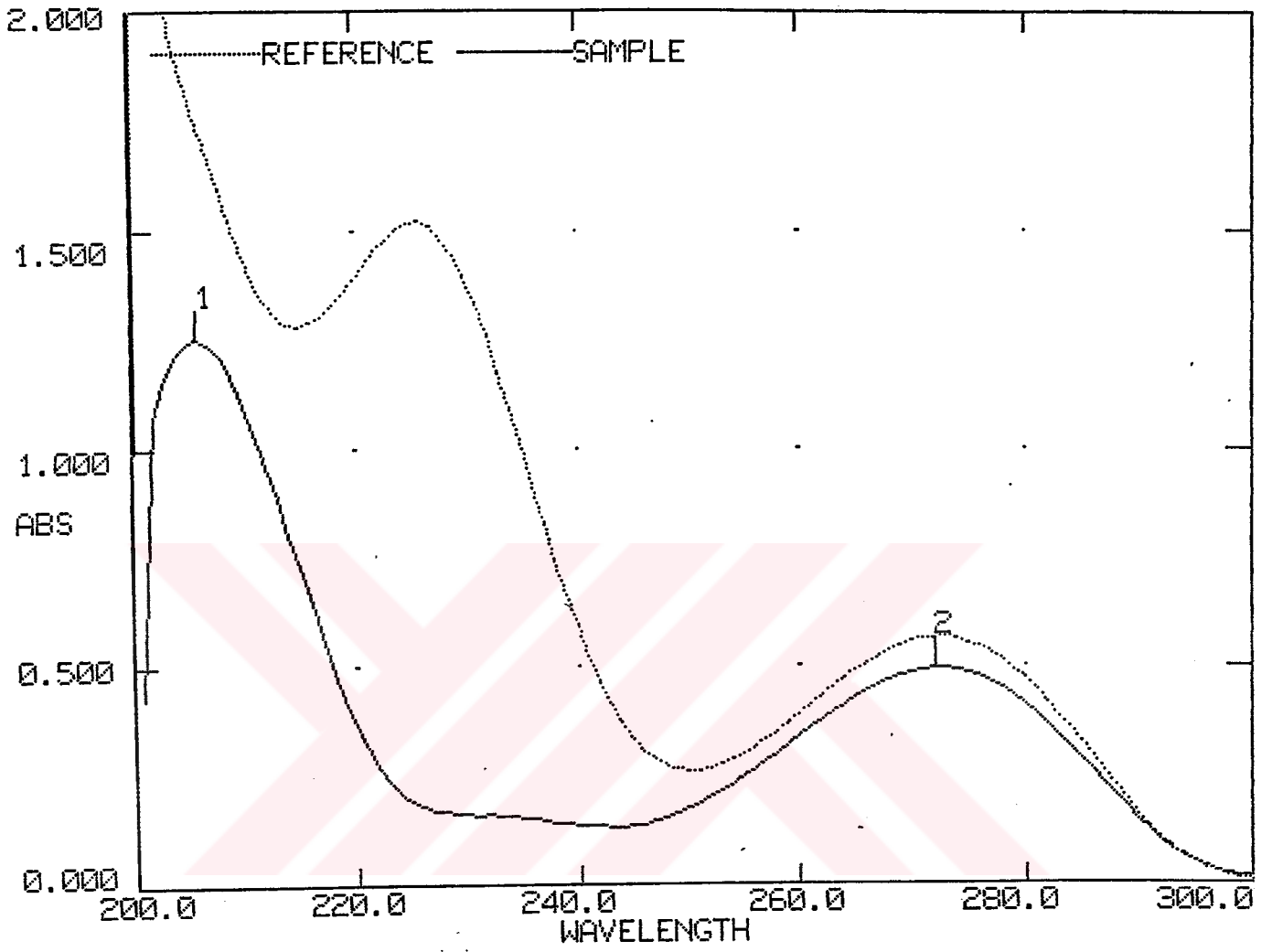
Kalibrasyonun hazırlanması için dokuz tane  $25 \text{ ml}$  'lik balon jojeden ilk üçüne sırayla suyla hazırlanmış  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonundaki kafein çözeltilisinden  $0.5$  ,  $1.0$  ,  $1.5 \text{ ml}$  , suyla hazırlanmış  $125 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyondaki teobromin çözeltilisinden de her birine  $2.1 \text{ ml}$  kondu. Diğer üç balon jojeye aynı standart kafein çözeltilisinden sırayla  $0.5$  ,  $1.0$  ,  $1.5 \text{ ml}$  , aynı standart teobromin çözeltilisinden her birine  $2.3 \text{ ml}$  kondu. Son üç balon jojeye de yine standart kafein çözeltilisinden  $0.5$  ,  $1.0$  ,  $1.5 \text{ ml}$  standart teobromin çözeltilisinden de her birine  $2.5 \text{ ml}$  kondu. Çözeltilerin hepsi hacmine distile su ile tamamlandı. Her bir çözeltinin  $217 \text{ nm}$  ve  $293 \text{ nm}$  arasında  $4$  'er  $\text{nm}$  arayla absorpsiyonları ölçüldü.

###### **3.3.1.1.2. Kakao Örneklerine Uygulanması**

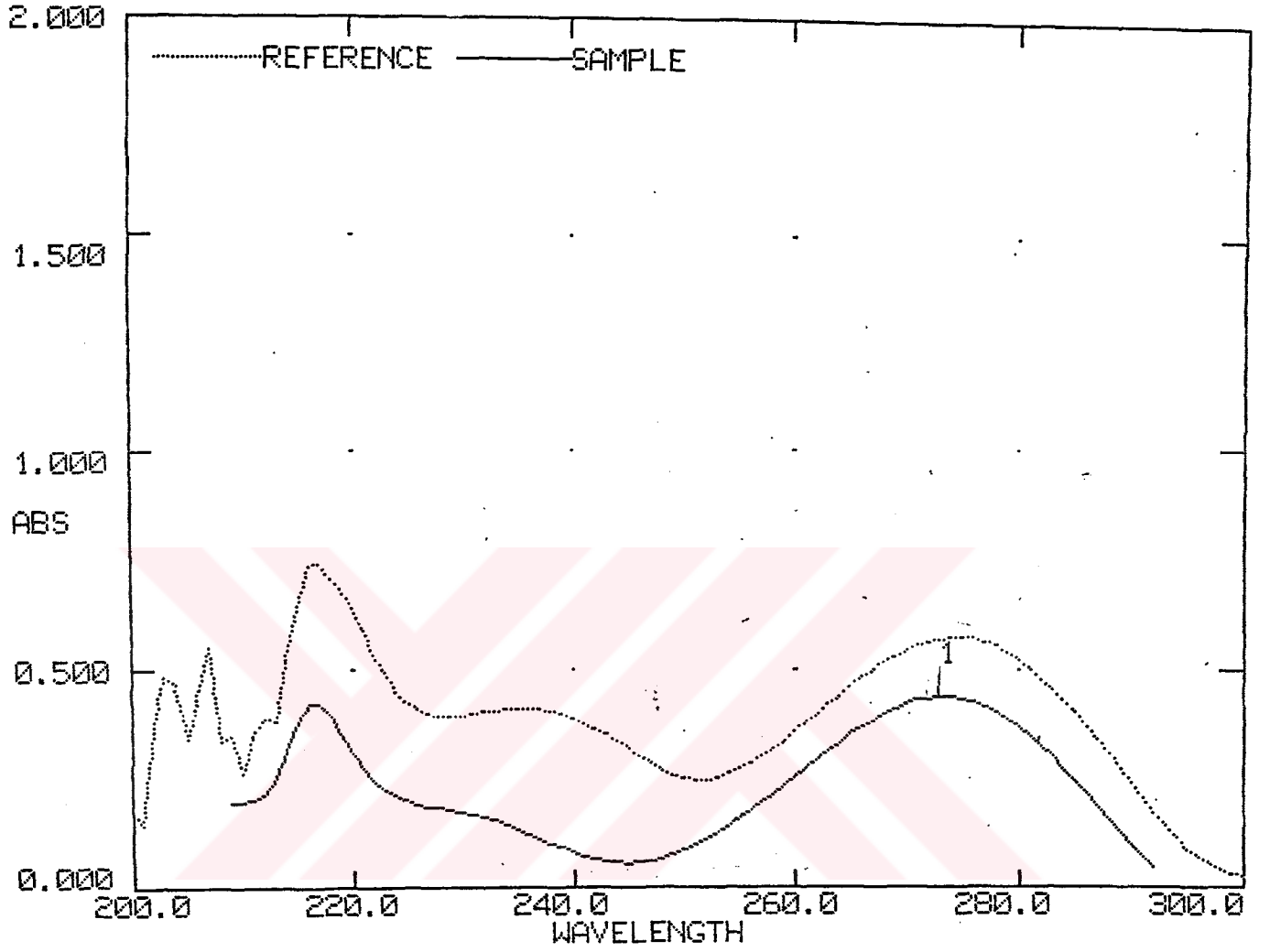
$1 \text{ gram}$  kakao  $\text{mg}$  'ın  $1/10$  'u duyarlılıkta bir erlen içine tartıldı. Üzerine  $95 \text{ ml}$  su ilave edilerek  $5$  dakika kaynatıldı. Çözeltiye  $4 \text{ ml}$  bazik kurşun asetat çözeltisi ilave edildi. Çözelti soğutulduktan sonra kaynama sırasındaki kayıp kadar su ilave edildi ve süzüldü. Süzüntünün  $50 \text{ ml}$  'si alındı ve üzerine  $0.5 \text{ gram NaHCO}_3$  ilave edildikten sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Bu çözeltiden  $5 \text{ ml}$  alınarak  $100 \text{ ml}$  'lik balon jojeye konuldu ve hacmine distile su ile tamamlandı. Çözeltinin  $217 \text{ nm}$  ve  $293 \text{ nm}$  arasında  $4$  'er  $\text{nm}$  arayla absorpsiyonları ölçüldü. Bu yöntemle ilgili sonuçlar bölüm 4. 1. 'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Kafein (—) ve teobrominin (---) sudaki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 3. 2. Kafein (—) ve teobrominin (.....) 0.1 N HCl' deki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 3. 3. Kafein (—) ve teobrominin (.....) 0.1 N NaOH' deki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

