

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**  
**VETERİNER FAKÜLTESİ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BİYOKİMYA I LABORATUVAR**  
**DERS NOTLARI**

**ERZURUM 2018**

## 1. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ

Kimyasal maddelerin kullanıldığı laboratuvarlarda çalışılırken güvenlik önlemlerini almak hayati önem taşımaktadır. Laboratuvarlarda bulunan kimyasalların büyük bir olasılıkla toksik, irrite edici ve patlayıcı olabileceği kesinlikle göz ardı edilmemelidir. Kimyasalların birçoğu yanlış kullanıldığında ya da uygun olmayan şekillerde atıldığı zaman çok tehlikeli durumlara yol açabilmektedir. Laboratuvar kazalarının hiç olmaması ya da en aza indirilmesi için laboratuvara çok iyi hazırlanarak gelmek ve anlatılan deneysel prosedürlerin tam olarak anlaşılması ile gerçekleştirilebilir. Tehlikeli durumlar genelde beklenmedik şekilde gelişirler. Bu nedenle genel güvenlik kuralları ve acil durumlarda hareket tarzı iyi bilinmelidir. Laboratuvar çalışmalarında aynı ortamda çalışan diğer kişilerin güvenliği için de ayrı bir özen gösterilmesi gerekmektedir. Bir kişinin dikkatsizliği ile oluşabilecek tehlikeli durumların diğerlerine de zarar verebileceği unutulmamalıdır.

Yanıcı veya toksik olan kimyasal maddeler, cam malzemeler, kesici ve delici aletler (iğne, bisturi vb.), enfeksiyon kaynağı biyolojik materyaller (kan, bakteri, virüs vb.) çok dikkatli kullanılmalı ve kuralına göre atılmalıdır. Isıtıcı bloklar, santrifüjler ve yüksek voltajlı elektroforez güç kaynakları gibi elektrikli aletler dikkatsiz kullanımda ayrı birer tehlike kaynağıdır.

Atık kimyasal, kesici objeler ve enfeksiyöz ajanların kuralına uygun olarak atılması sadece laboratuvar çalışma güvenliği için değil, genel halk sağlığı ve çevrenin korunması için de önem arz etmektedir.

Bütün öğrenci ve diğer çalışanların bir biyokimya laboratuvarında oluşabilecek tehlikeli durumları ve bu durumda neler yapacaklarını bilmeleri çok önemlidir. Bu nedenle uyulması gereken laboratuvar kuralları çok önemlidir.

## **LABORATUVARDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR**

1. Laboratuvarlar özenle ve ciddiyetle çalışılan mekanlardır. Araştırmacılar bu mekanlarda lakayt tavırlardan kaçınmalıdırlar.
2. Kimyasal maddelerin günlük kullanılan kıyafetlere veya tene temas etmesinden kaçınılması için beyaz önlük giyilmelidir.
3. Deneyleri yapacak olan kişiler laboratuvara zamanında ve hazırlıklı olarak gelmeli ve sorumlular tarafından izin verilmeden laboratuvarı terk etmemelidirler.
4. Laboratuvarda bir şeyler yenmemeli ve içilmemelidir.
5. Laboratuvarda şakaşma, müzik dinleme gibi amaç dışı hareketlerden kaçınılmalıdır.
6. Çalışırken heyecan ve panik yapmadan son derece sessiz ve sakin çalışılmalıdır.
7. Uzun saçlar toplanmalı, etrafı döküp saçacak dağınık kıyafetlerle çalışılmamalıdır.
8. Pipet kullanırken, herhangi bir ayarda daldırılan pipetin başka bir ayarda daldırılmamasına dikkat edilmelidir.
9. Kullanılan malzemelerin çatlaması, kırılması, kaybolması veya bozulması durumlarında laboratuvar sorumlusu bilgilendirilmelidir.
10. Laboratuvar çalışmasına başlamadan önce o gün hangi deney yapılacağı, yapılacak deneyin amacı, prensibi ve çalışma sonucunun nasıl gözlemleneceği veya hesaplanacağı önceden öğrenilmelidir.
11. Çalışılacak kimyasalın özellikleri veya tehlikesi hakkında herhangi bir sorun görülüyorsa, çalışmaya başlamadan önce laboratuvar sorumlusuna sorulmalıdır.
12. Gelişigüzel ve bir amaca dayanmayacak şekilde iki kimyasal maddenin karıştırılması ve sadece ne olduğunu görmek için yapılacak deneylerin kötü sonuçlara neden olabileceği unutulmamalıdır.

13. Reaktif şişesinden sıvı haldeki kimyasal madde deney tüpüne aktarılırken, şişe üzerinde etiket kısmı avuç içine gelecek şekilde olmalı ve tekniğine uygun olarak sıvı tüpe alınmalıdır.
14. Gerek sıvı gerekse katı maddelerin istemeyerek deney tüpüne fazla alınması durumunda fazlalığı geri stok şişesine veya kabına dökülmemelidir.
15. Deney tüpündeki iki sıvı maddenin karıştırılması için veya deney tüpündeki katı maddenin suda çözündürülmesi için aksi belirtilmedikçe tüpün ağzı parmakla kapatılarak çalkalanmamalıdır.
16. Stok kimyasal ve ayıraç şişelerinin ağızları açık bırakılmamalıdır. Çünkü buharlaşmaya bağlı zehirlenme veya madde konsantrasyonunda değişim meydana gelebilir.
17. Deney tüplerinin alev üzerinde ısıtılması işlemi, tüp hafif eğik durumda iken ve sıvı üst yüzeyinin biraz altından olacak şekilde yapılmalıdır. Bu işlemi yaparken kaynamadan kaynaklanacak sıçramaları önlemek için tüp düzenli bir biçimde sallanmalıdır. Isıtılan tüpün ağız kısmını kişi kendine veya başkalarına doğru tutmamalıdır. Ayrıca ısıtma işleminde tüp alev üzerinde sürekli tutulmamalı, ara ara alevden uzaklaştırarak ısıtma işlemi gerçekleştirilmelidir.
18. Kuvvetli asitlerin seyreltilmesi veya katı alkali hidroksitleri çözülmesi esnasında aşırı miktarda ısı açığa çıkacağı için dikkatli olunmalıdır. Bu amaçla asitler sulandırılırken asit üzerine su ilave edilmemeli, su daha önce kaba alınarak üzerine soğutma işlemiyle birlikte asit ilave edilmelidir.
19. Herhangi bir çözeltinin asitleştirilmesi veya alkalileştirilmesinde kullanılacak asit veya baz istenen reaksiyon oluşuncaya kadar azar azar ve damla damla ilave edilmelidir.

20. Kağıt ve katı maddeler kesinlikle lavaboya atılmamalı, çöp kutusuna atılmalıdır. Sıvı maddeler ise aksi belirtilmedikçe, çeşme suyu açık durumda iken lavaboya dökülmelidir.
21. Yanıcı ve kendiliğinden tutuşabilen eter, kloroform, vb ayıraçların bulunduğu kaplar hiçbir zaman bunzen beklerinin yanlarında bırakılmamalı ve açılmamalıdır.
22. Kullanılan kimyasal maddelerin zehirli ve toksik olabileceği göz önüne alınarak hiçbir zaman koklanmamalı, tadına bakılmamalı ve inhalasyondan kaçınılmalıdır.
23. Toksik, yakıcı, organik solventler, asitler ve bazlar cam pipete alınırken kesinlikle ağız kullanılmamalı, puar veya otomatik dispensör kullanılmalıdır.
24. Herhangi bir olumsuzluk durumunda neyi nasıl acilen yerine getirilmesi gerektiği yönündeki bilgilerin önceden bilinmesinde büyük yararlar vardır. Örneğin asit sıçraması halinde bölge derhal bolca sodyum bikarbonat veya bu yoksa su ile yıkanmalıdır. Elbiseye asit sıçramışsa, önce seyreltik amonyak çözeltisi ile daha sonra su ile yıkanmalıdır. Baz çözeltilerinin sıçraması durumunda doymuş borik asit çözeltisi kullanılır. Bu esnada eldiven giyilmelidir. Biyolojik materyal bulaşması durumunda bol sabunlu su ile yıkanmalıdır.
25. Kullanılan aletler ve cam malzemeler laboratuvar sonunda temiz bir şekilde bırakılmalıdır. Deney tüplerinin temizliği için deterjanlı su ve tüp fırçası kullanılır. Deney tüpünün fırça ile yıkanması işleminde, fırça tüpün boyundan biraz kısa olacak şekilde parmakla sabitlenerek kullanılmalı ve deney tüplerinin dip kısımlarının kırılmamasına dikkat edilmelidir. Çalışılan masalar silinmeli ve en son laboratuvardan çıkarken eller temizlenmelidir.
26. Lavabo ya da çöpe atılmaması gereken radyoaktif veya kimyasallar özel atık kabına boşaltılmalıdır.

# **LABORATUVARDA MEYDANA GELEBİLEN KAZALAR VE YAPILACAK İLK YARDIM**

Laboratuvarda meydana gelen herhangi bir kaza anında önce aşağıdaki işlemler yapılır. Ağır vakalarda derhal bir doktora başvurulur. Oluşabilecek kazalar;

A – Yara ve yanıklar

B – Yangınlar

C – Zehirlenmeler

## **A –YARA VE YANIKLAR**

**1 - Kesikler:** Bunları su ile yıkamak doğru değildir. Alkol ile pansuman edilir. Eğer yaraya giren yabancı maddeler var ise bunlar doktor tarafından çıkarılmalıdır. Yaralar sargı beziyle veya temiz bir mendil ile sarılmalıdır. Pamuk kullanılmamalıdır.

**2 - Göz Yanıkları:** Gözler iyice açık tutularak çeşme suyu ile yıkanır. Gerekirse seyreltik borik asit ile gözler banyo edilir.

**3 - Cilt Yanıkları:** Yanan yer hemen seyreltik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltiyle yıkanır, sonra zeytinyağı – kireç suyu emülsiyonu yanık üzerine sürülür ve gazlı bez ile sarılır.

**4 - Asit – Baz Yanıkları:** Bol soğuk su ile yıkanır. Yanık ileri geliyorsa % 1'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile, bazdan ileri geliyorsa % 1'lik asetik asit veya borik asit çözeltisi ile yıkanır. Sonra üzerine vazelin sürülür.

**5 - Brom Yanıkları:** Benzen ile yıkanır ve pansuman yapılır.

## **B - YANGINLAR**

**1 - Organik sıvılar veya alkali metallerden ileri gelen yangınlar** sudan ziyade kum ile söndürülür.

**2 - Kazaya uğrayanın elbiseleri** yanmış ise, kalın bir örtü ile sarılmalı veya hemen bir duş altına götürülmelidir.

3 - Yangın veya diğer hallerde, gazlı ve dumanlı salona ancak gaz maskesi ile girilmelidir.

## C – ZEHİRLENMELER

| ZEHİR                                                       | TEDAVİ                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NaOH, KOH, NH <sub>3</sub>                                  | % 1'lik asetik asit içirilir ve buz parçaları yutturulur.                                                                                                                                            |
| HCl, HNO <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> COOH                | MgO süspansiyonu içirilir. Buz parçaları yutturulur.                                                                                                                                                 |
| Br <sub>2</sub> , Cl <sub>2</sub> , HCl ve Nitröz Buharları | Seyreltik NH <sub>3</sub> , Alkol veya eter teneffüsü yapılır. Mümkünse su buharı veya NaHCO <sub>3</sub> 'lü buhar ile teneffüs ettirilir.                                                          |
| H <sub>2</sub> S, CO, HCN, KCN                              | 2 gr, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ve 0,5 gr NaNO <sub>2</sub> 50 ml suda çözülüp içirilmelidir. Suni teneffüs yaptırılmalı, gerektiğinde teneffüse saatlerce devam ettirilmelidir. |
| Arsenikli hidrojen, Fosforlu Hidrojen                       | Hastayı derhal açık havaya çıkarmalıdır. Hemen doktora başvurulmalıdır. Zehirlenme, etkisini birkaç saat sonra gösterir.                                                                             |
| Civa                                                        | Hasta derhal kusturulur ve tanin çözeltisi içirilir.                                                                                                                                                 |

## 2. BİYOKİMYA LABORATUVARINDA KULLANILAN MALZEMELER

Biyokimya öğrenci uygulamaları ve araştırmalarında iki türlü analiz uygulanır.

**a. Kalitatif Analizler:** Karışımdaki maddenin varlığının çeşitli madde ilaveleri veya diğer yöntemlerle gösterilmesi işlemleridir.

**b. Kantitatif Analizler:** Bir karışımdaki maddelerin miktarını saptamak için yapılan işlemlerdir. Çeşitli birimlerle ifade edilen sonuç (% mg, % gr, gr/l vb gibi) kesin olarak bildirilir. Bunlar üç grupta incelenir.

**i. Gravimetrik metodlar:** Laboratuvarda total lipid tayininde kullanılan metod olup amaç analizi yapılacak maddeyi ya tuz halinde çöktürmek ya da solventle ekstrakte etmektir. Bu yöntem nadiren başvurulur.

**ii. Volumetrik metodlar:** Biyolojik materyalde veya solüsyonlarda bulunan özel bir maddenin varlığının titrasyon ile ölçülmesi amaçlanmıştır. Kanda Ca miktarının Kramer Tisdall metodu ile ölçülmesi gibi örnekler verilebilir.

**iii. Kolorimetrik metodlar:** Biyokimyada en sık kullanılan metodlardır. Bazı kimyasal işlemler ile miktarı ölçülecek madde renkli hale çevrilir. Renklenen maddenin renk koyuluğu spektrofotometre, kolorimetre gibi aletlerde okunur. Miktarı formüller, standart grafikler yardımıyla bildirilir.

Yukarıda bildirilen analizlerin doğru ve usulüne uygun olarak yapılabilmesi için ölçü, tartı ve diğer malzemenin nitelik ve görevlerinin bilinmesi gereklidir.

