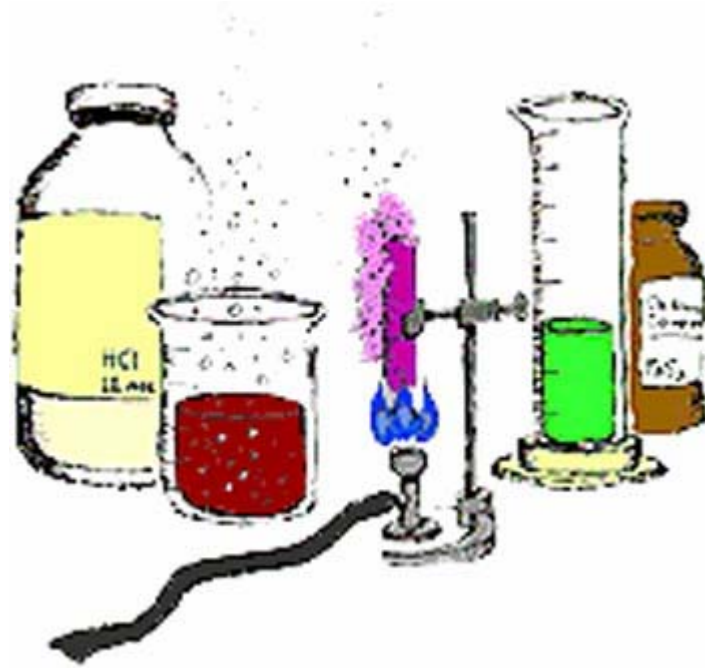


T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

# ORGANİK KİMYA VE BİYOKİMYA UYGULAMALARI



Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK

AYDIN  
2007

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## 1. LABORATUVAR ARAÇ VE GEREÇLERİ

- 1.1. Cam, Porselen, Plastik ve Diğer Malzemeler
- 1.2. Ölçü Sistemleri
- 1.3. Ağırlık Ölçümü ve Araçları (Teraziler)
- 1.4. Sıvı Hacim Ölçümü ve Araçları
- 1.5. Kimyasal Maddeler (Kimyasallar)
- 1.6. Laboratuvarda Güvenli Çalışma

## 2. ÇÖZELTİLER, KONSANTRASYONLAR VE ÇÖZELTİ HAZIRLAMA

- 2.1. Çözeltiler
- 2.2. Çözelti Konsantrasyonları

## 3. pH, ASİTLİK-BAZLIK VE TAMPON ÇÖZELTİLER

- 3.1. pH
- 3.2. Asitler ve Bazlar
- 3.3. Tamponlar

## 4. BİYOKİMYA LABORATUVARLARINDA KULLANILAN TEKNİKLER-MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMLERİ

- 4.1. Kimyasal Yöntemler
- 4.2. Fiziksel Yöntemler

## 5. KARBOHİDRAT DENEYLERİ

- 5.1. Monosakkarid Deneyleri
- 5.2. Disakkarid Deneyleri
- 5.3. Polisakkarid Deneyleri

## 6. AMİNO ASİT DENEYLERİ

- 6.1. Amino Asidler ve Özellikleri
- 6.2. Amino Asidlerin Kimyasal Tepkimeleri
- 6.3. Amino Asidleri Tanımlama Deneyleri

## 7. PROTEİN DENEYLERİ

- 7.1. Proteinler ve Özellikleri
- 7.2. Proteinlerin Sınıflandırılmaları
- 7.3. Proteinleri Tanımlama Deneyleri
- 7.4. Proteinleri Ayırma ve Saflaştırma Deneyleri
- 7.5. Proteinlerin Amino Asit Dizilerini Tayin Deneyleri

## 8. ENZİM DENEYLERİ

- 8.1. Enzimler ve Özellikleri
- 8.2. Enzim Kinetikleri
- 8.3. Enzim Deneyleri

## 9. LİPİD DENEYLERİ

### 9.1. Lipidler ve Özellikleri

### 9.2. Lipidleri Tanımlama Deneyleri

## 10. SAFRA DENEYLERİ

### 10.1. Safra ve Özellikleri

### 10.2. Safra Deneyleri

## 11. İDRARIN FİZİKSEL BAKISI

### 11.1. İdrarın Fiziksel Özellikleri

### 11.2. İdrarın Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi

## 12. İDRARIN KİMYASAL BAKISI

### 12.1. İdrarın Kimyasal Yapısı

### 12.2. Normal Bir İdrardaki Maddeleri Tanımlama Deneyleri

### 12.3. İdrarda Patolojik Maddeleri Arama Deneyleri

### 12.4. İdrar Yolları Taşlarının İncelenmesi

## 13. İDRAR SEDİMENTİNİN İNCELENMESİ

## 14. SÜT DENEYLERİ

### 14.1. Süt ve Özellikleri

### 14.2. Süt Deneyleri

## 15. MİDE SIVISI DENEYLERİ

### 15.1. Mide Sıvısı ve Özellikleri

### 15.2. Mide Sıvısı Deneyleri

## 16. KLİNİK BİYOKİMYA LABORATUVARI VE İSTENEN BAZI TESTLER

### 16.1. Klinik Biyokimya Laboratuvarı

### 16.2. Klinik Biyokimya Laboratuvarı için Numuneler

### 16.3. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Numunelerin İşlenmesi

### 16.4. Klinik Biyokimya Laboratuvarından İstenen Bazı Testler

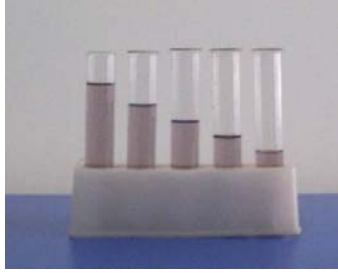
### 16.5. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Analizleri Etkileyen Faktörler

### 16.6. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Kalite Kontrol ve Standardizasyon

# 1. LABORATUVAR ARAÇ VE GEREÇLERİ

## 1.1. Cam, Porselen, Plastik ve Diğer Malzemeler

### 1.1.1. Deney Tüpleri:



Uzun, içi boş, silindirik şeklinde cam malzemelerdir. Ateşe dayanıklı olanlar payreks camdan yapılmışlardır. En sık kullanılanlar 15x1,5 cm boyutunda olanlardır.

Isıtma veya kaynatma deneylerinde tüp hiçbir zaman  $\frac{1}{4}$ 'den fazla doldurulmamalıdır.

Tüp ısıtılacağı zaman tahta bir maşa kullanmak en uygun yoldur. Maşa yoksa tüp ağzına yakın bir yerden başparmak üstte, işaret ve orta parmak altta olacak şekilde tutulur. Tüp alevin üstünde yaklaşık 45°'lik bir açıyla tutulmalıdır. **Tüple yapılan ısıtma deneylerinde tüpün ağzı deneyi yapan kişiye veya bir başkasına yönelik olmamalıdır.** Isıtma sırasında tüpün çatlamaması için hafifçe sallanmalıdır.

### 1.1.2. Santrifüj Tüpü:



Santrifüjde karşılaşılabilecekleri basınca dayanıklı cam veya plastikten yapılmış kısa tüplerdir. Konik veya silindirikler.

#### **Genel maksatlar için kullanılan tüplerin temizlenmesi:**

- 1) Tüp içeriği, açık musluk altında tüp fırçası da kullanılarak boşaltılır.
- 2) Tüpler %5'lik sodyum karbonat çözeltisi içine konur ve 25 dakika süreyle kaynatılır.
- 3) Tüpler, kaynatıldıkları kaptan musluk suyu geçirmek suretiyle soğutulur.
- 4) Tüpler, musluk suyu ve fırça ile iyice yıkanır.
- 5) Tüpler, %2-5'lik HCl çözeltisinde 15 dakika bırakılır.
- 6) Tüpler, önce musluk suyu ile daha sonra distile su ile iyice durulanır.
- 7) Tüpler, üzerlerindeki su süzölmeye bırakılır ve daha sonra bir etüve konularak kurutulur.

*\*Sodyum, Potasyum, kalsiyum, kurşun, cıva gibi metal iyonlarının miktar tayinlerinde kullanılan cam malzeme iyice temizlendikten sonra %20'lik nitrik asit çözeltisinde 12-24 saat bırakılır; 3-4 defa distile su ile yıkanır; sonra sıcak etüve konularak kurutulur.*

### 1.1.3. Kadeh:



Ağızları geniş, dipleri dar olan cam kaplardır. Genellikle idrar koymak için kullanılırlar.

#### 1.1.4. Beherglas:



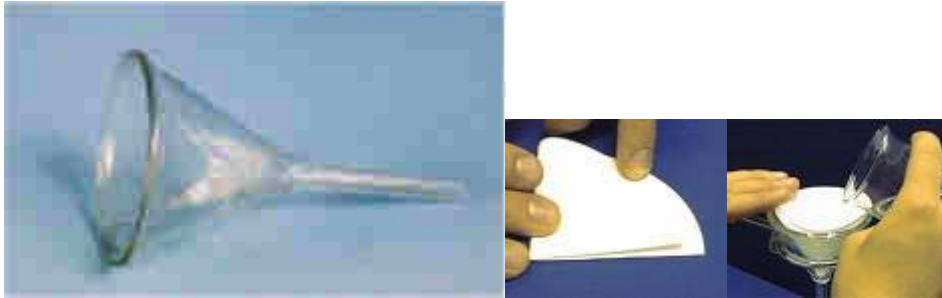
Silindir şeklinde, içindeki sıvının kolayca aktarılmasını sağlamak için üst kenarında oluklu çıkıntısı bulunan, altları düz cam veya plastik kaplardır. Hacimleri 5 ml'den 5000 ml'ye kadar değişir. Adi cam veya ateşe dayanıklı payreks camdan yapılırlar.

#### 1.1.5. Erlen (erlen mayer):



Ağızları dar, konik cam kaplardır. Çeşitli hacimlerde olurlar. Fazlaca buharlaşması istenen çözeltilerin (solüsyonların) kaynatılmasında, titrasyonlarda ve genel amaçlarla kullanılırlar.

#### 1.1.6. Huniler:



Dar boyunlu kaplara sıvıların aktarılmasında ve süzme (filtrasyon) işleminde kullanılırlar. İyi bir süzme için en uygun huniler 58° açılı olanlardır. Hunilerin çapları değişiktir.

Süzme işleminde süzgeç kağıtları kullanılır. Süzgeç (filtre)kağıdı dörde katlanarak bir kare elde edilir, sonra karenin serbest uçlarından çeyrek daire şeklinde kesilir. Süzgeç kağıdı bir tarafa bir kat, diğer tarafa üç kat olacak şekilde ayrılır ve huni içine yerleştirilir. İyi bir süzme yapmak için süzgeç kağıdı huninin kenarlarını aşmamalı, biraz aşağıda kalmalıdır; konan sıvı da hiçbir zaman süzgeç kağıdının seviyesini geçmemeli, hiç değilse birkaç mm aşağıda kalmalıdır.

#### 1.1.7. Krozeler:



### 1.1.8. Kapsüller:



Çeşitli büyüklükte, ağızları daha geniş, dip kısımları dar, cam veya porselenden yapılmış kaplardır.

### 1.1.9. Baget:



Karıştırma, sıvı aktarma gibi işlerde kullanılan içi dolu cam çubuklardır. Çeşitli boyda ve çapta olurlar.

### 1.1.10. Balon:



Alt kısmı geniş ve şişkin, üst kısmı ince bir boyun şeklinde cam kaplardır. Altı düz veya yuvarlak olabilir. Çeşitli hacimlerde olabilirler.

Çözeltilerin hazırlanmasında, ısıtılmaları gerektiğinde bir amyant üzerine konularak kullanılabilirler.

### 1.1.11. Reaktif Şişeleri:



Silindirik şekilli, dar boyunlu, renksiz veya koyu renkli camdan yapılmış, cam veya bakalit kapaklı şişelerdir. Hazırlanan reaktiflerin saklanması için kullanılırlar. Reaktiflerin büyük çoğunluğu ışıktan etkilenip bozduklarından ışık geçirmeyecek renkli şişelerde saklanmaları gerekir.

### 1.1.12. Damlalıklı Şişeler:



Renksiz veya koyu renkli camdan yapılmış şişelerdir. Genel olarak 50 ml'lidirler. Bazılarının kapakları olukludur; şişe eğildiği zaman içindeki sıvının damla damla akmasını sağlar.

### 1.1.13. Saat Camı:



Katı maddeleri tartmak için kullanılan cam malzemedir.

### 1.1.14. Termometre:



Sıcaklık ölçümünde kullanılan araçlardır.

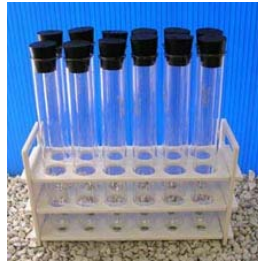
### 1.1.15. Piset:



Distile su kullanımı için gerekli kaplardır. Cam veya plastik olabilir; plastik olanlar sıkmakla su verir.

Az miktarda su eksikliklerini tamamlamada kullanılırlar.

### 1.1.16. Süpor (Port-tüp):



Deney tüplerinin konulmasına yarayan tahta, metal veya plastikten yapılmış araçlardır. Değişik ebatta olurlar.

### 1.1.17. Havanlar:



Katı maddeleri küçültüp toz haline getirmeye yaradıkları gibi, katı bir maddeyi bir sıvı içinde ezerek dağıtmaya ve böylece çözünmesini kolaylaştırmaya yararlar. Cilasız porselen, cam, çelik gibi çeşitli maddelerden yapılırlar.

Havanlar kullanıldıktan sonra hemen yıkanmalıdır.

### 1.1.18. Maşalar:



Isıtılacak bir kabı emniyetle tutmaya yararlar. Metal veya tahtadan yapılırlar.

### 1.1.19. Fırçalar:



Tüp ve diğer cam malzemelerin mekanik temizliği için kullanılan araçlardır.

***Bir çalışmada kullanılan cam malzemeler hemen akan su altında yıkanmalı ve fırça ile mekanik temizliği yapılmalıdır.*** Daha sonra özel metotlarla malzemeler temizlenir.

### 1.1.20. Spatül:



Toz veya küçük parçalar halindeki maddeleri almak için kullanılan metal veya porselenden yapılmış araçlardır.

***Kimyasal madde içine sokulacak spatülün çok temiz olması gereklidir.***

### 1.1.21. Amyant Tel:



Isıtma deneyi yaparken cam malzemenin ısıdan etkilenmesini önlemek amacıyla kullanılırlar.



### 1.1.22. Üçgen Tel:



Isıtma deneyi yaparken cam malzemenin ısıdan etkilenmesini önlemek amacıyla kullanılırlar.

### 1.1.23. Sac Ayağı:



Isıtma deneylerinde ispirto lambası veya bek alevi üzerine konur, üzerine amyant tel veya üçgen tel yerleştirilir, cam malzeme bunun üzerine konarak içindeki madde ısıtılır.

### 1.1.24. Bek:



Hava gazı, doğal gaz veya bütan gazı ile çalışarak alev sağlayan aletlerdir. Isıtma deneylerinde kullanılırlar. Alt taraflarında bulunan metal disk sağa sola çevrilerek alevin çok veya az havalı yanması sağlanabilir. Bazen bekler içten yanar ki bu durumda bek söndürülüp havasını ayarlayan disk tamamen kapalı duruma getirildikten sonra yeniden yakılır ve gaz gelişi istenilen şekilde ayarlanır.

### 1.1.25. Statif:



Büret ve diğer cam malzemelerin tutturulması için metalden yapılmış, ayak ve çubuk kısmından ibaret aletlerdir.

### 1.1.26. pH Metre:



Çözeltilerin pH'larını ölçmede kullanılan cihazlardır. Hidrojene hassas bir elektrodu vardır; bu elektrot, çabuk kuruduğu için sürekli olarak su içinde tutulmalıdır. Elektrodun kalibrasyonu pH'ı bilinen standart çözeltiyle yapılır; yumuşak bir bezle silindikten sonra pH'ı ölçülecek olan sıvıya daldırılır. Skalada okunan sayı, o çözeltinin pH'ıdır. Distile suyla iyice yıkandıktan sonra elektrot, su dolu kabın içinde olacak şekilde statifine (sabitleştirici) yerleştirilir.

### 1.1.27. pH kağıtları:



### 1.1.28. Benmari (Su Banyosu):



Bazı analizlerde, hazırlanan deneyin belli bir süre, belli sıcaklıktaki suda inkübasyona bırakıldığı aletlerdir. Tank içindeki suyun sıcaklığı 0-100°C arasında kontrol edilebilir. Çalkantılı olanlarda cihaz, dakikada 0-200 arası salınım yapabilir.

### 1.1.29. Distile Su Cihazı:



Distile su elde etmeye yarayan cihazdır. Çeşme suyu bir hortumla distile su cihazının içine girer, rezistanslar ile ısınır ve buharlaşır, su buharı borulardan geçerken soğur ve yoğunlaşır. Aletin ucundaki hortum aracılığı ile yoğunlaşan su dışarı alınır.

### 1.1.30. Deiyonize Su Cihazı:



Deiyonize su elde etmeye yarayan cihazdır. Uzun kolonları vardır, bu kolonlar içine iyon değıştirici reçineler konmuştur. Su kolonlardan geçerken içindeki iyonlar reçineler tarafından tutulur. Sonuçta elde edilen su iyonlarından arınmıştır.

### 1.1.31. Vorteks:



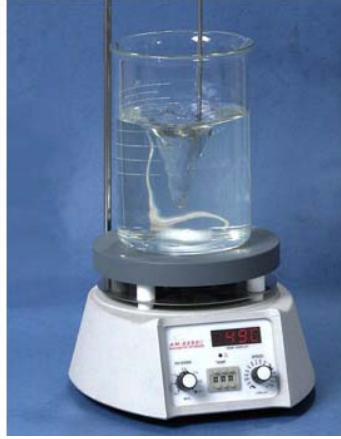
Deney tüpüne veya santrifüj tüpüne konan çözeltilerin tam olarak karıştırılmasında kullanılan cihazdır.

### 1.1.32. Shaker:



Hazırlanan deney tüplerinin bir süre için belli bir hızda çalkalanmasını sağlayan cihazdır. Çalkalama sıklığı ayarlanabilir. İnkübasyon sırasında çalkalama isteyen deneylerde kullanılır.

### 1.1.33. Manyetik Karıştırıcı:



Hazırlanan bir çözeltide bulunan maddelerin iyice çözünmesi ve karışmasını sağlamak için kullanılan aletlerdir. Sıcaklık ve devir sayısı ayarlanabilir.

Çözeltinin içine, iyi karışmayı sağlamak için bakla (stir bar) atılır ve manyetik karıştırıcının üzerine konur, alet çalıştırılır.

### 1.1.34. Desikatör:



Bir kapak, bir de alt kısmına sülfürik asit, anhidr kalsiyum klorür gibi kurutucu madde konan geniş cam kaplardır. Bazı desikatörlerin kapağında havayı boşaltmaya yarayan musluklu bir cam boru vardır; bu tip desikatörlere “vakumlu desikatör” denir. İyice kapanmasını sağlamak için kapak yüzeyi traşlıdır. Hava geçişini önlemek için kapak kenarları vazalinlenir.

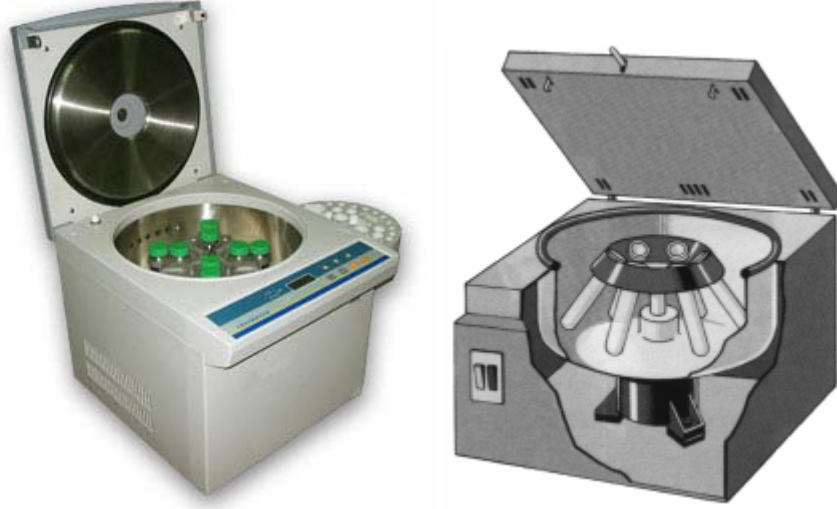
Reaktifleri ve diğer maddeleri rutubetten korumak için kullanılırlar.

### 1.1.35. Etüv:



Yıkılmış malzemelerin kurutulmasında, hazırlanan deneylerin belli bir süre belli bir sıcaklıkta inkübasyona bırakılmasında, bakteriyolojide sterilizasyon işleminde kullanılan cihazlardır. Üzerinde ısı ve zaman ayarı yapılabilecek düğmeler vardır.

### 1.1.36. Santrifüj:



Bir sıvı-katı karışımındaki katı maddeleri sıvı kısımdan kabaca ayırmakta kullanılan cihazdır. Maddelerin yoğunluklarına göre ayrımını sağlar. Birçok çeşitleri vardır. Soğutmalı olanlar, sıcaklığın  $-15^{\circ}\text{C}$ 'den  $25^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar istenen bir sıcaklıkta tutulmasını sağlarlar.

Tüm santrifüjler bir rotor veya santrifüj kefesi, çevirme mili ve motordan oluşurlar. Rotor, bir kapak ve mandalla hazırlanan bir odada bulunur. Çoğu santrifüjlerde açma düğmesi, zaman göstergesi, hız kontrolü, takometre ve fren vardır.

Santrifüjler rotorlarına göre horizontal başlıklı (açılımlı başlık) ve sabit açılı başlıklı (açılımsız başlık) olmak üzere iki tiptirler. Horizontal başlıklılarda rotor dinlenme halindeyken vertikal (dikey) pozisyonda, hareket halindeyken horizontal (yatay) pozisyonadadır. Sabit açılı başlıklılarda tüpler, rotasyonun vertikal aksına  $25-40^{\circ}$  açıda sabit (fiske) halde tutulur.

Santrifüje tüpleri yerleştirirken hepsinin eşit ağırlıkta olmalarına ve alete tam karşılıklı yerleştirilmelerine dikkat etmek gerekir.

Dakikadaki dönme hızı ve süresi ayarlanır.

Santrifüjün ayırma gücünü belirleyen, rölatif santrifugal güç (RCF) ve dakikadaki devir sayısı (rpm)'dir.

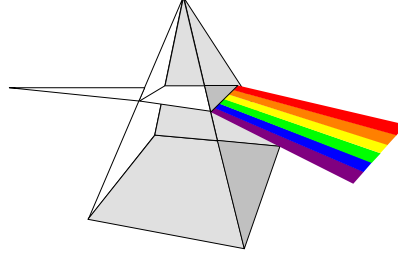
Rölatif santrifugal güç (RCF) birimi, yerçekiminin (gravite) katları ile (500 g gibi) ifade edilir. Mikrohematokrit santrifüjlerde 11.000-15.000 rpm veya 14.000 g'de eritrositler ayrılır. Ultrasantrifüjler, genellikle araştırmalarda kullanılan, 90.000-100.000 rpm veya 178.000 g sağlayabilen santrifüjlerdir.

### 1.1.37. Spektrofotometre:



Spektrofotometreler, madde renginin yoğunluğunun ölçülmesiyle madde miktarının veya konsantrasyonunun bulunmasını sağlayan cihazlardır.

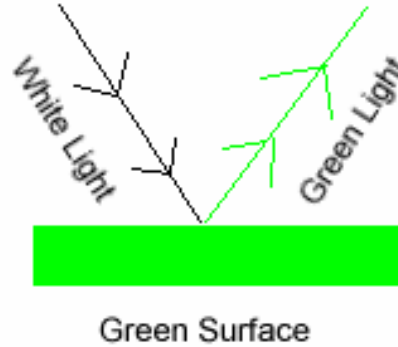
Işık, insan gözüyle görülebilir dalga boylarındaki elektromanyetik radyasyon enerjisidir. Dalga boyu, iki dalga piki arasındaki mesafedir ki genellikle nanometre (nm), bazen angström (Å) ve milimikron (mμ) olarak ifade edilir. Güneş ışığı veya bir tungsten lambadan saçılan ışık, insan gözünün beyaz olarak tanımladığı, farklı dalga boylarındaki ışık enerjilerinin bir karışımıdır.



İnsan gözü, yaklaşık 380-750 nm arasında dalga boylarına sahip olan ışık enerjilerine cevap verebilmektedir.

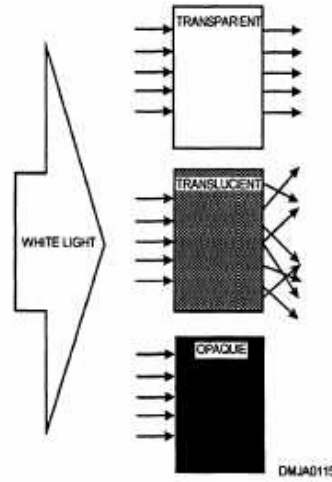
<380 nm dalga boyundaki ışık	Ultraviyole (Mor-ötesi, U.V.)
380-440 nm dalga boyundaki ışık	Menekşe
440-500 nm dalga boyundaki ışık	Mavi
500-580 nm dalga boyundaki ışık	Yeşil
580-600 nm dalga boyundaki ışık	Sarı
600-620 nm dalga boyundaki ışık	Turuncu
620-750 nm dalga boyundaki ışık	Kırmızı
>750 nm dalga boyundaki ışık	İnfraruj (Kırmızı-ötesi, IR) olarak tanımlanır.

Bir madde elektromagnetik dalga spektrumunda 380-750 nm uzunluğundaki görünür ışınların hepsini geçiriyor veya yansıtıyorsa beyaz görünür; hepsini soğuruyorsa (arbsorbluyorsa) siyah görünür. Görünür spektrumda mavi rengi soğuran bir made sarı renkli, sarı rengi soğuran bir madde mavi renkli görünür; yeşil rengi soğuran bir madde kırmızı renkli, kırmızı rengi soğuran bir madde yeşil renkli görünür.

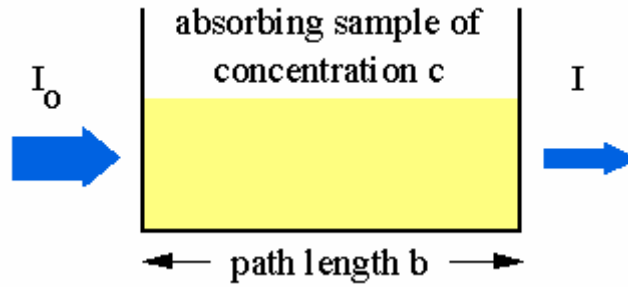


**Sarı-mavi** ve **kırmızı-yeşil** renk çiftlerine tamamlayıcı renkler denir; bu renklerin uygun oranda karışımı ile diğer renkler meydana gelir. Üç temel renk, sarı, gök mavisi ve morumsu kırmızı (pembe)'dir.

İçerisinde organik moleküller bulunan bir çözeltiden UV-görünür bölge ışınları geçerse, çözelti bu ışınların bir kısmını seçimli olarak soğurur (absorpsiyon), diğerlerini ise çok az soğurur veya olduğu gibi geçirir (transmisyon).



Bir küvet içine konmuş renkli bir çözeltiden çıkan ışık şiddeti ( $I$ ), çözeltime giren ışık şiddetinden ( $I_0$ ) daha küçüktür.



Çözeltiden çıkan ışık şiddetinin çözeltime giren ışık şiddetine oranı ( $I/I_0$ ), **transmittans (T)** olarak tanımlanır. Transmittans, genellikle %Transmittans (%T) olarak ifade edilir.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

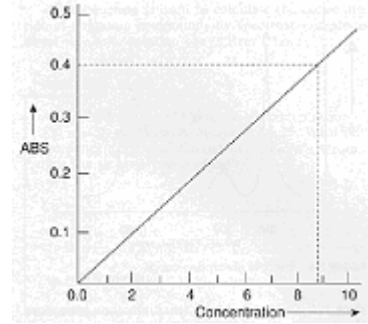
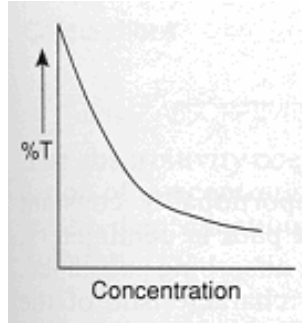
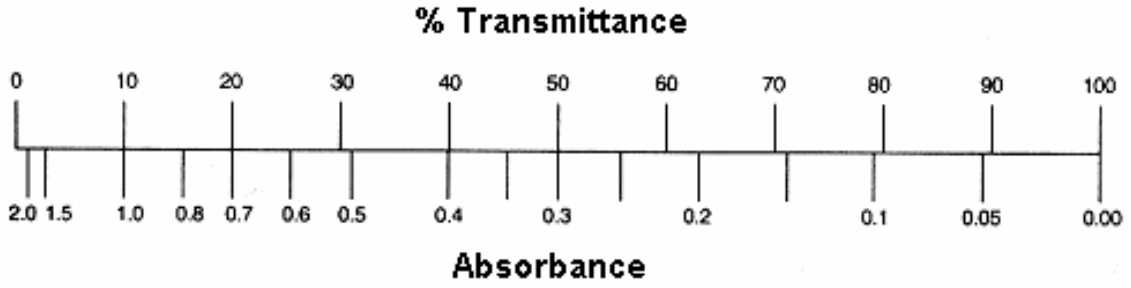
$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

Transmittansın tersinin logaritması Absorbans (Optik dansite,  $A$ ) olarak tanımlanır ki bu, çözeltinin içinden geçen ışığın ne kadarının absorbe edildiğinin (soğurulduğunun) ifadesidir.

