



**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE
GENETİK BÖLÜMÜ
BİYOKİMYA LABORATUVARI
LABORATUVAR KILAVUZU**

2025-2026 BAHAR DÖNEMİ

DERSİN SORUMLUSU
Arş. Gör. Dr. Fatma Şayan POYRAZ

LABORATUVAR SORUMLULARI
Arş. Gör. Dr. 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 Çözeltiler	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	

2025-2026 BAHAR YARIYILI LABORATUVAR DENEYLERİ NOT KATKI DAĞILIMI

Hafta	Tarih	Konular	Hazırlanacak Rapor No	Ders notuna katkısı
1	26.02.2026 (Gr 1,2,3)	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme		
2	05.03.2026 (Gr 1,2,3)	Çözelti Hazırlanması ve Biyokimyasal Hesaplamalar	1	%4
3	12.03.2026 (Gr 1,2,3)	pH Kavramı ve Tampon Çözeltiler	2	%4
4	19.03.2026 (Gr 1,2,3)	Ramazan Bayramı		
5	26.03.2026 (Gr 1,2,3)	Spektrofotometrik yöntem ile standart eğri hazırlama	3	%4
6	02.04.2026 (Gr 1,2,3)	Kantitatif Askorbik Asit (C Vitamini) Analizi	4	%4
7	09.04.2026 (Gr 1,2,3)	Aminoasitlere özgü reaksiyonlar : Ksantoprotein (Becher) Deneyi, Hopkins-Cole Deneyi	5	%4
8	16.04.2026 (Gr 1,2,3)	Vize Haftası		
9	23.04.2026 (Gr 1,2,3)	Ulusal Egemenlik ve Çocuk Bayramı		
10	30.04.2026 (Gr 1,2,3)	Proteinlere özgü reaksiyonlar : Bradford ve Lowry Deneyi	6	%4
11	07.05.2026 (Gr 1,2,3)	Kanda Hemoglobin Tayini	7	%4
12	14.05.2026 (Gr 1,2,3)	Bitkilerden pigment izolasyonu: Klorofil ve karotenoid tayini	8	%4
13	21.05.2026 (Gr 1,2,3)	In Vivo Biyokimyasal Deneyler İçin Doku Lizatlarının Hazırlanması ve MDA Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini Deneyi	9	%4
14	28.05.2026 (Gr 1,2,3)	Kurban Bayramı		
15	04.06.2026 (Gr 1,2,3)	İnce Tabaka Kromatografisi	10	%4
16	11.06.2026 (Gr 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:

- Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
- Mutlaka laboratuvar önlüğü giyiniz. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız. Çalışmayı engelleyecek ve tehlike oluşturabilecek takı ve aksesuarlar çıkarılmalıdır.
- Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
- Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
- Kullandığınız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
- Steril metod gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
- Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz
- Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru kaplara doğru şekillerde atınız.
- Laboratuvarda bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız.
- Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
- Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken mutlaka çeker oakta çalışınız ve kapların ağzını hemen kapatınız.
- İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.
- Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
- Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.

ÖRNEK RAPOR KAPAĞI TASARIMI

	YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ MBG BİYOKİMYA LABORATUVARI SONUÇ RAPORU 2025-2026 BAHAR	
---	---	---

Kanda Hemoglobin Tayini

DENEY SORUMLUSU :

RAPOR TESLİM TARİHİ:

DENEY GRUBU:

Öğrencinin Adı – Soyadı	Öğrencinin Numarası	Öğrencinin İmzası

Laboratuvar Raporu Deęerlendirme Őeması

Rapor Kısmı	Deęerlendirme Puanı
Kapak Tasarımı	10
Yazım Kurallarına Uygunluk	10
Giriő	10
Materyal-Metod	10
Deney Verileri ve �izim	20
Sonuç ve Tartıőma	30
Kaynakça	10

Dönem Sonu Not Deęerlendirme Dağılımı

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

1. HAFTA: LABORATUVAR TANITIMI, DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ GÜVENLİK PROTOKOLLERİ VE DERSİN İŞLEYİŞİNE YÖNELİK BİLGİLENDİRME

Dersin Değerlendirilme Sistemi:

Dersin değerlendirilmesinde 1 ara sınav, 1 final yapılacak ve her hafta grupça yazılan deney raporlarının ortalaması 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. Devamsızlığı olan öğrencilerin en az 3 günlük iş göremez durumunu belirten sağlık raporu ile telafi deneylerine katılması mümkündür.

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 çalışmalarından önce **FR-1968 nolu Yıldız Teknik Üniversitesi Laboratuvarlarda Güvenli Çalışma Talimatı Formu**'nu detaylıca okumanız ve imzalayarak ders sorumlusuna vermeniz gerekmektedir.

Deneyler esnasında bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığınız 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.

2. HAFTA: ÇÖZELTİ HAZIRLANMASI VE BİYOKİMYASAL HESAPLAMALAR

İki veya daha fazla maddenin moleküler ya da iyonik düzeyde homojen olarak dağılmasıyla oluşan karışımlar **çözelti** olarak tanımlanır. Çözeltiyi oluşturan bileşenlerden miktarca fazla olan ve dağılım ortamını oluşturan madde **çözücü (çözen)**, çözücü içerisinde dağılan diğer madde ise **çözünen** olarak adlandırılır [1].

Bir maddenin **çözünürlüğü**, belirli bir sıcaklık ve basınç altında, belirli miktardaki çözücü içerisinde çözünebilen maksimum madde miktarı olarak tanımlanır. Katı veya sıvı maddelerin çözünürlüğü genellikle **100 gram çözücü başına çözünen maddenin gram cinsinden miktarı** ile ifade edilir [2]. Çözeltide bulunan çözünen miktarının az olduğu durumlarda çözelti **seyreltik**, fazla olduğu durumlarda ise **derişik (konsantre)** olarak nitelendirilir.

Bir çözücünün çözebileceği maksimum miktardan daha az çözünen içeren çözeltiler **doymamış çözelti** olarak adlandırılır. Buna karşılık, çözünen maddenin çözünürlük sınırına ulaştığı ve daha fazla maddenin çözülemediği çözeltiler **doymuş çözelti** olarak tanımlanır [3].

Çözücü ve çözünenin fiziksel hâllerine göre çözeltiler farklı sınıflara ayrılmaktadır. Kimyada yaygın olarak karşılaşılan çözelti türleri şunlardır:

- **Sıvı içinde sıvı çözeltiler** (örneğin su-alkol çözeltileri),
- **Sıvı içinde katı çözeltiler** (örneğin sodyum klorürün suda çözünmesiyle oluşan tuzlu su),
- **Sıvı içinde gaz çözeltiler** (örneğin amonyanın suda çözünmesiyle oluşan sulu amonyak) [1,4].

Bir çözeltide, belirli miktardaki çözücü veya çözelti içerisinde çözünmüş madde miktarını ifade eden kavrama **derişim (konsantrasyon)** adı verilir ve genellikle **C** sembolü ile gösterilir. Çözelti derişimi, çözeltilerin nicel olarak karşılaştırılabilmesi açısından kimyada büyük önem taşımaktadır [2].

$$M = \frac{n}{V}$$

Burada;

C = Çözeltinin derişimini,

m_{Çözünen} = Çözünen miktarını,

V_{Çözelti} = Çözünen + çözücü miktarını vermektedir.

Çözeltilerin nicel olarak ifade edilebilmesi için kullanılan **derişim türleri**, esas alınan büyüklüğe göre **hacim bazlı, kütle bazlı ve mol bazlı** olmak üzere üç ana grupta incelenir [1].

Hacim Bazındaki Derişimler

Hacim bazlı derişimler, çözünen madde miktarının çözelti hacmine oranlanması esasına dayanır. Bu gruba giren başlıca derişim türleri şunlardır:

- Molarite (M),
- Normalite (N),
- Hacimce yüzde (% v/v) ve kütlece–hacimce yüzde (% m/v) derişimlerdir [3].

Kütle Bazındaki Derişimler

Kütle bazlı derişimler, çözünen madde miktarının çözücü veya çözelti kütlesine oranlanması ile tanımlanır. Bu derişim türleri özellikle sıcaklık değışimlerinden etkilenmemeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Kütle bazındaki başlıca derişimler şunlardır:

- Kütlece yüzde (% m/m),
- Molalite (m),
- Milyonda bir (ppm),
- Milyarda bir (ppb) [1,5].

Mol Bazındaki Derişimler

Mol bazlı derişimler, çözeltiyi oluşturan bileşenlerin mol sayıları esas alınarak tanımlanır. Bu grupta yer alan derişim türleri şunlardır:

- Molce yüzde,
- Mol kesri.

Mol kesri, özellikle buhar basıncı, kaynama noktası yükselmesi ve donma noktası alçalması gibi **fizikokimyasal özelliklerin** incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

Molar Çözeltiler ve Molarite

Bir litresinde **1 mol çözünen madde** bulunan çözeltiler **molar çözelti** olarak adlandırılır. Çözeltilerin molar derişimini ifade eden **molarite (M)**, bir litre (1000 mL) çözeltide bulunan çözünen maddenin mol sayısı olarak tanımlanır [3]. Molarite aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir:

$$M = \frac{n}{V}$$

Burada; n= çözünen maddenin mol sayısını, V= çözeltilinin litre cinsinden hacmini göstermektedir. Molarite, çözelti hacmine bağı bir derişim türü olduğundan, sıcaklık değışimlerinden etkilenmektedir [1].

Molal (m) Çözeltiler

Molalite (m), bir çözeltide bulunan çözünen maddenin mol sayısının, çözücünün kilogram cinsinden kütlesine oranı olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle, **1000 gram (1 kg) çözücü içerisinde çözünmüş maddenin mol sayısı** molaliteyi verir ve **m** sembolü ile gösterilir [5].

Molalitenin molariteden en önemli farkı, derişimin hesaplanmasında **çözelti hacminin değil, yalnızca çözücü kütlesinin** esas alınmasıdır. Bu nedenle molalite, sıcaklık değışimlerinden etkilenmeyen bir derişim türüdür. Oysa molarite, çözelti hacmine bağı olduğundan sıcaklığa duyarlıdır [1].

Molalite aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir:

$$m = \frac{n}{m_{\text{çözücü}}}$$

Burada; n = çözünen maddenin mol sayısını, $m_{\text{çözücü}}$ = çözücünün kilogram (kg) cinsinden kütesini göstermektedir.

Normalite (N), bir çözeltinin derişiminin, **1 litre çözelti içerisinde bulunan çözünen maddenin eşdeğer (ekivalan) sayısı** cinsinden ifade edilmesidir. Normalite, özellikle **asit–baz**, **redoks** ve **çökelme** tepkimelerinde çözelti derişimini tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır ve **N** sembolü ile gösterilir [3].

Normal çözeltilerin hazırlanmasında, çözünen maddenin **eşdeğer kütesinin** doğru şekilde hesaplanması temel öneme sahiptir. Eşdeğer kütle, bir maddenin kimyasal tepkimedeki **tesir değerliğine (valans veya n-faktörü)** bağlı olup, aşağıdaki bağıntı ile tanımlanır [1]:

$$\text{Eşdeğer kütle} = \frac{\text{Molar kütle}}{\text{Tesir değeri (n-faktörü)}}$$

Normalite ise çözünen maddenin eşdeğer sayısı (n_{eq}) ve çözeltinin litre cinsinden hacmi (V) kullanılarak aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$N = \frac{n_{eq}}{V}$$

Burada; n_{eq} = çözünen maddenin eşdeğer sayısını, V = çözeltinin litre cinsinden hacmini göstermektedir. Normalite, tepkime türüne bağlı olarak değişebilen bir derişim birimi olup, aynı maddenin farklı tepkimelerde farklı normalite değerlerine sahip olabildiği mümkündür [2,3].

Tesir değeri (t), bir maddenin kimyasal tepkimelerde katıldığı etkin birim sayısını ifade eden bir kavramdır. Asit–baz tepkimeleri açısından değerlendirildiğinde; asitlerin ortamda verebildiği hidrojen iyonu (H^+) sayısı ve bazların ortamda verebildiği hidroksit iyonu (OH^-) sayısı, o maddenin tesir değerliğini belirler [1]. Bu bağlamda, molekül yapısında tek bir H^+ iyonu içeren HCl, HNO_3 ve CH_3COOH gibi asitler ile tek bir OH^- iyonu içeren NaOH ve KOH gibi bazların tesir değeri 1’dir. Bu tür maddelerde eşdeğer (ekivalan) ağırlık, maddenin formül (molar) ağırlığına eşittir. Buna karşılık, yapısında iki H^+ iyonu bulunan H_2SO_4 gibi asitlerde tesir değeri 2 olup, bu maddelerin eşdeğer ağırlığı formül ağırlığının yarısına eşittir [5]. Tuzlar açısından tesir değeri, maddenin tepkime sırasında ortama verdiği veya ortamdan aldığı elektron sayısı ile ilişkilidir.

Örneğin, NaCl ve $AgNO_3$ gibi tuzlarda tesir değeri 1 olduğundan, bu maddelerin eşdeğer ağırlıkları formül ağırlıklarına eşittir. Buna karşılık, $BaCl_2$ ve $MgSO_4$ gibi iki değerli iyon içeren tuzlarda tesir değeri 2 olup, bu maddelerin eşdeğer ağırlıkları formül ağırlığının yarısı olarak hesaplanır [1,3].

Yüzde Derişim

Yüzde derişim, **bir çözeltinin 100 birimi içerisinde bulunan çözünen madde miktarını ifade eden derişim türüdür ve % sembolü ile gösterilir. Yüzde derişim, çözünen ve çözeltinin kütle veya**

hacim esasına göre tanımlanmasına bağlı olarak üç farklı şekilde ifade edilir [1].

Ağırlıkça yüzde, 100 ağırlık birimi (g, kg, mg, ton vb.) **çözeltili** içerisinde bulunan çözünen maddenin ağırlık birimi cinsinden miktarını ifade eder. Bu derişim türü aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

$$\% (m/m) = \frac{\text{Çözünenin kütlesi}}{\text{Çözeltinin kütlesi}} \times 100$$

Ağırlıkça yüzde derişim, sıcaklık değışimlerinden etkilenmeyen bir derişim türüdür [5].

Hacimce yüzde, 100 hacim birimi (mL, L, m³ vb.) **çözeltili** içerisinde bulunan çözünen maddenin hacim birimi cinsinden miktarını ifade eder. Hacimce yüzde aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır:

$$\% (v/v) = \frac{\text{Çözünenin hacmi}}{\text{Çözeltinin hacmi}} \times 100$$

Bu derişim türü genellikle sıvı-sıvı çözeltiler için kullanılmaktadır [1].

Hacim-ağırlıkça yüzde, 100 hacim birimi (genellikle mL) **çözeltili** içerisinde bulunan çözünen maddenin ağırlık birimi cinsinden miktarını ifade eder. Bu derişim türü aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

$$\% (m/v) = \frac{\text{Çözünenin kütlesi (g)}}{\text{Çözeltinin hacmi (mL)}} \times 100$$

Hacim-ağırlıkça yüzde derişim, özellikle **katı maddelerin sulu çözeltileri için** yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

Mol Kesri

Mol kesri, bir çözeltilde bulunan herhangi bir bileşenin mol sayısının, çözeltildeki toplam mol sayısına oranı olarak tanımlanan boyutsuz bir derişim büyüklüğüdür ve X sembolü ile gösterilir [2]. A, B, C, ... gibi bileşenlerden oluşan bir çözeltilde, herhangi bir A bileşenin mol kesri aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir:

$$X_A = \frac{n_A}{n_{\text{toplam}}}$$

Burada; n_A= A bileşenin mol sayısını, n_{toplam}= çözeltildeki tüm bileşenlerin mol sayılarının toplamını göstermektedir. Çözeltilde bulunan tüm bileşenlerin mol kesirlerinin toplamı **daima bire eşittir** ve aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$X_A + X_B + X_C + \dots = 1$$

Mol kesri, özellikle buhar basıncı, Raoult yasası, faz dengeleri ve diğer fizikokimyasal hesaplamalarda yaygın olarak kullanılan temel bir derişim ifadesidir [1].