## **2.1. Tüpler**

### **a. Deney Tüpleri**

Kimyasal reaksiyonların gerçekleştirildiği veya çözeltilerin konulduğu silindirik cam malzemelerdir. Hemen hemen her ebatta bulmak mümkündür. En fazla kullanılanlar 15x1,5 cm boyutlarında olanlardır ve bunlar yaklaşık 20 ml hacme sahiptirler. Alevde doğrudan doğruya ve dolaylı ısıtmalara karşı dayanıklıdır. Değişik amaçlarla üretilmiş çeşitli özel deney tüpleri bulmak mümkündür. Örneğin, kan şekeri tayininde kullanılan Folin-Wu tüpleri, oksidasyonu önlemek amacıyla dibi yuvarlak ve dar bir boyundan sonra yukarı doğru genişlemiş şekilde olan tüplerdir.



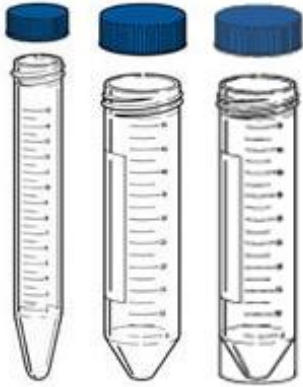
Deney Tüpleri



Folin-Wu Tüpü

### b. Santrifüj Tüpleri

Karışımlardaki farklı fazları birbirinden ayırmak için kullanılan, basınca dayanıklı, cam veya plastikten yapılmış, konik, silindirik, dereceli veya derecesiz, kapaklı veya kapaksız tüplerdir.



Santrifüj Tüpleri

### 2.2. Beherler

Geniş ağızlı silindirik olduğu için çeşitli hacimlerdeki sıvıların kolayca konulup boşaltılabildiği, ısıtma ve kimyasal solüsyon hazırlanması işlemlerinde kullanılan 10-2000 ml arasında değişen hacimlere sahip cam malzemedir.



Farklı hacimlerdeki beherler

### 2.3. Erlenmayerler

Özel camdan yapılmış, genellikle kimyasal solüsyon hazırlamakta kullanılan farklı hacimlerde çeşitleri bulunan, dar bir boyun ve alta doğru genişleyen konik bir yapıya sahip kaplardır. İçeriğini rahatça karıştırmaya imkan veren yapısı nedeniyle karışımların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılırlar. Özellikle titrasyon işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.



Erlenmayer

### 2.4. Balonlar

Dipleri düz veya yuvarlak olan dar boyunlu farklı hacimlerde çeşitleri bulunan cam kaplardır. Isıtma işlemlerinde yuvarlak altlı olanlar tercih edilirler. Çözelti hazırlamak için kullanılan volümetrik (hacmi belli) olanlara balon joje denir. Balon jojelerin boyun kısmında

hacimlerini belirten seviyede çizgisi bulunur. Balon jojeler hassasiyet gerektiren hacim ölçümlelerinde kullanılırlar. Herhangi bir ölçü çizgisi bulunmayan ve sadece genel amaçlı kullanılan balonlara ise adi balon denilmektedir.



Balon jojeler

## 2.5. Dereceli Ölçü Silindiri (Mezürler)

Sıvıların hacmini ölçmeye yarayan cam kaplardır. Genellikle hassasiyet gerektirmeyen sıvı hacimlerini ölçmede kullanılırlar. Değişik hacimlerde olabilirler.



Mezürler

## 2.6. Büretler

Alt uçlarında bir musluk bulunan dereceli cam borulardır. Uç kısmı kontrollü akışı sağlamak üzere inceltiştir. Çeşitli hacimde olanları vardır. Üstten bir huni vasıtasıyla doldurulurlar. Genellikle titrasyon işlemlerinde kullanılırlar.



Büret

### 2.7. Bunzenbeki ve Saç Ayağı

Havagazının uygun miktarda hava ile karışıp yanmasını sağlayan, ayarlanabilir nitelikteki malzemedir. Isıtma işlemi yapılırken ısıtılacak kabın üzerine konduğu metalden yapılmış malzemedir. Genellikle üzerine amyant plakalar konarak ısının şiddeti azaltılır.



Bunzenbeki



Saç ayağı ve amyant tel



### 2.8. Piset

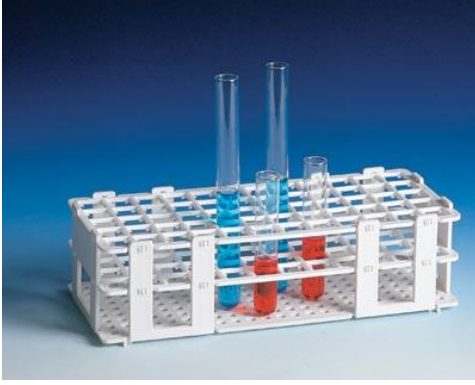
Genellikle ölçüsüz sıvı (özellikle su) aktarımını sağlamak üzere kullanılan plastik kaplardır. Kabın dibine kadar uzanan bir boru yardımıyla sıvı istenilen yere aktarılır. Eğmeden, dik olarak tutulup, bastırılmak suretiyle suyun akışı sağlanır.



Piset

### 2.9. Porttüp (Tüplük)

Deney tüpleri, büretler, balon ve benzeri gereçleri dik konumda veya belirli bir seviyede tutmak için kullanılan ve genellikle metalden yapılmış olan malzemelerdir.



Porttüp (Tüplük)

### 2.10. Petri Kabı (Kutusu) ve Desikatörler

Az miktarda katı maddeleri veya katı kültür materyallerini saklamak için kullanılan kapaklı, cam veya plastik kaplardır.

Desikatörler alt kısmına nem çekici maddeler (susuz kalsiyum klorür, susuz kalsiyum hidroksit, baryum oksit, susuz magnezyum perklorat ve silika jel gibi) konularak kimyasal maddeleri kurutmak veya nemden korumak için kullanılan cam kaplardır. Dış ortamla desikatörün içinin temasını kesmek için sıkı kapanan bir kapağı vardır.



Petri kapları



Desikatör

### 2.11. Huniler

Camdan yapılmış, eriyikleri süzmek, çökeleği ayırmak için kullanılan malzemelerdir. Birbirine karışmayan sıvıları ayırmak için ayırma hunileri kullanılır. Alt kısmında bulunan musluk yardımıyla sıvılar birbirinden ayrılır.



Huniler



Ayırma hunisi

### 2.12. Reaktif Şişeleri

Renkli veya renksiz olup farklı ölçülerde hacimlere sahip özel kapaklı şişelerdir.



Reaktif şişeleri

### 2.13. Cam Baget ve Manyetik Balık

Erimeyen maddeleri karıştırıp eritmeye yarayan içi dolu cam çubuklardır.

Beher içindeki çözeltinin homojen bir şekilde karışması için içerisine manyetik balık atılır. Manyetik balık, demir bilyeler şeklindedir. Manyetik karıştırıcı içerisinde motorla birlikte dönen mıknatıs kafa, bu manyetik balıkların karışım içerisinde dönmesini sağlar.

Ultra manyetik balıklar silindirik şekilli olup uçları yuvarlaktır. İç kısmındaki silindirik mıknatısın üzeri polimer ile kaplanarak üretilmiştir. Şekli nedeniyle kullanım alanı çok geniştir. Polimer kılıf  $+270^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar dayanıklıdır.



Cam baget



Manyetik karıştırıcı



Manyetik balık

### 2.14. Spatül

Kimyasal madde ölçümlerinde kullanılan, porselen, cam veya metalden yapılmış bir ucu kaşık, bir ucu da düz olan malzemedir. Her madde tartımında değiştirilmeli veya iyice temizlenmelidir.



## 2.15. Pipetler

Belirli hacimde sıvıları bir yerden alıp başka bir yere aktarmaya yarayan laboratuvar gereçleridir. Pipet içindeki hava, lastik bir apareyle (puar) veya ağızla boşaltılarak pipetin içerisine sıvının girişi sağlanır. Farklı amaçlara yönelik üretilmiş, değişik hacimli cam ve otomatik pipetler vardır.

**a. Taksimatlı Cam Pipetler:** Üzerleri taksimatlı ince cam borulardır. Bazılarının taksimatı pipet ucuna kadar yapılmıştır. Bu pipetlerin üflenerek tamamen boşaltılması gerekir (TD pipetleri). Bazılarında ise taksimat uçtan yaklaşık 1 cm kadar yukarıda sonlandırılmıştır. Boşaltma işlemi en alt işaret çizgisinde sonlandırılır (TC pipetleri).



Tamamen üflenmesi gereken pipetler



Boşaltma işleminin alt çizgide sonlanması gereken pipetler

**b. Otomatik Pipetler:** Mikro ve makro pipetler veya ayarlanabilir ve sabit hacimli pipetler olmak üzere gruplandırılabilirler. Tek kullanımlık uçlarla sıvının aktarılması, pipetten gelebilecek kirlenmelerin önüne geçilmesi yönüyle oldukça önemli bir avantaja sahiptir. Aktarılacak sıvı, uca bir piston yardımıyla çekilip boşaltılabilir. Değişik hacimli olanları vardır.



Otomatik Pipetler ve Uçları

### c. Pastör Pipetler (Damlalık)

Birtakım çözeltilerin pH ayarı vb. yapımında ya da tepkime sırasında ortama damla damla çözelti ilave etmek için kullanılan, bir ucu geniş hava dolu, öbür ucu sivri plastikten yapılmış araçlardır. Damlalıktan yuvarlak, çok küçük miktarda sıvı akar.



Pastör pipeti (damlalık)

## **Cam Pipetlerin Kullanılışı**

Pipetleme, deneysel çalışmalar sırasında küçük hacimli sıvı aktarımının vazgeçilmez ve en hassas olan bir parçasıdır. İyi bir pipetleme ve buna bağlı olarak iyi bir deneysel sonuç elde edebilmek için aşağıdaki pipetleme kurallarına uyulması gerekmektedir;

- Pipet başparmak ile orta parmak arasında tutulur.
- Pipetin ucu ölçülecek sıvıya yeteri kadar daldırılır. Hafif bir emme ile sıvı pipetin ağız ucu tarafındaki en üst işaretin biraz üstüne kadar çekilir. Sonra pipetin ağız ucu işaret parmağı ile kapatılır.
- Pipetin dış yüzeyinde bulunan sıvı bir süzgeç kağıdı ile silinerek alınır.
- Pipetin ağız ucunu kapatan işaret parmağına hafif gevşeme hareketleri vererek, parmak tamamen kaldırılmadan sıvı, seviye çizgisine düşürülür.
- Pipet dikey olarak tutularak boşaltılacak kabın kenarına temas ettirilir. Pipet ucundan işaret parmağı kaldırılarak üflemeden, sıvının boşalması beklenir. Eğer pipet tamamen boşaltılmayacaksa yine işaret parmağının kontrollü hareketi ile istenen miktarda sıvının boşalması sağlanır.

## **TEMİZLİK VE TEMİZLİK ÇÖZELTİLERİ**

### **Plastik Malzemenin Temizlenmesi**

Polyethylene kaplar ilk defa kullanıldıklarında 8 M ürede yıkanmalıdır. Distile suyla yıkandıktan sonra plastik kaplar 1 N KOH ile yıkanır, distile suyla tekrar yıkandıktan sonra,  $10^{-3}$  M EDTA ile metal iyon kontaminasyonunu çıkarmak için yıkanır. Son olarak distile (deiyonize su) suyla yıkanır. Bu ilk uygulamadan sonra her kullanıştan sonra %5 deterjanla ve sonradan distile suyla yıkama tavsiye edilir. İlk uygulama (Ure, EDTA, KOH) istenildiği zaman tekrarlanabilir.

## **Cam Malzemenin Temizlenmesi**

Birçok amaç için cam malzemenin % 0,5 deterjanla yıkanması ardından distile sudan geçirilmesi muhtemelen yeterlidir. Ancak hassas analizler yapılacaksa, cam malzemeler asit dikromata batırılır ve daha sonra distile suyla yıkanır. Böylece cam malzeme organik kontaminantlardan arındırılır. Konsantre sitrik asitle ve bunu takiben distile suyla yapılan ikinci bir yıkama metal iyonlarının çoğunu çıkarır.

Dikromik asit solüsyonunun hazırlanması:

250 ml'lik bir beherde 5 gr sodyum dikromat 5 ml distile suda çözülür. Sürekli karıştırarak yavaşça 100 ml konsantre sülfirik asit eklenir. Solüsyonun sıcaklığı 80 °C'ye yükselir. Solüsyon 40 °C'ye kadar soğuması için bırakılır. Cam kaplı kuru bir şişeye transfer edilir.

Dikromatın kullanımında dikkatli olmak gerekir. Chromium karsinojeniktir.

## **Quartz ve Cam Küvetlerin Temizliği**

Küvetler veya optik olarak cilalanmış cam malzemeler asla etanolik KOH veya diğer kuvvetli bazlarla yıkanmamalıdır. Çünkü bu çizilmelere sebep olur. Bütün küvetler % 0,5 deterjan solüsyonuyla ucu pamuklu çubuklar ile yıkanmalı daha sonra distile suyla yıkanmalıdır.

## **Pipetlerin Temizliği**

% 0,5 deterjan solüsyonu içine batırılır ve bol çeşme suyuyla yıkandıktan sonra distile sudan geçirilir.

## **Malzemenin Kurutulması**

Cam malzeme en iyi şekilde fırında kurutulur. Birçok plastik malzeme de aynı zamanda fırında kurutulabilir. Selüloz nitrat santrifüj tüpleri asla fırında kurutulmamalıdır. Çünkü selüloz nitrat patlayıcıdır.

Cam malzemenin asetonla kurutulmak için yıkanması sonucunda yüzeyde nonvolatil organik kontaminantlar bırakır. Bu nedenle bundan kaçınılmalıdır.