### **3.3.1.2. UV Spektrofotometrik Yöntem**

Bu yöntemde Li ve arkadaşlarının (1989) yaptıkları çalışma izlendi.

#### **3.3.1.2.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması**

Teobromine ait ölçü eğrisinin hazırlanması için sıcak suda hazırlanmış  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonundaki standart teobrominin çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltiden sırayla 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml ayrı ayrı 10 ml'lik balon jöjelere konulup herbirine 0.05 ml % 10'lük HCl çözeltisi eklendi ve distile su ile hacimlerine tamamlandı. Elde edilen teobromin çözeltilerinin UV spektrofotometre ile 272.7 nm'de absorbans değerleri saptandı. Bu değerler ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu ve eğriye ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

Kafeine ait ölçü eğrisi hazırlanması için kloroformda hazırlanmış  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonundaki standart kafein çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltiden sırayla 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml ayrı ayrı 10 ml'lik balon jöjelere konuldu ve kloroformla hacimlerine tamamlandı. Elde edilen kafein çözeltilerinin UV spektrofotometre ile 275.9 nm'de absorbans değerleri saptandı. Bu değerler ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu ve eğriye ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre saptandı.

#### **3.3.1.2.2. Kakao Örneklerine Uygulanması**

1 g kakao, mg'ın 1/10'i duyarlılıkta tartılıp bir erlen içine konuldu. Üzerine 96 ml su ilave edilerek kakao-erlen ve katılan su ile birlikte tartıldı. Karışım 5 dakika karıştırılarak kaynatıldı. Çözeltiye 4 ml bazik kurşunasetat çözeltisi tartularak ilave edildi. Karışım soğuduktan sonra tartıldı ve kayıp kadar su eklendi. Çözeltiye, 10 ml süzüntüye 0.1 g  $\text{NaHCO}_3$  karşılık gelecek şekilde  $\text{NaHCO}_3$  katıldı. Bu çözelti mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü ve ilk birkaç ml atık olarak kabul edildi. Süzüntünün 50 ml'sine 5.5 ml 1 N NaOH ilave edildi ve aynı NaOH kullanılarak pH 12.5-12.7 arasına getirildi. Bu çözeltiye 25, 20, 15, 15 ve 10 ml'lik porsiyonlar halinde kloroform eklendi ve herbirinin ilavesinden sonra 1 dakika çalkalanıp 5 dakika bekletildi. Kloroformlu kısım

100 ml 'lik balon jofeye alındı ve kloroformla hacmine tamamlandı. Çözeltinin UV spektrofotometre ile 275.9 nm ve 310 nm 'de absorbans değerleri ölçüldü ve iki absorbans değeri arasındaki fark tayin için kullanıldı. Sulu kısım ise 100 ml 'lik balon jofeye alındıktan sonra distile suyla hacmine tamamlandı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. İlk birkaç ml atık kabul edildi ve süzüntünün 10 ml 'si diğer bir 100 ml 'lik balon jofeye konuldu. Üzerine 50 ml su ve 0.55 ml % 10 'luk HCl ilave edildikten sonra hacmine distile suyla tamamlandı. Çözeltinin absorbansı 272.7 nm ve 310 nm 'de ölçüldü ve iki absorbans değeri arasındaki fark tayin için kullanıldı. Bulunan bu değerlerin ölçü eğrisindeki karşılıklarına bakılarak kakaodaki kafein ve teobromin miktarları saptandı. Bu yöntemle ilgili sonuçlar bölüm 4. 2. 'de verilmiştir.

### ***3. 3. 1. 3. Türev Spektrofotometrik Yöntem***

Spektrumların çizilmesi ve ölçü eğrilerinin hazırlanmasında Aburjete ve arkadaşlarının (1992) yaptıkları çalışmadan yararlandı.

#### ***3. 3. 1. 3. 1. Spektrumların Çizilmesi***

Kafein ve teobromin karışımının analizinde absorpsiyon (A) ve birinci türev (<sup>1</sup>D) spektrumları 0.1 N NaOH 'a karşı 200-300 nm dalga boyu aralığında, 2 nm band genişliğinde ve normal tarama hızı ile alındı.

#### ***3. 3. 1. 3. 2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması***

Teobromine ait ölçü eğrisinin hazırlanması için sıcak suda hazırlanmış 125 µgml<sup>-1</sup> konsantrasyonunda standart teobromin çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltiden sırayla 1, 2, 3, 4, 5 ml ayrı ayrı 25 ml 'lik balon jofelere konulup 0.1 N NaOH ile hacimlerine tamamlandı. Herbir çözeltinin 1. türev absorbans değerleri (<sup>1</sup>D<sub>245</sub>) okundu. Bu türev değerleri ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu ve eğriye ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

Kafeine ait ölçü eğrisinin hazırlanması için suda hazırlanmış 100 µgml<sup>-1</sup> konsantrasyonunda standart kafein çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltiden sırayla 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml ayrı ayrı 25 ml 'lik balon jofelere konulup 0.1 N NaOH

ile hacimlerine tamamlandı. Herbir çözeltinin 1. türev absorbands değerleri ( $^1D_{251}$ ) okundu. Bu türev değerleri ile bunlara karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu ve eğriye ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

### ***3.3.1.3.3. Kakao Örneklerine Uygulanması***

1 g kakao, mg'ın 1/10'i duyarlılıkta bir erlen içine tartıldı. Üzerine 95 ml su ilave edilerek 5 dakika kaynatıldı. Çözeltiye 4 ml bazik kurşunasetat çözeltisi ilave edildi. Çözelti soğutulduktan sonra kayıp kadar su ilave edildi ve 2000 psI basınçta 15 dakika santrifüjlendi. Berrak kısımdan 50 ml alındı ve üzerine 0.5 g NaHCO<sub>3</sub> ilave edilerek mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Bu çözeltiden 0.5 ml 10 ml'lik balon jöjeye konuldu ve 0.1 N NaOH ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin bölüm 3.3.1.3.1.'deki koşullarda 1. türev spektrumları alındı. Bu spektrumlardan kafein için 251 nm, teobromin için 245 nm'deki  $^1D$  değerleri okundu. Yöntemle ilgili sonuçlar bölüm 4.3.'te verilmiştir.