PPM (Milyonda Bir) ve PPB (Milyarda Bir) Çözeltileri

PPM (parts per million, milyonda bir) ve PPB (parts per billion, milyarda bir), özellikle çok düşük derişimlerdeki çözeltilerin ifade edilmesinde kullanılan derişim birimleridir. Bu derişim türleri çevre kimyası, analitik kimya, biyokimya ve toksikoloji gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [1].

PPM, bir çözeltilin **1.000.000 birimi içerisinde bulunan çözünen madde miktarını** ifade eder. Genellikle çok seyreltik çözeltiler için kullanılır. Kütle esasına göre ppm şu şekilde tanımlanır:

$$\text{ppm} = \frac{\text{Çözünenin kütlesi}}{\text{Çözeltinin kütlesi}} \times 10^6$$

Sulu çözeltiler için, yoğunluk yaklaşık olarak 1 g/mL kabul edildiğinde, 1 ppm = 1 mg/L olarak kabul edilebilmektedir. Bu nedenle, suda çözülmüş maddelerin derişimleri çoğu zaman mg/L cinsinden ppm olarak ifade edilir [5].

PPB, bir çözeltinin **1.000.000.000 birimi içerisinde bulunan çözünen madde miktarını** ifade eder. PPM'den daha düşük derişimlerin tanımlanmasında kullanılır. Kütle esasına göre ppb aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir:

$$\text{ppb} = \frac{\text{Çözünenin kütlesi}}{\text{Çözeltinin kütlesi}} \times 10^9$$

Sulu çözeltiler için yaklaşık olarak 1 ppb = 1 µg/L olarak kabul edilir [1].

PPM ve PPB derişim birimleri özellikle: İçme sularındaki ağır metal miktarlarının belirlenmesinde, hava ve su kirliliği analizlerinde, gıda ve ilaçlardaki iz miktarların tayininde, toksik maddelerin güvenli sınırlarının ifade edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

Çözeltilerin Seyreltilmesi

Çözeltiler, laboratuvar uygulamalarında çoğunlukla **derişimi bilinen stok çözeltilerden** hazırlanır. Seyreltme işlemi, stok çözeltiden hesaplanan hacimde çözelti alınarak, uygun hacimde seçilmiş bir balon joje içerisine aktarılması ve üzerine, joje üzerindeki işaret çizgisine kadar **çözücü eklenmesi** esasına dayanır. Bu işlem sonucunda, başlangıçtaki çözeltiye kıyasla daha **seyreltik** bir çözelti elde edilir [3]. Seyreltme hesaplarının temelinde, stok çözeltiden alınan çözünen maddenin mol sayısı ile seyreltme sonrası elde edilen çözeltide bulunan çözünen maddenin mol sayısının eşit olması ilkesi yer alır. Bu durum aşağıdaki genel eşitlik ile ifade edilir:

$$(\text{Stok derişim}) \times (\text{Stok hacmi}) = (\text{İstenen derişim}) \times (\text{İstenen hacim})$$

Hesaplamalarda, eşitliğin her iki tarafında kullanılan **derişim ve hacim birimlerinin aynı olmasına dikkat edilmelidir**. Çözelti derişimleri çoğunlukla molarite (M) veya normalite (N) cinsinden ifade edildiğinden, seyreltme bağıntısı aşağıdaki kısaltılmış formlar ile yazılabilir [1]:

$$M_1V_1 = M_2V_2 \quad \text{veya} \quad N_1V_1 = N_2V_2$$

MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Hassas terazi, spatül, distile su, tartım kabı, piset, mezür, erlen, çözelti şişesi, manyetik karıştırıcı, manyetik balık.

Deneyin Yapılışı:

Hacimce %70'lik 50 ml alkol çözeltisi hazırlanması:

1. Çözünen madde miktarını uygun eşitlikleri kullanarak bulunuz.
2. Hesapladığınız miktar kadar alkolü mezür ile ölçünüz.
3. Pisette bir miktar saf su ekleyip alkolün homojen bir şekilde çözünmesini sağlayınız.
4. Alkol tamamen çözündükten sonra piset yardımıyla toplam hacmi 50 ml'ye tamamlayınız ve çözeltiyi etiketleyerek bir şişeye aktarınız.

50 ml 2M NaOH çözeltisinin hazırlanması:

1. Çözünen madde miktarını uygun eşitlikleri kullanarak bulunuz.
2. Hesapladığınız miktar kadar NaOH'i hassas terazide tartınız ve bir erlene aktarınız.
3. Üzerine 50 ml su ilave ederek manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırınız.
4. Çözeltinizi temiz ve kuru olan, etiketlenmiş uygun çözelti şişesine aktarınız.

50 ml 1 M HCl çözeltisinin hazırlanması:

1. Yoğunluğu yaklaşık olarak 1,18 g/mL, %38'lik stok HCl çözeltisinin ana konsantrasyonunu hesaplayınız ve seyreltme için gerekli hesaplamaları yapınız.
2. Hesaplanan miktarda asit çözeltisini ana stoktan alarak 50 ml su üzerine yavaş yavaş damlatarak ilave ediniz ve çözeltiyi homojen hale gelene kadar karıştırınız.
3. Hazırlanan çözeltiyi temiz ve kuru olan uygun çözelti şişesine etiketleyerek aktarınız.

KAYNAKÇA

1. Chang, R., & Goldsby, K. (2016). *Chemistry* (12th ed.). McGraw-Hill Education.
2. Atkins, P., & de Paula, J. (2014). *Physical Chemistry* (10th ed.). Oxford University Press.
3. Petrucci, R. H., Herring, F. G., Madura, J. D., & Bissonnette, C. (2017). *General Chemistry: Principles and Modern Applications* (11th ed.). Pearson Education.
4. Zumdahl, S. S., & Zumdahl, S. A. (2018). *Chemistry* (10th ed.). Cengage Learning.
5. Brown, T. L., LeMay, H. E., Bursten, B. E., Murphy, C., Woodward, P., & Stoltzfus, M. (2018). *Chemistry: The Central Science* (14th ed.). Pearson.

3. HAFTA: pH Kavramı ve Tampon Çözeltiler

pH kavramı, ilk kez 1909 yılında Søren Peter Lauritz Sørensen tarafından, bir çözeltideki **hidrojen iyonu (H⁺) molar konsantrasyonunun negatif logaritması** olarak tanımlanmıştır [1]. Bu tanıma göre pH, çözeltilerin asidik veya bazik özelliklerini nicel olarak ifade eden logaritmik bir büyüklüktür ve aşağıdaki eşitlik ile gösterilir:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

Saf su için, 25 °C sıcaklıkta hidrojen ve hidroksit iyonlarının molar derişimleri eşittir ve her biri $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L'dir. Bu durumda saf suyun pH değeri 7 olarak hesaplanmaktadır [2]. pH değeri azaldıkça çözeltideki hidrojen iyonu derişimi artmakta, pH değeri arttıkça ise hidrojen iyonu derişimi azalmaktadır. Bu nedenle pH ölçeği, asitlik ve bazlık derecesinin ters orantılı olarak ifade edildiği bir ölçektir (Şekil 3.1). **Asit–baz tanımları, Brønsted–Lowry teorisine göre yapılmaktadır.** Buna göre;

- Asitler, proton (H⁺) veren maddeler,
- Bazlar ise proton (H⁺) alan maddeler olarak tanımlanır [3].

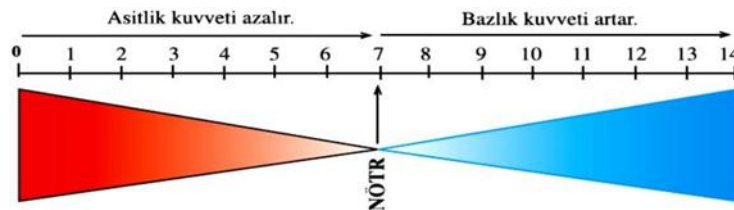
Kuvvetli asitler (örneğin HCl, H₂SO₄), sulu çözeltilerinde tamamen iyonlaşmış durumda bulunurken; zayıf asitler, çözeltilerinde kısmen iyonlaşmaktadır. Aynı durum bazlar için de geçerli olup, kuvvetli bazlar tamamen, zayıf bazlar ise kısmen iyonlaşır [2]. Canlı sistemlerde, özellikle vücut sıvılarının büyük bir kısmı, pH değışimlerine duyarlı olan zayıf asit–baz sistemleri içermektedir. Bu özellik, biyolojik ortamda asit–baz dengesinin korunması açısından büyük önem taşımaktadır [4].

pH Ölçeği ve Asit–Baz Sınıflandırması

Asit ve bazların asitlik veya bazlık dereceleri, çözeltilerin pH değerleri ile nicel olarak ifade edilebilir. Maddelerin asidik ya da bazik özelliklerini gösteren bu logaritmik ölçeğe pH ölçeği adı verilir. pH değerlerinin ölçümünde kullanılan cihaza ise pH metre denilmektedir [2]. pH ölçeği, **25 °C sıcaklıkta** teorik olarak **0 ile 14** arasında değerler almaktadır. Bu aralık, sulu çözeltilerde hidrojen iyonu derişiminin logaritmik değışimini yansıtmaktadır (Şekil 3.1) [3]. pH değerlerine göre çözeltiler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- **pH < 7** olan çözeltiler **asidik çözeltiler** olarak tanımlanır.
- **pH = 7** olan çözeltiler **nötr çözeltiler** olarak adlandırılır.
- **pH > 7** olan çözeltiler ise **bazik (alkalik) çözeltiler** olarak sınıflandırılır.

pH değeri azaldıkça çözeltinin asitlik derecesi artmakta, pH değeri arttıkça ise bazlık derecesi artmaktadır. Bu nedenle, pH değeri 1 olan bir çözelti, pH değeri 2 olan bir çözeltiden **on kat daha asidiktir** [2,4].



Şekil 3.1 pH'a göre asitlik-bazlık kuvveti

Asit ve Bazların Kuvveti

Asitlerin ve bazların kuvveti, sulu çözeltilerdeki iyonlaşma derecelerine (yüzdelere) bağlıdır. Bir asidin iyonlaşma yüzdesi arttıkça, asitlik kuvveti de artmaktadır. Benzer şekilde, bazların kuvveti de suda iyonlaşarak oluşturdukları hidroksit iyonu (OH^-) miktarına bağlıdır [2]. Bir asidin iyonlaşma derecesi, molekül yapısındaki asitlik hidrojeninin (H^+) moleküle bağlanma kuvveti ile doğrudan ilişkilidir. Asitlik hidrojeninin moleküle bağlanma kuvveti zayıf olan asitlerde, bu hidrojen iyonu molekülden daha kolay ayrılmakta ve iyonlaşma daha yüksek olmaktadır. Buna karşılık, hidrojenin moleküle bağlanma kuvveti arttıkça iyonlaşma derecesi azalır [3]. Suda çözündüklerinde tamamen veya %100'e çok yakın oranlarda iyonlaşan asitler kuvvetli asit olarak tanımlanır. HCl ve H_2SO_4 bu gruba örnek verilebilir. Buna karşılık, sulu çözeltilerinde çok az oranda iyonlaşan asitler ise zayıf asit olarak adlandırılır (örneğin CH_3COOH) [2]. Kuvvetli bir asit olan HCl , sulu çözeltisinde tamamen iyonlaştığından, çözeltideki H^+ iyonlarının molar derişimi, HCl 'nin molar derişimine eşittir. Benzer şekilde, kuvvetli bir baz olan KOH , suda tamamen iyonlaştığı için çözeltideki OH^- iyonlarının molar derişimi, KOH 'nin molar derişimine eşit olmaktadır [5].

Asit–Baz İndikatörleri

Asit ve bazların tepkimeleri sonucunda oluşan ortamın **asidik**, **bazik** veya **nötr** olup olmadığını belirlemek amacıyla **asit–baz indikatörleri** kullanılır. İndikatörler, ortamın pH değerine bağlı olarak **renk değiştirebilen organik maddeler**dir [3]. Her indikatör, belirli bir pH aralığında renk değişimi gösterir ve bu özellikleri sayesinde çözeltinin yaklaşık pH değeri hakkında bilgi verir. Örneğin, fenol kırmızısı indikatörü:

- pH < 6,6 olduğunda sarı,
- pH 6,6 – 8,2 aralığında portakal rengi,
- Daha yüksek pH değerlerinde ise kırmızı renk vermektedir [2].

Bu nedenle indikatör seçimi, incelenen çözeltinin tahmini pH aralığına göre yapılmalıdır. Aşağıdaki tabloda bazı yaygın asit–baz indikatörleri ve etkili oldukları pH aralıkları verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Yaygın asit–baz indikatörleri ve etkili oldukları pH aralıkları

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

Asit–baz titrasyonu, derişimi bilinen bir asit veya baz çözeltisinin, derişimi bilinmeyen bir baz veya asit çözeltisi ile kontrollü biçimde tepkimeye sokulması yoluyla bilinmeyen derişimin hesaplanmasına dayanan kantitatif bir analiz yöntemidir [2]. Titrasyon işlemi sırasında, derişimi bilinen çözeltiye **titrant**, derişimi bilinmeyen çözeltiye ise **analit** adı verilir. Titrasyon, asit ve bazın **stokiyometrik** olarak **tamamen tepkimeye girdiği noktaya**, yani **eşdeğerlik noktasına** kadar sürdürülür.

Eşdeğerlik noktasının deneysel olarak belirlenmesinde genellikle asit–baz indikatörleri veya pH metre kullanılır [5].

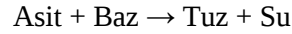
Asit–baz titrasyonları, kullanılan asit ve bazın kuvvetine bağlı olarak farklı türlere ayrılır:

- Kuvvetli asit – kuvvetli baz titrasyonu
- Kuvvetli asit – zayıf baz titrasyonu,
- Zayıf asit – kuvvetli baz titrasyonu,
- Zayıf asit – zayıf baz titrasyonu.

Her titrasyon türünde eşdeğerlik noktasındaki pH değeri farklılık göstermektedir [2].

Nötrleşme Tepkimeleri

Nötrleşme, bir asit ile bir bazın tepkimeye girerek tuz ve su oluşturması olayıdır. Brønsted–Lowry asit–baz tanımına göre bu tepkimede, asit proton (H^+) verirken baz proton almaktadır [3]. Genel bir nötrleşme tepkimesi aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:



Kuvvetli asit–kuvvetli baz nötrleşmelerinde oluşan çözelti genellikle nötr ($pH \approx 7$) olurken, zayıf asit veya zayıf baz içeren tepkimelerde oluşan çözelti asidik veya bazik özellik gösterebilir [5].

Amfoterlik

Amfoter maddeler, bulundukları ortama bağlı olarak **hem asit hem de baz gibi davranabilen** maddelerdir. Bu tür maddeler, Brønsted–Lowry teorisine göre hem proton verebilme hem de proton alabilme özelliğine sahiptir [2]. Amfoter maddelere en yaygın örnek su (H_2O)’dur. Su; asidik ortamda proton alarak baz, bazik ortamda proton vererek asit gibi davranır. Bunun dışında, $Al(OH)_3$, $Zn(OH)_2$ gibi bazı metal hidroksitler ve HCO_3^- gibi iyonlar da amfoter özellik göstermektedir. Amfoterlik, özellikle asit–baz dengeleri, tampon çözeltiler ve biyokimyasal sistemlerin anlaşılmasında önemli bir kavramdır [6].

