

FİZYOLOJİK ÖRNEKLERDE MİNERAL ELEMENTLERİN TAYİNİ

Organizmanın sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için besin maddeleri, su ve vitaminlerin yanı sıra minerallere de ihtiyacı vardır. İnsan vücudunda mineraller çok az miktarda bulunurlar. Bazı minerallerin vücuttaki fonksiyonları, vitaminlerin ve hormonlarınki kadar önemlidir. Mineraller genel olarak, besin maddeleri içerisinde bulunduğundan, eksikliklerine pek rastlanmamaktadır.

Doğada bulunan 92 elementten sadece 27 tanesi canlıların yapısında bulunmaktadır. Bu elementlerden 11 tanesi temel elementler, diğerleri ise vücutta çok düşük oranlarda bulunan eser elementlerdir (iz elementler). Eser elementler çok düşük miktarlarda bulunmalarına rağmen, yaşam için oldukça önemli görevleri vardır.

Tablo 1. Canlı organizmalarda bulunan elementler ve yüzdeleri

Temel elementler	Sembol	Element (%)	Eser elementler	Sembol
Karbon	C	9.50	Demir	Fe
Oksijen	O	25.50	Mangan	Mn
Hidrojen	H	63.0	Çinko	Zn
Azot	N	1.40	Flor	F
Kalsiyum	Ca	0.31	Bakır	Cu
Fosfor	P	0.22	Krom	Cr
Kükürt	S	0.05	Kobalt	Co
Potasyum	K	0.06	İyot	I
Klor	Cl	0.08	Molibden	Mo
Sodyum	Na	0.03	Kalay	Sn
Magnezyum	Mg	0.01	Vanadyum	V
			Brom	Br
			Selenyum	Se
			Silisyum	Si
			Nikel	Ni

Tablo 1’de görüldüğü gibi, canlı organizmada en çok bulunan ve hücrenin %99’unu oluşturan elementler karbon, hidrojen, oksijen ve azottur. Hücre ağırlığının %50-60’ı karbon, %8-10’u azot, %25-30’u oksijen ve yaklaşık %3-4’ü hidrojenenden oluşmaktadır.

Tuzun Organizma İçin Önemi

Sodyum iyonu, insan organizmasında genellikle klorür tuzu halinde bulunur. Sodyum klorürün sudaki çözünürlüğü fazla olduğundan toprakta az, deniz suyunda bol miktarda bulunur. Toprakta az bulunması sebebiyle bitkilere geçen sodyum tuzları da azdır. Bu nedenle besinlerle vücuda giren sodyum, ihtiyacı karşılayamadığından yemeklere tuz ilave edilir. Vücut sıvılarında bulunan sodyum vücutu fazla su kaybindan korur, osmotik basıncın ve asit-baz düzeylerinin dengesini sağlar, kasların çalışmasını etkiler. Sağlıklı kişilerde vücuttaki sodyum miktarı belirli sınırlar içinde sabit tutulur. Sodyumun kandaki normal düzeyi, 65 yaş altı için 135-145 mM, 65 yaş üstü için 132-142 mM arasındadır. Kandaki sodyum derişiminin normal değerlerin altına düşmesine 'hiponatremi', normal sınırların üzerine çıkmasına 'hipernatremi' denir.

Klor, hücreler arası sıvı ve kan plazmasının başlıca anyonudur. Kimyasal olarak NaCl ve HCl şeklinde bulunur. Mide asidi içinde HCl şeklindedir. Klor, organizmaya sodyum klorür (NaCl) şeklinde alınır. Bu nedenle sodyum ve klor metabolizması birbirleriyle bağlantılıdır. Klorür anyonu, asit-baz dengesinin ve osmotik basıncın ayarlanmasında görev almaktadır.

Kalp hastalarının, hipertansiyonluların, nefritli hastaların ve hamilelerin istenilen tuz diyetine uyup uymadıklarını kontrol etmek amacı ile idrarlarındaki tuz miktarı belirlenir. Ağır sportif hareketler ve fazla terleme, vücudun tuz oranını azaltır. Bunun sonucunda, baş ağrıları, mide bulantıları, ishal, bacak ve karın kaslarında kramplar görülebilir. İdrarla bir günde yaklaşık 10-15 gram tuz (NaCl) atılır.