## 2. ÇÖZELTİ HAZIRLAMA

İki veya daha fazla maddenin meydana getirdiği homojen karışımlara **çözelti** denir. Çözeltiyi oluşturan bileşenlerden miktarca fazla olanı **çözücü**, az olanı **çözünendir**. Özel olarak belirtilmemişse çözücü sudur. Güvenilir sonuçlar alabilmek için çözeltilerin dikkatli ve hassas olarak hazırlanması gerekmektedir. Biyokimya ve klinik biyokimya laboratuvarlarında türlü çözeltiler kullanılır. Çözücü ve çözünenin fiziksel özelliğine göre biyokimyasal çalışmalarda es sık kullanılan çözelti çeşitleri şunlardır;

- Sıvı içinde sıvı (Örneğin sulu alkol çözeltisi)
- Sıvı içinde katı (Örneğin sodyum klorür çözeltisi)
- Sıvı içinde gaz (Örneğin sulu amonyak)

Çözeltinin birim hacminde bulunan veya belli bir miktar çözücünde çözünen madde miktarına, söz konusu çözeltinin **konsantrasyonu** (C) (derişim) denir. Konsantrasyon için değişik birimler kullanılır. Biyokimya laboratuvarında kullanılan başlıca konsantrasyon birimleri **molarite** (M), **normalite** (N), **molalite** (m) ve **yüzde konsantrasyondur** (%).

### 2.1. Molar Çözeltiler

**Molarite** (M): Bir litre çözeltide çözünmüş maddenin mol sayısıdır.

$$M = \frac{\text{Çözünen maddenin mol sayısı (n)}}{\text{Çözelti hacmi (V) (L)}}$$

Çözücü ve çözünenin durumuna göre değişik tipte molar çözeltiler hazırlanabilir.

**a. Sıvı içinde katı madde çözünmesiyle hazırlanan molar çözeltiler**

**Örnek:** 500 mL 2 M NaOH çözeltisini nasıl hazırlanır? ( $M_A$ :40g/mol)

$$M = \frac{n}{V} \implies n = M \times V \implies n = 2M \times 0,5 L \implies n = 1\text{mol}$$

$$n = \frac{m \text{ (kütle)}}{M_A \text{ (molekül ağırlığı)}} \implies m = n \times M_A \implies m = 1\text{mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$m = 40\text{g}$$

40 g NaOH tartılıp, bir miktar suda çözündükten sonra hacmi mezürde distile su ile 500 mL' ye tamamlanır.

**NOT:** Eğer kimyasal madde kristal suyu (molekül suyu) içeriyorsa molekül ağırlığına kristal suyunun ağırlığını da ilave etmek gerekir.

Örneğin 100 mL 0,1 M potasyum karbonat ( $K_2CO_3$ ) çözeltisi hazırlanırken, elimizdeki madde  $3/2\text{mol } H_2O$  bulunduruyor. Yani  $K_2CO_3 \cdot 3/2 H_2O$  hesaplarken  $K_2CO_3$ 'ın  $M_A$ 'sına (138g/mol) suyun kütlesini ( $1,5 \times 18 = 27$ ) ilave ederek  $138 + 27 = 165\text{g/mol}$  olarak hesaplamak gerekir.

**b. Sıvı içinde sıvı madde çözünmesiyle hazırlanan molar çözeltiler**

Bir sıvının bir başka sıvı içerisinde çözünmesiyle hazırlanacak olan çözeltilerde çözünecek sıvı maddenin yoğunluk ve ağırlıkça yüzdesinin bilinmesi gerekir.

$$V(\text{mL}) = \frac{\text{Molekül Ağırlığı (MA)} \times \text{İstenen Konsantrasyon (M)} \times \text{İstenen Hacim (L)}}{\text{Yoğunluk (d)} \times \text{Konsantrasyon (\%)}} \times 100$$

**Örnek:** Yoğunluğu 1,18 g/ml, ağırlıkça %37' lik ve molekül ağırlığı 36,5 g/mol olan HCl kullanılarak 1 M, 500 mL çözelti nasıl hazırlanır?

$$V(\text{mL}) = \frac{36,5 \times 1 \times 0,5}{1,18 \times 37} \times 100$$

$$V(\text{mL}) = 41,8 \text{ mL}$$

Orijinal şişedeki asitten 41,8 mL alınarak hacmi distile su ile 500 mL' ye tamamlanır.

**NOT:** Asit çözeltilerini hazırlarken derişik asit üzerine hiçbir zaman su konulmaz.

Asit, içerisinde bir miktar distile su bulunan çözelti kabına yavaş yavaş ilave edilir. Daha sonra istenen hacme tamamlanır.

## 2.2. Normal Çözeltiler

Çözeltinin 1 mL'sinde bulunan çözünen maddenin milieşdeğer gram sayısıdır. Aynı ifade litresindeki eşdeğer gram sayısı olarak da belirtilebilir.

$$N = (m / \text{eşdeğer gram sayısı}) / V$$

Eşdeğer gram sayısı: Molekül ağırlığı / Tesir değeri

Formül düzenlenirse:

$$N = \frac{\text{Çözünen maddenin kütlesi (m)}}{\text{Çözünen maddenin molekül ağırlığı (MA)} \times \text{Çözeltinin hacmi (L)}} \times \text{Tesir Değeri (TD)}$$

**Tesir Değeri (TD):** Asitlerin ortama verdiği  $H^+$  iyonu sayısı, bazların ortama verdiği  $OH^-$  iyonu sayısı, tuzların ise ortama verdiği veya aldığı elektron sayısına tesir değeri denir.

Örneğin  $H_2SO_4$  için bu değer 2'dir. Çünkü sülfürik asit 2 tane  $H^+$  iyonunu sulu çözeltilisine verebilir.  $NaOH$ ,  $HNO_3$ ,  $HCl$  için bu değer 1'dir.

Molarite ve normalite arasında  $N = M \times TD$  bağlantısı vardır.

**Örnek:** 200 mL 0,5 N  $Ca(OH)_2$  çözeltisi nasıl hazırlanır? (MA:74 g/mol)

$$0,5 = \frac{m}{74 \times 0,2} \times 2 \implies m = 3,7 \text{ g}$$

3,7g  $Ca(OH)_2$  alınır bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacmi mezürde distile su ile 200 mL' ye tamamlanır.

### 2.3. Yüzde Çözeltiler

Yüzde konsantrasyon (%), 100 mL veya 100 gram çözeltide bulunan madde miktarını gösterir. Üç şekilde ifade edilir:

**a. Ağırlık/Ağırlık esasına göre (w/w):** 100 g çözeltide çözünen maddenin gram cinsinden miktarını belirtir.

**b. Hacim/Hacim esasına göre (v/v):** 100 mL çözeltide çözünen maddenin mL cinsinden miktarını belirtir.

**c. Ağırlık/Hacim esasına göre (w/v):** 100 mL çözeltide çözünen maddenin gram cinsinden miktarını belirtir.

Yüzde çözeltilerin hangi esasa göre hazırlanacağı belirtilmelidir. Şayet belirtilmemiş ise katı maddelerden ağırlık/hacim (w/v); sıvı maddelerden hacim/hacim (v/v) esasına göre hazırlanacağı ve çözücü belirtilmemişse çözücünün su olduğu anlaşılır.

**Örnek 1:** % 10' luk (w/v) 100 mL NaCl çözeltisi nasıl hazırlanır?

10g NaCl bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL' ye tamamlanır.

**Örnek 2:** %5' lik (w/v) 100 mL CuSO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlamak için elimizde mevcut CuSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O' dan ne kadar almak gerekir?(MA<sub>CuSO<sub>4</sub></sub>:159,5)

$$1 \text{ mol CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 159,5 + (2 \times 18) = 195,5 \text{ g/mol}$$

Çözelti %5' lik olacağına göre 5g saf CuSO<sub>4</sub>' ü 100 mL' ye tamamlamamız gerekir.

Mevcut CuSO<sub>4</sub>, 2 mol kristal suyu bulundurmaktadır. Bunu dikkate alarak;

|                                        |                 |
|----------------------------------------|-----------------|
| MA 159,5g olan CuSO <sub>4</sub> ' den | 5 g gerekli ise |
|----------------------------------------|-----------------|

|                                                         |             |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| MA 195,5 olan CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O' dan | x g gerekir |
|---------------------------------------------------------|-------------|

---

$$x = 6,13\text{g}$$

6,13g CuSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL' ye tamamlanır.

**Örnek 3:** %15' lik (v/v) 100 mL alkol çözeltisi nasıl hazırlanır?

Orijinal şişesinden 15 mL alkol alınır, distile su ilave edilerek hacmi 100mL' ye tamamlanır.

## 2.4. Osmolar Çözeltiler

Litresinde 1 osmol-gram madde ulunduran çözeltilere osmolar çözeltiler denir.

**Osmolarite:** Bir litre çözeltide çözünen maddenin osmol-gram miktarıdır.

$$1 \text{ osmol} - \text{gram} = \frac{\text{Molekül ağırlığı}}{\text{Osmotik bakımdan aktif partikül sayısı}}$$

Örneğin; NaCl sulu çözeltide tamamen  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarına ayrışır. Her NaCl molekülü osmotik bakımdan aktif iki partikül olduğundan,

$$1 \text{ osmol-gram NaCl} = 58,5/2 = 29,25 \text{ gramdır.}$$

Başka bir anlatımla 1 osmolar NaCl çözeltisinin litresinde 29,25 gr NaCl bulunmaktadır.

Diğer taraftan glukoz moleküler halde çözüldüğünden 1 molekül glukoz osmotik bakımdan aktif 1 partikül meydana getirir. Dolayısıyla 1 osmol-gram glukoz  $180/1 = 180$  gramdır.

Aynı osmotik basınca sahip olan yani birbirleriyle aynı sayıda osmotik bakımdan aktif partikül bulunduran çözeltilere **izotonik çözelti** denir.

Tıbbi olarak izotonik çözelti kavramı, osmolaritesi kanın osmolaritesiyle aynı olan çözeltiler için kullanılır. Kanın osmolaritesi yaklaşık 0,3 osmolardır.

**Örnek 1:** 1L izotonik NaCl (serum fizyolojik) çözeltisi hazırlamak için ( $M_A=58,5$ ; 1 osmol-gram NaCl  $58,5/2=29,25$ ) 0,3 osmol-gram ( $\text{NaCl} = 29,25 \times 0,3 \cong 9 \text{ g}$  NaCl alınıp 1L' ye tamamlanır.

**Örnek 2:** 1L izotonik glukoz çözeltisi nasıl hazırlanır? ( $M_A=180\text{g/mol}$ )

$$1 \text{ osmol-gram glukoz} = 180/1 = 180\text{g}$$

$$0,3 \text{ osmol-gram glukoz} = 180 \times 0,3 = 54 \text{ g}$$

54 g glukoz alınıp, suda çözüldükten sonra 1 L' ye tamamlanır.

Osmolaritesi 0,3 osmolardan az olan çözeltiler **hipotonik**, fazla olan çözeltiler **hipertonik** çözeltilerdir. Kan hücreleri (eritrosit, lökosit) hipotonik çözeltilerde içlerine su alarak şişer ve parçalanırlar. Hipertonik çözeltilerde bu hücreler su kaybederek büzülürler. İzotonik çözeltilerde ise hücrelerin yapıları bozulmadan kalır.

### **Çözeltilerde Seyreltme işlemleri**

Çözücü ilavesiyle çözeltinin konsantrasyonunun azaltılması işlemine **seyreltme (dilüsyon)** denir. Bu işleme yüksek konsantrasyonlu çözeltilerden düşük konsantrasyonlu çözelti hazırlamak için başvurulur. Seyreltme ile başlangıçtaki hacmi  $V_1$  olan çözelti hacmi  $V_2$ 'ye çıkarken, konsantrasyonu  $C_1$ 'den  $C_2$ 'ye düşer. Sonuçta çözünen madde miktarı (mol, gram, eşdeğer gram olarak) değişmez. Ancak konsantrasyon azalır. Bu sebeple seyreltme işlemlerinde;

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

eşitliğinden faydalanılır.

$C_1$ = ilk konsantrasyon

$C_2$ = seyreltmeden sonraki konsantrasyon

$V_1$ = ilk hacim

$V_2$ = seyreltmeden sonraki hacim

Eşitliğin her iki tarafında aynı olmak şartıyla konsantrasyonlar yerine molarite, normalite, yüzde veya diğer birimler alınabildiği gibi hacim yerine de mililitre veya litre alınabilir. Bir seyreltme işleminin nasıl yapıldığı Şekil 26' da gösterilmiştir.

Bir çözeltiyi ½ oranında seyreltmek, hacmini iki katına çıkarmak demektir. Bu da 1 hacim çözeltiye 1 hacim su ilavesi ile olur. 1:10 oranında seyreltmek 1 hacim çözeltiye 9 hacim su ilavesiyle toplam hacmi 10 katına çıkarmaktır.

$$\frac{1}{2} = \frac{1 \text{ örnek}}{1 \text{ örnek} + 1 \text{ çözücü}}$$

$$\frac{1}{10} = \frac{1 \text{ örnek}}{1 \text{ örnek} + 9 \text{ çözücü}}$$

**Örnek 1:** 50 ml, 0,05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlamak için 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinden kaç ml alınmalıdır?

