

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ

BİYOKİMYA LABORATUVAR DENEYLERİ

HAZIRLAYAN
Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

ELAZIĞ - 2012

DENEY NO : 1. YAĞLAR

Serbest Asit Sayısı, İyot Sayısı ve Yağlarda Gliserin Varlığının Belirlenmesi

Yağlar; yağ asitlerinin (genellikle uzun zincirli karboksilli asitler) gliserol denilen 3 (OH)²li bir alkolle yaptıkları esterlerdir. Gliserolün üç hidroksil grubunun da yağ asitleriyle esterleştiği bileşiklere **triaçilgliseroller** olarak bilinir. Hayvan ve bitki hücrelerindeki yağ depolarının başlıca bileşenidir. O halde triaçilgliseroller canlılar sistemine glikojenden daha iyi adapte olmuş bir depo enerji şeklidir. 1 gr lipitten KH'ın iki katı enerji elde edilmektedir (1 gr. KH = 4.4 kcal/gr iken, 1 gr. Yağ = 9 kcal/gr). Protein ve karbonhidratlarda olduğu gibi polimerik bir yapı göstermezler. Molekül yapısı daha basittir. Vücuttaki yağ tabakası soğuğa karşı koruyucu ve hassas organlarında koruyuculuğunu yapar. Yağ aynı zamanda A, D, E ve K gibi yağda çözünen vitaminlere kaynaklık işlevini görür. Yağlar hayvanların vücudunda veya bitkilerin meyve, tohum ve çekirdeklerinde doğal olarak bulunur. Hayvan vücudunda elde edilen yağlar hayvansal yağlar olup (tereyağı, iç yağları, balık yağları gibi) Bitkilerden elde edilen yağlar ise bitkisel yağlar olup (zeytin, ayçiçek, pamuk yağları gibi) Bitki tohumlarından elde edilenler ise pamuk, mısır, soya, keten, kakaodur.

Katı yağlardaki yağ asitlerinin hidrokarbon zinciri doymuş, sıvı yağlarda doymamış haldedir. Bu nedenle sıvı yağ hidrojenlendirilirse katılaşır. Doğal yağlarda bulunan yağ asitleri iki karbonlu birimlerden sentez edildikleri için çift sayıda karbon atomu içermektedirler. Kısaca yağ asitleri moleküllerinin hepsinde toplam karbon sayısı çift sayılıdır. Yalnızca Yunus balığında elde edilmiş olan izovalerik asitte tek sayılı karbon atomu vardır. Çoğunlukla ester şeklinde bulunan yağ asitlerinin küçük bir bölümü, plazmada albümine bağlı olarak taşınan esterleşmemiş yağ asitleri şeklinde bulunmaktadır. Yağların NaOH'le verdikleri tepkimeye sabunlaşma denir. KOH kullanılırsa arap sabunu olur. Elde edilen organik asitin Na tuzu suda çözünür ve sabun adını alır. Sabun yapılırken yan ürün olarak gliserin elde edilir ve parfüm sanayinde kullanılır. Serum proteinlerine bağlı bulunan ve total lipid adını alan maddelerin bazıları şunlardır.

1. Nötral yağlar(triacil gliseroller).
2. Serbest kollesterol.
3. Ester kollesterol.
4. Fosfolipidler.

5. Serbest yağ asitleri. Lipidler suda erimeyen maddelerdir. Su ile karıştırılıp çalkalandıklarında dayanıksız emülsiyonlar oluşur.

Asit değerinin tayini veya Asit sayısı

Asit değeri (sayısı) yağ içinde serbest haldeki asit miktarını belirler. Buna göre; Bir gram yağ içindeki serbest asiti nötrleştirmek için kullanılan KOH veya NaOH'in mg sayısına asit sayısı denir.

Deneyin yapılışı

1.Yaklaşık 0.5-1gr yağ tartılır ve 15-20 mL alkol-eter (1:1 oranında) karışımında çözülür.

2. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra karışım fenolftaleyn indikatörü yanında 0.1N ayarlı KOH çözeltisi ile 5 sn. dayanan açık pembe renk elde edilinceye kadar titre edilir. Harcanan KOH hacmine V_1 denir.

3. Başka bir erlene 15-20 mL alkol-eter çözeltisi (kör) benzer koşullarda KOH çözeltisi ile titre edilir. Harcanan KOH hacmine V_2 denir. Eğer yağın ağırlığı W , KOH'in normalitesi N ve molekül ağırlığı 56.11 olarak alınır (KOH'in yerine NaOH kullanılırsa 56.11 katsayısı yerine NaOH'in mol ağırlığı olan 40 rakamı yazılır); $V_2 =$ yaklaşık 0.3 mL'dir.

$$\text{AsitSayısı' } Ax) = \frac{V_1 - V_2}{W} \times 56.11 \times N \quad \text{olur.}$$

Yağlarda İyot Sayısı

İyot sayısı belirli şartlarda 100 gr yağ tarafından bağlanabilen iyodun gr cinsinden miktarıdır. Yağların doymuşluğu hakkında doğru bir fikir edinmek için yapılan deneylerden biridir. Doymuş yağlar kalp ve damar hastalıklarının oluşumunda önemli bir risk faktörüdür. Yağ asitlerinin bazıları doymamış hidrokarbonlardan oluşur. Herhangi bir yağdaki doymamış hidrokarbon oranı yağın erime noktasını doğrudan etkiler.

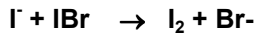
Erime noktası doymuşluk ile artar. Genel olarak verilen bir yağdaki doymamışlık oranı iyot ile tepkimesi sonucu bulunur. Bazı yağlardaki iyot sayısı ;

Zeytin yağı = 80-85	Balık yağı = 140-180	Keten tohumu yağı = 175-200
Ay çiçek yağı = 125-150	Tereyağı = 30-43	Domuz yağı = 50-70

Deneyin Yapılışı

1. Yaklaşık 0.5 -1 gr. sıvı yağ 4-5ml CHCl_3 veya CCL_4 içinde çözülür ve üzerine 13-16 mL İBR çözeltisi eklenir. (İBR çözeltisinin hazırlanışı: 500mL asetik asit, 4 ml Brom ve 2.4 gr iyodun katılmasıyla hazırlanır).

2. Çözelti karışımı karanlık bir yerde 3-4 dk. kadar bekletilir. Karışıma bekleme süresinin sonunda 50mL su ve 10mL %10'luk KI çözeltisi eklenerek iyice karıştırılır. Karışım içerisinde şu tepkime olur.



3. Çözeltideki fazla iyot ayarlı (0.1N) tiyosülfat ile nişasta indikatörü yanında titre edilir (**Nişasta indikatörü Amilaz deneyinde anlatıldığı şekilde hazırlanacak eğer hazır varsa ortak kullanılacak**) Kullanılan tiyosülfatın hacmi V_1 dir. Tiyosülfat ise potasyum bikromat, potasyum iyodat, metalik bakır ve iyot ile ayarlanabilir.

4. İçinde yağ hariç diğer maddeleri içeren (kör) çözeltisi hazırlanarak tiyosülfat ile titre edilir. Burada harcanan tiyosülfatın hacmine V_2 denir. V_2 yaklaşık 3.5 ml'dir.

5. Analiz için alınan yağ ağırlığı W, tiosülfat çözeltisinin derişimi N ise; formüldeki 12.69 katsayısı iyodun moleköl ağırlığının 1/10 dur. 1 gr yağ alınırsa iyot 1/100 olur. Eğer 0.5 gr alınırsa 1/200 olur.

$$İyotDeęeri(x) = \frac{V_1 - V_2}{W} \times 12.6 \times N$$

Yağlarda Gliserinin Varlığının Belirlenmesi

Deneyin yapılışı

Yaklaşık 0.5-1 ml sıvı yağ 3-4 ml metanolde hazırlanmış KOH çözeltisi ile birlikte bir deney tüpüne alınır. 4-5 dk. Süreyle kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtılır. Metanolde azalma olursa tekrar ekleme yapılır. Elde edilen berrak çözelti iki kısma ayrılır. 1. kısım soğutulur. 2. Kısım 5 ml saf su ile seyreltilir. Oda sıcaklığında soğutulur ve üzerine 4-5 damla $CuSO_4$ çözeltisi ilave edilir. Önce açık mavi bir çökelek meydana gelir (Cu-gliserin kompleksi) daha sonra koyu mavi çökelti oluşur. Bu da gliserinin varlığını gösterir.

NOT = Bu deney çeker ocak içerisinde yapılmalıdır. Çünkü metanol içildiğinde ya da buharları gözle temas ettiği zaman gözleri kör eder.

DENEY NO : 2. HEMOGLOBİN TAYİNİ VE KSANTOPROTEİN DENEYİ

Kan Plazması : Kan, antikoagulan (heparin, EDTA gibi) bir madde ile karıştırılıp santrifüj edilirse üstte kalan sarı renkli sıvıya **Kan plazması** denilir. Allta toplanan kısım ise kanın şekilli elemanlarını (eritrosit, lökosit vb.) ihtiva eder.

Kan Serumu : Kan örneği herhangi bir antikoagulan katılmaksızın tüpte bekletilecek olursa üstte toplanan berrak sarımtırak renkli sıvı kısmına **kan serumu** denilir. Kan plazması ile kan serumu arasında en belirgin farklılık, kan plazmasında ekstradan pıhtılaşmada önemli rol oynayan fibrinojenin bulunmasıdır. Kan serumu fibrinojen dışında kalan diğer kan proteinlerini içerir.

Bir protein olan hemoglobin oksijeni akciğerlerden dokulara, dokulardaki karbondioksit ve protonları ise akciğere taşımaktadır. Hemoglobin karbon dioksidi sünger gibi emer. Normal bir kişi'nin 100 ml kanında 15 gr hemoglobin bulunmaktadır. 1 gr hemoglobin maksimum 1.34 ml oksijen bağladığı için % 100 doyumlukta bağlanan oksijen miktarı 100 ml kanda 20 ml kadardır. Eritrositlerdeki glikoz metabolizma yolunda bir ara ürün olarak 1,3-bifosfogliserattan 2,3-bifosfogliserat (BPG) oluşmaktadır. Oksijen basıncının azaldığı durumlarda organizma, BPG ile uyum mekanizması geliştirmektedir. Deniz seviyesinde yükseltilere çıkıldığında bir iki gün içinde normalin yaklaşık iki katına çıkan BPG konsantrasyonu, dokularda hemoglobinin oksijene ilgisini azaltmakta ve düşük oksijen konsantrasyonunda dokuların yeterli oksijenlenmesini sağlamaktadır. Başta egzoz gazları olmak üzere, çevrede CO gibi zehirli gazların fazla olduğu ortamlarda bulunan kişilerde, BPG konsantrasyonları yüksek bulunmuştur.