Tampon Çözeltiler

Tampon çözeltiler, ortama az miktarda asit veya baz eklendiğinde ya da seyreltildiğinde, pH değişimini büyük ölçüde engelleyebilen çözeltilerdir. Bu özellikleri sayesinde tampon çözeltiler, özellikle biyokimyasal sistemlerde, analitik kimyada ve endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. Bir tampon çözelti genellikle zayıf bir asit ile onun eşlenik bazından (örneğin CH_3COOH/CH_3COO^-), ya da zayıf bir baz ile onun eşlenik asidinden (örneğin NH_3/NH_4^+) oluşur [5]. Tampon çözeltilerin pH değeri, zayıf asit veya bazın iyonlaşma dengesi ile belirlenir ve Henderson–Hasselbalch denklemi ile ifade edilir.

- Zayıf asit tamponları için:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{eşlenik baz}]}{[\text{asit}]}$$

- Zayıf baz tamponları için:

$$pOH = pK_b + \log \frac{[\text{eşlenik asit}]}{[\text{baz}]}$$

Tampon Kapasitesi

Tampon kapasitesi, bir tampon çözeltinin pH değerinde önemli bir değişiklik olmadan nötralize edebileceği asit veya baz miktarının bir ölçüsüdür. Başka bir ifadeyle, tampon kapasitesi bir tamponun

pH değişimine karşı direnç gücünü ifade eder [2]. Tampon kapasitesini etkileyen başlıca faktörler şunlardır:

1. **Tampon bileşenlerinin derişimi:** Asit ve eşlenik bazın (veya baz ve eşlenik asidin) toplam derişimi arttıkça tampon kapasitesi artar.
2. **Asit–baz oranı:** Tampon kapasitesi, pH değeri pKa’ya en yakın olduğunda maksimumdur.
3. **Eklenecek asit veya bazın miktarı:** Tampon kapasitesi sınırlıdır; belirli bir miktardan sonra tampon etkisi ortadan kalkar [5].

Bir tampon çözeltinin en etkili olduğu pH aralığı, genellikle $pK_a \pm 1$ aralığıdır. Bu aralık dışında tamponlama etkisi önemli ölçüde azalır [3].

Tampon kapasitesi “ β ” ile gösterilir. Bir tamponun kapasitesi yalnız konjuge asit-baz çiftinin toplam konsantrasyonuna bağlı 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.

MATERYAL VE 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.

Deneyin Yapılışı;

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 temiz bir erlene aktarılır ve üzerine 100 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
4. Maddeler tamamen çözünüp, homojen çözelti elde edildikten sonra çözelti pH’ı 7,4’e ayarlanır.

KAYNAKÇA

1. Sørensen, S. P. L. (1909). *Enzyme studies II: The measurement and meaning of hydrogen ion concentration*. Biochemische Zeitschrift, **21**, 131–304.
2. Chang, R., & Goldsby, K. (2016). *Chemistry* (12th ed.). McGraw-Hill Education.
3. Atkins, P., & de Paula, J. (2014). *Physical Chemistry* (10th ed.). Oxford University Press.
4. Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2016). *Textbook of Medical Physiology* (13th ed.). Elsevier.
5. Petrucci, R. H., Herring, F. G., Madura, J. D., & Bissonnette, C. (2017). *General Chemistry: Principles and Modern Applications* (11th ed.). Pearson Education.
6. Harris, D. C. (2015). *Quantitative Chemical Analysis* (9th ed.). W. H. Freeman and Company.

4.HAFTA: SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE STANDART EĞRİ HAZIRLAMA

Bir çözelti içerisinde miktarı bilinmeyen bir bileşenin nicel analizi, maddenin ultraviyole (UV) ve görünür (Vis) bölgedeki ışığı soğurma davranışından yararlanılarak gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde, örneğin belirli bir dalga boyundaki absorpsiyon değeri ölçülerek, çözelti içerisindeki madde miktarı tayin edilir [1].

Spektroskopinin Tanımı ve Temel İlkeleri

Spektroskopi, en genel anlamıyla, ışık (bazı sistemlerde ses dalgaları veya elektronlar) ile madde arasındaki etkileşimin, dalga boyu veya frekansın bir fonksiyonu olarak incelenmesi bilimidir. Diğer bir tanıma göre spektroskopi; bir örnekte bulunan atom, molekül veya iyonların enerji düzeyleri arasında geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Atom, molekül veya iyonların elektromanyetik ışınım ile etkileşmesi sonucunda:

Dönme (rotasyonel), Titreşim (vibrasyonel) ve Elektronik enerji düzeylerinde geçişler meydana gelir. Bu enerji düzeyi değişimleri, spektroskopik yöntemlerin temelini oluşturmaktadır [2].

Organik moleküllerin elektromanyetik ışınımı soğurması; molekülde bulunan atomların türüne, bağlanma şekillerine, molekülün geometrisine, büyüklüğüne ve elektronik yapısına bağlıdır. Bu nedenle spektroskopik yöntemler, yalnızca nicel analizde değil, aynı zamanda moleküler yapıların aydınlatılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

Spektroskopik Yöntemler

Maddenin farklı dalga boylarındaki ışıkla etkileşimi, farklı fiziksel ve kimyasal özellikler hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu nedenle günümüzde çok sayıda spektroskopik yöntem geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Başlıca spektroskopi türleri şunlardır:

- Ultraviyole–görünür (UV-Vis) 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

Fotometri ve Spektrofotometri

Çözelti içerisindeki madde miktarının, çözeltiden geçen ya da çözelti tarafından soğurulan ışık miktarı ölçülerek belirlenmesine **fotometri** adı verilir.

Analiz edilen örnek üzerine gönderilen ışığın belirli bir dalga boyunun filtreler yardımıyla seçildiği cihazlar kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken; dalga boyu seçiminin yarıklar, prizmalar veya kırınım ızgaraları aracılığıyla yapıldığı daha gelişmiş cihazlar **spektrofotometre** olarak

tanımlanır. Maddenin ışığı absorplama davranışını incelemek amacıyla kullanılan bu sistemlere **absorpsiyon spektrometresi** veya **absorpsiyon spektrofotometresi** adı verilir [4].

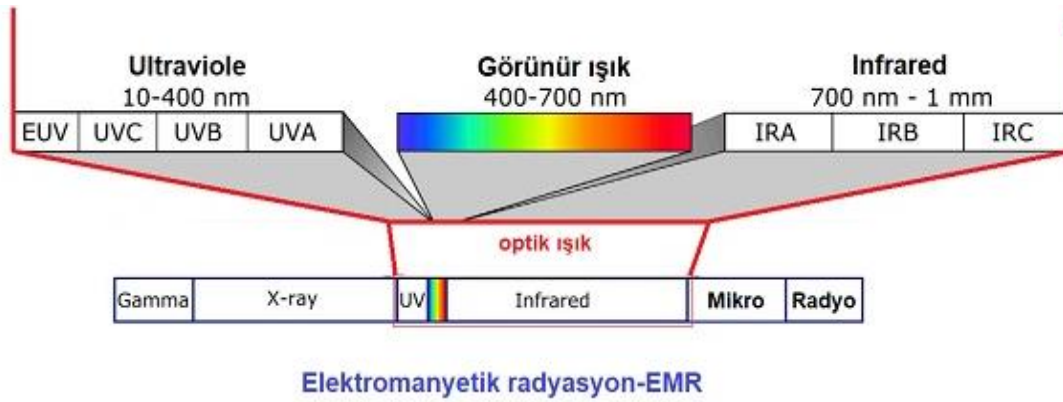
UV–Görünür (UV-Vis) Spektroskopisi

Genel olarak moleküllerin uyarılması sonucunda **moleküler geçişler**, moleküllerdeki elektronların uyarılması sonucunda ise **elektronik geçişler** meydana gelir. **Ultraviyole–görünür (UV-Vis) spektroskopisi**, moleküllerdeki elektronik geçişler sonucu oluşan spektrumları inceleyen bir yöntemdir ve bu nedenle **elektronik spektroskopi** olarak da adlandırılır.

Elektromanyetik spektrumda:

- **100–200 nm** aralığı: Vakum UV bölgesi,
- **200–400 nm** aralığı: Ultraviyole (UV) bölge,
- **400–700 nm** aralığı: Görünür bölge olarak tanımlanır (Şekil 4.1).

Görünür bölgede absorpsiyon yapan bileşikler, absorbladıkları rengin **tamamlayıcı renginde** görünürler. Bu özellik, renkli çözeltilerin UV-Vis spektroskopisi ile analiz edilmesini mümkün kılmaktadır [1,5].



Şekil 4. 1 Görünür bölge dalga boyları

UV–Görünür Bölge Spektrofotometreleri ve Çalışma Prensipleri

Mor ötesi (UV) ve görünür bölge spektrofotometrelerinde dalga boyu seçimi amacıyla **cam veya kuvars prizma** ya da optik ağ (ızgara) sistemleri kullanılır. Ölçüm sırasında, UV veya görünür bölgedeki belirli bir dalga boyundaki ışık seçilerek örnek üzerine gönderilir. Otomatik spektrofotometrelerde dalga boyu, cihaz tarafından düzgün ve sürekli bir şekilde değiştirilebilir [1]. Işık örnekten veya örnek çözeltisinden geçtikten sonra, örneğin **absorbsiyonu veya geçirgenliği** ölçülür [2]. UV–görünür bölgede ölçüm yapmak için döteryum (D₂), tungsten (W), hidrojen (H₂), ksenon (Xe) ve civa buharı lambaları gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. En yaygın uygulamada, UV bölgesi için hidrojen veya döteryum deşarj lambası, görünür bölge için ise tungsten filamentli lamba tercih edilir [1,3]. Spektrofotometreler, optik düzenlerine göre tek ışık yollu ve çift ışık yollu olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, cihazın tüm optik bileşenleri tek bir ışık yolu üzerine yerleştirilmiştir. Bu tür cihazlarda genellikle üç temel ayar mekanizması bulunur:

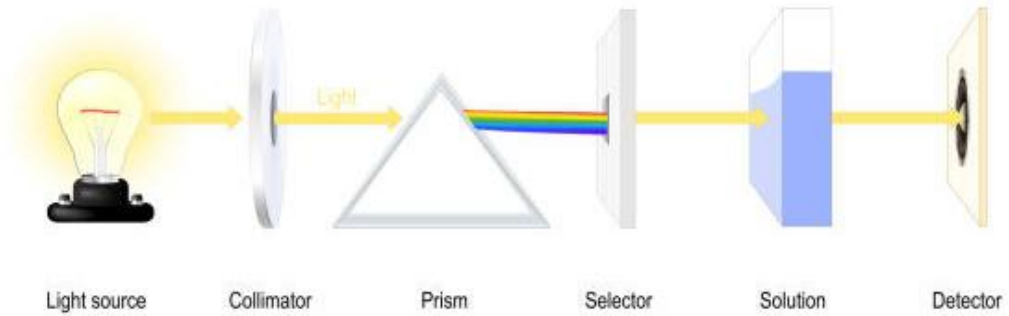
(i) optik ağ veya prizmanın mekanik olarak döndürülmesini sağlayan dalga boyu ayar düğmesi,

(ii) ışık yolunu tamamen kapatarak galvanometrede sıfır geçirgenlik ayarını yapan düğme ve
(iii) ışığın geçtiği yarığın genişliğini ayarlayan mekanizma [2].

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde ise monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki ayrı demete bölünür. Bu demetlerden biri örnek kabına, diğeri ise yalnızca çözücünün bulunduğu referans kaba yönlendirilir. Ayrılan ışık demetleri iki ayrı dedektör tarafından algılanır ve dedektör sinyallerinin oranı ölçülerek örneğin geçirgenliği belirlenir. Bu yöntemle ölçüm sırasında örnek sinyali sürekli olarak çözücü sinyaliyle karşılaştırılmış olur. Bu sistemde dedektörlerin uyumlu ve eşdeğer özellikte olması, ölçüm doğruluğu açısından büyük önem taşır [3].

Bazı çift ışık yollu spektrofotometrelerde ise tek dedektör kullanılır. Bu durumda örnekten ve çözücünden geçen ışık demetleri dedektöre art arda ulaşır ve alternatif bir sinyal oluşturur. Işık şiddetleri eşit olduğunda dedektörde net bir sinyal oluşmaz; ancak örnekten geçen ışığın şiddeti absorpsiyon nedeniyle azaldığında dedektör tarafından alternatif bir sinyal algılanır [1].

Çift ışık yollu spektrofotometrelerin bir diğer türü çift dalga boylu spektrofotometrelerdir. Bu cihazlarda iki ayrı monokromatör bulunur ve iki farklı dalga boyundaki ışık, dönen bir ışık bölücü yardımıyla örnekle ardışık olarak etkileştirilir. Özellikle bulanık çözeltilerde, dalga boylarından biri örnek tarafından absorplanan, diğeri ise absorplanmayan bir değere ayarlanır. Bulanıklığın her iki dalga boyunda aynı oranda ışık kaybına neden olması sayesinde, ölçümler arasındaki fark yalnızca örneğin absorbansına bağlı olur [4].



Şekil 4.2 Genel spektrofotometre düzeneği

Blank (Kör) Ölçümü, Biyomoleküllerin UV Absorpsiyonu ve Lambert–Beer Kanunu

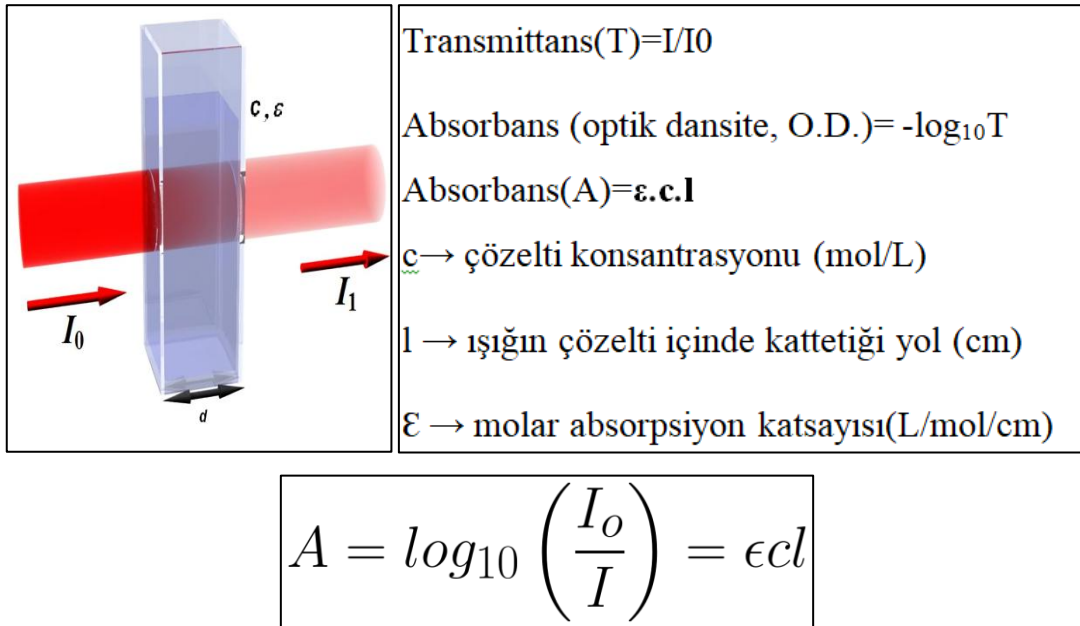
Spektrofotometrik cihazların büyük bir kısmında absorpsiyon ölçümü yapılırken, gönderilen ışık yalnızca hedef moleküllerle değil, aynı zamanda çözücü ve çözeltinin diğer bileşenleri ile de etkileşime girer. Bu nedenle cihaz tarafından elde edilen spektrum, yalnızca hedef moleküle ait absorpsiyon spektrumu değil, çözeltinin toplam absorpsiyonunu yansıtır [1]. Hedef molekülün gerçek absorpsiyonunu belirleyebilmek amacıyla kör (blank) ölçümü yapılır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, hücrelerden birine numune çözeltisi, diğerine ise yalnızca çözücü konularak ölçüm gerçekleştirilir. Böylece çözücünün absorpsiyonu ölçüm sırasında otomatik olarak elimine edilir [2]. Tek ışık yollu spektrofotometrelerde ise ölçümden önce yalnızca çözücünün

bulunduğu kuvars küvet cihaza yerleştirilerek blank ayarı yapılır; daha sonra aynı küvet numune çözeltisi ile doldurularak ölçüm alınır [1,3].