### ***3.3.1.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografik Yöntem (I)***

Bu çalışmada AOAC (1984)'de önerilen metoddan yararlanıldı. Yöntemde mobil faz olarak metanol : asetik asit : su (20:1:79), detektör olarak UV detektör kullanıldı ve maddeler 280 nm'de belirlendi. Akış hızı 1500 psI basınçta 1 ml/dak.'ya ayarlandı.

#### ***3.3.1.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması***

Kafeinin suda, teobrominin ise sıcak suda 100 µgml<sup>-1</sup> konsantrasyonunda standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 10 µl 3.3.1.4.'deki koşullarda alete enjekte edilerek pik alanları hesaplandı.

#### ***3.3.1.4.2. Kakao Örneklerine Uygulanması***

0.6 g kakao, mg'ın 1/10'i duyarlılıkta tartılarak 100 ml bidistile su (permanganat üzerinden distillenmiş) ile 25 dakika kaynatıldı. 15 dakika 2000 psI basınçta santrifüjlendi ve süzüldü 3.3.1.4.'deki şartlarda 10 µl alete

enjekte edildi. Bu yöntem ile ilgili sonuçlar bölüm 4.4. ' te verilmiştir.

### **3. 3. 1. 5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografik Yöntem ( II )**

Fransa ' da Barry kakao firmasının kullandığı analiz yönteminden yararlanılmıştır ( CRC-MA-47 ). Yöntemde mobil faz olarak fosfat tamponu (pH = 3 ) : asetonitril ( % 85 : % 15 ), detektör olarak UV detektör kullanıldı ve maddeler 272 nm ' de belirlendi. Akış hızı 1000 psİ basınçta 1 ml/dak. ' ya ayarlandı.

#### **3. 3. 1. 5. 1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

Kafein ve teobrominin mobil fazda  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  konsantrasyonunda standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden  $10 \mu\text{l}$  3.3.1.5. ' deki koşullarda alete enjekte edilerek pik alanları hesaplandı.

#### **3. 3. 1. 5. 2. Kakao Örneklerine Uygulanması**

70 mg kakao , mg ' ın  $1/10$  ' i duyarlılıkta tartıldı ve 50 ml mobil faz ile ultrasonik banyoda  $70^{\circ}\text{C}$  ' de 30 dakika kaynatıldı ve süzüldü.  $10 \mu\text{l}$  3.3.1.5. ' deki koşullarda alete enjekte edildi. Bu yöntem ile ilgili sonuçlar bölüm 4. 5. ' te verilmiştir.

### **3. 3. 2. Kafein ve Teobromin Toplamının Analizi**

#### **3. 3. 2. 1. UV Spektrofotometrik Yöntem**

Bu yöntemde kafein ve teobromin , teobromin cinsinden % purin miktarı olarak hesaplandı ( OICCC , 1988 ).

#### **3. 3. 2. 1. 1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

0.1 g teobromin miligramının  $1/10$  ' i duyarlılıkta tartıldı ve 50 ml 2.7 N HCl ile çözülüp 1 litreye distile suyla tamamlandı. Hazırlanan  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  ' lik standart teobromin çözeltisinden 10 ml alınarak 100 ml ' lik balon jöjeye konuldu ve hacmine distile suyla tamamlandı. Çözeltinin absorbanı UV spektrofotometre kullanılarak 272 nm ve 306 nm ' de ölçüldü. Hesaplamalar için iki absorban değeri arasındaki fark kullanıldı.

### **3.3.2.1.2. Kakao Örneklerine Uygulanması**

1 g kakao , mg ' ın 1 / 10 ' i duyarlılıkta bir erlen içine tartıldı. Üzerine 95 ml su ilave edilerek 5 dakika kaynatıldı. Çözeltiye 4 ml bazik kurşunasetat çözeltisi ilave edildi. Çözelti soğutulduktan sonra kaynama sırasındaki kayıp kadar su ilave edildi ve 2000 psI basınçta 15 dakika santrifüjlendi . Berrak kısımdan 50 ml alındı ve üzerine 0.5 g NaHCO<sub>3</sub> ilave edildikten sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Bundan 5 ml 100 ml ' lik balon jojeye konuldu ve üzerine 0.5 ml 2.7 N HCl ilave edilerek hacmine distile suyla tamamlandı. Bu çözeltinin 272 nm ve 306 nm ' de absorbanı ölçüldü. Hesaplamalar için iki absorban değeri arasındaki fark kullanıldı. Bu yöntem ile ilgili sonuçlar bölüm 4. 6. ' da verilmiştir.



#### **4. SONUÇLAR**

##### **4. 1. Kısmi En Küçük Kareler Spektrofotometrik Kalibrasyonu (PLS)**

Kafein - teobromin karışımlarını hazırlamak için kakaoda bulunabilecek teobromin ve kafein miktarları gözönünde tutuldu ve en uygun aralıkta kalibrasyon hazırlandı. Bunun için dokuz çözeltiden ilk üçü  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda kafein ve her biri  $10.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda teobromin , diğer üçü  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  ,  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda kafein ve her biri  $11.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda teobromin , son üçü de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  ,  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda kafein ve  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonunda teobromin içerecek şekilde hazırlandı. Bölüm 3.3.1.1.1. ' deki gibi çalışılarak elde edilen absorbans değerleri ve karşılık gelen karışım konsantrasyonları tablo 4. 1. ' de gösterilmiştir.

##### **4. 1. 1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması ve Diğer Yöntemler ile Kıyaslanması**

Kakaoda kafein ve teobromin miktarları bölüm 3.3.1.1.2. ' de anlatıldığı gibi çalışılarak PLS yöntemi ile tayin edildi. Örneklerin absorbans değerleri tablo 4. 2. ' de , bulunan kafein ve teobromin miktarları ise tablo 4. 3. ' de gösterilmiştir. PLS yönteminin UV spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılması tablo 4. 12.'de HPLC (I) yöntemi ile karşılaştırılması tablo 4. 13. ' de , HPLC (II) yöntemi ile karşılaştırılması tablo 4. 14. ' de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1. PLS yöntemine göre kafein ve teobromin karışımlarına ait kalibrasyon çizelgesi

C ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Dalga Boyu ( $\lambda$ )																			
	217	221	225	229	233	237	241	245	249	253	257	261	265	269	273	277	281	285	289	293
KA	0.695	0.464	0.354	0.307	0.259	0.204	0.167	0.158	0.192	0.258	0.347	0.446	0.541	0.614	0.643	0.609	0.519	0.384	0.226	0.099
TB	0.823	0.561	0.435	0.381	0.327	0.264	0.221	0.208	0.243	0.316	0.410	0.518	0.621	0.699	0.730	0.693	0.594	0.449	0.275	0.135
3	0.888	0.605	0.471	0.415	0.360	0.292	0.245	0.230	0.265	0.341	0.442	0.557	0.667	0.751	0.784	0.744	0.638	0.483	0.298	0.148
1	0.783	0.532	0.412	0.361	0.310	0.249	0.209	0.198	0.234	0.306	0.401	0.509	0.612	0.692	0.722	0.686	0.588	0.443	0.271	0.132
2	0.876	0.599	0.467	0.411	0.355	0.289	0.242	0.228	0.265	0.341	0.443	0.558	0.668	0.752	0.784	0.745	0.639	0.484	0.297	0.148
3	0.953	0.651	0.509	0.449	0.390	0.318	0.268	0.252	0.291	0.372	0.481	0.604	0.722	0.812	0.847	0.806	0.692	0.525	0.326	0.167
1	0.801	0.531	0.402	0.349	0.294	0.231	0.189	0.179	0.218	0.297	0.401	0.519	0.631	0.717	0.751	0.753	0.606	0.451	0.262	0.112
2	0.905	0.609	0.469	0.411	0.352	0.280	0.234	0.220	0.262	0.345	0.457	0.582	0.701	0.793	0.830	0.788	0.674	0.505	0.306	0.146
3	0.980	0.660	0.510	0.448	0.386	0.311	0.257	0.242	0.283	0.371	0.488	0.621	0.746	0.842	0.880	0.836	0.715	0.537	0.326	0.157