Hemoglobin kana renk veren maddedir. Hemoglobinin önemli kısmı, dört "hem" grubunun her birinde bulunan demir atomlarıdır. Demirin altı koordinasyon değerliğinden yalnızca biri globine bağlıdır ve eritrositler içinde bulunur. Barsak mukoza hücrelerinde Fe^{+3} girmiş olan demir oradan Fe^{+2} halinde dışarı çıkar. Bu mekanizma henüz aydınlatılamamıştır. Sonuç olarak Transferin oluşmaktadır. Transferrin molekül başına 2 Fe^{+2} atomu bağlar. Hemoglobin yapan hücrelere harcanan Fe'in 2/3'ünü transferrin sağlar. Transferrine bağlı Fe kemik iliğince kolayca alınabilir. Eğer kemik iliğine gerekmezse transferrinin getirdiği Fe'i karaciğere depo eder. Her anorganik Fe aynı biçimde emilmez şöyle ki Fe^{+2} , Fe^{+3} 'den daha hızla ve tercihle emilir.

Her dokuda biraz, fakat karaciğerde, dalakta ve barsak duvarlarında oranla çok bulunan ferritin'e bir Fe depolama şekli olarak bakılmaktadır. Bu depolar sabit değildir ihtiyaca göre iyonlaşarak plazmaya Fe verirler ve kemiklere Fe gönderirler(hemoglobin yapımı için). Yine birkaç aylık ömrü olan eritrositler de yıkılınca Fe'leri kısmen depolara iade edilir. Çocukluk dönemlerinde Fe ihtiyacı daha çoktur. Fe, özellikle enzimler içinde oksido-redüksiyon katalizörü olarak ödev görür. İnsan organizmasında 4-5 gr bulunur ki bunun %4 hemoglobin yapısında yer alır. Sitokromlar, demir içeren flavoproteinler ve ferredoksin toplam demirin ancak küçük bir kısmını içerir.

Demirin özel depolanma şekilleri vardır. **Ferritin** (FeOOH)₈ ($\text{FeO} \cdot \text{PO}_4\text{H}_2$) olarak %23'e kadar demir tutabilir. Hemosiderin, demir (III) hidroksit jeli şeklinde protein ve diğer organik maddelere adsorplanmış olarak %35'e kadar demir içerir. Hemosiderin hücre içlerinde mikroskopla görülebilen granüller oluşturur ki demir depolama rahatsızlıklarında bu granüller çoğalırlar. Her iki depo şekli de özellikle dalak ve karaciğerde, ferritin ayrıca barsak sümüksü derisinde de bulunur. Demir kanda ferritin ile değil, iki Fe^{+3} atomu ile kompleks yapmış bir β -globulin olan demir transferrin ile taşınır. Bu şekilde bağlı demir ancak Fe^{+2} ye indirgenerek uzaklaştırılabilir ve mobilize edilebilir. Canlı organizmada (in vivo) bu işlem indirgen madde olarak askorbik asit ile gerçekleşir. Böylece eritrositlerde yeni hemoglobin sentezi için gerekli demir hazırlanmış olur.

Eritrositlerin ortalama ömrü 4 aydır. Günde 8-9 gr hemoglobin parçalanıp yeniden sentezlenmesi gerektiği hesaplanmıştır. Bu sırada demir dışarı atılmayıp vücutta alıkonulur. Böylece bir dolaşım tamamlanmış olur. Bununla beraber engellenemeyen kayıpları karşılamak için sürekli olarak demir alınmalıdır. Tavsiye edilen günlük demir alımı 0.2-0.3 mmol (11-17 mg) dür.

Hemoglobin molekülü 4 molekül oksijen alabilir. Oksijen hemoglobine tersinir olarak bağlanır. Oksijen bağlanmasıyla hemoglobinin üç boyutlu yapısı değişerek molekül küçülmektedir. Hemoglobinde bulunan demir, oksijen taşıyıcı veya taşımasının Fe^{+2} durumunda kalır. Eğer hemoglobin taşıdığı oksijen tarafından yükseltgenseydi, oksijen kullanılmış olduğu ve dokuların kullanması için, hemoglobinin görevi ortadan kalkmış olurdu. Bununla beraber hemoglobinin, oksijen molekülü dışındaki diğer yükseltgen ajanlar tarafından yükseltgenmesi söz konusudur; oluşan bu Fe^{+3} bileşiğine **methemoglobin** adı verilir ve bu bileşik oksijeni bağlayamaz. Alyuvarlarda hemoglobini Fe^{+2} durumunda koruyan, glutatiyona bağlı, güçlü bir redüktaz vardır. Örneğin Fe, ihtiva eden **Katalaz, sitokrom oksidaz** enzimlerinin prostetik grubudur. Büyüme ve gebelik sırasında özellikle Fe için gereksinimler artar.

Demirin vücutta iki görevi vardır ; "Hem" grubunun etkin bölgesi şeklinde:

1. Hemoglobinin görevi için gereklidir.
2. Sitokromların görevleri için gereklidir. Hemoglobin dönüşümü hızlıdır ve bunun sonucu olarak da vücuttan demirin atılması fazladır. Fazla kan kaybının olduğu durumlarda demir büyük önem kazanır. Demir eksikliği ise anemiye yol açar. Fazlalığı ise hemokromatoz'a sebep olur. Hemoglobin kan hastalıklarını (Anemi v.b.) incelemek bakımından önemlidir. Ayrıca kanın pH'sının ayarlanmasında önemli görevi vardır. Hemoglobinin Fe^{+3} taşıyan şekline Methemoglobin denir ve oksijen taşımaz. Eritrositin katı bölümünün yaklaşık 1/3'ü hemoglobindir.

Deneyin Yapılışı

Hemoglobin tayininde Siyanid belirteci kullanılır. Siyanid çözeltisi ise şöyle hazırlanır: 200 mg potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] alınır ve bir miktar suda çözüldükten sonra üzerine 50 mg potasyum siyanür(KCN) ilave edilerek litreye saf su ile tamamlanır. Elimizde hemoglobin satandırtı olmadığı için bu çalışmada faktör kullanılacaktır.

18 gr/dL Hb = 0.49 Absorbans değeri vermektedir.

Örnek Hb gr / dL = Örnek Abs / Standart Abs x Standart C eşitliğinde;

Standart derişimi (C) = 18

Standart Abs = 0.49 Buradan Faktör = Standart C / Standart Abs = 36.73

Örnek Hb gr/dL = Örnek Abs x 36.73 olur.

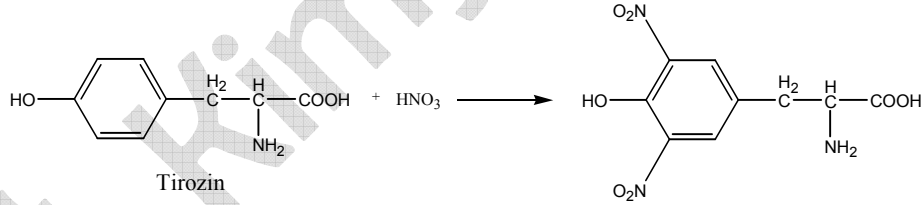
Bir (kör) ve iki nolu (örnek) olmak üzere iki deney tüpü alınır.

	1.nolu tüp(kör)	2.nolu tüp(örnek)
Siyanid çözeltisi	5 mL	5 mL
Çalışılacak Kan	-	0.05 mL(2 damla)

ilave edilerek vortekste karıştırılır. Oda sıcaklığında 3-4 dk bekletildikten sonra 545 nm'de Görünür Bölge Spektrofotometresinde kör ile sıfırlandıktan sonra okunur. Okunan Absorbans değeri faktörle çarpılarak kandaki Hb gr/dL olarak hesaplanır.

Ksantoprotein Deneyi

Aromatik aminoasitler (tirozin, triptofan, fenilalanin ve histidin) derişik nitrik asit ile muamele edildiklerinde sarı renkli, nitro türevlerine dönüşürler. Cilde derişik nitrik asit değdiğinde meydana gelen sararma da bu yüzdendir. Bu sarı renk alkali ortamda daha da koyu bir şekilde ortaya çıkar. Aynı zamanda yapılarında aromatik aminoasitleri taşıyan proteinler de bu reaksiyonda pozitif sonuç verirler.



Aromatik halka üzerine poli nitro grupları bağlanarak sarı renk oluşturur.

Deneyin yapılışı

Aminoasit veya protein çözeltilerinden 1'er ml ayrı ayrı deney tüplerine alınır. Üzerlerine birkaç damla derişik nitrik asit ilave edilerek ısıtılır. Isıtma işlemi sonunda tüpler soğutulur ve üzerine Derişik NaOH veya NH₃ çözeltileri eklenirse önceden oluşan sarı renk, portakal sarısına koyulaşır. Fenilalanin reaksiyona zor girdiğinden, nitrik asit yerine sülfürik asit kullanılmalıdır. Aromatik halka üzerindeki poli nitro grupları bağlanarak sarı renk oluşturur.

NOT= Bu deney çeker ocak içerisinde yapılmalıdır.

DENEY NO : 3. MONOSAKKARİTLER

Osazon oluşması

Yapılarındaki aldehit ve keton gruplarından dolayı indirgen özellik gösteren monosakkaritler, indirgen ve indirgen olmayan monosakkaritler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar.

Şekerlerde türevlendirilebilecek şu fonksiyonlu gruplar vardır. zincir şeklinde aldozlarda aldehit, ketozlarda keton grubu halkalı şekilde ise yarı asetal ve ketal OH'ı molekülün ucunda bir primer alkol grubu ve molekülün ortasında sekonder alkol grupları. Örneğin aldehit ve keton grupları H₂N-Z kondanzasyon araçlarıyla (hidroksilamin, hidrazin semikarbazit, fenil hidrazin..) kondenzasyon bileşikleri verirler. Aldozlar 1 eşdeğer fenil hidrazinle, fenilhidrazon verirler. Monosakkaritin yapısına iki tane fenil hidrazinin veya aşırısı aldozun ikinci karbon atomunu ketona yükseltir, bu da fenilhidrazinle yeniden kondenzasyon vererek **ozazon** meydana gelir.

Karbohidratların hidrolizi monosakkaritleri verir. Karbohidratlar poli hidrokşi bileşikler olduklarından kıvamlı çözeltiler verme eğilimindedirler. Dolayısıyla güç kristallenirler ve de kesin erime noktasına sahip değildirler. Ozazonlar ise, kolay kristallenen ve bu yolla kolay saflaştırılan ve kesin erime noktalarına sahip bileşiklerdir. Bu nedenle monosakkaritlerin teşhisinde çoğunlukla kullanılırlar. Ozazonlar mikroskop altında incelenerek farklı şekillerinden şekerin cinsi tayin edilmeye çalışılır. İdrarda saptanan indirgen şekerin laktoz veya glukoz olup olmadığının belirlenmesinde **ozazon** oluşturma yöntemi kullanılmaktadır.

Monosakkarit çözeltilisine çok az miktarda eklenen alkali mutarotasyona neden olmaktadır. Glukoz çözeltilisine oda ısısında Ca(OH)₂ ve Ba(OH)₂ gibi alkaliler eklendiğinde glukoz, bir süre sonra D-fruktoz ile D-mannoz'a dönüşmektedir.