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,1 \times V_1 = 0,05 \times 50$$

$$V_1 = 0,05 \times 50 / 0,1$$

$$V_1 = 25 \text{ ml H}_2\text{SO}_4 \text{ alınıp distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.}$$

**Örnek 2:** 150 ml 0,2 N NaCl çözeltisine 50 ml 0,1 N NaCl çözeltisi ilave edilirse karışımın normalitesi ne olur?

$$C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2 = C_n \times V_n$$

$$150 \times 0,2 + 50 \times 0,1 = C_n \times 200$$

$$30 + 5 = C_n \times 200$$

$$C_n = \frac{35}{200}$$

$$C_n = 0,175 \text{ N olur.}$$

**Örnek 3:** 100 ml 0,1 N NaCl çözeltisinin 0,3 N NaCl çözeltisinde kaç ml ilave edilmelidir ki 0,2 N NaCl' lik bir çözelti olsun?

$$C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2 = C_n \times V_n$$

$$0,1 \times 100 + 0,3 \times V_2 = 0,2 \times (100 + V_2)$$

$$V_2 = 50 \text{ ml}$$

## Yüksek konsantrasyonlu bir solüsyondan düşük konsantrasyonlu bir solüsyon

### hazırlanması

Örneğin %28' lik bir solüsyondan %7' lik bir solüsyon hazırlamak istenirse şu formüle göre hesaplanır.

$$\frac{\text{İstenilen konsantrasyon}}{\text{mevcut konsantrasyon}} \times 100 = \text{ml (sıvının hacmi)}$$

Bu formülde bulunan ml sayısı kadar yüksek konsantrasyonlu solüsyondan alınıp su ile 100 ml' ye tamamlandığı zaman istenilen konsantrasyonda bir solüsyon elde edilir.

$$\text{Misal bu formüle göre; } \frac{7}{28} \times 100 = 25$$

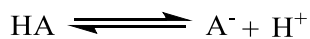
%28' lik solüsyondan 25 ml alınır distile su ile 100 ml' ye tamamlanırsa %7' lik solüsyon elde edilmiş olur.

## **2.5. Tampon Çözeltiler**

Az miktarda asit veya baz ilavesine karşılık  $H^+$  konsantrasyonu değişimine direnç gösteren çözeltilere **tampon çözelti**, bu dirence **tampon etkisi**, tampon etkisinin büyüklüğüne ise **tampon kapasitesi** denir.

Tampon çözeltiler, bir zayıf asit ve onun tuzu (eşlenik bazı) veya bir zayıf baz ve onun tuzundan (eşlenik asitinden) meydana gelmiş olup genellikle bazların adıyla isimlendirilirler (asetat tamponu, fosfat tamponu gibi).

HA zayıf bir asit olmak üzere bir tampon çözeltinin pH' ını veren eşitliğin çıkarılışı aşağıdaki gibidir.



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Her iki tarafın da negatif logaritması alınır

$$-\log[H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[Tuz]}{[Asit]}$$

Bu eşitliğe **Henderson-Hasselbach** eşitliği denir.

Bir tampon sistemden iyi bir tamponlama elde edebilmek için tampon pH'ının **pH=pKa±1** civarında olması gerekir. [Tuz]=[Asit] olduğunda pH=pKa'dır ve pH değişimi minimumdur. Yani tampon kapasitesi maksimumdur.

### **Vücut Tamponları**

Metabolik olaylar sırasında çok fazla miktarda asidik karakterli madde üretilir. Bu maddeler, hücreiçi-hücre dışı sıvılar ve hücre dışı sıvısının önemli bir üyesi olan kan pH'ını değiştirdiği için olumsuz etki gösterecektir. Bu amaçla bazı organ ve tampon sistemleri, bu değişimin önüne geçmek için birlikte hareket edeceklerdir. Özellikle akciğer ve böbrekler eşliğinde çalışan vücut tampon sistemleri bu mekanizmanın vazgeçilmez elemanlarıdır.

Başlıca vücut tamponları:

**Bikarbonat tamponu** ( $HCO_3^-/CO_2$ ); Plazma ve eritrositlerde bulunur. Organizmada kan pH'ının %60'ını tamponlayan sistemdir.

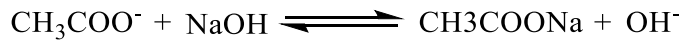
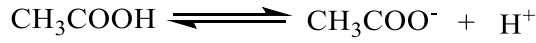
**Fosfat tamponu** ( $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ ); Plazma ve eritrositlerde bulunur. Esas görevi böbrekten asitlerin uzaklaştırılmasıdır.

**Protein tamponu** (protein<sup>-</sup>/protein); Serumda asidik veya bazik yan zincirli amino asit taşıyan bir çok protein tampon olarak davranmaktadır.

**Hemoglobin tamponu** ( $\text{Hb}^-/\text{HHb}$ ); Eritrositlerde görev yapar. Hemoglobin, total kan proteinlerinin tamponlama kapasitesinin %60'ından sorumludur. Bu sistem metabolik olaylar sırasında ortaya çıkan  $\text{CO}_2$ 'i tamponlar.

**Örnek 1:** 3L, pH=5 olan 0,2 M asetat tamponu nasıl hazırlanır? ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  için MA:82,03g/mol,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  için MA:60g/mol  $\text{CH}_3\text{COOH}$  için d=1,05g/ml pKa:4,77)

Asetat tamponunun asit bileşeni  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , tuz bileşeni  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 'dır.



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Tuz}]}{[\text{Asit}]}$$

$$5 = 4,77 + \log \frac{[\text{Tuz}]}{[\text{Asit}]}$$

$$0,23 = \log \frac{[\text{Tuz}]}{[\text{Asit}]}$$

0,2M asetat; hem  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 'tan hem de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ' dan gelecek toplam  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  miktarıdır. Dolayısı ile  $[\text{Tuz}]=x$  dersek  $[\text{Asit}]=0,2-x$  olur. Bunları formülde yerine koyarsak;

$$0,23 = \log \frac{[x]}{[0,2 - x]}$$

$$\text{antilog}(0,23) = \frac{[x]}{[0,2 - x]}$$

$$10^{(0,23)} = \frac{[x]}{[0,2 - x]}$$

$$1,70 = \frac{[x]}{[0,2 - x]}$$

$$x=0,126\text{mol}$$

$[\text{Tuz}]=x$  dediğimiz için  $[\text{CH}_3\text{COONa}]=0,126\text{mol}$  olur. (Litredeki mol sayısı)

$[\text{Asit}]=0,2-x$  dediğimiz için  $[\text{CH}_3\text{COOH}]=0,2-0,126$

$[\text{CH}_3\text{COOH}]=0,074\text{mol}$  olur. (Litredeki mol sayısı)

Köşeli parantezler molariteyi ifade ettiği için istenen hacme göre g veya mL olarak tuz ve asit miktarının bulunması gerekir. Buna göre 3L tamponda;

CH<sub>3</sub>COONa için: 0,126\*3=0,378mol

$$n = \frac{m}{M_A} \implies 0,378 = \frac{m}{82,03} \implies m=31 \text{ g gerekir.}$$

CH<sub>3</sub>COOH için: 0,074\*3=0,222 mol

$$n = \frac{m}{M_A} \implies 0,222 = \frac{m}{60} \implies m=13,3 \text{ g gerekir.}$$

Fakat asitin yoğunluğu 1'den farklıdır ve mL cinsinden hesaplamamız gerekir. Dolayısı ile;

1 mL'de 1,05g var ise

y mL' de 13,3g vardır

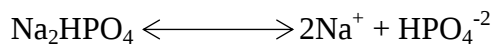
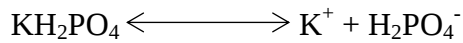
---

$$y=12,66\text{mL gerekir.}$$

31g CH<sub>3</sub>COONa ve 12,66 mL CH<sub>3</sub>COOH alınıp bir miktar distile suda çözündükten sonra son hacim 3L' ye tamamlanır.

**Örnek 2:** pH'ı 6,5 ve 50mM, 1L fosfat tamponunu nasıl hazırlanır? (pKa<sub>2</sub>=6,7;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> için M<sub>A</sub>:136,09 ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O için M<sub>A</sub>:358,14)



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Tuz}]}{[\text{Asit}]}$$

$$6,5 = 6,7 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$-0,2 = \log \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$\text{antilog}(-0,2) = \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$10^{(-0,2)} = \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

$$0,6 = \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^{-}]}$$

$\text{HPO}_4^{-2} = x$  dersek,  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-} = 0,05 - x$  olur. Bunları formülde yerine koyarsak;

$$0,6 = \frac{[x]}{[0,05 - x]}$$

$$x = 0,018 \text{ mol}$$

$[\text{HPO}_4^{-2}] = x$  dediğimiz için  $[\text{HPO}_4^{-2}] = 0,018 \text{ mol}$  olur.

$[\text{H}_2\text{PO}_4^{-}] = 0,05 - x$  dediğimiz için  $[\text{H}_2\text{PO}_4^{-}] = 0,05 - 0,018 = 0,032 \text{ mol}$  olur.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  için:

$$n = \frac{m}{MA} \implies 0,032 = \frac{m}{136,09} \implies m = 4,35 \text{ g gerekir.}$$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  için:

$$n = \frac{m}{MA} \implies 0,018 = \frac{m}{358,14} \implies m = 6,44 \text{ g gerekir.}$$

4,35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 6,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  tartılıp bir miktar distile suda çözündükten sonra son hacmi 1L' ye tamamlanır.

### 3. KARBOHİDRATLARI TANIMA DENEYLERİ

#### 3.1. ASİTLERİN ETKİSİ

Karbohidratlar yoğun mineral asitlerle ısıtılınca su kaybederler. Yeni oluşan bileşiğe furfural adı verilir. Bunlar fenollerle birleşerek renkli bileşikler oluşturular.

##### 3.1.1. Molisch Deneyi

###### Pensip

Yoğun sülfürik asit glikozidik bağları hidrolize ederek monosakkarit birimleri oluşturur. Bunlar da yapılarından  $\text{H}_2\text{O}$  moleküllerini kaybederek furfural türevlerini verirler. Oluşan bu ürün sülfolanmış  $\alpha$ -naftol ile birleşerek menekşe renkli kompleksleri şekillendirir.

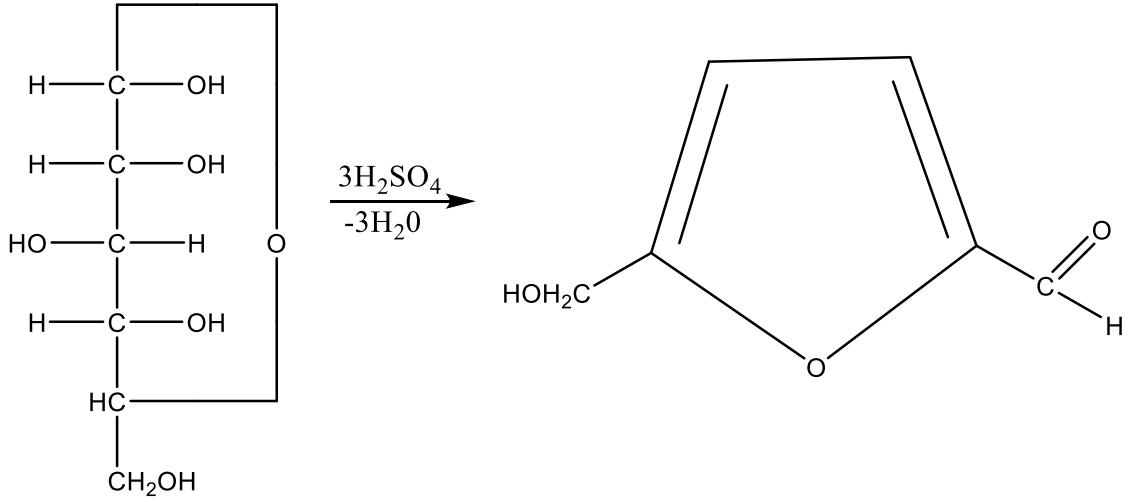
Bu reaksiyon yoğun sülfürik asitle furfural veren karbohidrat ve diğer organik bileşiklerin varlığını tayinde genel bir tanıma reaksiyonudur.

### Ayırıcılar

1. Yoğun sülfürik asit ( $H_2SO_4$ )
2.  $\alpha$ -naftol' ün %5' lik etanolde taze hazırlanmış solüsyonu (molisch ayıracı)
3. %5' lik Glukoz çözeltisi

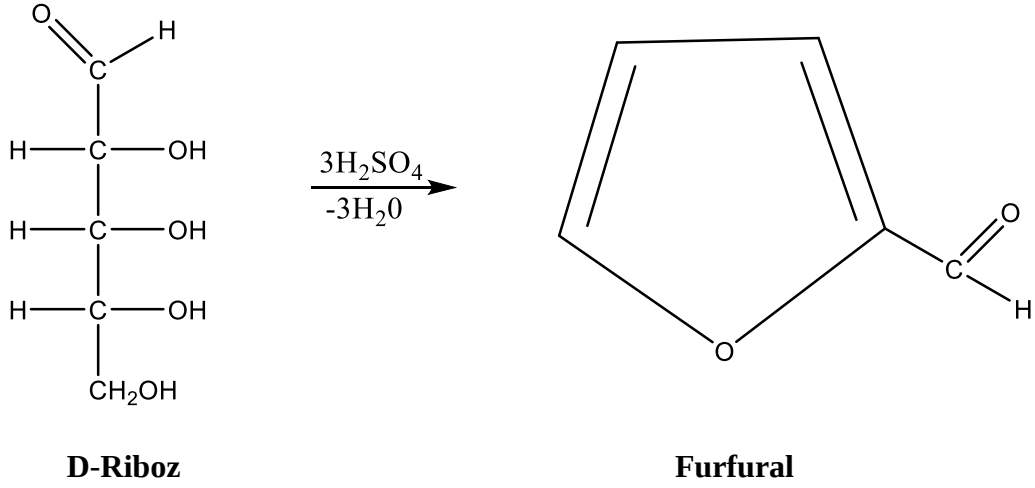
### Deneyin yapılışı

2 ml %5' lik glukoz çözeltisi üzerine birkaç damla Molisch ayıracı eklenir ve karıştırılır. Tüp eğik tutularak 1-2 ml yoğun  $H_2SO_4$  dikkatle tabaka yaptırılır. Tüpteki sıvı ile temas yüzeyinde menekşe veya kırmızı renk meydana gelmesi ortamda karbohidrat varlığının göstergesidir.