KA = Kafein

TB = Teobromin

Tablo 4. 2. Kakao örneklerinin absorpsiyon değerleri

Kakao Örneği*	Dalga Boyu ( $\lambda$ )																			
	217	221	225	229	233	237	241	245	249	253	257	261	265	269	273	277	281	285	289	293
1	0.852	0.567	0.412	0.335	0.265	0.198	0.157	0.147	0.180	0.247	0.333	0.433	0.526	0.598	0.626	0.593	0.499	0.366	0.204	0.073
2	0.737	0.466	0.321	0.248	0.184	0.121	0.083	0.075	0.109	0.175	0.260	0.358	0.449	0.521	0.548	0.517	0.426	0.297	0.141	0.015
3	0.867	0.586	0.434	0.357	0.289	0.223	0.182	0.172	0.205	0.271	0.357	0.454	0.547	0.618	0.645	0.612	0.519	0.386	0.227	0.097
4	0.820	0.538	0.387	0.312	0.246	0.182	0.143	0.134	0.168	0.236	0.322	0.421	0.514	0.586	0.613	0.580	0.487	0.354	0.194	0.063
5	0.822	0.544	0.394	0.319	0.253	0.189	0.148	0.138	0.170	0.235	0.318	0.415	0.506	0.577	0.603	0.571	0.480	0.350	0.192	0.065

Tablo 4. 3. Kakao örneklerinin analizi

Örnek kakao	% KA	% TB
1	0.12	2.140
2	0.14	2.140
3	0.18	2.200
4	0.13	2.040
5	0.16	2.160
$\bar{X}$	0.146	2.136

## 4. 2. UV Spektrofotometrik Yöntem (Kafein-Teobromin Yan yana Analizi İçin)

### 4. 2. 1. Ölçü Eğrileri

Kafein ve teobromine ait ölçü eğrileri 5-25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlandı. Bölüm 3.3.1.2.1. deki gibi çalışılarak elde edilen absorbans değerleri ve ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri değerleri kafein için tablo 4. 4 'de, teobromin için tablo 4. 5 'de, ölçü eğrileri kafein için şekil 4.1. 'de, teobromin için şekil 4.2. 'de gösterilmiştir. Bu ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri kakaoda kafein ve teobromin tayininde kullanılmıştır.

### 4. 2. 2. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması

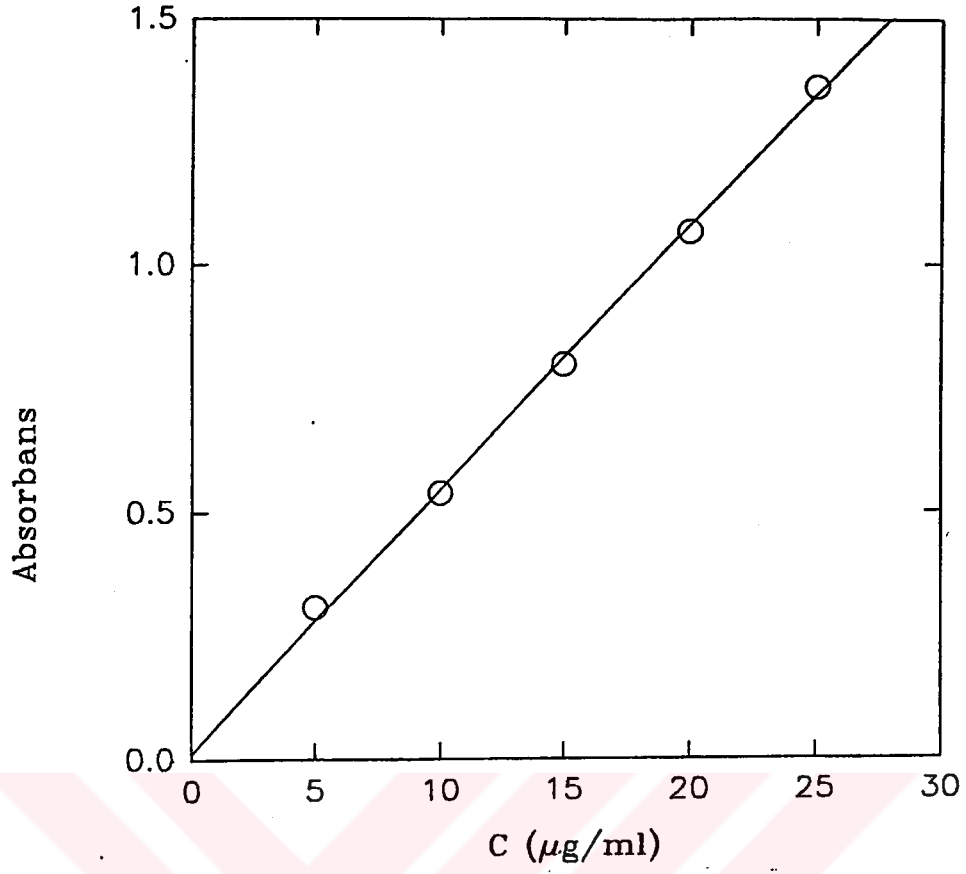
Kakaoda kafein ve teobromin miktarları bölüm 3.3.1.2.2. 'de anlatıldığı gibi çalışılarak UV spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Bu yöntem piyasada bulunan çeşitli kakao örneklerine de uygulandı. Elde edilen sonuçlar tablo 6 'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 4. Kafeinin UV spektrofotometrik yöntem ile tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin absorbans değerleri ve regresyon analizi

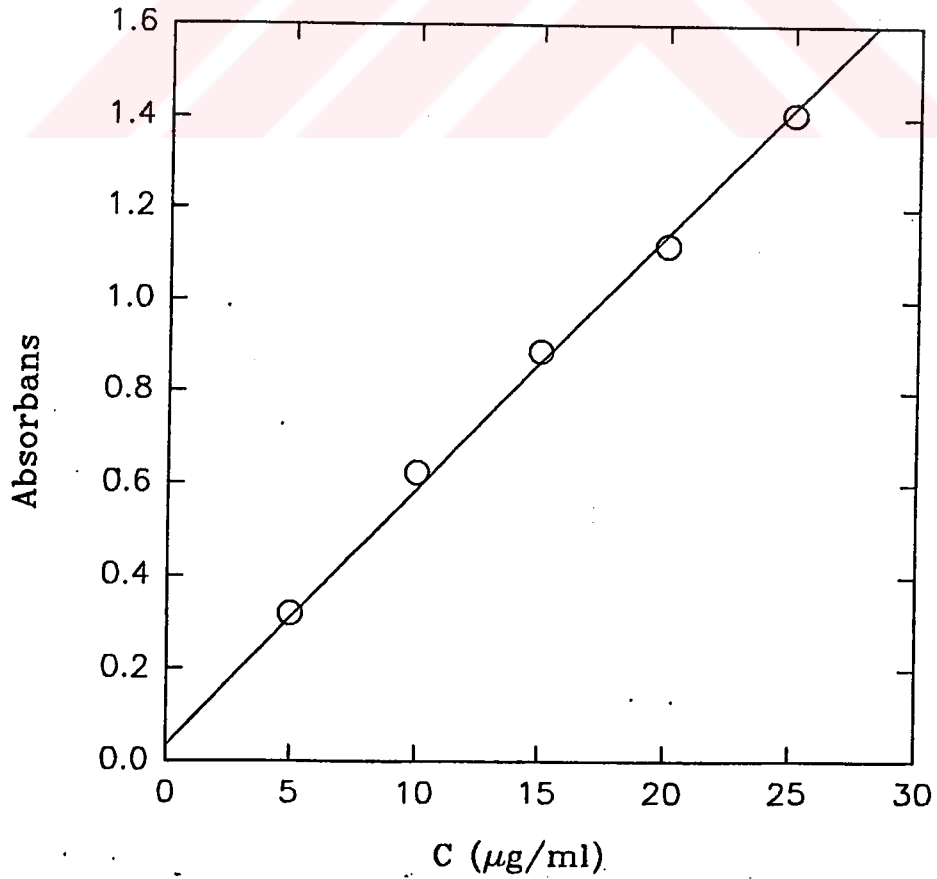
c ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	5	10	15	20	25
A	0.306	0.539	0.798	1.066	1.361
$A = 0.05274 c + 0.0229$					$r = 0.999$