Alkaliler ile ısıtılan şekerlerin rengi koyulaşmakta ve hafif bir karamel kokusu duyulmaktadır. İndirgen şekerler için genel bir tepkime olan ve Moor testi olarak bilinen bu tepkimede serbest hale geçen aldehitlerin polimerizasyonu ile reçineler oluşmaktadır.

Deneyin Yapılışı

4 deney tüpü alınır. Her bir deney tüpüne glukoz, galaktoz, maltoz, laktoz veya eldeki şeker çözeltilerinden herhangi birinden 3 ml alınır. Üzerine 5 damla fenilhidrazin, 0.5 veya 1 ml glasiyel asetik asit ilave edilir. Devamlı çalkalanarak kaynar su banyosunda 1 dk tutulur. Her bir tüpe % 10'luk NaOH'ten 6 damla kadar ilave edilir. Tüplerin içindeki maddeler hafif asit olmalıdır. Bu da turnusol kağıdı ile kontrol edilir.

Daha sonra tüpler kaynar su banyosuna bırakılır ve 30 dk ısıtılır. Şekerler içinde mannoz varsa ilk birkaç dk'da ozazon oluşabilir. Laktoz ve maltoz 60 dk'ya kadar değişen süreye ihtiyaç gösterir. 60 dk kaynatma sonunda tüpler çıkarılır ve oda sıcaklığında

soğumaya bırakılır. Altta oluşan kristaller mikroskopta incelenirse her şekerin kendisine ait tipik kristali görülür.

Orcin (Bial) Testi (Pentoz Belirleme Testi)

Bu deneyde serbest ve bağlı pentozlar gösterilebilir. Kuvvetli asitlerin etkisiyle pentozlardan furfural ürünleri oluşur. Fe^{+2} iyonlarının varlığında bu ürünler orcin veya Triton X-100 ile renkli bileşikler oluştururlar. Böylece pentozların tanınması mümkün olur.

Kullanılan Malzemeler

% 1'lik glukoz, sakkaroz, fruktoz, laktöz, maltoz ve ksiloz çözeltileri, amil alkol ve bial reaktifi (0.025 gr $FeCl_3$ saf suda çözülür, sonra litresinde 3 gr orcin bulunan HCl eklenir veya 1 gr orcin 0.1 gr $FeCl_3$, 100 ml % 37'lik HCl ile çözülerek hazırlanır. Orcin kullanılmadan hemen önce ilave edilirse daha iyi sonuç alınır).

Deneyin Yapılışı

1 ml şeker çözeltisine 2 ml bial reaktifi ilave edilir. Karıştırılır ve kaynar su banyosunda ısıtılır. Çözelti soğuk su altında aniden soğutulur ve tüpün kenarından amil alkol ilave edilir. Pentozların varlığında üstteki alkol fazında mor bir halka veya bazı durumlarda mavi-yeşil bir halka da görülebilir. Bu halkanın varlığı deneyin pozitif olduğunu gösterir. Bu deneyde pentoz yerine hekzozların kullanılması durumunda sarı-kahverengi renkler oluşur.

Molisch Deneyi

Şekerler derişik H_2SO_4 'le ısıtılırlarsa su kaybına uğrarlar. Daha hafif şartlarda yani biraz seyreltik H_2SO_4 'le ısıtılırlarsa kısmen sularını kaybederler, 3 molekül su ayrılmasıyla furfural ve bifurfural türevlerini oluştururlar. Furfural ve bunun türevleri fenollerle birleşerek renkli bileşikler oluştururlar. Bu özellik şekerlerin birçok kalitatif tayinlerinin esasını teşkil eder. Molisch deneyi karbonhidratlara özel genel bir deneydir. Karbonhidratlar ister saf isterse birleşmiş halde olsunlar Molisch deneyi ile müspet sonuç verirler.

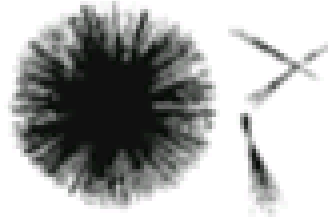
Reaktifler

1. Molisch reaktifi = 10 gr α -naftol, 100 mL etil alkolde çözülür veya 6 gr timol 100 mL etil alkolde çözülerek hazırlanır.

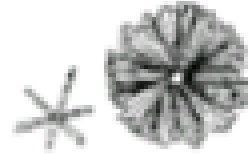
2. %1'lik glukoz, fruktoz, laktöz, sakkaroz, nişasta çözeltisi (eğer elimizde bunlar yoksa üzüm, elma, şeker pancarı ve havuç gibi meyveler ince doğranarak kaynatılır ve sonra süzülerek süzüntü kısmı şeker çözeltisi olarak kullanılabilir)

Deneyin Yapılışı

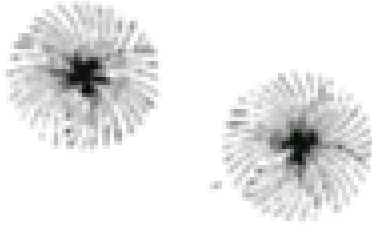
Şeker çözeltilerinin herbirinden 1 veya 2'şer mL deney tüplerine alınır. Sonra her tüpe 3-4 damla molisch reaktifi ilave edilir. Tüp kuvvetlice çalkalanır ve tüpün kenarında 45 derecelik açı ile derişik H_2SO_4 eklenir. İki sıvının değme yüzeylerinde mor bir halkanın oluşması deneyin pozitif sonuç verdiğini gösterir.



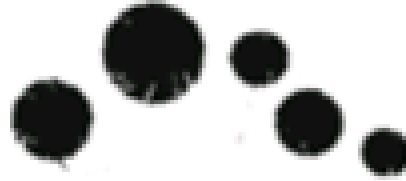
Glukozun
(İğn. 10'ya yakın damla)



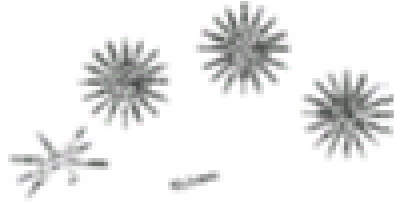
Früktozun
(İğn. 10'ya yakın damla)



Arabinozun
(İğn. 10'ya yakın damla)



Laktozun
(İğn. 10'ya yakın damla)



Maltozun
(İğn. 10'ya yakın damla)



Sükrözün
(İğn. 10'ya yakın damla)

DENEY NO : 4. GLUKOZ TAYİNİ VE SELİVANOF DENEYİ (Ketoş Şekeri Belirleme)

Karbonhidratlar genel olarak C, H ve O elementlerinden oluşmuş bir yapıya sahiptirler. Genel formülü $C_nH_{2n}O_n$, $C_n(H_2O)_n$ dir. Karbonhidratlar polihidroksilli alkollerin aldehit veya ketonlu türevleri (monosakkaritler) bunların polimerleri (oligo ve polisakkaritler) oksidasyon ürünleri (şeker asitleri), redüksiyon ürünleri (şeker alkoller), sübstitüsyon ürünleri (amino şekerler) ile sülfatlı ve fosfatlı esterleri olarak tarif edilebilir.

Üzümde ve meyvelerde çok bulunan, üzüm şekeri (glukoz) , meyve şekeri (fruktoz) önemli polisakkaritlerdir. Karbonhidratlar, besinlerle alındıktan sonra sindirim kanalında kendini oluşturan basit şekerlere parçalandıktan sonra emilirler. Organizmanın en kolay kullandığı karbonhidrat glukozdur.

Vücuda alınan besin maddelerinin %60'ına yakını karbonhidratlı gıdalardan oluşur. Karbonhidratlar, pankreas ve ince bağırsaklardan salınan enzimlerle monosakkaritlerle parçalanırlar ve sonunda ince bağırsak mukozasından absorbe edilirler.

Beyin başta olmak üzere, alyuvarlar, testisler, epidermis, lens, böbrek medulası, ovaryumlar gerekli enerji ihtiyaçlarını ancak glukozdan sağlayabilirler. Bu dokulardaki özelleşmiş hücreler yakıt olarak ancak glukozu kullanabilirler.

Bu hücreler yağlardan ve diğer enerji sağlayan maddelerden yararlanamazlar. Glukoz metabolizmasından kaynaklanan 2 önemli bozukluk; 1. Aşırı şişmanlık 2. Diabet (Metabolik şeker hastalığı). Bu hastalıklara bağlı birçok önemli medikal problemlere; ateroskleroza, hipertansiyona küçük vazal hastalıklara ve körlüğe neden olurlar. Kanda glukoz düzeyi açlık kanında 70-120 mg arasındadır. Yemeklerden sonra ise 160 mg'a kadar yükselir. Kan glukozunun normal değer üzerinde yükselmesine **hiperglisemi**, normal değer altına düşmesine ise **hipoglisemi** denilmektedir.

Glukoz deneyinin yapılışı

Glukoz tayininde o-toluidin reaktifi kullanılır. **Hazırlanışı ise** ; 0.56M o-toluidin üzerine 2 gr tiyoüre katılarak 16.4M glasiyel asetik asitle 500 ml'ye tamamlanır (Oda sıcaklığında saklanır).

Glukoz / Üre Standartı: 50 mg glukoz - 25 mg üre bir miktar etil alkolde çözülür ve 0.16 M benzoik asit ile 50 ml'ye tamamlanır.

Not : Burada su kullanılmayacak su yerine etil alkol kullanılacaktır.

Deney yapmak üzere numaralanmış üç deney tüpü alınır.

	1.nolu (kör)	2. nolu (örnek)	3. nolu (standart)
Saf su	0.1 ml	-	-
Serum örneği	-	0.1 ml	-
Standart glukoz çöz.	-	-	0.1 ml
o-toluidin	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml

ilave edilerek vortekste karıştırılır. Su banyosu içerisinde 5-6 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulur. Görünür Bölge spektrofotometresinde 620 nm'de kör ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır.

Hesaplama

$$\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times 100 = mg/100ml \quad \text{şeklinde olur.}$$

Selivanof Deneyi

Monosakkaritler seyreltik mineral asitlere karşı dayanıklıdır. Derişik asitler ise monosakkaritlerden 3 molekül su ayırır, dehidratasyon sonucu monosakkaritler furfurallere (furan aldehit) dönüşür. Bu deney fruktoz aramada kullanılır. Ketoheksozlar, derişik HCl'e karşı aldoheksozlardan daha duyarlıdır. Bu nedenle fruktoz, glukozdan daha çabuk furfural'e dönüşür.

