

GENEL BİLGİLER VE KURALLAR

Verimli bir laboratuvar çalışması için öğrencilerin aşağıdaki kurallara uymaları gerekmektedir.

1.1. Laboratuvarda Uyulması Gereken Temel Kurallar

- (1) Çeşitli kimyasal maddelerin etkilerinden korunmak amacıyla laboratuvar önlüğü giyilmelidir.
- (2) Laboratuvarda herhangi bir şey yenmemeli ve içilmemelidir.
- (3) Çalışılan ortam, kullanılan alet ve cam malzemeler temiz olmalı ve kullanıldıktan sonra temiz bırakılmalıdır.
- (4) Kimyasal maddelere elle dokunulmamalı, tadına ve kokusuna bakılmamalıdır.
- (5) İçinde reaktif veya kimyasal madde bulunan kapların ağzı kapalı tutulmalıdır.
- (6) Herhangi bir laboratuvar kazası durumunda vakit geçirmeden laboratuvar sorumlusuna haber verilmelidir.
- (7) Laboratuvarda kullanılan araç ve cihazların çok temiz olması gereklidir.
- (8) Başka bir tüpe veya kaba aktarılan reaktiflerin şişelerinin etiketleri yukarı kısımda tutulmalı ve etiketin reaktifle kirletilmesi önlenmelidir
- (9) Reaktifin aktarılması, etiketin karşısına gelen şişe ağzından yapılmalı ve kapaklar zaman geçirmeden kapatılmalıdır.
- (10) Reaktifler yöntemde belirtilen ölçülerde kullanılmalıdır.
- (11) Pipetle çalışılıyorsa, bir pipet yalnız bir reaktif için kullanılmalıdır, başka bir reaktif için kullanılmamalıdır.
- (12) Deney tüplerinin ısıtılmasının gerektiği deneylerde tüp hafifçe eğilir ve sıvı yüzeyinin biraz altından ısıtılır. Aynı zamanda kaynamadan doğan sıçramaları önlemek için de tüp düzenli bir biçimde ve dikkatlice sallanır. Isıtılan tüpün ağzı da kimsenin bulunmadığı yöne çevrilir.
- (13) Bir sıvının uzun süre kaynatılması gerektiğinde, beher (veya erlenmayer) ya Bunzen beki üzerindeki metal eleğe ya da ısıtılan saca yerleştirilir. Deneyden hoş olmayan kokular çıkıyorsa, işlem çeker ocakta yapılmalıdır.
- (14) Su veya sulu bir çözelti hiçbir zaman derişik sülfürik asit (der. H_2SO_4) içerisine dökülmemelidir. Çünkü bu işlem çok ekzotermik cereyan edeceği için tehlikeli sıçramalar meydana gelebilir ve bu da istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Derişik sülfürik asit seyreltilecekse, derişik sülfürik asit suya azar azar ilave edilmeli ve aynı anda bir cam çubukla karıştırılmalıdır.

(15) Derişik sülfürik asidin temas etmemesi gereken diğer bir kimyasal madde de potasyum ferrosiyandır. Çünkü bu temastan çok zehirli siyanür asidi (HCN) açığa çıkar.

(16) Çabuk alev alabilen bir sıvı ile (eter, alkol, karbon sülfür gibi) ateş yakınında çalışılmamalıdır. Bu gibi sıvıların bulunduğu çözeltiler ısıtmak için istenirse sıcak su banyosu kullanılmalıdır.

(17) Deney tüpü hiçbir zaman dip kısmından ısıtılmamalıdır. Özellikle bazik özellikli çözelti ile deney tüplerinin ısıtılmasında kaynamanın ve sıçramanın kolay olduğu unutmamalıdır. Koklama ve tatma testleri hiçbir zaman yapılmaz. Isıtma sırasında sıvı sıçramalarına karşı güvenlik gözlüğü takılmalıdır.

(18) İdrar ve kan örnekleri ile çalışılırken mutlaka eldiven giyilmeli ve deney sonrasında kullanılan tüp ve pipetler çamaşır suyu ile yıkanmalıdır.

1.1.2. Laboratuvar kazalarında ilk yardım

Kimyasal maddelerin yutulması veya dökülüp deri ile teması gibi olası laboratuvar kazalarında, soğukkanlı davranılarak laboratuvar sorumlusuna durum hemen bildirilmeli ve doktora gitmeden önce aşağıdaki acil durum önlemleri alınmalıdır.

a) Asit yanıkları: Asitlerin ele dökülmesi veya yüze sıçraması durumunda, asitin sıçradığı yer önce bol su, sonra bikarbonat çözeltisi ve daha sonra tekrar bol su ile yıkanmalıdır. Asitlerin göze sıçraması durumunda da göz bol su ile yıkanmalı, sonra %1'lik sodyum bikarbonat çözeltisi ile banyo yaptırılmalı ve mutlaka göz doktoruna başvurulmalıdır.

b) Baz yanıkları: Bazların neden olduğu yanıklarda yanan yer sırasıyla bol su, sonra %1'lik asetik asit çözeltisi ve daha sonra tekrar bol su ile yıkanmalıdır.

c) Yutulan maddelerle olan zehirlenmeler: Eğer asit yutulmuş ise, önce bol su sonra sodyum bikarbonat çözeltisi içirilmelidir. Yutulan baz ise önce bol su, sonra sirke (ya da %1'lik asetik asit çözeltisi) veya limon suyu (ya da sitrik asit çözeltisi) içirilmelidir.