Tablo 4. 5. Teobrominin UV spektrofotometrik yöntem ile tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin absorbans değerleri ve regresyon analizi

c ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	5	10	15	20	25
A	0.319	0.624	0.888	1.119	1.408
$A = 0.05346 c + 0.0697$					$r = 0.999$



Şekil 4. 1. Kafeine ait ölçü eğrisi



Şekil 4. 2. Teobromine ait ölçü eğrisi

Tablo 4. 6. Kakao örneklerinin analizi

Örnek kakao	% KA	% TB
1	0.131	1.92
2	0.121	2.03
3	0.135	1.96
$\bar{X}$	0.129	1.97
Örnek kakao $\bar{z}$	0.135	1.86
Örnek kakao $\bar{y}$	0.155	1.86

$\bar{z}$  = Ülker kakao ile çalışıldı. Sonuçlar üç deneyin ortalamasıdır.  
 $\bar{y}$  = Sagra kakao ile çalışıldı. Sonuçlar üç deneyin ortalamasıdır.

### 4. 3. Türev Spektrofotometrik Yöntem

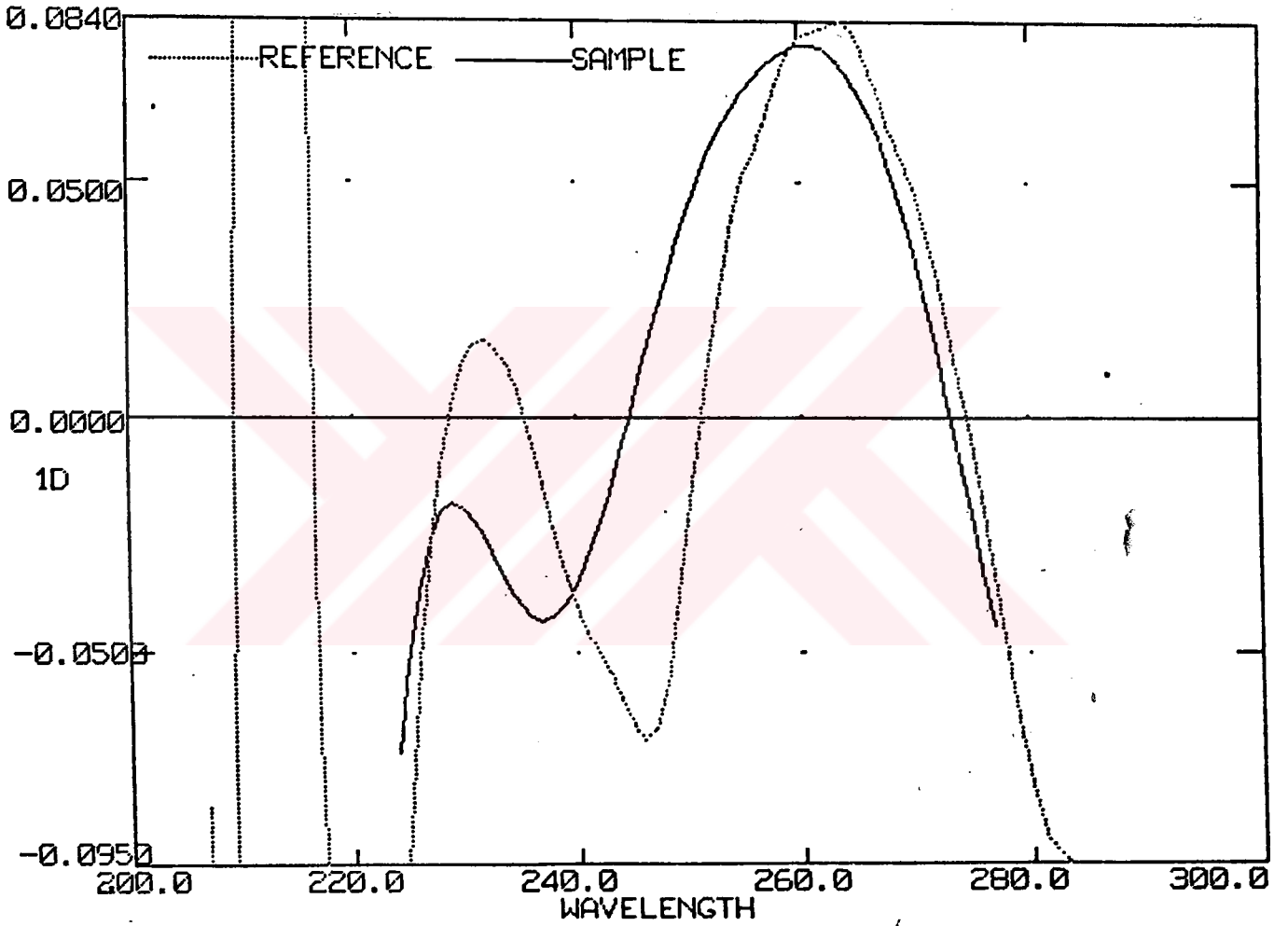
#### 4. 3. 1. Ölçü Eğrileri

Kafein ve teobromine ait ölçü eğrileri kafein için  $2-10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , teobromin için  $5-25 \mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında bölüm 3.3.1.3.2.'deki gibi çalışılarak hazırlandı. Kafein ve teobrominin 0.1 N NaOH 'deki 1. türev spektrumları şekil 4. 3. 'de gösterilmiştir.

Kafein için 1. derece türev spektrumunda  $251 \text{ nm}$  'de okunan 1. derece türev absorbans değerleri ( ${}^1D_{251}$ ) ve ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri tablo 4. 7. 'de, teobromin için 1. derece türev spektrumunda  $245 \text{ nm}$  'de okunan 1. derece türev absorbans değerleri ( ${}^1D_{245}$ ) ve ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri tablo 4. 8. 'de, kafeine ait ölçü eğrisi şekil 4. 4. 'de, teobromine ait ölçü eğrisi şekil 4. 5. 'de gösterilmiştir.

#### 4.3.2. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması

Bu yöntem kakao örneklerine uygulandığında kafein ve teobrominin türev değerleri birbirine çok yakın olması ve kafein miktarının teobromin miktarı yanında çok düşük bulunması nedeniyle iki madde türev spektrumunda ayrılamadı.



