
BİYOKİMYA

LABORATUVARI

LABORATUVAR KILAVUZU

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
BÖLÜMÜ

2024-2025 Bahar Dönemi

Dersin Sorumlusu

PROF. DR. Banu MANSUROĞLU

DOÇ.DR. Emel ORDU

DOÇ. DR. Kadriye KIZILBEY

Laboratuvar Yürütücüleri

Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ

Arş. Gör. Hasan Hüseyin GÜLERCAN

HAFTALIK KONULAR

Hafta	Konular	Ön Hazırlık
1	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
2	Çözelti Hazırlanması ve Biyokimyasal Hesaplamalar	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
3	pH Kavramı ve Tampon Çözelti	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
4	Spektrofotometrik yöntem ile standart eğri hazırlama	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
5	Kantitatif Askorbik Asit (C Vitamini) Analizi	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
6	Aminoasitlere özgü reaksiyonlar : Ksantoprotein (Becher) Deneyi, Hopkins-Cole Deneyi	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
7	Proteinlere özgü reaksiyonlar : Bradford Deneyi, Lowry Deneyi	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
8	Ara Sınav 1	
9	Kanda Hemoglobin Tayini	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
10	Bitkilerden pigment izolasyonu: Klorofil ve karotenoid tayini	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
11	In Vivo Biyokimyasal Deneyler İçin Doku Lizatlarının Hazırlanması	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
12	Süperoksit Dismütaz Miktar Tayini Deneyi	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
13	İnce Tabaka Kromatografisi	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
14	Telafi Deney Haftası	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
15	Telafi Deney Haftası	YTÜ MBG Biyokimya Laboratuvar Föyü
16	Final	

2024-2025 Bahar Yarıyılı Biyokimya Laboratuvarı DeneYleri Not Katkı Dağılımı

Hafta	Tarih	Konular	Hazırlanacak Rapor No	Rapor notunun ders notuna katkısı
1	17.02.2025 (Grup 1-2- 3)	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme		
2	24.02.2025 (Grup 1-2- 3)	Çözelti Hazırlanması ve Biyokimyasal Hesaplamalar	1	% 4 (Quiz Notu)
3	03.03.2025 (Grup 1-2- 3)	1.Deneye ait quiz pH Kavramı ve Tampon Çözeltiler	2	% 4
4	10.03.2025 (Grup 1-2- 3)	Spektrofotometrik yöntem ile standart eğri hazırlama	3	% 4
5	17.03.2025	Kantitatif Askorbik Asit (C Vitamini) Analizi	4	% 4
6	24.03.2025 (Grup 1-2- 3)	Aminoasitlere özgü reaksiyonlar : Ksantoprotein (Becher) Deneyi, Hopkins-Cole Deneyi	5	% 4
7	31.03.2025 (Grup 1-2- 3)	Ramazan Bayramı sebebiyle resmi tatil		
8	07.04.2025	Ara Sınav 1		
9	14.04.2025 (Grup 1-2- 3)	Proteinlere özgü reaksiyonlar : Bradford Deneyi, Lowry Deneyi	6	% 4
10	21.04.2025 (Grup 1-2- 3)	Kanda Hemogloblin Tayini	7	% 4
11	28.04.2025 (Grup 1-2- 3)	Bitkilerden pigment izolasyonu: Klorofil ve karotenoid tayini	8	% 4
12	05.05.2025 (Grup 1-2- 3)	In Vivo Biyokimyasal Deneyler İçin Doku Lizatlarının Hazırlanması ve Süperoksit Dismütaz Miktar Tayini Deneyi	9	% 4
13	12.05.2025 (Grup 1-2- 3)	İnce Tabaka Kromatografisi	10	% 4
14	19.05.2025 (Grup 1-2- 3)	Atatürk'ü Anma, Gençlik ve Spor Bayramı sebebiyle resmi tatil		
15	26.05.2025 (Grup 1-2- 3)	Telafi Deneyleri		



LABORATUVARDA ÇALIŞMA KURALLARI

Çalışmalarınızı etkili ve başarılı bir şekilde yürütebilmek için laboratuvarda çalışma kurallarını bilmeniz, laboratuvar araçlarını tanımanız ve onları en verimli şekilde kullanmanız, bunun için gerekli beceriyi kazanmanız gerekmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında uyulması gereken başlıca kuralları şöyle sıralayabiliriz:

1. Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
2. Mutlaka laboratuvar önlüğü giyiniz. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız.
3. Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
4. Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
5. Kullandığınız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
6. Steril metod gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
7. Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz
8. Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru kaplara doğru şekillerde atınız.
9. Laboratuvarında bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız.
10. Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
11. Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken kapların ağzını hemen kapatınız.
12. İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.
13. Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
14. Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.
15. Bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığımız işlemleri, elde ettiğiniz verileri bu deftere kaydediniz. Deneylerin sırasını, başlığını, amacını, gereçlerini, gözlem ve ölçmelerini, yorumunu, varılan sonuç ve genellemeleri yazınız. Gerekli durumlarda bulgularınızı çizim ve tabloya dönüştürünüz.

ÖRNEK RAPOR KAPAĞI TASARIMI

	<p>YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ MBG BİYOKİMYA LABORATUVARI SONUÇ RAPORU 2024-2025 BAHAR</p>	
---	---	---

Kanda Hemoglobin Tayini

DENEY SORUMLUSU Öğretim Üyesi:

DENEY SORUMLUSU Araştırma Görevlisi:

RAPOR TESLİM TARİHİ:

DENEY GRUBU:

Öğrencinin Adı – Soyadı	Öğrencinin Numarası	Öğrencinin İmzası

Laboratuvar Raporu Değerlendirme Őeması

Rapor Kısmı	Değerlendirme Puanı
Kapak Tasarımı	5
Amaç	5
Giriş	20
Materyal-Metod	10+10 (Çözelti hesaplanması ve Biyokimyasal Hesaplamalar)*
Deney Verileri ve Çizim	10
Sonuç ve Tartışma	30
Kaynakça	10

* Materyal-metod kısmında çözelti hazırlanması gereken deneyler için; çözelti hesaplamaları deney sırasında deney grupları tarafından yapılacak ve 10 puan üzerinden değerlendirilecektir. Hesaplamaları yapamayan grupların raporları 90 üzerinden değerlendirilecektir.

Dönem Sonu Not Değerlendirme Dağılımı

Laboratuvar Raporu	% 40 (Her bir rapor %4)
Ara sınav	%20
Final	%40

1.HAFTA: Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme

Dersin Değerlendirilme Sistemi:

Dersin değerlendirilmesinde 1 ara sınav, 1 final yapılacak ve her hafta grupça yazılan deney raporları 2. ara sınav yerine geçecektir.

1. Ara Sınav: %20
 2. Ara Sınav (Haftalık deney raporlarının ortalamaları): %40
- Final: %40

oranlarında yıl sonu notuna etki edecektir. Her rapor %4 oranda etki yapacaktır ve toplamda 10 rapor yazılacaktır.

Derse %80 devam zorunluluğu bulunmaktadır.

Çalışmalarınızı etkili ve başarılı bir şekilde yürütebilmek için laboratuvarında çalışma kurallarını bilmeniz, laboratuvar araçlarını tanımanız ve onları en verimli şekilde kullanmanız, bunun için gerekli beceriyi kazanmanız gerekmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında uyulması gereken başlıca kuralları şöyle sıralayabiliriz:

16. Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
17. Laboratuvarında mutlaka beyaz, uzun ve temiz bir önlük giyilmeli, önlüğün önü kapalı olacak şekilde çalışılmalıdır. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız. Çalışmayı engelleyecek ve tehlike oluşturabilecek takı ve aksesuarlar çıkarılmalıdır.
18. Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
19. Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
20. Kullandığımız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
21. Steril metot gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
22. Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz. Ellerde kesik, yara vb durumlar varsa bunların üzeri güzelce kapatılıp sarılmalı veya daha sonra çalışılmalıdır.
23. Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru atık kutularına atınız.
24. Laboratuvarında bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız. Sakız çiğnenmemeli, sigara içilmemeli, çalışırken eller yüze, göze, ağza temas ettirilmemelidir.
25. Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
26. Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken kapların ağzını hemen kapatınız.
27. İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.

28. Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
29. Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.
30. Bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığınız işlemleri, elde ettiğiniz verileri bu deftere kaydediniz. Deneyleerin sırasını, başlığını, amacını, gereçlerini, gözlem ve ölçmelerini, yorumunu, varılan sonuç ve genellemeleri yazınız. Gerekli durumlarda bulgularınızı çizim ve tabloya dönüştürünüz.

2. HAFTA: Çözelti Hazırlanması ve Biyokimyasal Hesaplamalar

İki veya daha fazla maddenin meydana getirdiği homojen karışımlara “**çözelti**” denir. Çözeltilerdeki dağılım ortamına çözücü veya çözen, dağılan maddeye de çözünen adı verilir. Bir maddenin çözünürlüğü bir çözücü içerisinde belli sıcaklık ve basınçta çözünen maksimum miktarına göre belirlenir. Katı veya sıvı bir maddenin çözünürlüğü 100 gr çözücü içinde çözünen maddenin gram cinsinde ağırlığı cinsinden ifade edilir. Çözünen madde miktarı az ise çözelti seyreltik çözelti, çok ise konsantre (derişik) çözelti adını alır.

Çözücünün çözebileceğinden daha az madde içeren çözeltilere doymamış çözeltiler denir. Eğer madde çözünürlük sınırına kadar çözülmüş ise, böyle çözeltilere doymuş çözelti denir.

Çözücü ve çözüne göre kimyada en çok kullanılan çözeltiler şunlardır:

- **Sıvı içinde sıvı:** Su-alkol çözeltisi
- **Sıvı içinde katı:** Tuzlu su çözeltisi
- **Sıvı içinde gaz:** Sulu amonyak çözeltisi

Herhangi bir çözelti için belirli miktar çözücüde çözülmüş madde miktarına -derişim (konsantrasyon) denir ve “C” ile gösterilir.

$$C = \frac{m_{\text{Çözünen}}}{V_{\text{Çözelti}}}$$

Burada;

C = Çözeltinin derişim

$m_{\text{Çözünen}}$ = Çözünen miktarı

$V_{\text{Çözelti}}$ = Çözünen + çözücü miktarıdır.

Derişim çeşitleri hacim, kütle ve mol bazında olmak üzere gruplandırılır.

Hacim Bazındaki Derişimler:

- Molarite (M),
- Normalite (N),
- Hacimce -kütlece yüzde

Kütle Bazındaki Derişimler:

- Kütlece yüzde
- Molalite (M),
- Milyonda (ppm),
- Milyarda (ppb)

Mol Bazındaki Derişimler:

- Yüzde mol
- Mol kesri (daha çok fizikokimyasal büyüklükler için kullanılır)

Molar Çözeltiler

Litresinde 1 mol madde bulunan çözeltilere “**molar çözeltiler**” denir.

Molarite, 1 litre (1000 cm³=1000ml) çözeltide çözünen maddenin mol sayısıdır. Molarite M; çözünenin mol sayısı

n ve çözeltinin hacmi V, olmak üzere,

$$M = \frac{\text{Çözünenin mol sayısı}}{\text{Çözeltinin hacmi}} = \frac{n}{V \text{ (L)}} \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Örneğin; 1 M (veya 1 molar) sodyum klorür çözeltisi demek, bir litre çözeltide 1 mol yani 58,44 g NaCl bulunuyor demektir. Söz konusu NaCl çözeltisinin derişimi, 1 M, mol/L veya 1 molar terimlerinden herhangi biri ile ifade edilir.

Molal (m) Çözeltiler

1000 gram çözücüde, çözülmüş maddenin mol sayısına denir ve m ile gösterilir. Molariteden en önemli farkı, çözücü ve çözünen miktarlarının bilinmesi fakat çözelti hacminin bilinmemesidir. Örneğin 3 molal NaOH çözeltisi, 1000 gram suda 3 mol ($3 \times 40 = 120$ g) NaOH çözümlenmesiyle hazırlanmış çözeltidir.

$$m = \frac{\text{Çözünen maddenin miktarı (mol)}}{\text{çözücü miktarı (kg)}}$$

Örnek: 120 g suda (120 ml suda) 12 g NaOH çözülmüştür. Bu çözeltinin molalitesi nedir?

$$12 \text{ g NaOH} = (12/40) = 0,3 \text{ mol NaOH}$$

$$m = \frac{\text{çözünen madde (mol)}}{\text{çözücü (kg)}}$$

$$120 \text{ ml su} = 120 \text{ g su} = 0,120 \text{ kg su}$$

$$m = \frac{0,3}{0,120} = 2,5 \text{ molal}$$

Normalite (N)

1 litre çözeltideki çözünen maddenin eşdeğerlik sayısı cinsinden ifadesine denir ve N ile gösterilir. Bu tür çözeltilerin hazırlanmasında eşdeğer kütlelerin hesaplanması önemli kısmını oluşturur.