1.2. Biyokimyasal Analizler

Bu analizler, biyokimya veya klinik biyokimya laboratuvarlarında yapılmaktadır. Biyolojik materyallerde, hastalıkların tanısı, bir hastalığın şiddetinin belirlenmesi, bir hastalığın tedavisinin izlenmesi gibi durumlarda istenen maddeleri tanımlama veya miktarlarını belirleme yöntemleridir.

Biyokimya laboratuvarlarında kullanılan teknikler biyokimyasal analiz kapsamına girmektedir. Bu yöntemler, kimyasal, fiziksel ve immünokimyasal yöntemler olmak üzere üçe ayrılır.

1.2.1. Biyokimya laboratuvarlarında sık kullanılan teknikler

Titrimetri (volümetri), bir çözeltideki madde miktarının (analit) konsantrasyonu, ağırlığı ya da hacmi bilinen ve analit ile belirli bir kantitatif reaksiyon verebilen bir başka çözelti (standart çözelti, titrasyon çözeltisi) yardımıyla tayini esasına dayanan analiz yöntemidir.

Spektrofotometri, ışık kaynağı ile prizma arasına yerleştirilen renkli maddenin ışık spektrumunun bazı renklerini absorplaması ve konsantrasyona göre spektrumda zayıf veya kuvvetli bant göstermesi özelliğine dayanan miktar tayin yöntemidir.

Analiz edilen örnek üzerine gönderilen ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletlere kolorimetre veya fotometre, bu seçiciliği prizmalar aracılığı ile yapan aletlere ise spektrofotometre denir.

1.3. Çözeltiler ve Hazırlanmaları

İki veya daha fazla maddenin meydana getirdiği homojen karışımlara çözelti adı verilir. Çözeltiyi oluşturan bileşenlerden fazlaca olan çözücü, az olan çözünenidir. Özel olarak belirtilmemiş ise çözücü sudur.

Çözelti hazırlarken katı maddeler tartı işlemi sırasında yapışmayacakları yüzeylerde tartılmalıdır.

Bir katı madde sıvı içerisinde çözülecekse, behere önce biraz çözücü konulur sonra katı madde ilave edilir ve çözülmesi sağlanır daha sonra bu çözelti balon jöjeye aktarılarak istenilen hacme tamamlanır.

Laboratuvar çalışmalarında kalitatif ve kantitatif tayinler için çeşitli çözeltilerin hazırlanması gerekir. Çözelti hazırlamanın amacı, belirli miktar çözeltide belirli miktarda çözücü ve çözünenin bulunmasını sağlamaktır. Bu amaçla bazı standart tanımlardan faydalanılır.

Ağırlık yüzdesi (%w/w): Bir çözeltinin 100 gramında bulunan madde miktarıdır. Örneğin %37'lik HCl çözeltisi denildiğinde, bu çözeltinin 100 gramında 37 gram HCl içerdiği anlaşılır.

$$\text{Ağırlık(\%)} = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (g)}}{\text{Çözeltinin kütlesi (g)}}$$

Hacimce yüzde (%v/v): Bir çözeltinin 100 mL'sinde bulunan madde miktarı olarak tanımlanır. Örneğin %5'lik etanol çözeltisi denildiğinde 100 mL çözeltinin 5 mL etanol içerdiği anlaşılır.

$$\text{Hacim(\%)} = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (mL)}}{\text{Çözeltinin hacmi (mL)}}$$

Ağırlık-Hacimce yüzde (%w/v): Hibrit bir tanımdır. Örneğin %5'lik NaOH çözeltisi denildiğinde 5 g NaOH'ın 100 mL'ye suyla tamamlanması ile hazırlanması anlaşılır. Rutin laboratuvar çözeltilerinin hazırlanmasında genellikle bu ifade kullanılır.

$$\text{Ağırlık - hacim(\%)} = \frac{\text{Çözünen madde miktarı (g)}}{\text{Çözeltinin hacmi (mL)}}$$

Örnek 1: 0.9 g NaOH'den 500 mL çözeltiyi %g/L ve %w/v olarak hesaplayınız. (NaOH=40 g/mol)

Çözelti 0.9 g/ 500 mL yani 1.8 g/L içerir,

%w/v olarak ise; 1.8 g/L = 0.18 g/ 100 mL = %0.16'lıktır.