Selivanof Deneyinin yapılışı

Bu deneyde Selivanof reaktifi kullanılır. Bu reaktifin hazırlanışı ise; 0.5 gr resorcin 100 mL %25 lik HCl de çözülerek hazırlanır. Numaralı deney tüplerinin bir tanesine 1 mL su diğerlerine ise % 1 lik değişik şeker çözeltilerinden 1 er mL alınır. Her bir tüpün üzerine 2 mL selivanof reaktifi ilave edilir. Tüpler su banyosunda 1-2 dk bekletilir. Bu süre sonunda tüplerdeki renk değişimleri kaydedilir. Daha sonra deney tüpleri 5 dk daha su banyosunda bekletilerek renk değişimleri gözlenerek kaydedilir. Ketoz şekerleri bu deneyde portakal kırmızısı renk verirler. Ayrıca mikroskop ile de incelenebilirler.

DENEY NO : 5. TOPLAM PROTEİN TAYİNİ

Büyüme, gelişme için gerekli besinlerin başında proteinler gelir. İnsan plazmasındaki total protein konsantrasyonu yaklaşık 6.0-7.8 gr/dL kadardır. Vücudun bütün hücrelerinin büyük bir bölümü, ayrıca vücudun metabolik reaksiyonlarını katalize eden ve denetiminde görev alan enzim ve hormonların yapısında proteindir.

Vücut proteinlerinin oluşumu için kaynak, besinlerin içinde bulunan proteinlerdir. Proteinler hidrolize edilerek parçalandıklarında daha basit yapıdaki aminoasitlere ayrılmaktadırlar. Böylece proteinleri, çok sayıda ve çeşitli amino asitlerin birleşmesinden oluşan bileşikler olarak tanımlamak mümkündür. Sinir sisteminde belirli aminoasitlerin impulsların iletisi ile alakalı olduğu görülmektedir. Örnekleri glisin ve glutamik asitlerdir. Vücudumuz esansiyel amino asitleri sentez edemediğinden büyümeyi desteklemek ve sağlıklı oluşu sürdürmek için yeteri miktarda diyetle sağlanmalıdır. Tıpta önemi olan bir çok bileşik aminoasit metabolizmasında meydana gelir.

Aminoasidin hücre içine taşınmasındaki anormallikler bazı hastalıklara neden olur. Bunların birçoğu, idrarda aşırı artmış miktarda bir veya birden fazla aminoasit bulunuşu ile karakterize edilir ve bu nedenle bunlar sıklıkla amino asidürler olarak anılır.

Total protein - Biuret metodu

Reaktifler

1. 6 M NaOH: 240 gr NaOH Lt 'ye tamamlanır.
2. Biuret ayırıcı : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 3 gr 500 ml saf suda çözülür. Üzerine 9 gr K-Na-tartarat eklenir. ve çözüldükten sonra 5 gr KI ilave edilir, 100 ml 6 M NaOH ilave edilir ve saf su ile litreye tamamlanır (oda sıcaklığında saklanır).
3. Biuret Ayıraç Körü; oda sıcaklığında saklanır. 9 gr K-Na tartarat, 5 gr KI suda çözülür ve 100 ml 6 M NaOH eklenir, saf su ile litreye tamamlanır.
4. Standart iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 3 dk bekletilir. Sonra Görünür Bölge spektrofotometresinde 540 nm'de kör ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır. Standart protein yoksa; 8 gr protein / dL = 0.40 absorbans olarak alınır.

İşlem	Kör (ml)	Standart(ml)	Serum örneği (ml)
Biuret ayırıcı	5	5	5
Ayıraç Körü	0.1	--	--
Standart	--	0.1	--
Örnek(serum)	--	--	0.1

Hesaplama:
$$\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart Konsantrasyonu} = \text{gr Protein}$$

DENEY NO : 6. ALBUMİN TAYİNİ VE SÜTTE KAZEİN'İN AYRILMASI

Albumin insan plazmasının ana proteini olup yaklaşık 69000 civarında olan moleküller bir ağırlığa sahiptir. Total plazma proteinin %60 kadarını kapsar. Albuminin % 40 kadarı plazmada geri kalanı ekstrasellüler mesafede mevcuttur. Karaciğer günde 12 gr kadar albümin üretir. Bu miktar karaciğerde sentezlenen total proteinin %25'ini salgılayan tüm proteinin de yarısını gösterir. Suda ve sulu elektrolitlerde erir, ısı ile koagüle olurlar. Tuz çözeltilerinde erirler. Hayvansal kaynaklı bütün albüminler yarı doymuş amonyum sülfat çözeltilerinde erirler. Albüminler daha ziyade hayvansal sıvılarda bulunurlar. Birçok Albümin bilhassa yumurta albümini ile serum albümin, laktalbumin, ovalbumin, kristalbumin, antitrombin ve insülin bunlara örnektir. Albüminin başlıca biyolojik fonksiyonları arasında çeşitli ligandları taşımak ve depolamak, endojen aminoasitler için kaynak görevi yapmak ve plazma onkotik basıncının devamını sağlamaktır. Albümin ve globülinler hücre ve vücut sıvısının su oranını düzenlerler. Albümin eksikliği karaciğer hastalığının belirtisidir. Albüminin diğer önemli görevi de muhtelif ligandları bağlamasıdır.. Albümin plazma düzeyi diyet ile alınan proteinlere bağlı olduğundan, beslenme durumunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Albümin düzeyinin belirlenmesi tedavi ve tedavinin izlenmesinde de oldukça önemlidir. Albümin serum ve plazma değerleri Normal değerleri 3.5-5.5gr/dl (SI 33-55gr/l) arasındadır

Reaktifler

1. Brom krosel yeşili = 0.146 gr
2. Sitrik asit = 8.1 gr
3. Trisodyum sitrat dihidrat = 17.1 gr/l
4. Sodyum azid = 0.125 gr bunların hepsi alınarak üzerine % 1'lik triton x-100 çözeltilisinden 50 mL katılarak tüm çözelti hacmi saf su ile 1 lt'ye tamamlanır. Bu arada pH ayarı 4.6-4.7 yapıldıktan sonra sarı renkli çözelti koyu yeşil renge döner ve bu şekilde reaktif çözeltisi hazırlanmış olur.

Deneyin yapılışı

Üç tane numaralı tüp alınır. **(0.05 mL = yaklaşık iki damla)**

	1.nolu tüp (kör)	2.nolu tüp(standart)	3.nolu tüp(örnek)
Saf su	0.05 mL	-	-
Standart	-	0.05 mL	-
Örnek (Serum)	-	-	0.05mL
Reaktif	3 mL	3.0 mL	3.0 mL

katılarak vortekste karıştırılır. Görünür Bölge spektrofotometresinde 630 nm'de kör ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır. Albümin standardı elimizde olmadığı için 5gr albümin/dL = 0.21 absorbans değeri okunduğu kabul edilecektir.

Hesaplama

$$\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times 5 = \text{gr Albümin} \dots \text{olur}$$

Sütten Kazeinin ayrılması

Kazein sütün en önemli proteini olup, alfa beta, gamma ve kappa olarak 4 ayrı şekilde bulunur. Yapısında fosfor ihtiva eden kazein, yukarıdaki 4 şeklin heterojen bir karışımıdır.

Deneyin yapılışı

25 ml süt 75 ml musluk suyu ile seyreltilir. 30 dakika içinde %2 lik HCL'den 4-5 ml yavaş yavaş ilave edilerek pH=4.8'e getirilir (burada pH metre kullanılacaktır). Daha sonra 10 dk. Karıştırılarak, yarım saat süreyle çökelmeye bırakılır veya santrifüj edilir. Çökelek çözelti ayrıldıktan sonra çökelek destile su ile 50 ml'ye tamamlanarak yıkanır ve süzülür. Ayrılan kazein büyükçe bir buchner hunisinde 2 tabaka süzgeç kağıdı kullanılarak süzülür bu işlem çökelek hafif kuruyuncaya kadar devam edilir. Sonra çökelek bir behere alınarak üzerine 10-15 ml saf su ilave edilerek karıştırılır. Çökelek, çözelti süzülerek ayrılır ve çözeltide klorür iyonu olup olmadığı %1 lik AgNO₃ çözeltisi ile kontrol edilir.

Eğer kazein saf hale getirilerek kurutulacaksa şu işlemlere devam edilir.

Süzüntüde klorür kalmayınca kadar yıkama işlemine ve süzüntünün %1 lik AgNO₃ çözeltisi ile kontrol işlemine devam edilir.

◆ Kazein tortusu 7.5 ml %95'lik etanole alınarak karıştırılıp süzülür ve bu işlem iki kez tekrarlanır. Aynı şekilde çökelek iki kez de 7.5 ml'lik eter çözeltisine alınıp süzülür ve kurutulur.

NOT= Saflaştırma kısmının yapılmasına gerek yoktur.

DENEY NO : 7. AMİLAZ TAYİNİ

Besin maddeleri ile alınan nişasta, dissakkaritler ve glikojen gibi karbonhidratlar, vücudun enerji gereksiniminin karşılandığı en önemli kaynaklardır. Ağızda çiğneme sırasında tükürük amilazı ile karışan nişasta, kısmen hidroliz olmaktadır. Tükürük amilazının etkisi midenin asidik ortamında sonlanmaktadır. Daha sonra etkili olan pankreas amilazının, tükürük amilazı ile bazı ortak özellikleri bulunmaktadır. Kısaca karbonhidratları parçalayan ana enzim amilazdır α ve β olmak üzere ikiye ayrılır. Her ikisi de nişasta ve glikojenin $\alpha(1-4)$ glikozidik düz zincirli bağlarını hidrolize ederek parçalarlar. Bu enzimlerin etkisi amilopektindeki $\alpha(1-6)$ glikozidik bağa gelince durur. Amilopektinin dallanma noktasında bulunan $\alpha(1-4)$ glikozidik bağları $\alpha(1-4)$ glikozidaz enzimi tarafından kırılmaktadır. Glikojende bulunan $\alpha(1-4)$ bağları limit dekstrin'e kadar α ve β -amilaz enzimleri tarafından yıkılmakta ve glukoz ve maltoz meydana gelmektedir. Dallanma noktasındaki $\alpha(1-6)$ bağı ise, $\alpha(1-6)$ glikozidaz enzimi tarafından hidrolize edilir. Bunlardan α -amilaz hayvansal, β -amilaz ise bitkiselidir. α -amilaz (diastaz) insan ve pek çok hayvanın tükürük bezi ve pankreası tarafından salgılanır. Fakat serum ve idrarda da çıkar. Amilaz glikojenin dokularda yıkılmasında rol oynamaz. α -amilaz pankreasta salgılanmaktadır. Bu enzimin serumda bulunması pankreasta bir rahatsızlık olduğunun belirtisidir. Plazma amilaz düzeyi, karaciğer hastalığında düşük olabilir. Aşırı barsak tıkanmasında, parotitis ve diyabet te ise plazma amilaz düzeyi yükselmiş olabilir. Pankreatik hastalıklarda α -amilaz enzimi serumda artmaktadır.

Serum'da 250-2800 U/L ve idrar'da 8000 U/L'ye kadar bulunur.

Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanması

1- Nişasta : 0.1 gr veya 100 mg saf nişasta tartılır ve 400 ml bir beherde 5ml saf su ile süspansiyon haline getirilir üzerine 30 ml kaynar distile su ilave edilir ve iyice karıştırılır. Bu çözelti hafif opalesans göstermelidir. Bulanıklık olduğu takdirde yeniden hazırlanmalıdır. Soğumaya terk edilir. 100ml'lik balon jöjeye aktarılarak 100ml tamamlanır (**Polietilen şişede soğukta saklanır. Kullanmadan önce iyice karıştırılmalıdır.**)

2. Tampon: (100 ml için; 1.938 Tris (hidroksimetil) aminometan [$C_4H_{11}NO_3$] suda çözülür ve üzerine 0.497gr NaCl eklenir ve iyice çözüldükten sonra 100ml ye tamamlanır. PH=7,5 olmalıdır. **NOT= 15-25°C'de Polietilen şişede saklanmalıdır.**

[Tris (hidroksimetil) aminometan'ın molekül ağırlığı =121.14 gr/mol dür.]

3- Renk Ayırıcı: (100 ml için);0.01494gr KI suda iyice çözüldükten sonra üzerine 0.01269 gr iyot eklenerek iyice çözüldükten sonra 100mL'ye tamamlanır.15-25⁰ C'da saklanır. 1/200 oranında su ile seyreltilerek kullanılır. Bu son çözelti 1 ay oda ısısında bekletilir. **Koyu renkli şişede saklanır.**

4- 0.5 M HCl gereği kadar hazırlanır ve titrasyonla ayarı yapılır.

Not : Serum ve tükürükte amilaza bakılsın.

İşlem:

	Kontrol	Örnek
Örnek(Tükürük veya serum)	0.1ml	0.1 ml
Hidroklorik Asit	0.5 ml	---
Tampon	1.0 ml	1.0 ml
Nişasta	1.0 ml	1.0 ml
Hidroklorik Asit	---	0.5 ml
Renk ayırıcı	5.0 ml	5.0 ml

iyice karıştırılır ve 37⁰ C'da su banyosunda 20 dk bekletilir. Su banyosunda çıkarılan tüplerin oda ısısına gelmesi için 10 dk bekletilerek Görünür Bölge spektrofotometresinde 580 nm'de saf su (kör) ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır.

Hesaplama:

$$\frac{\text{Kontrol Ölçüm Değeri} - \text{Örnek Ölçüm Değeri}}{\text{Kontrol Ölçüm Değeri}} \times 15.500 = \text{U/L}$$

F.Ü. Kimya Bölümü

DENEY NO : 8. SERUMDA Na, K, Ca TAYİNİ

İnsan, hayvan ve bitki organizmasını oluşturan organik maddeler ve anorganik maddeler belirli bazı elementlerden yapılmıştır, ki bunlara **Bioelementler** denir.

Başlıca bioelementler şunlardır ; C, H, O, N, S, P, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cl, I, Co, Mn, Mo, Br, F, Zn, Cu gibi. Bütün bu elementlerin ilk ve esas kaynağı doğadaki anorganik maddelerin elementleridir. Yalnız ve yalnız, bitkiler tarafından, bu anorganik maddeleri C, H, O, N, P, S... vb. gibi elementler, karbonhidrat, protein, lipit gibi organik maddelere çevrilmiş olur ve bitkilerden de insan ve hayvan vücuduna alınırlar.

İnsanlar ve hayvanlar normal bir büyüme ve çeşitli biyolojik fonksiyonlar için besinler arasında vitaminler yanında inorganik elementlere de ihtiyaç duyarlar. Anorganik elementler vücuttaki normal metabolizma olayları için gerekli olup, besinlerle alınmaları şarttır çünkü vücutta yapılamaz yani sentez edilemezler.

Periyodik cetveldeki elementlerden yaklaşık 70-80 tanesine insan vücudunda rastlanmasının mümkün olacağı belirtilmiştir. Bu anorganik elementleri bol bulunan elementler ve eser elementler diye ikiye ayırmak gereklidir.

Bol bulunan elementler Ca, Mg, Na, K, P, S ve Cl'dür. Bu elementlere ihtiyaç fazladır ve genellikle günlük dozlar gramlarla ifade edilecek kadardır. Birçok element insan ve hayvan vücudunda çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Bugün bu elementlerin konsantrasyonları uluslararası kullanılan birimde "partper milion"(ppm) olarak verilirler.

1 ppm = $1/10^6$ veya $1\mu\text{g}/\text{gr}$ canlı kütle, $\text{mg}/100\text{ml}$ birimi ile de verilebilir. Vücutta ppm düzeyinde bulunan ve enzim faaliyeti için esas olanlara ise **eser elementler** denir. Eser elementlerin vücutta aşırısının toksik etkisi vardır. Hayati önemi olan eser elementler ise organizmada belirli fonksiyonlara sahiptirler. Aşırı miktarda alınmaları veya organizmada birikmelerinin hayatı tehdit edebileceği gerçeği bu eser elementler içinde geçerlidir. Eser elementlerin pek çoğu ya kofaktör veya prostetik grup olarak görev yapmaktadır. Temel elementler aşağıdaki üç yoldan biri ile enzimatik reaksiyonlarda etkili olmaktadır.

1. Temel element enzim tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonun yapısında yer alır ve enzimin reaksiyon hızını artırır. Bu yargı özellikle demir ve bakır için doğrudur.
2. Temel element substrat veya enzimin aktif merkezi ile kompleks yapar ve bu durumda her ikisi de aktif hale dönüşür.
3. Temel element bazı hallerde katalitik faaliyetin herhangi bir safhasında elektron alan ajan olarak vazife görmektedir. Aktivite için metal iyonlarına ihtiyaç duyan enzimlere metaloenzimler adı verilmektedir.

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına **Kofaktör** adı verilmektedir. Enzimlerin aktivite göstermek için gereksinme duyduğu kompleks organik moleküllere **Koenzim** adı verilmektedir. Bazı hallerde enzim aktivite göstermek için hem kofatöre ve hem de koenzime ihtiyaç duyabilir. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktör ve koenzimler enzime gevşek veya sıkı bağlıdır. Genellikle diyaliz ile enzimden ayırmak mümkündür. Kofaktör ve koenzimler bazen enzime kovalent olarak bağlanmış olup

diyaliz ile ayrılması mümkün olmaz. İşte enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış protein yapısında olmayan bu gruplara **Prostetik grup** denir. Eğer enzim koenzimi veya kofaktörü ile birlikte katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise enzimin bu haline **Haloenzim** adı verilir. Eğer koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin diyaliz edilemeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif şekline ise **Apoenzim** adı verilir.

KALSİYUM

Özellikle besinlerdeki kalsiyumun resorpsiyonu kısmen gerçekleştiğinden besinler ile her zaman yeterli miktarda kalsiyum sağlanamaz. Büyük bir depo olan kemikler kalsiyum metabolizmasında önemli rol oynarlar. Tüm sistemlerde Ca^{+2} bir anahtar düzenleme rolü oynar. Örneğin Kalsiyum kemiğin yapısal elementidir. Kalsiyum hidroksiapatit halinde de bulunmakta ve yapısı $[Ca_3(PO_4)_2].Ca(OH)_2$ şeklindedir. Kalsiyum hücre sitoplazmasında serbest halde önemli düzenleyici faktör olarak da rol oynamaktadır. Hücre içindeki konsantrasyonu $10^{-6}M$ dan daha fazladır. Ca vücutta en büyük miktarda bulunan katyondur. Plazma Ca^{+2} düzeyi normalin altına düştüğünde kemikteki Ca^{+2} dolaşımdaki Ca^{+2} 'a geçer ve dolaşımdaki Ca^{+2} artırılarak yeni kemik oluşumu engellenir. Gerçekten 70 kg'lık bir yetişkinde 1200 gr kadar Ca bulunur. Ca'un %99'u kemiktendir. Kaslarda ise ancak %70 mg, sinir sisteminde ise %15 mg kadardır. Serumda ise %9-10 mg kadar Ca bulunur. Plazmadaki Ca düzeyi çok dar sınırlar içinde bulunur. Bu sınırlar %9.2-10.4mg arasındadır. Ca düzeyinin bu sınırın altına düşmesine Hipokalsemi ve 10.4mg'ın üzerine çıkmasına da **Hiperkalsemi** denilir.

Hiperkalsemi halinde ise sinirsel uyarımlar yavaşlar, bunun sonucu olarak ta kaslar tembelleşir neticede iştahsızlık ve kabızlık görülebileceği gibi ileri hallerde kemiklerde aşırı derecede Ca birikimi olur. Ca'un %50 kadarı plazma proteinlerine bağlı halde bulunur. Bu nedenle kapiler zarlarından geçemez ancak küçük moleküllü maddelerle bağlı bulduklarından zarlardan geçebilirler. Geriye kalan Ca ise serbest ve iyonize Ca halinde olup Ca^{+2} kapilerlerden kolaylıkla difüzyona uğradıkları için organizmada Ca ile ilgili görevler Ca^{+2} tarafından yerine getirilir. Ca idrar ve dışkı ile atılır.

Ca kapiler ve hücre duvarlarının geçirgenliği üzerine etkilidir. Bundan başka ; lipaz, ATP ase, süksinik dehidrogenaz gibi bazı enzimlerin aktivatörüdür. Kalp ve kas-sinir sisteminin uyarılma yeteneğini azaltır ve dengede tutar. Kas kasılması ve sinir impulsunun taşınması içinde gereklidir. Ca^{+2} , kan ve hücrelerde azaldığı zaman **tetani** görülür(tetani : sinirsel uyarımların şiddetlenmesi)

Kandaki kalsiyumun bir kısmı serbest, difüzlenebilir iyon şeklinde kalanı ise proteine bağlı olarak bulunur. Bu tür tuzlar ara sıra idrar yollarında böbrek ve mesane taşlarını oluştururlar. Ca^{+2} iyonu birçok hayati fonksiyonu yerine getirir. Kasların uyarılabilmesi ve kontraksiyonları için aktivatör olarak gereklidir ve kan pıhtılaşmasında önemli bir rol oynar.

Kalsiyumun üç ana görevi vardır ;

1. Kas kasılması için gereklidir.

2. Fosfat ile birlikte Ca^{+2} , kemiğin ana bileşenidir.

3. kan pıhtılaşması için gereklidir. Yüksek miktarlarda Ca^{+2} bulunduğu zaman toksiktir ve K^+ gibi kalbin çalışmasını yavaşlatır. Kan dolaşımındaki Ca^{+2} 'un fazlalığı ve eksikliği arasındaki denge çok duyarlı olduğundan Ca^{+2} derişimi, parathormon ve kalsitonin olarak bilinen iki hormonun birbirine zıt etkisi ile denetlenir. Ca eksikliği ile Osteoporoz, raşitizm, böbreksel raşitizm, Hiperparatiroidsel kemik kireçlenmesi gibi hastalıklar oluşabilir.