**D-Glukoz**

**5-hidroksimetilfurfural**



### 3.1.2 Seliwanoff Deneyi

#### Prensip

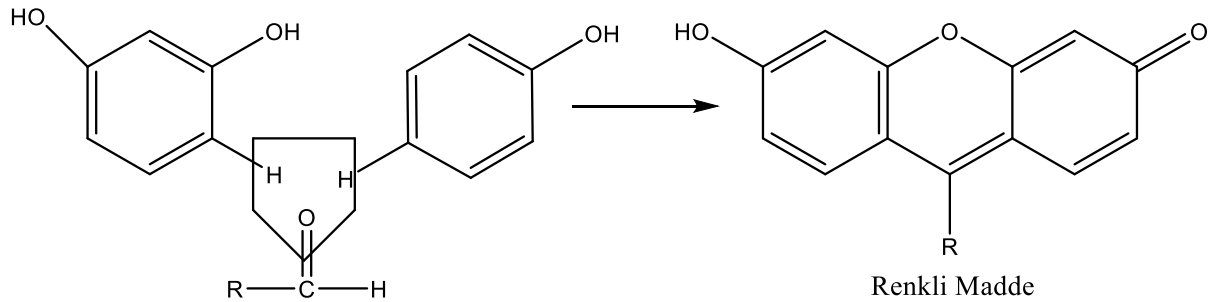
Ketozlar aldozlardan daha hızlı dehidre olarak furfural ve türevlerini oluşturur. Bunlar resorsinol ile kondanse olarak kırmızı renkli kompleks oluşturur. Bu renk keto şeker ve keto şeker içeren disakkarit /sakkaroz gibi) için özel bir deneydir.

#### Ayırıcı

3N HCl içinde %0,05 resorsinol veya 0,5g resorsinol 330ml yoğun HCl' de eritilir ve distile su ile litreye tamamlanır.

#### Deneyin Yapılışı

%1'lik Fruktoz solüsyonundan 1 ml alınır ve üzerine 3 ml Seliwanoff ayırıcı eklenir. Kaynayan su içerisinde 1-2 dakika bekletilir ısıtılır. Koyu kırmızı renk oluşumu ortamda keto şeker varlığını gösterir.



## 3.2. ALKALİLERİN ETKİSİ

Suladırılmış alkaliler kullanarak monosakkaritlerde birinci ve ikinci C atomlarında molekül içi bir düzenleme ile enol ara maddeler meydana gelir. Kuvvetli alkalilerle temasta ise monosakkaritlerde C-C bağları kopar, yeni düzenlemeler oluşur ve karamelizasyon olayı gerçekleşir.

### 3.2.1. Moore Deneyi

#### Prensip

Sulu alkaliler monosakkaritlere etki ederek enediol yapıyı oluşturur. Glukozun yeniden düzenlenmesinden glukoz, fruktoz ve mannoz içeren bir karışım meydana gelir. OH<sup>-</sup> iyonları polisakkaritleri kuran monosakkaritlerin yapısını bozar. Kuvvetli alkaliler ise şekerin C atomları arasında birçok çift bağ oluşturarak veya parçalayarak sarı ve kahverengi pigment oluşumuna neden olur ve şeker karamelize hal alır. Deney sırasında oluşan indirgeyici parçalanma ürünlerine “redüktan” denir.

#### Ayırıcılar

%5 Glukoz Çözeltisi

2N NaOH

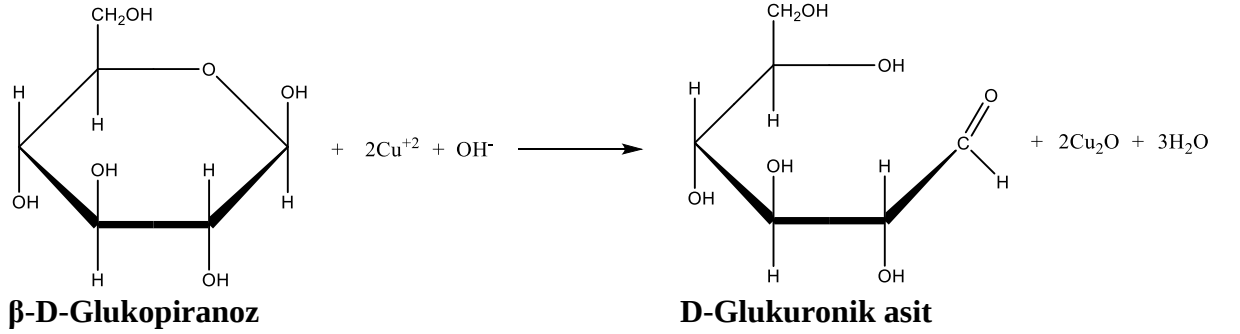
#### Deneyin Yapılışı

2 ml glukoz çözeltisi üzerine 1 ml 2 N NaOH çözeltisi eklenir, karıştırılır ve ısıtılır. Karışımın rengi önce sarı, daha sonra kahverengi olur ve karamel kokusu duyulur.

## 3.3. İNDİRGENME REAKSİYONLARI

İndirgenme reaksiyonu karbonil grubunun bir fonksiyonudur. Beş ve altı karbonlu monosakkaritler sulu ortamda; aldozlar hemiasetal, ketozlar hemiketal şeklinde bulunurlar. Serbest hemiasetal veya hemiketal hidroksil grubu alkali ortamda, ısıya da etkiyle önce karbonil grubuna dönüşür, karbonil grubu da Cu<sup>+2</sup>, Bi<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>+2</sup> veya Fe(CN)<sub>6</sub><sup>-3</sup> gibi

değişken değerlikli metalleri indirirlerken, kendileri de oksitlenerek şeker asitleri adı verilen monokaroksilik asitlere dönüşürler.



### 3.3.1. Fehling Deneyi

#### Ayıracılar

**Fehling I:** 35 g kristalize Bakır (II) sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) distile suda çözündürülerek 1000 ml'ye tamamlanır.

**Fehling II:** 173 g sodyum potasyum tartarat ve 100 g potasyum hidroksit yaklaşık 500 ml distile suda beraberce çözündürülür ve 1000 ml'ye tamamlanır.

**Çalışma reaktifi:** Fehling I ve II' den eşit hacimlerde alınarak hazırlanır. Reaktifin rengi mavidir.

#### Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne çalışma reaktifinden 1-2 ml alınır, üzerine birkaç damla % 5'lik glukoz çözeltisinden ilave edilip karıştırılır ve ısıtılır. Karışımın renginin maviden yeşile, daha sonra sarıya ve sonunda tuğla kırmızısına dönmesi glukozun +2 değerlikli mavi bakırı indirgeyerek +1 değerlikli sarı  $\text{Cu}(\text{OH})$  ve kırmızı  $\text{Cu}_2\text{O}$ ' e dönüştürmesindendir. Ortamın rengi glukozun ve dolayısıyla indirgenmiş bakırın oranıyla değişir ve tartarat kuprik hidroksitin presipitasyonunu önleyerek solubl formda kalmasını sağlar. Eğer ortamdaki +2 değerlikli bakır iyonlarının tamamını indirgeyecek kadar glukoz varsa ortamın rengi kırmızı olur.

### 3.3.2. Benedikt Deneyi

Bu deneyde benedikt ayıracı adı verilen çözelti kullanılır.

#### Benedikt reaktifinin hazırlanışı

17,3 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  100 ml distile suda çözündürülür. Bir başka behere 173 g sodyum sitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 100 g Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) yaklaşık 700 ml distile suda ısıtılarak çözündürülür. Bu karışım soğutulduktan sonra bakır (II) sülfat çözeltisi ile karıştırılır ve distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır. Sodyum sitrat bakırı solubl formda tutarak presipitasyonunu önler, sodyum karbonat ise ortamın alkalileştirilmesinde etkilidir.

#### Deneyin Prensibi

Glukoz sıcak alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$  (cupri) iyonlarını  $\text{Cu}^+$  (cupro)' e indirger, aynı zamanda  $\text{Cu}^{+2}$  de glukoz karbonil karbon atomundan oksitleyerek glukonik asite dönüştürür. Reaksiyon sonunda sarı renkli  $\text{Cu}(\text{OH})$  veya insolubl kırmızı renkli  $\text{Cu}_2\text{O}$  oluşur. Oluşan rengin yoğunluğu glukoz miktarıyla doğru orantılı olarak artar.

#### Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne 5 ml Benedikt ayıracı konulur ve 1 ml glukoz çözeltisi ilave edilir, karıştırılır ve 5-10 dakika süreyle kaynama ısısına kadar ısıtılır. Kırmızı renk indirgeyici şeker için pozitif sonuç verir.

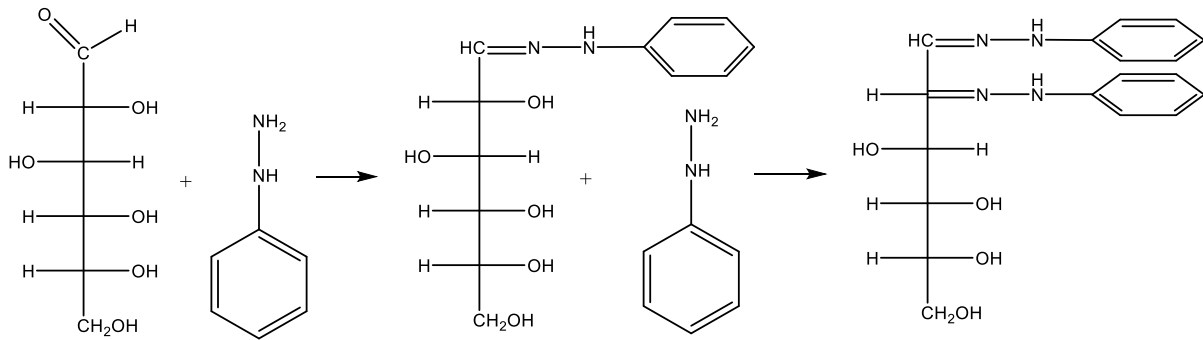
Bu deney yaygın olarak idrarda kalitatif glukoz tayininde kullanılır. Ortamda iki değerlikli bakırı indirgeyebilecek glukozdan başka diğer indirgeyici maddeler de pozitif sonuçlar verir. Bu maddeler früktoz, mannoz, galaktoz, laktoz, riboz, ksiloz, arabinoz, askorbik asit, ürik asit, kreatinin, sistein, salisilat, propiltiyourasil, streptomisin, tetramisin, sefalosporinler, formaldehit vb.'dir. Özellikle idrarda fazla miktarda askorbik asit önemli interferense sebep olabilir.

### 3.3.3. Ozazon Deneyi

Karbohidratların serbest karbonil grubu ile ilgili bir reaksiyondur. Serbest aldehit veya keton grubu taşıyan karbohidratlar, fenilhidrazin ile ısıtıldıklarında karbohidratların türüne özgü ozazon kristalleri oluşur. Şeker molekülüne bir fenilhidrazin girmesiyle renksiz, suda kolay çözünen hidrazonlar oluşur. İkinci bir fenilhidrazim molekülü, aldozlarda ikinci karbonu, früktozda birinci karbonu oksitleyerek karbonil grubuna çevirir. Üçüncü bir molekül fenilhidrazin de bu karbonil grubu ile reaksiyona girerek sarı renkli ozazon kristallerini oluşturur. Glukoz, laktoz ve maltozun kristalleri 200 0C'nin üstünde, galaktoz ve pentozları ise bu derecenin altında ergirler. Ayrıca kristallerin mikroskopla şekillerinin incelenmesiyle de ayırtlama yapılabilir. Ene diol formu üzerinden birbirlerine dönüşebilen glukoz, früktoz ve mannoz ekin demeti kristali oluştururken, galaktoz ve laktoz at kestanesi şeklinde kristal oluştururlar.

#### Deneyin Prensibi

Aktif aldehit veya keton grupları ihtiva eden şekerlerin fenilhidrazin ile birleşerek değişik şekillerde sarı renkli (ozazon) oluşturmasıdır. Bu test gebelerin idrarında şeker reaksiyonu olması halinde bu şekerin laktasyon sırasında görülen süt şekerinden mi (laktoz) yoksa diabet sonucu görülen bir glukozüriden mi kaynaklandığını ayırt etmek için kullanılır.



## **Reaktifler**

- %5' lik glukoz, galaktoz, maltoz ve laktoz çözeltileri
- %50 asetik asit
- %10 NaOH
- Fenilhidrazin

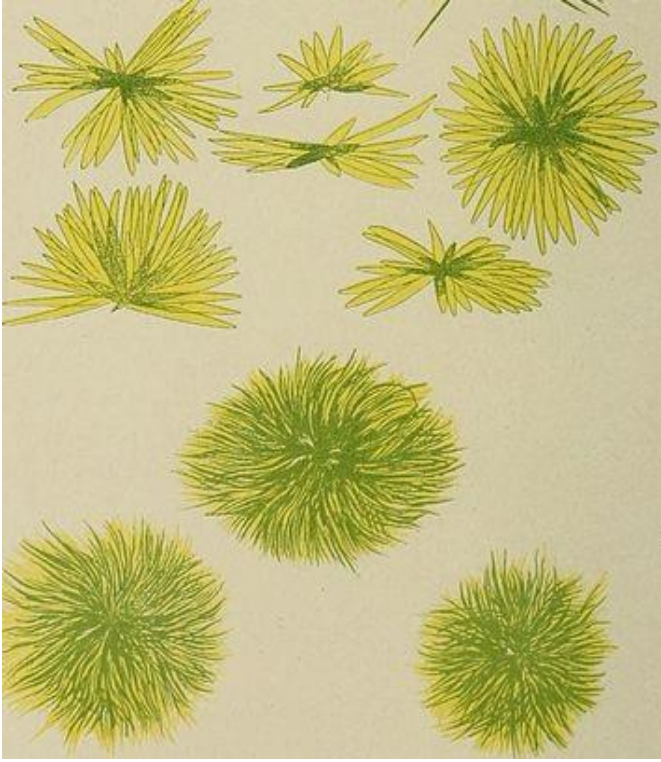
## **Deneyin Yapılışı**

Dört ayrı deney tüpüne glukoz, galaktoz, maltoz ve laktoz çözeltilerinden 5' er ml alınır. Üzerine birkaç damla fenilhidrazin ve 0,5 ml asetik asit ilave edilir, karıştırılır ve ısıtılır. Sodyum hidroksit ilavesinden sonra tüpler kaynar su hamamında 30-60 dakika bekletilir. Tüpler soğutulur, lam üstüne örnek alınıp lamel kapatılır ve oluşan kristaller mikroskopta şekil yönünden incelenir.