Eşdeğer ağırlık ise, molekül kütlelerinin tesir değerliğine (valans) bölünmesiyle hesaplanır.

$$\text{Eşdeğer gram sayısı} = \frac{\text{(Çözünen) Maddenin Kütlesi (m)}}{\text{Eşdeğer ağırlık (Ekivalen gram)}}$$

$$\text{Eşdeğer ağırlık (Ekivalen gram)} = \frac{\text{Molekül Kütlesi (M}_A\text{)}}{\text{Tesir (Etki) Değerliği (Valans) (t)}}$$

Tesir Değerliği (t): Asitlerin ortama verdiği H^+ iyonu sayısı, bazların ortama verdiği OH^- iyonu sayısına tesir değerliği denir.

Örneğin, HCl, HNO_3 , CH_3COOH gibi tek H^+ iyonu içeren **asitlerle** NaOH, KOH gibi tek OH^- iyonu içeren bazlarda, ekivalen ağırlık formül ağırlığına eşittir (etki değeri 1). H_2SO_4 ise iki H^+ iyonu içerdiğinden, ekivalen ağırlık formül ağırlığının yarısına eşittir (etki değeri 2).

Tuzlarda ise tesir değerliği ortama verilen ya da ortamdan alınan elektron sayısına eşittir. Örneğin NaCl, $AgNO_3$ gibi tuzlarda ekivalen ağırlık formül ağırlığına eşittir (etki değeri 1). $BaCl_2$, $MgSO_4$ gibi tuzlarda ise, ekivalen ağırlık formül ağırlığının yarısına eşittir (etki değeri 2).

Örnek: 100 ml derişik H₂SO₄ (%98'lik, d=1,84) 500 ml'ye seyreltilmiştir. Bu çözeltinin normalitesi nedir?
Önce 100 ml derişik sülfürik asitte kaç gram saf H₂SO₄ bulunduğunu hesaplanır ve 108,32 g olarak bulunur.

$$d = \frac{M}{V} \rightarrow M = d \cdot V$$

$$M = 1,84 \times 100 = 184 \text{ g}$$

$$\frac{100}{98} = \frac{184}{X} \Rightarrow X = 180,32 \text{ g saf H}_2\text{SO}_4$$

Sülfürik asit suya 2 hidrojen verir. Dolayısıyla etkin değeri 2'dir. Mol kütlesi ise 98'dir. Buna sülfürik asidin eşdeğer kütlesi 98/2=49 g olur. Bu durumda çözünen maddelerin eşdeğerlik sayısı (180,32 /49) =3,68, normalitesi ise (3,68 / 0,5)= 7,36 N olur.

Yüzde Derişim

Çözeltinin 100 biriminde çözünen madde miktarına denir ve % işareti ile gösterilir. Ağırlıkça yüzde hacimce yüzde ve hacim - ağırlıkça yüzde olmak üzere üç şekilde ifade edilebilir.

Ağırlıkça yüzde

100 Ağırlık birimi (g, kg, mg, ton vb. olabilir) çözeltide kaç ağırlık birimi çözünen olduğunu gösterir. Aşağıdaki eşitlik ile,

$$\text{Ağırlık yüzdesi} = \frac{\text{Çözünenin ağırlığı}}{\text{Çözeltinin ağırlığı}} \times 100 \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Örneğin ağırlıkça % 20'lik sodyum klorür çözeltisi demek 100 gram sodyum klorür çözeltisinin içinde 20 g katı sodyum klorür var veya 100 kg NaCl çözeltisinin içinde 20 kg katı NaCl var demektir.

Hacimce yüzde

100 Hacim birimi (mL, L, m³, vb. olabilir) çözeltide kaç hacim birimi çözünen olduğunu gösterir. Aşağıdaki eşitlik ile,

$$\text{Hacim yüzdesi} = \frac{\text{Çözünenin hacmi}}{\text{Çözeltinin hacmi}} \times 100 \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Örneğin hacimce % 40'lik alkol çözeltisi demek, 100 ml alkol çözeltisinin içinde 40 ml saf alkol var veya 100 L alkol çözeltisinin içinde 40 L saf alkol var demektir.

Hacim - ağırlıkça yüzde

100 Hacim birimi çözeltide kaç ağırlık birimi çözünen olduğunu gösterir. Aşağıdaki eşitlik ile,

$$\text{Ağırlık-Hacim yüzdesi} = \frac{\text{Çözünenin ağırlığı}}{\text{Çözeltinin hacmi}} \times 100 \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Katı maddenin sudaki çözeltileri için bu derişim ifadesi kullanılır.

Örneğin hacim ağırlıkça %20'lik sodyum klorür çözeltisi demek 100 ml NaCl çözeltisinde 20 g NaCl var veya 100 litre NaCl çözeltisinde 20 kg NaCl var demektir. Burada çözeltinin miktarı hacim biriminden, çözünen maddenin miktarı ise ağırlık biriminden ifade edilmelidir.

Mol Kesri

Çözeltideki bir bileşenin mol sayısının, toplam mol sayısına oranı, o bileşenin *mol kesri* olarak tanımlanır ve X ile gösterilir.

Örneğin A,B,C ... bileşenlerinden oluşan bir çözeltideki,

$$\text{A bileşeni için mol kesri, } X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B + n_C + \dots}$$

$$\text{B bileşeni için mol kesri, } X_B = \frac{n_B}{n_A + n_B + n_C + \dots} \text{ şeklinde yazılır.}$$

Çözeltideki bileşenlerin **mol kesirleri toplamı birdir** ve $X_A + X_B + X_C + \dots = 1$ olarak ifade edilebilir.

PPM ve PPB Çözeltiler

Bazen çok hassas analizlerde derişimler o kadar küçük olur ki birim olarak “ppm” veya “ppb” kullanılır.

Milyonda (ppm): Milyonda parça anlamında (ppm, İngilizce part per million kelimelerinin kısaltılmış şekli) bir derişim birimidir.

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünenin mg miktarı}}{\text{Çözelti kg miktarı}}$$

Örneğin, 2 ppm Hg⁺² (civa) çözeltisi denildiğinde; 1 kg su örneğinde 2 mg civa bulunduğu anlaşılır.

$$\frac{2 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} = \frac{2 \text{ mg}}{10^6 \text{ mg}} = 2 \text{ ppm} \text{ şeklinde yazılır.}$$

Çok seyreltik çözeltilerde; 1 kg çözeltinin hacmi, (suyun yoğunluğu 1g/ml = 1 kg/litre olduğundan) bir litredir.

Buna göre çözeltilerde bu birim,

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünenin madde miktarı}}{\text{Çözeltinin madde miktarı}} \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Örneğin, 20 ppm Fe, 1 litre çözeltide 20 mg Fe⁺² bulunuyor anlamındadır.

Milyarda (ppb): çok küçük derişimler için kullanılan diğer bir derişim birimidir. **ppb**, (İngilizce parts per billion kelimelerinin kısaltılmışı) kullanılır. Milyarda parça anlamına gelen ppb; litre çözücüde çözünen miktarının mikrogram cinsinden ifadesidir.

Buna göre;

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünenin mg miktarı}}{\text{Çözeltinin ton miktarı}}$$

Veya

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünenin ml miktarı}}{\text{Çözeltinin m}^3 \text{ miktarı}}$$

Çözeltilerin Seyreltilmesi

Çözeltiler genellikle derişimi bilinen **stok** çözeltilerinden hazırlanır. Bunun için stok çözeltiden hesaplanarak alınan çözeltiler, istenen hacme göre seçilmiş balon jöjeye alınır ve üzerine hacmi belirten çizgiye kadar çözücü eklenir. Bu şekilde başlangıçtaki derişimden daha seyreltik çözeltiler hazırlanmış olur.

Seyreltme hesapları, stok çözeltiden alınan çözünen mol sayısı ile seyreltik çözeltideki çözünenin mol sayısının aynı olması esasına dayanır ve (stok derişimi) x (stok hacmi) = (istenen derişim) x (istenen hacim) şeklinde ifade edilir. Burada eşitliğin her iki tarafında derişim ve hacim birimlerinin aynı olmasına dikkat edilmelidir. Çoğu derişimler molarite ve normalite ile ifade edildiğinden,

Kısaca $M_1V_1 = M_2V_2$ veya $N_1V_1 = N_2V_2$ şeklinde yazılabilir.

N_1, M_1, V_1 normalite, molarite ve hacmin **ilk** değerleri, N_2, M_2, V_2 ise normalite, molarite ve hacmin **son** değerleridir.

MATERYAL VE METOD:

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Hassas terazi, Spatül, Distile su, Tartım kabı, Piset, Mezür, 100 ml'lik erlen, 100 ml'lik çözeltiler şişesi, Manyetik karıştırıcı

Deneyin Yapılışı:

Hacimce %70'lik 50 ml alkol çözeltileri hazırlanması:

1. Çözünen madde miktarını uygun eşitlikleri kullanarak bulunuz.
2. Hesapladığımız miktar kadar alkolü mezür ile ölçünüz.
3. Pisetle bir miktar saf su ekleyip alkolün çözünmelerini sağlayınız
4. Alkol tamamen çözüldükten sonra piset yardımıyla toplam hacmi 50 ml'ye tamamlayınız

50 ml 2M NaOH çözeltilerinin hazırlanması:

1. Çözünen madde miktarını uygun eşitlikleri kullanarak bulunuz.
2. Hesapladığımız miktar kadar NaOH'i hassas terazide tartınız
3. NaOH'i erlene aktarınız.
4. Üzerine 50 ml su ilave ediniz.
5. Manyetik karıştırıcı homojen hale gelene kadar karıştırınız.
6. Çözeltilerinizi temiz ve kuru olan uygun çözeltiler şişesine aktarınız.

50 ml 1M HCl çözeltilerinin hazırlanması:

1. Hesaplanan miktarda asit çözeltileri 50 ml su üzerine ilave edilir.
2. Homojen hale gelene kadar karıştırılır.
3. Çözeltiler temiz ve kuru olan uygun çözeltiler şişesine aktarılır.

3. HAFTA: pH Kavramı ve Tampon Çözelti

pH ve Tampon Çözelti Kavramı

pH ilk kez 1909 da Sorensen tarafından hidrojen iyonu molar konsantrasyonunun negatif logaritması olarak tanımlandı.

$$pH = \log [H^+]$$

veya

$$[H^+ = 10^{-pH}]$$

25° C da saf su için

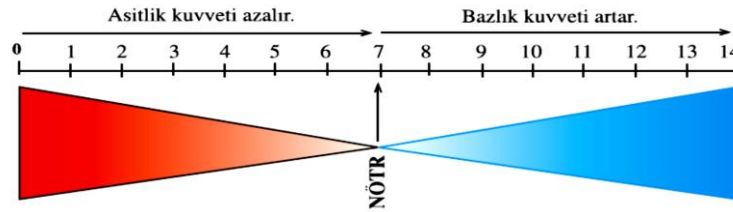
$pH = -\log [H^+] = -\log 10^{-7} = -(-7) = 7$ 'dir.

pH değeri düştükçe $[H^+]$ artar, pH değeri arttıkça $[H^+]$ düşer. Asitler proton verici, bazlar proton alıcıdır. Kuvvetli asitler (HCl, H₂SO₄) çözeltilerinde tamamen iyonlaşmış durumdadırlar. Zayıf asitler ise çözeltilerinde kısmen iyonlaşmış durumdadırlar. Aynı durum bazlar için de geçerlidir. Vücut sıvılarının çoğu zayıf asittir.

pH Metre:

Asit ya da bazların kuvveti pH değerleriyle tanımlanabilir. Maddelerin asitliğini ya da bazlığını gösteren ölçüğe pH metre denir. pH metre 0'dan 14'e kadar değer alır (Şekil 3.1).

Buna göre çözeltiler pH metrede aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 3.1 pH Asitlik-Bazlık Kuvveti

Aşağıdaki tabloda bazı maddelerin pH değerleri verilmiştir (Şekil 3.2).