SODYUM

Sodyum (Na^+) her ne kadar yiyecek maddelerinde yaygın olarak bulunursa da temel besinsel kaynak, yemek pişirmede ve yemeğe tat vermede kullanılan sofrata tuzu ($NaCl$)'dür. $NaCl$ 'ün beslenme ile tüketimi büyük ölçüde kültürel ve bireysel yeme alışkanlıklarına bağlıdır. A.B.D.'de günde erişkinler tarafından 5-15 gr $NaCl$ tüketilirse de alınan bu miktarın %90-95'i idrarla atılır. Sodyum vücut sıvılarında en yoğun şekilde bulunan elementtir. Doğada $NaCl$ şeklinde yaygın halde bulunduğu vücut yemeklere ilave edilen tuzla sodyum ihtiyacını kolaylıkla karşılar. Tuzun fazlası yine $NaCl$ şeklinde çok büyük ölçüde idrarla, daha az olmak üzere de ter ve dışkı ile dışarı atılır. Günlük $NaCl$ ihtiyacı 3 gr civarındadır. Normal kişilerde metabolizma için gerekli olan Na miktarı birkaç yüz mg'dan ibarettir. Ancak kan basıncı yüksek olan kişilerde $NaCl$ alımı yeterince sınırlandırılmalıdır. Bu sınır 1 gr civarındadır.

Na , vücutta özellikle hücre dışı (damar içi ve hücreler arası) sıvılarda iyon olarak bulunur. Plazmada %320 mg kadardır. Na kan plazması dışında ve tuz halinde bir miktar da kemiklere yerleşmiş halde bulunur. Gereğinde organizma kemikteki bu Na 'dan da yararlanabilir. Hücre ve doku hücrelerinde ise pek az olup örneğin eritrositlerde %20 mg kadardır. Organizmadaki Na miktarının ancak 2/3'ü değiştirilebilir durumdadır 1/3'ü ise kemikte bağlı olduğu için değişmez. Na ekstraselüler sıvının temel katyonu (Na^+) olup Cl^- ve HCO_3^- ile beraber asit-baz dengesinin düzenlenmesini sağlar. Sodyum (Na^+) aynı zamanda vücut sıvılarının osmotik basıncının sürdürülmesinde ve böylece aşırı sıvı kayıplarına (su kaybına) karşı korunmada da önemlidir. Kasın normal uyarılmasını ve hücrenin geçirgenliğini korur. Kanın osmotik basıncının sağlanması ve korunmasında Na^+ konsantrasyonunun büyük önemi vardır. β -galaktozidaz ve β -amilaz enzimleri Na tarafından aktive edilir. Sinir ve kas fonksiyonunun Na^+/K^+ ATP ase düzenleyicisidir. Kan sodyumu düzeyinin ayarlanması başlıca ACTH (adrenokortikotropik hormon) hormonunun etkisi altında olur. kanda Na düzeyinin normalin üstüne çıkmasına **hipernatremi** altına düşmesine ise **hiponatremi** denilir. Adrenokortikotropik hormon (ACTH) özellikle böbrek üstü bezinin korteks kısmında salgılanır. Bazı bireylerde Na^+ alımı ile kan basıncı arasında belirgin bir ilişki vardır. Böylece, sodyumun $NaCl$ halinde aşırı ve gereksiz alımı hipertansiyona yol açabilir veya önceden var olan hipertansiyonu şiddetlendirebilir. İdrarla Na^+ atılışı, alınan Na^+ durumuna göre böbrekler tarafından oldukça doğru olarak kontrol edilir. Bu sayede ekstraselüler bölgedeki konsantrasyon sabit tutulur (135-140 mmol/l). $NaCl$ -geri resorpsiyonu böbrek üstü bezleri tarafından hormonal olarak ayarlanır.

Bununla beraber, ter kayıplarını karşılamak üzere günde 4 Lt'den fazla su alındığında fazladan NaCl sağlanmalıdır. Yüksek ısı ile ve aşırı terleme ile uzun süre karşı karşıya kalındığında, terdeki Na⁺ kaybı, aldosteron ile ilgili adapte edici bir olay ile en aza indirgenecektir. Her ne kadar ekstravasküler (Na⁺) intravasküler (plazma) (Na⁺) ile bir denge halinde ise de bu ikincisinin konsantrasyonu toplam vücut (Na⁺) depolarını yansıtmayabilir. Buna göre, düşük serum (Na⁺) (hiponatremili bir hastada vücut Na⁺ 'unda bir tükeniş bulunmayıp bunun yerine aşırı miktarda intravasküler belki de ekstravasküler su bulunabilir. Benzer şekilde eğer su noksanlığı varsa düşük veya normal vücut Na⁺ içeriği olduğu halde serum Na⁺ 'u artmış (hipernatremi) olabilir. Böbrek hastalığında Na⁺ tutma yeteneği sıklıkla kaybolur ve ağır NaCl, K ve su dengesi bozuklukları ortaya çıkabilir. Farelere uzun süre fazla miktarlarda tuz verilirse, büyük ödem oluşumu, hipertansiyon, lipemi, kan proteini azalışı, anemi ve üremi görülür ve sonunda ölümler (**Lipemi** : kanda aşırı yağ birikimidir). Organizmaya çok az tuz verilirse önce idrarla çıkması azalır. Bu önlem yetmezse, organizmadaki genel miktarı da azalmağa başlar. Azaltılma durumu çok uzun sürdürülürse kemik ve kıkırdakta belirli bozukluklar görülür.

POTASYUM

Potasyum (K⁺), intraselüler yani hücre içi sıvısının temel katyonudur. Buna bağlı olarak, besinsel (K⁺) un temel kaynağı yiyecek olarak tükettiğimiz hücresel materyaldir. Ağır protein kalori yetersizliği hariç, bir besinsel eksiklik olağan dışı ve enderdir. (K⁺), içinde bulunduğu kütle ile orantılı olarak ince bağırsaklarda kolaylıkla absorbe edilir ve plazmada dolaşıma katılır. Ekstravasküler sıvıdaki (K⁺) vücuttaki tüm dokulara yayılır ve özellikle depolarizasyon ve kalbin kasılmaları olmak üzere bazı organların fonksiyonlarını derinden etkileyebilir. K vücutta özellikle doku hücrelerinde bulunur. Örneğin eritrositlerde %420 mg kadardır buna karşılık plazmada %20 mg kadardır. Kaslar ve karaciğer gibi doku hücrelerindeki K kolayca yenilenir. Beyin ve eritrositler gibi bazı organlarda ise oluşumundan yıkımına kadar sabit kalır. ⁴²K izotopu ile yapılan çalışmalarda K'un girebildiği dokularda çok yavaş dağıldığı ve dengeye ise birkaç günde gelebildiği gözlenmiştir. K normal kişilerde kas aktivitesine etkilidir yani kas sinir sistemini uyarma yeteneği olan bir maddedir. Gerçekten kana çok miktarda K enjekte edilirse **tetani** görülür. Kandaki miktarı çok azalır, çizgili kaslarda felçler ve kalp kasında bozukluklar görülebilir. Hücre içinde asit-baz dengesine, ozmotik basınca, su tutulmasına, türlü metabolizma reaksiyonlarına etki eder. Aktivatör olarak birçok enzime yardım eder. K⁺ bazı metabolik reaksiyonlar için şarttır örneğin fosforilasyonlar gibi. Karbamoil fosfat sentetaz ile piruvat kinaz enzimleri K tarafından aktive edilirler.

Doku hücrelerinin fazlalaşmasını sağlayıcı bir etkisi ve birde diüretik (idrar artırıcı) etkisi bilinmektedir. Kanda K düzeyinin azalmasına **Hipokalemi** denilir ve K⁺ eksikliği kas yumuşaması ve letarjiye sebep olur. Kanda K düzeyinin artmasına ise **Hiperkalemi** denilir ve kalbi durdurucu etkisi vardır.

Na ve K organizmada karakteristik olarak dengesiz biçimde dağılmışlardır. Na^+ , hücre dışı sıvılarda ve özellikle intersitisyel bölgelerde K^+ ise, hücre içinde yoğun olarak bulunur. Hücre içinde oldukça fazla osmotik-etkin madde bulunduğu için hücredeki K^+ konsantrasyonu ekstraselüler Na^+ konsantrasyonundan daha düşüktür. Aksi takdirde osmotik denge olmazdı. Bazı organların (sinir, kas) fonksiyonlarının temeli bu dengesiz dağılıma dayanır. Bu nedenle idrardaki Na^+/K^+ oranı böbrek üstü bezlerinin fonksiyonları hakkında bilgi verir. Normal beslenme ile günde ortalama 100 mmol K^+ alınır. Hepsi resorplamayıp %5-10'u feçesle kalanı da böbreklerden dışarı atılır. Böbreklerdeki geri resorpsiyon şiddetli K^+ noksanlığında bile tam değildir. K^+ atılımı aldosteronun kontrolü altındadır. Böbrek (Na^+)'u koruduğu etkinliğe yakın (K^+) koruması yapamaz.

Deneyin Yapılışı

Serumda Na tayini için; 5, 10, 25, 50 ve 75ppm'lik stok Na çözeltileri hazırlanır. Alev fotometresinde sensivite 2'ye getirilir. Na filtresinde kör (saf su) ile sıfırlama yapıldıktan sonra seyreltikten derişige doğru stok Na çözeltilerin absorbans değerleri okunarak çalışma grafiği çizilir. 0.2 mL kan serumu alınarak yaklaşık 55-60 kat triton x-100 ile seyreltilerek absorbans değeri okunur. Çalışma grafiğinden Na değeri hesaplandıktan sonra seyreltme katsayısı ile çarpılarak serumdaki Na miktarı bulunur.

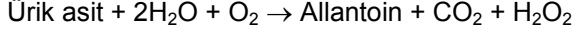
Serumda K tayini için; 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 ppm'lik stok K çözeltileri hazırlanır. 0.2 mL serum alınarak yaklaşık 45-50 kat triton x-100 ile seyreltilir. K filtresinde ve Sensivite 2'de kör (saf su) ile sıfırlama yapıldıktan sonra okumalar yapılır. Na tayinindeki işlemlerin tümü burada da aynen tekrarlanarak serum K düzeyi hesaplanır.

Serumda Ca tayini için; 10, 25, 50 ve 75 ppm'lik stok Ca çözeltileri hazırlanır. 0.2 mL serum alınarak 6-10 kat triton x-100 ile seyreltilir. Ca filtresinde ve sensivite 4'de kör (saf su) ile sıfırlama yapıldıktan sonra okumalar yapılır. Na tayinindeki işlemlerin tümü burada da yapılarak serum Ca düzeyi hesaplanır.

NOT : Bu deney için grafik kağıdı getirilecek

DENEY NO : 9. ÜRİK ASİT TAYİNİ

Ürik asit pürin metabolizmasının bir ürünüdür. Pürinler bütün doku hücrelerinde bulunan nükleoproteinlerin yıkılma ürünleridir. Ürik asidin esas kaynağı besinsel nükleoproteinler ve ettir. Karaciğer pürinlerin ürik aside değişme yeridir. Bakırlı bir protein olan ve karaciğerde bulunan urat oksidaz ile ürik asit, bazı memelilerde daha ileri yıkılıma uğramaktadır.



