

KARBOHİDRATLARIN KANTİTATİF TAYİNİ

1. Süt ve özellikleri

Süt, meme bezleri tarafından salgılanan bir sıvıdır. Sütün bileşiminde büyük oranda su ve pek çok katı madde bulunur. Emülsifiye lipidler ve kazeinin kalsiyum tuzları süte beyaz bir görünüm verirken, karotenoid pigmentler süte sarı görünüm verirler.

Sütte bulunan proteinler; kazein, laktalbumin ve laktoglobulindir. Kazein, bir fosfoproteindir ve genellikle kalsiyum kazeinat şeklinde bulunur. Asit etkisi ve ekşime halinde kalsiyum kazeinattan kazein ve kalsiyum ayrılır, kazein yağ ile birlikte çöker. Palmitik, oleik, stearik, miristik asitler ve yüksek yağ asitlerinin trigliseridleri süte bol miktarda bulunur. A, D, E, K, C ve B₂ vitaminleri ile katalaz, peroksidaz, fosfataz enzimleri de süte bulunmaktadır.

Sütte karbohidrat olarak laktoz bulunur. Laktoz, glikoz ve galaktoz monosakkaritlerinden oluşan indirgen bir disakkarittir. Vücudumuzda laktozun sindirimi, ince barsak duvar hücreleri tarafından salgılanan laktaz (β -galaktozidaz) enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Laktozun bu enzimle hidrolizi sonucunda oluşan glikoz ve galaktoz monosakkaritleri ince barsaktan absorblanarak kan dolaşıma geçer ve karaciğerde metabolize edilir.

Laktaz enziminin eksikliği ya da tam işlev görmemesi durumunda laktoz intoleransından söz edilir. Temel anlamda laktoz intoleransı süt ya da süt ile üretilmiş ürünleri sindirememek ya da bunda güçlük yaşamak anlamına gelir. Süt intoleransı ya da laktaz eksikliği olarak da adlandırılan bu durum, tüm dünyada en sık karşılaşılan sindirim bozukluklarından birisidir ve özellikle Asya-Avrupa ırklarında daha fazla görülür.

Çok hassas kişilerde kahve kremasının içindeki çok az miktardaki laktoz bile yakınmalara neden olabilir.

En sık tüketilen laktoz kaynakları; süt, tereyağı, margarin, yoğurt, peynir, süt tozu, bazı ekmek türleri, hamur ürünleri ve çikolatadır.

Yoğurt bu ürünler arasında farklı bir yere sahiptir. İçindeki bakteriler laktozu parçalarlar ve süt içemeyen pek çok kişi rahatlıkla yoğurt yiyebilir.

2. Kan Şekeri

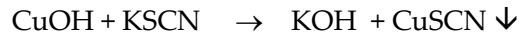
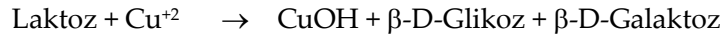
Sağlıklı bir kişide açlık kan şekeri 80-120 mg/100 mL'dir (glisemi). Yemeklerden sonra glikoz düzeyi artmaktadır. 2 saatlik tokluk kan şekeri 140 mg/100 mL'dir. Kan glikoz düzeyi hastalık durumlarında normal değerinin altına inemediği (hipoglisemi) gibi üstüne de çıkabilmektedir

(hiperglisemi). Hiperglisemi (şeker hastalığı, diyabet, Diabetes Mellitus) başta karbohidrat olmak üzere protein ve yağ metabolizmasını ilgilendiren hormonal bir hastalıktır. Vücudumuzda kan glikoz düzeyini ayarlayan hormonlar vardır. Bunlardan en önemlileri; kan şekerinin yükselmesini önleyen insülin ve kan şekerinin düşmesini önleyen glukagon hormonlarıdır.

3. Deneysel Çalışmalar

Deney 3.1. Sütte Laktoz Miktarının Titrimetrik Tayini

Deneyin prensibi: Laktozun yarı asetal grubunun bazik ortamda Cu^{+2} 'yi indirgemesi sonucunda oluşan CuOH 'ın potasyum sülfosiyanür (KSCN) ile reaksiyona girerek bakır sülfosiyanür (CuSCN) halinde beyaz bir çökelek vermesi esasına dayanır.



Deneyin yapılışı:

I. Aşama: Sütten kazeinin çöktürülmesi

- (1) Bir deney tüpüne 2 mL süt, 1 mL %10'luk sodyum tungstat, 1 mL 0.7 N H_2SO_4 konular ve 5 dakika beklenir.
- (2) Çözeltinin üzerine 16 mL saf su ilave edilerek toplam hacim 20 mL'ye tamamlanır.
- (3) Çözelti berrak bir süzüntü elde edilinceye kadar süzülür, çökelek ayrılır ve süzüntü bürete doldurulur.