Örnek 2: %20'lik 500 mL NaCl çözeltisi hazırlamak için kaç g NaCl gereklidir?

$$\text{\%(w/v)} = \text{g katı/ 100 mL çözelti}$$

$$\text{\%20} = 20 \text{ g NaCl/ 100 mL}$$

Molarite (M): Bir litre çözelti içinde çözünen maddenin molekül sayısını ifade eder.

$$\text{Mol sayısı} = \frac{\text{Maddenin ağırlığı}}{\text{Molekül ağırlığı}} \quad \text{Molarite} = \frac{\text{Çözünen maddenin mol sayısı}}{\text{Çözücü miktarı (L)}}$$

1 mmol= 10 ³ mol	1 nmol= 10 ⁹ mol
1µmol= 10 ⁶ mol	1 pmol= 10 ¹² mol

1 mM = 10 ⁻³ M = 1 mmol/L = 1µmol/mL
1 µM = 10 ⁻⁶ M = 1 µmol/L = 1 nmol/mL
1 nM = 10 ⁻⁹ M = 1 nmol/L = 1 pmol/mL

Örnek 3: 0.01 µM 250 mL NaOH çözeltisi hazırlamak için ne kadar NaOH gereklidir?

$$0.01 \times 10^{-6} \frac{\text{mol NaOH}}{\text{L çözelti}} \times 250 \text{ mL çözelti} \times \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{40 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} = 0.1 \times 10^{-6} \text{ g NaOH alınır,}$$

250 mL'ye suyla tamamlanır.

Örnek 4: 6 M 100 mL HCl çözeltisi nasıl hazırlanır? (HCl için $M_a = 36.5 \text{ g/mol}$, %37 ve

$$d = 1.18 \text{ g/cm}^3)$$

$$6.0 \frac{\text{mol HCl}}{\text{L çözelti}} \times 100 \text{ mL çözelti} \times \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{36.5 \text{ g HCl}}{1 \text{ mol HCl}} \times \frac{100 \text{ g reaktif}}{37 \text{ g HCl}} \times \frac{1 \text{ L reaktif}}{1.18 \times 10^3 \text{ g reaktif}} = 0.05 \text{ L HCl} = 50 \text{ mL}$$

Bu nedenle 50 mL HCl alınarak su ile 100 mL'ye seyreltilir.

Not: Asit çözeltileri hazırlanırken belirli bir miktar su üzerine derişik asit yavaş bir şekilde ilave edilir.

Normalite (N): Bir litrede çözünen maddenin eşdeğer gram sayısını ifade eder.

$$\text{Normalite} = \frac{\text{Çözünen maddenin eşdeğer gram sayısı}}{\text{Çözelti miktarı (L)}}$$

$$\text{Eşdeğer gram} = \frac{\text{Molekül ağırlığı}}{\text{Tesir değeri}}$$

$$\text{Normalite} = \text{Molarite} \times \text{Tesir değeri}$$

Tesir değeri (z): Asitlerin ortama verdiği H^+ sayısı, bazların ortama verdiği OH^- sayısı, tuzların ise ortama verdiği ya da aldığı elektron sayısıdır.

Örnek 5: 0.4 N 150 mL H_2SO_4 çözeltisini hazırlayınız. (H_2SO_4 için $M_a = 98 \text{ g/mol}$, %96, $d = 1.841 \text{ g/cm}^3$)

$$\text{Eşdeğer gram } \text{H}_2\text{SO}_4 = \frac{98}{2} = 49 \text{ g/mol}$$

$$0.4 \frac{\text{mol H}_2\text{SO}_4}{\text{L çözelti}} \times 500 \text{ mL çözelti} \times \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{49 \text{ g H}_2\text{SO}_4}{1 \text{ mol H}_2\text{SO}_4} \times \frac{100 \text{ g reaktif}}{96 \text{ g H}_2\text{SO}_4} \times \frac{1 \text{ L reaktif}}{1.841 \times 10^3 \text{ g reaktif}}$$

$$= 0.0055 \text{ L H}_2\text{SO}_4 = 5.5 \text{ mL}$$

Bu nedenle 5.5 mL H₂SO₄ alınarak su ile 500 mL'ye seyreltilir.

Seyreltme: Bazı durumlarda elde bulunan yüksek konsantrasyondaki bir çözeltilerden daha düşük konsantrasyonlu başka çözeltiler de hazırlanabilir. Bu işlemler aşağıdaki bağıntı kullanılır;

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

C₁ : İlk çözeltinin konsantrasyonu

V₁ : İlk çözeltinin hacmi

C₂ : İstenilen konsantrasyon

V₂ : İstenilen hacim

Örnek 6: %95'lik etil alkolden 400 mL %25'lik yeni bir alkol çözeltisi nasıl hazırlanır?

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

$$95 \times V_1 = 25 \times 400 \quad V_1 = 105 \text{ mL}$$

105 mL %95'lik etil alkol saf su ile 400 mL'ye tamamlanursa istenilen çözelti hazırlanmış olur.