MADDE	pH
1M HNO ₃	0
Mide suyu	1,0-3,0
Limon suyu	2,4
Sirke	3,0
Portakal suyu	3,5
Domates	4,0- 4,4
İdrar	5,0-7,0
Tükürük	7,0-7,5

Hava ile temas etmemiş saf su	7
Kan	7,35 - 7,45
Gözyaşı	7,4
Deniz suyu	8,5- 10,0
Ev temizliği için kullanılan amonyak	11,5
1 M NaOH çözeltisi	14

Şekil 3.2 Bazı maddelerin pH değerleri

Asit ve Bazların Kuvveti

Asitlerin kuvveti iyonlaşma yüzdelere bağlıdır. İyonlaşma yüzdesi arttıkça asitlik kuvveti artar. Bir asidin iyonlaşma yüzdesi, asitlik hidrojeninin moleküle bağlanma kuvveti ile ilişkilidir. Asitlik hidrojeninin moleküle bağlanma kuvveti ne kadar zayıf ise, molekülden o kadar kolay ayrılabilir (iyonlaşabilir). Suda çözüldüklerinde %100 ya da %100'e yakın iyonlaşabilen asitlere kuvvetli asit denir. Suda çözüldüklerinde çok az iyonlaşabilen asitlere zayıf asitler denir. Kuvvetli bir asit olan HCl, çözeltisinde tamamen iyonlaştığı için H⁺ molar konsantrasyonu HCl molar konsantrasyonuna eşittir. Kuvvetli bir baz olan KOH çözeltisinde de OH⁻ molar konsantrasyonu KOH molar konsantrasyonuna eşittir.

Asit ve bazın tepkimesi sonucunda ortamın nötr, asidik ya da bazik olduğunu anlamak için indikatör denen maddeler kullanılır. İndikatörler ortamın asidik ya da bazik oluşuna göre renk değiştirebilen maddelere denir. İndikatörler farklı pH değerlerinde çözeltiye farklı renkler verirler. Örneğin; pH'sı 6,6 - 8,2 olan bir çözeltiye fenol kırmızısı ilâve edilirse, çözelti portakal rengini alır. Çözeltinin pH'sı 6,6'dan küçük ise çözelti sarıya dönüşür.

Aşağıdaki tabloda bazı asit baz belirteçleri ve etkili olduğu pH aralıkları verilmiştir.

Belirteç (indikatör)	Renk		pH aralıkları
	Asitte	Bazda	
Timol mavisi	Kırmızı	Sarı	1,2 - 2,8
Metil oranj	Oranj	Sarı	3,1 - 4,4
Metil kırmızısı	Kırmızı	Sarı	4,2 - 6,3
Bromtimol mavisi	Sarı	Mavi	6,0 - 7,6
Kresol kırmızısı	Sarı	Kırmızı	7,2 - 8,8
Fenolftalein	Renksiz	Pembe kırmızı	8,3 - 10,0

Asit-Baz Titrasyonları, Nötrleşme

Nötrleşme

Asit ve bazların tepkimeye girerek tuz ve su oluşturmaları olayına nötrleşme denildiğini

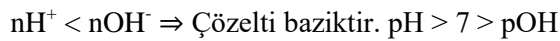
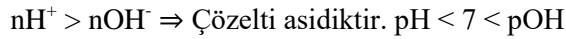
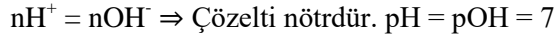
Nötrleşmenin temelinde asitten gelen H⁺ iyonu ile bazdan gelen OH⁻ iyonunun birbirlerinin etkilerini yok ederek

H₂O'yu oluşturmaları yatar.



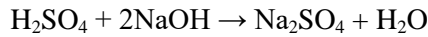
Asitlik Bazlık Nötr

Yukarıdaki denklemden de anladığımız gibi 1 mol H⁺ iyonu 1 mol OH⁻ iyonu ile tamamen birleşerek 1 mol su oluşturur. Bu durumda karıştırılan çözeltilerden gelen H⁺ iyonu ile OH⁻ iyonu sayısı, ortamın asitliği ya da bazlığını belirtir.



Örnek: 0,5 M 400 mL NaOH çözeltisini tamamen nötrleştirebilecek 500 mL H₂SO₄ çözeltisinin molar derişimi kaçtır?

Çözüm: Önce H₂SO₄ ile NaOH arasındaki nötrleşme tepkimesini yazalım.



Denkleme göre, 1 mol H₂SO₄ 2 mol NaOH ile tamamen nötrleşir. Elimizdeki NaOH'ın mol sayısı

$$n_{NaOH} = M_{NaOH} V_{NaOH} \Rightarrow n = 0,5 \times 0,4 = 0,2 \text{ mol'dür.}$$

1 mol H₂SO₄ 2 mol NaOH ile nötrleşirse

x 0,2

x = 0,1 mol H₂SO₄ ile nötrleşir.

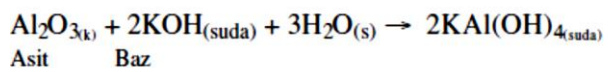
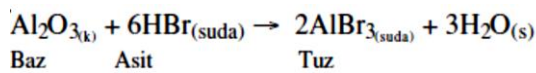
$$V_{H_2SO_4} = 500 \text{ mL} \quad n_{H_2SO_4} = M_{H_2SO_4} V_{H_2SO_4}$$

$$M_{H_2SO_4} = \frac{0,1}{0,5} = 0,2 \text{ mol/L}$$

Amfoterlik

Asitler karşısında baz, bazlar karşısında asit gibi davranabilen maddelere amfoter madde denir. Amfoter oksitler hem asidik hem de bazik özellik gösterebilen oksit bileşikleridir. Al₂O₃, ZnO, BeO ve Bi₂O₃ amfoter özellik gösterir.

Aşağıda Al₂O₃ (Alüminyum oksit)in asit ve baz karşısındaki davranışı verilmiştir.

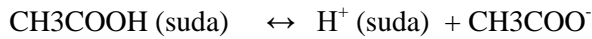


Tampon Çözeltiler

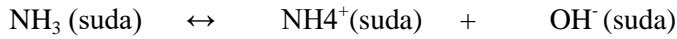
Tampon çözeltiler pH'sı belli olan seyrelmeyle veya az miktarda kuvvetli asit veya baz ilavesi ile pH sı değişmeyen çözeltilere denir. Bu nedenle biyokimyasal reaksiyonlarda hayati bir önem taşırlar. Organizmalarda pH değerinin çok az değişmesi bile hayatı tehdit eder. Dolayısıyla bütün organizmalar uygun bir metabolizma sağlamak için doğal olarak tamponlanmışlardır.

Tampon çözeltiler zayıf bir asit ile bu asidin kuvvetli bazdan oluşmuş tuzunu ya da zayıf bir baz ile bu bazın kuvvetli asitten oluşmuş tuzunu bir arada bulunduran çözeltilerdir.

Örnek:



Zayıf Asit Konjuge Baz

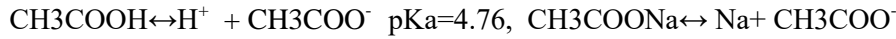


Zayıf Baz Konjuge asit

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \text{Log} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (\text{Handerson-Hasselbach Eşitliği})$$

$$[\text{HA}]$$

Örnek: pH sı 5.06 olan 0.15 M Sodyum Asetat (CH_3COONa) tampon çözeltisinin kompozisyonu nedir?



$$5.06 = 4.76 + \text{Log} \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

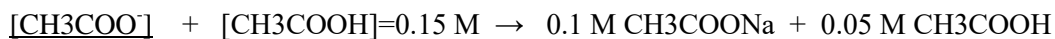
$$[\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$0.3 = \text{Log} \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$2 = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}]$$



Sonuç olarak 0.5 litre 0.1 M CH_3COONa ve 0.5 litre 0.05 M Asetik Asit karıştırılırsa 1 litre 0.15 M pH 5.06 Asetat tampon çözeltisi elde edilir.

Tampon Kapasitesi

Bir tampon çözeltinin, pH'ında fazla değişme olmadan nötralleşebildiği H^+ yada OH^- iyonları derişimine denir.

Tampon kapasitesi “ β ” ile gösterilir. Bir tamponun kapasitesi yalnız konjuge asit-baz çiftinin toplam konsantrasyonuna değildir. Konsantrasyonları oranı 1’den büyük veya küçük değerlere gittikçe tampon kapasitesindeki düşme artmaktadır. İyi bir tampon ;

-toksik olmamalı ,

-UV bölgede absorpsiyon vermemeli ,

-Biyolojik ve kimyasal olarak inaktif olmalı ,

-pKa değeri sıcaklıkla ve iyon şiddetiyle minimum düzeyde değişmelidir.

Hazırlanan tampon çözeltinin eklenen asit ya da baza karşı tamponlama yaparak pH değişimine karşı koyabileceği pH aralığı aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\text{pH kapasitesi} = \text{pKa} \pm 1$$

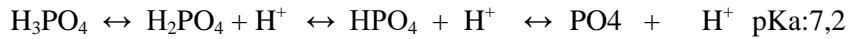
MATERYAL-METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler:

Distile su, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl , hassas terazi, spatül, tartım kabı, mezür, erlen, çözelti şişesi, beher, manyetik karıştırıcı, pH metre.

Deney:

100 ml 0,01M pH 7,4 Fosfat Tamponu Hazırlanması



1. H_2PO_4 kaynağı için NaH_2PO_4 , HPO_4 kaynağı için ise Na_2HPO_4 kullanılacaktır.
2. 0,01 M olacak şekilde NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ve NaCl değerleri hesaplanır, hassas terazide tartılır.
3. Tartılan maddeler erlene aktarılır ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
4. Maddeler tamamen çözünüp, homojen çözelti elde edildikten sonra pH 7,4’e ayarlanır.

4. HAFTA: Spektrofotometrik yöntem ile standart eğri hazırlama

Bir çözelti içerisinde miktarı bilinmeyen bir örneğin UV-görünür bölge soğurma davranışından faydalanarak nicel analizini yapmak ve miktarını belirlemek.

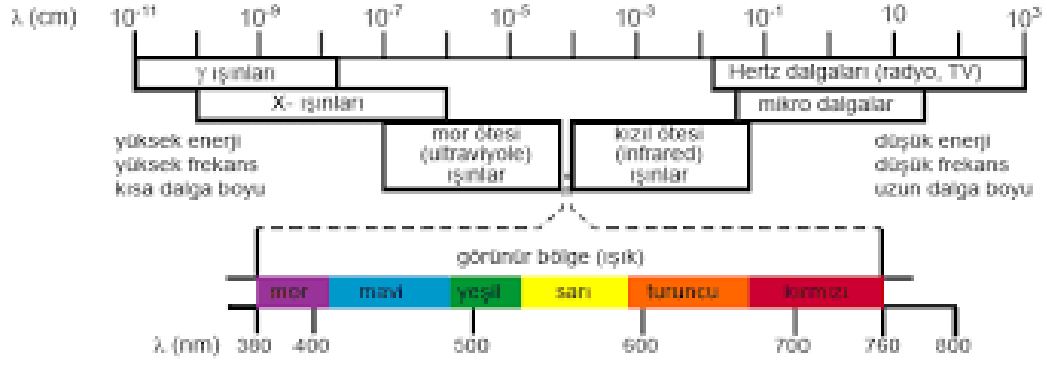
Spektroskopi; en basit şekilde, ışık(bazı sistemlerde ses veya elektron) ve madde arasındaki etkileşimin dalga boyunun veya frekansın bir fonksiyonu olarak incelenmesidir. Diğer bir tanımla bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının, ölçülmesi ve yorumlanmasına **spektroskopi** denir. Atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışımaya ile etkileşimi sonucu dönme, titreşim ve elektronik enerji seviyelerinde değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur. Elektromanyetik ışımının organik moleküller tarafından soğurulması, moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklere bağlı olduğundan, spektroskopik yöntemlerle bu moleküllerin yapıları aydınlatılabilir.

Değişik dalga boylarındaki ışıkla etkileşimi sonucunda maddenin farklı özellikleri hakkında bilgi edinilmektedir. Bu sebeple günümüzde birçok farklı spektroskopi yöntemi kullanılmaktadır. Kullanılan spektroskopik yöntemler şunlardır:

- Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi
- Floresans ve fosforesans spektroskopisi
- Atomik absorpsiyon spektroskopisi
- Atomik emisyon ve atomik floresans spektroskopisi
- İnfrared (IR)spektroskopisi
- Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi
- Kütle spektrometrisi

Çözelti içindeki madde miktarını çözeltilerden geçen veya çözeltilerin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılırlar. Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir.