Kalsiyum İyonunun Önemi

Kalsiyum, insan organizmasında en bol bulunan elementtir (ortalama 1.5 g/kg). Kalsiyum iyonları (Ca^{2+}), hücre dışı sıvılarda yoğunlaşmıştır. İnsan vücudundaki kalsiyumun %99'u kemik ve dişlerde, $Ca_3(PO_4)_2$ şeklinde bulunmaktadır. Kalsiyumun büyük bir kısmını kanda albumine bağlanarak taşınır.

Kan kalsiyum düzeyi sağlıklı bir insanda 9-11 mg/100 mL (2.25 -2.75 mM) düzeyindedir. Bu sınırın altındaki değerler 'hipokalsemi', üzerindeki değerler ise 'hiperkalsemi' olarak adlandırılır. Hipokalsemi sonucu 'tetani' adı verilen kasların aşırı kasılması durumu ortaya çıkar. Kanda kalsiyum düzeyinin artması durumunda ise, sinir

sistemindeki uyarımlar yavaşlar, kaslar tembelleşir, iştahsızlık ve kabızlık görülür. Yetişkin bir insan için günlük kalsiyum ihtiyacı 800 mg'dır.

Kalsiyumun, kasların kasılması ve kalbin çalışmasında, gebelik ve doğumdan sonra süt yapımında büyük rolü vardır. Kemik gelişimi ve yapısı üzerindeki etkileri nedeniyle özellikle bebeklerde ve çocuklarda yeterince kalsiyum alınmasına özen gösterilmelidir.. Vücutta birçok fizyolojik fonksiyonu olan kalsiyumun yeterli miktarlarda alınmaması, çocuklarda 'raşitizm', yetişkinlerde ise 'osteomalazi' hastalığına neden olmaktadır.

İnorganik Fosfatın Önemi

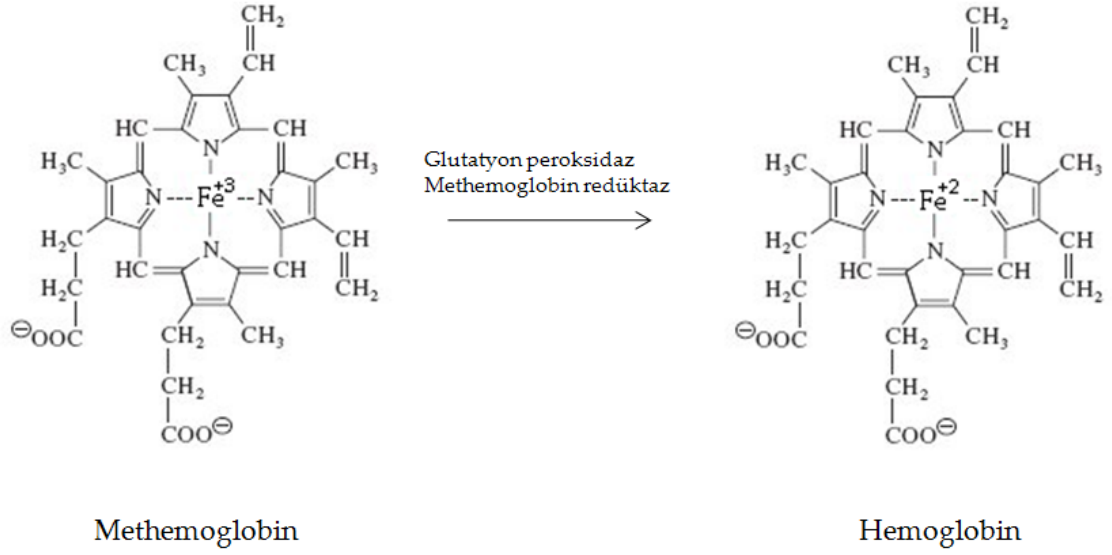
Fosfat, kemik ve dişlerin oluşumunda kalsiyum ile birlikte rol alır. Kanda fosfat iyonları şeklinde bulunduğu gibi, protein ve lipitlere bağlı olarak da bulunur. Nükleik asitleri meydana getiren nükleotitlerde fosforik asit grupları vardır. Canlı organizmanın enerji kaynağını oluşturan ATP de bir fosfat bileşimidir.

İnorganik fosfat, plazmada başlıca HPO_4^- ve H_2PO_4^- iyonları şeklinde bulunur. Plazma fosfor derişimi inorganik fosfat miktarı olarak belirtilir. Plazmadaki normal inorganik fosfat derişimi 2.5-4.5 mg/dL arasındadır. Plazmanın fosfor düzeyi, kalsiyum düzeyi ile yakından ilişkilidir.