Bu deney kristal şekillerine göre mikroskopta bakılarak şekerlerin tanınmasında kullanılır. Glukosazon ekin demeti, maltosazon papatya, laktosazon at kestanesi şeklinde görülür. Ozazon teşekkül su banyosunda gecikirse tüp çıkarılıp soğuk su altına tutulduğunda kristallerin oluşumu hızlandırılabilir. Glukoz, fruktoz ve mannoz aynı ozazonu verdiklerinden bu deney 3 şekerin ayrılmasında yararsızdır. Çünkü fenilhidrazin molekülleri 1 ve 2 nolu C' lara aynı şekilde bağlanır ve bu 3 şekerin de 3., 4., 5. ve 6. C' daki konfigürasyonları aynı olduğundan dolayı aynı ozazon ortaya çıkar.



Glukosazon



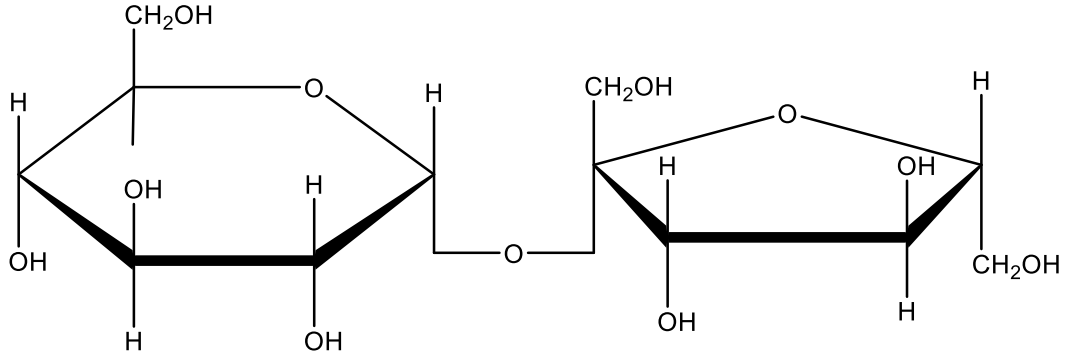
Maltosazon

Laktosazon

### 3.4. DİSAKKARİTLERİN REAKSİYONLARI

Disakkaritler glikozidik bağla bağlanmış iki monosakkaritten kurulu şekerlerdir. Glikozidik bağ bir monosakkaritin hidroksil grubu ile diğerinin karbonil grubu arasında bir molekül  $H_2O$  açığa çıkmasıyla oluşmaktadır. Glikozidik bağlar bazlara dayanıklı olmasına karşın, asidik ortamda kaynatıldığında bağ hidrolize olur ve disakkarit monosakkarit

birimlerine ayrılır. Disakkaritlerden maltoz, izomaltoz, laktoz, sellobiyoz ve gentabiyoz serbest anomerik hidroksil (hemiasetal) grubu taşıdıklarından indirgeyici, sakkaroz ve trehaloz ise disakkariti oluşturan monosakkaritler anomerik karbon atomlarından glikozidik bağ yaptıklarından indirgeyici değildirler. Bu iki disakkarit hidrolize edildikten sonra indirgenme reaksiyonu gösterirler.



**Sakkaroz**

### 3.4.1. Sakkarozun Hidrolizi

İndirgeyici özelliği olan disakkaritler fehling, benedikt, trommer vb. deneylere pozitif sonuç verirken, sakkaroz ve trehaloz vermezler. Deneyin iki amacından birincisi; sakkarozun indirgeyici özelliğinin olmadığını fehling deneyi ile gösterilmesi, ikincisi ise; HCl ile hidrolizidir.

#### Reaktifler

- Sakkaroz çözeltisi
- HCl
- NaOH
- Fehling A ve B çözeltileri

Sakkaroz (sükroz)  $\beta$ -D-fruktofuranozit ile  $\alpha$ -D-glikopiranozit anomerik karbonlardan bağlanmasıyla oluştuğundan indirgeyici grup taşımaz, bu nedenle indirgenme reaksiyonlarına katılmaz. Sakkaroz, sakkaraz (sükraz veya invertaz) enzimiyle veya dilüe asitlerle kaynatılara

kolaylıkla hidroliz edilebilir. Hidrolizasyonla sakkaroz, früktoz ve glukoz monosakkaritlerine ayrılır.

### **Deneyin Yapılışı**

Birkaç ml sakkaroz çözeltisi deney tüpüne alınır, üstüne dilüe Hl ilave edilir ve karıştırılır. Karışım kaynatılır. Hidrolizin beirlenmesi amacıyla kaynamakta olan karışımdan 1 ml alınır soğutulur ve üzerine asiditeyi nôtürleştirmek için yeterince NaOH ilave edilir daha sonra fehling deneyi uygulanır. Pozitif sonuç alınması sakkarozun hidrolize olduğunu gösterir. Negatif sonuç alınırsa; sakkaroz + HCl karışımı tekrar kaynatılarak pozitif sonuç alınıncaya kadar işleme devam edilir.

### **3.5. POLİSAKKARİTLERİN REAKSİYONLARI**

Polisakkaritler 10 veya daha fazla sayıda monosakkaritin glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşurlar. Glikanlar olarak da adlandırılan polisakkaritler, yapısında bulunan monosakkarit türüne göre **homopolisakkarit** (nişasta, selüloz, glikojen, inülin, dekstran, kitin) ve **heteropolisakkarit** (hyaluronik asit, kondroitin sülfatlar, heparin, pektin vb.) olarak ikiye ayrılır.

Nişasta bitkisel depohomopolisakkarittir, amiloz ve amilopektin alt ünitelerinde oluşur. Amiloz  $\alpha$ -D-Glukoz birimlerinin  $\alpha$ -(1-4) glikozidik bağla bağlanmış linear bir polimerdir. Amilopektin ise  $\alpha$ -(1-4) bağlarına ilaveten 24-30 adet glukozda bir, dallanma noktalarında  $\alpha$ -(1-6) glikozidik bağ içeren polimerdir. Molekül ağırlığı birkaç binden beşyüz bine kadar değişen amiloz suda gerçek manada çözünemeyen hidratlanmış miseller oluşturur. Misellerde polisakkarit zinciri kendi ekseninde sarmal yaparak heliks yapısı oluşturabilir. Bu heliks yapısı eğer ortamda farklı tür bir molekül yoksa stabil değildir, rastgele katlanmış kangallar şeklinde bulunur. Sulu ortamda iyot varlığında amilozun heliks yapısı sabitleşir ve iyot heliks şeklindeki yapının nonpolar kısımlarına yerleşerek nişastanın kalitatif tayininde kullanılan mavi rengin oluşmasına yol açar. Çözelti ısıtıldığında heliks yapısı bozularak

linearlaşır ve renk açılır, soğutulduğunda renk tekrar oluşur. Amilopektin ve hayvansal depohomopolisakkarit olan glikojen ise iyotla daha kısa dalga boylu ışığı absorbladığından kırmızı-mor renk verir. Nişastanın iyotla verdiği renk reaksiyonu zincir uzunluğuyla ilgili olarak da değişir (Tablo).

**Tablo** Nişastanın oda ısısında zincir uzunluğuna ( glukoz monomer sayısına) göre iyotla verdiği renk

| ZİNCİR UZUNLUĞU | HELİKS DÖNME SAYISI | RENKLİ ÜRÜN |
|-----------------|---------------------|-------------|
| 12              | 2                   | Renksiz     |
| 12-15           | 2                   | Kahverengi  |
| 20-30           | 3-5                 | Kırmızı     |
| 35-40           | 6-7                 | Mor         |
| 45<             | 9                   | Mavi        |

### 3.5.1. Nişastanın İyotla Reaksiyonu ve Hidrolizi

#### Reaktifler

- Nişasta çözeltisi (%0,05)
- İyot çözeltisi
- HCl

#### Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne 1ml nişasta çözeltisi, üzerine 1-2 damla iyot damlatılır ve karıştırılır. Oda ısısında heliks yapısındaki amilozun nonpolar kısmına iyot girmesiyle mavi renk oluşur. Karışım ısıtıldığında heliks yapı linear yapıya dönüşür, iyot serbest kalır ve mavi renk kaybolur. Çözelti soğutulduğunda mavi renk tekrar oluşur.

Nişasta çözeltisi ile fehling deneyi yapılır. Nişastanın zincir sonlarındaki glukozlarda serbest indirgeyici drup olmasına karşın, ortamdaki  $Cu^{+2}$  iyonlarını, yeterince indirgeyerek kadar olmadığından renk değişimi gözlenmez.

Nişasta sulu ortamda yoğun HCl ile kaynatılarak hidrolize edilebilir. Bir tüpe 5 ml kadar nişasta çözeltisi alınır, üzerine yeterince HCl ilave edilir ve karışım kaynar su banyosuna bırakılır. Tüpteki karışımdan beşer dakika aralıklarla örnekler alınır, üzerine iyot

damlatılır. İyotla renksiz oluncaya kadar ısıtılır, sonunda fehling ve selivanoff deneyleri yapılır, ancak fehling ve selivanoff deneylerini yapmadan ortam asiditesinin n  t  rle  mesi için yeterince NaOH ilavesi yapılmalıdır.

Ni  sta molekülleri maltoz ve glukoza hidrolize olmuşsa iyotla renksiz, fehling iile kırmızı bir tortu verir.

#### **4. L  P  DLER   TANIMA DENEYLER  **

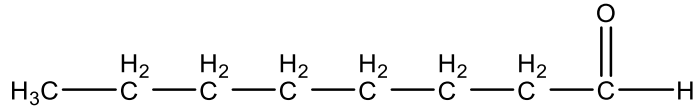
Lipidler, yağ asitleri ile gliserin ya da benzeri alkollerin aralarında su çıkararak esterleşmesi ile meydana gelen organik maddelerdir. Lipidler, genel olarak suda erimeyen (polar olmayan), eter ve kloroform gibi         lerde         n organik moleküllerdir. Lipidlerin temel fonksiyonu depo enerji kaynağı olmasıdır. Bir gram ya   aynı ağırlıktaki karbondihidrattan iki kat daha fazla enerjiye sahiptir. Uzun süren açlık neticesinde oluşan     mlerde vücutta lipid saptanmıştır. Bu muhtemel bir yapısal materyal olduğunu gösterir.

Lipidlerin görevleri   u şekildedir;

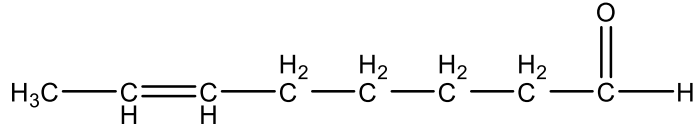
1. Membranların komponentleridir.
2. Enerji deposudurlar.
3. Organizmada bazı önemli maddelerin kaynağıdırlar.
4. Organizmayı ısı, ışık, elektrik ve fiziksel şoklardan korurlar.
5. Enfeksiyonlardan korunmada, suyun fazla miktarda kaybı ya da kazanılmasında etkilidirler.
6. Bazı vitamin ya da hormonların yapısında görev alırlar.

#### **Yağ asitleri**

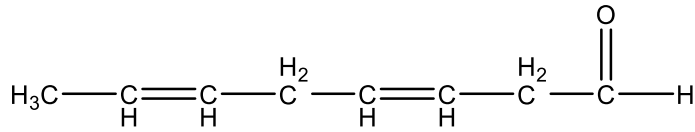
Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir; yapılarında, 4-36 karbonlu hidrokarbon zincirinin ucunda karboksil grubu bulunur:



Doymuş yağ asitleri



Tekli doymamış yağ asitleri



Çoklu doymamış yağ asitleri

Doğal yağlarda bulunan yağ asitlerinin karbon atomu sayısı çifttir. Yağ asitlerinin yapısında yer alan hidrokarbon zinciri karbonları,  $-\text{COOH}$  karbonundan itibaren isimlendirilir;  $-\text{COOH}$  karbonuna komşu ilk karbon atomuna  $\alpha$ -karbon, ikinciye  $\beta$ -karbon, üçüncüye  $\gamma$ -karbon denir; en sonda yer alan metil grubunun karbonu ise  $\omega$ -karbon olarak isimlendirilir.

### **Doymuş yağ asitleri**

Hidrokarbon zincirleri çift bağ içermeyen ve dallanmamış olan yağ asitleridirler.

En basit doymuş yağ asidi, 2 karbona sahip asetik asittir. Doymuş yağ asitleri, iki karbonlu monokarboksilik asit olan asetik asit üzerine kurulmuş olarak tasarlanabilirler. Asetik asit, propiyonik asit ve butirik aside uçucu yağ asitleri denir; bunlar, özellikle ruminantların metabolizmalarında önemli yer tutarlar. Asetik asit ve butirik asit, su ile her oranda karışabilirler. Karbon sayısı 10'dan fazla olan yağ asitleri suda çözünmezler.