Biyolojik moleküllerin ultraviyole (UV) bölgedeki absorplama özellikleri, bu moleküllerin konsantrasyonlarının ve saflıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu absorpsiyon, çoğunlukla moleküllerde bulunan bağ elektronlarının uyarılması sonucu ortaya çıkar [4]. Bu özellik sayesinde UV-görünür bölge spektroskopisi, bir molekülde bulunan fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve bu grupları içeren bileşiklerin nicel analizinde etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır [2].

UV-Vis spektroskopisinin nicel analizde temelini oluşturan ilişki **Lambert-Beer Kanunu** (Şekil 4.3) ile ifade edilir. Bu kanuna göre, bir çözeltiden geçen ışık miktarı; ışığın çözelti içinde kat ettiği yol uzunluğu ve çözeltideki maddenin konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılıdır, çözelti tarafından absorplanan ışık miktarı ise bu büyüklüklerle doğru orantılıdır [1,6].



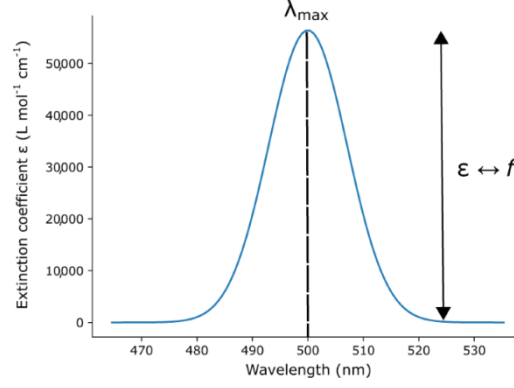
Şekil 4.3 Lambert-Beer Kanunu

Spektrofotometrik Nicel Analizde Dalga Boyu Seçimi ve Kalibrasyon Eğrisi

Spektrofotometre kullanılarak bir maddenin nicel analizinin yapılabilmesi için, ölçümün gerçekleştirileceği uygun dalga boyunun belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla öncelikle analiz edilecek örneğin absorpsiyon spektrumu bilinmelidir [1]. Absorpsiyon spektrumu, maddenin belirli bir derişimdeki (genellikle 1 molar) çözeltisinin farklı dalga boylarındaki absorbans değerlerinin ölçülmesi ile elde edilir [2].

Dalga boyu seçimi yapılırken, çözücünün ve çözeltide bulunabilecek diğer türlerin ilgili dalga boyunda ışığı absorplamaması, sistemin **Lambert-Beer eşitliğine uyması** ve nicel analizin **en yüksek duyarlılıkla** gerçekleştirilebileceği dalga boyunun seçilmesi esas alınır. Bu dalga boyu genellikle maddenin maksimum absorbans verdiği $\lambda_{\max}$ değeridir (Şekil 4.4) [1,3].

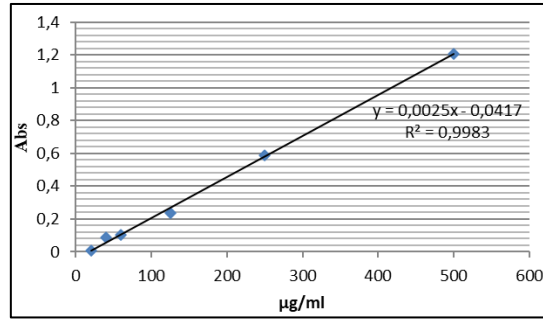
Uygun dalga boyu belirlendikten sonra, analizi yapılacak maddeyi içeren ve **derişimleri bilinen** bir dizi standart çözelti hazırlanır. Seçilen dalga boyunda bu standart çözeltilerin absorbans (A) değerleri ölçülür [2]. Elde edilen absorbans değerleri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek bir **kalibrasyon eğrisi** (Şekil 4.5) oluşturulur. Lambert–Beer kanununa uyulan koşullarda bu grafik doğrusal olup, bilinmeyen derişime sahip örneklerin miktar tayini bu doğru yardımıyla gerçekleştirilir [3,4].



Şekil 4.4 Maddenin maksimum absorbans verdiği $\lambda_{\max}$ değeri temsili görüntüsü

Doğrusallık ve Hata Analizi

Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olup olmadığı, korelasyon katsayısı (R^2) ile değerlendirilir [2]. R^2 değerinin 1'e yakın olması, yöntemin doğrusal ve güvenilir olduğunu gösterir (Şekil 4.5). Doğrusallıktan sapmalar genellikle yüksek derişimler, ışık saçılması, cihaz kaynaklı hatalar veya Lambert–Beer kanunundan sapma nedeniyle oluşur [1,4].



Şekil 4.5 Kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısının temsili gösterimi.

Bilinmeyen Örnek Hesaplama

Kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denklemi $A = mC + b$ şeklindedir [2]. Bilinmeyen örneğin absorbans değeri ölçüldükten sonra bu değer denkleme yerleştirilerek derişim (C) hesaplanır. Gerekirse seyreltilmiş örnekler için seyreltme katsayısı dikkate alınarak gerçek derişim bulunur [3].

MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, eppendorf tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, kuvartz küvet, spektrofotometre cihazı.

Deneyin Yapılışı;

1. 1 mg/ml ana stok çözeltisi hazırlanır.

2. Stok çözeltinin absorbans değeri ölçülerek maksimum dalga boyu bulunur (bu esnada seyreltme yapıldı ise not etmeyi unutmayınız).
3. Ana stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda en az 5 seyreltme yapılır ve belirlenen dalga boyunda absorbans değerleri ölçülür.
4. Kaydedilen absorbans değerleri grafiğe aktarılarak standart eğri oluşturulur.

KAYNAKÇA

1. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed., Cengage Learning, 2007.
2. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. 9th ed., W. H. Freeman and Company, 2016.
3. Ewing, G. W. *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. McGraw-Hill, 1985.
4. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. *Introduction to Spectroscopy*. 5th ed., Cengage Learning, 2015.
5. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8th ed., Wiley, 2014.
6. Atkins, P., & de Paula, J. *Physical Chemistry*. 10th ed., Oxford University Press, 2014.

5. HAFTA: KANTİTATİF ASKORBİK ASİT (C VİTAMİNİ) ANALİZİ

Vitaminler, kökeni Latince *vita* (hayat) sözcüğüne dayanan; organizmanın normal büyüme, gelişme ve metabolik işlevlerini sürdürebilmesi için çok küçük miktarlarda gerekli olan temel organik bileşiklerdir [1]. İnsan vücudunda vitaminler doğrudan enerji kaynağı olarak kullanılmaz; başka bir ifadeyle vitaminler metabolik süreçlerde “yakılmaz” ve kalori sağlamazlar [2]. Bunun yerine, birçok biyokimyasal reaksiyonda koenzim veya düzenleyici olarak görev yaparak metabolik süreçlerin etkin biçimde yürütülmesini sağlarlar [3].

Herhangi bir vitaminin yetersiz alımı durumunda, o vitaminin katıldığı biyokimyasal reaksiyonlar aksamakta ve bunun sonucunda büyüme geriliği, metabolik bozukluklar ve çeşitli fizyolojik işlev kayıpları ortaya çıkabilmektedir [1,4]. Vitaminler ayrıca karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında rol alarak besin öğelerinin vücut tarafından etkin biçimde kullanılmasını sağlarlar [3]. Organizma, vitaminlerin kan dolaşımında gerekli düzeylerde sürekli bulunmasını homeostatik mekanizmalar yoluyla düzenler [2].

Vitaminlerin fizyolojik etkileri temelde biyokimyasal reaksiyonların düzenlenmesiyle ilişkilidir. Bu etkiler genel olarak üç ana başlık altında toplanabilir [1,3]:

- Büyüme ve gelişmenin desteklenmesi
- Sağlıklı nesillerin oluşumuna katkı sağlanması
- Sinir ve sindirim sistemlerinin normal işleyişinin sürdürülmesi, bağışıklık sisteminin desteklenmesi ve besin öğelerinin etkin kullanımının sağlanması

Vitaminlere metabolik faaliyetler için çok düşük miktarlarda gereksinim duyulmaktadır. Günümüzde insan beslenmesi açısından vitamin olarak tanımlanmış yaklaşık 15 farklı bileşik bulunmaktadır [4]. Bu bileşikler, gıdalar yoluyla doğrudan aktif vitamin formunda alınabildiği gibi, provitaminler şeklinde alınıp vücutta bir dizi kimyasal dönüşüm geçirerek biyolojik olarak aktif vitaminlere dönüşebilirler [2]. Vitaminlerin gıdalardaki dağılımı homojen olmayıp, bazı gıdalar belirli vitaminler açısından zengin iken diğer vitaminleri çok düşük düzeylerde içerebilir [5].

Vitamin tayininde hem klasik hem de modern analitik yöntemler kullanılmaktadır. Gıdalardaki vitaminler volumetrik titrasyon yöntemleri ile veya çeşitli enstrümantal analiz teknikleri kullanılarak belirlenebilir [6, 7]. Günümüzde birçok gıda maddesindeki vitamin analizleri spektroskopik yöntemler yardımıyla yapılmaktadır. Bu amaçla, gıdadaki vitaminler uygun çözücülerle (çoğunlukla asidik ortamda) özütlenerek çözelti fazına aktarılır [6]. Elde edilen çözelti, kromatografik ayırma teknikleri kullanılarak bileşenlerine ayrılır ve vitamin miktarları fluometri veya diğer optik ölçüm yöntemleriyle tayin edilir [7]. Vitamin analizlerinde doğruluk ve hassasiyet açısından en güvenilir yöntem Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemin yüksek maliyetli olması, rutin analizlerde kullanımını sınırlandırmaktadır [5,6]. Gıdalarda Vitamin Analizleri; gıdanın besin değerinin belirlenmesi, yasal mevzuata uygunluğunun denetlenmesi, etiket bilgilerinin

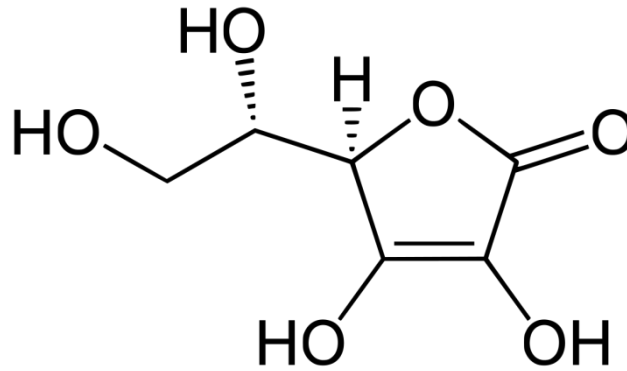
doğruluğunun kontrol edilmesi amaçlarıyla gerçekleştirilmektedir [6]. Gıda analizlerinde en sık yapılan vitamin tayinleri şunlardır [5]:

- Meyve ve sebze ürünleri ile gazlı içeceklerde A vitamini (β -karoten) tayini
- Bitkisel margarinlerde A ve D vitamini tayini
- Meyve ve sebze ürünlerinde C vitamini tayini

C Vitamini (Askorbik Asit): Yapısal Özellikleri, Kararlılığı ve Biyolojik Önemi

C vitamini (askorbik asit), endiol yapısına sahip ve lakton halkası içeren bir heksoz türevidir olup kimyasal yapısı Şekil 5.1'de gösterilmektedir [1]. Molekül ağırlığı 176 g/mol olan askorbik asit, yaklaşık 192 °C erime noktasına sahip, renksiz kristal yapılı bir bileşiktir [2]. C vitamini, skorbüt hastalığını önleyici etkisinden dolayı antiaskorbüt faktör olarak tanımlanmaktadır [3].

Askorbik asit molekülü, hem güçlü bir indirgen özellik hem de asidik karakter kazandıran bir dienol grubu içermektedir [1]. Benzen, eter, petrol eteri, kloroform gibi organik çözücülerde ve yağlarda çözünmezken, suda yüksek oranda çözünür [2]. Vitaminler arasında en dayanıksız olanlardan biri olup çevresel koşullara karşı oldukça hassastır [4].



Şekil 5.1 C Vitamini kimyasal bağ yapısı

C vitamininin kararlılığı aşağıdaki faktörlere bağlı olarak değişmektedir [3,4]:

- Alkali ortamlara ve oksidasyona karşı duyarlıdır; özellikle bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi metal iyonlarının varlığında oksidasyon hızı önemli ölçüde artar.
- Kuru kristal formda bulunduğunda görece daha karardır.
- Asidik çözeltilerde (pH < 4) stabilitesi belirgin şekilde artmaktadır.
- Askorbik asit, havanın oksijeni ile kolaylıkla okside olarak biyolojik aktivitesini kaybeder.

Doğada C vitamini, **indirgenmiş formu olan askorbik asit ($C_6H_8O_6$)** ve **yükseltgenmiş formu olan dehidroaskorbik asit ($C_6H_6O_6$)** şeklinde bulunur [2]. C vitamini eksikliği, başta bağ dokusu olmak üzere birçok fizyolojik sistemde bozukluklara yol açmaktadır. Yetersiz alımı durumunda [3,8]:

- Kılcal damar çeperleri zayıflar,
- Diş etlerinde kanama ve dişlerde gevşeme görülür,
- Eklem hastalıkları ortaya çıkabilir.

Ayrıca askorbik asit, cilt ve bağ dokusunun temel bileşenlerinden biri olan **kollajen sentezi** için zorunlu bir kofaktördür ve proteinlerin normal biyosentezinde önemli rol oynar [8].

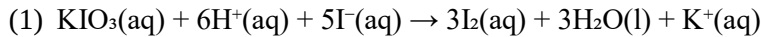
MATERYAL VE METOD:

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, falkon tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, kuvartz küvet, spektrofotometre cihazı. ** Deneyi yaparken tablo 5.1'i takip ediniz.

- %0.25'lik nişasta çözeltisi (0,625g nişasta tartılarak sıcak 250 mL suda çözülür çözelti berrak oluncaya kadar kaynatılır)
- 0.7 M sodyum tiyosülfat
- %0.2 KIO₃ çözeltisi
- %5'lik KI çözeltisi
- % 0.1 Askorbik asit standart çözeltisi
- 0.3 M H₂SO₄ çözeltisi

Deneyin Yapılışı:

Askorbik asit (C vitamini), orta kuvvette bir indirgen ajan olup redoks özellikleri sayesinde iyodometrik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Sulu ortamda askorbik asidin iyot ile verdiği reaksiyonlar, C vitamininin nicel tayininin temelini oluşturmaktadır [2]. İyodometrik yöntemde ilk aşamada, iyodat iyonu (IO₃⁻) asidik ortamda ve iyodür iyonlarının varlığında indirgenerek serbest iyot (I₂) oluşturur. Bu reaksiyon aşağıda verilmiştir [3]:



Oluşan moleküler iyot, askorbik asit tarafından indirgenirken askorbik asit yükseltgenerek dehidroaskorbik aside dönüşür [1]:

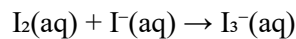


Bu iki reaksiyon **seyreltik asidik ortamda** gerçekleşir ve birinci reaksiyonun ilerleyebilmesi için iyodür iyonlarının bulunması zorunludur [3]. Toplam reaksiyon aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

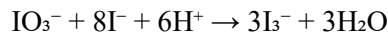


Bu reaksiyonun denge sabiti oldukça büyüktür ve pratikte reaksiyon tamamlanmış kabul edilir [2].