1.3.1. Biyokimyada kullanılan çözeltiler

İzotonik çözelti: Osmotik basıncı hücre suyunun osmotik basıncına eşit olan çözeltilere denir. İzotonik çözelti içerisine konan hücre değişikliğe uğramaz. %0.9'luk NaCl çözeltisi, vücut sıvısına izotoniktir. Buna fizyolojik çözelti (serum fizyolojik) denir.

Hipotonik çözelti: Osmotik basıncı hücre suyunun osmotik basıncından düşük olan çözeltilere denir. Hipotonik çözelti içerisine konan hücrede şişme gözlenir. Hipotonik ortamda hücrenin su alarak şişmesine deplazmoliz denir.

Hipertonik çözelti: Osmotik basıncı hücre suyunun osmotik basıncından yüksek olan çözeltilere denir. Hipertonik çözelti içerisine konan hücrede büzülme gözlenir. Hipertonik ortamda hücrenin su kaybetmesi olayına plazmoliz denilir.

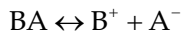
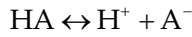
1.4. Asit-Baz Dengesi

Asitler proton veren; bazlar ise proton alan maddeler olarak tanımlanır. Başka bir ifadeyle asitler hidronyum iyonu, bazlar ise hidroksil iyonu verirler. Hem proton vericisi (donör), hem proton alıcısı (akseptör) olan maddelere 'amfoter maddeler' denir. Asit ve bazların suda çözüldüklerinde iyonlaşmaları farklıdır. Buna göre zayıf asit, kuvvetli asit, zayıf baz veya kuvvetli baz tanımı yapılır. Suda çözüldüklerinde büyük oranda iyonize olan asitler kuvvetli asitlerdir (K_a değerleri büyük, pK_a değerleri küçük).

1.4.1. Tamponlar

Zayıf bir asit ile onun eşlenik bazı veya zayıf bir baz ile onun eşlenik asidinin oluşturduğu çözeltilere tampon çözeltiler denir. Tamponlar, küçük miktarlarda asit (H^+) veya baz (OH^-) eklendiğinde pH değişikliklerine karşı koyma eğiliminde olan sulu sistemlerdir.

Zayıf asit ve tuzunu içeren tampon çözeltilerinin pH'ı Handerson-Hasselbach eşitliği ile hesaplanabilmektedir. Zayıf asit HA ve konjuge bazı BA ile gösterilirse;



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

Ortamda tuz olmadığında zayıf asit olan HA çok az iyonlaşır. Asit çözeltisine BA eklendiğinde bütün A^- iyonları daha fazla iyonlaşan BA'dan gelir. Seyreltik tampon çözeltilerde iyonlaşmamış asit konsantrasyonu $[HA]$ toplam asit konsantrasyonuna eşittir. Aynı zamanda asit iyon derişimi $[A^-]$ toplam tuz konsantrasyonu olan $[BA]$ 'ya eşittir. Yukarıdaki denklem buna göre düzenlenirse;

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[BA]} \quad \text{veya} \quad [H^+] = K_a \frac{[\text{asit}]}{[\text{tuz}]}$$

Tampon içerisindeki asitin tuza moleküler oranı ve K_a değeri biliniyorsa, her iki tarafın eksi logaritması alınarak pH değeri hesaplanır;

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = -\log\left[K_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{BA}]}\right]$$

$$\text{pH} = -\log K_a - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{BA}]}$$

$$-\log K_a = \text{p}K_a \quad \text{ve} \quad -\log \frac{[\text{HA}]}{[\text{BA}]} = \log \frac{[\text{BA}]}{[\text{HA}]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{BA}]}{[\text{HA}]} \quad \text{veya} \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{\text{tuz}}{\text{asit}}$$

Örnek 1: 0.1 M 500 mL pH 7.4 fosfat tamponu nasıl hazırlanır? (disodyum monohidrojenfosfat hepta hidrat ve monosodyum dihidrojenfosfat dihidrat $\text{p}K_{a2}$ değeri 7.2 ve Na: 23, P: 31, O: 16, H: 1 g/mol)

$$7.4 = 7.2 + \log \frac{\text{HPO}_4^{2-}}{\text{H}_2\text{PO}_4^-} \quad \text{HPO}_4^{2-} = a \quad \text{H}_2\text{PO}_4^- = b \text{ olsun.}$$

$$a/b = 1.58 \quad a + b = 0.1 \quad a = 1.58b$$

$$2.58b = 0.1 \quad b = 0.039 \quad a = 0.061$$

500 mL tampon çözelti için 0.061 M disodyum monohidrojenfosfat hepta hidrat ve 0.039 M monosodyum dihidrojenfosfat dihidrat miktarları hesaplanır 0.1 N H_3PO_4 ve 0.1 M NaOH ile pH 7.4'e ayarlanır.