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}$$

Bir çözeltide çözünmüş olan maddenin miktarı veya konsantrasyonu ile %Transmittans (%T) arasında doğrusal olmayan bir ilişki olduğu halde Absorbans ( $A$ ) arasında doğrusal bir ilişki vardır:

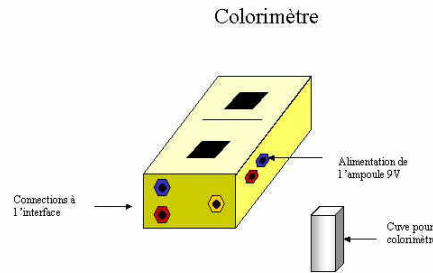




Absorbans (A), yüzde transmittans (%T) ve çözeltideki maddelerin konsantrasyonu (c) arasındaki ilişkiyi **Lambert-Beer yasası** ifade eder: **İçinde çözelti bulunan bir küvetten geçen ışığın transmittansı ( $I/I_0$ ), ışık yolu veya küvet çapının ( $l$ ) artmasıyla azalır; ayrıca dilüe çözeltinin absorbansı (A), çözeltinin konsantrasyonu (c) ile doğru orantılıdır.**  $\epsilon$  absorpsiyon katsayısı (ekstinksiyon katsayısı) olarak gösterildiğinde Lambert-Beer yasasının matematiksel ifadesi şu şekilde olur:

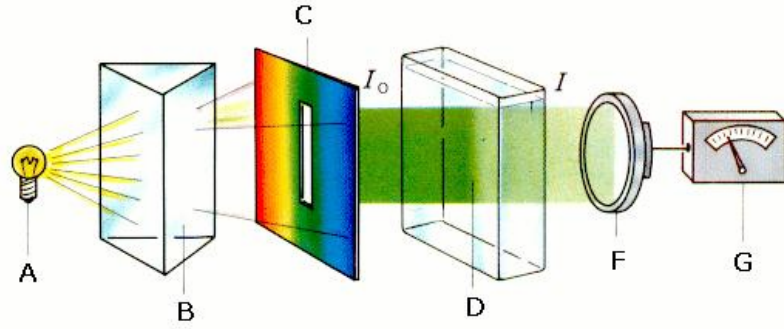
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Çözelti içindeki madde miktarını çözeltinin renginden faydalanarak ölçme işlemine **kolorimetri**, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **kolorimetre** denir. Kolorimetrik ölçümde, konsantrasyonu ölçülecek çözeltinin rengi değişik konsantrasyonlardaki standartların rengiyle karşılaştırılarak değerlendirilir.



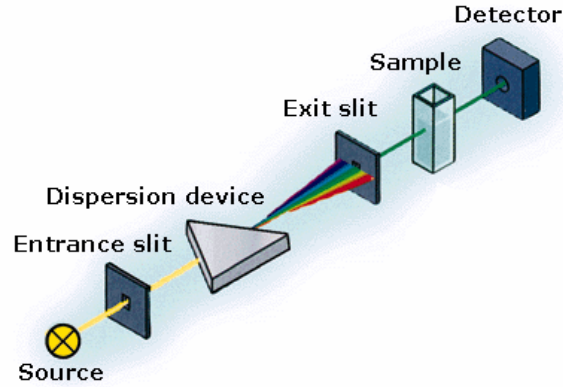
Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri**, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **fotometre** denir. Fotometrik ölçümde, renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir.





Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler **kolorimetre** veya **fotometre** olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler **spektrofotometre** olarak adlandırılırlar.

Spektrofotometrelerde konsantrasyonu bilinen bir standart çözeltinin absorpladığı ışık miktarı (absorbans, optik dansite) ile konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin absorpladığı ışık miktarı karşılaştırılır. Kullanılacak ışık, çözeltinin kuvvetli absorpladığı dalga boyunda seçilir; örneğin kırmızı renkli sıvı için yeşil dalga boyunda ( yeşil renkli sıvı için kırmızı dalga boyunda), mavi renkli sıvı için sarı dalga boyunda (sarı renkli sıvı için mavi dalga boyunda) ışık seçilir.



Spektrofotometrelerde çözeltideki madde için uygun seçilen dalga boyundaki ışığın örneğe ve standarda (bilinen konsantrasyondaki çözelti) ait absorbansları veya optik dansiteleri ( $A$ , OD) karşılaştırılıp matematiksel işlemler yapılarak örnekteki maddenin konsantrasyonu bulunur:

$$A_{\text{ö}} = \varepsilon \cdot c_{\text{ö}} \cdot l$$

$$A_{\text{std}} = \varepsilon \cdot c_{\text{std}} \cdot l$$

$$\frac{A_{\text{ö}}}{A_{\text{std}}} = \frac{\varepsilon \cdot c_{\text{ö}} \cdot l}{\varepsilon \cdot c_{\text{std}} \cdot l}$$

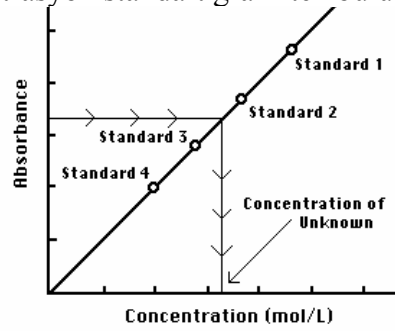
$$\frac{A_{\text{ö}}}{A_{\text{std}}} = \frac{c_{\text{ö}}}{c_{\text{std}}}$$

$$c_{\text{ö}} = (A_{\text{ö}} / A_{\text{std}}) \cdot c_{\text{std}}$$

$$c_{\text{ö}} = (c_{\text{std}} / A_{\text{std}}) \cdot A_{\text{ö}}$$

$$c_{\text{ö}} = (\text{Faktör}) \cdot A_{\text{ö}}$$

İstenirse, çeşitli konsantrasyonlardaki standart çözeltilerin, belirli uygun bir dalga boyunda ışık için absorbans değerleri bir köre (absorbansı sıfır kabul edilen) karşı ayrı ayrı ölçülüp bir grafik kağıdına konsantrasyonlara karşı işaretlenerek standart grafiği çizilir. Örneğin absorbansı da aynı köre (absorbansı sıfır kabul edilen) karşı ölçülür ve ölçülen absorbansa karşı gelen konsantrasyon standart grafikten bulunur.



## 1.2. Ölçü Sistemleri

**Metrik Sistem:** Uzunluk birimi metre (m), ağırlık birimi gram (g), hacim birimi litre (l) olan ölçü sistemidir.

**SI Sistemi:** Temelde yedi birim ve bunlardan türetilmiş birimlerden oluşur.

Uzunluk birimi: metre (m)

Ağırlık birimi: kilogram (kg)

Zaman birimi: saniye (s)

Elektrik akımı birimi: amper (A)

Sıcaklık birimi: Kelvin (K)

Parlaklık yoğunluğu birimi: Candela (cd)

Madde miktarı birimi: mol (mol)

**Temel Birimlerin Küçülen ve Büyüyen Katlarının Önekleri:**

Küçülen Katlar Önekleri:

Desi (d):  $10^{-1}$

Santi (c):  $10^{-2}$

Mili (m):  $10^{-3}$

Mikro ( $\mu$ ):  $10^{-6}$

Nano (n):  $10^{-9}$

Pico (p):  $10^{-12}$

Femto (f):  $10^{-15}$

Atto (a):  $10^{-18}$

Büyüyen Katlar Önekleri:

Deka (da):  $10^1$

Hecto (h):  $10^2$

Kilo (k):  $10^3$

Mega (M):  $10^6$

Giga (G):  $10^9$

Tera (T):  $10^{12}$

Peta (P):  $10^{15}$

Exa (E):  $10^{18}$

### 1.3. Ağırlık Ölçümü ve Araçları (Teraziler)

Ağırlık ölçümlerinde kullanılan ölçü birimi gram (g) olarak ifade edilir.

Desigram (dg) =  $10^{-1}$  g

Santigram (cg) =  $10^{-2}$  g

Miligram (mg) =  $10^{-3}$  g

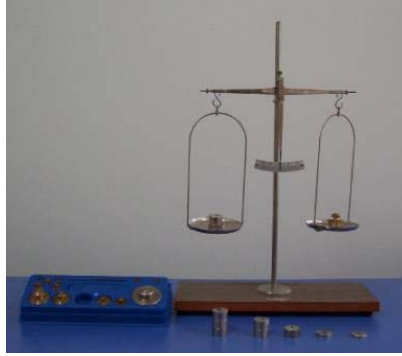
Mikrogram ( $\mu$ g) =  $10^{-6}$  g

Nanogram (ng) =  $10^{-9}$  g

Pikogram (pg) =  $10^{-12}$  g

Femtogram (fg) =  $10^{-15}$  g

**1.3.1. Teraziler:** Tartım işleminde kullanılan cihazlardır.



**Adi Teraziler:** Gramın 1/10'unu doğrulukla tartabilen terazilerdir.

**Adi terazi ile tartım işlemi:**

- 1) Terazinin skalasının "0" noktasında durağan bulunup bulunmadığına bakılır ve değilse ayarlanır.
- 2) Her iki kefeye eşit ebat ve ağırlıkta iki adet kağıt veya tartı kabı konur.
- 3) Sağ kefeye ağırlık takımındaki gramlardan tartılmak istene kadar konur.
- 4) Sol kefeye tartılacak maddeden, terazinin ibresi "0" noktasında dengeye gelinceye kadar azar azar konur.
- 5) Tartım işlemi bittikten sonra terazi kefeleri bir fırça ile temizlenir, gramlar da kutusuna yerleştirilir.

**Hassas Teraziler:** Analitik teraziler, semi-mikrokimyasal teraziler, mikrokimyasal teraziler diye bilinen çeşitleri vardır.

Analitik teraziler, 200 g ağırlık tartacak kapasitededir ve hassasiyetleri 0,1 mg'dır. Bazı analitik terazilere tartma özelliklerini geliştirmek ve ömürlerini uzatmak için bir takım ilaveler yapılmıştır. Analitik teraziler, ideal olarak ısı ve rutubet değişikliklerinin minimum olduğu klimalı bir odada bulunmalıdır; hava akımından, direkt güneş ışığından, etüv ve Benmari'den kaynaklanan ısı ve tahrip edici dumanlardan korunmalıdır.

Semi-mikrokimyasal terazilerin kapasiteleri 30-50 g ve hassasiyetleri 0,02-0,01 mg'dır.

Mikrokimyasal terazilerin kapasiteleri 20 g ve hassasiyetleri 0,001 mg'dır.

## 1.4. Sıvı Hacim Ölçümü ve Araçları

Sıvı hacim ölçümlerinde kullanılan ölçü birimi litre (l) olarak ifade edilir.

Desilitre (dl) =  $10^{-1}$  l

Santilitre (cl) =  $10^{-2}$  l

Mililitre (ml, cc) =  $10^{-3}$  l

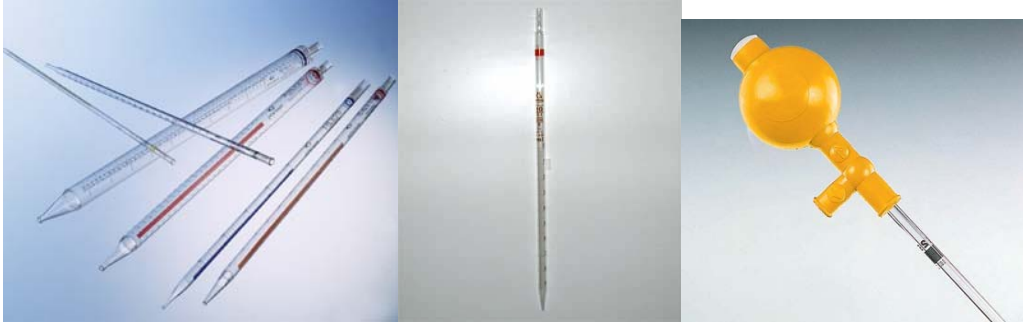
Mikrolitre ( $\mu$ l) =  $10^{-6}$  l

Nanolitre (nl) =  $10^{-9}$  l

Pikolitre (pl) =  $10^{-12}$  l

Femtolitre (fl) =  $10^{-15}$  l

**1.4.1. Pipetler:** Bir çözeltiliden belli hacimde sıvı almaya ve başka bir kaba aktarmaya yarayan özel cam borulardır.



**Büllü Pipet:**



Ortalarında bül denilen şişkin bir kısım bulunur. Uç kısımları ise ince ve uzundur. İnce kısımlardan birinin üzerinde bir çizgi bulunur; bülün üzerindeki sayı, bu çizgiye kadar alınabilecek sıvı hacmini gösterir. Bir büllü pipet kaç ml hacimdeyse o kadar sıvı alınabilir; daha az veya çok miktarda sıvı ölçümü mümkün değildir. Büllü pipetler, büyük bir hassasiyetle çalışma gerektiğinde kullanılırlar.

**Dereceli (taksimatlı) Pipetler:**



Düz ve dar bir boşlukları vardır. Taksimatları suya göre yapılır; doğrulukları, maksimum kalibrasyon çizgisine göre garanti edilmiştir. Dereceli bir pipetin total hacmi üst ucunda yazılıdır. Bazı pipetlerde ise üst uca "0" rakamı vardır; bu tip pipetlerin total hacmi alt uçtaki en son taksimattan anlaşılır; alttaki taksimatta görülen sayı kendinden sonra gelen tam sayıya tamamlanarak pipetin hacmi saptanır.

Dereceli pipetler, değişik hacimlerde olurlar; en çok 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml ve 25 ml hacimde olanlar kullanılır.

Dereceli pipetler, büyük bir hassasiyet gerektirmeyen hallerde kullanılırlar.

### ***Sulandırma Pipetleri:***



Eritrosit ve lökosit sayımında kullanılırlar. Ucunda 0,1'den 1'e kadar derecelenmiş bir kapiller boru ile bu borunun açıldığı geniş bir boşluktan oluşur. Eritrositler sayım için en az 100 defa, lökositler ise en az 10 defa sulandırıldığı için şişkinlik lökosit pipetinde daha küçüktür. Şişkin kısımda bulunan cam boncuk (eritrosit pipetlerinde kırmızı, lökosit pipetlerinde beyaz) sulandırma çözeltileri ile kanın karışmasını sağlar.

### ***Mikropipetler:***



Genellikle 10-500 µl hacimlerdeki pipetlerdir.

Mikropipetlerin üst kısmındaki basma butonu iki aşamalıdır. Ölçüm yaparken; pipet önce almak istenen miktara ayarlanmalı, butun ilk aşamaya kadar basıldıktan sonra pipetin ucu sıvıya daldırılmalı ve yavaşça butondaki baskı azaltılarak sıvının pipete dolması sağlanmalıdır. Daha sonra buton ikinci aşamasına kadar iyice bastırılarak pipetin ucundaki sıvının boşaltılması sağlanmalıdır.

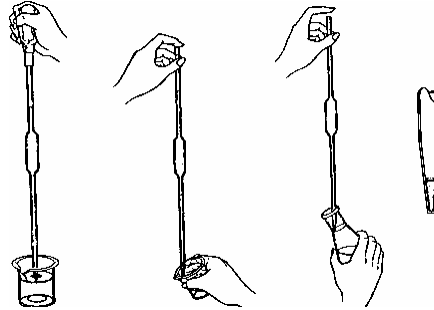
### ***Semiotomatik Pipetler ve Dispensrlar (dağıtıcılar):***



1 ml'den 20 ml'ye kadar çeşitli büyüklükte dirler. Hacmi dijital olarak gösteren modelleri de vardır. Numuneyi içine çeken kısım cam, silikonize cam veya plastik olabilir; genellikle iç yüzeyinde camdan daha az miktarda sıvı tutmaya meyilli olan dispo zı bıl (tek kullanımlık) plastik bir maddeden yapılır.

Dispensrlar, belli miktarda sıvının çok sayıdaki tüplere eşit hacimlerde dağıtımın sağlayan aletlerdir. 1 µl-20 ml arası hacimlerde sıvı dağıtımını yapabilirler. Dispensır, dağıtım yapılacak sıvı ile köpük yapmadan doldurulmalıdır ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için ilk atım mutlaka sıvının ana kabına yapılmalıdır. Sonraki atımlar seri halde köpük oluşturmada n yapılmalıdır.

### ***Pipet ile bir çözeltiden belli hacimde sıvı alma ve aktarma:***



- 1) Ölçülecek hacme uygun pipet seçilmelidir. Pipetin ucuna yakın bölgelerin hassasiyeti daha az olduğu için alt uçtan ölçümler yapılmamalıdır.
- 2) Pipet, üst ucuna yakın kısmından başparmak ile son üç parmak arasında tutulur. İşaret parmağı, sıvıyı çekince akmaması için üst ucu kapatacak şekilde hazır olmalıdır.
- 3) Pipetin boşaltma ucu, alınacak sıvının içine daldırılır. Bu esnada pipet yeter derecede sıvının içine girmelidir ve pipete sıvı çekerken hava girmemesine dikkat etmelidir.
- 4) Sıvı, hafif bir emme ile pipetin ağız ucu tarafındaki seviye işaretinin üst kısmına kadar çekilir ve pipetin ağız ucu işaret parmağı ile çabucak kapatılır.
- 5) Pipetin boşaltma ucu sıvı alınan kaptaki sıvı içinde iken, pipetin ağız ucunu kapatan işaret parmağına hafif gevşeme hareketleri verilerek sıvı seviyesi istenilen işaret çizgisine kadar düşürülür. Bu esnada işaret parmağı pipetin ağız ucundan uzaklaştırılmamalıdır.

- 6) Pipet sıvı alınan kaptan dışarı alınır ve pipetin dışında bulunan fazla sıvı bir süzgeç kağıdı veya temiz bir tülbent ile silinir.
- 7) Pipet, alınan sıvının konulacağı kaba taşınır ve pipetin boşaltma ucu bu kabın kenarına temas ettirilir.
- 8) Pipetin ağız ucundan işaret parmağı uzaklaştırılır ve pipet içeriğinin boşalması beklenir. Pipet içeriğinin tam olarak boşalması için pipetin dikey tutulması gereklidir.
- 9) Pipet içeriği tamamen boşaldıktan sonra, pipetin ucunda kalan damla gerekirse üflenerek alınır; pipetin ağız ucu tarafındaki bir halka, pipetin üflenmesinin gerekli olduğunu gösterir.

#### ***Pipetlerin temizlenmesi:***

- 1) Pipetler, kullanıldıktan sonra serum, kan ve kimyasal çözelti kalıntılarının pipet içinde kurumaması için hemen musluk suyu ile dolu bir silindire konurlar.
- 2) İçinde kan pıhtısı bulunan pipetler, %10'luk Potasyum hidroksit çözeltisi içinde 12 saat bırakılırlar.
- 3) Yağlı pipetler, bikromat temizleme çözeltisinde 12-24 saat bırakılırlar.
- 4) Pipetler, içlerinden musluk suyu geçirmek suretiyle iyice temizlenirler. Eğer otomatik pipet yıkayıcı varsa pipetler otomatik yıkayıcının taşıyıcısına boşaltma uçları yukarı gelecek şekilde konur ve pipet taşıyıcı da yıkayıcı kaba konur; bundan sonra musluk suyunun akışı yıkayıcı saatte 8 defa dolup boşalacak şekilde ayarlanır; 3-4 saat sonra pipet taşıyıcısı çıkarılır.
- 5) Pipetler distile su ile 3 defa durulanır.
- 6) Pipetlerin üzerlerindeki suyun akması için en az 10 dakika beklenir.
- 7) Pipetler, 90°C'lik bir etüvde yaklaşık 1 saat bırakılarak kurutulur.

#### **1.4.2. Büretler:**



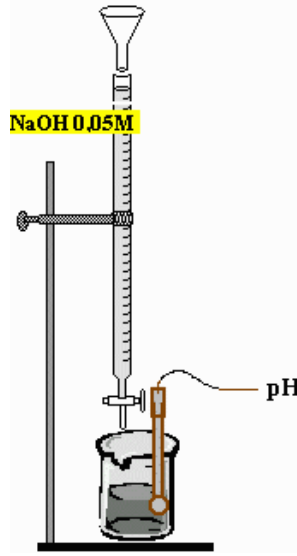
Bir çeşit pipettirler, fakat bunların boşaltma ucunda sıvının akışını kolayca kontrol edebilmek için bir kapama musluğu vardır. Çeşitli büyüklükte büretler vardır; kapasitesi 2 ml veya daha az olanlarına mikrobüret denir.

Titrasyon işleminde kullanılırlar. Büretler yağdan tamamıyla temiz olmalıdır. Sıvının büretin içini ıslatmasından kaynaklanan hataları engellemek için sıvının akış hızı yavaş olmalıdır.

Büretlerin içine konan çözeltiler genellikle “normal” çözeltilerdir.



### **Büret ile titrasyon yapılması:**



- 1) Büret önce “0” çizgisini aşacak şekilde bir huni yardımıyla doldurulur.
- 2) Huni çıkarılır ve alttaki musluk sağa-sola çevrilerek içindeki sıvı bir miktar akıtılır, böylece büretin hiçbir kısmında hava kabarcığı kalmaması sağlanır.
- 3) Alt musluk açılarak sıvı yüzeyinin konveksliği sıfır çizgisine teğet olacak şekilde ayarlanır. Böylece büret titrasyona hazır hale getirilmiş olur.
- 4) Titrasyon daima oturarak yapılmalıdır. Titrasyon sırasında musluk, sıvının damla damla akması için hafifçe açılırken titrasyon kabı boyun kısmından serbestçe tutularak düzenli bir şekilde çalkalanır.

### **1.4.3. Dereceli Silindirler (Ölçü Silindirleri, Mezürler):**



Silindir biçiminde, çeşitli çap ve boyda, hacim ölçen, üzerlerinde hacim göstergesi çizgiler bulunan cam veya plastik kaplardır. Kapaklı veya kapaksız olabilirler. Bazılarında üst tarafta içindeki sıvıyı boşaltmaya elverişli bir çıkıntı vardır.

Mezürler, büyük bir hassasiyetle çalışmayı gerektirmeyen ölçüm işlerinde kullanılırlar.



#### 1.4.4. Balon Joje (Ölçü Balonları):



Belli hacimde, alt kısımları yuvarlak ve şişkin, üst kısımları ince uzun boyunlu kapaklı cam veya plastik kaplardır. Boyun kısmında bir kalibrasyon çizgisi bulunur; bu çizgiye kadar aldıkları sıvı miktarı üzerlerinde yazılıdır. Çeşitli hacimlerde bulunurlar.

Hassas çözeltiler ve ayıraç hazırlanmasında, bir maddeyi belli bir oranda seyreltmek gibi işlemlerde kullanılırlar.

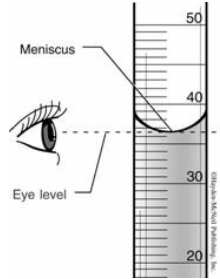
##### **Sıvı hacmini ölçerken dikkat edilecek noktalar:**

1) Damla oluşumu önlenmelidir. Eğer pipet veya büret tam olarak temiz değilse, alt ucunda damla oluşumuna yol açarak sıvı ölçümünde hatalara yol açar. Bunun önlenmesi için, pipet ve diğer cam malzemeler yağdan tamamen temizlenmiş olmalıdır. Bu amaçla bikromat temizleme solüsyonu kullanılmalıdır.

##### **Bikromat temizleme çözeltisinin hazırlanması:**

- Isıya dayanıklı 1000 mL'lik bir cam balona 500 mL su konur.
- Cam balondaki su üzerine 250 mL konsantre sülfürik asit, devamlı karıştırma suretiyle eklenir.
- Cam balonun ağzı bir beherle kapatılır ve soğuyuncaya kadar üzerinden soğuk çeşme suyu geçirilir.
- Cam balondaki karışıma 100 gram potasyum bikromat eklenir ve tamamen çözülünceye kadar karıştırılır.
- Volüm, su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2) Menisküs çizgisine dikkat edilmelidir: Özellikle küçük çaplı tüplerde, yüzey geriliminden dolayı sıvıların kavis oluşturan üst yüzeyine menisküs çizgisi denir. Eğer sıvı içinde bulunduğu kabı ıslatıyorsa (örneğin su) menisküs çizgisi konkavdır; civa örneğinde olduğu gibi sıvı bulunduğu kabı ıslatmıyorsa konvektir. Bütün ölçümler, menisküs çizgisi göz hizasına getirildikten sonra yapılmalıdır.



Renksiz sıvının seviyesi, menisküs çizgisinin altından okunmalıdır.

Renkli sıvının seviyesi, menisküs çizgisinin üstünden okunmalıdır.

Cıvanın seviyesi, menisküs çizgisinin üstünden okunmalıdır.

3) Hacmi ölçülecek sıvının sıcaklığı, ölçü aleti üzerinde yazılı olan kalibrasyon sıcaklığı (genellikle 20°C'dir) ile aynı olmalıdır.

## 1.5. Kimyasal Maddeler (Kimyasallar)

### 1.5.1 Yapılarına Göre Kimyasal Maddeler

1.5.1.1. Elementler: Aynı cins atomlardan meydana gelen saf maddelerdir.

Atom No	Element	Sembol	(pikogram/gram)	Atom No	Element	Sembol	(pikogram/gram)
1	Hidrojen	H		48	Kadmiyum	Cd	2
2	Helium	He		49	İndiyum	In	0.5
3	Lityum	Li	2	50	Kalay	Sn	1
4	Berilyum	Be	3	51	Antimon	Sb	0.5
5	Bor	B	500	52	Tellüryum	Te	0.1
6	Karbon	C		53	İyot	I	2,000
7	Azot	N		54	Ksenon	Xe	
8	Oksijen	O		55	Sezyum	Cs	0.1
9	Flor	F		56	Baryum	Ba	2
10	Neon	Ne		57	Lantan	La	0.1
11	Sodyum	Na	500	58	Seryum	Ce	1
12	Magnezyum	Mg	100	59	Praseodimiyum	Pr	0.1
13	Aluminyum	Al	300	60	Neodimiyum	Nd	0.1
14	Silisyum	Si	1,000	61	Prometyum	Pm	0.5
15	Fosfor	P	500	62	Samaryum	Sm	0.5
16	Sülfür	S	500	63	Europiyum	Eu	0.01
17	Klor	Cl		64	Gadolinyum	Gd	0.1
18	Argon	Ar		65	Terbiyum	Tb	0.01
19	Potasyum	K	200	66	Diyozenyum	Dy	0.1
20	Kalsiyum	Ca	500	67	Holmium	Ho	0.1
21	Skandiyum	Sc	0.5	68	Erbiyum	Er	0.1
22	Titanyum	Ti	50	69	Tuliyum	Tm	0.1
23	Vanadyum	V	1	70	Yterbiyum	Yb	0.01
24	Krom	Cr	3	71	Lutezyum	Lu	0.01
25	Manganez	Mn	30	72	Hafniyum	Hf	0.05
26	Demir	Fe	50	73	Tantal	Ta	0.01
27	Kobalt	Co	3	74	Tungsten	W	1
28	Nikel	Ni	30	75	Rhenyum	Re	1
29	Bakır	Cu	20	76	Osmiyum	Os	1
30	Çinko	Zn	100	77	İridiyum	Ir	1
31	Galyum	Ga	2	78	Platin	Pt	0.01
32	Germaniyum	Ge	10	79	Altın	Au	300
33	Arsenic	As	25	80	Civa	Hg	50
34	Selenyum	Se	10	81	Taliyum	Tl	0.05
35	Brom	Br	2,000	82	Kurşun	Pb	10
36	Kripton	Kr		83	Bismüt	Bi	0.5
37	Rubidyum	Rb	1	84	Polonyum	Po	
38	Stronsiyum	Sr	5	85	Astatin	At	2,000
39	Yttriyum	Y	0.1	86	Radon	Rn	
40	Zincorçum	Zr	1	87	Fransiyum	Fr	
41	Niobyum	Nb	0.001	88	Radyum	Ra	1
42	Molibden	Mo	2	89	Aktinyum	Ac	
43	Teknesyum	Tc	0.1	90	Toryum	Th	0.01

Grup	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	1A	2A	3B	4B	5B	6B	7B	8B			1B	2B	3A	4A	5A	6A	7A	8A	
<b>Periyod</b>																			
1	1 H																	2 He	
2	3 Li	4 Be										5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne		
3	11 Na	12 Mg										13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar		
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
6	55 Cs	56 Ba	*	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	**	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
<b>Lantanidler</b>	*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb				
<b>Aktinidler</b>	**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No				

IA	<b>Elements of Life</b>																0	
1 H 1.008	IIA												III A	IV A	VA	VIA	VII A	2 He 4.003
3 Li 6.941	4 Be 9.012											5 B 10.81	6 C 12.01	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 19.00	10 Ne 20.18	
11 Na 22.99	12 Mg 24.31	III B	IV B	VB	VIB	VII B	VIII B		IB	II B	13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.07	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95		
19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.87	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.69	29 Cu 63.55	30 Zn 65.39	31 Ga 69.72	32 Ge 72.61	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.80	
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3	
55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	57* La 138.9	72 Hf 178.5	73 Ta 180.9	74 W 183.8	75 Re 186.2	76 Os 190.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.1	79 Au 197.0	80 Hg 200.6	81 Tl 204.4	82 Pb 207.2	83 Bi 209.0	84 Po (209)	85 At (210)	86 Rn (222)	
87 Fr (223)	88 Ra (226)	89** Ac (227)	104 Rf (261)	105 Db (262)	106 Sg (263)	107 Bh (264)	108 Hs (265)	109 Mt (268)	110 Uun (269)	111 Uuu (272)	112 Uub (277)	113 Uut (285)	114 Uuq (289)	115 Uup (289)	116 Uuh (293)	117 Uus (293)	118 Uuo (293)	
		58* Ce 140.1	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm (145)	62 Sm 150.4	63 Eu 152.0	64 Gd 157.3	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.0	71 Lu 175.0			
		90** Th 232.0	91 Pa 231	92 U 238.0	93 Np (237)	94 Pu (244)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (262)			

Most abundant, essential for all organisms: C, N, O, P, S, H

Less abundant, essential for all organisms : Na, Mg, K, Ca, Cl

Trace levels, essential for all organism: Mn, Fe, Co, Cu, Zn

Trace levels, essential for some organisms: V, Cr, Mo, B, Al, Ga, Sn, Si, As, Se, I,

+1	+2	+3	-1	-2	-3
Li <sup>+1</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Al <sup>+3</sup>	F <sup>-1</sup>	O <sup>-2</sup>	N <sup>-3</sup>
Na <sup>+1</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Fe <sup>+3</sup>	Cl <sup>-</sup>	S <sup>-2</sup>	P <sup>-3</sup>
K <sup>+1</sup>	Ba <sup>+2</sup>	Cr <sup>+3</sup>	Br <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
Ag <sup>+1</sup>	Zn <sup>+2</sup>		I <sup>-</sup>	Sülfat	Fosfat
Cu <sup>+1</sup>	Ni <sup>+2</sup>		OH <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	
NH <sub>4</sub> <sup>+1</sup>	Cu <sup>+2</sup>		Hidroksit	Sülfat	
Amonyum	Fe <sup>+2</sup>		NO <sub>3</sub>	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	
	Hg <sup>+2</sup>		Nitrat	Karbonat	
			NO <sub>2</sub>	CrO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	
			Nitrit	Kromat	
			CN <sup>-</sup>		
			Siyanür		
			CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>		
			Asetat		

### Alkali Metaller (Na, K,...):



Çok aktif maddelerdir. Hava ortamında saklanamazlar. Petrol eteri içinde saklanırlar. Bu metaller, su ile, sulu asitler ile çok şiddetli ve patlamalar şeklinde ekzotermik tepkimeler vererek H<sub>2</sub> gazı çıkarırlar; çıkan H<sub>2</sub> gazı kendiliğinden tutuşarak yangına neden olabilir.