Ancak moleküler iyodun suda çözünürlüğü düşük olduğundan, iyodür iyonları eklenerek triiyodür (I₃⁻) kompleksi oluşturulur [4]:



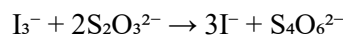
Triiyodür iyonu, iyodat kullanılarak da üretilir:



Oluşan triiyodür iyonu askorbik asit ile aşağıdaki reaksiyona girer [1]:



Askorbik asit derişimi, dolaylı olarak reaksiyona girmeden kalan I₃⁻ iyonlarının miktarının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu amaçla **sodyum tiyosülfat** çözeltisi kullanılır [3]:



Oluşan $S_4O_6^{2-}$ iyonu **tiyonat iyonu** olarak adlandırılır. Titrasyonun son noktasının belirlenmesinde indikatör olarak nişasta kullanılır. **Triiyodür iyonları nişasta ile koyu mavi renkli bir kompleks oluşturur ve renk kaybolması titrasyonun bitiş noktasını gösterir** [4].

Tablo 5.1 Deney grupları ve sarflar

Deney No	0.3 M H_2SO_4 (ml)	Askorbik Asit (ml)	Ölçülecek Numune (ml)	Su (ml)	KIO_3 (ml)	KI (ml)	$Na_2S_2O_3$ ile açık sarı renk alana kadar titrasyon	Nişasta (ml)	$Na_2S_2O_3$ ile açık sarı renk alana kadar titrasyon	Harcanan $Na_2S_2O_3$
1	5	0.1	0	1.9	1.5	1		0.2		
2	5	0.25	0	1.75	1.5	1		0.2		
3	5	0.5	0	1.5	1.5	1		0.2		
4	5	0.75	0	1.25	1.5	1		0.2		
5	5	1	0	1	1.5	1		0.2		
Örnek	5	0	2	0	1.5	1		0.2		

VERİLERİN HESAPLANMASI

1-5 numaralı örneklerdeki askorbik asit miktarı mg cinsinden hesaplanarak ve harcanan tiyosülfat miktarı kullanılarak standart eğri grafiği çizilir. Örnek için harcanan tiyosülfat miktarı grafik üzerinden okunarak askorbik asit konsantrasyonu tayin edilir ve mg/100mL cinsinden ifade edilir.

Titre	1	2	3	4	5	Örnek
Çözelti ilk hacim(ml)						
Çözelti son hacim(ml)						
Kullanılan toplam hacim(ml)						

KAYNAKLAR

1. Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 31st ed., McGraw-Hill, 2018.
2. Nelson, D. L., & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed., W. H. Freeman, 2017.
3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. *Biochemistry*. 9th ed., W. H. Freeman, 2019.
4. Gropper, S. S., Smith, J. L., & Carr, T. P. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 7th ed., Cengage Learning, 2018.
5. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. *Food Chemistry*. 4th ed., Springer, 2009.
6. AOAC. *Official Methods of Analysis*. 21st ed., Association of Official Analytical Chemists, 2019.
7. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. 9th ed., W. H. Freeman and Company, 2016.
8. Combs, G. F. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. 4th ed., Academic Press, 2012.

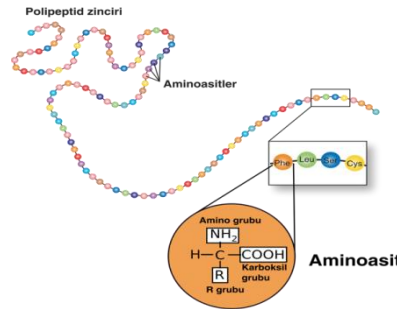
6. HAFTA:AMİNOASİTLERE ÖZGÜ REAKSİYONLAR: KSANTOPROTEİN(BECHER) VE HOPKİNS-COLE DENEYİ

Amino asitler, yapılarında hem bir amino grubu ($-NH_2$) hem de bir karboksil grubu ($-COOH$) bulunduran, proteinlerin temel yapı taşları olan organik bileşiklerdir (Şekil 6.1) [1]. Doğada yaklaşık 300 farklı amino asit tanımlanmış olmakla birlikte, bunlardan yalnızca 20 tanesi standart (proteinogenik) amino asit olarak kabul edilir ve canlı organizmalarda proteinlerin yapımında görev alır [2]. Bu standart amino asitler, belirli sayı ve dizilişlerde kovalent bağlarla birbirine bağlanarak polipeptit zincirlerini ve dolayısıyla proteinleri oluşturur. Standart amino asitler, DNA tarafından kodlanan ve ribozomal protein sentezine doğrudan katılan birimlerdir [3].

Bir standart amino asit, polipeptit zinciri yapısına girdikten sonra çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir ve bu süreç sonucunda nonstandart amino asitler oluşabilir [2]. Örneğin, kollajen proteininde bulunan prolin amino asidi, hidroksilasyon tepkimesiyle hidroksiprolin'e dönüştürülür ve bu modifikasyon kollajenin yapısal dayanıklılığı açısından kritik öneme sahiptir [4].

Bunun yanı sıra, proteinlerin yapısında yer almayan ancak hücre içerisinde çeşitli biyolojik işlevlere sahip olan amino asitler de bulunmaktadır. Bu amino asitler metabolik ara ürünler, nörotransmitter öncülleri veya düzenleyici moleküller olarak görev yapabilirler [1].

Standart amino asitlerin ortak yapısal özelliği, merkezi bir **karbon atomuna (α -karbon)** bağlı bir amino grubu, bir karboksil grubu, bir hidrojen atomu ve değişken bir **yan zincir (R grubu)** içermeleridir [3]. Fizyolojik pH koşullarında amino grubu protonlanmış durumda olup **pozitif yüklü**, karboksil grubu ise protonunu kaybederek **negatif yüklü** hâlde bulunur. Bu nedenle amino asitler fizyolojik ortamda genellikle **zwitteriyon** formundadır [2]. Yan zincirde ek karbon atomları bulunması durumunda, α -karbondan itibaren bu karbonlar sırasıyla β , γ , δ , ϵ gibi harflerle adlandırılır. Yan zincirin kimyasal yapısı, amino asidin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirleyen temel unsurdur [1].



Şekil 6.1 Aminoasitlerin genel yapısı.

Standart amino asitler, biyokimyasal ve moleküler biyoloji çalışmalarında üç harfli kısaltmalar (örneğin Ala, Gly, Ser) ve tek harfli semboller (A, G, S gibi) kullanılarak gösterilirler [1]. Bu gösterim sistemi, protein dizilerinin kısa ve evrensel bir biçimde ifade edilmesini sağlar.

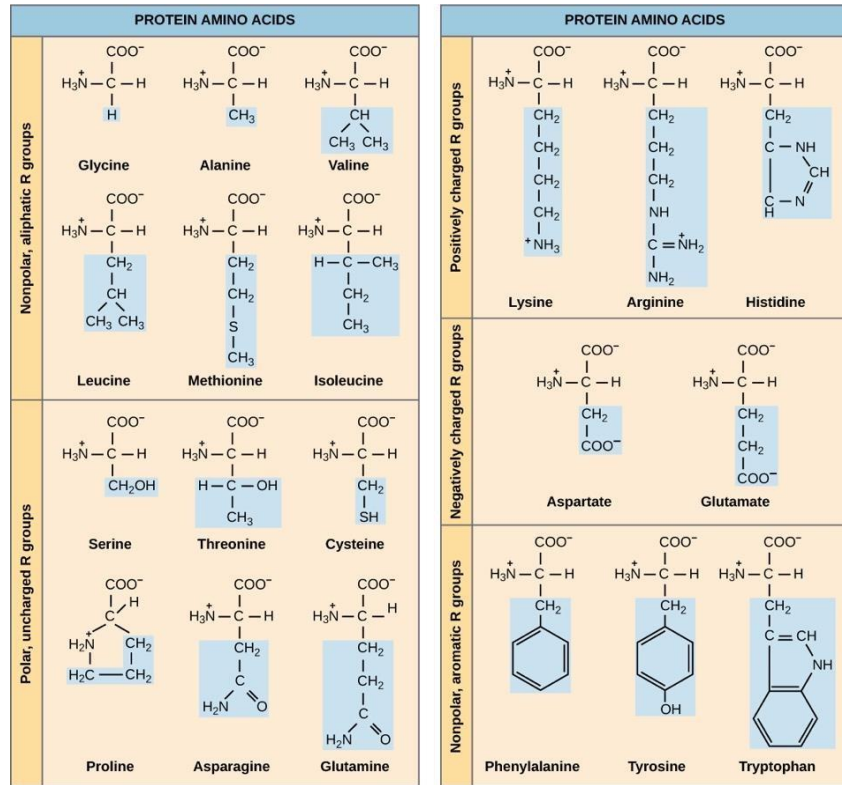
Standart amino asitler, temel iskelet yapıları bakımından benzer olmakla birlikte, yan zincirlerinin (R gruplarının) kimyasal yapısı, büyüklüğü, elektrik yükü ve sulu ortamlardaki davranışları açısından

birbirlerinden belirgin şekilde farklılık gösterirler [2]. Bu farklılıklar, amino asitlerin protein içindeki konumlarını, etkileşimlerini ve dolayısıyla proteinlerin üç boyutlu yapılarını ve biyolojik işlevlerini belirleyen temel unsurlardır.

Bazı amino asitler, fizyolojik pH koşullarında amino grubunun taşıdığı pozitif yük ve karboksil grubunun taşıdığı negatif yüke ek olarak, yan zincirlerinde de elektriksel yüke sahiptirler. Bu tür amino asitler, proteinlerin iyonik etkileşimlerinde ve aktif merkez oluşumlarında önemli rol oynarlar [3]. Yan zincirlerin bazıları polar özellik gösterirken, bazıları nonpolar (hidrofobik) yapıdadır. Polar yan zincirler genellikle su ve diğer polar moleküllerle etkileşime girmeye yatkınken, nonpolar yan zincirler hidrofobik etkileşimler yoluyla proteinlerin iç kısımlarında yer alma eğilimindedir [1].

Amino asitlerin biyolojik fonksiyonları ve protein yapısındaki rolleri, doğrudan yan zincirlerinin kimyasal özellikleri ile ilişkilidir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, protein-protein etkileşimleri ve ligand bağlanmaları büyük ölçüde R gruplarının özelliklerine bağlıdır [4].

Standart amino asitler, kimyasal özelliklerinin daha kolay anlaşılabilmesi amacıyla, özellikle **yan zincirlerinin polaritesi ve biyolojik pH'da su ile etkileşme eğilimleri** dikkate alınarak genellikle **beş ana sınıfa** ayrılırlar. Bu sınıflandırma, protein yapı-fonksiyon ilişkilerinin incelenmesinde temel bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır (Şekil 6.2) [2].



Şekil 6.2 Aminoasitlerin sınıflandırılması.

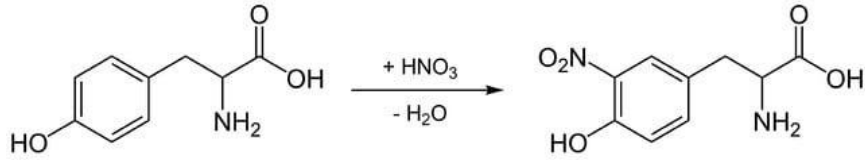
Amino asitler ve yapılarında amino asit bulunan proteinler belirli kimyasal maddelerle renk reaksiyonları verirler. Bu reaksiyonlardan faydalanılarak amino asit ve proteinlerin kantitatif tayinleri yapılır.

Ksantoprotein (Becher) Deneyi, proteinlerin güçlü asit, ısı ve alkali ile muamele edildiklerinde karakteristik renk değişimleri göstermesi esasına dayanan kalitatif (nitel) bir analiz yöntemidir. Bu reaksiyon özellikle protein yapısında bulunan aromatik amino asitlerin varlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır [5].

Ksantoprotein reaksiyonu, başta tirozin ve fenilalanin olmak üzere, kısmen de triptofan içeren aromatik amino asitlerin derişimini dolaylı olarak ortaya koyar. **Reaksiyon sonucunda normal koşullarda çözelti açık sarı bir renk alırken, patolojik durumlarda daha koyu sarı, portakal rengi veya kahverengiye yakın tonlar gözlenebilir** [6].

Elde edilen rengin normal ya da patolojik olup olmadığının değerlendirilmesinde, sabit renk veren potasyum kromat çözeltileriyle hazırlanan seyreltiler referans olarak kullanılır. Reaksiyon sonucunda oluşan renk, bu referans çözeltilerle karşılaştırılarak serumdaki aromatik amino asit düzeyi hakkında yorum yapılır [7].

Reaksiyonun kimyasal temeli, proteinlerin derişik nitrik asit (HNO_3) ile muamele edilmesi sırasında aromatik halkaların nitrasyonuna dayanır. Isıtma işlemiyle birlikte nitrik asidin aromatik çekirdeğe nitro grubu bağlaması sonucu sarı renkli nitro türevleri oluşur ve bu durum ksantoprotein reaksiyonu olarak adlandırılır (Şekil 6.3) [5]. Asidik ortamda oluşan sarı renk, ısı uygulanması ve alkali ilavesiyle daha da belirgin hâle gelir.



Şekil 6.3 Tirozin aminoasidinin nitrolanması.

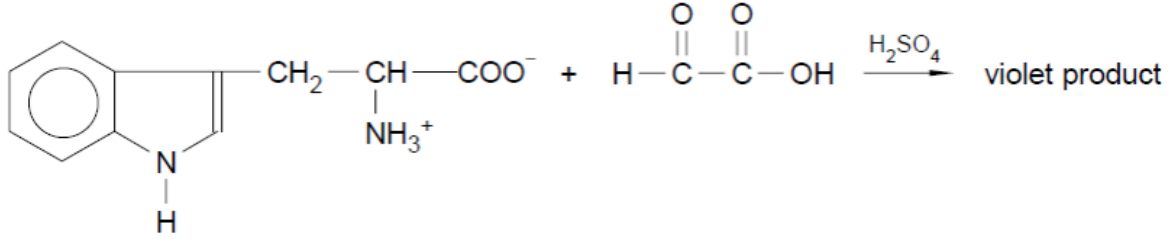
Sağlıklı bireylerde gözlenen açık sarı renk, serumda doğal olarak bulunan düşük miktardaki tirozin, fenilalanin ve sınırlı ölçüde triptofandan kaynaklanmaktadır. Fenolle zehirlenme gibi bazı patolojik durumlarda ise ksantoprotein reaksiyonu belirgin şekilde şiddetlenmekte ve koyu renk oluşumu gözlenmektedir [8]. Sonuç olarak, ksantoprotein deneyi proteinlerde bulunan aromatik amino asitlerin varlığını ortaya koyan basit ve hızlı bir nitel analiz yöntemi olup, özellikle klinik biyokimyada yardımcı tanı testi olarak kullanılmaktadır.

Hopkins–Cole Deneyi, protein yapısında triptofan amino asidinin varlığını saptamaya yönelik özgül bir kalitatif analiz yöntemidir. Bu reaksiyon, triptofanın indol halkasının belirli aldehitlerle kuvvetli asidik ortamda verdiği karakteristik renk oluşumuna dayanır [5].

Deney sırasında protein örneği, genellikle glikoksilik asit ve derişik sülfürik asit ile muamele edilir. Bu koşullar altında triptofanın indol halkası, aldehit grupları ile yoğunlaşma reaksiyonuna girerek mor renkli bileşiklerin oluşmasına neden olur. Gözlenen bu mor renk, reaksiyonun pozitif olduğunu ve örnekte triptofan bulunduğunu gösterir (Şekil 6.4) [6].

Hopkins–Cole reaksiyonu, triptofan için oldukça seçici bir test olup, proteinlerdeki diğer amino asitler benzer koşullar altında bu karakteristik mor rengi oluşturmazlar. Bu nedenle deney, proteinlerin amino

asit bileşimi hakkında nitel bilgi sağlamada ve özellikle triptofanın tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [8].