II. Aşama: Laktozun miktar tayini

- (1) Bir erlene 5 mL kantitatif benediktt reaktifi konular ve üzerine bir spatül ucu Na_2CO_3 ilave edilir.
- (2) Çözelti Na_2CO_3 çözününceye kadar ısıtılır. Çözelti kaynamaya başlayınca büretteki süzüntü damla damla ilave edilir (Titrasyon süresince çözeltinin çalkalanması ve kaynatılması gerekmektedir).
- (3) Beyaz çökelek oluşuncaya kadar titrasyona devam edilir. Çökelek oluşuktan sonra harcanan süzüntü miktarı büretten okunarak kaydedilir.

Yapılan çalışmada;

Na_2CO_3 , ortamın yeterince bazik olmasını sağlamaktadır.

Sodyum sitrat, oluşan CuOH 'i çözeltide çözünmüş halde tutmaktadır.

Ferrosiyanür, indirgenme reaksiyonu sonucunda oluşacak bakır oksitin çökmesini önler.

Potasyum sülfosiyanür, Cu^+ katyonunu bağlayarak titrasyon sonucunu göstermektedir.

Hesaplama: 5 mL kantitatif benedikt reaktifine eşdeğer laktoz miktarı 13.4 mg'dır.

$$\%g \text{ laktoz} = [13.4 \times 100 \times \text{seyreltme faktörü}] / [\text{titrasyonda harcanan süzüntü (mL)} \times 1000]$$

Çözeltiler:

Kantitatif benedikt çözeltisi

A çözeltisi: 10 g susuz Na_2CO_3 , 20 g sodyum sitrat, 12.5 g potasyum sülfosiyanür 60 mL saf suda ısıtılarak çözülür. Çözelti soğuduktan sonra süzülür.

B çözeltisi: 1.8 g bakırsülfat 10 mL saf suda çözülür, 0.5 mL %5'lik potasyum ferrosiyanür çözeltisi ilave edilir.

A ve B çözeltileri birleştirilir ve saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

%10'luk sodyum tungstat çözeltisi: 10 g sodyum tungstat 100 mL saf suda çözülür.

0.7 N H_2SO_4 : 400-500 mL saf su bulunan balon jöjeye 19 mL derişik H_2SO_4 yavaş yavaş ilave edilir ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanır.

Deney 3.2. Sütte Laktoz Miktarının Spektrofotometrik Tayini

Deneyin yapılışı:

- (1) 250 μL süte, 500 μL sodyum tungstat ve hafifçe çalkalayarak 500 μL 0.7 N H_2SO_4 çözeltisi eklenir. Damıtık su ile hacim 25 mL'ye tamamlanır, 5 dk bekletilir ve süzülür.
- (2) Örnek, standart ve kör tüpler aşağıdaki tabloya göre hazırlanır.

Çözeltiler / mL	Örnek	Standart	Kör
Süzüntü	0.5	-	-
Laktoz standartı	-	1	-
Damıtık su	0.5	-	1

Bakır ayıracı	1	1	1
Tüpler 8 dk kaynar su banyosunda bekletilir ve ardından soğutulur			
Fosfomolibdik asit	2	2	2
Tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletilir (Bu aşamada gaz çıkışı tamamlayıncaya kadar tüpler çalkalanır).			
630 nm'de örnek ve standartın absorbanları okunur			

(3) Sütteki şeker miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\% \text{ Laktoz} = [\text{Örneğin absorbanı} / \text{Standartın absorbanı}] \times 100$$

Çözeltiler

0.7 N H₂SO₄ çözeltisi: 40-50 mL saf su bulunan balon jöjeye 1.9 mL derişik H₂SO₄ yavaş yavaş ilave edilir ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.

Bakır ayıracı: 40 g sodyum karbonat (Na₂CO₃) 400 mL suda çözülür. 7.5 g tartarik asit ve 4.5 g CuSO₄.5H₂O eklenerek karıştırılır. Hacim 1 L'ye tamamlanır.

%0.2'lik benzoik asit çözeltisi: 0.2 g benzoik asit alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

%1'lik laktoz çözeltisi: 1 g laktoz alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Standart laktoz çözeltisi: 1.5 mL %1'lik laktoz çözeltisi 50 mL %0.2'lik benzoik asit ile tamamlanır.