Genel olarak moleküllerin uyarılmasıyla moleküler geçişler ve moleküllerdeki elektronların uyarılmasıyla da elektronik geçişler olur. **UV-görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi** moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve elektronik spektroskopi olarak adlandırılırlar. 100-700 nm aralığı elektronik spektrum, 100-200 nm aralığı vakum UV, 200-400 nm aralığı UV ve 400-700 nm aralığı ise görünür bölgedir(Şekil 3.1). Görünür bölgede absorpsiyon yapan bileşik absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür.



Şekil 4. 1 Görünür bölge dalga boyları

Mor ötesi ve görünür bölge spektrofotometrelerinde cam veya kuvars prizma bulunur ve kullanırken ışığın herhangi bir frekanslı UV veya görünür bölgesi seçilir (otomatik spektrofotometreler, frekansı düzgün olarak değiştirir). Işık örnekten (veya örnek çözeltisinden) geçtikten sonraki absorpsiyon veya geçirgenlik okunur. UV-görünür bölgede döteryum (D₂), tungsten (W), hidrojen (H₂), ksenon (Xe), civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. En uygun ışık kaynağı hidrojen deşarj tüpü ve görünür bölgede tungsten lambasıdır.

Spektrofotometreler tek ve çift ışık yollu olarak ikiye ayrılırlar. Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir. Bu aletin başlıca üç ayar düğmesi bulunur. Birincisi alette kullanılan optik ağ veya prizmayı mekanik olarak döndürmeyi sağlayan düğme, ikincisi ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometre "sıfır" geçirgenlik ayarını yapan düğme, üçüncüsü ise ışığın geçtiği aralığın enini değiştiren düğmedir.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde ise monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünür ve biri örneğe diğeri ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması ölçüm için oldukça önemlidir.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek dedektör kullanılarak da ölçüm yapmak mümkündür. Bu durumda örnekten ve çözücünden geçen ışık demetleri dedektör üzerine art arda gelir ve alternatif türden sinyal oluştururlar. Işık şiddetleri eşit ise dedektörde herhangi bir sinyal oluşmaz; örnek bölmesinden gelen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığı zaman dedektöre gelen sinyal alternatif sinyal olarak algılanır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir başka türü ise çift dalga boyulu spektrofotometrelerdir. Bu spektrofotometrelerde iki farklı monokromatör vardır; iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle art arda etkileştirilir. Bulanık çözeltilerde dalga boylarından biri çözeltideki maddenin absorplayacağı, diğeri ise absorplamayacağı değerlere ayarlanır. Bulanıklıktan dolayı her iki dalga boyunda aynı miktarda ışık kaybı olacağından iki dalga boyunda yapılan ölçümlerin farkı, sadece örneğin absorbansı ile ilişkili olur.

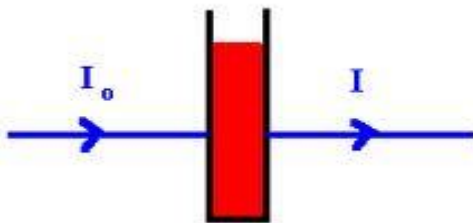


Şekil 4.2 Genel spektrofotometre düzeneği

Spektrofotometrik cihazların çoğunda absorpsiyon ölçümü yapılırken ışık sadece hedef moleküllerle değil aynı zamanda çözelti ile de etkileşime girer. Dolayısıyla cihaz hedef molekülün absorpsiyon spektrumunu değil, çözeltinin spektrumunu verir. Bu nedenle hedef molekül türünün absorpsiyonunu öğrenmek için kör (blank) alınır. Çift ışık yollu spektroskopilerde bir hücreye numune diğerine çözücü konulurken tek ışık yollu spektroskopilerde ilk önce çözücü kuvarz küvete konularak blank, daha sonra ölçüm alınır.

Biyolojik moleküllerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonun ve saflığın tayininde kullanılmaktadır. Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Bunun sonucu olarak UV-Vis Spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır.

Lambert-Beer kanunu: Bir çözeltiden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde kat ettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ise doğru orantılıdır.



$$\text{Transmittans}(T)=I/I_0$$

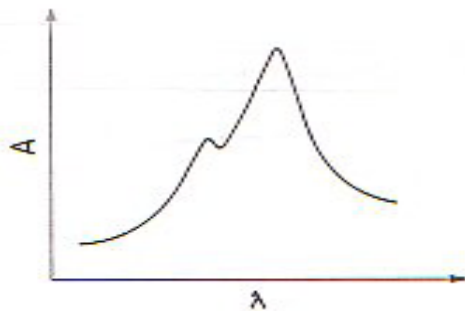
$$\text{Absorbans (optik dansite, O.D.)}=-\log_{10}T$$

$$\text{Absorbans}(A)=\epsilon \cdot c \cdot l$$

$c \rightarrow$ çözelti konsantrasyonu (mol/L)

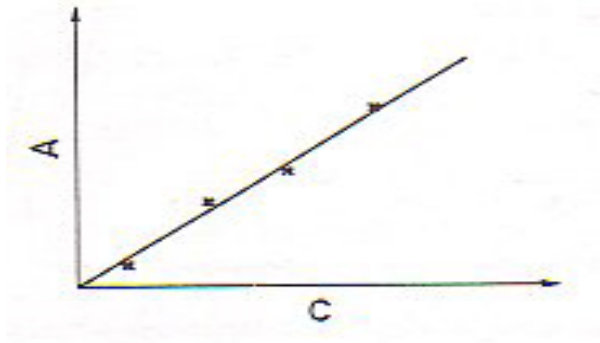
$l \rightarrow$ ışığın çözelti içinde kattığı yol (cm)

$\epsilon \rightarrow$ molar absorpsiyon katsayısı(L/mol/cm)



Spektrofotometre ile bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyunu kararlaştırmak için, örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Bunun için, maddenin 1 molar çözeltisinin çeşitli dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri ölçülür. Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorplamadığı, Lambert-Beer eşitliğine uyulduğu ve nicel analiz en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra

analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalga boyundaki absorbands (A) değerleri ölçülür. A değerleri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilir.



Standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı A değerlerini grafiğe geçirmek suretiyle elde edilen doğruya **kalibrasyon doğrusu** denir. Nicel analiz, kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğu bölgede yapılır. Derişimi bilinmeyen örneğin A değeri ölçülür ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen derişim saptanır.

MATERYAL VE METOD:

Materyal

, Distile su, eppendorf tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, kuvartz küvet, spektrofotometre cihazı.

Yöntem

1. Stok çözeltisi hazırlanır.
2. Stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda seyreltme yapıp nm'de ölçüm yapıp kaydedilir.
3. Kaydedilen absorbands değerleri grafiğe aktarılarak standart eğri oluşturulur.

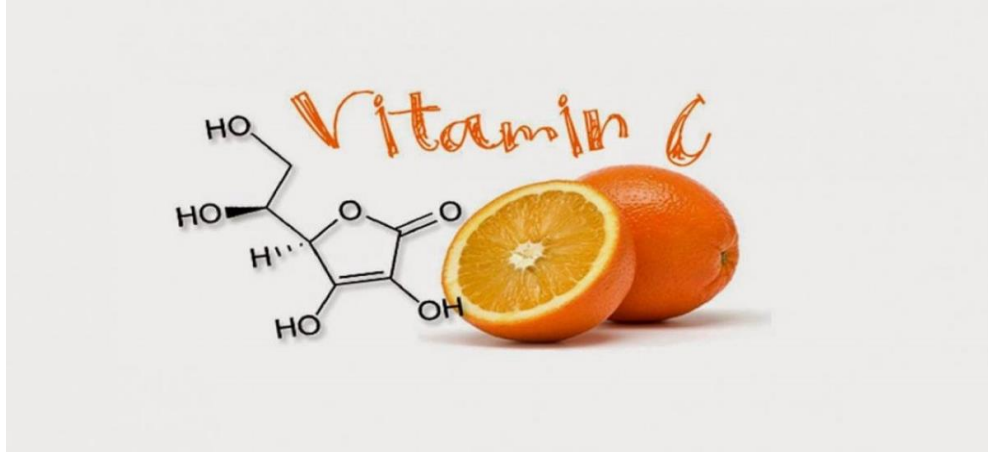
5. HAFTA: Kantitatif Askorbik Asit (C Vitamini) Analizi

Bir çözeltide bulunan C vitamininin kalitatif-kantitatif tayini.

Latince *vita* (hayat) sözcüğünden gelen vitaminler, vücudumuz için mutlaka gerekli olan ve vücudumuzdaki katalizör görevli en basit organik maddelerdir. Vitaminlerden herhangi biri vücuda alınmazsa, o vitaminin yardımcı olduğu kimyasal reaksiyon yürümeyeceğinden dolayı büyümede ve vücut çalışmalarında aksamalar olabilir. Ayrıca vücudumuzun karbonhidrat, yağ ve proteini kullanmasını da sağlarlar. Vitaminler vücutta "yakılmaz", yani vitaminlerden doğrudan enerji (kalori) alınmaz. Vücut, her vitaminden gerekli olan miktarın kan dolaşımında sürekli mevcut olmasını sağlar.

Vitaminlerin vücut çalışmasındaki etkileri, biyokimyasal reaksiyonların düzenlenmesiyle ilgilidir. Vitaminlerin insan sağlığına etkisini üç grupta toplayabiliriz;

- Büyümeye yardım
- Sağlıklı nesillerin oluşmasına yardım
- Sinir ve sindirim sistemlerinin normal çalışması, besin öğelerinin elverişli olarak kullanılması ve vücut direncine yardım.
- Vitaminlere, tüm metabolik faaliyetlerde çok düşük miktarlarda gerek duyulur. Bugün vitamin olarak tanımlanmış 15 bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler:
 - Gıdalardan aktif vitamin yapısında vücuda alınabildiği
 - Provitaminler (vitamin öncüsü) halinde vücuda alındıktan sonra bir dizi kimyasal değişikliğe uğrayarak bir ya da daha fazla vitamin aktivitesi gösteren bileşiğe dönüşür.
 - Vitaminler gıdalarda farklı miktarlarda bulunur ve farklı dağılımlar gösterir. Bazı gıdalar bir veya birkaç vitamince oldukça zengin olmalarına rağmen bazı vitaminleri eser düzeyde içerir.
- Gıdalarda vitamin analizleri:
 - Gıdadaki vitamin değerini belirlemek
 - Mevzuata uygunluğunu araştırmak
 - Etiket bilgilerine uygunluğunu araştırmak üzere yapılabilir.
 - Gıdalardaki vitamin analizleri; volumetrik titrasyon ve enstrümental analiz yöntemle tayin edilebilir. Çoğu gıda maddesindeki vitamin analizleri spektroskopik yöntemlerle yapılabilmektedir. Bunun için gıda maddesindeki vitamin uygun çözücülerle (çoğunlukla asidik ortamda) özütlenip çözeltiye alınır. Çözelti özel bir kromatografik kolondan geçirilerek vitaminler ayrılır ve fluometri veya başka optik yöntemler kullanılarak miktarları bulunur. Doğruluk açısından en geçerli olan yöntem HPLC yöntemidir. Fakat çok pahalı olduğu için pek tercih edilmemektedir. Gıdalarda en çok yapılan vitamin analizleri;
 - Meyve ve sebze ürünlerinde, gazozda A vitamini (beta karoten) tayini
 - Bitkisel margarinlerde A ve D vitamini tayini
 - Meyve ve sebze ürünlerinde C vitamini tayinidir.



Şekil 5.1 C Vitamini kimyasal bağ yapısı

C Vitamini (Askorbik asit) -, endiol yapısında ve lakton halkalı bir heksoz türevidir (Şekil5.1). Erime noktası 192 °C ve molekül ağırlığı 176 olan, renksiz kristallerden oluşan C vitamini, bir antiaskorbüt faktörüdür. Hem indirgen gücü olan hem de asidik özellik veren bir dienol grup ihtiva eder. Benzen, eter, petrol eter, kloroform ve yağda çözünmez. C vitamini (Askorbikasit) vitaminler arasında en dayanıksız olanıdır.