Şekil 6.4 Hopkins-Cole reaksiyon mekanizması.

MATERYAL VE METOD

Ksantoprotein Deneyi

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, tartım kağıdı, spatül, falkon tüp, cam tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, ispiro ocağı.

- Derişik HNO_3
- % 20 TCA (Trikloroasetikasit)
- % 33 NaOH (Sodyum Hidroksit)
- % 0,038 g.lık $K_2Cr_2O_7$ (Potasyum dikromat)

Deneyin Yapılışı:

1. Farklı konsantrasyonlarda tirozin amino asidi 10 ml saf suda çözülür.
2. Standart için farklı konsantrasyonlara seyreltilmiş potasyum dikromat çözeltileri hazırlanır.
3. Farklı tüplere alınan 2'şer ml tirozin çözeltileri üzerine eşit hacimde % 20'lik TCA damlatılarak tüpler çalkalanır.
4. Aynı bir tüpe kontrol grubu olarak 2 ml su ve 2 ml %20'lik TCA eklenir, çalkalanır.
5. Aynı aşamalar potasyum dikromat tüpleri için yapılır ve standart hazırlanır.
6. 10 dk beklenir.
7. Tüplerdeki sıvılar üzerine 0,5 ml derişik HNO_3 ilave edilir ve çalkalanır.
8. Tüpler 30 sn açık alev üzerinde tutulup ısıtılır.
9. Isıtılan tüpler musluk suyu altında soğutulur.
10. Soğutulan çözeltilere % 33 NaOH çözeltisinden 1,5 ml konur ve renk değişimleri gözlemlenerek standart çözelti ile kıyaslanır ve yorumlanır.

Hopkins – Cole Deneyi

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, tartım kağıdı, spatül, falkon tüp, cam tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, ispiro ocağı.

- Triptofan çözeltisi
- Gliyoksilik asit çözeltisi
- Konsantre sülfirik asit çözeltisi

Deneyin Yapılışı:

1. Cam tüp içeriş,nde 2 ml triptofan çözeltisine 2 ml gliyoksilik (% 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.

KAYNAKLAR

1. Nelson, D. L., & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 8th ed., W. H. Freeman, 2021.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. *Biochemistry*. 9th ed., W. H. Freeman, 2019.
3. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. Wiley, 2016.
4. Lodish, H. et al. *Molecular Cell Biology*. 8th ed., W. H. Freeman, 2016.
5. Plummer, D. T. *An Introduction to Practical Biochemistry*. McGraw-Hill, 1987.
6. Varley, H., Gowenlock, A. H., & Bell, M. *Practical Clinical Biochemistry*. Heinemann Medical Books, 1980.
7. Tietz, N. W. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders, 1996.
8. Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill, 2018.

7.HAFTA: PROTEİNLERE ÖZGÜ REAKSİYONLAR: BRADFORD VE LOWRY DENEYİ

Proteinler, doğada bulunan en büyük ve en karmaşık makromolekül gruplarından birini oluşturur. Yapısal olarak proteinler, amino asitlerin peptit bağlarıyla bir araya gelmesi sonucu oluşan bir veya daha fazla polipeptit zincirinden meydana gelirler [1]. Hücresel düzeyde çok sayıda biyolojik işlev proteinler tarafından yürütülmektedir. Metabolik reaksiyonların katalizlenmesi, DNA replikasyonu, hücresel sinyal iletimi, çevresel uyaranlara yanıt verilmesi ve moleküllerin hücre içinde veya hücreler arasında taşınması bu işlevler arasında yer almaktadır [2].

Proteinler, sahip oldukları geniş yapısal çeşitlilik ve farklı biyolojik rollerine rağmen, temel yapı prensipleri açısından büyük ölçüde benzerlik gösterirler. Bununla birlikte, hücresel yaşam için kritik öneme sahip olmaları nedeniyle proteinlerin üç boyutlu yapılarının aydınlatılması, biyosentez mekanizmalarının, biyolojik işlevlerinin ve düzenlenme (regülasyon) süreçlerinin anlaşılması biyokimya ve moleküler biyoloji alanlarında temel araştırma konuları arasında yer almaktadır [3].

Belirli bir hacimdeki çözeltide toplam protein miktarının tayini, proteinlerin ayırma ve saflaştırma süreçlerinde önemli bir rol oynar. Protein miktarının bilinmesi, farklı saflaştırma basamaklarının değerlendirilmesinde, protein veriminin ve saflığının izlenmesinde temel bir gerekliliktir. Özellikle elektroforetik ve kromatografik ayırma tekniklerinde, deney koşullarının optimize edilebilmesi ve elde edilen fraksiyonların karşılaştırılabilmesi için protein miktar tayinine ihtiyaç duyulmaktadır [4].

Günümüzde protein miktarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin çoğu, protein çözeltilerinin ultraviyole bölgede absorpsiyon göstermesi ya da proteinlerin belirli kimyasal belirteçlerle reaksiyona girerek renkli bileşikler (kromoforlar) oluşturması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemlerde, oluşan absorpsiyon ya da renk yoğunluğu görünür veya UV bölgede spektrofotometrik olarak ölçülerek protein miktarı nicel olarak farklı hassasiyetlerde tayin edilmektedir (Şekil 7.1) [1].

Bradford (Boya Bağlama) Yöntemi, protein miktarının nicel olarak belirlenmesinde yaygın biçimde kullanılan spektrofotometrik bir analiz yöntemidir. Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerle etkileşime girdiğinde renk değiştirmesi esasına dayanır. Boya, asidik ortamda protein çözeltisi ile reaksiyona girdiğinde, proteinin derişimine bağlı olarak farklı şiddetlerde mavi renk oluşmasına neden olur [5].

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması özellikle arginin gibi bazik amino asit yan zincirleri ile aromatik amino asit kalıntıları üzerinden gerçekleşmektedir. Bu nedenle boyanın bağlanma derecesi, yalnızca protein miktarına değil, aynı zamanda proteinin amino asit bileşimine ve yapısal özelliklerine de bağlıdır. Dolayısıyla Bradford yöntemi, farklı protein türleri için değişken yanıtlar verebilir [4].

Bradford yöntemi, Lowry yöntemine kıyasla daha kısa sürede sonuç vermesi, uygulamasının daha basit olması ve reaktif maliyetinin düşük olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca

yöntemin duyarlılığı yüksektir ve yaklaşık 0,001 mg/mL düzeyindeki protein derişimleri güvenilir biçimde ölçülebilmektedir [1].

Modifiye Lowry Metodu, protein miktarının nicel olarak belirlenmesinde kullanılan duyarlı bir spektrofotometrik yöntemdir. Yöntemin temelini, fosfomolibdotungstik asit içeren Folin–Ciocalteu belirtecini proteinlerde bulunan tirozin kalıntıları ile reaksiyona girerek mavi renkli bir kompleks oluşturması oluşturmaktadır [6].

Reaksiyon, ilk aşamada alkali ortamda bakır iyonları ile proteinler arasında bir kompleks oluşumu ile başlar. Bu aşama, oda sıcaklığında yaklaşık 5–10 dakika içerisinde tamamlanır. Oluşan bakır–protein kompleksi, ikinci aşamada Folin–Ciocalteu belirtecinde bulunan molibden ve tungsten iyonları ile etkileşime girerek yoğun mavi renkli yeni bir kompleks meydana getirir [7].

Bakır iyonlarının reaksiyon ortamında bulunması, yöntemin duyarlılığını önemli ölçüde artırmaktadır. Bakır–protein kompleksinin Folin belirteci ile verdiği reaksiyon sonucunda oluşan renk şiddeti, bakır bulunmayan sistemlere kıyasla yaklaşık 3–15 kat daha yüksektir. Bu özellik, Modifiye Lowry metodunu düşük derişimdeki proteinlerin tayini için uygun hâle getirmektedir [4].

Bununla birlikte, analiz edilen örnekte fenolik bileşiklerin bulunması yöntemin özgülüğünü olumsuz yönde etkileyebilir. Fenolik maddeler Folin–Ciocalteu belirteci ile reaksiyona girerek yalancı yüksek absorbans değerlerine neden olabileceğinden, bu tür bileşenlerin varlığı ölçüm hatalarına yol açabilmektedir [6].

Yöntem	Hassasiyet	Zaman	Prensip	Özellikler
Biüret	Düşük 1-6 mg	20-30 dk	Peptid bağlarının alkali bakır ile mor kompleks oluşturması (550 nm)	+ Hızlı, az girişim yapar - Hassasiyeti düşük
Basit absorbans UV	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
Basit Absorbans Uzak UV	Yüksek 0.01-0.05 mg	5-10 dk	190-205 nmdeki ışığın peptid bağları tarafından absorblanması (190 nm)	+ Hassas, protein geri kazanılabilir -Uygulanabilirliği düşük, girişim fazla, Tyr ve Trp içeriğine bağlı
Lowry	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
Bradford	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,
BCA (Bisinkoninik asit)	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 -
Gümüş /Altın Bağlama	Çok yüksek 0.000125 mg	10 dk	Kollodial altın ve gümüşün proteine bağlanması (dansitometrik ölçüm)	+ Çok hassas, girişim düşük - Proteinden proteine değişiklik gösterir
Nitrik Asit	Yüksek 0.005 mg	120-140 dk	Proteinlerin nitrik asit ile reaksiyon vermesi (358 nm)	+ Hassas, girişim düşük, ucuz - Zaman alıcı,

Şekil 7.1 Farklı metodların karşılaştırılması

MATERYAL VE METOD

Bradford (Boya Bağlama) Yöntemi

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, tartım kağıdı, spatül, falkon tüp, eppendorf tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, 96-well plate, ELISA reader.

- 1 mg/ml stok BSA çözeltisi
- Konsantrasyonu bilinmeyen protein çözeltisi
- %0.9 (w/v) NaCl çözeltisi
- Bradford çözeltisi

Boya belirtecinin 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 çözeltisi, kullanılacağı zaman 5 kat distile su ile sulandırılarak seyreltilir. Whatman no.1 filtreden geçirilir ve bir cam şişede, oda sıcaklığında saklanır

Deneyin Yapılışı

1. Kör (Blank) örnek, standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri Tablo 7.1'de verilen değerlere göre hazırlanır ve hızlı bir şekilde vortekslenir.
2. En az 5 dakika bekledikten sonra örnekler 96-well plate kuyucuklarına 100 µl olarak eklenir ve 595 nm'deki absorpsiyon değerleri ELISA readerda okunur.
3. Kullanılan BSA çözeltisinden standart eğri grafiğı hazırlanarak örnekteki protein derişimi hesaplanır.

Tablo 7.1 Bradford deneyi takip çizelgesi

Bileşikler	Standart Eğri					Örnek
	1(K)	2(S)	3(S)	4(S)	5(S)	
1mg/ml BSA (µl)	0	25	50	75	100	0
Örnek (µl)	0	0	0	0	0	100
dH ₂ O(µl)	100	75	50	25	0	0
%0,9 NaCl (ml)	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
Bradford çözeltisi (ml)	1	1	1	1	1	1
Toplam Hacim (ml)	7	7	7	7	7	7

Modifiye Lowry Metodu

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, tartım kağıdı, spatül, falkon tüp, eppendorf tüp, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, 96-well plate, ELISA reader.

- 1 mg/ml stok BSA çözeltisi
- A çözeltisi : 0.1 N (v/v) NaOH içerisinde %2 (w/v) Na₂CO₃
- B çözeltisi : %1 (w/v) Na- veya K- tartarat içinde %0.5 (w/v) CuSO₄.5H₂O
- C çözeltisi : 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karışımından oluşur (Taze hazırlanır).
- D çözeltisi : 1 hacim Folin belirteci: 2 hacim sudan oluşan karışımdır (Taze hazırlanır ve

ışıktan korunur; folin toksik olduğundan dikkatli kullanılmalıdır.)

Deneyin Yapılışı

1. Standart eğri ve ölçülecek protein örnekleri tüplere alınır ve üzerine 5'er ml C belirteci eklenerek karıştırılır.
2. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
3. Tüplere 0.5 ml D belirteci eklenir ve vorteksle karıştırılır (D çözeltisi eklendikten sonra 2-3 saniye içinde homojen bir şekilde karışım sağlanmalıdır ve tüpler ışıktan korunmalıdır).
4. Tüpler 30 dakika karanlıkta bekletilir.
5. 96-well plate kuyucuklarına 100 µl olarak eklenen örnek ve standartların 660 nm'de absorpsiyon değerleri ELISA readerda okunur.
6. Standart eğri grafiği hazırlanarak örnekteki protein derişimi bulunur.

Tablo 7.2 Lowry deneyi takip çizelgesi

Bileşikler	Standart Eğri					Örnek
	1(K)	2(S)	3(S)	4(S)	5(S)	
1mg/ml BSA (µl)	0	25	50	75	100	0
Örnek (µl)	0	0	0	0	0	100
dH ₂ O(µl)	100	75	50	25	0	0
C çözeltisi (ml)	5	5	5	5	5	5
D çözeltisi (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Toplam Hacim (ml)	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

KAYNAKLAR

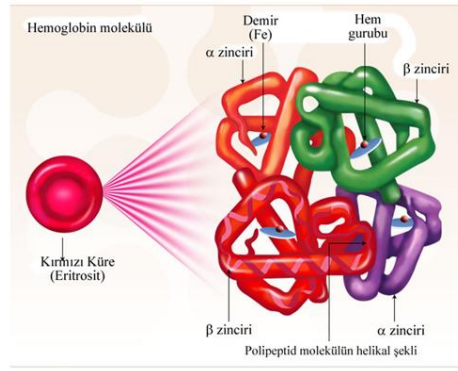
1. Nelson, D. L., & Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2021.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. Biochemistry. W. H. Freeman, 2019.
3. Lodish, H. et al. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman, 2016.
4. Scopes, R. K. Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 2013.
5. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254, 1976.
6. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265–275, 1951.
7. Plummer, D. T. An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill, 1987.

8.HAFTA: KANDA HEMOGLOBİN TAYİNİ

Hemoglobin, eritrositlerde bulunan ve temel görevi oksijenin akciğerlerden dokulara taşınması olan bir taşıyıcı proteindir. Yaklaşık 5,5 nm çapında, küresel yapıya sahip bir makromolekül olup tetramerik yapıdadır (Şekil 8.1) [1]. Hemoglobin molekülü, her biri bir hem prostetik grubu taşıyan dört polipeptit zincirinden oluşur. Erişkin insan hemoglobininde bu zincirler iki alfa ve iki beta globin zinciri şeklindedir [2]. Her bir alt birimde bulunan hem grubu, oksijenin bağlandığı aktif bölgeyi oluşturur.

Hemoglobinin alt birimleri arasındaki etkileşimler, proteinin oksijene olan ilgisini belirleyen konformasyonel değişikliklere neden olur. Dört hem grubuna oksijen moleküllerinin bağlanması, hemoglobin molekülünde yapısal bir değişim oluşturarak oksijen bağlanma özelliklerini etkiler. Bu özellik, hemoglobinin kooperatif bağlanma davranışının temelini oluşturur [3].

Kandaki hemoglobin miktarının tayini, klinik biyokimyada büyük öneme sahiptir ve bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Hemoglobin düzeyi kolorimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle ölçülebilmektedir [4]. Sağlıklı bireylerde normal hemoglobin değerleri kadınlar için 12–16 g/dL, erkekler için ise 13–18 g/dL aralığındadır [5].



Şekil 8.1 Hemoglobin yapısı.

Hemoglobin tayininde kolorimetrik ve spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır.

Kolorimetrik Yöntemle Hemoglobin Tayini, renk karşılaştırma esasına dayanır. Bu yöntemde eritrositler asidik ortamda parçalanır ve açığa çıkan hemoglobin, hidroklorik asit ile reaksiyona girerek asit hematine (hemin klorür) dönüşür. Oluşan koyu kahverengi rengin şiddeti, standart bir renk ile karşılaştırılarak kandaki hemoglobin miktarı belirlenir [4]. Bu yöntemde Sahli yöntemi adı verilmektedir.