### Toksik Metaller:



En önemlileri civa, kurşun, kadmiyum ve nikelidir.

Civa, oda sıcaklığında sıvı olan bir metaldir. Kolay buharlaşır ve civa buharları çok zehirlidir.

Kurşun, yumuşak ve kolay işlenebilme özelliği nedeniyle birçok kullanım alanı bulmuştur. Kimyasal aktivitesinden dolayı hava oksijeni ile birleşerek üzeri koruyucu bir oksit tabakası ile kaplanır.

Kadmiyum, Gümüş renginde bir metaldir. Havada kolaylıkla oksitlenir.

**Arsenik:** Yarı metal özellik gösteren bir elementtir. Erime noktası düşüktür ve kolay buharlaşır. Arsenik buharları, solunum yollarıyla alındığında çok şiddetli zehir etkisi gösterir.

**Bakır:** Elektriki diğer bütün metaller içinde gümüşten sonra en iyi ileten kırmızımsı bir metal.

**Çinko:** Mavimsi açık gri renkte, kırılğan bir metal. Normal sıcaklıkta havada bırakılan metalin yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluştuğundan bu sıcaklıkta halojenlere bile dayanıklıdır. HCl gazı çinkoyu çok çabuk korozyona uğratar.

**Demir:** Demir, tüm metaller içinde en çok kullanılanıdır ve tüm dünyada üretilen metallerin ağırlıkça %95'ini oluşturur.

**Kükürt:** Limon sarısında ametel, yalın katı maddedir.



**Brom:**



Oda koşullarında koyu kırmızı renkli sıvıdır. Halojen ameteldir. Moleküler brom oldukça reaktif olduğundan için, sıvı halde cilde temasından kesinlikle kaçınılmalıdır. Gaz haldeki bromun solunmasından kaçınmak gerekir; solunum sistemini tahriş eder.

**İyot:**



Koyu gri-koyu mor bir katı olan iyot, ısıtıldığı zaman süblimasyonla burnu tahriş edici, pembe-mor bir gaza dönüşür. Suda az çözünüp sarı bir çözelti oluşturur.

**Fosfor:**



Oda koşullarında beyaz, kırmızı ve renksiz katı ameteldir. Son derece yanıcı olan beyaz fosfor çok defa, sis meydana getirmek için kullanılır.

**1.5.1.2. Bileşikler:** Birden fazla elementin belirli oranlarda kimyasal yollarla bir araya gelerek, kendi özelliğini kaybedip oluşturdukları yeni saf maddelerdir.

Bileşik adı	Formül	Molekül ağırlığı	Ekivalan ağırlığı
Hidroklorik asit	HCl	36,46	36,46
Sülfürik asit	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,08	49,04
Fosforik asit	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98,00	32,67
Nitrik asit	HNO <sub>3</sub>	63,01	63,01
Amonyum hidroksit	NH <sub>4</sub> OH	35,04	35,04
Sodyum hidroksit	NaOH	40,00	40,00
Potasyum hidroksit	KOH	56,10	56,10
Bakır 1 hidroksit	CuOH	80,55	
Bakır 2 hidroksit	Cu(OH) <sub>2</sub>	97,55	
Sodyum karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	106,00	53,00
Sodyum bikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	84,00	
Sodyum klorür	NaCl	58,45	58,45
Potasyum klorür	KCl	74,55	74,55
Kalsiyum klorür	CaCl <sub>2</sub>	111,00	55,50
Amonyum klorür	NH <sub>4</sub> Cl	53,49	
Baryum klorür	BaCl <sub>2</sub>	208,24	
Demir 3 klorür	FeCl <sub>3</sub>	162,21	
Potasyum iyodür	KI	166,00	
Sodyum iyodür	NaI	149,89	
Bakır sülfat (susuz)	CuSO <sub>4</sub>	159,6	79,8
Bakır sülfat pentahidrat	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249,7	
Gümüş nitrat	AgNO <sub>3</sub>	160,88	160,88
Sodyum nitrat	NaNO <sub>3</sub>	84,99	
Sodyum nitrit	NaNO <sub>2</sub>	68,99	
Potasyum permanganat	KMnO <sub>4</sub>	158,03	
Bakır 1 oksit	Cu <sub>2</sub> O	143,09	
Bakır 2 oksit	CuO	79,55	
Cıva 1 oksit	Hg <sub>2</sub> O	417,18	
Cıva 2 oksit	HgO	216,59	
Okzalik asit	(COOH) <sub>2</sub>	90,04	
Okzalik asit dihidrat	(COOH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	126,06	
Asetik asit	CH <sub>3</sub> COOH	60,05	
Kurşun asetat	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	325,20	
Glukoz	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,00	
Sukroz	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	341,99	
Glisin	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	75,07	
Üre	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	60,07	

**Molekül ağırlığı**, bir maddenin molekülünün yapısına katılan tüm atomların ağırlıklarının toplamıdır. Örneğin suyun (H<sub>2</sub>O) molekül ağırlığı; 2 x 1,008 + 16,00 = 18,016'dir.

Molekül ağırlığının gram cinsinden ifadesi **mol** olarak tanımlanır. 1/1000 mol=1 mmol veya 1 mol=1000 mmol.



Örneğin 1 mol (1000 mmol) su, 18,016 gram su demektir veya 18,016 gram su 1 mol'dür. Gerçekte 1 mol (1000 mmol) suda Avogadro sayısı ( $6,023 \times 10^{23}$ ) kadar su molekülü bulunur.

**Ekivalan ağırlık (eşdeğer ağırlık)**, bir element veya bileşiğin 1 mol hidrojen ile birleşen veya onun yerine geçebilen miktarını ifade eder; moleküler ağırlığın valansa (değerlik) bölümüne eşittir.

Ekivalan ağırlığın gram cinsinden ifadesi, **ekivalan sayısı (Eq)** olarak tanımlanır.  $1/1000$  Eq=1 mEq veya  $1$  Eq=1000 mEq.

Örneğin 1 ekivalan HCl, 36,46 gram HCl demektir veya 36,46 gram HCl, 1 ekivalan HCl'dir. Aynı şekilde 1 Eq (1000 mEq) kalsiyum,  $40,08/2=20,04$  gram kalsiyum demektir veya 20,04 gram kalsiyum 1 Eq (1000 mEq) kalsiyumdur.

**Valans (değerlik)**, bir asit için moleküldeki yer değiştirebilen H atomları sayısı, bir baz için moleküldeki yer değiştirebilen OH<sup>-</sup> iyonu sayısı, bir tuz için moleküldeki (+) yüklü iyonların yerine geçebilecek H<sup>+</sup> iyonu sayısı, oksidan bir madde için reaksiyon sırasında alınıp verilen elektron sayısıdır.

### Asitler:



Deriye temas ettiğinde, solunduğunda, ağız yoluyla alındığında kuvvetli tahriş edici maddelerdir. Derişik asitler seyreltme amacıyla suyla karıştırılınca ekzotermik tepkime sonucu çok büyük ısı açığa çıkar ve sıçramalara neden olur. Asitler, birçok metal kapları, bazı plastik kapları kolayca çözerler; giysilere bulaştıklarında yakıcı, delici özellik gösterirler.

Asitlerle temas edildiğinde eğer giysilere bulaşmışsa hemen çıkartılmalıdır. Asidin bulaştığı bölge bol su ile iyice yıkanarak temizlenmelidir. Su yoksa, asidin bulaştığı bölge seyreltik NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi (%1'lik) ile nötrleştirilmeli veya pamuk, sargı bezi gibi emici maddelere emdirilerek temizlenmelidir.

### Bazlar:



NaOH, KOH gibi anorganik bazlar ve birçok organik bazın derişik çözeltileri kuvvetli tahriş edici ve aşındırıcıdır. Bunlarla çalışırken deriye temas etmemesine dikkat edilmeli, kaza anında bol su ile yıkanarak temizlenmeli veya seyreltik asetik asit çözeltisi (%1'lik) ile nötrleştirilmelidir. **Asit ve baz çözeltilerini seyreltirken asla su üzerine dökülmemelidir.**

## Gümüş Nitrat:



Çözeltisi, göz ve solunum yollarında tahrişe neden olur. Deriye temas ettiğinde  $Ag_2O$  oluşumu nedeniyle deriyi siyah renge boyar.

## Bakır Sülfat:



Göztaşı olarak da bilinir. Mavi ve kokusuz bir maddedir. Cilde temas ettiğinde hafif irritasyona neden olabilir. Göze temas ettiğinde korneada hasar meydana gelebilir. Yanlışlıkla içildiğinde veya yutulduğunda : mide ağrısı, kusma, ishal, kan basıncında düşme (hipotansiyon), çarpıntı, asidoz, bayılma şikayetleri ortaya çıkabilir. Kısa süre içerisinde ölüm meydana gelir.

## Eter:



Bir oksijen atomunun iki organik kökle bağlandığı (R-O-R) organik bileşik sınıfı. En yaygın olarak kullanılan iki eter; dietil eter (veya etil eter,  $C_2H_5OC_2H_5$ ). Kolay buharlaşan maddelerdir. Eterle çalışırken eter buharlarının solunması sonucu zehirlenmeler olabilir. Cerrahide kullanılan ilk anestezi maddesidir. Yanmaz olduğundan öbür anestezi malzemelerinin yerini almıştır. Bayıltma için kullanılır.



## Kloroform:



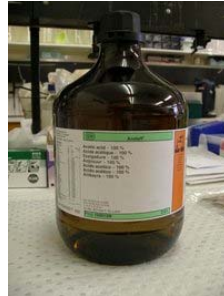
Anestezik (uyuşturucu) etkisi olan bir kimyasal. Kimyasal formülü  $\text{CHCl}_3$  olup, triklorometan da denir. Ağır, renksiz bir sıvı olup  $61^\circ\text{C}$ 'de kaynar. Kolay buharlaşır. Yağları çözer. Kimyasal işlemlerde çok kullanılır.

## Karbon Tetraklorür:



Laboratuarlarda genellikle çözücü olarak sıkça kullanılır. Karaciğer metabolizmasını bozup yağlanma yapar.

## Asetik Asit:



$\text{CH}_3\text{COOH}$  formüllü bir organik asittir; sirkeye ekşi tadını ve keskin kokusunu vermesiyle bilinir. Suda tamamen çözünür. Tuz ve esterine asetat denir. Yoğun asetik asit cildi yakar, göze kalıcı zarar verir ve ciltte kabarcıklar oluşmasına neden olur.

## Oksalik Asit:



$\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$  formüllü, iki karboksil grubunun direkt olarak bağlanabilmesi ile oluşan tek bileşiktir. Bu yüzden en kuvvetli organik asitlerden biri olarak bilinir. Kristal yapılı (erime noktası  $189^\circ\text{C}$ ), renksiz ve zehirli bir organik karboksilik asittir. Kendisinin, potasyum veya

kalsiyum tuzu halinde bazı bitkilerde bulunur. Kolayca yükseltgenebilir ve bu özelliğinden dolayı, beyazlatma , pas ve mürekkep lekesini çıkarma gibi işlemlerde kullanılır.

**Glukoz (Glikoz):**



Altı karbon atomu ve bir aldehid grubuna sahip bir basit şekerdir (monosakkarid). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) önerdiği adlandırma kurallarına göre "glikoz", monosakkarid yerine kullanılan bir sözcüktür, glukoz ise burada söz konusu olan şeker türüdür. Glukoz, yaşam için en önemli karbohidratlardan biridir.

## 1.5.2. Tehlike Özelliklerine Göre Kimyasal Maddeler

### 1.5.2.1. Patlayıcı (Explosive, E) Maddeler:



Isı, ışık gibi termik enerji ile veya vurma, sürtme, çarpma gibi mekanik enerji ile molekül yapıları bozulup çok miktarda ısı, gaz ve yüksek basınç oluşturarak ekzotermik tepkime veren madde ve karışımlardır.

İyot benzen, etilnitrat, etilnitrit, pikrikasit, trinitrobenzen, trinitrotoluen, trinitrogliserin (nitrogliserin) patlayıcı maddelerin bazılarıdır.

### 1.5.2.2. Oksitleyici (Oxidising, O) Maddeler:



Özellikle yanıcı maddelerle veya hava oksijeni ile yanmayan bazı maddelerle temas edince onları yükseltgeyerek ekzotermik bir tepkime veren ve bu tepkimede indirgenebilen madde veya karışımlardır.

Organik peroksitler, peroksiasetik asit, permanganat, kromat, nitrik asit, nitratlar, nitritler, anorganik peroksitler, kloratlar, perkloratlar oksitleyici maddelerin bazılarıdır.

### 1.5.2.3. Alev Alıcı Maddeler:



Kolayca buhar haline geçen ve buharları hava ile karışınca patlayıcı karışımlar oluşturan maddelerdir. Üç grupta toplanırlar.

**Aşırı Alev Alıcı (Extremely Flammable, F<sup>+</sup>) Maddeler:** Tutuşma sıcaklıkları 0°C'nin altındadır. Propan, siklopropan, bütan, pentan, dimetileter, dietileter, propilamin, etilamin, trimetilamin aşırı alev alıcı maddelerin bazılarıdır.

**Kolay Alev Alıcı (Highly Flammable, F) Maddeler:** Hava ile temas ettiklerinde kendiliğinden ısınan ve hava oksijeni ile reaksiyona girerek alevlenebilen veya ateş kaynağı ile kısa süre temas ettiğinde tutuşup yanmaya devam eden madde ve karışımlarıdır. Bunlar üç grupta toplanırlar.

Oda sıcaklığında kendiliğinden tutuşabilen maddeler. Örneğin metalkarbonil bileşikleri.

Tutuşma sıcaklığı  $\leq 21^{\circ}\text{C}$  olan sıvılar. Örneğin metil alkol, etil alkol, propil alkol, butil alkol, pentil alkol, aseton, benzen, toluen, etil asetat.

Nemli hava veya su ile temas ettiğinde kimyasal bir tepkime sonucu çok kolay tutuşabilen gaz oluşturan madde ve karışımları. Örneğin alkalimetaller, beyaz fosfor.

**Alev Alıcı (Flammable) Maddeler:** Tutuşma sıcaklığı  $21^{\circ}\text{C}$  ile  $55^{\circ}\text{C}$  arasında olan sıvı haldeki madde ve karışımlarıdır. Bunlarda tehlike sembolü kullanılmaz. Örneğin metilstiren.

### 1.5.2.4. Toksik (zehirleyici) Maddeler:



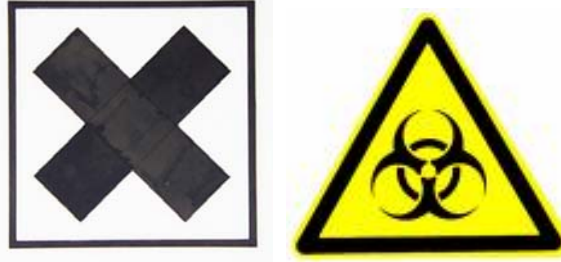
Biyolojik bir sistemdeki normal fonksiyonları bozabilen ve bu nedenle sağlığa zarar verebilen maddelerdir. Toksik maddelerin biyolojik etkisi doz ile belirtilir; öldürücü doz (Letal Dose, LD), canlının vücut ağırlığının kg'ı başına mg olarak alınan miktardır. Bir defada alınan ve 14 günlük gözlem sonucunda deney hayvanlarının yarısının ölmesine neden olan doz öldürücü doz olarak kabul edilir ve LD50 ile gösterilir. Toksik maddeler, çok toksik madde ve toksik madde olarak iki sınıfta toplanmıştır.

**Çok Toksik (Very Toxic, T<sup>+</sup>) Maddeler:** Çok az miktarda (eser miktarda) solunduğunda, ağız yoluyla alındığında veya deri yoluyla emilerek alındığında insan sağlığı üzerinde akut veya kronik rahatsızlıklara veya ölüme neden olan madde ve karışımlarıdır. Potasyum siyanür, hidrojen sülfür, azot dioksit, hidrojen florür, brom, fosgen, tetraklor etan, dimetil sülfat, nitrogliserin, nitrobenzen, nitroanilin, metilcivaklorür çok toksik maddelerin bazılarıdır.

**Toksik (Toxic, T) Maddeler:** Az miktarda solunum, ağız ve deri yoluyla alındığında canlı sağlığı üzerinde akut veya kronik rahatsızlıklara veya ölüme neden olan madde ve

karışımlarıdır. Kükürdioksit, klor, amonyak, klorasetikasit, karbon tetraklorür, fenol, krezol, anilin, dimetilanilin, diaminobenzen toksik maddelerin bazılarıdır.

#### 1.5.2.5. Sağlığa Zararlı (Harmful) Maddeler:



Solunumla, ağız yoluyla veya deri yoluyla alındığında insan sağlığı üzerinde akut veya kronik rahatsızlıklara veya ölüme neden olan madde ve karışımlarıdır. Toluen, diklormetan, kloroform, okzalik asit, glikol, sikloheksanol, benzaldehid, benzil alkol, aminofenol, mangandioksit, iyot, potasyum florür sağlığa zararlı maddelerin bazılarıdır.

**Tahriş Edici (Irritant, Xi) Maddeler:** Deri ile veya mukoza ile doğrudan temas ettiğinde dokunduğu yeri tahriş ederek geçici veya kalıcı rahatsızlıklara neden olan maddelerdir. Bir kimyasal maddenin tahriş edici sayılabilmesi için deri ile temasında en az 24 saatlik süre içerisinde etkisini göstermesi gerekir. Zayıf organik asitler, asitanhidritler, bazlar, alkoller, aminler, asit ve baz çözeltileri tahriş edici maddelerin bazılarıdır.

**Hassasiyet Verici (Sensitising, Xn, Xi) Maddeler:** Hidrazin, formaldehid, siyanamid, tetrakloronitrobenzen, akrilat, deride alerjiye neden olan hassasiyet verici maddelerin bazılarıdır. Kobalt, nikelsülfat, fitalik asidin anhidriti solunum yollarında alerjiye neden olan hassasiyet verici maddelerin bazılarıdır.

#### 1.5.2.6. Aşındırıcı (Corrosive, C) Maddeler:



Deri ile temas ettiğinde derinin aşınmasına ve tahrip olmasına neden olan; göz, akciğer, mide gibi organik dokulara zarar veren; metalleri ve bazı yapı malzemelerini aşındıran maddelerdir. Bunlar, deride yaptıkları tahribata göre aşındırıcı (korozif) ve çok aşındırıcı (çok korozif) olmak üzere iki grupta toplanırlar.

**Aşındırıcı Maddeler:** Deriye temas edince 4 saat içinde etkisini gösteren aşındırıcı maddelerdir. Hidroklorik asit, hidroflorik asit, fosforik asit, çinko klorür, aset anhidrit, amonyak çözeltisi, benzilamin, kalay tetraklorür aşındırıcı maddelerin bazılarıdır.

**Çok Aşındırıcı Maddeler:** Deriye temas ettiğinde 3 dakika içinde aşındırıcı etkisini gösteren maddelerdir. Sülfürik asit, nitrik asit, hidroflorik asit, potasyum hidroksit, sodyum hidroksit, formik asit, asetik asit, triklorasetikasit, trietilamin çok aşındırıcı maddelerin bazılarıdır.

#### 1.5.2.7. Kanserojen (Carcinogenic) Maddeler:



Solunum, ağız ve deri yoluyla alındığında kanser oluşumuna neden olan veya kanser oluşumunu hızlandıran maddelerdir. Ağır metaller ve bileşikler, halojenli hidrokarbonlar,

aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, epoksitler, N-nitrozaminler, alkilleyiciler, lifli maddeler kanserojen maddelerdirler. Kanserojen maddeler genellikle üç ana grupta toplanırlar.

**A1 Grubu (Kategori 1) Kanserojen Maddeler;** Kötü huylu tümörler oluşturduğu bilinen maddelerdir. Örneğin asbest, kromatlar, kadmiyum klorür.

**A2 Grubu (Kategori 2) Kanserojen Maddeler:** Deney hayvanlarında kanser oluşturduğu bilinen ve insanlarda da aynı tehlikeyi yaratacağı düşünülen maddelerdir.

**B Grubu (Kategori 3) Kanserojen Maddeler:** Kanser yapma tehlikesi olan maddelerdir.

Kötü huylu tümörlerin oluşumuna neden olan maddelere mutajenler denir. Anormal doğumlara neden olan maddelere teratojenler denir.

*Mutajen Maddeler,* solunumla, ağız yoluyla ve deri yoluyla alındığında kalıtsal ve genetik bozukluklara neden olan maddelerdir. Akrilamit, etilen oksit, etilen imin, dietil sülfat A1 ve A2 grubu mutajenik maddelerin bazılarıdır. Atrazin, ziran, thiran B grubu mutajen maddelerin bazılarıdır.

*Üreme Açısından Toksik Maddeler,* solunum yoluyla, ağız yoluyla veya deri yoluyla alındığında erkek ve dişilerin üreme organlarına etki ederek kapasitelerini azaltan, anormal doğumlara neden olan maddelerdir. 2-etoksietanol, 2-etoksietilasetat, benzopiren A1 ve A2 grubu üreme açısından toksik maddelerdendirler. Kurşun asetat, nitrotoluen, nitrobenzen, dialkil kurşun, kurşun kromat B grubu üreme açısından toksik maddelerdendirler.

#### 1.5.2.8. Çevre İçin Tehlikeli (Dangerous for the Environment, N) Maddeler:



Çevreye yayıldığında insan, hayvan, bitki, su, toprak ve hava gibi çevre elemanlarından birine veya birkaçına veya tümüne birden kısa süreli ya da uzun süreli tehlikeli olan ve zarar veren maddelerdir.

Denizler, göller ve nehirlerde yaşayan çeşitli canlılara zarar veren maddelerin örnekleri; amonyak, anilin, klorasetikasit, halojenler, sodyum nitrit, bakır sülfat, nitrotoluen, tiyoüre, monoklormetandır.

Havadaki çeşitli gazlara ve özellikle ozon tabakasına zarar veren maddelerin örnekleri; kloroflorohidrokarbonlar, karbonmonoksit, azot oksitleri, karbon tetraklorür, trikloreterandır.

#### 1.5.2.9. Radyoaktif Maddeler:



Atom çekirdeklerinin kararsızlığı nedeniyle daha kararlı hale geçmek için kendiliğinden bozularak  $\alpha$ ,  $\beta^-$ ,  $\gamma$ ,  $\beta^+$  gibi çeşitli ışınlar yayan maddelerdir. Uranyum, toryum, polonyum, radyum, radon,  $^{14}\text{C}$  çok bilinen radyoaktif maddelerdir. Ayrıca insan aktiviteleri sonucu meydana gelen yapay radyasyonlar da vardır.

Radyoaktif maddelerin yaydığı doğal radyasyonlar ve yapay yollarla oluşturulan radyasyonlar, canlı varlıkların bünyelerinden geçerken birçok kimyasal, fiziksel ve biyolojik değişimlere neden olurlar.

Radyasyondan korunmanın birinci önlemi bu maddelerden uzak durmaktır.

## 1.6. Laboratuvarda Güvenli Çalışma

Laboratuvar çalışmalarında güvenlik esastır. Çalışmaya başlamadan önce laboratuvar koşullarının değerlendirilmesi yapılmalı, deneyde kullanılacak madde ve malzemelerin değerlendirilmesi yapılmalıdır. Laboratuvarda güvenli çalışma kurallarına uyulmalıdır. Laboratuvarda temizlik kurallarına uyulmalıdır.

**1.6.1. Laboratuvar Koşullarının Değerlendirilmesi:** Laboratuvarımızın fiziki durumunu iyi tanımalı ve tehlike anında nasıl davranılacağı önceden tasarlanmalıdır. Bunun için aşağıdaki durumlar dikkate alınmalıdır.

- 1) Yangın çıkış kapısı ve yangın merdiveninin kontrolü yapılmalıdır.
- 2) Alarm sisteminin kontrolü yapılmalıdır.
- 3) Yangın söndürücülerinin yerleri ve nasıl kullanılacağı bilinmelidir.
- 4) Gaz ve su vanalarının yerleri ve nasıl kapatılacağı bilinmelidir.
- 5) Elektrik ana şalterinin yeri ve nasıl kapatılacağı bilinmelidir.
- 6) Gaz tüplerinde kaçak olup olmadığı kontrol edilmelidir.
- 7) Çalışma ortamının havalandırması yapılmalıdır.
- 8) Çeker ocakların yerleri ve acil kullanıma hazır olup olmadıkları kontrol edilmelidir.
- 9) Işıklandırmanın kontrolü yapılmalıdır.
- 10) Basınçlı gaz tüplerinin sağlam ve desteğe bağlı olup olmadıkları kontrol edilmelidir.
- 11) Atıkların muhafaza edileceği yerler kontrol edilmelidir.
- 12) Raflar ve malzeme dolaplarının güvenli olup olmadığı kontrol edilmelidir.
- 13) Tehlikeli kimyasal maddelerin konulduğu kaplar, şişeler, tüpler üzerindeki gerekli uyarı işaretleri kontrol edilmelidir.
- 14) Çalışma yapılacak ortamda patlayıcı, alev alıcı, yanıcı, yakıcı ve diğer tehlikeli maddelerin olup olmadığı kontrol edilmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır.
- 15) Santrifüj makineleri, basınçlı kaplar, vakum pompaları kontrol edilmelidir.
- 16) Kaza anında kullanmak için ilk yardım malzemeleri bulundurulmalı ve bunların nasıl kullanılacağı öğrenilmelidir.
- 17) Her öğrenci için laboratuvar gözlüğü bulundurulmalıdır.
- 18) Revir, hastane, itfaiye gibi yardım istenecek kurumların telefonları bulundurulmalıdır.
- 19) Bütün personel ve öğrenciler laboratuvar güvenliği konusunda bilgilendirilmelidir.

**1.6.2. Deneyde Kullanılacak Madde ve Malzemelerin Değerlendirilmesi:** Yapacağımız deneyin en ince ayrıntılarına kadar önceden iyi planlanması hayati önem taşır. Deneye başlamadan önce özellikle aşağıdakiler yapılmalıdır.