- Alkalilere ve oksidasyona karşı ve özellikle Cu ve Fe gibi katalizörler bulunduğu zaman çok hassastır.
- Kuru kristaller halinde iken dayanıklıdır.
- Asit çözeltilerinde de (pH 4'den aşağıda) oldukça dayanıklıdır.
- Askorbik asit havanın oksijeni ile de okside olur. Bu oksidasyon sonucu molekül vitamin aktivitesini kaybeder.
- Doğada indirgenmiş ($C_6H_8O_6$) ve yükseltgenmiş ($C_6H_6O_6$) şeklinde bulunur.

➤ Eksikliği:

- Kılcal damar çeperlerinin zayıf bir yapı kazanmasına,
- Diş etlerinin kolaylıkla kanamasına, dişlerin gevşemesine,
- Eklem hastalıklarına neden olmaktadır.
- Ayrıca cildin ve bağ dokuların önemli bir unsuru olan kollagen ile proteinin normal oluşumu için gereklidir.

MATERYAL VE METOD:

Deneyde Kullanılacak Malzemeler:

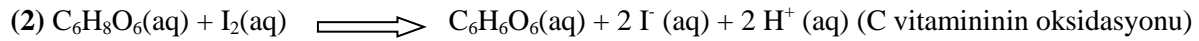
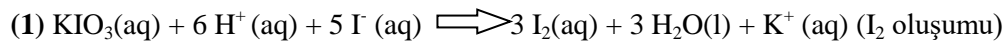
• %0.25'lik nişasta çözeltisi (0,625g nişasta tartılarak sıcak 250 mL suda çözülür çözelti berrak oluncaya kadar kaynatılır)

- 0.7 M sodyum tiyosülfat (0.1 g Na_2CO_3 ve 110.8g $Na_2S_2O_3$ /1000 mL su)
- %0.2 KIO_3 çözeltisi (2g KIO_3 /1000 mL su)
- %5'lik KI çözeltisi (2,5g/50 mLsu (her grup ayrı hazırlayacaktır))
- % 0.1 Askorbik asit standart çözeltisi (0.1g askorbik asit/ 100 mL su)
- 0.3 M H_2SO_4 çözeltisi (16,65 mL der. H_2SO_4 / 1000 mL)

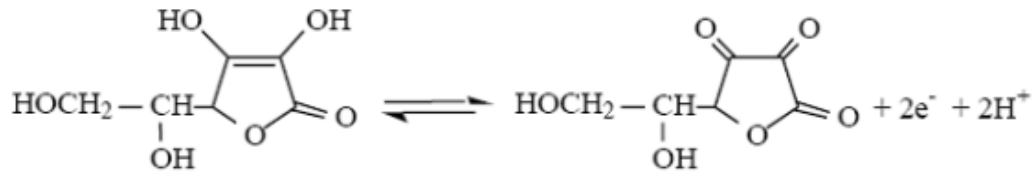
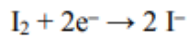
Deneyin Yapılışı:

Erlen No	0,3M H ₂ SO ₄ (mL)	Askorbik Asit (mL)	Meyve Suyu (mL)	Su (mL)	KIO ₃ (mL)	KI (mL)	Na ₂ S ₂ O ₃ ile Titrasyon (Açık sarı olana kadar)	Nişasta (mL)	Na ₂ S ₂ O ₃ ile Titrasyon (Renksiz olana kadar)	Sarfiyat
1	50	2,5	0	17,5	15	10		2		
2	50	5	0	15	15	10		2		
3	50	10	0	10	15	10		2		
Örnek	50	0	20	0	15	10		2		

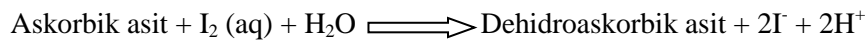
Askorbik asit (C vitamini) orta kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Sudaki iyot molekülünü askorbik asit ile indirgenmesi reaksiyonu şu şekilde verilebilir;



1. reaksiyon ile I₂ oluşur, bu oluşan I₂ 2. Reaksiyon ile okside olur. Her iki reaksiyon da seyreltik asidik ortamda gerçekleşir ayrıca 1. Reaksiyon I⁻ iyonlarına ihtiyaç duyar. İlgili yarı reaksiyonlar şu şekilde verilebilir;

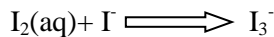


Toplam reaksiyon şu şekildedir;

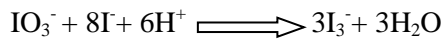


Bu reaksiyonun denge sabiti büyüktür ve girenler tamamen ürüne dönüşürler.

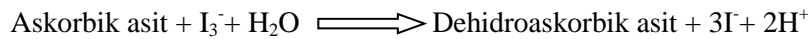
Ancak I₂'nin sudaki çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle I⁻ kullanılarak I₃⁻ kompleksi oluşturulur.



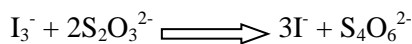
I₃⁻ kompleksi triiyodür olarak adlandırılır. Triiyodür iyodat kullanılarak da üretilir.



Triiyodür askorbik asitle reaksiyona girer.



Askorbik asit konsantrasyonu dolaylı yolla reaksiyona girmeden kalan I₃⁻ iyonları tayin ederek bulunur. Bu amaçla tiyosülfat kullanılır.



S₄O₆²⁻ tiyonat iyonu olarak isimlendirilir. İndikatör olarak nişasta kullanılır. Triiyodür nişasta ile koyu mavi renkli bir kompleks oluşturur.

VERİLERİN HESAPLANMASI

1, 2 ve 3 numaralı erlenlerdeki askorbik asit miktarı mg cinsinden hesaplanarak harcanan tiosülfat miktarı kullanılarak standart eğri grafiği çizilir. Örnek için harcanan tiosülfat miktarı grafik üzerinden okunarak askorbik asit konsantrasyonu tayin edilir ve mg/100mL cinsinden ifade edilir.

Titre	1	2	3	Örnek
İlk Hacim(ml)				
Son Hacim(ml)				
Kullanılan Hacim(ml)				
Hesaplama				

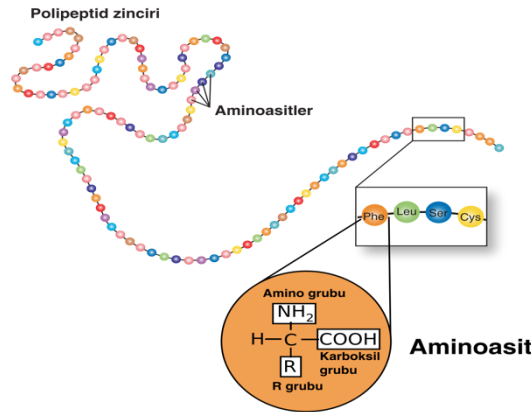
6.HAFTA: Aminoasitlere özgü reaksiyonlar : Ksantoprotein (Becher) Deneyi, Hopkins-Cole Deneyi

Amino asitler, yapılarında hem amino grubu ($-NH_2$) hem de karboksil grubu ($-COOH$) içeren bileşiklerdir. Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Amino asitlerin standart amino asitler diye bilinen 20 tanesi, karakteristik sayı ve diziliş sırasında bir düz zincirde birbirlerine kovalent olarak bağlanarak proteinleri oluştururlar. Standart amino asitler, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir.

Bir standart amino asit polipeptit zinciri yapısına girdikten sonra bir modifikasyona uğrarsa Nonstandart amino asitler diye bilinen bazı amino asitler oluşabilir. Örneğin prolin, kollajen içerisinde hidroksiprolin okside olur.

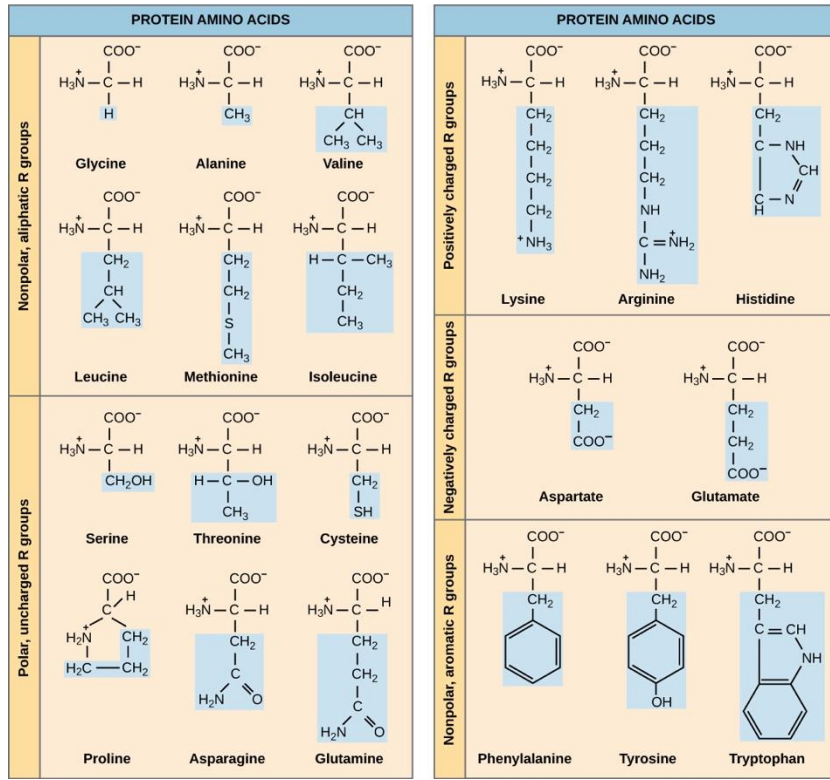
Proteinlerin yapısında bulunmayan fakat hücrede çok değişik biyolojik fonksiyonlara sahip amino asitler de vardır.

Standart amino asitler, karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Fizyolojik pH'da, amino grubu proton taşır ve pozitif yüklüdür; karboksil grubundan ise proton ayrılmıştır ve negatif yüklüdür: Standart amino asitlerde amino ve karboksil gruplarının bağlı olduğu karbon atomu α -karbon atomu diye anılır. R grubu bir zincirde ek karbonlar içeriyorsa bu karbonlar β , γ , δ , ϵ gibi harflerle belirtilirler.



Şekil 6.1 Aminoasitlerin genel yapısı

Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler. Standart amino asitler birbirlerinden yan zincirlerindeki yani R gruplarındaki yapı, büyüklük, elektrik yükü, amino asidin sudaki çözünürlüğüne etkisi bakımından farklıdırlar. Bazı amino asitler, fizyolojik pH'da, amino grubundaki pozitif yüke ve karboksil grubundaki negatif yüke ek olarak yan zincirde de bir yük taşımaktadırlar. Bazı yan gruplar polar iken bazı yan gruplar nonpolarıdır. Amino asitlerin fonksiyonları ve protein yapısındaki rolleri, yan zincirlerinin kimyasal özellikleri ile bağlantılıdır. Standart amino asitler, kimyasal özelliklerinin kolay anlaşılması için, R yan gruplarının özellikle polarite veya biyolojik pH'da su ile etkileşmeye eğilim özelliklerine göre de beş sınıfa ayrılırlar.



Şekil 6.2 Aminoasitlerin Sınıflandırılması

Amino asitler ve yapılarında amino asit bulunan proteinler belirli kimyasal maddelerle renk reaksiyonları verirler. Bu reaksiyonlardan faydalanılarak amino asit ve proteinlerin kantitatif tayinleri yapılır.

MATERYAL VE METOD

Ksantoprotein (Becher) Deneyi

Proteinlerin asit, ısı ve alkali ile işlem gördüklerinde sırasıyla beyaz, sarı ve portakal renk vermeleri esasına dayanan kalitatif (nitel) bir yöntemdir. Ksantoprotein (Becher) reaksiyonu, serumdaki aromatik amino asitlerin tanımlanmasına yönelik bir testtir.

Normal durumda çözelti açık arı bir renk alır. Patolojik durumlarda ise çok koyu sarı renk alır, portakal rengi hatta kahverengiye çalan renkler görülebilir.

Ortaya çıkan rengin normal ya da patolojik olduğuna kolayca karar vermek için, sabit bir renk veren potasyum kromatin ile yapılan seyreltilmelerinde ortaya çıkan renkler, reaksiyonda oluşan renklerle kıyaslanır. Hangi renk ile uyuyorsa, anlamı hizasında yazılı durumu gösterir.

Çözeltinin sarı renk almasının sebebi ;

Proteinler HNO₃ ile muamele edildiklerinde sarı bir renk oluşturarak ksantoprotein reaksiyonu veririler. Sarı renk oluşmasının sebebi HNO₃ ile kaynatılmayı takiben aromatik çekirdeğe nitro grubunun (benzen çekirdeğinin nitasyonu) girmesidir.