Sahli hematometresinde, ortada derecelendirilmiş bir Sahli test tüpü ve yanlarda iki adet standart tüp bulunur. Standart tüplerde, belirli hemoglobin derişimlerine karşılık gelen renkler yer alır. Kan örneği, Sahli test tüpünde bulunan 1/10 N hidroklorik asit çözeltisi ile muamele edilerek hemin klorüre dönüştürülür. Elde edilen rengin, standart tüplerle karşılaştırılması sonucunda hemoglobin düzeyi belirlenir. Sahli tüplerinde %100 değer, kullanılan cihaza bağlı olarak 14,5 veya 16 g hemoglobinin 100 mL kanda bulunmasına karşılık gelmektedir (Şekil 8.2) [6].



Şekil 8.2 Sahli hematometresi.

Spektrofotometrik Yöntemle Hemogloblin Tayininde ise, hemogloblinin kanda bulunan farklı formları tek bir stabil bileşiğe dönüştürülür. Kanda hemoglobin; oksihemoglobin, karboksihemoglobin, methemoglobin ve diğer küçük fraksiyonlar hâlinde bulunur. Bu formlar, potasyum ferrisiyanid ve potasyum siyanid içeren Drabkin çözeltisi ile reaksiyona sokularak siyanmethemoglobin adı verilen stabil bir bileşiğe dönüştürülür [7]. Oluşan siyanmethemoglobinin absorbansı, spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülür. Bu yöntem hem manuel uygulamalarda hem de otomatik hücre analizörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hemoglobin düzeyi tam kanda gram/desilitre (g/dL) cinsinden ifade edilir [5].

MATERYAL VE METOD

Drabkin Yöntemi

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: %70'lik alkol, lanset, pamuk, distile su, falkon tüpler, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, 96-well plate, ELISA reader.

- Drabkin's Reagent (1L dH₂O içinde çözülür, içerisinde siyanür bileşeni olduğundan dikkatli çalışılmalıdır).
- 0,5 ml Brij 23 çözeltisi (1 L Drabkin's çözeltisine 0.5 ml eklenir).

Deneyin Yapılışı

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

KAYNAKLAR

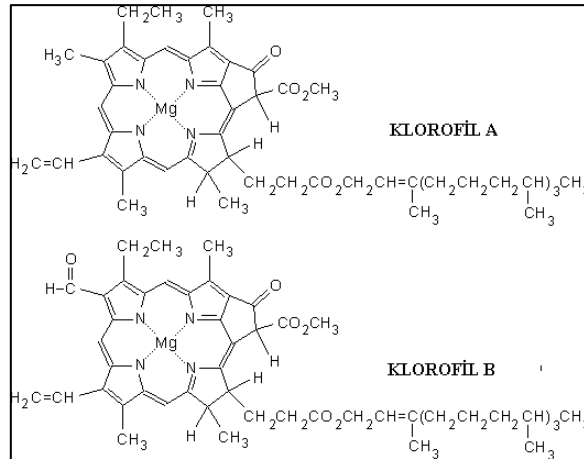
1. Nelson, D. L., & Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2021.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. Biochemistry. W. H. Freeman, 2019.
3. Perutz, M. F. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Quarterly Reviews of Biophysics, 22, 139–237, 1989.
4. Plummer, D. T. An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill, 1987.

5. Tietz, N. W. Fundamentals of Clinical Chemistry. Saunders, 1996.
6. Varley, H., Gowenlock, A. H., & Bell, M. Practical Clinical Biochemistry. Heinemann Medical Books, 1980.
7. Drabkin, D. L., & Austin, J. H. Spectrophotometric studies: Preparation from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. Journal of Biological Chemistry, 112, 51–65, 1935.

9. HAFTA: BİTKİLERDEN PİGMENT İZOLASYONU: KLOROFİL VE KAROTENOİD TAYİNİ

Bitkilerde fotosentezde görev alan temel pigmentler iki ana gruba ayrılmaktadır: klorofiller ve karotenoidler. Her iki pigment grubu da kloroplastların içinde yer almakta olup, fotokimyasal olarak aktif fotosentetik biyomembranlar olan tilakoid zarlarında bulunan protein komplekslerine bağlı hâlde bulunmaktadır [1]. Bitki dokusunun aseton veya metanol gibi organik çözücülerle parçalanması sonucunda bu pigmentler, proteinlerden ayrılmış şekilde izole edilebilmektedir [2]. Klorofil ve karotenoidlerin organik çözücülerde kolaylıkla çözünmeleri nedeniyle, biyokimyasal sınıflandırmada lipidler grubunda değerlendirildikleri kabul edilmektedir [3].

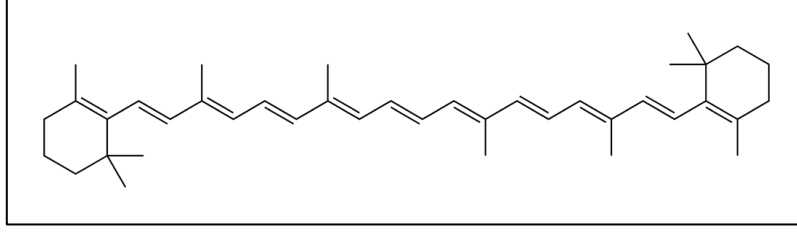
Bitkilerde en yaygın olarak bulunan pigmentler **klorofil a** ve **klorofil b** olup (Şekil 9.1), bu iki pigment yaklaşık olarak a:b = 3:1 oranında bulunmaktadır [4]. Canlı bitki hücrelerinde klorofiller birincil fotosentetik pigmentlerdir ve özellikle ışığın mavi (yaklaşık 450 nm) ve kırmızı (650–700 nm) dalga boyu aralıklarında absorpsiyon göstermektedirler [1]. Işığın absorpsiyonu sonucunda klorofil molekülündeki bir elektron daha yüksek enerji düzeyine uyarılmakta ve bu durum fotosentetik elektron taşıma zincirinin başlamasına neden olmaktadır. Bu süreç sonucunda NADPH ve ATP sentezlenmekte, elde edilen bu enerji taşıyıcı moleküller bitkide karbonhidrat metabolizmasında kullanılmaktadır [5].



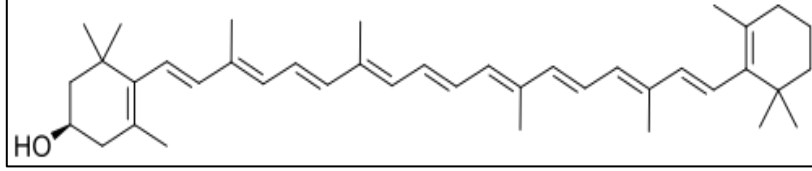
Şekil 9.1 Klorofil a ve klorofil b'nin yapısı.

İkinci fotosentetik pigment grubu olan karotenoidler, yapısal özelliklerine göre iki ana sınıfa ayrılmaktadır. **Karotenler**(Şekil 9.2) yalnızca karbon ve hidrojen atomlarından oluşan hidrokarbon yapılı pigmentlerdir. **Ksantofiller**(Şekil 9.3) ise karbon ve hidrojene ek olarak oksijen atomu içermekte olup, bu oksijen atomları hidroksil veya epoksit fonksiyonel grupları şeklinde bulunmaktadır [3]. Bitkilerde karotenoidlerin yüzde bileşimi; ışık şiddeti, sıcaklık ve besin durumu gibi çevresel büyüme koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [2]. Karotenoidler içerisinde yer alan β -karoten, hem fotosentezde ışık hasadına katkı sağlamakta hem de klorofil moleküllerini foto-oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol üstlenmektedir [1].

Klorofil a ve klorofil b pigmentleri, görünür ışık spektrumunun özellikle 400–475 nm ve 600–675 nm dalga boyu aralıklarında maksimum absorpsiyon göstermektedir. Bu absorpsiyon özellikleri, fotosentezin ışık reaksiyonlarının etkin bir şekilde gerçekleşmesini mümkün kılmaktadır [4].



Şekil 9.2 β-karoten kimyasal yapısı.



Şekil 9.3 Ksantofil kimyasal yapısı.

Bu dalga boylarında gözlenen absorpsiyon piklerinin maksimum değerleri, analizde kullanılan çözücünün polaritesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin, dietil eter gibi düşük polariteli bir çözücünde klorofil a için yoğun absorpsiyon pikleri 660 nm ve 428 nm dalga boylarında ortaya çıkarken, daha yüksek polariteye sahip metanol kullanıldığında bu piklerin sırasıyla 665 nm ve 432 nm dalga boylarına kaydığı gözlenmektedir [2,6]. Bu kaymalar, çözücü–pigment etkileşimlerinin elektronik geçiş enerjilerini etkilemesinden kaynaklanmaktadır.

Karotenoid pigmentler ise klorofillerden farklı olarak görünür spektrumda tek bir geniş bölgede yoğun absorpsiyon göstermektedir ve bu absorpsiyon genellikle 350–500 nm dalga boyu aralığında yoğunlaşmaktadır [7]. Bu özellik, karotenoidlerin ışık hasadı ve fotokoruyucu rolleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu tür spektrofotometrik çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, yalnızca pigmentlerin tanımlanmasında değil, aynı zamanda bitki ekstralarında bulunan klorofil ve karotenoidlerin konsantrasyonlarının nicel olarak belirlenmesinde de yaygın biçimde kullanılmaktadır [1].

MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Distile su, havan, havan eli, cam tozu, falkon tüpler, otomatik pipet, pipet uçları, vorteks, filtre kağıdı, kuvartz küvetler, UV-spektrofotometre.

- Bitki dokusu
- Saf aseton
- Susuz sodyum sülfat

Deneyin Yapılışı

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.

Pigment Konsantrasyonunun Hesaplanması: Ekstrenin klorofil ve karotenoid içeriğini belirlemek için ekstrakt seyreltilerek çeşitli dalga boylarında (661.6, 644.8 ve 470 nm) ölçümler yapılır ve aşağıdaki eşitlikler kullanılarak pigment konsantrasyonları hesaplanır.

$$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8} \quad (C_a = \text{Bitki ekstresindeki klorofil a konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}))$$

$$C_b = 20.13A_{644.8} - 4.19A_{661.6} \quad (C_b = \text{Bitki ekstresindeki klorofil b konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}))$$

$$C_{a+b} = 7.05A_{661.6} + 18.09A_{644.8} \quad (C_{a+b} = \text{Total klorofil konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}))$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.90C_a - 63.14C_b) / 214 \quad (C_{x+c} = \text{Total karotenoid konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}))$$

Kendi deneyiniz için aşağıdaki bilgileri doldurup sonucu belirtiniz.

Çalışma Materyali:

Miktarı g

Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücü Hacmi ml

Ekstre Hacmi (Filtreden Geçirdikten Sonraki Hacim) : ml

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

$C_a =$

$C_b =$

$C_{a+b} =$

$C_{x+c} =$

KAYNAKLAR

1. Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. Plant Physiology and Development. Sinauer Associates, 2015.
2. Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148, 350–382, 1987.
3. Nelson, D. L., & Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2021.
4. Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. Biology of Plants. W. H. Freeman, 2013.
5. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. Biochemistry. W. H. Freeman, 2019.
6. Porra, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research, 73, 149–156, 2002.
7. Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB Journal, 9, 1551–1558, 1995.

10.HAFTA: *In vivo* BİYOKİMYASAL DENEYLER İÇİN DOKU LİZATLARININ HAZIRLANMASI

Doku lizati, hücrel bileşenlerin analiz edilebilmesi amacıyla dokuların uygun yöntemlerle parçalanması ve içerdikleri biyomoleküllerin çözelti fazına aktarılması sürecidir. Bu işlem; biyokimyasal analizler, protein ekspresyon profillemesi, enzim aktivite tayinleri, western blot, ELISA, PCR ve proteomik çalışmalar gibi pek çok deneysel uygulamanın temel basamaklarından birini oluşturmaktadır [1,2]. Lizat hazırlanması sırasında hücrel bütünlüğün kontrollü biçimde bozulması ve hedef moleküllerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin korunması büyük önem taşır [3].

Doku lizati hazırlama süreci, çalışılacak doku örneğinin uygun koşullarda toplanmasıyla başlar. Dokudaki biyolojik aktivitenin korunabilmesi için örneklerin genellikle -80°C 'de veya sıvı azot içerisinde saklanması önerilmektedir [4]. Taze doku kullanılması durumunda ise lizis işlemi mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirilmelidir. Ekstraksiyon veriminin artırılması amacıyla doku örnekleri, lizis tamponu ile temas ettirilmeden önce küçük parçalara ayrılır [5].

Lizis tamponu, hücre zarının kontrollü bir şekilde parçalanmasını sağlayan ve hücrel bileşenlerin stabilitesini koruyan çözeltilerdir. Kullanılacak tamponun bileşimi, yapılacak analizin türüne ve hedeflenen biyomoleküle bağlı olarak belirlenir [6]. Lizis tamponları genellikle hücrel ozmotik dengeyi sağlamak amacıyla Tris-HCl veya PBS gibi tuzlar, hücre zarının çözünmesini sağlamak için Triton X-100, SDS veya NP-40 gibi deterjanlar, proteinlerin degradasyonunu önlemek için proteaz ve fosfataz inhibitörleri ve metal iyonlarını bağlayarak protein stabilitesini artıran EDTA gibi şelatlayıcı maddeler içerir [7]. Membran proteinlerinin izolasyonu için yüksek deterjan içeriğine sahip tamponlar tercih edilirken, nükleer proteinlerin ekstraksiyonu için daha düşük iyonik güce sahip hipotonik tamponlar kullanılmaktadır [8].

Doku veya hücrelerin parçalanması, mekanik, kimyasal veya enzimatik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Mekanik yöntemlerde homojenizatörler, sonikatörler veya doku öğütücüleri aracılığıyla doku fiziksel olarak parçalanır ve hücrel içerik serbest bırakılır [9]. Kimyasal yöntemlerde deterjanlar ve lizis tamponları hücre zarlarını çözerek lizisi sağlar. Enzimatik yöntemlerde ise lizozim, tripsin veya DNaz gibi enzimler kullanılarak hücrel yapıların kontrollü bir şekilde yıkılması sağlanır [10]. Çoğu uygulamada bu yöntemler bir arada kullanılarak daha etkin ve verimli bir lizis elde edilmektedir.

Çalışılan hücre tipine ve hedeflenen biyomoleküle bağlı olarak uygun lizis yönteminin seçilmesi gerekmektedir. Lizis stratejisi, hücrel yapıların selektif olarak parçalanmasını ve hedef moleküllerin bütünlüğünün korunmasını amaçlamalıdır [2]. Örneğin nükleer proteinlerin ekstraksiyonu hedeflendiğinde, hücre membranı öncelikle hipotonik tampon kullanılarak şişirilir ve mekanik veya hafif kimyasal işlemlerle parçalanır; bunu takiben nükleer membran kontrollü bir şekilde bozularak nükleer içerik serbestleştirilir [8].

Lizis işleminin ardından hücresel kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla santrifüj uygulanır. Bu aşama, çözünmüş proteinler ve diğer hücresel bileşenleri içeren süpernatantın, hücresel artıkların oluşturduğu pelet kısmından ayrılmasını sağlar [3]. Santrifüj hızı ve süresi, ayrıştırılmak istenen hücresel fraksiyona göre değişiklik göstermektedir. Düşük hızda santrifüj (300–500 g, 5–10 dakika) bütün hücrelerin ve büyük hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasında kullanılırken, orta hızda santrifüj (10.000–15.000 g, 10–20 dakika) organellerin veya büyük protein komplekslerinin ayrıştırılması için tercih edilir [10]. Yüksek hızda santrifüj (100.000 g ve üzeri, yaklaşık 1 saat) ise membran fraksiyonları ile sitozolik proteinlerin ayrılması amacıyla uygulanmaktadır [11]. Santrifüj sonrasında süpernatant dikkatlice toplanarak analizlerde kullanılmak üzere ayrılır.