- 1) Yapacağımız deneye ait deney föyü çok dikkatli okunmalı, deneyin hangi aşamalardan geçmesi gerektiği ve bu aşamaların bir listesi yapılmalıdır.
- 2) Deneyde kullanılacak malzemelerin listesi yapılmalıdır.
- 3) Deneyde kullanılacak malzemelerin sağlam ve güvenli olup olmadıkları belirlenmelidir.
- 4) Kullanılacak malzemelerden kaynaklanabilecek kazalar öngörülmesi ve tedbirler alınmalıdır.
- 5) Deneyde kullanılacak kimyasal maddelerin listesi yapılmalıdır. Bu maddelerin özellikleri araştırılmalı ve bu yönden tedbirler alınmalıdır. Kimyasal madde etiketlerinde bulunan R işaretleri, kullanıcıyı hem tehlike sembolleri açısından hem de tehlikenin

niteliği açısından uyarır; S işaretleri ise bu maddelerle çalışırken ortaya çıkacak sağlıkla ilgili tehlikelerden nasıl korunulacağı ile ilgili güvenlik önerilerini belirtir. Örneğin R1-Kuru halde patlayıcıdır, R10-Alevlenebilir, R20-Solunumla alınırsa sağlığa zararlıdır, S1-Kapalı yerde saklayın, S3-Serin yerde tutun, S24-Cilt ile temastan kaçının,...

**1.6.3. Laboratuvarda Güvenli Çalışma Kuralları:** Laboratuvarda güvenli çalışma için mutlaka aşağıdaki kurallara uyulmalıdır.

- 1) Laboratuvarda mutlaka önlük giyin.
- 2) Laboratuvarda hiçbir zaman yiyecek ve içecek bulundurmayın ve tüketmeyin.
- 3) Laboratuvarda hiçbir zaman sigara içmeyin.
- 4) Her türlü örnek ya da reaktif potansiyel olarak infeksiyöz nitelikte kabul edin.
- 5) Deney sırasında örnek ve reaktiflere direkt olarak temas etmeyin; eldiven kullanın.
- 6) Reaktif içeren şişeleri ya da cam malzemeyi hiçbir zaman boyun kısmından tutmayın; malzemenin boyutuna göre bir ya da iki elinizle ana gövde kısmından tutun.
- 7) Asit içeren bir solüsyon hazırlarken asidi yavaş yavaş ve sık sık karıştırarak suyun üzerine ekleyin; hiçbir zaman derişik asit üzerine su eklemeyin.
- 8) Ağız ile pipetlemeden mümkün olduğu kadar kaçının.
- 9) Herhangi bir infeksiyöz materyalin ya da reaktifin dökülmesi durumunda laboratuvar sorumlusu asistanla temasa geçip uygun dezenfektanla temizliği yapın.
- 10) Herhangi bir madde ile direkt temas sonrasında mutlaka ellerinizi yıkayın.
- 11) Deneyiniz bitince kullandığınız tüpleri hemen musluk suyu ile çalkalayıp yıkayın.

**1.6.4. Laboratuvarda Temizlik Kuralları:** Laboratuvar temizliğinde kimyasal temizlik ve bakteriyolojik temizlik olmak üzere iki temel kavram söz konusudur. Biyokimya Laboratuvarları için kimyasal temizlik aşağıdaki basamaklardan geçilerek sağlanır.

***Kaba Temizlik Basamağı:*** laboratuvarda kullanılan her türlü alet, tüp, cam ve porselen kaplar, pipet ve büretler öncelikle musluk suyu ile bol miktarda çalkalanmalı ve yıkanmalıdır.

***Kurumuş Protein ya da Lipid Artıklarının Temizlenmesi Basamağı:*** Kurumuş ve yerleşmiş protein artıkları için %10'luk KOH çözeltisi ile uzun süre temas ve ardından musluk suyu ile yıkama gerekir. Gözle fark edilen lipid kirleri için KOH'in alkoldeki çözeltisini uygulamak ve ardından yine musluk suyu ile yıkamak gerekir.

***Diğer Kirlerin Temizlenmesi Basamağı:*** Bu tip temizlik için kromsülfürik asit ( sülfürik asit+potasyum bikromat)çözeltisi ve seyreltik nitrik asit çözeltisi kullanılır.

***Kimyasal Deterjanlarla Temizleme:*** Bu işlemde kullanılan deterjanlar kuvvetli alkali özellik taşırlar, noniyoniktirler ve metal içermezler.

***Distile Sudan Geçirme Basamağı:*** Yukarıdaki basamakların ardından malzemeler akan distile suyun altından geçirilerek çalkalanır.

***Kurutma:*** Temizlikten sonra cam kaplar, pipetler, büretler tam olarak kurutulur. Bunun için kurutma etüvünde 100-150°C'de 2-3 saat tutulurlar.



## 2. ÇÖZELTİLER, KONSANTRASYONLAR VE ÇÖZELTİ HAZIRLAMA

### 2.1. Çözeltiler



Çözeltiler, iki veya daha fazla maddenin homojen karışımlarıdır.

Genel olarak bir çözeltinin bileşenleri (komponentleri); çözen madde (**çözücü, çözen, solvent, dispersiyon ortamı**) ve çözülmüş madde veya maddeler (**çözünen, solüt, substrat, dispers fazı**)'dır. Çözücü genelde sıvı ve sudur; alkol, kloroform gibi sıvılar da olabilir. Çözülmüş maddeler katı, sıvı, gaz olabilir.



Bir çözeltideki çözülmüş madde miktarının fazla olması, çözeltinin konsantrasyonunun (derişiminin, yoğunluğunun) yüksek olduğu ve çözeltinin **konsantre (derişik, yoğun)** olduğu şeklinde ifade edilir; bir çözeltideki çözülmüş madde miktarının az olması, çözeltinin konsantrasyonunun düşük olduğu ve çözeltinin **dilüe (az yoğun, seyreltik)** olduğu şeklinde ifade edilir. *Derişik çözeltilerde çözülmüş madde miktarı fazladır, seyreltik çözeltilerde çözülmüş madde miktarı azdır.*

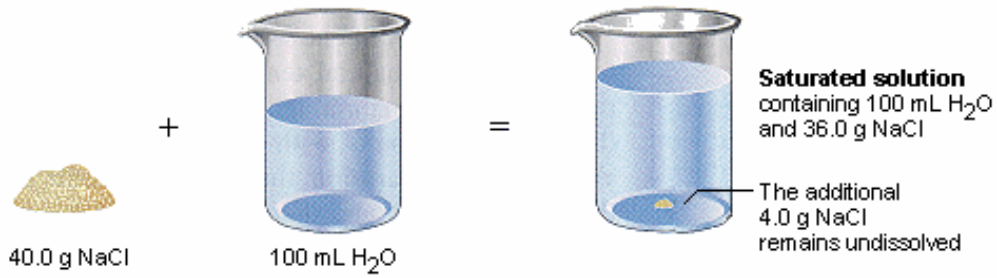




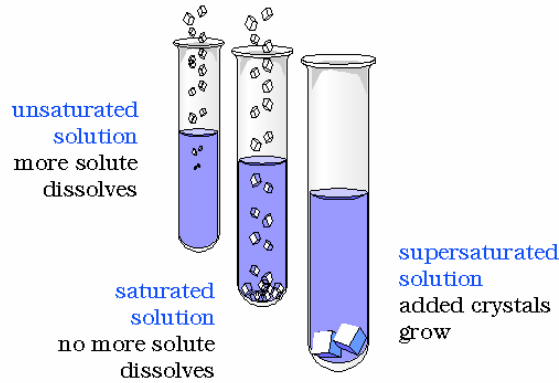
Bir çözeltilde çözülmüş madde miktarı, belli bir değerden daha fazla olamaz. Çözülmüş maddenin maksimumunu (azamisini, bulunabileceğin en fazlasını) içeren çözelti, **doymuş** çözelti olarak tanımlanır.



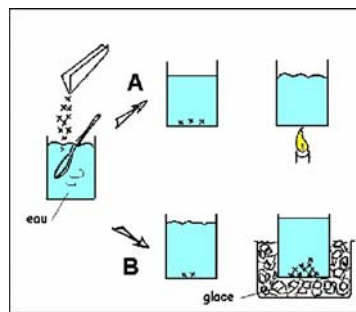
Bir maddenin 20°C' deki doymuş çözeltisinin 1 litresinde bulunan substratın gram veya mol olarak miktarı, **maddenin çözünürlüğü** olarak tanımlanır; bir madde için çözünürlük, g/L veya mol/L olarak ifade edilir.



Doymuş çözeltilere eklenecek daha fazla solüt, çözünmeden çözeltinin dibinde çökelti olarak kalır.



Dibinde çökelti olmayan doymuş çözeltilere çözücü eklenmesi, çözeltiyi daha az konsantre veya seyreltik hale getirir. Sıcaklık değişiklikleri de çözeltinin doymuşluğunu değiştirir.



## 2.2. Çözelti Konsantrasyonları

Bir çözeltinin konsantrasyonu, çözeltinin belirli bir volümü içinde çözünmüş olan substrat miktarıdır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.

Çözelti konsantrasyonları, % konsantrasyon, molar konsantrasyon, molal konsantrasyon, normal konsantrasyon gibi değişik şekillerde ifade edilebilir. Çözeltiler de buna göre % çözeltiler, molar çözeltiler, molal çözeltiler, normal çözeltiler gibi çeşitli sınıflara ayrılırlar.

### 2.2.1. % Çözeltiler

3 types of concentration percentages:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{(w/w)} \quad \frac{\text{g solute}}{\text{g solution}} \times 100\% \\ \text{(v/v)} \quad \frac{\text{mL solute}}{\text{mL solution}} \times 100\% \\ \text{(w/v)} \quad \frac{\text{g solute}}{\text{mL solution}} \times 100\% \end{array} \right.$$

**% w/v çözeltiler:** Konsantrasyonu, 100 mL çözeltideki çözünmüş madde miktarı gram olarak ifade edilen çözeltilerdir. Örneğin %5'lik glukoz çözeltisi dendiğinde, çözeltinin 100 mL'sinde 5 gram glukoz bulunduğu anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.

**% w/v çözeltilerin hazırlanması:**

- 1) Hazırlanacak çözelti volümü için uygun volümde kuru ve temiz bir balon joje alınır.
- 2) Balon jojeye bir miktar çözücü konur.
- 3) Hazırlanacak volümde çözeltide bulunması gereken solüt miktarı hesaplanır:

$$\frac{\text{İstenen konsantrasyon}(\%)}{100} \times \text{İstenen volüm}(\text{mL}) = \text{g tartılacak solüt miktarı}$$

4) Hesaplanan miktarda solüt tartılır ve balon jojedeki çözücüye eklenerek karıştırma suretiyle çözülür.

*\*KOH ve NaOH gibi alkalilerin çözünmeleri sırasında açığa çıkan fazla miktarda ısı balonun aşırı ısınma ile çatlamasına neden olabilir. Bu durumda soğutmak amacıyla balonun dışı, akan çeşme suyu altında tutulmalı; fakat bu sırada balonun içine çeşme suyu kaçmamasına dikkat etmelidir.*

5) Balon jogenin işaret çizgisine kadar çözücü eklenerek volüm istenilen değere tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**Örnek:** 250 mL volümde % 5'lik glukoz çözeltisinin hazırlanması:

1°) 250 mL'lik kuru ve temiz bir balon joje alınır.

2°) Balon jojeye bir miktar distile su konur.

3°)  $\frac{5}{100} \times 250 = 12,5$  g glukoz tartılır ve balondaki suya eklenerek çözülür.

4°) Balonun işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm 250 mL'ye tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**%w/w çözeltiler:** Konsantrasyonu, 100 g çözeltideki çözünmüş madde miktarı gram olarak ifade edilen çözeltilerdir. Örneğin %5 w/w'lik glukoz çözeltisi dendiğinde, çözeltinin 100

g'ında 5 gram glukoz bulunduğu anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.

(w/w) unless stated otherwise

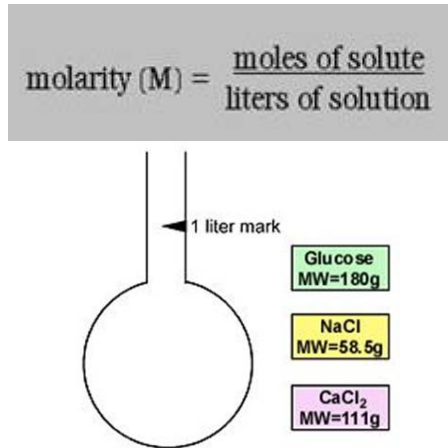
$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ g solute}}{10^6 \text{ g solution}} = \frac{1 \text{ mg solute}}{1 \text{ kg solution}}$$

for dilute aqueous solutions, ppm ~ mg  
solute/L solution

**%v/v çözeltiler:** Konsantrasyonu, 100 mL çözeltideki çözülmüş madde miktarı mL olarak ifade edilen sıvı-sıvı çözeltilerdir. Örneğin %70 v/v'lik etil alkol çözeltisi dendiğinde, çözeltilerin 100 mL'sinde 70 mL etil alkol bulunduğu anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.

(v/v) ppm is sometimes written ppmv  
1 ppmv = 1 µL solute/1 L solution.

**2.2.2. Molar çözeltiler:** Konsantrasyonu, 1000 mL çözeltideki çözülmüş madde miktarı mol olarak ifade edilen çözeltilerdir. Örneğin 2 molar (2M) glukoz çözeltisi dendiğinde, çözeltilerin 1000 mL'sinde 2 mol glukoz bulunduğu anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.



1 mol madde, Avogadro sayısı ( $6,023 \times 10^{23}$ ) kadar birim parçacık (atom, molekül veya iyon) içeren miktarda maddedir ve 1 mol maddenin kütlesi, gram cinsinden birim parçacık kütlesine eşittir. Örneğin;

- 1 mol (1000 mmol) Ca, 40,08 g Ca (Kalsiyumun atom ağırlığı 40,08)
- 1 mol (1000 mmol) glukoz, 180 g glukoz (glukozun molekül ağırlığı 180)
- 1 mol (1000 mmol) Na<sup>+</sup>, 22,99 g Na<sup>+</sup> (Sodyumun atom ağırlığı 22,99)

### **Katı maddelerin molar çözeltilerinin hazırlanması:**

1) Hazırlanacak çözelti volümü için uygun volümde kuru ve temiz bir balon joje alınır.

2) Balon jojeye bir miktar çözücü konur.

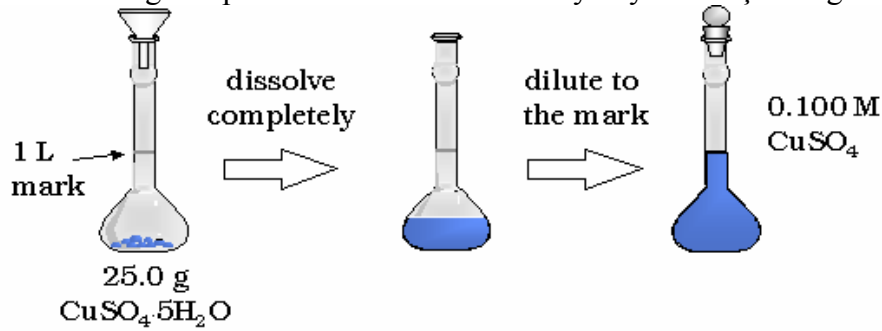
3) Hazırlanacak volümde çözeltide bulunması gereken solüt miktarı hesaplanır:

$\text{İstenen volüm}(L) \times \text{İstenen molarite}(M) \times \text{Molekül ağırlığı}(g) = g \text{ tartılacak solüt}$

4) Hesaplanan miktarda solüt tartılır ve balon jojedeki çözücüye eklenerek karıştırma suretiyle çözülür.

*\*KOH ve NaOH gibi alkalilerin çözünmeleri sırasında açığa çıkan fazla miktarda ısı balonun aşırı ısınma ile çatlamasına neden olabilir. Bu durumda soğutmak amacıyla balonun dışı, akan çeşme suyu altında tutulmalı; fakat bu sırada balonun içine çeşme suyu kaçmamasına dikkat etmelidir.*

5) Balon jojenin işaret çizgisine kadar çözücü eklenerek volüm istenilen değere tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.



**Örnek:** 250 mL (0,250L) volümde 2M'lık NaOH çözeltisinin hazırlanması:

1°) 250 mL'lik kuru ve temiz bir balon joje alınır.

2°) Balon jojeye bir miktar distile su konur.

3°)  $0,250 \times 2 \times 40 = 20 \text{ g NaOH}$  tartılır ve balondaki suya eklenerek çözülür.

4°) Balonun işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm 250 mL'ye tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

### **Sıvı asitlerin molar çözeltilerinin hazırlanması:**

1) Hazırlanacak çözelti volümü için uygun volümde kuru ve temiz bir balon joje alınır.

2) Balon jojeye bir miktar distile su konur.

3) Hazırlanacak volümde çözeltide bulunması gereken sıvı asit miktarı hesaplanır:

$\frac{\text{istenen molarite}(M) \times \text{moleküler ağırlığı}(g) \times \text{istenen volüm}(L)}{\text{densite} \times \text{konsantrasyon}(\%)} = \text{mL alınacak sıvı asit}$

4) Hesaplanan miktarda sıvı asit alınır ve balon jojedeki suya eklenerek karıştırma suretiyle çözülür.

*\* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gibi asitlerin çözünmeleri sırasında açığa çıkan fazla miktarda ısı, balonun aşırı ısınma ile çatlamasına neden olabilir. Bu durumda soğutmak amacıyla balonun dışı, akan çeşme suyu altında tutulmalı; fakat bu sırada balonun içine çeşme suyu kaçmamasına dikkat etmelidir.*

5) Balon jojenin işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm istenilen değere tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**Örnek:** 500 mL (0,500 L) volümde 2M'lık HCl çözeltisinin, dansitesi 1,19 olan % 38'lik (0,38) konsantre HCl'den hazırlanması:

1°) 500 mL'lik kuru ve temiz bir balon joje alınır.

2°) Balon jojeye bir miktar distile su konur.

$$3^{\circ}) \frac{2 \times 36,46 \times 0,500}{1,19 \times 0,38} = 80,63 \text{ mL konsantre HCl alınır ve balondaki suya eklenerek}$$

çözülür.

4°) Balonun işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm 500 mL'ye tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

### **Molar ve % konsantrasyonların birbirine çevrilmesi**

$$\text{mol/L konsantrasyon} \times \text{molekül ağırlığı} = \text{g/L konsantrasyon}$$

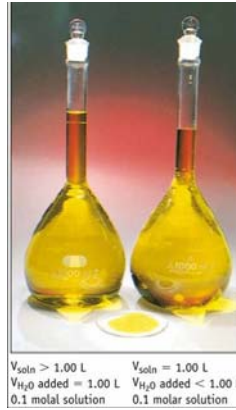
$$\frac{\text{mM konsantrasyon} \times \text{molekül ağırlığı}}{10} = \text{mg/dL konsantrasyon}$$

$$\frac{\% \text{mg konsantrasyon} \times 10}{\text{molekül ağırlığı}} = \text{mM konsantrasyon}$$

**2.2.3. Molal çözeltiler:** Konsantrasyonu, 1000 g çözücüde çözülmüş madde miktarı mol olarak ifade edilen çözeltilerdir. Örneğin 2 molal glukoz çözeltisi dendiğinde, 1000 g çözücüde 2 mol glukoz çözüldüğü anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur, sudan başka bir sıvı ise bu ayrıca belirtilir.

$$\text{molality} = \frac{\text{mol solute}}{\text{kg solvent}}$$

Molalite, sıcaklık değişimine bağımlı değildir. Konsantrasyon birimi olarak molariteye oranla daha duyarlıdır. Buna rağmen klinik laboratuvarlarda kullanımı yaygın değildir. Klinik laboratuvarlarda kullanılan çözeltiler sulu çözeltiler olduklarından molalite ile molarite arasında pek büyük fark yoktur.



**2.2.4. Normal çözeltiler:** Konsantrasyonu, 1000 mL çözeltideki çözülmüş madde miktarı ekivalan gram sayısı (Eq) olarak ifade edilen çözeltilerdir. Örneğin 2 Normal (2N) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi dendiğinde, çözeltinin 1000 mL'sinde 2 ekivalan (2 Eq=2000 mEq) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bulunduğu anlaşılır. Çözeltilerdeki çözücü genelde sudur.

$$\text{Normality (N)} = \frac{\text{equivalents of solute}}{\text{liter of solution}}$$

**Katı maddelerin normal çözeltilerinin hazırlanması:**

- 1) Hazırlanacak çözelti volümü için uygun volümde kuru ve temiz bir balon joje alınır.
- 2) Balon jojeye bir miktar çözücü konur.
- 3) Hazırlanacak volümde çözeltide bulunması gereken solüt miktarı hesaplanır:  
$$\text{İstenen normalite}(N) \times \text{Ekivalan gram}(g) \times \text{İstenen volüm}(L) = \text{g tartılacak solüt}$$
- 4) Hesaplanan miktarda solüt tartılır ve balon jojedeki çözücüye eklenerek karıştırma suretiyle çözülür.

*\*KOH ve NaOH gibi alkalilerin çözünmeleri sırasında açığa çıkan fazla miktarda ısı, balonun aşırı ısınma ile çatlamasına neden olabilir. Bu durumda soğutmak amacıyla balonun dışı, akan çeşme suyu altında tutulmalı; fakat bu sırada balonun içine çeşme suyu kaçmamasına dikkat etmelidir.*

- 5) Balon jojenin işaret çizgisine kadar çözücü eklenerek volüm istenilen değere tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**Örnek:** 500 mL (0,500 L) volümde 2,5 N'lik NaOH çözeltisinin hazırlanması:

- 1°) 500 mL'lik kuru ve temiz bir balon joje alınır.
- 2°) Balon jojeye bir miktar distile su konur.
- 3°)  $2,5 \times 40 \times 0,500 = 50 \text{ g NaOH}$  tartılır ve balondaki suya eklenerek çözülür.
- 4°) Balonun işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm 500 mL'ye tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**Sıvı asitlerin normal çözeltilerinin hazırlanması:**

- 1) Hazırlanacak çözelti volümü için uygun volümde kuru ve temiz bir balon joje alınır.
- 2) Balon jojeye bir miktar distile su konur.
- 3) Hazırlanacak volümde çözeltide bulunması gereken sıvı asit miktarı hesaplanır:  
$$\frac{\text{istenennormalite}(N) \times \text{molekülerag}(g) \times \text{istenenvolüm}(L)}{\text{valansxdansitexkonsantrasyon}(\%)} = \text{mL alınacak sıvı asit}$$
- 4) Hesaplanan miktarda sıvı asit alınır ve balon jojedeki suya eklenerek karıştırma suretiyle çözülür.

*\* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gibi asitlerin çözünmeleri sırasında açığa çıkan fazla miktarda ısı, balonun aşırı ısınma ile çatlamasına neden olabilir. Bu durumda soğutmak amacıyla balonun dışı, akan çeşme suyu altında tutulmalı; fakat bu sırada balonun içine çeşme suyu kaçmamasına dikkat etmelidir.*

- 5) Balon jojenin işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm istenilen değere tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

**Örnek:** 250 mL (0,250 L) volümde 0,1 N'lik HCl çözeltisinin dansitesi 1,19 olan %38'lik (0,38) konsantre HCl'den hazırlanması:

- 1°) 250 mL'lik kuru ve temiz bir balon joje alınır.
- 2°) Balon jojeye bir miktar distile su konur.
- 3°)  $\frac{0,1 \times 36,46 \times 0,250}{1 \times 1,19 \times 0,38} = 2,02 \text{ mL}$  konsantre HCl alınır ve balondaki suya eklenerek çözülür.

- 4°) Balonun işaret çizgisine kadar distile su eklenerek volüm 250 mL'ye tamamlanır ve balonun ağzı kapatılarak alt-üst etme suretiyle iyice karışma sağlanır.

### Normal, Molar ve % konsantrasyonların birbirine çevrilmesi

$$\frac{mEq / L \text{ konsantrasyon} \times \text{Moleküler kütle}}{10 \times \text{Valans}} = \text{mg/dL konsantrasyon}$$

$$\frac{mg / dL \text{ konsantrasyon} \times 10 \times \text{Valans}}{\text{Moleküler kütle}} = \text{mEq/L konsantrasyon}$$

$$M \text{ konsantrasyon} \times \text{Valans} = N \text{ konsantrasyon}$$

$$\frac{N \text{ konsantrasyon}}{\text{Valans}} = M \text{ konsantrasyon}$$

**2.2.5. Konsantrasyonlara hidrasyon suyunun etkisi:** Kristal şeklindeki bileşiklerde moleküle bağlı su, **hidrasyon suyu** olarak bilinir.



Katı maddelerin çözeltilerini hazırlarken yapılacak hesaplamalarda kullanılan formüller, hidrasyon suyu olmayan maddelere göre yazılmıştır. Hidrasyon suyu olan kristal şeklindeki katı maddelerin çözeltilerini hazırlarken, formülle maddenin susuz haline göre gerekli miktarı bulduktan sonra, basit orantı ile kullanılacak kristalli hal için gerekli miktarı hesaplamak gerekir. Örneğin; 250 mL %10'luk  $\text{CuSO}_4$  çözeltisini hidrasyon suyu olmayan bakır sülfattan ( $\text{CuSO}_4$ , molekül ağırlığı 160) değil de 1 molekül hidrasyon suyu olan bakır sülfattan ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , molekül ağırlığı 178) ile hazırlayacaksak tartacağımız  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  miktarı,

$$\frac{\text{istenen konsantrasyon}(\%)}{100} \times \text{istenen volüm}(mL) = \text{g tartılacak solüt miktarı}$$

formülüne göre bulacağımız  $\frac{10}{100} \times 250 = 25$  g değildir;

160 g  $\text{CuSO}_4$ 'ten

25 g gerekirse

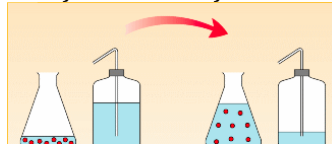
178 g  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'dan

X =? g gerekir basit orantısına göre

$$X = \frac{178 \times 25}{160}$$

$$X = 27,81 \text{ g'dır.}$$

### 2.2.6. Çözeltilerin seyreltilmeleri ve çözelti karışımları



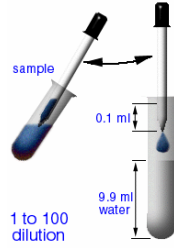
Çözeltilerin seyreltilmeleri, konsantrasyonlarının azaltılması, böylece derişik (konsantre) bir çözeltinin seyreltik (dilüe) bir çözelti haline getirilmesi demektir.

Bir çözeltinin 1/2 oranında seyreltilmesi deyince 1 volüm çözelti ile 1 volüm seyreltme sıvısının karıştırılacağı anlaşılır.

1 volüm çözelti ile 2 volüm seyreltme sıvısının karıştırılması, 1/3 oranında seyreltme demektir.



Seyreltme sıvısı genellikle sudur ve bu nedenle *seyreltme* işlemleri genellikle *sulandırma* veya *dilüsyon* olarak adlandırılırlar; seyreltme sıvısı da *dilüent* olarak adlandırılır.



Seyreltilen çözeltilerin ilk volüm ( $V_1$ ), ilk konsantrasyon ( $C_1$ ), seyreltikten sonraki volüm ( $V_2$ ) ve seyreltikten sonraki konsantrasyon ( $C_2$ )'ları arasında,

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$  şeklinde bir bağıntı vardır. Konsantre bir çözeltilerden belli volümde ve belli konsantrasyonda seyreltik çözeltilerin hazırlanması için konsantre çözeltilerden alınacak miktarı hesaplamada bu bağıntı kullanılır.

**Örnek:** % 98'lik alkol ile 250 mL % 70'lik alkol çözeltilisi hazırlamak için;

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

$$V_1 \times 98 = 250 \times 70$$

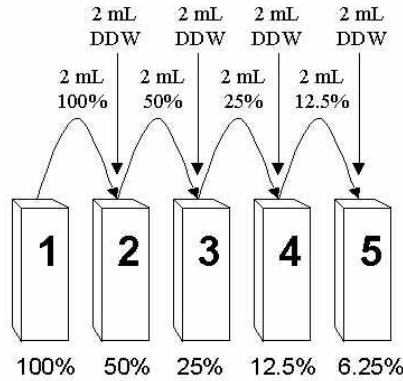
$$V_1 = \frac{250 \times 70}{98}$$

$V_1 = 178,57$  mL % 98'lik alkol alınır ve toplam volüm 250 mL olacak şekilde distile su ile karıştırılır.