Asidik ortamda hafif tonda olan sarı rengin, ısı ve alkali ilavesiyle şiddetlenmesi sağlanır.

Sağlıklı bireylerde gözlenen açık sarı renk, serumda az miktarda bulunan tirozin, fenil alanin ve bir ölçüye kadar triptofan gibi halkalı amino asitlerden ileri gelir. Fenolle zehirlenme vakalarında ksantoprotein reaksiyonu yüksek bulunur.

Tirozin, fenil alanin ve bir ölçüde triptofan proteinlerde bulunan ve bu reaksiyondan sorumlu amino asitlerdir.

Çözeltiler

Derişik HNO₃

% 20 TCA (Trikloroasetikasit)

% 33 NaOH (Sodyum Hidroksit)

% 0,038 g.lık K₂Cr₂O₇ (Potasyum dikromat)- Kontrol grubu

Serum

Yöntem

1. 0.1-0.05.0.01 gr miktarlarda tirozin amino asiti 10 ml saf suda çözülür.
2. 3 ml seruma aynı hacim % 20 trikloroasetikasit damlatılarak çalkalanır.
3. 10 dk beklenir.
4. Filtre kağıdından süzülür.
5. Elde edilen proteinden yoksun süzüntüden 2 ml bir tüpe konur.
6. Tüpteki sıvı üzerine 0,5 ml derişik HNO₃ ilave edilir. Çalkalanır.
7. 30 sn açık alev üzerinde tutulup ısıtılır.
8. Isıtılan tüp musluk suyu altında soğutulur.
9. Soğutulan çözeltiliye % 33 NaOH çözeltisinden 1,5 ml konur.

Hopkins – Cole Deneyi

Proteinlerde triptofan bulunmasına dayalı bir reaksiyondur. Triptofan ve indol halkası içeren başka kuvvetli asitlerle (glikoksilik asit ve sülfirik asit ile) işlem gördüklerinde çeşitli aldehitlerle yoğunlaşması sonucu mor renkli bileşiklerin oluşması reaksiyonun pozitif olduğunun göstergesidir.

Çözeltiler

Protein çözeltisi (Triptofan)

Glyoksilik Asit

Konsantre sülfirik asit

Yöntem

1. 2 ml protein çözeltisine 2 ml glikoksilik (% 99,9) asit ilave edilir.
2. Hazırlanan çözelti karıştırılır.
3. Tüp hafifçe eğilir. Çözelti içerisine damla damla tüpün yüzeyinden sızdırarak 2 ml sülfirik asit ilave edilir. İki sıvının yüzeyinde mor renkli bir halkanın oluşumu reaksiyonun pozitif olduğunu gösterir.

7. HAFTA: Proteinlere özgü reaksiyonlar : Bradford Deneyi, Lowry Deneyi

Proteinler doğadaki en büyük makromolekül gruplarından biridir. Amino asitlerin oluşturduğu bir veya daha fazla polipeptit zincirinden oluşmaktadırlar. Hücrede birçok işlev proteinler tarafından yürütülmektedir. Örneğin metabolik reaksiyonların katalizlenmesi; DNA replikasyonu; uyarana karşı cevap verme ve diğer moleküllerin taşınması gibi işlevleri vardır.

Bu büyük çeşitliliğe ve farklı işlevlere karşın temelde oldukça benzer yapıları olan bu moleküllerin, üstlendikleri önemli görevler nedeniyle yapılarının aydınlatılması, sentezlerinin, işlevlerinin ve regülasyonlarının ortaya konulması çok büyük önem taşır.

Belli hacimde bir çözeltildeki toplam protein miktarının belirlenmesi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin seçiminde ve belli aşamalarda protein veriminin ve saflığının kontrolünde önemli bir yer tutar. Özellikle elektroforetik ve kromotografik ayırmalarda deneylerin optimizasyonu için miktar tayinine gereksinim duyulmaktadır.

Son yıllarda yararlanılan teknikler, protein çözeltilisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli bir bileşiğin (kromofor) görünür alanda spektral olarak belirlenmesi temeline dayanır.

Yöntem	Hassasiyet	Zaman	Prensip	Özellikler
<i>Biüret</i>	Düşük 1-6 mg	20-30 dk.	Peptid bağlarının alkali bakır ile mor kompleks oluşturması (550 nm)	+ Hızlı, az girişim yapar - Hassasiyeti düşük
<i>Basit absorban UV</i>	Orta 0.05-2 mg	5-10 dk.	280 nmdeki ışığın tirozin triptofan tarafından absorblanması (280 nm)	+Hızlı, ucuz, protein geri kazanılabilir -Girişim fazla, hassasiyet orta, Tyr ve Trp içeriğine bağlı
<i>Basit Absorbans Uzak UV</i>	Yüksek 0.01-0.05 mg	5-10 dk	190-205 nmdeki ışığın peptid bağları tarafından absorblanması (190 nm)	+ Hassas, protein geri kazanılabilir -Uyulanabilirliği düşük, girişim fazla, Tyr ve Trp içeriğine bağlı
<i>Lowry</i>	Yüksek 0.01-1 mg	40-60 dk	Biüret reaksiyonu ve fosfomolibdotungstatın Tyr ve Trp tarafından indirgenmesi (550 nm)	+ Hassas - Zaman alıcı, girişim yüksek, orta seviyede Tyr ve Trp içeriğine bağlı
<i>Bradford</i>	Yüksek 0.001mg	15-20 dk	CBB G250 boyar maddesinin proteine kovalent olmayan bağlanması (595 nm)	+ Hassas, girişim düşük, ucuz - Arg ve Lys içeriğine bağlı,
<i>BCA (Bişinkoninik asit)</i>	Yüksek 0.0005 mg	60-80 dk.	Biüret reaksiyonu ve BCA'nın bakır ile kompleks oluşturması (562 nm)	+ Hassas, proteinden proteine değişiklik göstermez, girişim düşük -
<i>Gümüş /Altın Bağlama</i>	Çok yüksek 0.000125 mg	10 dk	Kolloidal altın ve gümüşün proteine bağlanması (dansitometrik ölçüm)	+ Çok hassas, girişim düşük - Proteinden proteine değişiklik gösterir
<i>Nitrik Asit</i>	Yüksek 0.005 mg	120-140 dk	Proteinlerin nitrik asit ile reaksiyon vermesi (358 nm)	+ Hassas, girişim düşük, ucuz - Zaman alıcı,

MATERYAL VE METOD

Bradford (Boya Bağlama) Yöntemi

Bu yöntem, Comassie brilliant blue (Comassie parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin yapısının önemi vardır.

Bu yöntem Lowry yöntemine göre daha hızlı, daha ucuz, daha kolay ve daha hassastır. 0.001 mg/mL protein ölçülebilir.

Belirteçin hazırlanması

25 mg Comassie brilliant blue G-250'nin 12.5 ml % 95 etanolde çözündürülüp, 25 ml % 85 H₃PO₄ (Fosforik asit) eklendikten sonra, 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanan derişik boya çözeltilisi, kullanılacağı zaman 5 kere

sulandırılır. Whatman no.1 filtreden geçirilir ve bir cam şişede, oda sıcaklığında saklanır.

Yöntem

Bileşikler	Tüpler				
	1(K)	2(S)	3(S)	4(S)	5(S)
1mg/mlBSA (μ l)	-	25	50	75	100
dH ₂ O(μ l)	100	75	50	25	0
%0,9 NaCl (ml)	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Bradfordçözeltisi (ml)	1	1	1	1	1
Toplam Hacim ml	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

1. Kör (Blank) örnek, standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri tabloda verilen değerlere göre hazırlanır ve hızlı bir şekilde vortekslenir.
2. En az 5 dakika bekleddikten sonra 595 nm'deki absorpsiyon değerleri okunur.
3. Standart eğri grafiği hazırlanarak örnekteki protein derişimi bulunur.

Modifiye Lowry Metodu

Bu yöntem, fosfomolibdotugstik asit çözeltilisinin (Folin-Ciocalteau belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon, bakır ile protein arasında kompleks oluşumu ile başlar; alkali çözeltide, oda temperaturünde 5-10 dakika içinde tamamlanır. Bakırın varlığı yöntemin duyarlılığını 3-15 kat arttırmaktadır, çünkü Cu ile yapılan kompleks, Folin belirtecindeki molibden ve tungsten ile birleşerek yeni kompleks ortaya koyar. Ancak analiz edilen örnekteki fenolik maddeler hatalara yol açabilir.

Çözeltiler

- A) 0.1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃
- B) %1 (w/v) Na- veya K- tartarat içinde %0.5 (w/v) CuSO₄.5H₂O
- C) 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karışımından oluşur (Taze hazırlanır).
- D) 1 hacim Folin belirteci: 2 hacim sudan oluşan karışım (Taze hazırlanır ve ışıktan korunur; Folin toksik olduğundan mikropipet kullanılır.)

Yöntem

- 1) Çalışma aralığına uygun konsantrasyonunda 0.5'er ml standartlar (örneğin, 20, 80, 140, 200, 280, 340, 400 μ g/ml), kör örnek ve protein örnekleri, 5'er ml C belirteci ile karıştırılır.
- 2) Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
- 3) 0.5 ml D belirteci eklenir ve vorteksle karıştırılır. (D çözeltisi eklendikten 2-3 saniye içinde homojen bir şekilde karışım sağlanmalıdır.)
- 4) 30 dakika karanlıkta bekletilir.
- 5) 660 nm'de absorbans ölçülür.
- 6) Standart eğri grafiği hazırlanarak örnekteki protein derişimi bulunur.

8. HAFTA: Kanda Hemoglobin Tayini

Hemoglobin kırmızı kan hücrelerinde oksijen taşıyıcı proteindir. 5,5 nm çapında, kabaca küresel bir yapıdadır. Her polipeptit zincirine bağlı dört hem prostetik grubu içeren tetramer bir proteindir. Erişkin hemoglobininde iki alfa zinciri ve iki beta zinciri olmak üzere iki tip globülin bulunur. Her bir hemoglobin alt ünitesi bir hem grup içerir. Hem grup oksijen bağlanma bölgesidir.

Hemoglobinin alt birimleri arasındaki etkileşimler, proteinin oksijene olan ilgisini etkileyen yapısal değişikliklere yol açar. 4 hem gruba birden oksijen molekülü bağlandığı zaman hemoglobin molekülünün yapısı değişir.

Kanda hemoglobin miktarının tayin edilmesinin birçok yolu bulunmaktadır. Kolorimetrik yöntem ve spektrofotometrik yöntemlerle hemoglobin ölçümü yapılabilmektedir.

Normal hemoglobin değerleri: Kadın için : 12-16 g/dl; Erkek için : 13-18 g/dl 'dir.

Kolorimetrik yöntemle hemoglobin düzeyinin ölçümü ; Renk karşılaştırılmasına dayanan kolorimetrik yöntemde; eritrositlerin asit tuzuyla parçalanmasından sonra açığa çıkan hematinin, tuz asitleri tarafından, asit hematine çevirmesi ve bununda, renginin standart renk ile karşılaştırılarak kandaki hemoglobin miktarının bulunmasına dayanır.

Asit hematinin rengi koyu kahverengidir. Hematinin, asitle reaksiyonu sonunda belli bir sürede verdiği renk miktarının ölçülmesi ile kandaki hemoglobin miktarı kolaylıkla saptanabilir. Buna "Sahli Yöntemi " denir.

Sahli hemometresinde; kenar kısımlarda iki standart tüp ve ortada derecelendirilmiş bir Sahli test tüpü bulunur. Standart tüplerde koyu sarı bir sıvı bulunmaktadır. Alınan kan örneği, Sahli test tüpündeki asit çözelti (1/10 N HCl çözeltisi) yardımıyla hemin klorüre dönüşür. Hemometre çevresindeki standart tüpler 14,5 ya da 16 g/dl hemoglobinin, hemin klorüre çevrilmesi ile oluşacak rengi göstermektedir. Bu değer erişkin için ideal hemoglobin düzeyidir. Bu nedenle %100 olarak kabul edilerek dereceli tüp ile elde edilen değerleri karşılaştırılır ve hemoglobin düzeyini ölçülür. % 100 değeri bazı Sahli tüplerinde 14,5, bazı Sahli tüplerindeyse 16 gram hemoglobin (100 mililitre kanda) ile eşdeğerdir.