Kuş, insan ve yüksek omurgalılarda urat oksidaz enzimi bulunmadığı için ürik asit son üründür. Serumda ürik asit serbest ve albümine bağlı olarak iki şekilde bulunur. Ürik asit ve tuzları hemen hemen hiç çözünmeyen maddeler olup, konsantrasyonları 100 ml' de birkaç mg'ı aştığı zaman dokularda ve sıvılarda çökerler.

Ürik asit normal kanda %2-4 mg dır. Yetişkinlerde ürik asidin serum konsantrasyonu normalde 2-4 mg/dl arasında değişmektedir. Kadınlarda ortalama 4.1mg/dl, erkeklerde ise 5 mg-dl kadardır. Kanda ürik asit miktarları; yaşa, cinsiyete, etnik farka, sosyoekonomik duruma bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çocuklarda serum ürik asit miktarı 1-4 mg/dl arasında değişmektedir. Plazmadaki ürik asit miktarı hücrelerdekinden hemen hemen iki misli daha fazladır. Bu pH'ın değişimine bağlıdır. Ortamın pH değeri 5.75 ve üzerinde ise ürik asit urat anyonu, altında ise asit şeklinde çöker. Her iki yapıda pH=5.75 de ortamda eşit miktarlarda bulunur. Bu da ürik asidin eritrositlerin zarlarından kolayca geçtiğini gösterir. Bazı organlar; bilhassa böbrekler geçici olarak fazla miktarda ürik asit depo etme yeteneğine sahiptirler. Normal olarak ürik asit tamamıyla barsak mukozasında emilerek idrarla böbreklerle yardımıyla atılır.

Ürik asidin kanda çoğalmasına hiperürisemi ve azalmasına da hipourisemi denir. Hipourisemi sık görülmekle beraber klinik bakımdan büyük önemi yoktur.

Kanda Ürik Asit Miktarını Artıran Hastalıklar

1. Karaciğer ve safra kesesi hastalıkları.
2. Böbrek hastalıkları: Bu hastalara bol proteinli besin verilirse, kanda ürik asit miktarı artar. Aynı besin sağlıklı kişilere verilirse bir değişiklik görülmez.
3. Metabolizma bozuklukları: Vücut sıvılarında monosodyum uratın çökmesiyle **Gut hastalığı** meydana gelmektedir. Gut, nükleoprotein veya pürin metabolizmasının pirimer bir bozukluğudur. Bu, kanda ürik asit miktarının artmasıyla karakterize edilir. Ağır diyabetlilerde kanda ürik asit miktarı artar.
4. Kronik kurşun zehirlenmesi : Kanda ürik asit miktarı çok artar. Burada böbrekte meydana gelen tahriş önemli bir faktör olabilir.
5. Çeşitli hastalıklar : Kronik ekzema ve metil alkol ile ağır zehirlenmelerde, hiper tansiyon, kalp yetmezliği ve kronik lösemi gibi hastalıklarda artar. Hatta bazen böbrek yetmezliğini gösteren bir belirtidir.

Reaktifler

1. Sodyum Tungustat : % 10'luk (60 öğrenci için yaklaşık 50 ml yeterli)

2. 2/3 N Sülfürik asit (60 öğrenci için yaklaşık 50 ml yeterli)

3. Üre-Karbonat çözeltisi (2 hacim **A** + 1 hacim **B**)

A Çözeltisi : 30 gr Sodyum karbonat 100 ml suda çözülür.

B Çözeltisi : 45 gr üre 100 ml suda çözülür.

4. **Folin-Denis** : 10 gr molibdatsız sodyum tungustat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) bir miktar saf suda çözüldükten sonra 10 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltiliye 8 ml % 85 fosforik asit eklenir ve geri soğutucu altında 2 saat kaynatılır. Soğutulduktan sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5. **Stok Ürik Asit Çözeltisi** : 1 gr saf ürik asit (bir gece 100°C'de etüvde kurutulur ve desikatörde soğutulur) 0.6 gr lityum karbonat 150 ml suda çözülür. Bunun üzerine 20 ml formalin (% 40 formaldehit) ve 500 ml saf su eklenir. Bunların üzerine de 1 N 25 ml sülfürik asit ilave edilerek saf su ile 1 Lt'ye tamamlanır.

6. **Sulu Ürik Asit** : 1 ml stok ürik asit 100 ml'ye saf su ile tamamlanır. Bunun 1 ml'sinde 0.01 mg ürik asit vardır.

NOT : 4, 5 ve 6 nolu ayıraçlar buzdolabında, 1 ve 2 nolular oda sıcaklığında saklanmalıdır.

Proteini uzaklaştırılmış süzütünün elde edilmesi için bir santrifüj tüpüne sırasıyla; 4.2 ml Saf su + 0.6 ml Serum + 0.6 ml % 10 Na tungustat ve 0.6 ml 2/3 N H_2SO_4 : iyice karıştırılarak 2500 devirde 10 dk santrifüjlenir ve bu şekilde süzüntü elde edilmiş olur.

	Kör	Standart	Örnek (Süzüntü)
Süzüntü,	--	--	2.0 ml
Standart (sulu 1/100)	--	2.0 ml	--
Saf su	3.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Karbonat-Üre	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Folin-Denis	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

Karıştırılır ve oda ısısında bekletilir. Burada ürik asit fosfotungstik asitle oda ısısında indirgenerek mavi bir renk verir. Sonra bu oluşan kompleks Görünür Bölge spektrofotometresinde 720 nm'de kör ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır (10 dk içinde okuma yapılmalıdır).

Hesaplama

$$\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbans}} \times 10 = \frac{\% \text{ mg Ürik Asit}}{100 \text{ ml}}$$

DENEY NO : 10. ÜRE TAYİNİ

Üre karaciğerde sentezlenerek kan yolu ile böbreklere gelmekte ve idrarla atılmaktadır. Amonyak gibi toksik bir maddenin beyine zarar vermeden perifer dokulardan toplanıp toksik olmayan hale dönüştürülerek vücuttan dışarı atılır. Amonyak karaciğer tarafından üreye çevrilmekte ve daha sonra vücut dışına atılmaktadır. Karasal hayata uyum göstermiş omurgalılarda üre karaciğerde meydana gelmektedir. Amonyak gayet toksik olup zeka geriliğine, gelişme geriliğine ve çok yüksek konsantrasyonda ise koma ve ölüme sebep olmaktadır. Üre; yüksüzdür, toksik değildir, biyolojik membranlardan kolayca geçer ve bu nedenle böbrekler üzerinden kolayca dışarı atılır. Üre meydana gelişinde olaylar bir döngü şeklinde (üre döngüsü) meydana gelmektedir. Üre döngüsü toksik amonyağı toksik olmayan üreye çevirdiğinden , üre sentezi ile ilgili bütün bozukluklar amonyak zehirlenmesine neden olurlar. Üre döngüsünde genetik bozukluk var ise kanda üre görülür. Protein metabolizmasının son ürünü olan üre böbreklerden atılıma uğrar. Ürenin normal değerlerden yüksek oluşu; renal yetmezlik-nefrit, akut ve kronik akut renal yetmezlik. Normal sınırların altında olması ise; azot metabolizmasının bozukluğu, hepatik yetmezlik, kalp yetmezliği gibi belirtiler olabilir. Kan üre düzeyinin 80 mg/dL değerinden fazla olması böbrek fonksiyonlarının bozulduğunun belirtisidir. Bunun yanı sıra kan amonyak konsantrasyonunun yükselmesi , karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak üre döngüsünün iyi çalışmadığını gösterir.

Deneyin yapılışı

Gerekli Reaktifler

1. Oksidant reaktifi = 4 mol/lit H_3PO_4 (19.6gr/ H_3PO_4 yoğunluğu=ml fosforik asit) ve Fe^{+3} 60 mmol /lit (0.776gr $FeCl_3 \cdot 6H_2O$) karışımı saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.
2. DAM-TSC = diasetilmonoksim 140 mmol/lit (1.76 gr) ve Tiosemikarbazid 5 mmol/lit (0.057 gr) bunlar ayrı ayrı bir miktar alkolde çözüldükten sonra saf su ile 125 mL'ye tamamlanır (Bu çözelti buzdolabında saklanır) (diasetilmonoksim'in MA= 101.11gr/mol, Tiosemikarbazid'in MA=91.14 gr/mol).
3. Üre standardı = Glukoz deneyi için hazırlanmış olan stok çözelti kullanılacaktır. Bu deneyde örnek olarak serum veya idrar kullanılabilir

05 mL=yaklaşık 2 damla

Deney yapmak üzere 3 tane numaralanmış tüpe sırasıyla ;

	1.nolu tüp (kör)	2.nolu tüp(standart)	3.nolu tüp(örnek)
Oxidant reaktifi	0.05 ml	-	-
Standart	-	0.05 ml	-
Örnek (Serum)	-	-	0.05ml
DAM-TSC	3 ml	3 ml	3 ml

Görünür Bölge spektrofotometresinde 525 nm'de kör ile sıfırlandıktan sonra okumalar yapılır. **Hesaplama :**

$$\frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times 25 = \frac{\text{mg Üre}}{100 \text{ ml}} \dots \text{olur}$$

DENEY NO 11. VİTAMİNLER VE HPLC İLE ANALİZLERİ

Normal metabolizma için gerekli olan fakat organizmada bazıları dışında sentez edilemeyen besinlerle dışarıdan alınması gerekli biyokimyasal katalizörlerdir. Vitaminler ; suda çözünen ve yağda çözünenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Suda çözünenler; B kompleks grubu vitaminleri (B₁, B₂, B₆, B₁₂, Nikotinamid, biyotin, folik asit, pantotenik asit, lipoik asit ve C vitamini gibi) dir. Suda çözünen vitaminlerin bazıları dışarıda alındığı gibi bazıları da organizmada sentez edilirler. Aşırı miktarda alındıklarında tekrar dışarı atılırlar. Yağda çözünen vitaminler ise ; A, D, E, K ve diğerleridir. Bu yağda çözünen vitaminler ise organizmada sentez edilemezler. Dışarıdan alınması gerekir. Gereğinden fazlası alındığı zaman bunlar dışarı atılmaz ve zehir etkisi gösterirler. Herhangi bir vitamin ihtiyaçtan daha az alınır veya hiç alınmazsa, zamanla birtakım düzensizlikler, fonksiyon bozuklukları ve rahatsızlıklar oluşur.