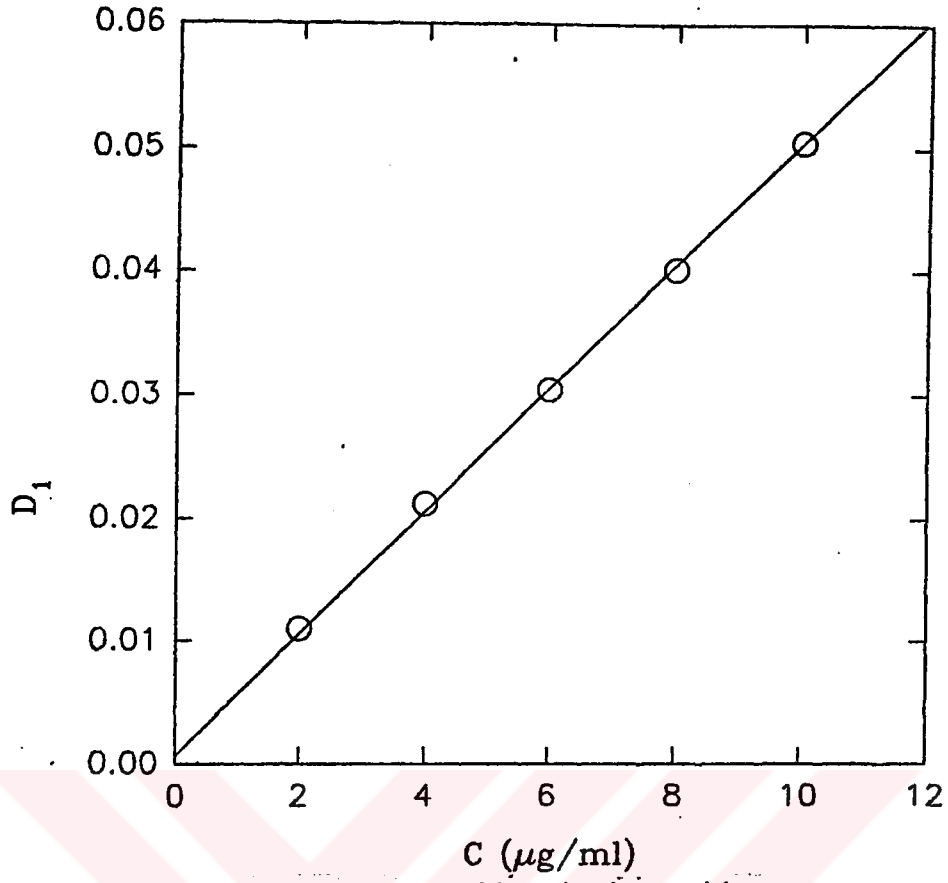
Şekil 4.3. Kafein (—) ve teobrominin (.....) 0.1 N NaOH' daki ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin birinci derece türev absorpsiyon spektrumları

Tablo 4. 4. Kafeinin türev spektrofotometrik yöntem ile tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin absorbans değerleri ve regresyon analizi

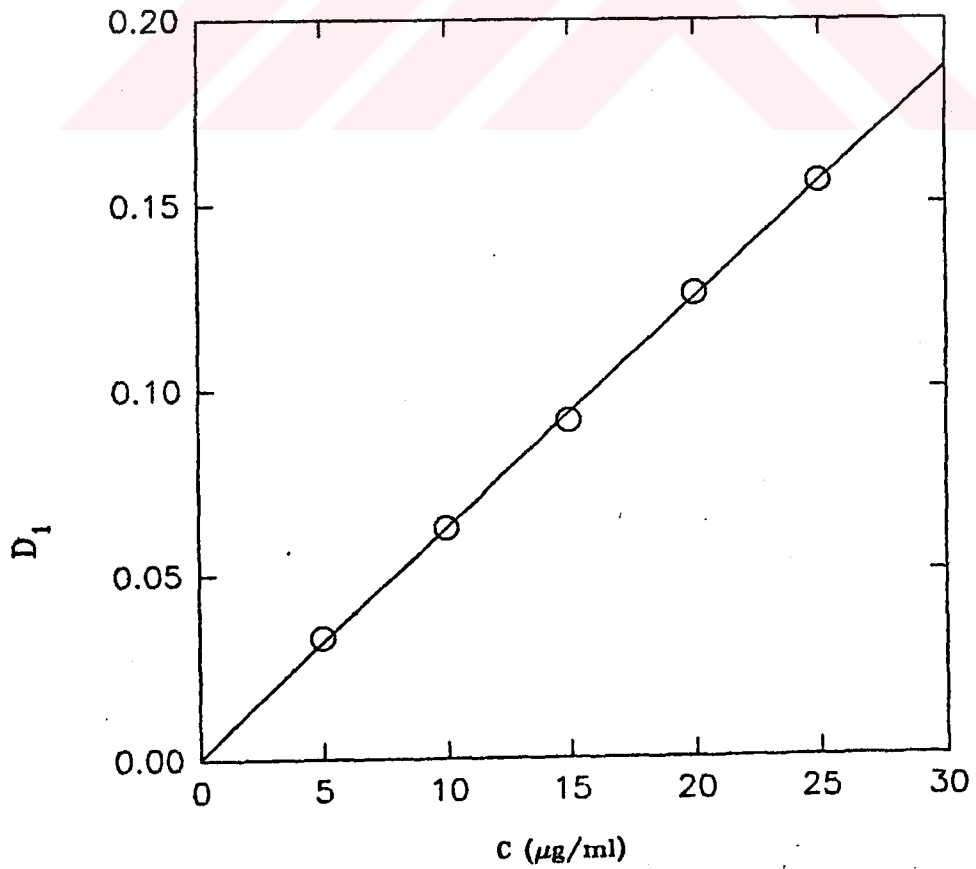
c ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	2	4	6	8	10
$D_1$	0.0110	0.0212	0.0304	0.0401	0.0505
$^1 D_{251} = 0.004895 c + 0.00127$					$r = 0.9998$

Tablo 4. 5. Teobrominin türev spektrofotometrik yöntem ile tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin absorbans değerleri ve regresyon analizi

c ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	5	10	15	20	25
$D_1$	0.0326	0.0627	0.0915	0.1258	0.1561
$^1 D_{245} = 0.006202 c + 0.00071$					$r = 0.9996$



Şekil 4. 4. Kafeine ait ölçü eğrisi



Şekil 4. 5. Teobromine ait ölçü eğrisi

#### 4.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografik Yöntem (I)

##### 4.4.1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması

Bu çalışmada standart çözeltiler bölüm 3.3.1.4.1. 'e göre , kakao örnekleri ise bölüm 3.3.1.4.2. 'e göre hazırlandı ve bölüm 3.3.1.4. 'deki koşullarda ölçümleri alındı. Yöntemle elde edilen sonuçlar tablo 4. 9. 'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 9. Kakao örneklerinin analizi

Örnek kakao	% KA	% TB
1	0.121	2.10
2	0.130	1.98
3	0.135	1.99
4	0.134	2.22
$\bar{X}$	0.130	2.07

#### 4.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografik Yöntem (II)

##### 4.5.1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması

Yapılan çalışmada standart çözeltiler bölüm 3.3.1.5.1. 'e göre , kakao örnekleri ise bölüm 3.3.1.5.2. 'ye göre hazırlandı ve bölüm 3.3.1.5. 'deki koşullarda ölçümleri alındı. Yöntemle elde edilen sonuçlar tablo 4. 10 'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 10. Kakao örneklerinin analizi

Örnek kakao	% KA	% TB
1	0.154	2.145
2	0.160	2.166
3	0.158	2.157
$\bar{X}$	0.157	2.156

#### 4. 6. UV Spektrofotometrik Yöntem (Kafein-Teobromin Toplam Analizi İçin)

##### 4. 6. 1. Yöntemin Kakao Örneklerine Uygulanması

Kakaoda toplam kafein ve teobromin miktarını bulmak için uygulanan bu yöntemde bölüm 3.3.2.1.1. 'deki koşullarda  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  standart teobromin çözeltisi hazırlandı ve UV spektrofotometrik ölçümleri alındı. Kakao örnekleri ise 3.3.2.1.2. 'de belirtildiği gibi çalışıldı ve aynı şekilde ölçümleri alındıktan sonra standart teobromin çözeltisine karşı hesaplamalar yapıldı. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar tablo 4. 11. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 11. Kakao örneklerinin analizi