1.4.2. pH'nin biyolojik önemi

Biyokimyacılar için, suda çözüldüklerinde tamamen iyonize olmayan zayıf asit ve bazların davranışı önemlidir. Zayıf asit ve bazlar, metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Organizmada bulunan doku ve sıvıların normal fonksiyonunu gerçekleştirebilmesi için pH'nin belirli sınırlar içerisinde kalması gerekmektedir. Örneğin, kan serumunun pH'si yaklaşık 7.4 dür ve vücut, kimyasal ve fiziksel mekanizmalarla kan pH'ini kontrol altında tutabilmektedir. Asit-baz metabolizması bozuklukları özellikle yoğun bakım üniteleri ile acil servis hastalarında sık rastlanan klinik sorunlardandır.

Normal pH, hücre içi enzimlerin aktivitesinin sürdürülmesi için zorunludur, bu yüzden pH değişiklikleri ölümcül olabilir. Hücre içi ile hücre dışı pH sürekli olarak bir denge halindedir. Bu

dengeinin oluşumunda hem bazı iyon pompaları, hem de hücre içindeki tamponlar rol oynar. Normalde kan H⁺ konsantrasyonu 40 nmol/L düzeyindedir. Bu rakamın pH'si 7.4 olarak bulunur. Fizyolojik koşullarda pH 0.04-0.05'lik oynamalar gösterebilir. pH'de gerçekleşen 0.1-0.2 birimlik değişiklikler ise kendini ciddi kardiyovasküler ve nörolojik belirtilerle gösterir. Yaşamın mümkün olabildiği en düşük H⁺ konsantrasyonu 16 nmol/L (pH 7.8), en yüksek konsantrasyon ise 160 nmol/L (pH 6.8)'dir.

1.4.3. Vücut sıvı ve hücrelerindeki tampon sistemler ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi

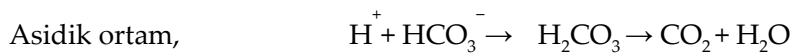
Vücutta asit-baz dengesinin sağlanmasında etkili başlıca dört tampon sistemi vardır. Bunlar,

- (a) Karbonik asit/bikarbonat tampon sistemi.
- (b) Primer fosfat/sekonder fosfat tampon sistemi.
- (c) Asit protein/proteinat tampon sistemi.
- (d) Asit hemoglobin/hemoglobinat tampon sistemi.

(a) Karbonik asit/bikarbonat tampon sistemi

Hüce dışı (ekstrasellüler) sistemdeki asit baz dengesini sağlayan en güçlü tampon sistemi, bikarbonat tampon sistemidir. Böbrekler HCO₃⁻, akciğerler CO₂ konsantrasyonunun başlıca belirleyicileridir. Normal koşullarda kanda pH 7.35-7.45, P_{CO2} 37-42 mmHg, HCO₃⁻ konsantrasyonu 22-26 mEq/L arasında değişir. Plazma HCO₃⁻ düzeyinde azalma veya CO₂'te artma **asidemi**, HCO₃⁻ düzeyinde artma veya CO₂'te azalma ise **alkalemi** olarak olarak adlandırılan klinik tablolara neden olur.

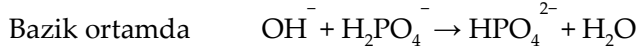
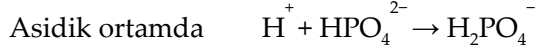
Aşağıdaki reaksiyonlar ile hücre dışı sıvının pH'si sabit tutulmaya çalışılır.



(b) Primer fosfat/sekonder fosfat tampon sistemi

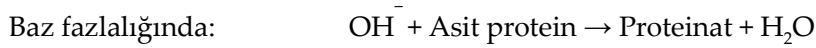
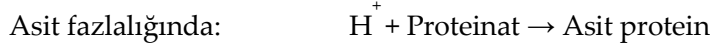
Primer fosfat/sekonder fosfat tampon sistemi, daha çok hücre içi (intraseküler) sıvıların tampon sistemidir. Eritrositlerde ve böbrek tubulus hücrelerinde fazlaca bulunur. Primer fosfat/sekonder fosfat tampon sistemi, böbreklerden H⁺ iyonlarının H₂PO₄⁻ şeklinde atılabilmelerinde önemli rol oynar.

Aşağıdaki reaksiyonlar ile ortamın pH'si sabit tutulmaya çalışılır.



(c) Asit protein/proteinat tampon sistemi

Doku hücrelerinde en çok kullanılan tampon sistemlerindendir, kısmen plazmada da işlev görür. Aşağıdaki reaksiyonlar ile ortamın pH'si sabit tutulmaya çalışılır.



(d) Asit hemoglobin/hemoglobinat tampon sistemi

Eritrositlerde bulunan tampon sistemidir. Karbondioksitin HCO_3^- şeklinde taşınmasında etkilidir. CO_2 'in %5'i plazmada serbest olarak bulunur, %20'si eritrositlerde karbohemoglobin şeklinde bulunur ve %75'i kanda HCO_3^- şeklinde taşınır.