Demir İyonunun Önemi

Organizmada demir, başlıca hemoglobin, miyoglobin, sitokrom, peroksidaz ve katalaz enzim sistemlerinde bulunur. Hemoglobin, kana kırmızı rengini veren ve oksijen taşımada görevli olan alyuvarların (eritrositler) yapısında bulunan porfirin türevlerinden bir proteindir. Vücuttaki bütün demir miktarı 4-5 g kadardır.

Oksijen hemoglobinin yapısında bulunan hem grubu içindeki demir atomu ile, bir elektron paylaşarak hemoglobine bağlanır. Bu bağlanma hem içindeki demir atomunun iki değerlikli (Fe^{2+}) olması halinde mümkündür. Üç değerlikli demir içeren hemoglobin 'methemoglobin' olarak adlandırılır. Methemoglobinin yeniden oksijen bağlayabilir hale gelmesi için yapısındaki Fe^{3+} 'in Fe^{2+} 'e indirgenmesi gerekir. Bu işlem organizmada methemoglobin redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir.



Şekil 1. Methemoglobinin hemoglobine indirgenmesi

Eritrositlerde bulunan hemoglobinin 3 temel görevi vardır:

- (1) O₂'in akciğerlerden periferal dokulara taşınması.
- (2) CO₂ ve protonların atılım için periferal dokulardan akciğerlere taşınması
- (3) Asit hemoglobin/hemoglobinat tampon sisteminde görev alır (Bkz. Bölüm 1).

Oksijenin organizma için önemi

Oksijen canlıların vücut fonksiyonlarını gerçekleştirmeleri için önemli bir yere sahiptir. Anaerobik (oksijensiz solunum yapan) bazı canlı türleri ve bakteriler dışındaki diğer tüm canlılar ve aerobik (oksijenli solunum yapan) canlılarda, enerji üretiminin sağlanması ve metabolizmanın uygun işlemesi açısından bulunması gereken bir moleküldür. Oksijenin bulunmadığı durumlarda kanda oksijen basıncı düşer. 'Hipoksi' adı verilen bu durumda anaerob metabolizma devreye girer ve geçici olarak enerji üretimi sağlanır. Anaerob metabolizmada son ürün olarak laktik asit meydana gelir. Bu durum uzun süre devam ettiğinde giderek biriken laktik asit, ortamın pH değerinin düşmesine neden olur. Buna 'metabolik asidoz' adı verilir.

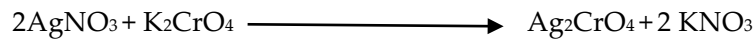
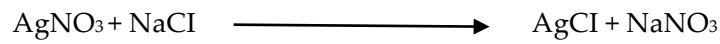
Hemoglobine oksijenin bağlanması: Hemoglobine oksijen bağlanması kooperatif bir olaydır. Tetrametrik yapıda olan hemoglobinin 4 adet 'hem' grubuna birer tane O₂

molekölü bağlanabilir. Bir 'hem' grubuna bir O₂ molekülünün bağlanması, moleküldeki geri kalan 'hem' gruplarının O₂ 'e olan ilgisini artırır. Bu etkiye 'hem-hem etkileşmesi' adı verilir. Hemoglobinin oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlaması, O₂ in kısmi basıncına (pO₂), ortamın pH'sine ve ortamda bulunan 2,3-bifosfogliserat miktarına bağlıdır. Oksijenin kooperatif bağlanması ile oksijenin kısmi basıncında değişiklik olur. Bu durum hemoglobinin dokulara daha çok O₂ taşınmasını sağlar. Akciğerlerde O₂ konsantrasyonu ve kısmi basıncı yüksektir. Burada O₂ hemoglobinle kolayca birleşir. Meydana gelen oksihemoglobin (HbO₂), oksijenin çoğunu, oksidatif metabolizmada kullanılmak üzere kısmi basıncı düşük olan periferel dokulara bırakır.

Deneyel Çalışmalar

Deney 1. İdrarda Tuz Tayini (Mohr Yöntemi)

Deneyin prensibi: İçerisine indikatör madde olarak potasyum kromat ilave edilmiş idrar, gümüş nitrat ile titre edildiğinde idrarda bulunan klor, AgNO₃ ile etkileşerek AgCl halinde çökmektedir. Ortamda gümüş ile birleşecek klor kalmadığında fazla gümüş potasyum kromat ile reaksiyona girerek tuğla kırmızısı renginde gümüş kromat oluşturmaktadır. İdrardaki NaCl miktarı $\frac{g_{NaCl}}{100 \text{ mL idrar}}$ olarak hesaplanır ($M_{NaCl} = 58,5 \text{ gmol}^{-1}$).