Doymuş yağ asitlerinin 2-6 karbonluları kısa zincirli, 8-12 karbonluları orta zincirli, daha fazla karbonluları uzun zincirli olarak tanımlanırlar. Doymuş yağ asitlerinin karbon sayısı 10 ve daha az olanları oda sıcaklığında sıvı ve uçucudurlar; diğerleri katı yağlar olarak

tanımlanırlar. Hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri, 16 karbonlu palmitik asit ile 18 karbonlu stearik asittir.

### **Doymamış yağ asitleri**

Hidrokarbon zincirinde bir veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleridirler.

Hidrokarbon zincirinde bir çift bağ içeren doymamış yağ asitleri, monoansatüre (monoenoik) yağ asitleridirler; iki veya daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitleri, poliansatüre yağ asitleridirler. Poliansatüre yağ asitleri, içerdikleri çift bağ sayısına göre dienoik, trienoik, tetraenoik yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Son yıllarda yağ asitlerinin karbon zincirlerindeki karbonların numaralandırılması, karboksil grubundan başlamak yerine  $\omega$  karbonu olarak adlandırılan metil karbonundan başlamak suretiyle yapılmakta ve çift bağlardan ilki buna göre belirtilerek  $\omega$ -3 yağ asitleri gibi isimlendirme yapılmaktadır; örneğin 18: 3 $\Delta$ 9, 12, 15 linolenik asit, bir  $\omega$ -3 yağ asididir.

## **Lipidleri Tanıma Deneyleri**

### **4.1. Ester Oluşumu Deneyi**

**Deneyin Amacı:** Lipidlerin oluşumu ile ilgili reaksiyonda ester oluşumunu göstermek

**Ayırıcılar :** Glasiyal asetik asit, etil alkol, yoğun  $H_2SO_4$

**Deneyin Prensibi:** Alkol ve fenollerin organik veya inorganik asitlerle ilişkisi neticesinde esterler oluşur. Meyvelerin ve çiçeklerin hoş kokusu esterlerin varlığı ile oluşur. Birçok biyolojik maddeyi oluşturan komponentler ester bağı ile birleşmiştir. Örnek, trigliseridler, fosfolipidler, şeker fosfatları, ve nükleik asitler.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne 2 ml glasiyal asetik asit ve 2 ml etil alkol konur. 3-5 damla yoğun sülfirik asit ilave edilir. 70-80 derecelik su banyosunda 10 dakika ısıtılır, soğutulup 10 ml musluk suyu ilave edilir. Oluşan koku ve organik tabaka gözlenir.

## 4.2. Akrolein Deneyi

**Deneyin Amacı:** Lipidlerin temel yapısında bulunan gliserinin varlığının gösterilmesi ya da bir yağı gerçek yağ olup olmadığının anlaşılması.

**Ayırıcılar:** Anhidr  $\text{KHSO}_4$

**Deneyin Prensibi:** Gliserin anhidr potasyum hidrojen sülfat ile muamele edilirse ısının da etkisiyle dehidre olarak doymamış bir aldehit olan akroleine dönüşür. Akrolein karakteristik bir kokuya sahiptir. Bu deney bir yağın gliserin ve yağ asitlerinin esteri olup olmadığını kontrol etmede kullanılır.

**Deneyin Yapılışı:** Bir tüpe 1 g kadar  $\text{KHSO}_4$  ve birkaç damla gliserin konur. Tüp ısıtılır. Tüpün ağzına amonyaklı gümüş nitrat eriyiği ile ıslatılmış filtre kağıdı tutulursa gümüş nitrat akrolein tarafından indirgenir ve kağıdın rengi kahverengi-siyaha döner. Koklanıldığında burnu iğneleyici bir koku duyulur.

## 4.3. Doymamış Yağ Asitlerindeki Çift Bağların $\text{KMnO}_4$ ile Gösterilmesi Deneyi

**Deneyin Amacı:** Yağların yapılarında bulunan doymamış yağ asitlerindeki bir ya da birden fazla çift bağların varlığının tespiti.

**Ayırıcılar:** Sıvı yağ (Oleik Asit), Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Potasyum Permanganat ( $\text{KMnO}_4$ )

**Deneyin Prensibi:** Doymamış yağ asidinin yapısında bulunan çift bağ düşük ısıda potasyum permanganat ile oksitlenerek çift bağlara OH grubu girer ve dihidroksi stearik asit oluşur. Eğer ısıtma işlemi arttırılarak devam ederse stearik asit su kaybedeceğinden azelaik asit oluşur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar sıvı yağ (Oleik asit) konur. Üzerine spatül ucu ile  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ilave edilir ve hafif ısıtılır. Daha sonra sulandırılmış  $\text{KMnO}_4$  damla damla ilave edilerek çalkalanır ve damlatma işlemine renk kayboluncaya kadar devam edilir.

#### **4.4. Kolesterol deneyleri**

##### **4.4.1. Salkowski Deneyi**

**Deneyin Amacı:** Kolesterolün varlığını göstermek

**Ayırıcılar:** Konsantre Sülfirik Asit, Kolesterol, Kloroform

**Deneyin Prensibi:** Kolesterol ile sülfirik asitin esterleşme tepkimesi neticesinde karışımın kırmızı renge dönüşmesidir.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne 2 ml %5'lik kloroformda eritilmiş kolesterol konur. Daha sonra yoğun sülfirik asitle tabaka yaptırılır. Tabaka yerinde kırmızı halka ve açık yeşil floresan renk görülmesi kolesterolün varlığına işaret eder.

##### **4.4.2. Liebermann-Burchardt Deneyi**

**Deneyin Amacı:** Kolesterolün varlığını göstermek

**Ayırıcılar:** Konsantre Sülfirik Asit, Kolesterol, Kloroform, Anhidr Asetik Asit

**Deneyin Prensibi:** Kolesterolün asetik asit ve sülfirik asit ile reaksiyonu sonucu yeşil renk oluşmasıdır.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne 2 ml %5'lik kloroformda eritilmiş kolesterol konur. Üzerine 0,5 ml asetik asit ve 0,5 ml sülfirik asit ilave edilir. Mor-mavi renk ve yeşil rengin oluşması kolesterol varlığını gösterir.

## 4.5. Keton maddelerini tanıma deneyleri

Keton cisimleri metabolizmanın normal işleyişi sırasında da üretilen ve dokular tarafından enerji metaboliti olarak kullanılan maddelerdir. Fakat keton cismi üretimi açlık, uzun süreli şiddetli egzersiz ve kontrolsüz diabet gibi durumlarda artmaktadır.

Keton cisimlerinin tek öncül molekülü Asetil KoA'lardır. Keton cismi üretimine katılan asetil KoA'ların büyük kısmı yağ asidlerinin yıkımından elde edilir. Bununla beraber lösin, izolösin, lizin, fenilalanin, tirozin ve triptofan aminoasitlerinden de keton cisimleri sentezlenir.

Keton cisimleri mitokondride üretilen asetil KoA'lar TCA'nın kapasitesini aşmaya başladığında senzlenmektedir. Keton cismi sentezi ve yıkım insanda mitokondrilerde gerçekleşmektedir.

Keton cisimleri:

1. Asetoasetat
2.  $\beta$ -hidroksibütirat
3. Aseton'dur (aseton metabolize olmayan bir yan üründür)

### 4.5.1. Legal Deneyi

**Deneyin Amacı:** Aseton aramak

**Ayırarlar:** %10'luk NaOH, %5'lik Sodyumnitropurisit ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ), Asetik Asit

**Deneyin Prensi:** Aseton alkali ortamda (NaOH) sodyumnitropurisit ile kiraz kırmızısı renk oluşturur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar aseton ihtiva eden sıvı konur üzerine birkaç damla sodyumnitropurisit çözeltisinden ilave edilir ve karıştırılır. Tüpteki karışımın kiraz kırmızısı renge dönüştüğü görülür. Bu deney idrarda yapılıyorsa, rengin asetondan mı

yoksa kreatinininden mi olduğunu ayırt etmek için tüpe birkaç damla asetik asit ilave edilir, renk açılırsa kreatinininden koulaşır, asetondan olduğuna karar verilir.

#### 4.5.2. Lieben Deneyi

**Deneyin Amacı:** Aseton aramak

**Ayırıcılar:** 2 N NaOH, Lugol Çözeltisi (5 g İyot, 10 g KI 100 ml distile suda eritilir).

**Deneyin Prensipleri:** Aseton NaOH ile oluşan alkali ortamda iyot ile sarı renkli iyodoform tortuları ya da kristalleri oluşturur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar aseton ihtiva ettiğini düşündüğümüz sıvıdan konur. Üzerine sulandırılmış lugol çözeltisi (1/5) ilave edilerek çalkalanır. Daha sonra NaOH çözeltisinden renk açılincaya kadar damlatılır, bu arada tüpte sarı renkli tortulu iyodoform oluşması asetondan kaynaklandığının işaretidir.

#### 4.6. Safra deneyleri

##### 4.6.1. Gmelin Deneyi

**Deneyin Amacı:** Bilirubin varlığını araştırmak

**Ayırıcılar:** Nitrik Asit, Tüten Nitrik Asit (Nitrik asit üzerine sodyum nitrit ilavesiyle elde edilir), Sulandırılmış Safra ya da Bilirubin İhtiva Eden Çözelti

**Deneyin Prensipleri:** Nitrik asit etkisi ile bilirubin biliverdine oksitlenmesidir.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar nitrik asit konur üzerine 2-3 damla tüten nitrik asit ilave edildikten sonra bilirubin ihtiva eden sıvı ya da sulandırılmış safra ile tabaka yaptırılır. Tabaka yerinde sarı yeşil mor rengin görülmesi bilirubin varlığını ve biliverdine oksitlendiğini gösterir.

#### 4.6.2. Hammersten Deneyi

**Deneyin Amacı:** Bilirubin varlığını göstermek

**Ayır  lar:** Hammersten Ayır   (1/19 oranında HNO<sub>3</sub> ve HCl), %95 Alkol, Bilirubin İhtiva Eden Sıvı ya da Sulandırılmış Safra

**Deneyin Prensibi:** Bilirubinin oksitlenerek biliverdine dönüşmesidir.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar hammersten ayır   konur üzerine 4-5 ml %95'lik alkol ve birkaç damla sulandırılmış safra ya da bilirubin ihtiva eden sıvı ilave edildikten sonra karıştırılır ve ısıtılır. Yeşil bir rengin oluşması bilirubinin biliverdine oksitlendiğini gösterir.

#### 4.6.3. Rosin Deneyi

**Deneyin Amacı:** Bilirubinin varlığını göstermek

**Ayır  lar:** Rosin Ayır   (Alkolde hazırlanmış %1'lik iyot   z  ltisi), Sulandırılmış Safra

**Deneyin Prensibi:** Bilirubinin yeşil renkte biliverdine oksitlenmesidir.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar sulandırılmış safra konur ve rosin ayır   ile tabaka yaptırılır. Kısa bir süre içerisinde tabaka yerinde yeşil rengin oluşması bilirubinin biliverdine oksitlendiğini gösterir.

#### 4.6.4. Fouchet (Fu  ) Deneyi

**Deneyin Amacı:** İdrarda ya da bilirubin ihtiva eden sıvıda bilirubin varlığını göstermek

**Ayır  lar:** %10'luk Baryum Klorür, Sodyum Sülfat   z  ltisi (1.5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ml distile suda eritilir), Fouchet Ayır   (25 g triklor asetik asit 100 ml distile suda eritilir,

üzerine 10 ml %10'luk demir klorür ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) çözeltisinden ilave edilir ve koyu renkli şişede saklanır.

**Deneyin Prensibi:** Baryum klorürün sülfatlarla oluşturduğu baryum sülfatın tuttuğu bilirubinün fuşe ayırıcı ile biliverdine oksitlenmesiyle sarı yeşil mavi renkler oluşur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar idrar ya da sulandırılmış safra konur üzerine baryum klorür ve sodyum sülfat çözeltilerinden 1-2 ml ilave edilerek karıştırılır. Baryum sülfattan dolayı oluşan tortu bir süzgeç kağıdından süzülür. Daha sonra süzgeç kağıdı düz bir zemin üzerine konarak üzerine fuşe ayırıcından birkaç damla damlatılır. Sarı yeşil mavi renkli halkaların oluşumu bilirubinün biliverdine oksitlendiğini gösterir.

#### 4.6.5. Pettenkofer Deneyi

**Deneyin Amacı:** Safra asitlerinin varlığının gösterilmesi

**Ayırıcılar:** Yoğun Sülfirik Asit, %10'luk Sakkaroz Çözeltisi, Sulandırılmış Safra

**Deneyin Prensibi:** Yoğun sülfirik asitin etkiyle suyunu kaybeden sakkarozdan oluşan furfural ile safra asitlerinin birleşmesi sonucu koyu kırmızı kiraz rengi oluşur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar sulandırılmış safra konur üzerine yoğun sülfirik asit ilave edilir. Daha sonra %10'luk sakkaroz çözeltisinden birkaç damla ilave edilerek ısıtılırsa koyu kırmızı kiraz renginin oluştuğunun görülmesi safra asitlerinin varlığına işaret eder.

#### 4.6.6. Hay Deneyi

**Deneyin Amacı:** Safra asitlerinin varlığının gösterilmesi

**Ayırıcılar:** Safra, Kükürt Çiçeği

**Deneyin Prensibi:** Safra asitlerinin yüzey gerilimini azaltıcı etkisinden kaynaklanır.

**Deneyin Yapılışı:** İki deney tüpü ya da beher alınır tüpün birine bir miktar su konur diğerine sulandırılmış safra konur. Her iki tüpe de bir spatül ucu kükürt çiçeği konur ve çalkalanır. Safra ihtiva eden tüpteki kükürt tozlarının dibe çöktüğü görülür bu da safranin yüzey gerilimini düşürdüğüün işaretidir.