A Vitamini (Retinol)

Suda çözünmeyen, yağda ve organik çözücülerde çözünen bir maddedir. A vitamini bir primer alkol grubuna ve çok sayıda doymamış bağa sahiptir. Bir büyüme vitamini olan A vitaminin alkol (retinol), aldehit (retinal) ve asit (retinoik asit) formları da mevcuttur. Memelilerde sadece retinol A vitamini etkisi göstermezken karotenoidler (α , β ve γ -karotenler) A vitamini etkisi gösterir. Ayrıca α -karoten ve γ - karotenin birleşmesiyle bir molekül A vitamini oluşur. A vitamini karaciğerden yağ asidi esteri halinde depolanır. Gıda ile alınan β -karotenler, karoten dioksigenaz enzimi ile oksidatif parçalanmaya uğrarlar. Düşük oksijen kısmi basınçlarında β -karotenler, antioksidan özellik göstermektedirler.

A vitamini görme, büyüme, üreme ve epitel hücrelerin sağlamlığı fonksiyonlarına sahiptir. İnsanın günlük A vitamini ihtiyacı 1mg civarındadır. Karaciğer, böbrek, yağ, yumurta sarısı A vitamini için zengin kaynaklardır. Sarı ve koyu yeşil sebzeler ve meyveler A vitamini öncülü olan karotenler bakımından zengindirler. A vitamininin eksikliğinde eklemelerde iltihaplanmalar ve beraberinde göz kornealarında iltihaplar, hastanın görme netliğinin azalması, göz altı derilerinde büzölmeler, hastanın gece ile gündüz görmelerinde uyumsuzluk gözlenmektedir. A ve C vitamini singlet oksijen temizleyicisi özelliği nedeniyle diğer oksijen radikallerine karşı da koruyucu etkiler yapar.

E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısında olup, yağda çözünen bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoidlerin substitue edildiği 6-hidroksi kromanlar veya tokoferollerdir. D- α -tokoferol geniş dağılım gösteren ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan formudur. Bitkisel yağlar E vitamini bakımından zengindir. Karaciğer ve yumurta orta derecede E vitamini içerir. E vitamini gereksinimi, çoklu doymamış yağ asidi alımı arttığı zaman artar. E vitamini ince bağırsaklarda

absorplanır. E vitamini eksikliği erken doğan bebeklere özgüdür. Yetişkinlerde genellikle kusurlu lipid emilimi ve taşınmasıyla birlikte. İnsanlarda E vitamini eksikliği belirtileri eritrositlerin peroksitlere karşı duyarlılığı ve anormal hücre membranlarının oluşmasıdır. Enzim ve bileşiklerin çoğu oksidatif stresin etkilerine karşı hücreleri korurlarken E vitamini antioksidan savunmanın tümünde önemli bir yere sahiptir. E vitamini serbest radikallerin oksidasyonuna karşı hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini korumada ilk savunma hattını oluşturur. Sellüler ve organel zarlar arasına girerek serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipid peroksidasyonuna karşı korur.

D Vitamini (D₁,D₂,D₃)

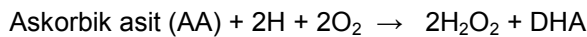
Hormon benzeri etkileri olup D vitamini vücutta yapılabılır ve bunlar genellikle DNA'ya etki ederek bazı proteinlerin meydana gelmesiyle etkinlik gösterirler. Kemiklerin oluşmasında Ca ve fosfat metabolizmasını düzenler. Eksikliğinde raşitizm oluşur. Fazla alındığında zehir etkisi yapar . Ençok balık ve yağları ile süt ve güneşte bulunur.

K Vitamini (K₁, K₂, K₃)

K₁ vitamini bitkilerin yeşil yapraklarında bulunur. K₂ barsaklarda bakteriler tarafından sentez edilir. K₃ ise sentetik bir bileşik olup kan pıhtılaştırıcı ilaç olarak kullanılmaktadır. K vitamini kanın pıhtılaşmasını katalizleyen bir bileşiktir. K vitamini eksikliği pek fazla görülmemekle birlikte uzun süre eksikliği olursa anemi ve karaciğer harabiyeti oluşur. En fazla karnabahar, lahanaya, ıspanak yumurta ve karaciğerde bulunur.

C Vitamini

Vitamin C, kapalı formülü C₆H₈O₆ olan bir ketolaktondur. Kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alır. Suda çözünebilir vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil taze sebze, patates, domates, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. C vitamini bağırsaklarda kolayca emilir ve kana karışır. Askorbik asit yeterince alınmadığı zaman skorbüt hastalığı, kansızlık ve uyuşuklukla başlar ilerledikçe kanamalar olur, bağ dokuları zayıflar ve kemikler kırılabilir olur. C vitamini besinlerle fazla alınması, koroner kalp hastalığı ve bazı kanserler gibi kronik hastalıkların görülme sıklığını azaltır. C vitamini fazlası idrar ve terle dışarı atılır. Böylece alınan fazla miktar depo edilmez. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onların temizlenmesinde rol oynar. C vitamini güçlü bir indirgeyici ajan ve antioksidan olup süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girerek bir ara ürün olan semidehidroaskorbat yoluyla metaboliti dehidroaskorbik asiti (DHA) oluşturur.



Niasin (Nikotinamit)

Nikotinamit adenin dinükleotit (NAD^+) ve nikotinamit adenin dinükleotit fosfat (NADP^+) koenzimlerinin yapısını oluşturur. Pellegra denilen bir deri hastalığı oluşur. En çok maya tahıllar, et, süt ve karaciğer de bulunur

Tiamin (B_1)

Tiamin pirofosfat (TPP) koenziminin yapısını oluşturur. B_1 eksikliğinde Beriberi hastalığı oluşur. Ençok tahıl ve baklagillerde bulunur

Riboflavin (B_2)

Flavin adenin dinükleotid (FAD) ve Flavin mononükleotid (FMN) olmak üzere iki biyolojik aktif şekli bulunmaktadır (yani FAD ve FMN nin yapısını oluşturmaktadır). Riboflavin eksikliğinde keliyozis hastalığı (ter bezlerinin iltihaplanması) oluşur. En çok süt, yumurta karaciğer ve yeşil sebzelerde bulunur.

Lipoik asit

Barsak bakterileri tarafından sentezlendiği için eksikliği pek görülmez.

B_6 vitamini

Pirodoksin, transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarının koenzimi olan piridoksal fosfat (PLP)'ın yapısını oluşturur. Eksikliğinde deri bozuklukları ve merkezi sinir sisteminde değişimler olur. Ençok tahıl ve hayvansal besinlerde bulunur.

Kobalamin (B_{12})

B_{12} vitaminin yapısındaki Co $+3$, $+2$ ve $+1$ olabilir. Normal vitamin halinde Co^{+3} , koenzim şekillerinde ise Co^{+1} halindedir. B_{12} insanlarda metiyonin sentezi ve metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüşümü için kobalamin kullanılmaktadır. Eksikliğinde megaloblastik anemi (ağır kansızlık) oluşur. En çok hayvansal besinlerde bulunmaktadır.

Pantotenik asit

Karbonhidrat ve lipit metabolizmasında önemli rolü olan koenzim A'nın bileşiminde bulunur. Eksikliğinde mide ve barsak bozuklukları, deri bozuklukları oluşur. Ençok karaciğer, yumurta ve mayada bulunur.

Biotin (H vitamini)

Karboksilasyon tepkimelerinde karboksil grubu taşıyıcısı olarak görev yapar. Yumurtanın beyazındaki avidine bağlandığı için buna Yumurta akı hastalığı da denir. Eksikliğinde saç dökülmesi, halsizlik ve deri bozuklukları olur. En fazla maya, yumurta sarısı, karaciğer, böbrek ve domateste bulunur.

Folik asit

Karbon taşıma reaksiyonlarını katalizlemektedirler. Eksikliğinde anemi ve DNA sentezinde yavaşlama görülmekte en çok yeşil sebze, karaciğer ve tahıllarda bulunmaktadır.

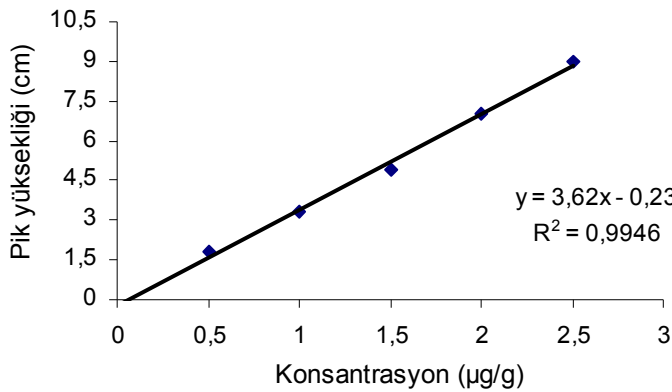
Deneyin Yapılışı

A ve E Vitamini Tayini

Serum örneğinden 0.3 ml bir tüpe alınıp üzerine 1.5 ml etanol ilave edilerek proteinler çöktürülür. Süzülerek ayrılan süzüntü üzerine 0.3 ml n-hegzan ilave edilerek vortekste karıştırılır. Daha sonra 4000 devir/dk'da 3 dakika santrifüjlenerek üstteki hegzan fazı ayrılır. Her bir serum örneği için hegzanla ekstraksiyon işlemi en az iki defa tekrarlanır. Böylece, serum içindeki A ve E vitamininin tamamı hegzan fazına alınır. Ayrılan hegzan fazı azot gazı altında kuruluğa kadar uzaklaştırılır. Daha sonra örnekler tekrar 0.25 ml % 100 metanolde çözülerek analize hazır hale getirilir. Bu metanol çözeltisinden 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edilir. HPLC'de hareketli faz olarak metanol : asetonitril : kloroform (47 : 42 : 11) karışımı kullanılır. Vitamin A (retinol) 326, vitamin E (α-tokoferol) ise 296 nm'lik dalga boylarında tayin edilir. A ve E vitamin miktarlarını belirlemek için herbirinin ayrı ayrı değişik konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanarak bu çözeltilerin pik yükseklikleri belirlenir. Daha sonra belirlenen bu pik yüksekliklerine karşı derişim (konsantrasyon) grafiğe alınarak çalışma grafiği çizilir.

C Vitamini Tayini

Serum örneğinden 0.2 ml alınarak üzerine 0.5M HClO₄'den 0.2 ml ilave edilerek proteinler çöktürülür. Sonra saf su ile toplam hacim 1 ml'ye tamamlanarak çözelti santrifüjlenip çökelek ve süzüntünün ayrılması sağlanır. Daha sonra üstteki süzüntüden 20 µL alınarak HPLC'de Mobil faz : 3.7 mM KH₂PO₄ (pH: 4, H₃PO₄ ile) Akış hızı : 1ml dk⁻¹. Dalga boyu : 245 nm'de C₁₈ kolonu kullanılarak C vitamini tayin edilir. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan stok C vitamini çözeltilerinin pik yükseklikleri ölçülerek çalışma grafiği çizilir. Çalışma grafiğinin doğru denklemi yardımıyla C vitamini miktarları belirlendi. Serum örnekleri 5 kat seyreltildiği için seyrelme katsayısı olan 5 ile çarpılarak C vitamini miktarları hesaplanır.



Vitamin C'nin çalışma grafiği ve doğru denklemi