Hücrel metabolizma olaylarında oluşan CO_2 , doku boşluklarına ve kan plazmasına geçer. Plazmada konsantrasyonu artan CO_2 ise eritrositlere geçer.

1.5. Antikoagülanlar

Kanın pıhtılaşmasını önleyen maddelere antikoagülanlar adı verilir. Önemli antikoagülanlardan bazıları şunlardır.

İn vitro (canlı dışında) olarak kullanılanlar; oksalat, sitrat, florür, EDTA ve heparindir.

İn vivo (canlı içinde) olarak kullanılanlar ise; heparin, dikumarol ve türevleri, insan protein C (K vitamini bağımlı glikoprotein)'dir.

Oksalatlar: Kalsiyumu bağlayarak kanın pıhtılaşmasını önler. %20'lik çözeltisi kullanılır. 10 mL kan için 0.1 mL çözelti gerekir. Hemoglobin tayini, eritrosit ve lökosit sayımları, hematokrit tayini yapılabilir. Asit-baz dengesini incelemek, elektrolit ve bazı kalsiyum ölçüm yöntemleri, laktat dehidrogenaz gibi bazı enzimlerin tayini için ise uygun değildir. Yayma preparatlar için de kullanılamaz.

Sitratlar: Kalsiyumu bağlayarak kanın pıhtılaşmasını önler. 1 mL kan için 5 mg sodyum sitrat gerekir. %3.8'lik çözeltisi kullanılır.

Florürler: Kalsiyumu bağlayarak kanın pıhtılaşmasını önler. 1 mL kan için 10 mg sodyum florür gerekir.

EDTA (etilendiamintetraasetikasit): Kalsiyum ile kompleks yaparak kanın pıhtılaşmasını önler. 1 mL kan için 1 mg Na-EDTA gerekir.

Heparin: Spesifik olarak pıhtılaşma faktörleri IX ve XI'i bağlayarak, antitrombin III ile etkileşip trombini inaktive etme yeteneğini artırarak kanın pıhtılaşmasını önler. 1 mL kan için 75 IU heparin gerekir.

Kumarin grubu ilaçlar: Vitamin K antagonistleri; kinon türevlerinin aktif hidrokinon şekillerine indirgenmelerini inhibe ederler. Pıhtılaşma faktörü II, VII, IX ve X'un amino-terminal bölgelerinde glutamik asit kalıntılarının vitamin K'ye bağımlı karboksilasyonu inhibe olur.

İnsan protein C: Trombinle aktif hale gelir, pıhtılaşma faktörleri V ile VIIIa'yı inaktif hale getirir.

1.6. Biyolojik Örneklerdeki Proteinlerin Çöktürülmesi

Yapılan biyokimyasal analizleri bozan maddelerin başında proteinler gelmektedir. Kan ve vücut sıvılarında bulunan pek çok maddenin tayininde, öncelikle bu proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için proteinlerin asit, ağır metal ya da antikor yardımıyla çöktürülmesi ve çöktürülmesinin süzülerek ya da santrifüjlenerek uzaklaştırılması gerekmektedir. Kalan süzüntüye 'proteinsiz filtrat' adı verilir. Proteinsiz filtratların elde edilmesinde çoğunlukla ağır metaller (çinko, kadmiyum, demir, civa, bakır, kurşun), derişik asitler ve spesifik antikorlar kullanılmaktadır.

1.6.1. Asitler ile çöktürme

Serumda bulunan proteinlerdeki serbest amino grupları gibi bazik gruplar sülfosalisilik asit ile birleşirler ve protein- sülfosalisilik asit bileşığı oluşur. Bu bileşik suda çözünmediğinden çöker. Bu proteinler trikloroasetik asit (TCA)'in anyonları ile bağlanarak da suda çözünmeyen tuzları oluşturarak çökerler. Birçok protein son konsantrasyonu %5 (v/v) TCA ilavesiyle çöker. Molekül ağırlığı 20.000'in altında olan proteinler için %10 civarında TCA eklenmesi gerekebilir. Sıvı faz santrifüjleme ile uzaklaştırılarak çökelek birkaç kez tampon (veya liyofilize edilecekse saf su) ile yıkanır ve az miktarda tamponda (veya saf suda) süspanse edilir.

1.6.2. Tuz ile çöktürme (*Salting Out*)

Nötral tuzların ortama giderek artan miktarda eklenmesi ile çöktürme, kullanılan en yaygın yöntemdir. Ortama eklenecek nötral bir tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (biraraya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar.