Deneyin yapılışı: Bir erlene 2 mL idrar alınır, üzerine 5 mL su ve 2 damla %10'luk potasyum kromat ilave edilir ve karıştırılır. Çözelti büretteki 0,1 N AgNO₃ ile titre edilir. Her damladan sonra erlen tuğla kırmızısı renk gözlenene kadar karıştırılır.

Titrasyonun başlangıcında idrarda AgCl oluşması nedeniyle önce beyaz çökelek meydana gelir, daha sonra oluşan tuğla kırmızısı renk reaksiyonun tamamlandığını göstermektedir. Büretten harcanan AgNO₃ miktarı okunur. Reaksiyonlar üzerinden gerekli hesaplamalar yapılarak örnekteki NaCl miktarı bulunur.

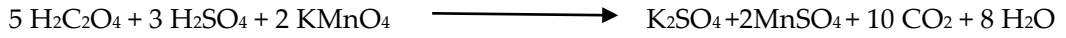
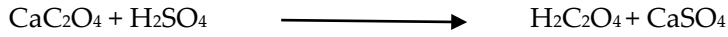
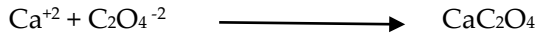
Çözeltiler

AgNO₃ çözeltisi (0.1 N): 16.99 g gümüş nitrat bir miktar saf suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanır.

Deney 2. Serumda Kalsiyum Tayini (Clark-Collip Yöntemi)

Deneyin prensibi: Serumda bulunan kalsiyum, amonyum okzalat ilavesi ile kalsiyum okzalat halinde çöker. Çökelti asitli ortamda potasyum permanganat ile titre edilir. Oluşan pembe renkli MnSO₄ miktarı, başlangıçta ortamda bulunan kalsiyum miktarı ile orantılıdır. Çalışılan serum örneğindeki %mg kalsiyum miktarı (mg Ca/100 mL serum) hesaplanır ($M_{Ca} = 40 \text{ g mol}^{-1}$).

Not: Hesaplamalarda, katsayılara ve indirgenme-yükseltgenme basamaklarına (Mn) dikkat ediniz!



Deneyin yapılışı: Numune çalışması için bir adet **santrifüj tüpü** alınır ve tablodaki işlemler yapılır.

Maddeler / mL	Numune
Distile su	1
Serum	1.5
%4 amonyum okzalat	0.5

- (1) Santrifüj tüpü karıştırılır ve 1 saat 37 °C'deki su banyosunda bekletilir.
- (2) Su banyosundan alınan tüp soğutulur ve 10 dakika santrifüjlenir.
- (3) Üstteki sıvı atılır. Dipteki çökelek üzerine 2 mL %2'lik NH₃ çözeltisi ilave edilir, karıştırılır ve tekrar 10 dakika santrifüjlenir.
- (4) Dipte kalan çökelek üzerine 2 mL 1 N H₂SO₄ ilave edilir ve 60-70 °C'lik su banyosunda çökelek çözününceye kadar bekletilir.

(5) Çözelti erlene alınır ve sıcakken 0.01 N KMnO_4 ile en az 2 dakika kalabilen pembe renk oluşuncaya kadar titre edilir. Büretten harcanan KMnO_4 miktarı okunur.

(6) Reaksiyonlar üzerinden gerekli hesaplamalar yapılarak örnekteki Ca miktarı bulunur.

Çözeltiler

Stok KMnO_4 çözeltisi (0.1 N): 3.16 g KMnO_4 distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanır. Bir hafta bekletilip süzülür.

Çalışma KMnO_4 çözeltisi (0.01 N): 10 mL Stok permanganat çözeltisi kaynamış destile su ile 100 mL ye tamamlanır.

H_2SO_4 Çözeltisi (1 N): 50 mL %95'lik derişik H_2SO_4 distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

Deney 3. Serumda İnorganik Fosfat Tayini

Deneyin prensibi: Serumda bulunan inorganik fosfatın sülfomolibdat ile reaksiyona girmesi sonucunda sarı renkli molibdat kompleksi oluşur. Bu kompleksin indirgen bir madde olan askorbik asit ile tepkimeye girmesi sonucunda, inorganik fosfat miktarı ile orantılı koyulukta molibden mavisi oluşması esasına dayanır.