Spektrofotometrik yöntemle hemoglobin düzeyinin ölçümü ; Hemoglobin kanda çeşitli formlarda bulunur; bunlar oksihemoglobin, karboksihemoglobin, methemoglobin ve diğer küçük bileşenlerdir. Bunlar potasyum ferrisiyanid ve potasyum siyanid içeren Drabkin solüsyonunun kan ile karıştırılması suretiyle siyanmethemoglobin adlı tek bir stabil bileşiğe dönüştürülür. Hemoglobini belirlemek için siyanhemoglobinin absorbansı spektrofotometrede 540 nm'de ölçülür. Manuel yöntemlerde ve otomatik hücre analizörlerinde benzer yöntemler kullanılır. Hb tam kanda gram/desilitre (g/dl) cinsinden ifade edilir.

MATERYAL VE METOD

Drabkin Yöntemi

Deneyde Kullanılacak Malzemeler:

Manuel Metod için ;

- 1- 0.05 g of KCN
- 2- 0.2 g of potassium ferrocyanide
- 3- 1 g sodium bicarbonate
- 4- 1 L dH₂O

Hazır Solüsyon için ;

- 1- Drabkin's Reagent(1L dH₂O içinde çözülür.)
- 2- 0,5 ml Brij 23 çözeltisi eklenir.
- 3- 1 L dH₂O

Alkol (%70)

Lanset

Pamuk

Distile su

Kanda hemoglobininin belirlenmesi için klasik teknikler oksijen, karbon monoksit kapasitesi veya demir içeriği tahminine dayanıyordu. Bu analizlerin hemoglobinin heterojen yapısından dolayı güvenilir olmadığını kanıtlanınca alkaline pH'taki toplam hemoglobinin hızla siyano türevlerine dönüştürüldüğü bir yöntem olan kolorimetrik siyanmethemoglobin yöntemi önerilmiştir.

Bu yöntemde ;

- Test tüplerinin her birine 5 ml Drabkin Solüsyonu eklenir.
- İncelenecek olan tam kan örneklerinden 20 µl tüplere eklenir.
- Tüplere nazikçe pipetaj yapılır ve oda sıcaklığında 15 dk reaksiyonun tamamlanması beklenir. (Alternatif olarak 56 °C'de 3-5 dk sürekli karıştırılarak reaksiyon tamamlanabilir).
- Blank Solüsyonuna karşı 540 nm'de spektrofotometrik olarak okunur ve mg/ml cinsinden total hemoglobin konsantrasyonu hesaplanır.

Kalibrasyon eğrisi

1. Drabkin's Solution'da 180 mg/mL hemoglobin içeren bir Siyanmethemoglobin Standart Çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan çözelti karanlıkta ve soğuk ortamda (2-8 °C) saklanır.
2. Seyreltik siyanmethemoglobin standardı hazırlanır.
3. Tablo 1'de belirtilen oranlarda çözeltiler eklenir, pipetaj yaparak ve vorteksleyerek iyice karıştırılır ve çalışma standartlarını hazırlanır.
4. Tüp 2-4'ün absorbansı Blank'e (tüp1) göre 540 nm'de okunur.
5. Absorbans değerlerini kaydedilir.

6. Absorbans değerleri ile siyanmethemoglobin konsantrasyonuna karşı (mg/mL) bir kalibrasyon eğrisini çizilir. Eğri orijinden geçirilerek doğrusal olması sağlanır.(Başlangıç noktası 0 alınır.)

Tablo 1: Çalışma Standartı Hazırlanması

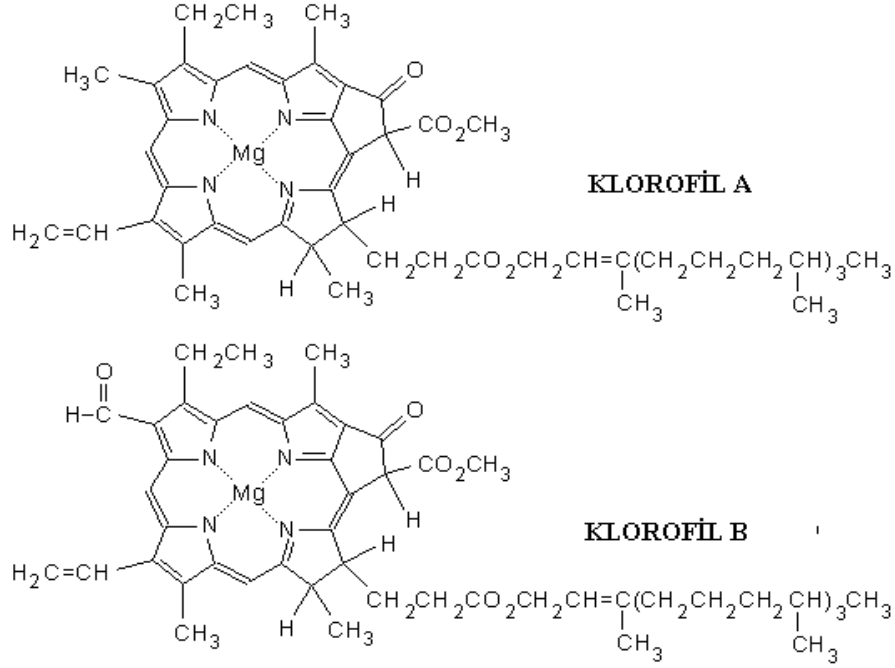
Tüp No	Seyreltik siyanmethemoglobin standart (mL)	Drabkin's Solution (mL)	Siyanmethemoglobin konsantrasyon (mg/mL)
1	0.0	3.0	Blank(0)
2	1.0	2.0	60
3	2.0	1.0	120
4	3.0	0.0	180

9. HAFTA: Bitkilerden pigment izolasyonu: Klorofil ve karotenoid tayini

Bitkilerin temel fotosentetik pigmentleri iki gruba ayrılır: Klorofiller ve karotenoidler. Bu pigmentlerin ikisi de, kloroplastların içinde bulunur ve fotokimyasal olarak aktif fotosentetik biyomembranlar olan tilakoidlerdeki proteinlere bağlı olarak yerleşmişlerdir. Bitki dokusunun aseton veya metanol gibi çözücülerde parçalanması sonucunda bu pigmentler, proteinlerden bağımsız bir şekilde elde edilirler. Klorofil ve karotenoidler, organik çözücülerde kolaylıkla çözündüklerinden, biyokimyasal olarak lipitler sınıfına sokulmaktadır.

En çok görülen bitki pigmentleri olan klorofil a ve klorofil b yaklaşık olarak;

a:b = 3:1 oranında karşımıza çıkmaktadır. Canlı bitki hücrelerinde, klorofiller birincil fotosentetik pigmentlerdir, bu pigmentler ışığı mavi (450 nm) ve kırmızı bölgede (650-700 nm) absorplamaktadır. Işığın absorplanması, klorofil molekülünde bir elektronun eksite olmasını (uyarılmasını) sağlar, böylelikle de NADPH ve ATP üretimi ile fotosentetik sürecin başlaması için enerji sağlanmış olur. Elde edilen NADPH ve ATP bitki tarafından karbohidrat metabolizmasında kullanılır.

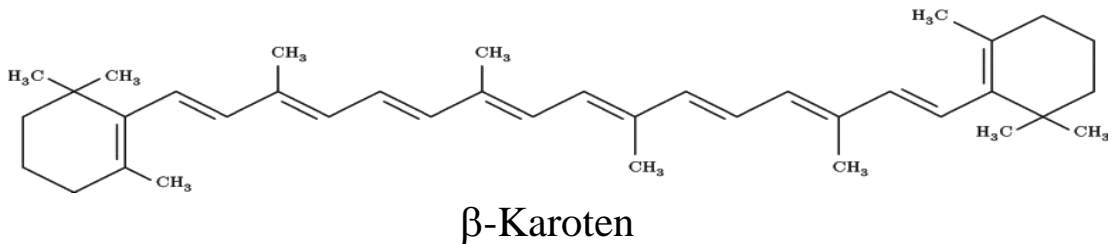


İkinci pigment grubu karotenoidler iki farklı tipte görülür:

1-karotenler: sadece karbon ve hidrojen içerirler.

2-ksantofiller: karbon, hidrojen ve oksijen atomlarını hidroksil veya epoksit işlevsel grupları formunda taşırlar.

Bitkilerdeki karotenoidlerin yüzde bileşimi büyüme koşullarına bağlıdır.



Klorofil a ve klorofil b 400-475 ve 600-675 dalga boyları arasında maksimum absorpsiyon gösterir. Bu dalga boylarında görülen piklerin maksimum absorpsiyonları kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır: örneğin; dietil eter içinde klorofil a için yoğun absorpsiyon piki 660 ve 428 nm.'de görülürken, daha polar olan metanol içinde bu pikler 665 ve 432 nm.'ye kaymaktadır.

Karotenoidler klorofillerin aksine tek bir bölgede yoğun bir absorpsiyon gösterirler (350-500 nm.). Bu tip çalışmalarda elde edilen spektrofotometrik bilgi pigment tanımlanmasının yanında bir bitki ekstresindeki pigmentlerin konsantrasyonlarının da belirlenmesinde kullanılır.

MATERYAL-METOD

- Bitki dokusu
- Aseton (%100)
- Havan
- Cam tozu
- Spektrofotometre
- Spektrofotometre küveti (cam; 1 ml)
- Susuz sodyum sülfat
- Filtre kağıdı

a) Pigmentlerin Ekstraksiyonu: Bu deney zayıf ışık altında tamamlanmalıdır. 0,5 g bitki dokusu alınır ve küçük parçalara ayrılır, havan içine yerleştirilir. 15 ml aseton ölçülür ve kap içine doldurulur, yaklaşık olarak 0,5 g cam tozu eklenir ve çözelti keskin yeşil bir renk alana kadar karıştırılır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra 1-2 g susuz sodyum sülfat ilave edilir, bu işlem ile su ekstreden uzaklaştırılır. Ekstre filtre kağıdından geçirilir ve hacmi ölçülür.

b) Pigment Konsantrasyonunun Hesaplanması: Ekstrenin klorofil ve karotenoid içeriğini belirlemek için çeşitli dalga boylarında (661.6, 644.8 ve 470 nm) ölçümler yapılmalıdır.

Pigment Konsantrasyonunun Hesaplanması:

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6}$$

$$C_{a+b} = 7.05A_{661.6} + 18.09A_{644.8}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.90C_a - 63.14C_b) / 214$$

C_a = Bitki ekstresindeki klorofil a konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_b = Klorofil b konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{a+b} = Total klorofil konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

C_{x+c} = Total karotenoid konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

Kendi deneyiniz için aşağıdaki bilgileri doldurup sonucu belirtiniz.

ÇALIŞMA MATERYALİ:

MİKTARI: g

EKSTRAKSİYONDA KULLANILAN ÇÖZÜCÜ HACMİ: ml

EKSTRE HACMİ (filtreden geçirdikten sonraki hacim) : ml

$A_{661.6} = \dots\dots\dots$ $A_{644.8} = \dots\dots\dots$ $A_{470} = \dots\dots\dots$

$C_a =$

$C_b =$

$C_{a+b} =$

$C_{x+c} =$

10. HAFTA: In Vivo Biyokimyasal Deneyler İçin Doku Lizatlarının Hazırlanması

Doku lizati, hücresel bileşenlerin analiz edilebilmesi için dokuların uygun yöntemlerle parçalanması ve içerdikleri biyomoleküllerin ekstrakte edilmesi işlemidir. Bu süreç, biyokimyasal analizler, protein profillemeye, enzim aktivite ölçümleri, western blot, ELISA, PCR ve proteomik çalışmalar gibi birçok deneysel teknikte kritik bir adımdır. Lizat hazırlanırken doku bütünlüğünün bozulması kontrollü bir şekilde sağlanmalı ve hedef moleküllerin korunmasına özen gösterilmelidir.

Doku Lizatı Hazırlama Aşamaları

1. Doku Örneğinin Toplanması ve Hazırlanması

Doku lizati hazırlama süreci, çalışılacak dokunun uygun koşullarda alınmasıyla başlar. Dokunun biyolojik aktivitesinin korunması için genellikle -80°C 'de veya sıvı azot içerisinde saklanması önerilir. Eğer taze doku kullanılacaksa, işlem hızlı bir şekilde yapılmalıdır. Doku örnekleri, lizis tamponu içerisine alınmadan önce küçük parçalara ayrılarak daha etkin bir ekstraksiyon sağlanır.