Örnek kakao	%( KA + TB )
1	2.34
2	2.37
3	2.38
$\bar{X}$	2.36
S	0.0208

Tablo 4. 12. Kakao örneklerinin PLS ve UV Spektrofotometrik yöntemlerle analizi

İstatistik Parametreler	KAFEİN		TEOBROMİN	
	PLS Yöntemi	UV Spektrofotometrik Yöntem	PLS Yöntemi	UV Spektrofotometrik Yöntem
n	%	%	%	%
1	0.12	0.131	2.14	1.92
2	0.14	0.121	2.14	2.03
3	0.18	0.135	2.20	1.96
4	0.13		2.04	
5	0.16		2.16	
$\bar{X}$	0.146	0.129	2.136	1.97
S	0.024	$7.2 \cdot 10^{-3}$	0.059	0.0556
$\bar{X} \pm t \cdot S / \sqrt{n}$	0.116 - 0.175	0.111 - 0.147	2.063 - 2.209	1.832 - 2.108
t testi	1.16 < 2.45		3.93 > 2.45	
F testi	11.11 < 19.25		1.126 < 19.25	
$t_6^{0.05}$ tablo = 2.45				
$n_1 = 5$ $n_2 = 3$ $F_{4,2}^{0.05}$ tablo = 19.25				

PLS yöntemi ve kloroformla ekstraksiyona dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar (t) testi ile ortalamalar, (F) testi ile varyanslar yönünden % 95 güvenilirlik düzeyinde karşılaştırılmıştır. Tablo 4. 12. 'de de görüldüğü gibi hesaplanan F değerleri tablo değerinden küçüktür. Buna göre kakaoda kafein ve teobromin analizinde PLS ve karşılaştırma yöntemi arasında varyanslar yani tekrarlanabilirlik yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Teobromin analizinde hesaplanan t değeri tablo değerinden büyüktür, yani ortalamalar anlamlı derecede farklıdır. Kafein analizinde hesaplanan t değeri ise tablo değerinden küçüktür. Bu da kafein analizi için iki yöntemin ortalamaları arasında anlamlı derecede fark olmadığını gösterir. Kullanılan istatistiksel formüller bölüm 5 'de verilmiştir.

Tablo 4. 13. Kakao örneklerinin PLS ve HPLC (I) yöntemleriyle analizi

İstatistik Parametreler	KAFEİN		TEOBROMİN	
	PLS Yöntemi	HPLC (I) Yöntemi	PLS Yöntemi	HPLC (I) Yöntemi
n	%	%	%	%
1	0.12	0.121	2.14	2.10
2	0.14	0.130	2.14	1.98
3	0.18	0.135	2.20	1.99
4	0.13	0.134	2.04	2.22
5	0.16		2.16	
$\bar{X}$	0.146	0.130	2.136	2.07
S	0.024	$6.37 \cdot 10^{-3}$	0.059	0.112
$\bar{X} \pm t \cdot S / \sqrt{n}$	0.116 - 0.175	0.120 - 0.140	2.063 - 2.209	1.892 - 2.248
t testi	1.43 < 2.57		1.148 < 2.360	
F testi	14.197 > 9.12		3.59 < 6.59	
	$t_5^{0.05}$ tablo = 2.57		$t_7^{0.05}$ tablo = 2.36	
$n_1 = 5$ $n_2 = 4$	$F_{4,3}^{0.05}$ tablo = 9.12		$F_{3,4}^{0.05}$ tablo = 6.59	

PLS yöntemi ve HPLC(I) yöntemi ile elde edilen sonuçlar (t) testi ile ortalamalar, (F) testi ile varyanslar yönünden %95 güvenirlilik düzeyinde karşılaştırılmıştır. Tablo 4. 13 ' de görüldüğü gibi hesaplanan t değerleri tablo değerlerinden küçüktür. Buna göre PLS ve karşılaştırma yöntemi arasında ortalamalar yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Kafein analizinde hesaplanan F değerleri ise tablo değerinden büyüktür, yani iki yöntemin varyansları arasında anlamlı fark vardır. Teobromin analizinde ise hesaplanan F değeri tablo değerinden küçüktür. Bu da teobromin analizi için iki yöntemin varyansları arasında anlamlı derecede fark olmadığını gösterir. Kullanılan istatistiksel formüller bölüm 5 'de verilmiştir.

Tablo 4. 14. Kakao örneklerinin PLS ve HPLC (II) yöntemleriyle analizi

İstatistik Parametreler	KAFEİN		TEOBROMİN	
	PLS Yöntemi	HPLC (II) Yöntemi	PLS Yöntemi	HPLC (II) Yöntemi
n	%	%	%	%
1	0.12	0.154	2.14	2.145
2	0.14	0.160	2.14	2.166
3	0.18	0.158	2.20	2.157
4	0.13		2.04	
5	0.16		2.16	
$\bar{X}$	0.146	0.157	2.136	2.156
S	0.024	$3.055 \cdot 10^{-3}$	0.059	0.0105
$\bar{X} \pm t \cdot S/\sqrt{n}$	0.116 - 0.175	0.149 - 0.164	2.063 - 2.209	2.130 - 2.182
t testi	1.018 < 2.78		0.74 < 2.57	
F testi	61.7 > 19.25		31.6 > 19.25	
	$t_4^{0.05}$ tablo = 2.78		$t_5^{0.05}$ tablo = 2.57	
$n_1 = 5$ $n_2 = 3$	$F_{4,2}^{0.05}$ tablo = 19.25			

PLS yöntemi ve HPLC (II) yöntemi ile elde edilen sonuçlar (t) testi ile ortalamalar, (F) testi ile varyanslar yönünden % 95 güvenilirlik düzeyinde karşılaştırılmıştır. Tablo 4. 14 'de görüldüğü gibi hesaplanan F değerleri tablo değerinden büyüktür. Buna göre kakaoda kafein ve teobromin analizinde PLS ve karşılaştırma yöntemi arasında varyanslar yani tekrarlanabilirlik yönünden anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Ancak hesaplanan t değerleri tablo değerlerinden küçüktür. Bu da kafein ve teobromin analizi için iki yöntemin ortalamaları arasında anlamlı derecede fark olmadığını gösterir. Kullanılan istatistiksel formüller bölüm 5 'de verilmiştir.

### 5. Yöntemlerin Karşılaştırılmasında Kullanılan İstatistiksel Eşitlikler

İki yöntemin tekrarlanabilirliğinin karşılaştırılması için (F) , ortalamaların karşı (t) testinden yararlanır. F testinde iki farklı yöntemin varyansları kıyaslanır.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (1)$$

Eğer  $F < F_{\text{tablo}}$  ise iki yöntemin standart sapması hesaplanır .

$$S = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (2)$$

t değeri ise (3) eşitliğinden bulunur.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad (3)$$

Serbestlik derecesi ,  $n_1 + n_2 - 2$  bağıntısından hesaplandıktan sonra bulunan t değeri tablo değeri ile karşılaştırılır.

Eğer  $F > F_{\text{tablo}}$  ise t değeri ( 4 ) nolu eşitlikten hesaplanır.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(S_1^2 / n_1 + S_2^2 / n_2)}} \quad (4)$$

Bu durumda serbestlik derecesi ( 5 ) nolu eşitlikten bulunur.

$$\text{Serbestlik derecesi} = \left[ \frac{(S_1^2 / n_1 + S_2^2 / n_2)}{\frac{(S_1^2 / n_1)}{n_1 + 1} + \frac{(S_2^2 / n_2)}{n_2 + 1}} \right] - 2 \quad (5)$$

Bulunan t değeri tablo değeriyle karşılaştırılır.

## **6. TARTIŞMA**

Kakao da kafein ve teobromin tayini için spektrofotometrik ve kromatografik çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmada yeni bir yöntem olan kısmi en küçük kareler spektrofotometrik kalibrasyonu ( PLS ) ve literatürdeki diğer analiz yöntemleri kakao örneklerine uygulanmıştır.