Tuzların çöktürücü etkisi, protein moleküllerinin bağladığı suyu çekmelerinden kaynaklanır. Salting-out protein yüzeyinin hidrofobik yapısına bağlıdır. Suyu sevmeyen gruplar genellikle proteinin iç kısmında bulunurlar. Sisteme tuzlar eklendiğinde su, tuz iyonlarını çözer ve tuz derişimi arttıkça iç kısımlarda yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çöker. Bu yöntem ise "salting out" denir.

1.7. Kan

Kan, hücrelerden ve "plazma " adı verilen bir sıvıdan oluşmuştur. Hücreler eritrositler (kırmızı kan hücreleri), lökositler (beyaz kan hücreleri) ve trombositlerdir. Hücrelerin %99'undan fazlasını eritrositler oluşturur. Eritrositler kanın oksijen taşıyan hücreleridir. Lökositler vücudu enfeksiyonlara ve kansere karşı koruyan hücrelerdir. Trombositler ise kanın pıhtılaşmasında görev alırlar.

Tam kan (total kan): Serum veya plazması ayrılmamış kandır. Antikoagulanlı tüpe alınır. Kan sayımı (hemogram) ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) tayini, kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) eldesi için gereklidir.

Serum: Pıhtılaşmış kandan şekilli elemanlar (eritrosit, lökosit, trombosit) ayrıldıktan sonra geri kalan sıvı kısmıdır. Antikoagulansız tüpe alınan kandan elde edilir. Bilirübin ve karotenler serumun sarı renkli olmasına neden olur. Birçok analiz için tercih edilir.

Plazma: Pıhtılaşması antikoagulanlarla önlenmiş kandan şekilli elemanlar ayrıldıktan sonra geri kalan sıvı kısmıdır. Antikoagulanlı tüpe alınan kandan elde edilir. Bazı özel analizler için gereklidir. Plazma kanın sıvı kısmıdır, su içinde çözülmüş çok sayıda organik ve inorganik maddelerden oluşur. Bu maddelerden en önemlisi proteinlerdir. Proteinler plazmanın toplam ağırlığının yaklaşık %7'sini oluşturur. Plazma proteinleri 3 ana gruba ayrılır. Bunlar, albüminler, globulinler ve fibrinojendir. Plazma ile serum arasındaki fark, plazmanın fibrinojen içermesidir.

1.8. Deneysel Çalışmalar

Deney 1.8.1. Trikloroasetik Asit ile Proteinsiz Filtrat Hazırlanması

Deneyin prensibi: Kan proteinlerinin trikloroasetik asit ile oluşturduğu çözünmeyen tuzların çöktürülmesi esasına dayanır.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 mL kan veya serum ilave edilir ve üzerine damla damla 0.5 mL %20 trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi konulur. İyice çalkalanan tüp 10 dk bekletilir ve filtre kağıdından süzülür. Süzüntü, protein dışında tüm maddeleri içermektedir.

Çözeltiler:

%20 TCA: 20 mL TCA alınır 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

Deney 1.8.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Sonucunda Serumdaki Globulinler ile Albuminlerin Ayrılması

Deneyin prensibi: Globulinler, yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisinde, albuminler ise tam doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökerler. Serumda bulunan globulinler ve albuminler, seyreltik çözeltide çözünmüş haldedirler. Seyreltik çözeltinin yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle globulinler çökerler. Süzme sırasında globulinler süzgeç kağıdının üzerinde kalırken albuminler çözünmüş halde süzgeç kağıdından süzüntüye geçerler ve böylece globulinlerle albuminler birbirlerinden ayrılmış olurlar. Süzüntünün tam doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle de albuminler çöker. Çözünmüş proteinlerin amonyum sülfat gibi nötral tuzların etkisiyle çökmelerinin nedeni, protein moleküllerine bağlı suyun çekilmesidir.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 mL serum konur. Deney tüpündeki serum üzerine 1 mL su eklenerek karıştırılır ve böylece serum seyreltilir. Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 2 mL doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklenerek karıştırılır. Böylece oluşan yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde beyaz bir bulanıklık olduğu gözlenir. Deney tüpündeki bulanık karışım süzülür. Berrak olan süzüntüye azar azar amonyum sülfat kristalleri atılıp karıştırılarak doymuş amonyum sülfat çözeltisi elde edilir. Doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde yeniden bulanıklık olduğu gözlenir.

Deney 1.8.3. Süt kazeininin eldesi ve tanımlanması deneyi

Deneyin prensibi: Sütteki kazein bir fosfoproteindir; asetik asit ile denatüre olur ve protein tanımlama yöntemleriyle tanımlanır.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 5 mL süt konur ve 1:1 oranında su ile seyreltilir. Tüpteki sulandırılmış süt üzerine damla damla 2 N asetik asit çözeltisi eklenir ve küçük topaklar halinde bir çökelti oluştuğu görülür. İkinci basamakta oluşan çökelti, karışımın filtre kağıdından süzülmesiyle filtre kağıdı üzerine alınır; süzüntü de bir başka tüpte toplanır (süzüntü sonraki deneyde kullanılacaktır). Filtre kağıdı üzerine alınan çökelti ile proteinleri tanımlama deneylerinden biüret deneyi yapılır ve (+) sonuç gözlenmesiyle kazeinin protein olduğu tanımlanmış olur. Süzgeç kağıdı üzerindeki çökeltiyeye reaktif ilave edilir.