2. Lizis Tamponunun Seçimi ve Kullanımı

Lizis tamponu, hücresel bileşenlerin korunmasını sağlayan ve hücre zarının kontrollü bir şekilde parçalanmasını mümkün kılan bir çözelti olup, çalışmanın amacına göre seçilir. Genellikle lizis tamponları aşağıdaki bileşenleri içerir:

- Tuzlar: Hücresel ozmotik dengeyi korumak için (örneğin, Tris-HCl, PBS).
- Deterjanlar: Hücre zarını parçalayarak proteinleri çözünebilir hale getirmek için (Triton X-100, SDS, NP-40 gibi).
- Proteaz ve Fosfataz İnhibitörleri: Proteinlerin bozulmasını önlemek için eklenir.
- Şelatlayıcılar: Metal iyonlarını bağlayarak protein stabilitesini artırır (örneğin, EDTA).

Lizis tamponunun bileşimi, hedeflenen hücresel bileşene göre değişiklik gösterebilir. Örneğin, membran proteinleri için deterjan içeriği yüksek tamponlar kullanılırken, nükleer proteinler için hipotonik tamponlar tercih edilir.

3. Lizis Yöntemleri

Dokunun veya hücrelerin parçalanması çeşitli fiziksel, kimyasal veya enzimatik yöntemlerle sağlanabilir:

- Mekanik Yöntemler: Homojenizatörler, sonikatörler veya doku öğütücüleri kullanılarak doku fiziksel olarak parçalanır (Şekil 10.1).
- Kimyasal Yöntemler: Deterjanlar ve lizis tamponları kullanılarak hücre zarlarının çözünmesi sağlanır.
- Enzimatik Yöntemler: Lizozim, tripsin veya DNaz gibi enzimler kullanılarak hücre

yapıları kontrollü bir şekilde yıkılır.



Şekil 10.1 Homojenizatör

Çalışılan hücre tipine ve hedeflenen biyomoleküle bağlı olarak uygun lizis yöntemi seçilmelidir. Örneğin, nükleer proteinlerin ekstrakte edilmesi gerekiyorsa, hücre membranı öncelikle hipotonik tamponla şişirilerek parçalanır, ardından nükleer membran kontrollü bir şekilde bozulur.

4. Santrifüj ve Süpernatantın Toplanması

Lizis sonrası hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için genellikle santrifüj işlemi uygulanır. Bu işlem, süpernatantın (çözülmüş proteinler ve diğer hücresel bileşenleri içeren sıvı kısım) pelet (hücre kalıntıları) kısmından ayrılmasını sağlar. Santrifüj hızı ve süresi, hedef bileşene bağlı olarak değişebilir. Örneğin:

- Düşük hızda santrifüj (300-500 g, 5-10 dakika): Bütün hücreleri ve büyük hücre kalıntıları uzaklaştırmak için.
- Orta hızda santrifüj (10.000-15.000 g, 10-20 dakika): Organelleri veya büyük protein komplekslerini ayırtmak için.
- Yüksek hızda santrifüj (100.000 g ve üzeri, 1 saat): Membran ve sitozolik proteinlerin ayrımı için.

Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice toplanarak deneysel analizlerde kullanılmak üzere saklanır.

5. Örneklerin Saklanması ve Kullanımı

Elde edilen süpernatant, hedef moleküllerin stabilitesine bağlı olarak farklı sıcaklıklarda saklanabilir:

- Kısa süreli kullanım için: 4°C'de birkaç saat veya -20°C'de birkaç gün saklanabilir.
- Uzun süreli saklama için: -80°C'de dondurularak depolanır.

Protein içeriğinin korunması için lizata genellikle gliserol veya dondurucu koruyucu maddeler eklenir. Tekrar tekrar çözülme-donma döngüsünden kaçınılmalıdır, çünkü bu proteinlerin bozulmasına yol açabilir.

Doku lizatı hazırlama süreci, hücrel ve biyokimyasal analizlerin temel adımlarından biridir. Doğru lizis tamponu ve uygun lizis yöntemi seçimi, hücrel bileşenlerin korunması ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle her adım dikkatlice planlanmalı ve lizis koşulları yapılan deneylerin amacına uygun olacak şekilde optimize edilmelidir.

MATERYAL-METOD

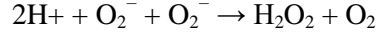
- Doku örneği
- Soğuk saf su
- Bistüri
- Tartım kabı
- Kloroform
- Etanol
- Santrifüj tüpü
- Homojenizatör

Deneyin yapıldığı gün derin dondurucudan (-80 °C) çıkarılan doku örnekleri soğuk serum fizyolojik (SF) ile yıkanır. Kurutma kâğıdı ile kurulan dokular, eşit parçaya ayrıldıktan sonra tartılarak herbir örneğin yaş doku ağırlığı kayıt edilir. SOD aktivite tayini yapılacak tüm dokular 1/10 oranında saf su ile soğuk su banyosunda homojenize edilir. Homojenat 7000 rpm de, +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilir. Alınan süpernatant 1/1 (hacim/hacim) olacak şekilde kloroform/etanol [3/5(v/v)] karışımıyla seyreltilerek tekrar 7000 rpm de +4 °C'de 2 saat santrifüj edilir. Çalışma yapılana kadar hazırlanan süpernatant - 80 dondurucuda muhafaza edilir.

11. HAFTA: Süperoksit Dismütaz Miktarı Tayini Deneyi

Fitokimyasallar, vitaminler ve enzimler gibi endojen ve eksojen antioksidanların çoklu türleri arasında, süperoksit dismutaz (SOD), dokulardaki ana katalitik antioksidandır. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), biyolojik sistemlerde bulunan ana reaktif oksijen türlerinden (ROS) biridir, kritik $O_2^{\cdot-}$ seviyeleri, antioksidan savunma sistemindeki bir eksiklikten dolayı ortaya çıkar, oksidatif hasara yol açar ve hücre hayatta kalmasını engeller.

Süperoksit dismutaz (SOD), $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu aşağıdaki gibi katalize eder.



Doku SOD aktivitesinin ölçümünde, Sun'un yöntemi kullanılacaktır. Yöntemin prensibi ksantin, ksantin oksidaz ile reaksiyona girip oksijen oluşturması, oluşan oksijenin NBT ile renkli bir bileşik meydana getirmesi ve bu rengin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır. Dokuda SOD aktivitesi ne kadar çok ise SOD dokudan o oranda $O_2^{\cdot-}$ ortadan kaldırır. Bu açıdan numune tüpündeki SOD ne kadar fazla ise tüpte oluşan renk o oranda açık olur.

MATERYAL-METOD

Kullanılan Reaktifler

Stok ksantin: mmol/l, 6-7 damla 2.5 N NaOH eklenir.

EDTA: 0.6 mmol/l

NBT: 150 μ mol/l

Na_2CO_3 : 400 mmol/l

BSA: 1 gr/l

$CuCl_2$: 0.8 mmol/l

Ksantin Oksidaz: 16.66 Ü/ml

Her bir numune tüpüne 2900 ml reaktif karışımı, 50 μ l numune, 50 μ l ksantin oksidaz eklenir. Kör olarak kullanılan tüpe 1425 ml reaktif karışımı, 50 μ l distile su ve 25 μ l ksantin oksidaz eklenir. Tüpler 25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 0,5 ml $CuCl_2$ eklenir ve 560 nm'de distile suya karşı absorbans ölçülür.

Yüzde İnhibisyonu = $\frac{\text{Körün ansorbansı} - \text{Testin absorbansı}}{\text{Körün ansorbansı}} \times 100$

Körün Absorbansı

Spesifik aktivite (SA) = $\frac{\text{Körün ansorbansı} - \text{Testin absorbansı}}{\text{Körün Absorbansı}} \times 20$

Körün Absorbansı

1 ünitelik aktivitenin %50 inhibisyon yaptığı düşünülerek hesaplama yapılır.

12. HAFTA: İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (TLC) bir fizikokimyasal ayırma yöntemidir. Yapılış tekniğine göre kağıt kromatografisine benzer. Bir reaksiyonda, reaksiyon karışımı ve başlangıç maddeleri beraberce kromatografiye uygulanarak devam eden reaksiyonlar hakkında bilgi almak istediğimizde veya bilinmeyen bir maddenin bilinen bir madde yardımıyla tanınmasını sağlayan çok basit bir yöntemdir. Çoğu kez saflık kontrolü için de yararlı bir metottur. Kolon kromatografisi ile saflaştırma öncesi kolon kromatografisinin şartlarını belirlemede kullanılan çok faydalı bir yöntemdir.



Şekil 12.1 TLC uygulama tankı ve plakalar

Bu kromatografi türünde sabit faz olarak silikajel(SiO_2), alüminyumoksit(Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyondur. Stasyonier faz olarak en çok kullanılan adsorbanlar silikajel, alüminyum oksit, kieselguhr, selüloz ve türevleri ile poliamidlerdir.

İnce tabaka kromatografisine özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silikajel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanmıştır. Bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi laboratuvarlarda hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20cm ile 20x20cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2mm arasındadır. Plakalar kullanılmadan önce 110°C 'deki etüvde 2 saat kurularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır (Şekil 12.1).

İnce tabaka kromatografisinde kullanılan mobil faz bir ya da bir kaç çözücünden ibaret olabilir. Adsorbsiyon kromatografisinde çözücüler elüsyon etkilerine göre yani sürüklenme güçlerine göre eluotrop seri olarak adlandırılan bir grup altında toplanmıştır ve bir çözücünün elüsyon etkisi polaritesi ile artmaktadır.

İnce tabaka kromatografisi 'nin Avantajları:

- 1- Kullanılan temel aletler oldukça basit ve ekonomik,
- 2- Ayırmlar oldukça hızlı (kolon ve kağıttan daha iyi),
- 4- Lekelerin belirlenmesi için korrosif reaktifler kullanılabilir,

- 5- Bir çok uygulama için kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar verir,
- 6- Çok değişik adsorban kullanma olanağı sunar,
- 7- Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (HPTLC) sistemi ile
 - a- Densitometrik kromatogram taraması,
 - b- Kantitatif hesaplama ve sonuçların yazdırılması mümkündür.

MATERYAL VE METOD:

Deneyde Kullanılacak Malzemeler:

- Kromatografi tankı
- %80 lik etil alkol
- Mor renkli boya çözeltisi
- Kapiler cam boru
- 1.5x7cm boyutunda silikajel kaplı alüminyum plaka

Deneyin Yapılışı:

- Mobil faz tank içinde 5-8 mm yüksekliğinde doldurulduktan sonra, tank iç duvarını çepeçevre saracak şekilde temiz bir süzgeç kağıdı yerleştirilir. Böylece tankın çözücü buharı ile doyması sağlanır.
- İnce tabaka kromatografisinde geliştirme aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilir.
- Bir itk tabakası yüksekliği 5-6 cm, genişliği yürütülecek noktaların aralarında 0,5 cm olacak şekilde, örnek sayısına yeterli olacak şekilde kesilir.
- Analizi yapılacak bileşiğin % 1-2'lik çözeltisi hazırlanır. En yaygın çözücü diklorometandır veya kloroformdur. Reaksiyon karışımı derişik ise uygun bir çözücü ile seyreltilebilir.
- İnceltilmiş kapiler ile her çözeltiden alınan örnekler tabakanın altından 1,0 cm yukarıda aynı hizada 0,5 cm aralıklı noktalara damlatılır.
- Hazırlanan plaka içinde 0,5 cm yükseklikte çözücü bulunan tanka, tabaka dik olarak yerleştirilip yukarıdan 0,3 cm kalana kadar sıvının yükselmesi beklenir. Plaka çıkarılıp üst çözücü seviyesi işaretlenerek, plaka önce çıplak gözle sonra UV ışık altında veya spreyle renklendirilerek incelenir ve değerlendirme yapılır.

Eğer ayrılan madde UV bölgede kendisi absorpsiyon yapıyorsa ya da 254 nm veya 366 nm dalga boyundaki UV ışımlanna tutulduklarındaki floresans gösteriyorsa kromatogramda lekelerin belirlenmesi basittir. Aksi halde maddelerin bir kimyasal reaksiyonla renkli türevlerinin oluşturulması işleminden yararlanılarak kromatograma bir belirteç püskürtülür ve madde lekeleri belirgin hale geti getirilir. Bazı durumlarda biyolojik yöntemlerle de lekeler ortaya çıkarılabilir.