Kloroformla ekstraksiyona dayalı UV spektrofotometrik teknik bu çalışmada kullanılan analiz yöntemlerinden biridir. Deneysel çalışmalarda, özellikle kakao örneğinin hazırlanması sırasında kloroformla ekstraksiyon işleminin ve pH ayarının oldukça zaman alması, ekstraksiyon işlemlerinde madde kaybı olasılığı bu tekniğin sakıncalarını oluşturur. Ayrıca bir başka spektrofotometrik yöntem kafein ve teobrominin toplam analizi için uygulanmıştır. Bu yöntemin kakaoda toplam alkaloid analizi için kolay ve hızlı bir teknik olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir yöntemde türev spektrofotometrik teknik olmuştur. 0.1 N NaOH 'daki kafein ve teobromin çözeltilerinin birinci derece türev spektrumundan 245 ve 251 nm dalga boyları her iki maddenin diğerine etkisi olmaksızın ölçülmesine imkan vermiştir. Ancak bu yöntem, kakao örneklerine uygulandığında, kafeinin teobromin yanında oldukça az miktarda olması ve her iki maddenin belirlendiği dalga boylarının birbirine çok yakın olması nedeniyle sonuç vermemiştir.

Uygulanan diğ er yöntemler ise yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemlerdir. Bu yöntemlerin gerek duyarlılığı gerekse doğrudan yapılan ölçümleri ile son derece kullanışlı olduğu görülmüştür. Ancak pahalı çözücü ve aletlerin gerekliliğı, süzme işlemlerinin zaman alıcı olması bu tekniklerin dezavantajlarını oluşturur.

Kafein ve teobrominin fiziksel ve kimyasal olarak birbirine çok benzemesi ve spektrumların üst üste çakışması kısmi en küçük kareler spektrofotometrik kalibrasyon yöntemini kakao örneklerine uygulamamızın başlıca nedenlerini oluşturur. Bu çalışmada kafein ve teobrominin çeşitli çözücülerdeki spektrumları alınmış , hemen hemen hepsinde iki maddenin karakteristik dalga boylarının üst üste çakışması nedeniyle çözücü olarak su seçilmiştir. Kalibrasyon tablosunun oluşturulması için çözelti karışımlarının hazırlanmasında , literatürde belirtilen kakaoda bulunabilecek kafein ve teobromin miktarları göz önünde tutulmuştur. Sonuçta basit bir spektrofotometre ile çalışılması oldukça zor olan kakao örneklerinin analizi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

PLS yöntemi diğ er uygulanan yöntemlerle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. PLS yöntemi ile elde edilen sonuçlar UV spektrofotometrik yöntem ile kıyaslandığında , iki yöntemin tekrarlanabilirlik açısından anlamlı derecede fark olmadığı , sadece teobromin analizi için ortalamaların anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. Bu da ekstraksiyona dayalı yöntemlerde madde kaybının olabileceğini gösterir. PLS yöntemi HPLC yöntemi ile kıyaslandığında ise iki yöntemin arasında tekrarlanabilirlik açısından anlamlı fark olduğu , ancak ortalamalar açısından anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir.

**KAYNAKLAR**

Abrurjete, M. , A. ; El-din, M. , S. , Mahmoud, I. , I. , 1992 , J. Liq. Chromatog., 15(1) , 101-125 .

Bozdoğan , A. , Acar , A. , M. , Kunt , G. , 1992 , Talanta , 39 , 977-979.

Bozdoğan , A. , Acar , A. , M. , Kunt , G. , 1994 , Pharmazie , 49 , 457.

British Pharmacopeia , 1993 , London Her Majesty ' s Stationary Office.

Chauhan , R. , P. , S. , Agarwal , S. , C. , Dwivedi , D. , Dixit Deepa , İman , S. , M. , 1993 , Asian J. Chem. , 5(4) , 805-807. Ref. CA. 120 , 86575x (1994).

Chen, Jiahua, 1991 , Shipin Kexue, 137, 40-43. Ref. CA. 116 , 104573u (1992).

Clarke , E.G.C. , 1986 , Clarke ' s Isolation and Identification of Drugs , The Pharmaceutical Press.

CRC-MA-47 , Barry Cacao , Laboratiire Central , Fransa.

Englis , D. , T. , Miles , J. , W. , 1954 , Anal. Chem. , 26 , 1214-1218.

Florey , K. , 1986 , Analytical Profiles of Drug Substances , 15 , 70-150.

Geladi , P. , Kowalski , B. , R. , 1986(a) , Anal. Chim. Acta , 185 , 1.

Geladi , P. , Kowalski , B. R. , 1986(b) , Anal. Chim. Acta , 185 , 18.

~~Högskolan Agnör, 1988~~  
Geladi , P. , 1988 , J. Chemometrics , 2 , 231. ?

Gerritsma , K. , W. , Koers , J. , 1953 , Analyst ( London ) , 78 , 201-205.

Guyot , B. , Davrieux , F. , Manez , J. , C. , Vincent , J. , C. , 1993 , Colloq. Sci. Int. Cafe , [C.R] , 15(2) , 626-636 Ref. CA. 121 , 7569t (1994).

Harral , I. , 1940 , Analyst (London) , 65 , 408.

Holmes , K. , E. , 1950 , Analyst (London) , 75 , 457-461.

Hurst , W. , J. , Snyder , K. , P. , Martin , R. , A. , 1985 , J. Chromatog. , 318 , 408-411.

Karabina , K. , 1995 , Yıldız Teknik Üniv. , Doktora Tezi.

Kazi , T. , 1985 , Colloq. Sci. Int. Cafe , [C.R.] , 11 , 227-244 Ref. CA. 106 , 48717y (1987).

Keskin , H. , 1959 , Gıdai Kimya . Şirketi Mürettibiye Basımevi

Li , S. , Berger , J. , Hartland , S. , 1990 , Anal. Chim. Acta , 232 , 409-412.

Merck Index , 1989 , Merck and Co. Inc. Rahway N.J. , USA.

Moir , D. , D. , Hinks , E. , 1935 , Analyst (London) , 46 , 32-37.

Moore , R. , G. , Campbell , H. , A. , 1948 , Anal. Chem. , 20 , 40-47.

Official Methods of Analysis , A.O.A.C. , 1984 , Washington , D.C.

OICCC / Number 107 , 1988 , Barry Cacao , Fransa.

Surmeian , Mariana , Georgescu , D. , Cosofret , Vasile , V. , 1994 , Rev. Chim., 45(9) , 823-826 Ref. CA. , 121 , 308481a (1994).

The United States Pharmacopeia , XXII , Revision , 1990 , United States Pharmacopeial Convention , Inc. Rockville Md.

Wadsworth , R. , V. , 1921 , Analyst (London) , 46 , 32-37.

Wang , Mei Ling , Lee , Min Hsiung , 1995 , Zhonggvo Nongye Huaxve Huizhi, 31(1) , 114-123. Ref. CA. , 123 , 8108v (1995).

Xu , Chongfan , Jiang , Shvo Zhao Xvemei , Shang Qingwei , 1993 , Zhongguo Yaovxe Zazhi , 28(8) , 490-492. Ref. CA. , 120 , 62451c (1994).

**ÖZ GEÇMİŞ**

**Doğum Tarihi** : 9 Nisan 1973  
**Doğum Yeri** : Rize  
**İlk Öğrenim** : 1979 - 1984 , Kastomonu Atatürk İlkokulu  
**Orta Öğrenim** : 1984 - 1987 , Kastomonu Merkez Ortaokulu  
**Lise Öğrenimi** : 1987 - 1990 , Kastomonu Abdurrahmanpaşa Lisesi  
**Yüksek Öğrenim** : 1990 - 1994, Yıldız Teknik Üniversitesi  
Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü  
**Yüksek Lisans** : 1994 - , Yıldız Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı  
Analitik Kimya Programı

1994 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım . Halen görevime devam etmekteyim .