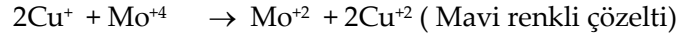
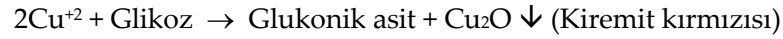
%10'luk NaOH çözeltisi: 10 g NaOH/ 100 mL saf su

Fosfomolibdik asit çözeltisi: 3.5 g molibdik asit, 0.5 g sodyum tungstat, 20 mL %10'luk NaOH molibdik asitin içindeki amonyağın hepsi çıkıncaya kadar (20-40 dk) kaynatılır. 12.5 mL %85'lik fosforik asit eklenerek hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

Deney 3.3. Kanda Şeker Miktarının Tayini (Folin-Wu Metodu)

Deneyin prensibi: Proteini uzaklaştırılmış süzüntü içindeki glikozun bakır sülfatı (Cu²⁺) indirgeyerek bakır oksit (Cu₂O) haline dönüştürmesi, oluşan bakır oksitin fosfomolibdik asiti indirgeyip tekrar Cu²⁺'ye dönüşerek mavi renkli bir çözeltinin meydana gelmesi esasına dayanır. Mavi rengin şiddeti çözeltilde bulunan glikoz miktarı ile doğru orantılıdır. Bu renkli çözeltinin

optik yoğunluğu (OD) spektrofotometre ile ölçülür. Kalibrasyon grafiği çizilerek okunan OD değerine karşılık gelen 'mg glikoz' miktarı bulunur.



Deneyin yapılışı:

I. Aşama: Proteinsiz kan süzüntüsünün hazırlanması

Çözeltiler / mL	Kör	Numune
Saf su	4	3.5
Serum	-	0.5
0.7 N H ₂ SO ₄	0.5	0.5
%10 Sodyum tungstat	0.5	0.5

Tüpler çalkanır, 5 dk oda sıcaklığında bekletilir ve süzülür

II. Aşama: İndirgenme ve renk reaksiyonu

2 adet Folin-Wu tüpü alınarak aşağıdaki şekilde çalışılır. Isıtma ve bekletme işlemlerinde tüplerin ağzı alimünyum folyo ile sarılmalıdır ! (Folin Wu tüpü kullanılmasının sebebini tartışınız)

Çözeltiler / mL	Kör	Numune
Kör süzüntü	1	-
Numune süzüntüsü	-	1
Bakır ayırıcı	1	1

Tüpler, 8 dk kaynar su banyosunda bekletilir ve soğutulur

Fosfomolibdik asit	1	1
--------------------	---	---

Tüpler, 5 dk kaynar su banyosunda tutulur ve musluk suyu altında soğutulur

Saf su	9.5	9.5
--------	-----	-----

Tüpler, 10 dk oda sıcaklığında bekletilir

420 nm'de optik yoğunluk ölçümü yapılır

Standart kalibrasyon grafiğinin hazırlanması: 4 adet Folin-Wu tüpü alınır ve aşağıdaki tabloya göre standart çalışma yapılır. Isıtma ve bekletme işlemlerinde tüplerin ağzı alimünyum folyo ile sarılmalıdır !

Çözeltiler / mL	1	2	3	4
St glikoz çözeltisi	0.25	0.50	0.75	1
Saf su	0.75	0.50	0.25	-
Bakır ayıracağı	1	1	1	1
Tüpler, 8 dk kaynar su banyosunda bekletilir ve soğutulur				
Fosfomolibdik asit	1	1	1	1
Tüpler, 5 dk kaynar su banyosunda tutulur				
Saf su	9.5	9.5	9.5	9.5
Tüpler, 10 dk oda sıcaklığında bekletilir				
420 nm'de köre karşı optik yoğunluk ölçümü yapılır				

Standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak numunede bulunan glikoz miktarı %mg glikoz (mg glikoz/100 mL kan) olarak hesaplanır.

Çözeltiler:

Benzoik asit çözeltisi (%0.25): 0.625 g benzoik asit 250 mL saf suda çözülür, kaynatılır ve soğutulur. Buharlaştırma ile kaybolan kısım saf su ile tamamlanır.

Stok glikoz çözeltisi (10 mg/mL): 1 g saf susuz glikoz 5 mL %0.25'lik benzoik asit çözeltisinde çözülür ve bu çözelti ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Standart glikoz çözeltisi (0.2 mg/mL): 50 mL %0.25'lik benzoik asit çözeltisinin üzerine stok glikoz çözeltisinden 2 mL ilave edilir, karıştırılır ve daha sonra toplam hacim benzoik asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanır.

KAYNAKLAR

(1) Öztop, H.N. ve Candan, F. Biyokimya Laboratuvarı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas.

- (2) Benedikt, S.R. A reagent for the detection of reducing sugars. J. Biol. Chem. 1908, 5, 485-487.
- (3) www.mumcu.com/html/article.php?sid=370
- (4) <http://www.sekerdiyabet.com/>