Deneyin yapılışı: Kör, örnek ve standart çalışmaları için aşağıdaki tablolarda belirtilen işlemler sırası ile uygulanır.

Maddeler / mL	Kör	Örnek	Std 1 (0.01 mg/ml)	Std 2 (0.02 mg/ml)	Std 3 (0.03 mg/ml)	Std 4 (0.04 mg/ml)	Std 5 (0.05 mg/ml)
Standartlar	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Serum	-	0.5	-	-	-	-	-
Saf su	0.5	-	-	-	-	-	-
Triklor asetik asit	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Örneğin bulunduğu tüp 5 dakika santrifüjlenir. Üstteki berrak çözeltiliye ve diğer tüplere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanır.

Maddeler / mL	Kör	Örnek	Std 1 (0.01 mg/ml)	(St 2 (0.02 mg/ml)	Std 3 (0.03 mg/ml)	Std 4 (0.04 mg/ml)	Std 5 (0.05 mg/ml)
Saf su	3	3	3	3	3	3	3
Sülfomolibdat	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Askorbik asit	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra örnek ve standart tüplerin 620 nm dalga boyuna karşılık gelen absorban değerleri ölçülür. Ölçülen absorban değerleri, fosfat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek standart kalibrasyon grafiği çizilir ve grafikten 100 mL kandaki fosfat miktarı hesaplanır.

Çözeltiler

Triklor asetik asit (%30): 30 g triklor asetik asit distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

Sülfomolibdat: Eşit hacimde 5 M H₂SO₄ ve %7.5'lük sodyum molibdat çözeltileri karıştırılarak hazırlanır.

Askorbik asit (%1): 1 g askorbik asit distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır. Çözelti günlük hazırlanır.

Stok standart fosfat çözeltisi (1 mg/mL): 0.4393 g KH₂PO₄ suda çözülür. Üzerine 1 mL 5M H₂SO₄ eklenir ve 100 mL'ye tamamlanır.

Deney 4. Oksihemoglobin-Deoksihemoglobin Dengesinin İncelenmesi

Deneyin prensibi: Hemoglobinin O₂ bağlayıp bırakması esasına dayanan nitel bir çalışmadır.

Deneyin yapılışı:

I. Aşama: Oksihemoglobin çözeltisinin hazırlanması

Bir santrifüj tüpüne kan örneğinden 3-4 mL alınır, 5 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı atılır. Kalan çökelek üzerine 0.2 M NaCl çözeltisinden 5 mL koyulup karıştırılır,

santrifüjlenir. Üstteki sıvı kısım (süpernatant) atılır. Daha sonra tüpteki çökelek 5 mL saf su ile ayırma hunisine aktarılır. 5 mL toluen eklenerek 3-4 dakika şiddetle çalkalanır. Oda sıcaklığında fazlar ayrılincaya kadar bekletilir. Alt kısımda ayrılan sıvı faz bir tüpe alınır, bu oksihemoglobin çözeltisidir, üstteki toluen fazı atılır.

II. Aşama:

- (1) 2 mL stokes ayıracı bir tüpe alınır.
- (2) Üzerine yeşil bir renk elde edilinceye kadar damla damla amonyak çözeltisi ilave edilir.
- (3) Bu çözelti, bir tüpte bulunan 5 mL oksihemoglobin çözeltisine, kırmızı renk mor renge dönüşüncye kadar damla damla ilave edilir. Mor rengin oluşması oksihemoglobinin deoksihemoglobine dönüştüğünü göstermektedir.
- (4) Oluşan mor renkli deoksihemoglobin çözeltisi, petri kabına boşaltılarak 15 dk bekletilir. Bunun sonucunda deoksihemoglobin yeniden oksijen bağlayarak kırmızı renkli oksihemoglobine dönüşür.

Çözeltiler

Stokes çözeltisi: 3 g tartarik asit 100 mL suda çözülür. Bu çözelti içinde 2 g demir II sülfat hepta hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) çözülerek hazırlanır. Çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- (1) http://www.outreach.canterbury.ac.nz/chemistry/documents/chloride_mohr.pdf
- (2) Clark, E. P., and Collip, J. B., *J. Biol. Chem.*, 63, 461 (1925).
- (3) Murphy, J. and Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27, 31–37 (1962).
- (4) Stokes, G. G. *Proc. Roy. Soc. London* 13, 355 (1864).