Bir maddenin volümü  $V_1$  ve konsantrasyonu  $C_1$  olan çözeltilisi ile volümü  $V_2$  ve konsantrasyonu  $C_2$  olan çözeltilisi karıştırıldığında karışımın volümü ( $V_{1+2}$ ) ve konsantrasyonu ( $C_{1+2}$ ) ile karışımı oluşturan çözeltilerin volüm ve konsantrasyonları arasında,

$$(V_{1+2}) \times (C_{1+2}) = V_1 \times C_1 + V_2 \times C_2 \text{ şeklinde bir bağıntı vardır.}$$

### 2.2.7. Seri dilüsyonlar



Seri dilüsyonlarda her dilüsyondan sonra elde edilen yeni çözeltili tekrar dilüe edilir ve bu işlem ardı ardına tekrarlanabilir. Örneğin;

0,5 mL serumun 0,5 mL fizyolojik NaCl çözeltilisi ile karıştırılmasıyla serum 1/2 oranında dilüe edilmiş olur.

1/2 oranında dilüe serumdan 0,5 mL alıp 0,5 mL fizyolojik NaCl çözeltilisi ile karıştırırsak tekrar 1/2 oranında dilüsyon yapmış oluruz.

Art arda iki defa 1/2 oranında dilüsyon, toplam olarak  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$  oranında dilüsyon demektir.

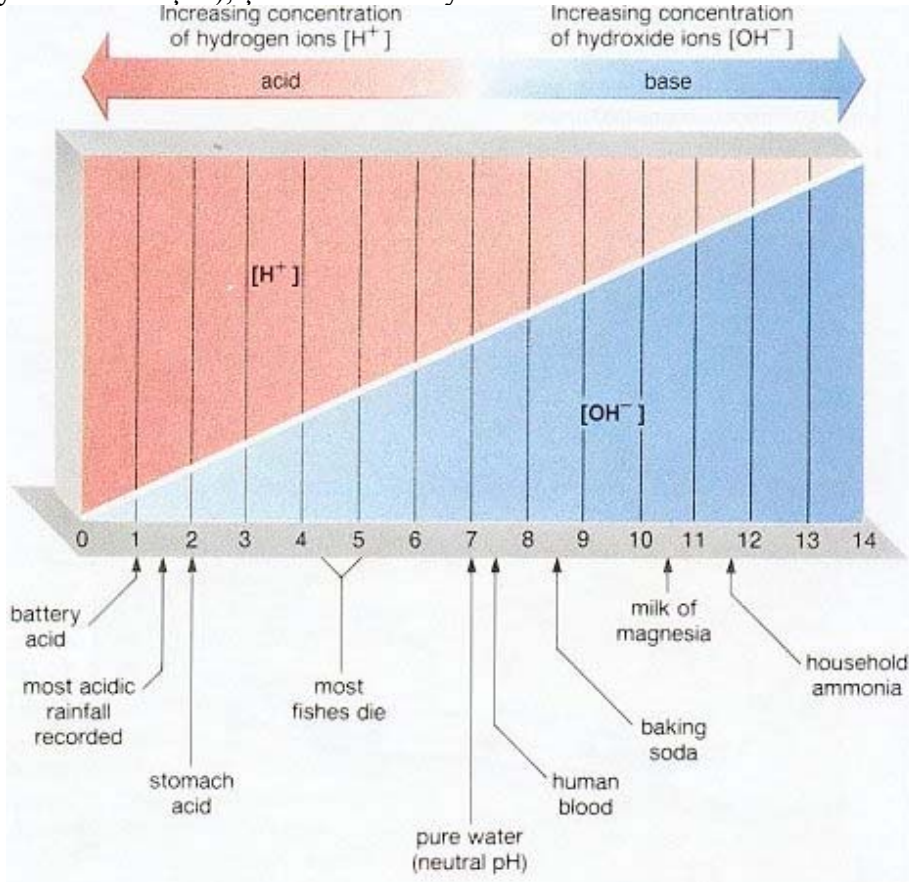
### 3. pH, ASİTLİK-BAZLIK VE TAMPON ÇÖZELTİLER

#### 3.1. pH

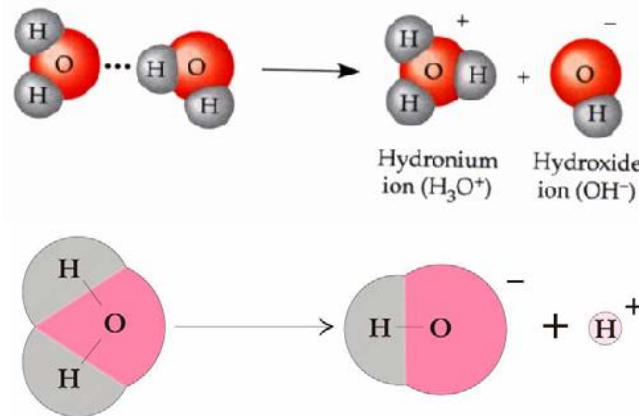
Bir çözeltideki  $H^+$  iyonları konsantrasyonunun eksi logaritması çözeltinin pH'ı olarak ifade edilir.

$$pH = \log_{10}(1/[H^+]) = -\log_{10}[H^+]$$

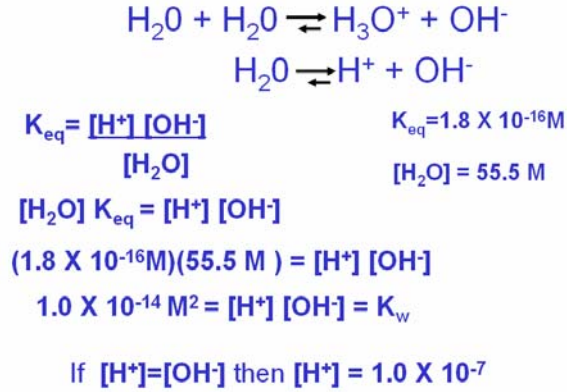
25°C'de nötral bir çözeltinin pH'ı 7'dir. Bir çözeltinin pH'ı 7'den küçükse ( $H^+$  iyonu konsantrasyonu daha yüksek), çözelti asidiktir. Bir çözeltinin pH'ı 7'den büyükse ( $H^+$  iyonu konsantrasyonu daha düşük), çözelti alkali veya baziktir.



Bir su molekülü, çok az sayıda bile olsa komşu su molekülü lehine bir proton yitirebilir ve böylece bir hidronyum iyonu ( $H_3O^+$ ) oluşturabilir. Sonuç olarak su, az da olsa hidronyum ve hidroksil iyonlarına ayrışır.

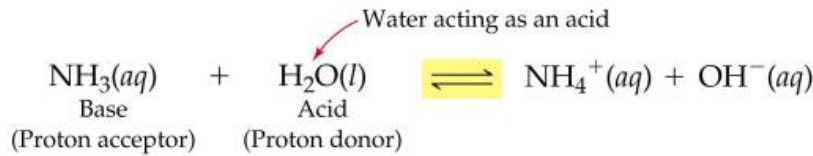
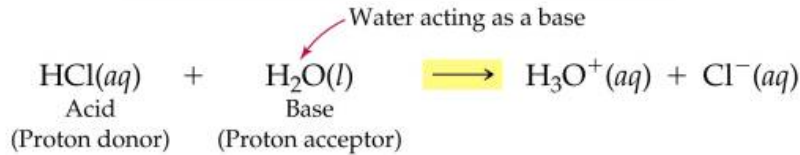
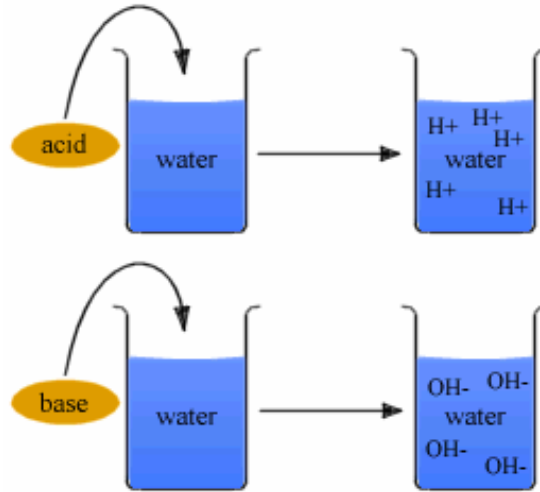


Sulu çözeltilerde, saf suda olduğu gibi  $H^+$  ile  $OH^-$ 'nin konsantrasyonları eşit olduğunda, çözeltinin **nötral pH**'da olduğu ifade edilir. Nötral pH'da  $H^+$  ile  $OH^-$ 'nin konsantrasyonu birbirine eşit ve  $10^{-7}M$ 'dir.

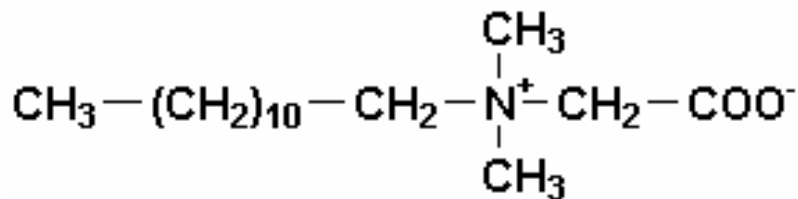


### 3.2. Asitler ve Bazlar

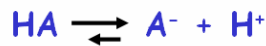
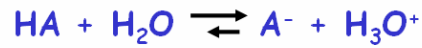
Asitler proton vericisi (donör), bazlar proton alıcısıdır (akseptör).



Hem proton vericisi (donör), hem proton alıcısı (akseptör) olan maddelere **amfoter maddeler** denir.



Bir proton donörü ve ona uygun proton akseptörü, bir konjuge asit-baz çifti oluştururlar.



HA = Conjugate acid ( donates H<sup>+</sup>)(Bronstad Acid)

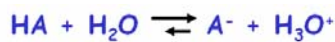
A<sup>-</sup> = Conjugate base (accepts H<sup>+</sup>)(Bronstad Base)

Proton donor	Proton acceptor
CH <sub>3</sub> COOH (acetic acid)	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (phosphoric acid)	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (dihydrogen phosphate)	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (hydrogen phosphate)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ammonium)	NH <sub>3</sub>
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (carbonic acid)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (bicarbonate)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>

$\begin{array}{c} ^+\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{OH} \end{array} \end{array}$	(glycine)	$\begin{array}{c} ^-\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{array} \end{array}$
$\begin{array}{c} ^-\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{array} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{O}^- \end{array} \end{array}$

Biyokimyacılar için, suda çözüldüklerinde tamamen iyonize olmayan zayıf asit ve bazların davranışı önemlidir.



HA = Conjugate acid ( donates H<sup>+</sup>)(Bronstad Acid)

A<sup>-</sup> = Conjugate base (accepts H<sup>+</sup>)(Bronstad Base)

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

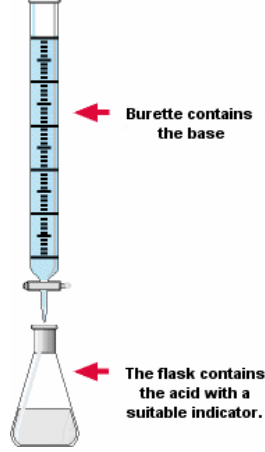
K<sub>a</sub> & pK<sub>a</sub> value describe tendency to loose H<sup>+</sup>

large K<sub>a</sub> = stronger acid  
small K<sub>a</sub> = weaker acid

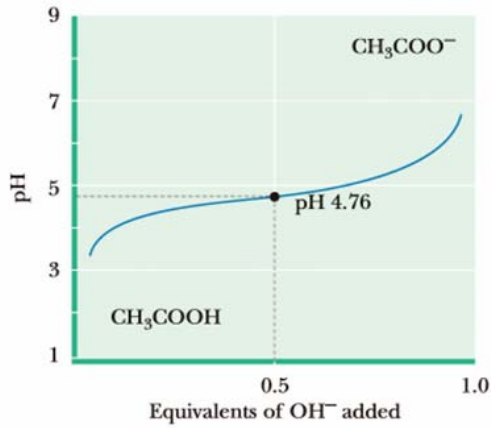
$$pK_a = -\log K_a$$

Acid	K <sub>a</sub> (M)	pK <sub>a</sub>
HCOOH (formic acid)	1.78 × 10 <sup>-4</sup>	3.75
CH <sub>3</sub> COOH (acetic acid)	1.74 × 10 <sup>-5</sup>	4.76
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH (propionic acid)	1.35 × 10 <sup>-6</sup>	4.87
CH <sub>3</sub> CH(OH)COOH (lactic acid)	1.38 × 10 <sup>-4</sup>	3.86
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (phosphoric acid)	7.25 × 10 <sup>-3</sup>	2.14
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (dihydrogen phosphate)	1.38 × 10 <sup>-7</sup>	6.86
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (monohydrogen phosphate)	3.98 × 10 <sup>-13</sup>	12.4
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (carbonic acid)	1.70 × 10 <sup>-4</sup>	3.77
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (bicarbonate)	6.31 × 10 <sup>-11</sup>	10.2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ammonium)	5.62 × 10 <sup>-10</sup>	9.25

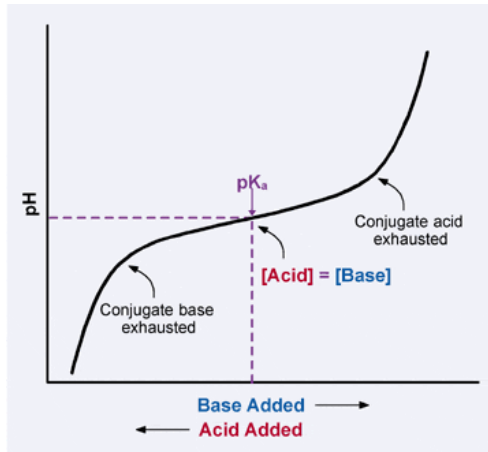
Zayıf asitlerin pKa değerleri, titrasyon grafiği çizilerek bulunabilir. Bunun için, belirli volümdeki asit örneği, konsantrasyonu bilinen kuvvetli bir baz (genellikle NaOH) çözeltisi ile titre edilir. NaOH, bir indikatör boya veya bir pH metre ile nötralizasyon sağlandığı anlaşılıncaya kadar, aside yavaş yavaş ilave edilir. Asidin belirli bir volümüne belirli miktarlarda NaOH eklendikçe pH ölçümü yapılır.



Eklenen NaOH miktarlarına karşılık pH değerlerinin grafiği çizilir.



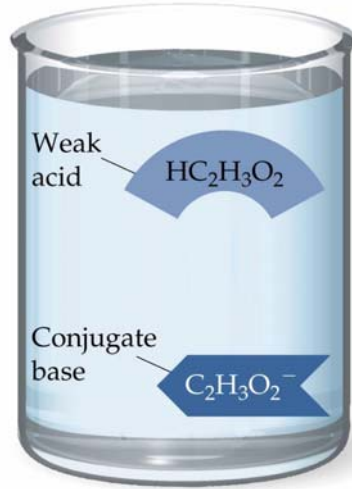
Buradaki grafikte bulunan pH değeri, zayıf asidin pKa değeridir. Zayıf asidin pKa değerine eşit pH'da, zayıf asit ve bunun konjuge bazı eşit konsantrasyonlarda bulunur. Daha düşük pH'larda asit konsantrasyonu fazladır; daha yüksek pH'larda ise asidin konjuge bazının konsantrasyonu fazladır.



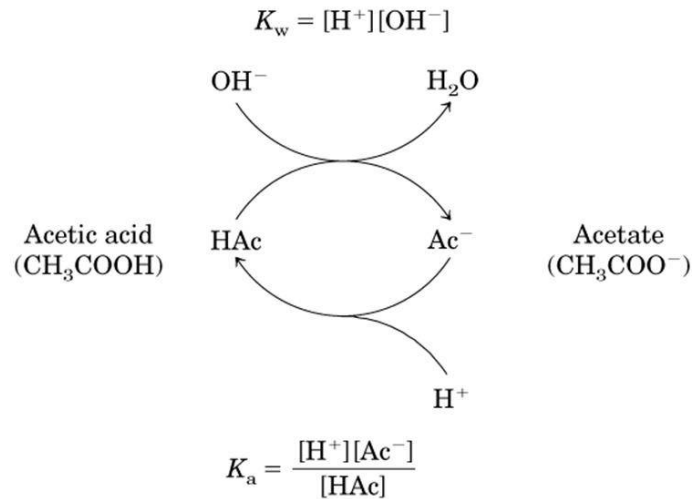


### 3.3. Tamponlar

Zayıf bir asit (proton donörü) ve onun konjuge bazını (proton akseptörü) eşit miktarlarda içeren karışımlar tampon sistemi olarak bilinirler.

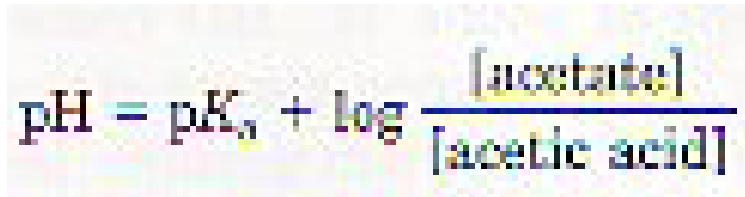


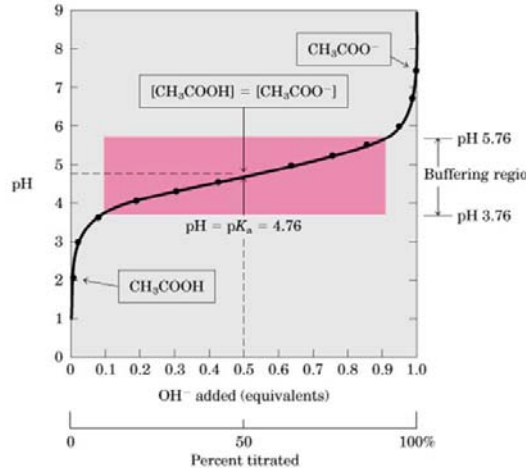
Tamponlar, küçük miktarlarda asit ( $H^+$ ) veya baz ( $OH^-$ ) eklendiğinde pH değişikliklerine karşı koyma eğiliminde olan sulu sistemlerdir. Bir tampon sisteminin tamponlama özelliği, iki reverzibl reaksiyonun sonucudur.



pH, zayıf asit ile onun konjuge bazının bir karışımının tamponlama etkisi ve zayıf asidin  $pK_a$ 'sı arasındaki kantitatif ilişki, **Henderson-Hasselbalch denklemi** ile ifade edilir.

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





Henderson-Hasselbalch denklemi, her hangi bir pH'da proton donör ve proton akseptörün molar oranını hesaplamaya da yarar. Örneğin; asetik asidin pKa değeri 4,76 olduğuna göre asetat ve asetik asitten pH'ı 5,30 olan asetat tamponu hazırlamak için gerekli asetat ve asetik asidin molar konsantrasyon oranı:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{acetate}]}{[\text{acetic acid}]}$$

$$\log \frac{[\text{acetate}]}{[\text{acetic acid}]} = \text{pH} - \text{p}K_a$$

$$= 5.30 - 4.76 = 0.54$$

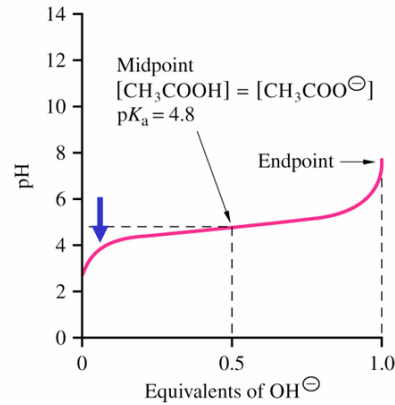
$$\frac{[\text{acetate}]}{[\text{acetic acid}]} = \text{antilog } 0.54 = 3.47$$

Buna göre; pH'ı 5,30 olan asetat tampon hazırlamak için 1 litrelik çözeltide 1 M asetik asit ve 3,47 M asetat olması gerektiği anlaşılır.

Henderson-Hasselbalch denklemi, aynı zamanda, verilen bir pKa ve molar orana göre bir asit-baz çiftinin pH'ını hesaplamaya yarar.

### Case where 10% acetate ion 90% acetic acid

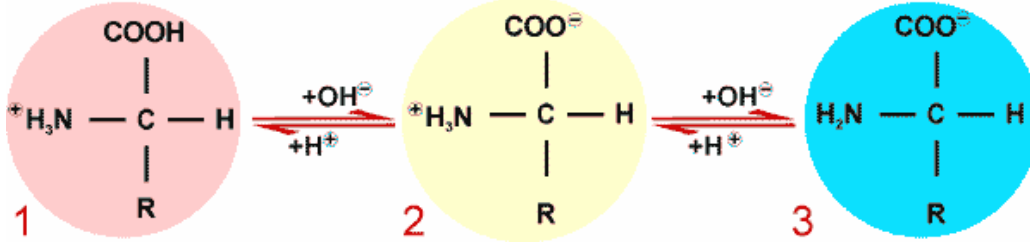
- $\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[0.1]}{[0.9]}$
- $\text{pH} = 4.76 + (-0.95)$
- $\text{pH} = 3.81$





Hem asitlerle hem bazlarla tuz oluşturabilen maddelere *amfolitler* veya *amfoter elektrolitler* denir.

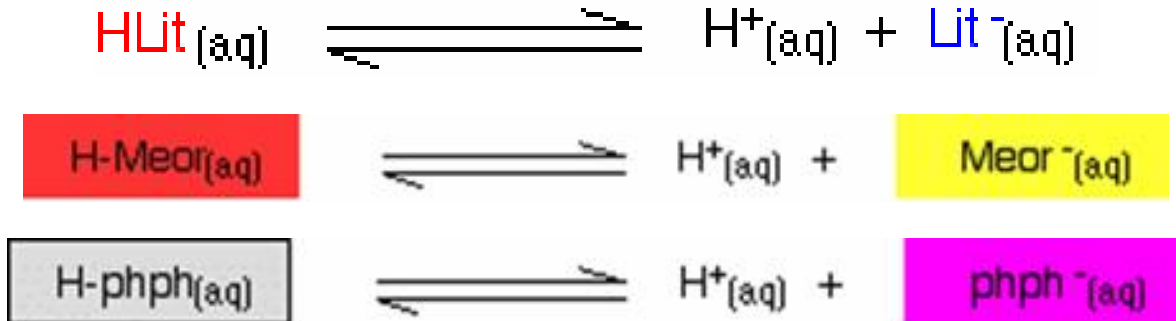
Amfolitler, amfolitin izoelektrik noktası denen bir pH ortamında, eşit sayıda negatif (-) ve pozitif (+) yük içerirler ( $H^+A^-$ ). Amfolitler, izoelektrik noktadan düşük pH ortamında (asit ortam), kation (pozitif yüklü iyon,  $H_2^+A$ ) halinde bulunurlar; izoelektrik noktadan yüksek pH ortamında (bazik ortam) ise anyon (negatif yüklü iyon,  $A^-$ ) halinde bulunurlar.



**İndikatörler:** Sulu çözeltide ortamın  $H^+$  iyonu konsantrasyonuna (pH'ına) göre renk değiştiren maddelerdir; titrasyonlarda sık kullanılırlar.

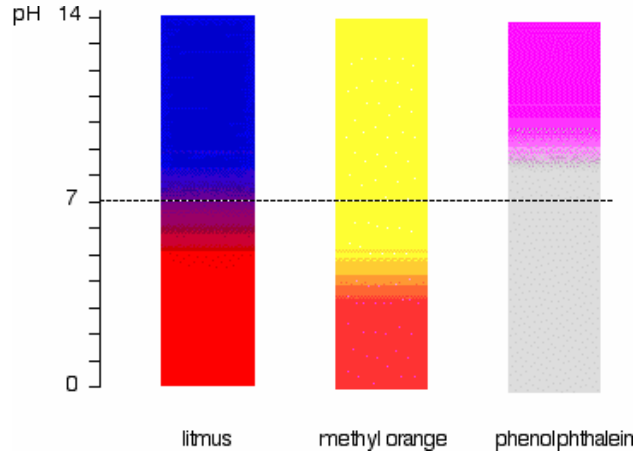


İndikatörler, genellikle amfoter maddelerdir. Litmus, zayıf bir asittir; iyonlaşmamış halde kırmızı, iyonlanmış halde mavi renklidir. Methylorange, zayıf bir asittir; iyonlaşmamış halde kırmızı, iyonlanmış halde sarı renklidir. Phenolphthalein, zayıf bir asittir; iyonlaşmamış halde renksiz, iyonlanmış halde pembe renklidir.



İndikatörün renk değiştirdiği noktaya dönüm noktası denir.

indicator	pK <sub>ind</sub>	pH range
litmus	6.5	5 - 8
methyl orange	3.7	3.1 - 4.4
phenolphthalein	9.3	8.3 - 10.0



Sulu çözeltilerin pH'ı, genellikle bir amfolit olan ve ortamın H<sup>+</sup> iyonu konsantrasyonuna (pH'ına) göre renk değiştiren indikatör boyalar yardımıyla ölçülebilir. Bu yöntemlere kolorimetrik yöntemler denir.



Sulu çözeltilerin pH'ı, elektrometrik yöntemler denen, iki elektrot arasındaki potansiyel farkının bir galvanometre ile ölçülmesi esasına dayanan yöntemlerle daha hassas olarak ölçülebilir. pH metre denen aletlerde elektrottan çıkan sinyal, şiddetlendirilir ve pH'ı bilinen bir çözelti tarafından oluşturulan sinyal ile karşılaştırılır.



## 4. BİYOKİMYA LABORATUVARLARINDA KULLANILAN TEKNİKLER-MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMLERİ

### 4.1. Kimyasal Yöntemler

**4.1.1 Titrimetri (volümetri):** İçinde çözünmüş maddenin konsantrasyonu bilinmeyen bir çözeltinin belirli bir volümüyle reaksiyona girebilen bir başka maddenin bilinen konsantrasyonlu çözeltisinin volümlerini karşılaştırma suretiyle çözelti konsantrasyonu tayinidir.

Normalitesi bilinen bir asit çözeltisi yardımıyla bir alkali çözeltinin normalitesini tayin *alkalimetri* olarak bilinir. Normalitesi bilinen bir alkali çözeltisi yardımıyla bir asit çözeltinin normalitesini tayin *asidimetri* olarak bilinir.

#### 4.1.1.1. HCl Titrasyonu Deneyi

**Amaç:** HCl çözeltisi, NaOH çözeltisi ile titre edilerek nötralizasyonun sağlandığı nokta bir indikatör yardımıyla gösterilecek; titremide kullanılan asit ve baz volümlerinin ölçümleri yapılarak titrasyon yoluyla volüm ya da konsantrasyon hesaplaması gösterilecektir.

**Materyal:** 0,1 N HCl, 0,1 N NaOH, Metilen kırmızısının suda %1'lik çözeltisi.

**Metod:** 1) Bir erlenmayere 10 cc 0,1 N HCl çözeltisi ve 2-3 damla metil kırmızısı çözeltisi konur.

2) Ortama büretten damla yoluyla 9,8 cc 0,1 N NaOH çözeltisi eklenir. Bu anda elde edilen pH yaklaşık 3'dür; daha fazla NaOH eklenmesiyle pH giderek artar.

3) Ortama büretten damla yoluyla 0,1 N NaOH çözeltisi eklenerek titrasyon yapılır.

4) İndikatörün renginin kırmızıdan sarıya döndüğü ilk anda titrasyona son verilir.

5) Titrasyonda kullanılan NaOH'in volümü ölçülür ki her iki çözeltinin de normalitesi tam olarak 0,1 N ise, kullanılan NaOH'in volümü de 10 cc'dir.

**Tartışma ve Sonuç:** Titrasyonda kullanılan çözeltiler 1 ve 2 olarak adlandırılırsa aşağıdaki formül yazılabilir.

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Buna göre; normalitesi ve hacmi bilinen bir çözeltiyi titre ederken kullanılan ikinci çözeltinin normalitesi biliniyorsa titrasyon için kullanılan hacim göz önüne alınarak normalite hesaplamaları yapılabilir.

**4.1.2 Oksidimetri:** Oksitlenme reaksiyonlarına dayanan miktar tayin yöntemidir; manganometri ve iyodometri önemlidir.

**4.1.3 Çökeltme yöntemleri:** Çökeltme reaksiyonlarına dayanan miktar tayin yöntemidir; argentometri ve cuprometri önemlidir.

Çökeltme yöntemlerinin uygulanmasında, miktarı bulunması istenen maddenin çözeltisinin belli bir volümü, bu maddeyi güç çözünür bir çökelek halinde çöktürebilecek ve konsantrasyonu bilinen ikinci bir madde çözeltisi ile titre edilir. Eşdeğerlik noktasına ulaşıldığında tepkimeye son verilir. Eşdeğerlik noktasının belirlenmesi için, tepkimeye giren maddenin tükendiğini ve ortamda diğer madde çözeltisinin fazla olarak bulunduğunu gösterebilecek indikatörler kullanılır.

#### 4.1.3.1. İdrarda Klorür Tayini (Mohr Deneyi)

**Amaç:** Konsantrasyonu bilinen, gümüş iyonlu çözelti yardımıyla bir çözeltinin klorür iyonu miktarı tayin edilecektir.

**Materyal:** İdrar (klorür iyonu içeren çözelti örneği olarak), 0,1 N AgNO<sub>3</sub> potasyum kromat çözeltisi ve aktif kömür.

**Metod:** 1) Bir erlenmayere 10 cc idrar, spatül ucu kadar aktif kömür ve indikatör olarak 2 damla potasyum kromat çözeltisi konur.

2) Karışım devamlı çalkalanarak büretten damla yoluyla AgNO<sub>3</sub> eklenerek titre edilir.