#### 4.6.7. Safra Musini Tanıma Deneyi

**Deneyin Amacı:** Safranin içerisinde bulunan mukopolisakkarit yapısındaki musinin varlığını göstermek.

**Ayırıcılar:** Safra, 2 N  $\text{CH}_3\text{COOH}$

**Deneyin Prensibi:** Safrada bulunan ve mukopolisakkarit yapısındaki musin asetik asit ile denatüre olur.

**Deneyin Yapılışı:** Bir deney tüpüne bir miktar sulandırılmış safra konur üzerine birkaç damla 2 N asetik asit ilave edilir ve karıştırılır. Bulanıklığın görülmesi musinin varlığını gösterir.

### 5. PROTEİNLER

Yunanca'da birinci sırada anlamına gelen proteois kelimesinden türemiştir. Proteinler canlı bir hücrenin kuru ağırlık üzerinden yaklaşık % 50'sini oluşturan, kompleks yapıdaki makro moleküllerdir. Amino asitlerden oluşurlar ve molekül ağırlıkları 5.000 ile birkaç milyon dalton arasında değişir. Proteinler, organizmanın ihtiyaç duyduğu 3 makro besin grubu içinde yer almaktadır.

Hücre yapısında ve hücrenin üstlendiği çeşitli işlevlerde (yapısal ve fizyolojik) yer alırlar. Hücrelerin zarında lipitlerle birlikte bulunurlar. Hormon ve enzimlerin yapısında da yer alırlar. Proteinlerin elementel analizi yapıldığında: C (% 50-55) H (% 6-7), N (% 12-19),

S (% 0.2-3.0), O (% 20-23) Bunların dışında P, Fe, Zn, Cu elementleri En önemli özelliği N bulundurmasıdır ve yağlardan ve karbonhidratlardan bu özelliği ile ayrılmaktadırlar.

Proteinler değişik sayı ve çeşitte amino asit içerirler. Yapıyı oluşturan amino asitler peptid bağı ile bağlanarak polipeptid yapısını oluştururlar. Bazı proteinler amino asitlerin yanı sıra karbonhidrat, lipit, mineral madde ve renk maddeleri (pigmentler) gibi diğer yapıtaşlarını da içerirler. Bunlara prostetik grup denir.

## **Amino Asitler**

Amino asitler proteinlerin yapı taşıdır. Aynı karbon üzerinde amino ( $-NH_2$ ) ve karboksil ( $-COOH$ ) grubu bulundururlar. Genel gösterimi  $R-CH-NH_2-COOH$  şeklindedir. R grubu değişken gruptur. R grubunun değişmesiyle 20 çeşit primer veya standart amino asit meydana gelir. Bu 20 çeşit amino asitin değişik sayı ve sırada dizilimi ile çok sayıda ve değişik fonksiyonları olan proteinler oluşur.

Amino asitler renksiz, suda tamamen, etil alkolde ise kısmen çözünmelerine karşılık, eterde hiç çözünme özelliği olmayan organik bileşiklerdir. Amino asitlerin bulundurduğu karboksil ve amino grubu, reaksiyon gücü oldukça yüksek fonksiyonel gruplar oldukları için bu grupların verdiği bütün reaksiyonları verirler. Amino asitlerin verdiği bu reaksiyonlar gerek biyolojik sıvılardaki serbest amino asitlerin cinsi ve miktarı, gerekse protein yapısına giren amino asitlerin miktarı, cinsi ve sırasını belirlemede son derece önemli ve yararlıdır.

## **Protein ve Amino Asitleri Tanıma Deneyleri**

### **5.1. Ninhidrin Deneyi**

**Deneyin Amacı:** Amino asitleri tanımak

**Ayırıcılar:** Ninhidrin Çözeltisi (150 mg/dl), Amino Asit Çözeltileri

**Deneyin Prensibi:** Bütün  $\alpha$ -amino asitler güçlü bir organik oksidan olan ninhidrin ile reaksiyona girerek mor bir renk verirler.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüplerine 1 ml kadar amino asit (%0.1-0.5 glisin, tirozin veya triptofan) çözeltisi alınır ve üzerine 3-5 damla ninhidrin ilave edilir. 2 dk kaynatılıp musluk altında soğutulduğu zaman mor bir renk meydana gelir. Proteinler de aynı deney için pozitif sonuç verirler.

Reaksiyonda ninhidrin etkisiyle amino asitler oksidatif bir deaminasyon ve dekarboksilasyona uğrayarak aldehit,  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$  oluşur, ninhidrin ise indirgenir. İndirgenmiş ninhidrin tekrar ninhidrin ve  $\text{NH}_3$  ile reaksiyona girerek mor renkli bir kompleks oluşturur.

## 5.2. Ksantoprotein Deneyi

**Deneyin Amacı:** Yapısında aromatik halka bulunan amino asitleri tanımak

**Ayırıcılar:** Amino Asit Çözeltileri,  $\text{HNO}_3$

**Deneyin Prensibi:** Benzen halkasına sahip (aromatik yan zincirli) tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi amino asitler ve bunların oluşturduğu proteinler nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) etkisiyle sarı renkli nitro- ya da nitrozo bileşiklerini oluştururlar. Bu durum alkali ortamda daha da şiddetlenir.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne yaklaşık 2 ml kadar amino asit çözeltileri konur. Üzerine 1 ml kadar derişik  $\text{HNO}_3$  ilave edilerek karıştırılır. Beyaz bir tortu oluşur. Isıtılır ve rengin sarıya dönüştüğü görülür. Tüp soğutulup üzerine NaOH veya  $\text{NH}_3$  (amonyak) ilave edilirse sarı renk koyu portakal kırmızısı veya turuncuya döner.

### 5.3. Biüret Deneyi

**Deneyin Amacı:** Peptid bağlarının varlığının gösterilmesi

**Ayırarlar:** Bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ), protein çözeltisi

**Deneyin Prensibi:** Alkali ortamda bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) iki veya daha fazla peptid bağı ihtiva eden moleküllerle reaksiyona girerek menekşe renkli kompleks meydana getirir. Serbest amino asitler peptid bağı içermediğinden bu reaksiyonu vermezler.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne 1 ml protein çözeltisi, 1 ml 2 N NaOH eklenerek karıştırılır. Üzerine %0.1'lik  $\text{CuSO}_4$  ilave edilip karıştırıldığında menekşe rengin oluştuğu görülür.

Bu reaksiyonda  $\text{CuSO}_4$  içerisindeki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları peptid bağlarına girerek mavi menekşe rengin oluşmasını sağlar. Reaksiyonun gerçekleşmesi için en az iki adet peptid bağı olması gerektiğinden glisin ve üre ile deney yapıldığında menekşe renk gözlenmez.

Peptid bağları sayısı protein konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğundan kantitatif olarak protein konsantrasyonunu belirlemede de kullanılabilir. Spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmaktadır.

### 5.4. Isı ile Denatürasyon Deneyi

**Deneyin Amacı:** Proteinler üzerine ısının etkisini incelemek veya bir sıvı içerisinde protein olup olmadığını araştırmak

**Ayırarlar:** Protein çözeltisi

**Deneyin Prensibi:** Isı etkisiyle protein ve su molekülleri arasındaki gevşek bağların kopmasıyla protein molekülünün sol halden jel hale geçmesi

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne 2-3 ml kadar protein çözeltisi konularak ısıtılır. Bir süre sonra tüpteki çözeltinin beyaz ve bulanık bir hal aldığı görülür. Bu durumda ısı etkisiyle

protein ve su molekülleri arasındaki gev  sek bağları kopmasıyla protein   z  ltisinin sol halden jel hale geçtiği anla  lır.

Bu deney özellikle idrarda protein aramada pratik ve önemli bir yer tutar. Protein harici bazı faktörlerde ısının etkisiyle bulanıklık oluştururlar. Bu durumda bulanıklık oluşan idrar üzerine seyreltik asetik asit damlatılır. Bulanıklık kaybolmuyorsa protein, köpürme olmadan bulanıklık kayboluyorsa fosfat olarak yorumlanır. Toprak alkali metaller ihtiva eden idrarda ısıtılmakla tortu oluşur. Bu tortu yine asetik asit ilavesiyle kaybolur.

### 5.5 Triklor Asetik Asit (TCA) ile    kt  rme Deneyi

**Deneyin Amacı:** Zayıf asitlerin proteinler üzerine etkisini incelemek.

**Ayıraçlar:** Protein solüsyonu, TCA

**Deneyin Prensibi:** Asidik ortamda proteinler katyon (+) formundadırlar ve zayıf asitlerin anyon kökü ile birleşerek (n  t  rle  me)    kerler.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne 2-3 ml kadar protein   z  ltisi alınır.   zerine 1 ml kadar %10-20'lik TCA ilave edildiğinde beyaz bir tortu (bulanıklık) oluştururlar. Oldukça hassas bir deneydir.

Aynı deney tüpüne seyreltik NaOH ilave edilirse beyaz bulanıklığın tekrar kaybolduğu ve proteinin   z  n  r formuna döndüğü gözlemlenir.

### 5.6 Heller Halkası Deneyi (HNO<sub>3</sub> ile    kt  rme)

**Deneyin Amacı:** Proteinler   zerine kuvvetli asitlerin etkisini incelemek.

**Ayıraçlar:** Protein solüsyonu, HNO<sub>3</sub>

**Deneyin Prensibi:** Kuvvetli asitler proteinleri denatüre ederler. Bu denatürasyon irreversibldır.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne 2-3 ml kadar protein çözeltisi alınır. Üzerine pipet yardımıyla  $\text{HNO}_3$  yavaşça tabaka yaptırılarak ilave edilir. İki sıvının temas yüzeyinde denatürasyona bağlı olarak bulanık bir halka (Heller halkası) teşekkül eder.

## 5.7. Esbach Deneyi

**Deneyin Amacı:** Proteinler üzerine kuvvetli asitlerin etkisini incelemek.

**Ayıraçlar:** Protein solüsyonu, Esbach Ayıracı

**Deneyin Prensibi:** Kuvvetli asitler proteinleri denatüre ederler. Bu denatürasyon irreversibldır.

**Deneyin Yapılışı:** Deney tüpüne 2-3 ml kadar protein çözeltisi alınır. Üzerine 2 ml kadar Esbach ayıracı (1 g pikrik ve 2 g sitrik asit 100 ml suda hazırlanır) ilave edilip karıştırılırsa deney tüpünde asit etkisiyle tortulaşmanın olduğu görülür.

## 6. ENZİMLER

Enzimler, kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleyen, büyük çoğunluğu protein yapısında olan biyomoleküllerdir. Reaksiyon sonunda değişime uğramazlar, reaksiyonun sadece hızını arttıırırlar. Enzimler, yalnız proteinden meydana gelen şekliyle iş görebildikleri gibi, ilave bir faktör de (kofaktör) gerektirebilirler. Bu ilave faktör ya bir inorganik (metal iyonu) ya da organik bir molekül (koenzim) olabilir. İlave faktörün eşlik edeceği inaktif enzim proteinine apoenzim, ilave faktörü bağlayıp aktif şekle dönüşen enzim ise holoenzim olarak adlandırılır.

Enzimatik bir reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, ısı, pH, ortamda inhibitörün bulunup bulunmaması ve diğer faktörlere bağlıdır.

## **Enzim Deneyleri**

### **6.1. Amilaz Deneyi (Nişastanın tükürük ile enzimatik hidrolizi)**

**Ayır  lar:** Fehlin reaktifleri, t  r  k, %5'lik ni  sta solüsyonu

**Deneyin Amacı:** Tükürükteki amilaz aktivitesinin gösterilmesi

**Deneyin Prensibi:** Tükürükteki amilaz enzimi ni  stayı maltoz ve dekstrinlere kadar parçalar ve iyotla mavi renk veren ni  stanın parçalanmasıyla ortam renginin a  lmasına neden olur. Ni  stanın hidrolizi daha ileri derecede olursa mavi renk tamamen kaybolur.

**Deneyin Yapılış:** Bir deney tüpüne 2 ml kadar tükürük alınır ve üzerine 8 ml distile su alınarak karı  tılır. Bu karı  m 1, 2, 3 ve 4 şeklinde numaralandırılmış tüplere eşit olarak paylaştırılır. Sonra her bir tüpe 2   er ml %5'lik ni  sta süspansiyonu eklenir ve hemen 1. t  p kaynatılırken diğer tüpler kaynar suda 2. t  p 2 dakika, 3. t  p 5 dakika ve 4. t  p 10 dakika bekletilir. 1. t  p kaynatma ve soğutma, diğer tüpler de belirtilen s  renin tamamlanmasından sonra her bir karı  mın 0,5'er ml'si ile iyot testi yapılarak ni  stanın hidroliz ürünleri izlenir. Geriye kalan karışımlar ile de Fehling deneyi yapılarak hidrolizin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edilir.

Ancak burada ni  stanın hidrolizi açısından tükürükteki amilazın bireysel farklılığı ve ısının iyi ayarlanamaması gibi nedenlere bağlı olarak tüplerin bekletilme sürelerine göre alınan sonuçlarda öğrenciler arasında farklılıklar görülebilir. Yani bazı öğrencilerin daha kısa s  relerde, bazı öğrencilerin ise daha uzun s  relerde ni  stayı hidrolize etmeleri mümkündür.

Bu deneylerin dışında, ni  stanın iyotla reaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin, tükürük ilavesiyle renk a  ılması deneyi, %2'lik okzalik asit ilave (iyot+okzalik asit+tükürük) edilerek gerçekleştirilir. Burada mavi rengin a  ılmadı  ı görülür. Çünkü tükürükte bulunan amilaz enzimi kalsiyum varlığında aktivite gösterir. Tükürükte bulunan kalsiyum, okzalik asit ile birleşerek kalsiyum-okzalat oluşur ve amilaz beklenen aktiviteyi gerçekleştiremez.