Çözeltiler:

2 N asetik asit: 11 mL %99.9'luk asetik asit alınır, distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Biüret reaktifi: 6 g Na-K tartarat, 1.5 g kristalize bakır sülfat 300 mL %10'luk NaOH, hacim distile suyla 1 litreye tamamlanarak karıştırılıp çözülür.

Deney 1.8.4. Sütteki laktalbumin ile laktoglobulini çöktürme ve tanımlama deneyi

Deneyin prensibi: Sütteki laktalbumin ile laktoglobulin ısı etkisiyle denatüre olurlar ve proteinleri tanımlama yöntemleriyle tanımlanabilirler.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne Deney 3'de elde edilen süzüntüden 3 mL konur. Tüpteki süzüntüye 2 damla metil kırmızısı indikatörü damlatılır ve karıştırılır. Tüpteki karışıma, renk sarı oluncaya kadar %5'lik NaOH damlatılarak asitlik giderilir. Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılarak karışım kaynatılır; bu sırada tüpte bir bulanıklık veya çökelti oluştuğu gözlenir. Tüpteki karışım soğutulur ve soğuduktan sonra bir filtre kağıdından süzülür; çökelti, filtre kağıdı üzerine alınır, süzüntü de bir başka tüpte toplanır. Filtre kağıdı üzerine alınan çökelti ile proteinleri tanımlama deneylerinden kurşun asetat deneyi yapılır ve (+) sonuç gözlenmesiyle laktalbumin ile laktoglobulinin protein olduğu tanımlanmış olur.

Çözeltiler:

Metil kırmızısı indikatörü

%5'lik NaOH: 5 g NaOH alınır, distile su ile çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

0.005 M Pb(C₂H₃O₂)₂: 0.16 g Pb(C₂H₃O₂)₂ alınır, distile su ile çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

%40'luk NaOH: 40 g alınır, distile su ile çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

Deney 1.8.5. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Asetat tamponunun hazırlanması (pH= 4)

0.1 M asetat tamponunun hazırlanması için, 82 mL 0.2 M asetik asit ve 18 mL 0.2 M sodyum asetat çözeltilerinden oluşan karışım bidistile suyla 200 mL'ye tamamlanır. pH metre ile pH 4'e ayarlanır.

Fosfat tamponunun hazırlanması (pH= 7)

0.1 M fosfat tamponunun hazırlanması için, 39 mL 0.2 M monobazik sodyum fosfat ve 61 mL 0.2 M dibazik sodyum fosfat çözeltilerinden oluşan karışım bidistile suyla 200 mL'ye tamamlanır. pH metre ile pH 7'e ayarlanır.

Karbonat tamponunun hazırlanması (pH= 10)

0.1 M karbonat tamponunun hazırlanması için, 27.5 mL 0.2 M sodyum karbonat ve 22.5 mL 0.2 M sodyum bikarbonat çözeltilerinden oluşan karışım bidistile suyla 200 mL'ye tamamlanır. pH metre ile pH 10'a ayarlanır.

Deney 1.8.6. Seyrelterek Çözelti Hazırlama ve Spektrofotometrik Tayin

Seyreltme-I

1. 1 M CuSO_4 çözeltisi hazırlayınız ($M_a=159.55$ g/mol)
2. 1 M CuSO_4 çözeltisini kullanarak toplam hacim 1 mL olacak şekilde suyla seyrelterek aşağıdaki CuSO_4 çözeltilerini hazırlayınız.

1:2, 1:5, 1:10, 1:50 ve 1:100

3. Her bir seyreltmenin absorbans değerini 700 nm'de belirleyiniz.
4. Konsantrasyonu bilinmeyen CuSO_4 çözeltisinin absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon 2. basamakta elde edilen standart kalibrasyon grafiğinden bulunur.

KAYNAKLAR

- (1) Öztop, H.N. ve Candan, F. Biyokimya Laboratuvarı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, Sivas.
- (2) Fahrünnisa P. 2000. Biyokimya, Ankara.
- (3) www.ekimya.com/2/15039a.gif.
- (4) Aktümsek, A. ve Nurulloğlu, Z. Ü. Pratik Biyokimya, Nobel Yayınları, Ankara, Mart, 2007.
- (5) http://www.rose-hulman.edu/~brandt/publications/422_Manual_3rd_Ed.pdf.
- (6) Skoog, D.A, West, D.M, Holler, F.J, 2007, Analytical Chemistry, Bilim Yayıncılık, Ankara, 2007.
- (7) <http://www.hematoloji.org.tr/files/image/kan/kan1.jpg>