3) Erlenmayerdeki karışım önce beyaz çökelti, sonrasında ise kalıcı kiremit kırmızısı renk alacaktır ki indikatörün renginin kırmızıya döndüğü ilk anda titrasyona son verilir.

4) Titrasyonda kullanılan AgNO<sub>3</sub>'ın völümü ölçülür.

**Tartışma ve Sonuç:** İdrardaki Cl<sup>-</sup> iyonları, Ag<sup>+</sup> iyonları ile AgCl çökeltisi oluştururlar. Klorür iyonunun moleküler ağırlığı 35,5 g ve 0,1 N Cl<sup>-</sup> 3,55 mg/ml Cl<sup>-</sup> olduğundan titrasyonda harcanan her 1 ml 0,1 N AgNO<sub>3</sub>, ml'de 3,55 mg Cl<sup>-</sup> iyonuna denktir.

Titrasyon sonunda 20 ml 0,1 N AgNO<sub>3</sub> harcanmışsa, kullanılan 10 cc (10 ml) idrar örneğinde  $20 \times 3,55 = 71$  mg Cl<sup>-</sup> var demektir. Bir başka deyişle idrardaki klorür iyonu konsantrasyonu 7,1 mg/ml (710 mg/dl, 7100 mg/l)'dir.

**4.1.4 Kompleksometri:** Kompleksleşme olaylarına dayanan bir titrimetri yöntemidir.

## 4.2. Fiziksel Yöntemler

**4.2.1. Gravimetri:** Tartım yöntemidir.

**4.2.2. Kolorimetri:** Renk ölçülmesi esasına dayanan miktar tayin yöntemidir. Bir çözeltide konsantrasyonu belli olmayan bir madde tarafından oluşturulan rengin aynı maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltisinin rengi ile karşılaştırılması suretiyle konsantrasyon tayinidir. Kolorimetri yerine spektrofotometri terimi de kullanılmaktadır.

**4.2.3. Fotometri:** Belirli bir spektrumdaki ışık şiddetinin ölçülmesine dayanan miktar tayin yöntemleridir. Absorpsiyon fotometrisi ve alev fotometrisi önemlidir.

**4.2.4. Nefelometri:** Bir çözeltinin bulanıklık derecesini bulanık ortama 90°'lik açı ile gelen ışığın difraksiyonunu ölçme suretiyle, bulanıklığı oluşturan maddenin konsantrasyonunu tayin yöntemidir.

**4.2.5. Türbidimetri:** Bir çözeltinin bulanıklık derecesini bulanık ortama 90°'lik açı ile gelen ışığın çözeltiden geçen miktarını (ışığın absorpsiyona uğramayan kısmı ve difraksiyon ışığının bir kısmı) fotometre ile ölçme suretiyle, bulanıklığı oluşturan maddenin konsantrasyonunu tayin yöntemidir.

**4.2.6. Refraktometri:** Işığı kuvvetle kıran çözeltilerin kırma indekslerini ölçüp karşılaştırma suretiyle konsantrasyon tayin yöntemidir.

**4.2.7. Polarimetri:** Asimetrik karbonlu ve dolayısıyla optikçe aktif maddelerin çözeltilerinin polarılmış ışığın düzlemini çevirme derecelerini ölçüp karşılaştırma suretiyle konsantrasyon tayin yöntemidir.

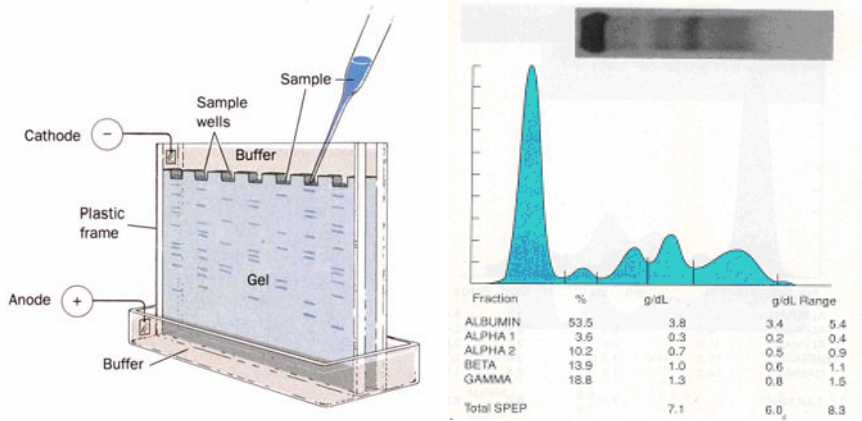
**4.2.8. Gazometri:** Gaz halindeki maddelerin oluştuğu reaksiyonlarda oluşan gazın volümlerini ölçme esasına dayanan miktar tayin yöntemidir.

**4.2.9. Spektrofotometri:** Işık 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. Spektrofotometri ve kolorimetri eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılırlar.

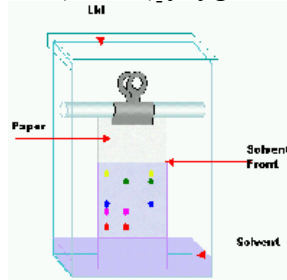
**4.2.10. Flüorometri:** Bir maddenin bir çözeltide çok küçük konsantrasyonlarda bile UV etkisi altında kuvvetli flüoresans verme özelliklerine dayanan miktar tayin yöntemidir.

**4.2.11. Elektroforez:** Asit ortamda katyon olarak bazik ortamda ise anyon olarak davranan maddelerin elektrik alanında farklı hızlarda göçme özelliklerine dayanan miktar tayin ve ayırma yöntemidir.

Elektroforez için dört şeye ihtiyaç vardır: 1) iyonların hareket edebileceği uygun bir ortam (destek ortamı). 2) Elektriksel alanı oluşturmak için doğru akım sağlayacak güç kaynağı. 3) Uygun pH'da bir tampon çözelti. 4) Birbirinden ayrılan bantları kantitatif olarak değerlendirebilen dansitometre.



**4.2.12. Kromatografi:** Porlu ortamda hareketli bir çözücü içinde, solütlerin farklı hızlarda göçme özelliklerine dayanan miktar tayin ve ayırma yöntemidir. Gaz kromatografisi ve yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yaygın olarak kullanılır.



**4.2.13. Otoanaliz:** Çeşitli yöntemleri kullanan otoanalizör aletleriyle miktar tayin yöntemidir.



## 5. KARBOHİDRAT DENEYLERİ

Karbohidratlar, polimerizasyon derecesine göre üç sınıfa ayrılırlar.

Class (DP) <sup>1</sup>	Subgroup	Components
Sugars (1-2)	Monosaccharides	Glucose, galactose, fructose
	Disaccharides	Sucrose, lactose, trehalose
	Polyols	Sorbitol, mannitol
Oligosaccharides (3-9)	Malto-oligosaccharides	Maltodextrins
	Other oligosaccharides	Raffinose, stachyose, fructo-oligosaccharides
Polysaccharides (>9)	Starch	Amylose, amylopectin, modified starches
	Non-starch polysaccharides	Cellulose, hemicellulose, pectins, hydrocolloids

<sup>1</sup> DP = degree of polymerization.

### 5.1. Monosakkarid Deneyleri

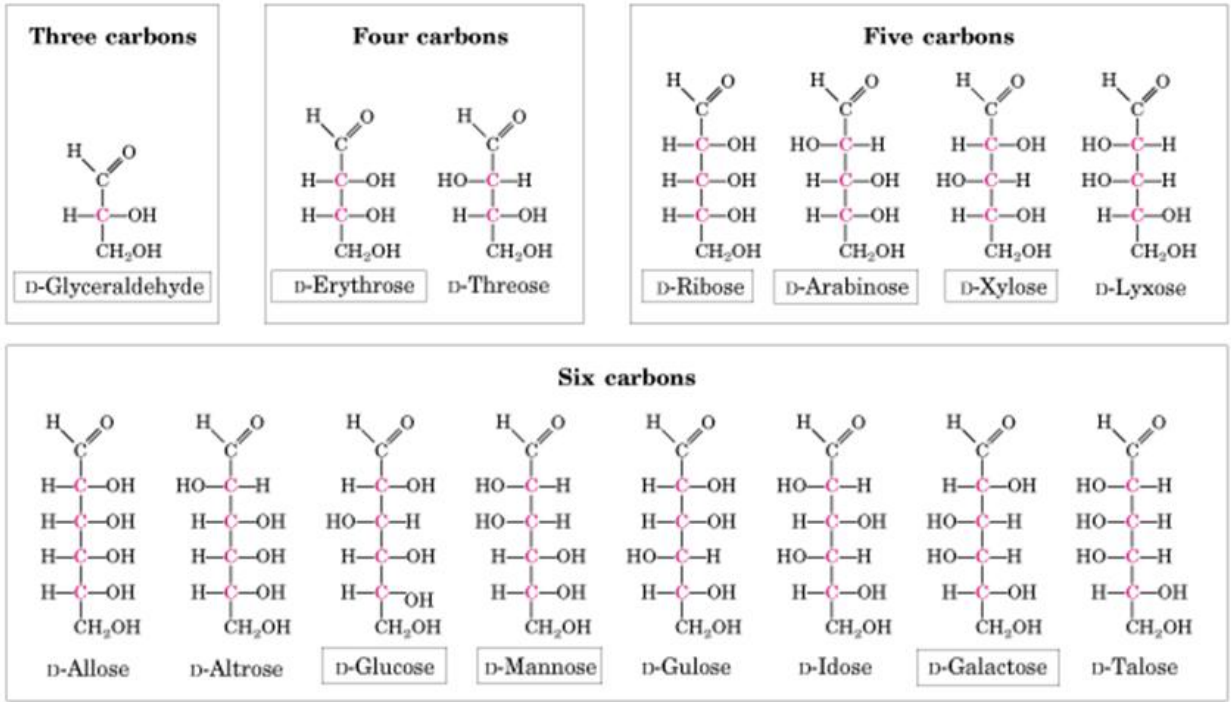
#### 5.1.1. Monosakkaridler ve özellikleri

Monosakkaridler, hidroliz yoluyla daha küçük molekülü basit karbohidratlara ayırılmazlar; oligosakkaridlerin ve polisakkaridlerin alt ünitelerini oluştururlar.

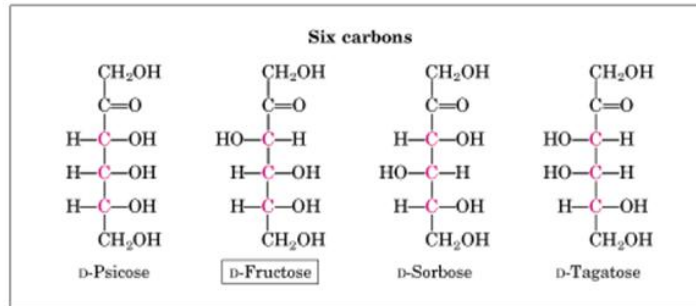
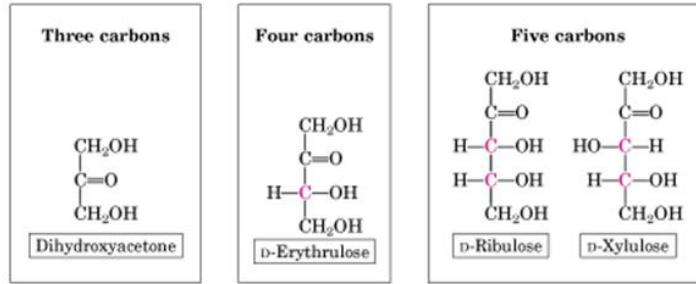
Monosakkaridler, bir veya daha fazla hidroksil gruplu ya aldehid ya da keton yapısındadırlar.

Monosakkaridler, moleküllerindeki toplam karbon sayılarına ve karbonil grubunun cinsine göre sınıflandırılırlar. Monosakkaridlerin moleküldeki toplam karbon sayısı 3 olanlar triozlar, 4 olanlar tetrozlar, 5 olanlar pentozlar, 6 olanlar heksozlar, 7 olanlar heptozlardır. Monosakkaridlerin molekülde **aldehid grubu** içerenleri aldozlar, **keton grubu** içerenleri ketozlardır.

Karbon Sayısına Göre	İçerdikleri Karbonil Grubuna Göre	
	Aldozlar	Ketozlar
(3 karbonlu) <b>Triozlar</b>	Gliseraldehid	Dihidroksi aseton
(4 karbonlu) <b>Tetrozlar</b>	Eritroz	Eritrüloz
(5 karbonlu) <b>Pentozlar</b>	Riboz Ksiloz	Ribüloz Ksilüloz
(6 karbonlu) <b>Heksozlar</b>	Glukoz Mannoz Galaktoz	Fruktoz Sorboz



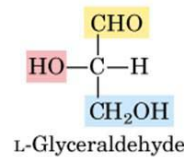
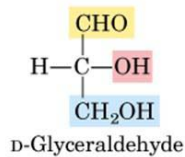
#### D-Aldoses



#### D-Ketoses

Monosakkaridlerin doğada çeşitli izomer formları vardır: D- ve L- izomerler (enantiyomerler), epimer şekerler, enol şekerler,  $\alpha$ - ve  $\beta$ - formları (anomerler).

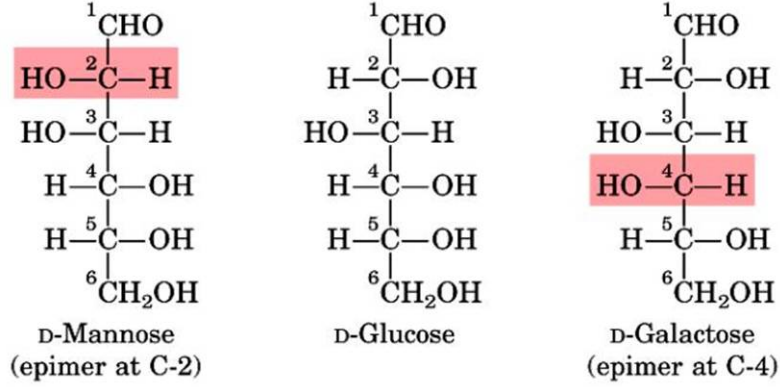
**Monosakkaridlerde D- ve L-izomerler** ayrımı için, karbonil grubundan en uzak olan asimetric karbon atomu referans alınır. Referans karbon atomu üzerindeki hidroksil grubu projeksiyon formülünde sağda ise, monosakkarid D- izomerdir; solda ise L- izomerdir.



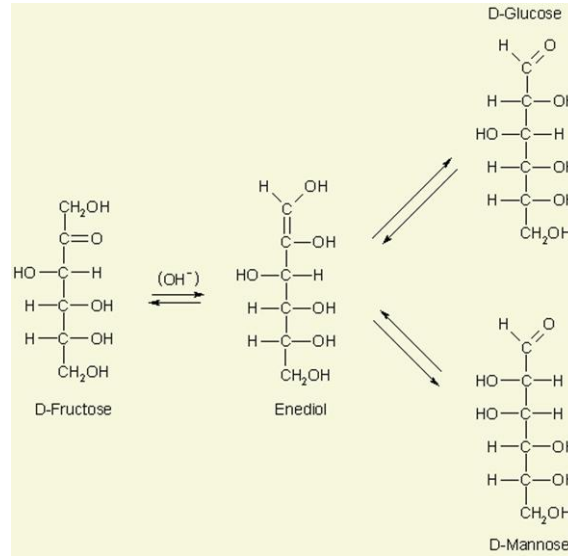


Canlı organizmada bulunan heksozların çoğu D- izomerlerdir. Örneğin kandaki glukoz, D-glukozdur.

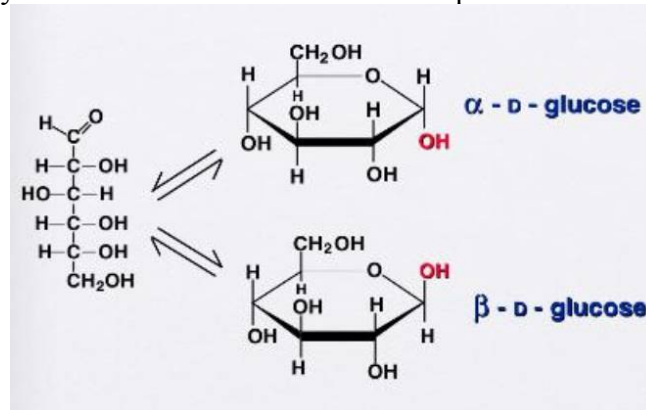
**Epimer şekerler** ismi, yalnızca bir asimetric karbon atomu etrafındaki konfigürasyon bakımından farklı olan iki monosakkarid için kullanılır. Glukoz, altı karbonlu standart şekerdir. Glukozun C-2’de epimeri mannozdur; C-4’de epimeri ise galaktozdur.



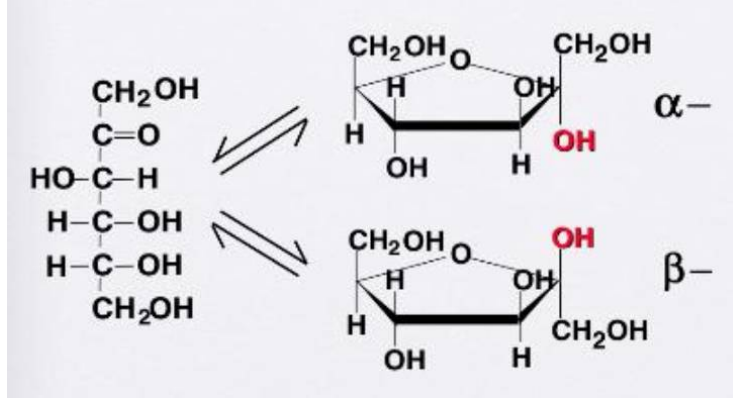
**Enol şekerler** ismi, enolleşme (enolizasyon) ara basamağından geçerek birbirlerine dönüşebilen monosakkaridler için kullanılır. Glukoz, mannoz ve fruktoz, enol şekerler olarak da bilinirler.



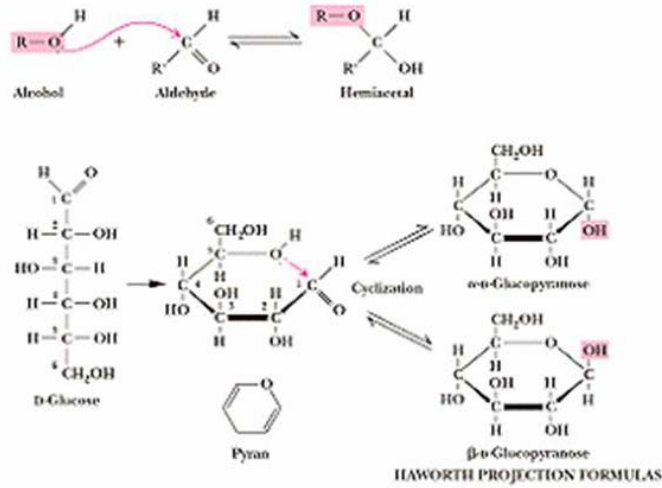
**Monosakkaridlerin  $\alpha$ - ve  $\beta$ - formları**, 5 ve daha fazla karbonlu monosakkaridlerin sulu çözeltilerde halkalı yapılar meydana getirmeleri sonunda ortaya çıkar. D-Glukoz, piran halkasına benzeyen halkalı yapıda, hafifçe farklı optik özellikleri olan,  $\alpha$ -D-Glukopiranoz ve  $\beta$ -D-Glukopiranoz diye adlandırılan iki farklı forma sahiptir.



D-Fruktoz, furan halkasına benzeyen halkalı yapıda, hafifçe farklı optik özellikleri olan,  $\alpha$ -D-Fruktofuranoz ve  $\beta$ -D-Fruktofuranoz diye adlandırılan iki farklı forma sahiptir.

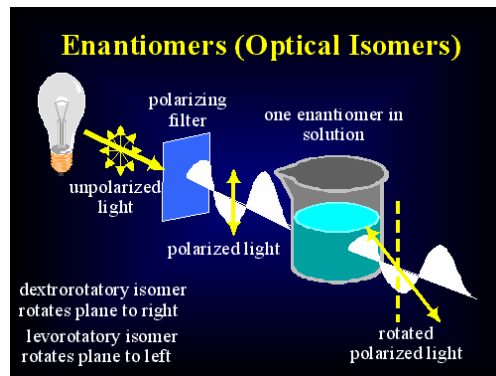


Monosakkaridlerde  $\alpha$ - ve  $\beta$ - formlarının oluşması, aldehidler ile alkoller arasında yarı asetaller oluşturan veya ketonlar ile alkoller arasında yarı ketaller oluşturan bir genel reaksiyonun sonucudur. Monosakkaridlerde halkalı yapı oluşmakla fazladan bir asimetrik karbon atomu ortaya çıkmış olmaktadır. Bu asimetrik karbon atomları, **anomerik karbon** diye adlandırılırlar.



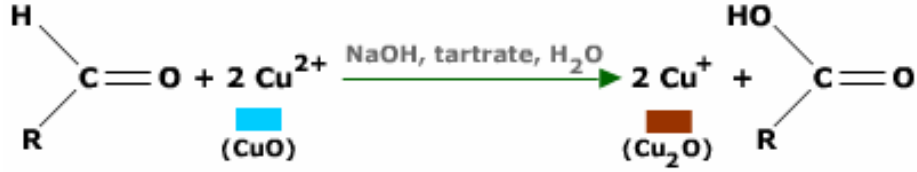
Monosakkaridlerin birbirlerinden yalnızca anomerik karbondaki konfigürasyon bakımından farklı  $\alpha$ - ve  $\beta$ - formları **anomerler** diye adlandırılırlar.

D-Gluzun  $\alpha$ - ve  $\beta$ - formları, polarize ışığın düzlemini aynı yöne fakat farklı derecelerde çevirirler. Örneğin  $\alpha$ -D-Gluz  $112^\circ$  sağa (+) çevirir;  $\beta$ -D-Gluz ise  $19^\circ$  sağa (+) çevirir (dekstroz).

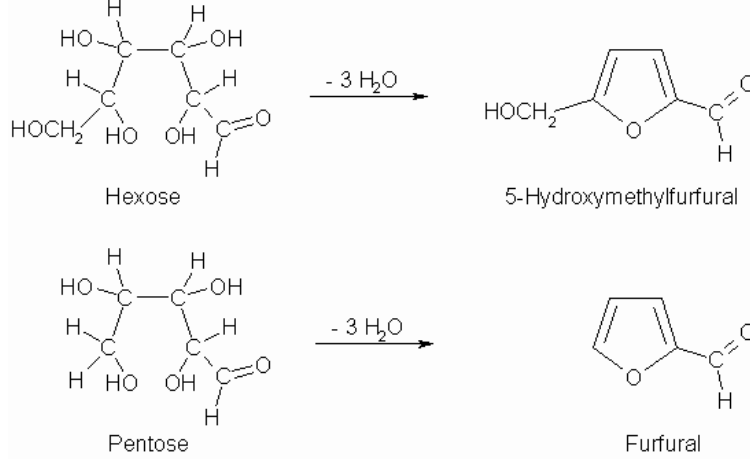


### 5.1.2. Monosakkaridlerin Reaksiyonları

1) Pentoz ve heksozlar, serbest yarı asetal hidroksil gruplarıyla  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  gibi iyonları indirgerler; bu sırada kendileri de aldonik asitlere yükseltgenirler.

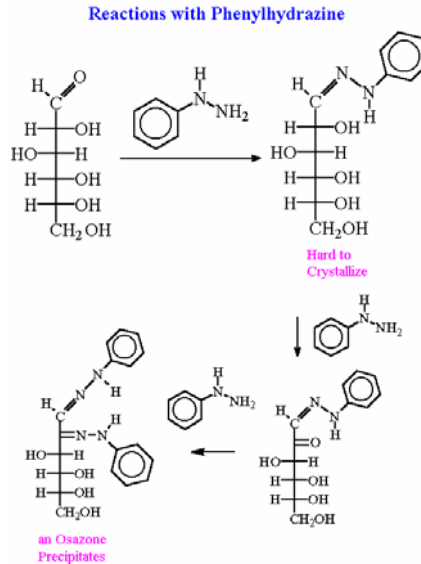


2) Pentoz ve heksozlar, kuvvetli mineral asitler içinde dehidre olurlar; böylece pentozlardan *furfural* oluşur, heksozlardan *5-hidroksimetil furfural* oluşur.



Furfural ve 5-hidroksimetil furfural da fenollerle kondense olarak karakteristik renkli ürünler oluştururlar.

3) Heksozların 1. ve 2. karbonlarına fenil hidrazin bağlanabilir; böylece karakteristik kristalli *osazonlar* oluşur.



3. , 4. , 5. ve 6. karbonlarının konfigürasyonları aynı olan glukoz, mannoz ve fruktoz, sarı renkli ve ekin demeti görünümünde osazon kristalleri oluştururlar. Glukozun C-4'de epimeri olan galaktoz, koyu sarı renkte ve at kestanesi görünümünde osazon kristalleri oluşturur.

4) Monosakkaridler, şiddetli alkali ortamda çok çeşitli maddelere değişirler. Örneğin glukozdan 100'den fazla yeni madde oluşur.

5) Monosakkaridler, şiddetli asit ortamda kaynar dereceye kadar ısıtılırlarsa kömürleşerek parçalanırlar.

6) Monosakkaridler, zayıf asitli ortamda sodyum amalgam ile yüksek değerli alkollere indirgenebilirler.

### 5.1.3. Monosakkaridleri Tanımlama Deneyleri

#### 5.1.3.1. Monosakkaridlerin indirgeyici özellikleri ile ilgili deneyler

##### 5.1.3.1.1. Trommer deneyi

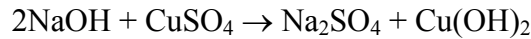
**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren monosakkaridler, indirgeyici özellikleriyle  $\text{Cu}^{2+}$ 'ı  $\text{Cu}^+$ 'a indirgerler.

**Gerekenler:** 1) %5'lik glukoz çözeltisi. 2) %5'lik NaOH çözeltisi. 3) %5'lik  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi. 4) Pipet. 5) Deney tüpleri. 6) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL %5'lik glukoz çözeltisi konur. 2) Tüpteki çözeltiye 1 mL %5'lik NaOH çözeltisi eklenir ve karıştırılır. 3) Tüpteki karışıma 1 mL %5'lik  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki son karışım, su banyosunda veya bunzen beki alevinde dikkatlice ısıtılır. 5) Isıtılan karışımın sarı veya kırmızı renkli çökelti haline dönüştüğü gözlenir.



**Açıklama:** Önce NaOH ile  $\text{CuSO}_4$  arasında tepkime olur ve suda mavi renkli kaba çökelti halinde  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  oluşur.



Daha sonra, glukozun serbest yarı asetal hidroksili ile  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  arasında tepkime olur; glukoz,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'i  $\text{CuOH}$  haline indirger ve kendisi de aldonik asidine yükseltgenir.

Oluşan  $\text{CuOH}$ , suda çözünmez ve **sarı renkli** çökelti halinde çöker.

Isıtma sırasında  $\text{CuOH}$  su kaybederek  $\text{Cu}_2\text{O}$  haline dönüşür.

ISI



Oluşan  $\text{Cu}_2\text{O}$ , suda çözünmez ve **kırmızı renkli** çökelti halinde çöker.

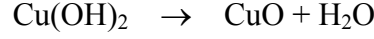
Tüpteki çökelti, içerdiği  $\text{CuOH}$  ve  $\text{Cu}_2\text{O}$  miktarlarına, bir bakıma da indirgenen bakır miktarına ve dolayısıyla glukoz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte olur.

**Tartışma:** Deney glukoz yerine serbest yarı asetal hidroksili içeren bir başka şeker çözeltisi ile yapılsaydı,  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin  $\text{Cu}^+$ 'e indirgenmesine bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte bir çökelti gözlenirdi.

Deney glukoz yerine bir başka indirgen madde çözeltisiyle yapılsaydı, gene  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin  $\text{Cu}^+$ 'e indirgenmesine bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte bir çökelti gözlenirdi.

Deney glukoz çözeltisi yerine distile su ile yapılsaydı,  $\text{Cu}^{2+}$  indirgenmezdi ve  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'in ısı etkisiyle su kaybetmesi sonucu oluşan  $\text{CuO}$ 'den ileri gelen siyah renkli çökelti gözlenirdi.

ISI



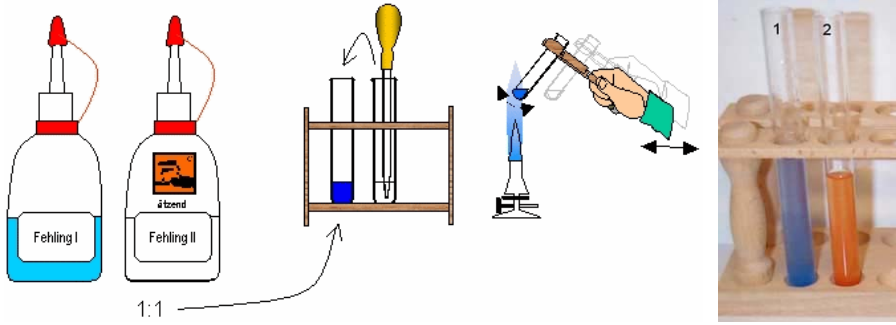
Deney glukoz yerine serbest yarı asetal hidroksili içermeyen bir şeker çözeltisi ile yapılıyorsa,  $\text{Cu}^{2+}$  indirgenemez ve  $\text{CuO}$ 'den ileri gelen siyah renkli çökelti gözlenirdi.