Elde edilen lizatlardaki hedef moleküllerin stabilitesini koruyabilmek için uygun saklama koşulları sağlanmalıdır. Kısa süreli kullanımlar için süpernatantlar 4 °C’de birkaç saat veya –20 °C’de birkaç gün saklanabilirken, uzun süreli depolama için –80 °C’de muhafaza edilmesi önerilmektedir [4]. Protein stabilitesini artırmak amacıyla lizata gliserol gibi kriyoprotektanlar eklenebilir. Tekrarlayan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır, çünkü bu durum proteinlerin denatürasyonuna ve fonksiyon kaybına yol açabilmektedir [5].

Sonuç olarak doku lizatı hazırlama süreci, hücresel ve biyokimyasal analizlerin temel basamaklarından biridir. Uygun lizis tamponunun ve lizis yönteminin seçimi, hedef biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunması açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle her aşama dikkatle planlanmalı ve lizis koşulları, yürütülecek deneylerin amacına uygun şekilde optimize edilmelidir [1].

MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Soğuk distile su, bistüri, tartım kabı, beher, falkon tüpler, otomatik pipet, pipet uçları, homojenizatör, vorteks,

- Doku örneği ve %1,15 (w/v) KCl çözeltisi

Doku Örneklerinin Hazırlanması

1. Doku örneğine ağırlığının 10 katı kadar hacimde soğuk %1,15’lik KCl çözeltisi eklenerek doku homojenize edilir. Örnekler hemen kullanılmayacaksa -80 °C’de saklanır.

KAYNAKLAR

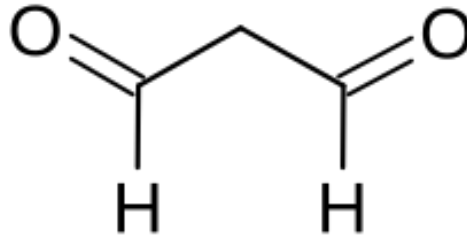
1. Sambrook, J., Russell, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
2. Alberts, B. et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 2015.
3. Scopes, R. K. Protein Purification: Principles and Practice. Springer, 1994.
4. Burgess, R. R. Protein precipitation techniques. Methods in Enzymology, 463, 331–342, 2009.
5. Walker, J. M. The Protein Protocols Handbook. Humana Press, 2009.
6. Green, M. R., Sambrook, J. Analysis of proteins and proteomes. Cold Spring Harbor Protocols, 2018.
7. Link, A. J. Proteomics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. CSHL Press, 2019.
8. Wilson, L., Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge University Press, 2010.
9. Goldstein, J. L. et al. Cell disruption techniques. Analytical Biochemistry, 150, 1–8, 1985.
10. Deutscher, M. P. Guide to Protein Purification. Academic Press, 1990.
11. Graham, J. M. Biological Centrifugation. BIOS Scientific Publishers, 2001.

10.HAFTA (DEVAM): MALONDİALDEHİT TAYİNİ DENEYİ

Organizmada oksidan–antioksidan dengesinin korunması, sağlıklı bir yaşamın sürdürülebilmesi açısından temel bir gerekliliktir [1]. Metabolik süreçler sırasında endojen olarak serbest radikaller üretilmesinin yanı sıra; güneş ışınları, iyonize radyasyon, sigara kullanımı ve çevre kirliliği gibi ekzojen faktörler de serbest radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır [2]. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren yüksek derecede reaktif moleküller olup başta lipitler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere tüm hücrel bileşenlerle etkileşime girerek yapısal ve fonksiyonel hasara yol açabilme potansiyeline sahiptirler [3]. Serbest radikal üretiminin artması ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda organizmada oksidatif stres gelişmektedir [4].

Reaktif oksijen türleri (ROS), özellikle çoklu doymamış yağ asitleri üzerinde etkili olarak lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır [5]. Memeli hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan ve malondialdehit gibi çeşitli yıkım ürünlerine dönüşmesiyle lipit peroksidasyonu meydana gelir [6]. Bu süreç, hücre zarının bütünlüğünü bozarak hücrel fonksiyonların aksamasına yol açan en önemli hücrel zedelenme mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir [7].

Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan yıkım ürünleri arasında biyolojik açıdan en önemlisi malondialdehit (MDA)'dir. Malondialdehit, $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ moleküler formülüne sahip, düşük molekül ağırlıklı bir organik bileşiktir (Şekil 10.1) [8]. Renksiz bir sıvı olan MDA, enol formunda bulunabilen oldukça reaktif bir bileşik olup oksidatif stresin biyokimyasal bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [9].



Şekil 10.1 Malondialdehit (MDA) kimyasal yapısı.

Lipit peroksidasyonu düzeyi, tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren bileşiklerin belirlenmesine dayanan TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) yöntemi ile ölçülmektedir [10]. Bu yöntem, lipit peroksidasyonu sırasında oluşan başlıca son ürünlerden biri olan malondialdehitin (MDA), asidik ortam ve yüksek sıcaklık koşullarında TBA ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır [6]. Oluşan MDA–TBA kompleksi pembe-kırmızı renkte olup, maksimum absorpsiyonu 535 nm dalga boyunda göstermektedir [9]. Bu absorpsiyon değerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle örnekteki TBARS miktarı dolaylı olarak tayin edilmekte ve böylece lipit peroksidasyon düzeyi hakkında nicel bilgi elde edilmektedir [8].

MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Sıcak su banyosu, beher, santrifüj, otomatik pipet, pipet uçları, 96-well plate, ELISA reader.

- 0.25 M HCl
- %0,375 (w/v) Tiyobarbitürik Asit (TBA)
- %15 (w/v) Trikloroasetik Asit (TCA)

Deneyin Yapılışı

1. Gerekli hesaplamalar yapıp tartımlar alınır.
2. Trikloroasetik asit(TCA) üzerine 80 ml saf su eklenir ve çözülene kadar karıştırılır.
3. Çözülen TCA üzerine Tiyobarbitürik Asit (TBA) ve 2 ml HCl eklenerek TBA'nın tamamen çözünmesi için hafifçe ısıtılarak çözelti karıştırılır.
4. %1.15 soğuk KCl ile homojenize edilen homojenatlar üzerine 1 ml TCA/TBA karışımı içeren solüsyondan eklenir ve örnekler 15 dk 100 °C'de kaynatılır (Blank olarak 1 ml TBA/TCA çözeltisine 0,5 ml saf su eklenir).
5. Kaynatılan örnekler biraz soğutulduktan sonra 3000 g'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edilerek soğutulur ve süpernatandan 100 ul örnek alınarak 96-well plate kuyularına eklenerek 535 nm'de spektrofotometrik olarak okunur.

KAYNAKLAR

1. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 2015.
2. Valko, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44–84, 2007.
3. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biology, 4, 180–183, 2015.
4. Birben, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal, 5, 9–19, 2012.
5. Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014.
6. Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine, 11, 81–128, 1991.
7. Niki, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. Free Radical Biology and Medicine, 47, 469–484, 2009.
8. Del Rio, D. et al. Malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in health and disease. Molecular Aspects of Medicine, 36, 1–15, 2013.
9. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology and Medicine, 9, 515–540, 1990.
10. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95, 351–358, 1979.

11.HAFTA: İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ

İnce tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC), bileşenlerin fizikokimyasal özelliklerindeki farklılıklara dayanan yaygın bir ayırma ve tanımlama yöntemidir [1]. Uygulama prensibi bakımından kağıt kromatografisine benzemekle birlikte, daha kısa sürede sonuç vermesi, daha iyi ayırma sağlaması ve daha geniş bir uygulama alanına sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir [2]. TLC, bir reaksiyonun ilerleyişinin izlenmesi, başlangıç maddeleri ile ürünlerin karşılaştırılması, bilinmeyen bir bileşiğin bilinen bir standart yardımıyla tanımlanması ve maddelerin saflık kontrolünün yapılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır [3]. Ayrıca kolon kromatografisi ile yapılacak saflaştırma işlemlerinden önce uygun mobil fazın belirlenmesinde önemli bir ön analiz yöntemi olarak görev yapmaktadır [4].

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak genellikle silikajel (SiO_2), alüminyum oksit (Al_2O_3), selüloz ve türevleri ya da poliamidler kullanılmaktadır (Şekil 11.1). Bu yöntemde ayırma mekanizmasının temelini adsorpsiyon oluşturmaktadır [1]. En yaygın kullanılan adsorbanlar silikajel ve alüminyum oksittir. Sabit fazın polaritesi arttıkça, polar bileşiklerin yüzeye daha kuvvetli bağlanması söz konusu olmaktadır [5]. TLC uygulamalarında, yüzeyi adsorban madde ile kaplanmış cam, alüminyum veya plastik plakalar kullanılır. Bu plakalar ticari olarak temin edilebildiği gibi laboratuvar ortamında da hazırlanabilir [2]. Cam plakaların boyutları genellikle 5×20 cm ile 20×20 cm arasında değişmektedir. Adsorban tabakanın kalınlığı yapılacak analizin türüne bağlı olarak 0,25–2 mm arasında seçilir. Plakalar kullanılmadan önce yaklaşık 110°C 'de 1–2 saat kurutularak aktive edilir ve nemden korunarak kullanılır [3].

Mobil faz, bir veya birden fazla çözücünün belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanır. Adsorpsiyon kromatografisinde çözücüler, elüsyon güçlerine göre eluotrop seri olarak sınıflandırılmaktadır. Bir çözücünün elüsyon gücü, genel olarak polaritesi arttıkça yükselir [4]. Uygun mobil faz seçimi, bileşenler arasında yeterli ayırma sağlanabilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

İnce tabaka kromatografisinin başlıca avantajları arasında, kullanılan ekipmanın basit ve ekonomik olması, ayırma süresinin kısa olması, farklı adsorban ve çözücü sistemleriyle çalışılabilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi yer almaktadır [1]. Ayrıca Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) sistemleri sayesinde densitometrik tarama yapılabilmekte, kantitatif analiz gerçekleştirilebilmekte ve sonuçlar dijital olarak kaydedilebilmektedir [6].



Şekil 11.1 TLC uygulama tankı ve plakalar

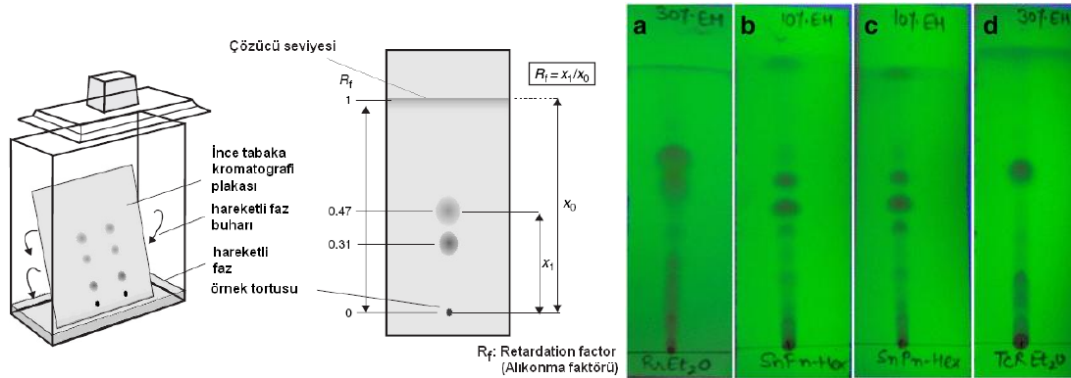
MATERYAL VE METOD

Deneyde Kullanılacak Malzemeler: Kromatografi tankı, kapiler cam boru, 1.5 x 7cm boyutunda silikajel kaplı alüminyum plaka.

- Hegzan
- Aseton
- Diklorometan
- Dietil eter
- Etanol
- Etil asetat
- Sekonder metabolit (incelenecek örnek)

Deneyin Yapılışı

Kromatografi tankı içerisine mobil faz yaklaşık 5–8 mm yüksekliğinde konur ve tankın iç duvarı çözücü buharı ile doymun hale gelmesi için süzgeç kağıdı ile kaplanır. Geliştirme işlemi genellikle aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Analizi yapılacak bileşiğin uygun çözücünde hazırlanmış %1–2’lik çözeltisi, kapiler cam boru yardımıyla plakanın alt kenarından yaklaşık 1 cm yukarıya, eşit aralıklarla damlatılır. Hazırlanan plaka, çözücü seviyesi başlangıç çizgisinin altında kalacak şekilde tank içerisine dik olarak yerleştirilir. Mobil faz, kapiler etki ile yukarı doğru ilerledikten sonra plaka tanktan çıkarılır ve çözücü cephesi işaretlenir. Plaka kurutulduktan sonra lekeler çıplak gözle, UV ışığı altında görünür hale getirilir (Şekil 11.2). UV bölgede absorpsiyon yapan veya floresans özelliği gösteren bileşiklerin tespiti daha kolaydır; aksi durumda renkli türevler oluşturan reaktifler kullanılır.



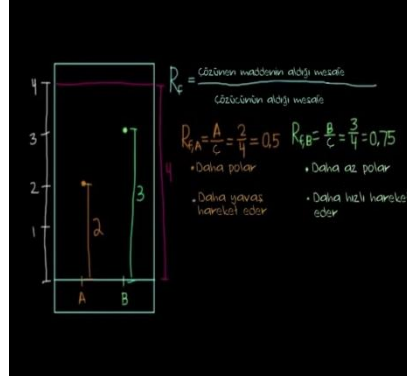
Şekil 11.2 İTK uygulaması ve UV altındaki temsili görünütüsü.

Rf (retardation factor) değeri, ince tabaka kromatografisinde (TLC) bir bileşiğin mobil ve sabit fazlar arasındaki dağılım davranışını tanımlamak için kullanılan boyutsuz bir parametredir. Bir maddenin TLC plakası üzerinde mobil faz ile birlikte ne kadar ilerlediğini nicel olarak ifade eder ve bileşiklerin tanımlanması ile karşılaştırılmasında yaygın olarak kullanılır [1]. Rf değeri aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır [2]:

Rf = Maddenin başlangıç çizgisinden itibaren aldığı yol / Çözücü cephesinin başlangıç çizgisinden itibaren aldığı yol (Şekil 11.3).

Hesaplamada, maddenin aldığı yol, başlangıç çizgisinden lekenin merkezine kadar olan mesafe olarak ölçülür. Çözücü cephesi mesafesi ise başlangıç çizgisinden çözücünün ulaştığı en üst noktaya kadar olan mesafedir. Her iki mesafenin de aynı birimde ölçülmesi gerekir [3].

Rf değerleri 0 ile 1 arasında değişir. Düşük Rf değerine sahip bileşikler sabit faz ile daha güçlü etkileşen, genellikle daha polar maddelerdir. Yüksek Rf değerine sahip bileşikler ise mobil faz ile daha fazla taşınan, genellikle daha az polar özellik gösteren maddelerdir [5]. Rf değeri; kullanılan adsorbanın türüne, mobil fazın bileşimine, plakanın aktivasyonuna ve deney koşullarına bağlı olarak değiştiğinden, yalnızca aynı koşullar altında elde edilen değerler karşılaştırılabilir [1,3].



Şekil 11.3 Rf değeri hesaplanması

KAYNAKLAR

1. Stahl, E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. Springer, Berlin, 1969.
2. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning, 2007.
3. Poole, C. F. The Essence of Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 2003.
4. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley, 2010.
5. Sherma, J., Fried, B. Handbook of Thin-Layer Chromatography. Marcel Dekker, 2003.
6. Reich, E., Schibli, A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme, 2007.