### 5.1.3.1.2. Fehling deneyi

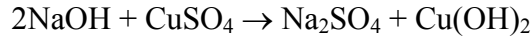
**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren monosakkaridler, indirgeyici özellikleriyle  $\text{Cu}^{2+}$ 'ı  $\text{Cu}^+$ 'e indirgerler.

**Gerekenler:** 1) %5'lik glukoz çözeltisi. 2) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 5 mL konsantr  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B çözeltisi konup karıştırılarak *taze Fehling Reaktifi* hazırlanır. 2) Tüpteki taze Fehling Reaktifi üzerine 2 mL %5'lik glukoz çözeltisi eklenir ve karıştırılır. 3) Tüpteki son karışım, su banyosunda veya bunzen beki alevinde dikkatlice ısıtılır. 4) Isıtılan karışımın sarı veya kırmızı renkli çökelti haline dönüştüğü gözlenir.



**Açıklama:** Önce taze Fehling reaktifi hazırlama sırasında NaOH ile  $\text{CuSO}_4$  arasında tepkime olur ve  $\text{Cu(OH)}_2$  oluşur.



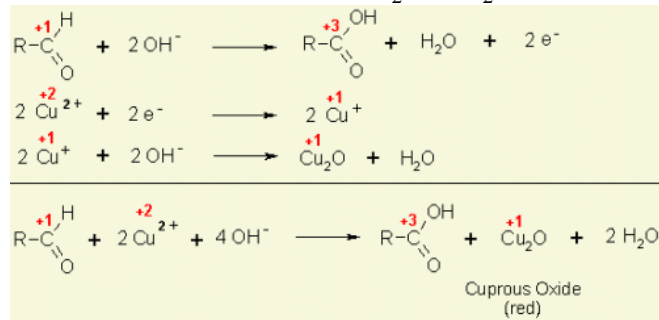
**Seignette tuzu,  $\text{Cu(OH)}_2$ 'i çözünür hale getirerek glukoz ile daha kolay tepkimeye girmesini sağlar;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de Fehling A'daki  $\text{CuSO}_4$ 'ün bozulmasını önler.**

Daha sonra, glukozun serbest yarı asetal hidroksili ile  $\text{Cu(OH)}_2$  arasında tepkime olur; glukoz,  $\text{Cu(OH)}_2$ 'i  $\text{CuOH}$  haline indirger ve kendisi de aldonik asidine yükseltgenir.

Oluşan  $\text{CuOH}$ , suda çözünmez ve **sarı renkli** çökelti halinde çöker.

Isıtma sırasında;  $\text{CuOH}$ , su kaybederek  $\text{Cu}_2\text{O}$  haline dönüşür.

ISI



Oluşan  $\text{Cu}_2\text{O}$ , suda çözünmez ve **kırmızı renkli** çökelti halinde çöker.

Tüpteki çökelti, içerdiği CuOH ve Cu<sub>2</sub>O miktarlarına, bir bakıma da indirgenen bakır miktarına ve dolayısıyla glukoz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte olur.

**Tartışma:** Deney glukoz yerine serbest yarı asetal hidroksili içeren bir başka şeker çözeltisi ile yapılsaydı, Cu<sup>2+</sup>'nin Cu<sup>+</sup>'e indirgenmesine bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte bir çökelti gözlenirdi.

Deney glukoz yerine bir başka indirgen madde çözeltisiyle yapılsaydı, gene Cu<sup>2+</sup>'nin Cu<sup>+</sup>'e indirgenmesine bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte bir çökelti gözlenirdi.

Deney glukoz çözeltisi yerine distile su ile yapılsaydı, Cu<sup>2+</sup> indirgenmezdi ve Cu(OH)<sub>2</sub>'in ısı etkisiyle su kaybetmesi sonucu oluşan CuO'den ileri gelen siyah renkli çökelti gözlenirdi.

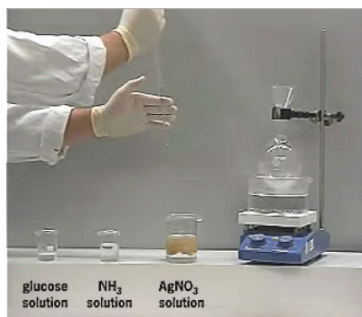
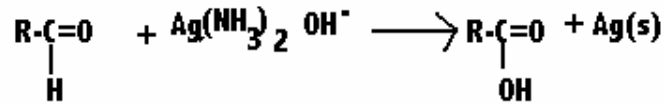
#### 5.1.3.1.3. Nylander deneyi

**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren monosakkaridler, indirgeyici özellikleriyle bizmut tuzu Bi(OH)<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>'ü siyah renkli bizmut oksite veya metalik bizmuta indirgerler.



#### 5.1.3.1.4. Tollens deneyi

**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren monosakkaridler, indirgeyici özellikleriyle amonyaklı gümüş nitrati metalik gümüşe indirgerler.





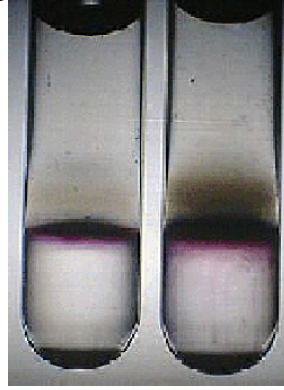
### 5.1.3.2. Monosakkaridlerin renk tepkimeleri ile ilgili deneyler

#### 5.1.3.2.1. Molisch deneyi

**Prensip:** Monosakkaridler  $H_2SO_4$  etkisiyle dehidre olurlar; pentozlardan *furfural* oluşur, heksozlardan da *5-hidroksimetil furfural* oluşur. Furfural ve 5-hidroksimetil furfural da  $\alpha$ -naftol ile *mor renkli trifenil metan* oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %5'lik glukoz çözeltisi. 2) Konsantre  $H_2SO_4$  3)  $\alpha$ -naftol'ün etil alkoldeki %1'lik çözeltisi. 4) Pipet. 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL %5'lik glukoz çözeltisi ve 1 mL  $\alpha$ -naftol çözeltisi konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım üzerine 4 mL konsantre  $H_2SO_4$  tabaka oluşturacak şekilde tüp kenarından dikkatlice akıtılarak eklenir. 3) Tüpte tabakaların temas yerinde *mor renkli* halka oluştuğu gözlenir.



**Açıklama:** Konsantre  $H_2SO_4$  monosakkaridlerden su çekerek onları dehidre eder; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşturur.

Furfural ve 5-hidroksimetil furfural da  $\alpha$ -naftol ile tepkimeye girerler ve mor renkli trifenil metan oluştururlar.

Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen mor renkli halka, oluşan *trifenilmetandan* ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney glukoz çözeltisi yerine bir başka heksoz veya pentoz çözeltisi ile yapılsaydı, gene tüpte temas yerinde mor halka gözlenirdi.

Molisch deneyi, monosakkaridlerin genel tepkimesidir; monosakkaridin türünü belirlemek yani pentoz mu yoksa heksoz mu olduğunu anlamak için yararlı değildir.

#### 4.1.3.2.2. Anilin asetat deneyi

**Prensip:** Monosakkaridler  $H_2SO_4$  etkisiyle dehidre olurlar; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşur. Furfural, *anilin asetat* ile *koyu kırmızı renk* maddesi oluşturur; 5-hidroksimetil furfural ise anilin asetat ile koyu kırmızı renk maddesi oluşturmaz.

**Gerekenler:** 1) %5'lik ksiloz çözeltisi. 2) Konsantre  $H_2SO_4$  3) Anilin asetat çözeltisi. 4) Pipet. 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL %5'lik ksiloz çözeltisi ve 1 mL konsantre  $H_2SO_4$  konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım, bunzen beki alevinde dikkatlice ısıtılır. Bu sırada da tüp kenarından içeriye, anilin asetat çözeltisi ile ıslatılmış filtre kağıdından şerit sarkıtılır. 3) Tüp içine sarkıtılan kağıt şeridin koyu kırmızı renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** Konsantre  $H_2SO_4$ , monosakkaridlerden su çekerek onları dehidre eder; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşur.

Furfural da anilin asetat ile tepkimeye girer ve koyu kırmızı renkli bir madde oluşturur.

Tüp içine sarkıtılan kağıt şeridin koyu kırmızı renk alması, oluşan koyu kırmızı renkli maddeden ileri gelmektedir.



**Tartışma:** Deney ksiloz çözeltisi yerine bir heksoz çözeltisi ile yapılsaydı; tüp içine sarkıtılan kağıt şeridin koyu kırmızı renk aldığı gözlenmezdi. Çünkü, heksozların dehidre olmasıyla oluşan 5-hidroksimetil furfural, anilin asetat ile koyu kırmızı renkli madde oluşturmaz.

**Anilin asetat deneyi, monosakkaridin türünü belirlemek yani pentoz mu yoksa heksoz mu olduğunu anlamak için yararlı bir deneydir.** Monosakkaridle yapılan anilin asetat deneyinde tüp içine sarkıtılan kağıt şeridin koyu kırmızı renk aldığı gözlenirse monosakkarid pentozdur; tüp içine sarkıtılan kağıt şeridin koyu kırmızı renk aldığı gözlenmezse monosakkarid pentoz değildir, heksoz olabilir.

#### 5.1.3.2.3. Bial deneyi (orcin deneyi)

**Prencip:** Monosakkaridler asit ve kaynatma etkisiyle dehidre olurlar; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşur. Furfural, **orcin** ile **mavi renkli** madde oluşturur; 5-hidroksimetil furfural ise **orcin** ile **sarı-kahverengi** bir kompleks oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %5'lik ksiloz çözeltisi. 2) Bial reaktifi: 0,3 g orcin, 5 damla %10'luk  $FeCl_3$  çözeltisi ve 100 mL derişik HCl karıştırılarak hazırlanır. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Kaynar su banyosu

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL %5'lik ksiloz çözeltisi ve 4 mL Bial reaktifi konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım, kaynar su banyosunda 2 dakika ısıtılır. 3) Tüp akan çeşme suyu altında soğutulur. 4) Tüpteki karışımın mavi renge dönüştüğü gözlenir.

**Açıklama:** Kaynatma ve asit etkisi, monosakkaridlerden su çekerek onları dehidre eder; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşturur.

Furfural da orcin ile tepkimeye girer ve mavi renkli bir madde oluşturur.

Tüpteki karışımın mavi renk alması, oluşan mavi renkli maddeden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney ksiloz çözeltisi yerine bir heksoz çözeltisi ile yapılsaydı; tüpteki karışımın sarı-kahverengi renk aldığı gözlenirdi. Çünkü, heksozların dehidre olmasıyla oluşan 5-hidroksimetil furfural, orcin ile sarı-kahverengi madde oluşturur.

Bial deneyi, monosakkaridin türünü belirlemek yani pentoz mu yoksa heksoz mu olduğunu anlamak için yararlı bir deneydir. Monosakkaridle yapılan Bial deneyinde tüpteki karışımın mavi renk aldığı gözlenirse monosakkarid pentozdur; tüpteki karışımın sarı-kahverengi renk aldığı gözlenirse monosakkarid pentoz değildir, heksozdur.

#### 5.1.3.2.4. Seliwanoff deneyi

**Prencip:** Monosakkaridler asit ve kaynatma etkisiyle dehidre olurlar; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşur. Furfural, **rezorcin** ile **mavi-yeşil renkli** bir kompleks oluşturur. 5-hidroksimetil furfural ise **rezorcin** ile **kırmızı renkli** bir kompleks oluşturur; fruktoz gibi ketoheksozlarla koyu kırmızı renk, glukoz gibi aldoheksozlarla ise açık kırmızı renk oluşur.

**Gerekenler:** 1) %5'lik ksiloz çözeltisi. 2) Seliwanoff reaktifi: 0,15 g rezorcin, 100 mL derişik HCl ve 200 mL distile su karıştırılarak hazırlanır. 3) Pipet. 4) Deney tüpleri. 5) Kaynar su banyosu.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL %5'lik ksiloz çözeltisi ve 5 mL Seliwanoff reaktifi konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım, kaynar su banyosunda 5 dakika ısıtılır. 3) Tüp akan çeşme suyu altında soğutulur. 4) Tüpteki karışımın **mavi-yeşil** renge dönüştüğü gözlenir.

**Açıklama:** Kaynatma ve asit etkisi, monosakkaridlerden su çekerek onları dehidre eder; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşur.

Furfural da rezorcin ile tepkimeye girer ve mavi-yeşil renkli bir madde oluşturur.

Tüpteki karışımın mavi-yeşil renk alması, oluşan mavi-yeşil renkli maddeden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney ksiloz çözeltisi yerine bir heksoz çözeltisi ile yapılsaydı, tüpteki karışımın kırmızı renk aldığı gözlenirdi. Çünkü, heksozların dehidre olmasıyla oluşan 5-hidroksimetil furfural, rezorcin ile kırmızı renkli madde oluşturur; fruktoz gibi ketoheksozlarla koyu kırmızı renk, glukoz gibi aldoheksozlarla ise açık kırmızı renk oluşur.



Seliwanoff deneyi, monosakkaridin türünü belirlemek yani pentoz mu yoksa heksoz mu olduğunu anlamak ve hatta ketoheksoz mu yoksa aldoheksoz mu olduğunu anlamak için yararlı bir deneydir. Monosakkaridle yapılan Seliwanoff deneyinde tüpteki karışımın mavi-yeşil renk aldığı gözlenirse monosakkarid pentozdur; tüpteki karışımın koyu kırmızı renk aldığı gözlenirse monosakkarid ketoheksozdur; tüpteki karışımın açık kırmızı renk aldığı gözlenirse monosakkarid aldoheksozdur.

### 5.1.3.3. Monosakkaridlerin osazon oluşturmalarıyla ilgili deney

**Prensip:** Monosakkaridler, fenil hidrazin ile 1. ve 2. karbonlarının katıldığı bir tepkimeye girerek karakteristik osazon kristalleri oluştururlar.

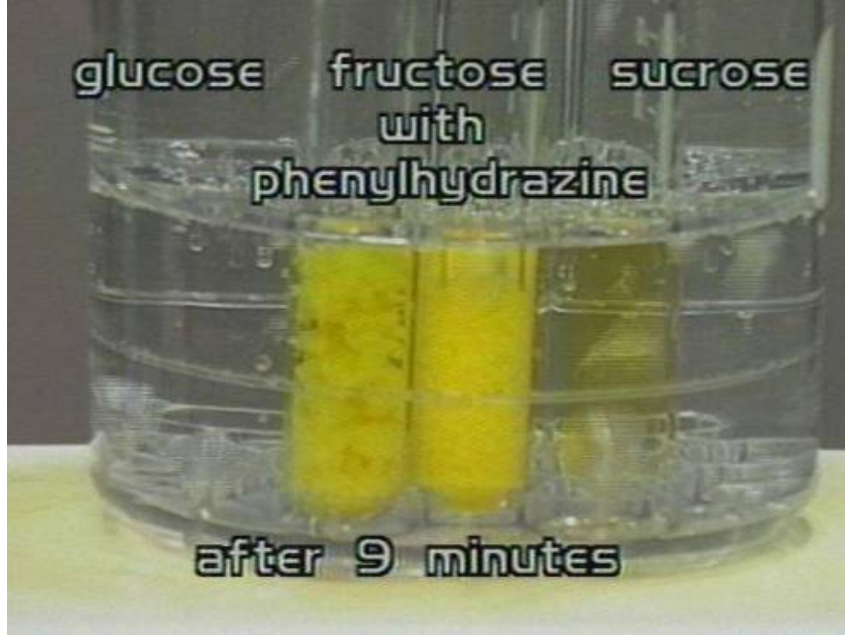
**Gerekenler:** 1) %5'lik glukoz çözeltisi. 2) %50'lik asetik asit. 3) Fenil hidrazin. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Cam baget. 7) Kaynar su banyosu.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL %5'lik glukoz çözeltisi, 5 damla %50'lik asetik asit ve 5 damla fenil hidrazin konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım, kaynar su banyosunda 10-15 dakika tutulur ve bu sırada kristallenme olması için cam bagetle içten tüp kenarına sürtme hareketleri yapılır. 3) Tüp akan çeşme suyu altında soğutulur. 4) Tüpteki sarı kristaller mikroskop altında incelenir.

**Açıklama:** Monosakkaridler, fenil hidrazin ile 1. ve 2. karbonlarının katıldığı bir tepkimeye girerek karakteristik osazon kristalleri oluştururlar. Glukoz ile ince uzun iğneler şeklinde ve ekin demeti görünümünde kristaller oluştuğu gözlenir.

**Tartışma:** Deney glukoz çözeltisi yerine mannoz çözeltisi veya fruktoz çözeltisi ile yapılsaydı gene ince uzun iğneler şeklinde ve ekin demeti görünümünde kristaller oluştuğu gözlenirdi. Çünkü, glukoz, mannoz ve fruktozun 1. ve 2. karbonlarına bağlı gruplar farklı; fakat 3., 4., 5. ve 6. karbonlarına bağlı gruplar ise aynıdır. 1. ve 2. karbonlarına fenil hidrazinin bağlanmasıyla glukoz, mannoz ve fruktozun tüm karbonlarına bağlı gruplar aynı olmuş olur ve böylece oluşan osazon kristalleri arasında da fark olmaz. Deney galaktoz çözeltisi ile yapılsaydı kirli sarı ve at kestanesi görünümünde kristaller oluştuğu gözlenirdi. Çünkü, galaktozun 4.karbonuna bağlı hidroksil grubu glukozdakine göre ters taraftadır; osazon oluşurken 4.karbon tepkimeye katılmadığından oluşan osazon kristalleri de farklı olur.

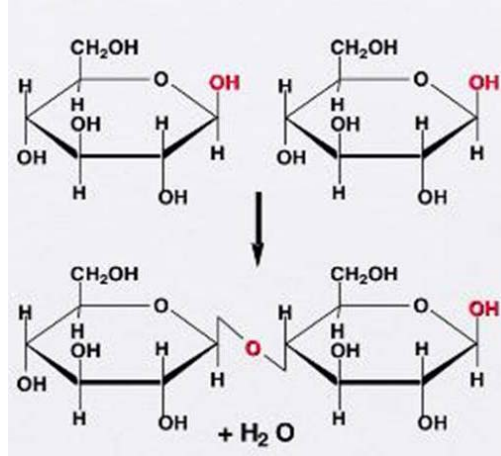
Deney glukoz çözeltisi yerine sukroz (sakaroz, bir disakkarid) çözeltisi ile yapılsaydı osazon oluşumu gözlenmezdi.



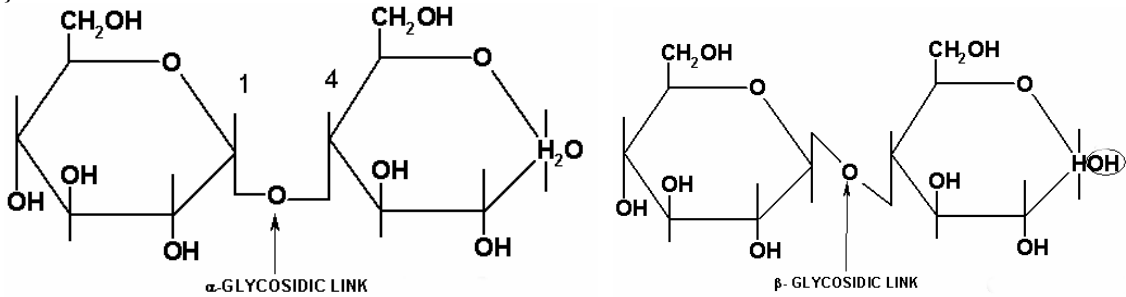
## 5.2. Disakkarid Deneyleri

### 5.2.1. Disakkaridler ve özellikleri

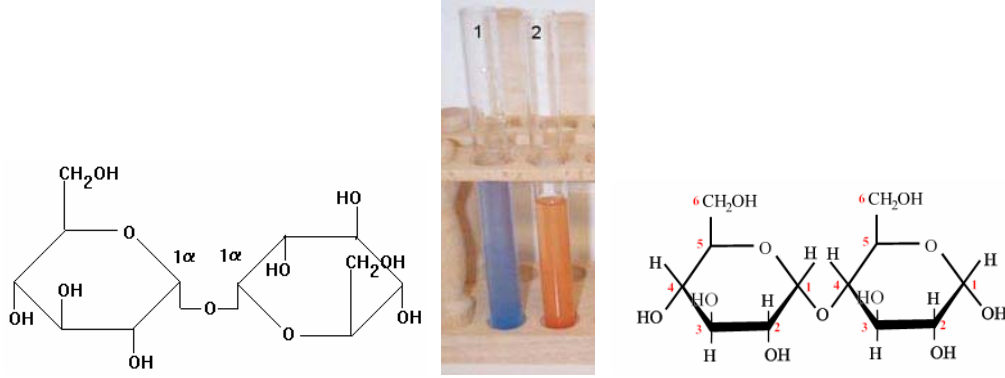
Disakkaridler, bir monosakkarid molekülü üzerindeki anomerik karbon hidroksil grubunun bir diğer monosakkarid molekülü üzerindeki bir hidroksil grubu ile reaksiyonlaşması sonucu oluşturulan bir O-glikozidik bağ vasıtasıyla birbirine bağlanmış iki monosakkarid molekülü ile oluşmuş bileşiklerdir.



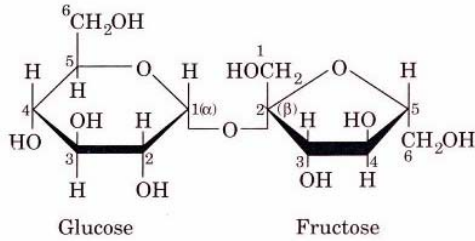
Disakkaridlerin oluşumunu sağlayan glikozidik bağlar,  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki tipte olur. Glikozidik bağın tipini, C-1'deki  $-OH$  grubunun pozisyonu belirler. C-1'deki  $-OH$  grubunun pozisyonu  $\alpha$  pozisyonu ise  $\alpha$ -glikozidik bağ,  $\beta$  pozisyonu ise  $\beta$ -glikozidik bağ oluşur.



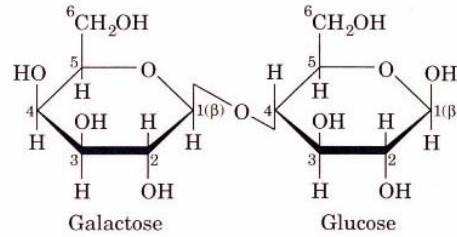
Bazı disakkaridler oluşurken monosakkaridlerin her ikisinin anomerik karbonu oluşuma katılır ve dolayısıyla böyle disakkaridlerin molekülünde anomerik karbon atomu bulunmaz. Molekülünde bir serbest anomerik karbon atomu bulunan disakkaridler, monosakkaridler gibi indirgeyici özellik gösterdikleri halde molekülünde bir serbest anomerik karbon atomu bulunmayan disakkaridler indirgeyici özellik göstermezler.



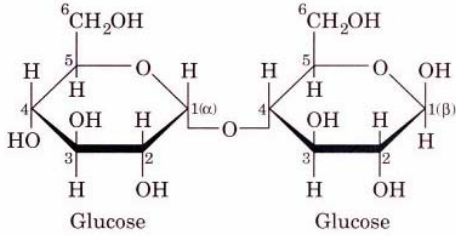
**Maltoz, Laktoz, Sukroz (Sakkaroz), Trehaloz, Sellobioz** önemli disakkaridlerdir.



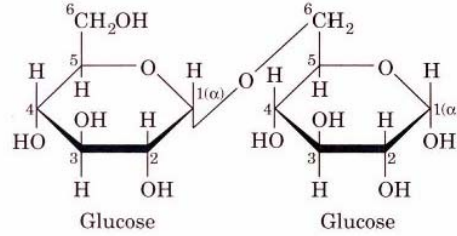
**Sucrose**



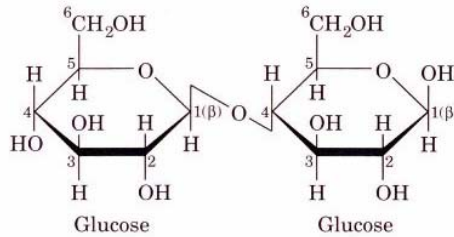
**Lactose**



**Maltose**



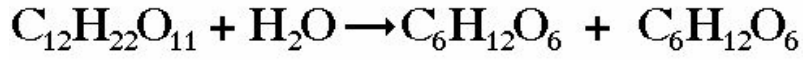
**Isomaltose**



**Cellobiose**

**Maltoz**, indirgeyici özelliğindedir ve **malt şekeri** olarak bilinir. **Laktoz**, indirgeyici özelliğindedir ve **süt şekeri** olarak bilinir. **Sukroz (sakkaroz)**, indirgeyici özelliğindedir ve **çay şekeri, sofru şekeri** olarak bilinir. **Trehaloz**, indirgeyici özelliğindedir. **Sellobioz**, indirgeyici özelliğindedir.

Disakkaridler sulu asit ile kaynatma suretiyle ve enzimatik olarak hidroliz edildiklerinde kendilerini oluşturan monosakkaridler ortaya çıkar.

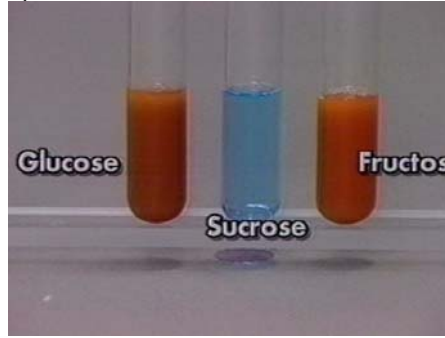


**Maltose**  $\longrightarrow$  **Glucose + Glucose**

**Lactose**  $\longrightarrow$  **Glucose + Galactose**

**Sucrose**  $\longrightarrow$  **Glucose + Fructose**

Fehling (-) olan sakkaroz, asit ile hidroliz olarak glukoz ve fruktoza parçalanır. Glukoz ve fruktoz da Fehling (+) sonuç verir.



## 5.2.2. Disakkaridlerin hidrolizi deneyleri

### 5.2.2.1. Sakkarozun asit ile hidrolizi deneyi

**Prencip:** Fehling (-) olan sakkaroz, asit ile hidroliz olarak glukoz ve fruktoza parçalanır; glukoz ve fruktoz da Fehling (+) sonuç verirler.

**Gerekenler:** 1) Sakkaroz. 2) Konsantre HCl. 3) %20'lik NaOH çözeltisi. 4) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve 5 mL konsantre  $H_2SO_4$  5) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 6) Taze Fehling reaktifi: Eşit miktarlarda Fehling A ve Fehling B çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilir. 7) Pipet 8) Deney tüpleri. 9) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne spatül ucuyla sakkaroz ve 5 mL distile su konup karıştırılarak sakkaroz çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (-) sonuç gözlenir. 2) Bir başka deney tüpüne spatül ucuyla sakkaroz ve 1 mL konsantre HCl konur. 3) Tüpteki karışımın üzerine 5 mL distile su eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki karışım, kaynar su banyosunda veya bunzen beki alevinde dikkatlice ısıtılır. 5) Tüpteki karışıma 2mL %20'lik NaOH çözeltisi eklenir. 6) Tüpteki son karışım ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (+) sonuç gözlenir.

**Açıklama:** Sakkaroz, bir glukoz molekülü ile bir fruktoz molekülünün **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)Fru** biçiminde kondensasyonu ile oluşmuş molekül yapısına sahip bir disakkariddir. Sakkaroz, serbest yarı asetal hidroksili içermez ve bu nedenle indirgeyici değildir; Fehling(-) sonuç verir. Sakkaroz, asit ile ısıtma sonucunda hidroliz olarak glukoz ve fruktoz moleküllerine parçalanır. NaOH, hidrolizden sonra ortamı nötrleştirir. Son karışımda bulunan glukoz ve fruktoz, serbest yarı asetal veya yarı ketal hidroksilleri nedeniyle indirgeyici özellikte olduklarından yapılan Fehling deneyinde (+) sonuç gözlenir.

**Tartışma:** Deney **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc** yapısındaki maltoz veya **Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc** yapısındaki laktoz ile yapılıyordu hidrolizden önce de Fehling (+) sonuç gözlenirdi. Çünkü, maltoz ve laktoz serbest yarı asetal hidroksil grubuna sahiptirler ve bu nedenle indirgeyicidirler.

Deney **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 1)Glc** yapısındaki trehaloz ile yapılıyordu hidroliz olmadan Fehling (+) sonuç gözlenemezdi; çünkü, trehaloz da sakkaroz gibidir; serbest yarı asetal hidroksili içermediğinden indirgeyici değildir.

### 5.2.2.2. Sakkarozun enzim ile hidrolizi deneyi

**Prencip:** Fehling (-) olan sakkaroz, enzim ile hidroliz olarak glukoz ve fruktoza parçalanır; glukoz ve fruktoz da Fehling (+) sonuç verirler.

**Gerekenler:** 1) Sakkaroz. 2) Maya. 3) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve 5 mL konsantre  $H_2SO_4$  4) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 5) Taze Fehling reaktifi: Eşit miktarlarda Fehling A ve Fehling B çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilir. 6) Porselen kapsül. 7) Pipet 8) Deney tüpleri. 9) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne spatül ucuyla sakkaroz ve 5 mL distile su konup karıştırılarak sakkaroz çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (-) sonuç gözlenir. 2) Bir porselen kapsüle 1 mL sakkaroz çözeltisi ve küçük bir parça maya konup ezilerek karıştırılır. 3) Kapsüldeki karışımda hidrolizin gerçekleşmesi için bir süre beklenir. 4) Kapsüldeki son karışım ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (+) sonuç gözlenir.

**Açıklama:** Sakkaroz, bir glukoz molekülü ile bir fruktoz molekülünün **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)Fru** biçiminde kondensasyonu ile oluşmuş molekül yapısına sahip bir disakkariddir. Sakkaroz, serbest yarı asetal hidroksili içermez ve bu nedenle indirgeyici değildir; Fehling(-) sonuç verir. Sakkaroz, mayadaki enzimler etkisiyle hidroliz olarak glukoz ve fruktoz moleküllerine parçalanır. Son karışımda bulunan glukoz ve fruktoz, serbest yarı asetal veya yarı ketal hidroksilleri nedeniyle indirgeyici özellikte olduklarından yapılan Fehling deneyinde (+) sonuç gözlenir.

**Tartışma:** Deney **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc** yapısındaki maltoz veya **Gal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)Glc** yapısındaki laktoz ile yapılıyordu hidrolizden önce de Fehling (+) sonuç gözlenirdi. Çünkü, maltoz ve laktoz serbest yarı asetal hidroksil grubuna sahiptirler ve bu nedenle indirgeyicidirler.

Deney **Glc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 1)Glc** yapısındaki trehaloz ile yapılıyordu hidroliz olmadan Fehling (+) sonuç gözlenemezdi; çünkü, trehaloz da sakkaroz gibidir; serbest yarı asetal hidroksili içermediğinden indirgeyici değildir.

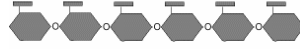
## 5.3. Polisakkarid Deneyleri

### 5.3.1. Polisakkaridler (glikanlar) ve özellikleri

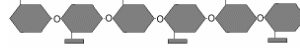
Polisakkaridler, pek çok sayıda monosakkarid veya monosakkarid türevi molekülün art arda O-glikozid bağları vasıtasıyla bağlanması suretiyle oluşmuş molekül yapısındaki karbohidratlardır. Doğada bulunan karbohidratların çoğu, yüksek moleküler ağırlıklı polimerler olan polisakkaridler halindedirler.



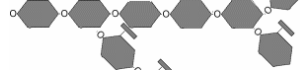
## Starch



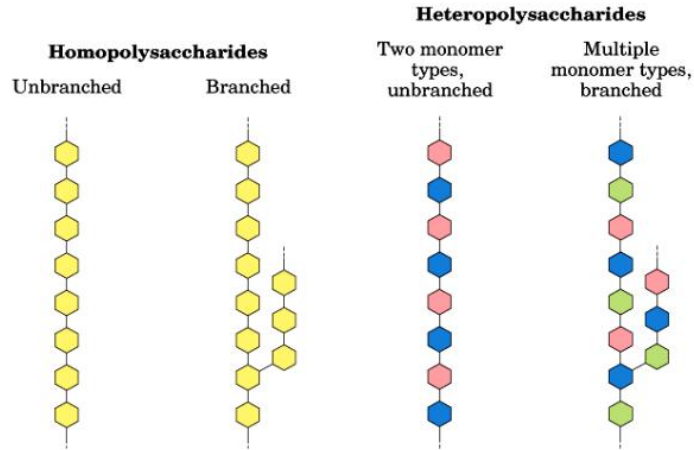
## Cellulose



## Glycogen

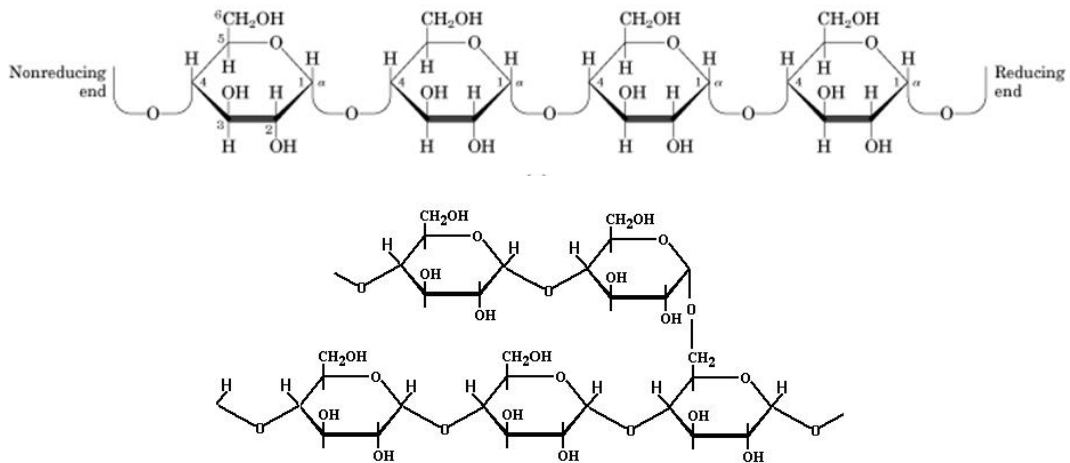


Polisakkaridler, birbirlerinden zincirleri boyunca tekrarlayan monosakkarid ünitelerinin benzerliği, bu üniteleri bağlayan bağların tipi ve dallanma derecesi bakımından farklıdırlar.



Doğadaki en önemli depo homopolisakkaridler, bitki hücrelerinde nişasta, hayvan hücrelerinde glikojendir.

**Nişasta**, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tip glukoz polimeri içerir. **Amiloz**, ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağları vasıtasıyla birbirine bağlanmış glukoz ünitelerinin dallanmamış uzun zincirlerinden oluşmuş bir glukoz polimeridir; zincirde birkaç bin glukoz kalıntısı bulunabilir ve bir ucu indirgeyicidir. **Amilopektin**, ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağları vasıtasıyla birbirine bağlanmış glukoz ünitelerinin uzun zincirlerinin her 24-30 glukoz kalıntısında bir dallanması suretiyle oluşmuş bir glukoz polimeridir; dallanma noktalarındaki bağ, ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) bağıdır ve dolayısıyla molekülde bir indirgeyici uç fakat dal sayısı kadar çok sayıda indirgeyici olmayan uç vardır.



**Glikojen**, amilopektin gibi, glukoz kalıntılarının ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağları vasıtasıyla birbirine bağlanması suretiyle oluşmuş bir glukoz polimeridir; fakat glukoz ünitelerinin uzun zincirlerinin her 8-12 glukoz kalıntısında bir dallanması nedeniyle daha yoğun bir dallanma



gözlenir; dallanma noktalarındaki bağ, ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) bağıdır ve dolayısıyla molekülde bir indirgeyici uç fakat dal sayısı kadar çok sayıda indirgeyici olmayan uç vardır.

### **5.3.2. Polisakkaridlerin hidrolizi deneyleri**

#### **5.3.2.1. Nişastanın asit ile hidrolizi deneyi**

*Prensip:* Fehling (-) olan nişasta, asit ile hidroliz olarak glukoz moleküllerine parçalanır; glukoz da Fehling (+) sonuç verir.

**Gerekenler:** 1) Nişasta. 2) Konsantre HCl. 3) %20'lik NaOH çözeltisi. 4) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve 5 mL konsantre  $H_2SO_4$  5) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 6) Taze Fehling reaktifi: Eşit miktarlarda Fehling A ve Fehling B çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilir. 7) Pipet 8) Deney tüpleri. 9) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne spatül ucuyla nişasta ve 5 mL distile su konup karıştırılarak nişasta çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (-) sonuç gözlenir. 2) Bir başka deney tüpüne spatül ucuyla nişasta ve 1 mL konsantre HCl konur. 3) Tüpteki karışımın üzerine 5 mL distile su eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki karışım, kaynar su banyosunda veya bunzen beki alevinde dikkatlice ısıtılır. 5) Tüpteki karışıma 2mL %20'lik NaOH çözeltisi eklenir. 6) Tüpteki son karışım ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (+) sonuç gözlenir.

**Açıklama:** Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tip glukoz polimeri içerir. **Amiloz**, ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağları vasıtasıyla birbirine bağlanmış glukoz ünitelerinin dallanmamış uzun zincirlerinden oluşmuş bir glukoz polimeridir; zincirde birkaç bin glukoz kalıntısı bulunabilir ve bir ucu indirgeyicidir. **Amilopektin**, ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) bağları vasıtasıyla birbirine bağlanmış glukoz ünitelerinin uzun zincirlerinin her 24-30 glukoz kalıntısında bir dallanması suretiyle oluşmuş bir glukoz polimeridir; dallanma noktalarındaki bağ, ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) bağıdır ve dolayısıyla molekülde bir indirgeyici uç fakat dal sayısı kadar çok sayıda indirgeyici olmayan uç vardır. Nişastadaki az sayıda indirgeyici uç, indirgeyici olmayan çok sayıda uç tarafından gizlenir; bu nedenle nişasta, Fehling (-) sonuç verir. Nişasta, asit ile ısıtma sonucunda hidroliz olarak glukoz moleküllerine parçalanır. NaOH, hidrolizden sonra ortamı nötrleştirir. Son karışımda bulunan glukoz da serbest yarı asetal hidroksilleri nedeniyle indirgeyici özellikte olduğundan yapılan Fehling deneyinde (+) sonuç gözlenir.

### 5.3.2.2. Nişastanın enzim ile hidrolizi deneyi

**Prencip:** Fehling (-) olan nişasta, enzim ile hidroliz olarak glukoz moleküllerine parçalanır; glukoz da Fehling (+) sonuç verir.

**Gerekenler:** 1) Nişasta. 2) Tükruk. 3) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve 5 mL konsantre  $H_2SO_4$  4) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 5) Taze Fehling reaktifi: Eşit miktarlarda Fehling A ve Fehling B çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilir. 6) Porselen kapsül. 7) Pipet 8) Deney tüpleri. 9) Kaynar su banyosu veya bunzen beki alevi.

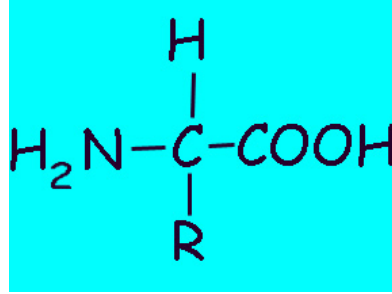
**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne spatül ucuyla nişasta ve 5 mL distile su konup karıştırılarak nişasta çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (-) sonuç gözlenir. 2) Bir porselen kapsüle 1 mL nişasta çözeltisi ve bir tükruk konup karıştırılır. 3) Kapsüldeki karışımda hidrolizin gerçekleşmesi için bir süre beklenir. 4) Kapsüldeki son karışım ile Fehling deneyi yapılır ve Fehling (+) sonuç gözlenir.

**Açıklama** Nişastadaki az sayıda indirgeyici uç, indirgeyici olmayan çok sayıda uç tarafından gizlenir; bu nedenle nişasta, Fehling (-) sonuç verir. Nişasta, enzim ile hidroliz olarak glukoz moleküllerine parçalanır. NaOH, hidrolizden sonra ortamı nötrleştirir. Son karışımda bulunan glukoz da serbest yarı asetal hidroksilleri nedeniyle indirgeyici özellikte olduğundan yapılan Fehling deneyinde (+) sonuç gözlenir.

## 6. AMİNO ASİT DENEYLERİ

### 6.1. Amino Asitler ve Özellikleri

Amino asitler, yapılarında hem amino grubu (-NH<sub>2</sub>) hem de karboksil grubu (-COOH) içeren bileşiklerdir.



Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Amino asitlerin standart amino asitler diye bilinen 20 tanesi, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir. Standart amino asitler, üç harfli kısaltmalar ve tek harfli sembollerle gösterilirler.

Amino asit	Kısaltma	Amino asit	Kısaltma
Glisin	Gly	Treonin	Thr
Alanin	Ala	Sistein	Cys
Valin	Val	Metiyonin	Met
Lösin	Leu	Asparajin	Asn
İzolösin	Ile	Glutamin	Gln
Prolin	Pro	Aspartat	Asp
Fenilalanin	Phe	Glutamat	Glu
Tirozin	Tyr	Lizin	Lys
Triptofan	Trp	Arjinin	Arg
Serin	Ser	Histidin	His

Standart amino asitler, R yan gruplarının özellikle polarite veya biyolojik pH'da su ile etkileşmeye eğilim özelliklerine göre dört sınıfa ayrılırlar.

#### 1) Nonpolar R grubu amino asitler.

Amino acid	Abbreviations	Structural Formula
Glycine	Gly (G)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{H}-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Alanine	Ala (A)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Valine	Val (V)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Leucine	Leu (L)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Isoleucine	Ile (I)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ NH}_3^+ \\   \quad   \\ \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Methionine	Met (M)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Proline	Pro (P)	$\begin{array}{c} \text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Phenylalanine	Phe (F)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$
Tryptophan	Trp (W)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \end{array}$

2) Polar R gruplu amino asitler.

Amino acid	Abbreviations	Structural Formula
Asparagine	Asn (N)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glutamine	Gln (Q)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Serine	Ser (S)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Threonine	Thr (T)	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Tyrosine	Tyr (Y)	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Cysteine	Cys (C)	$\begin{array}{c} \text{HSCH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

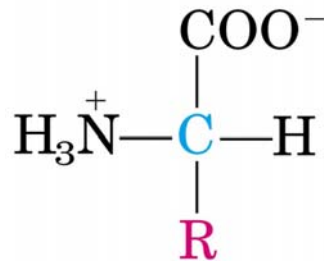
3) Asidik R gruplu amino asitler.

Amino acid	Abbreviations	Structural Formula
Aspartic acid	Asp (D)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glutamic acid	Glu (E)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

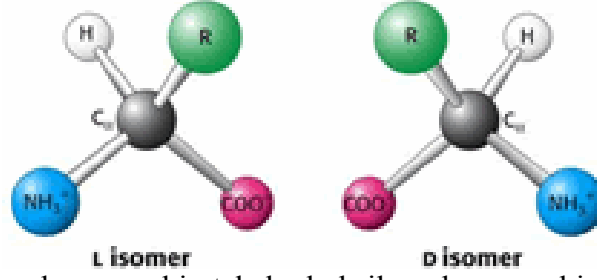
4) Bazik R gruplu amino asitler.

Amino acid	Abbreviations	Structural Formula
Lysine	Lys (K)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Arginine	Arg (R)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Histidine	His (H)	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

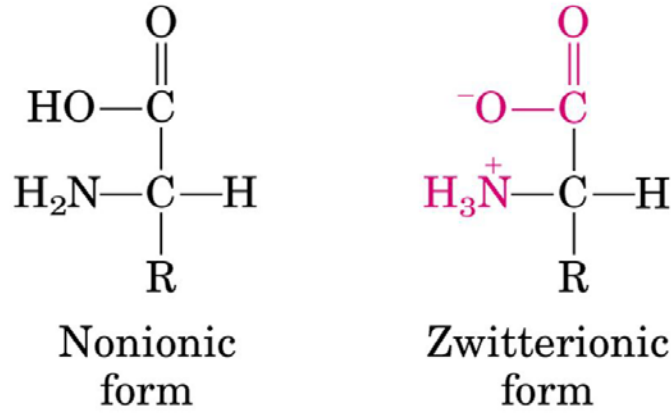
Glisinden (Gly, G) başka bütün standart amino asitlerde  $\alpha$ -karbon atomu asimetriktir.



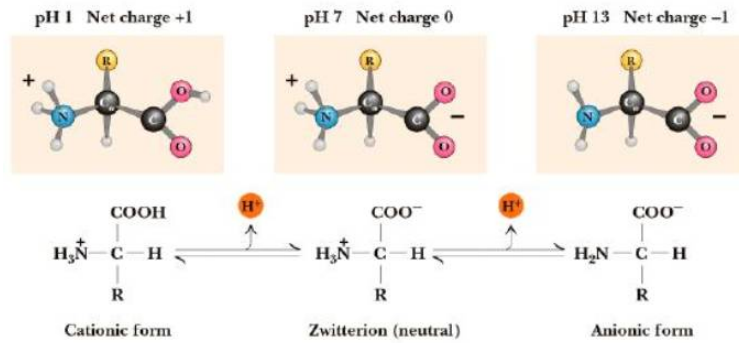
Glisinden (Gly, G) başka bütün standart amino asitler optikçe aktif iki stereoizomere veya enantiyomere sahiptirler. Protein moleküllerindeki amino asitler, L-stereoizomerlerdir.



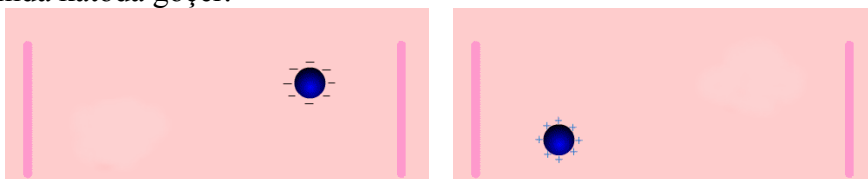
Bir tek amino grubuna ve bir tek karboksil grubuna sahip standart amino asitler, nötral sulu çözeltilerden **zwitterion** olarak bilinen, tam olarak iyonlaşmış şekillerde kristalize edilebilirler.



Bir standart amino asit, kendisi için karakteristik olan izoelektrik nokta değerine eşit pH ortamında net elektrik yükü taşımaz; izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında bazik anyon şeklinde; izoelektrik nokta değerinden düşük pH ortamında asit katyon şeklinde bulunur.



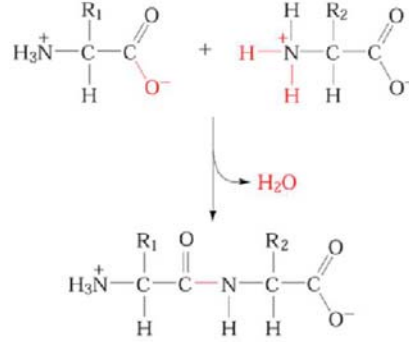
Bir standart amino asit, kendisi için karakteristik olan izoelektrik nokta değerine eşit pH ortamında bir elektrik alanında hareketsiz kalır; izoelektrik nokta değerinden yüksek pH ortamında elektrik alanında anoda geçer; izoelektrik nokta değerinden düşük pH ortamında elektrik alanında katoda geçer.



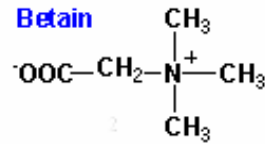
## 6.2. Amino Asidlerin Kimyasal Tepkimeleri

### 6.2.1. Amino asidlerin amino grupları ile verdikleri tepkimeler

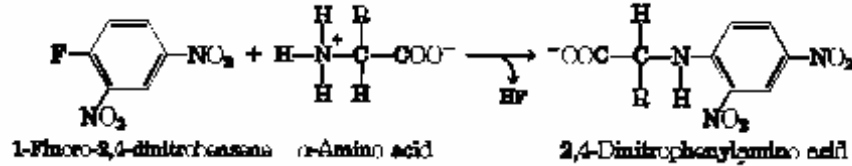
1) *Açillenme ile asidamid (peptid) oluşturma*: Amino asidin amino grubunun bir başka amino asidin karboksil grubu ile peptid bağı oluşturmaları tepkimesidir; peptidler ve proteinler oluşur.



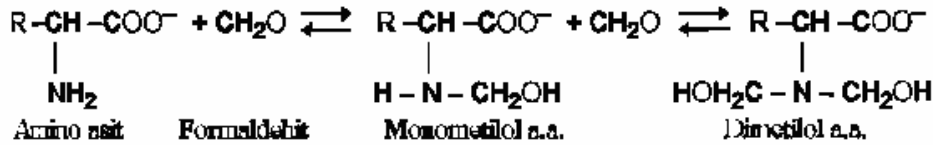
2) *Metillenme*: Amino asidin amino grubuna metil grubunun bağlanması tepkimesidir; betainler oluşur.



3) *Sanger tepkimesi*: Amino asidlerin amino gruplarına 1-flüoro-2,4-dinitro benzen bağlanmasıyla açık sarı renkli bir bileşik oluşması tepkimesidir.



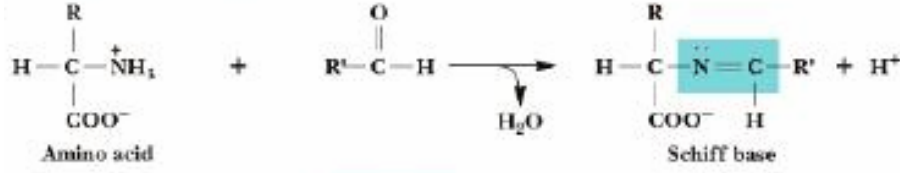
4) *Sörensen tepkimesi*: Amino asidlerin amino gruplarına formaldehid bağlanmasıyla N-metilol veya N,N-dimetilol oluşturmaları tepkimesidir.



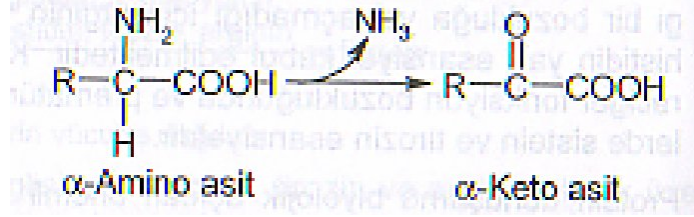
5) *Van Slyke reaksiyonu*: Amino asidlerin nitroz asid ile reaksiyona girerek azot gazı oluşturmaları tepkimesidir.



6) Schiff bazı(-N=CH-) oluşturma: Amino asidin bir aldehidle su çıkışı suretiyle birleşmesi tepkimesidir.

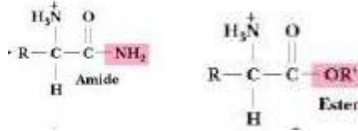


7) Deaminasyon: Amino asidlerin amino gruplarının ayrılmasıyla  $\alpha$ -keto asidlerin oluşması tepkimesidir.

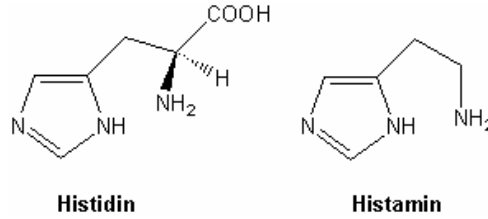


### 6.2.2. Amino asidlerin karboksil gruplarıyla verdikleri tepkimeler

1) Substitüsyon tepkimeleri: Tuz oluşturma, amid oluşturma, asidamid (peptid) oluşturma, ester oluşturma tepkimeleri.

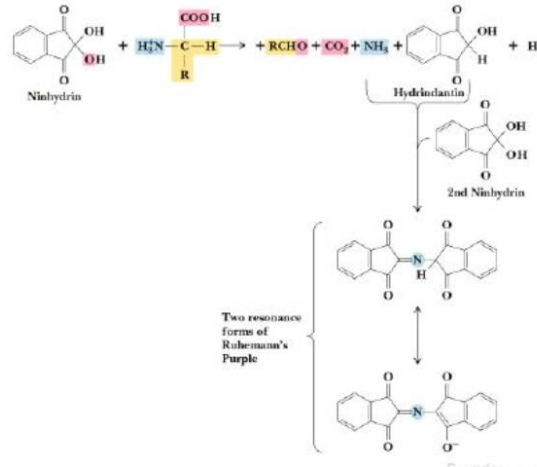


2) Dekarboksilasyon: Amino asidlerin karboksil gruplarının ayrılmasıyla biyojen aminlerin oluşması tepkimesidir.



### 6.2.3. Amino asidlerin amino ve karboksil gruplarının birlikte verdikleri tepkimeler

1) Ninhidrin tepkimesi: Ninhidrin çözeltisiyle kaynatılan amino asidin mavi-menekşe renkli bir kompleks oluşturması tepkimesidir.





#### 6.2.4. Amino asidlerin R- grupları ile verdikleri tepkimeler (renk reaksiyonları)

1) *Ksantoprotein reaksiyonu*: Yapısında **aromatik halka** bulunan fenil alanin, tirozin, triptofan, histidin gibi amino asidlerin konsantre nitrik asid ile ısıtma ve daha sonra ortamın NaOH ile alkalileştirilmesi sonucu **kırmızı-turuncu** renkli bir bileşik oluşturmaları reaksiyonudur.

2) *Kurşun sülfür oluşumu*: **Sülhidril (-SH)** veya disülfid (-S-S-) grubu içeren amino asidlerin NaOH ile kaynatıldıktan sonra ortama kurşun asetat çözeltisi eklendiğinde **siyah** renkli kurşun sülfür oluşturmalarıdır.

3) *Tiyol (-SH) gruplarının tepkimesi*: Sisteinin ağır metallere ve nitroprussiyatla labil renk kompleksi oluşturmaları tepkimesidir.

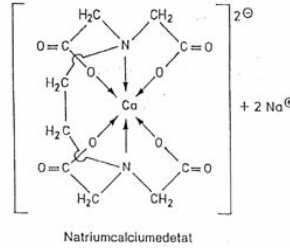
4) *Millon reaksiyonu*: **Fenol** içeren tirozin amino asidinin cıva nitrat ve konsantre nitrik asid ile ısıtıldığında **kırmızı** renkli cıva-nitro tuzu oluşturmaları tepkimesidir.

5) *Sakaguchi reaksiyonu*: **Guanido** grubu içeren arjinin amino asidinin sodyum hipoklorit veya sodyum hipobromit ve  $\alpha$ -naftol ile **koyu kırmızı** bir bileşik oluşturmaları tepkimesidir.

6) *Hopkins Cole reaksiyonu*: **İndol** halkası içeren triptofan amino asidinin glioksilik asidle karıştırıldıktan sonra konsantre sülfürik asidle tabakalaştırılmalarında temas yerinde **menekşe renkli** bir halka oluşmasıdır.

#### 6.2.5. Amino asidlerin tüm gruplarıyla verdikleri reaksiyon

Amino asidler,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  gibi ağır metallere kelatlanma kompleks bileşikleri oluştururlar.



### 6.3. Amino Asidleri Tanımlama Deneyleri

#### 6.3.1. Amino asidleri Van Slyke yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prensip**: Amino asidler, nitroz asid ile reaksiyona girerek stabil olmayan diazo bileşiği üzerinden, azot gazı çıkışıyla  $\alpha$ -hidroksi asid oluştururlar.

**Gerekenler**: 1) %0,5'lik glisin çözeltisi. 2)  $NaNO_2$ 'in %10'luk taze çözeltisi. 3) 2N asetik asid. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama**: 1) Bir deney tüpüne 2 mL %10'luk  $NaNO_2$  çözeltisi konur. 2) Tüpteki  $NaNO_2$  çözeltisi üzerine 2 mL 2N asetik asid eklenir ve karıştırılır. 3) Tüpteki karışım üzerine %0,5'lik glisin çözeltisi eklenir ve tüp çalkalanmadan iç yüzeyinde gaz kabarcıkları olduğu gözlenir.

**Açıklama**: Deneyin ilk aşamasında  $NaNO_2$  ile asetik asidin etkileşmesinden nitroz asid ( $HNO_2$ ) oluşur. Daha sonra nitroz asid, amino asid ile reaksiyonlaşır; amino asiddeki serbest amino ( $-NH_2$ ) grubundan azot gazı meydana gelirken  $\alpha$ -hidroksi asid oluşur. Deney tüpünün iç yüzeyinde gözlenen gaz kabarcıkları, açığa çıkan azot gazına aittir. Çıkan azot gazı miktarı ölçülerek çözeltide kaç molekül amino asid olduğu da saptanabilir; bu, amino asidlerin kantitatif tayininde kullanılmaktadır.

### 6.3.2. Amino asitleri ninhidrin yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prencip:** Amino asitler, amino ve karboksil gruplarının birlikte verdikleri bir reaksiyonda ninhidrin ile mor renkli kompleks oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %0,5'lik glisin çözeltisi. 2) Ninhidrin reaktifi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL %0,5'lik glisin çözeltisi konur. 2) Tüpteki glisin çözeltisi üzerine 2 damla ninhidrin reaktifi damlatılır. 3) Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılır. 4) Tüpteki karışımın mor bir renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** Ninhidrin, güçlü bir organik oksidandır. Amino asitler, ninhidrin etkisiyle oksidatif deaminasyona ve dekarboksilasyona uğrarlar; amino asitten aldehid, amonyak ve karbondioksit oluşurken ninhidrin de indirgenir. İlk sıralarda oluşan indirgenmiş ninhidrin de henüz indirgenmemiş ninhidrin ve amonyak ile reaksiyona girerek mor renkli bir kompleks oluşturur; tüpte gözlenen mor renk, oluşan bu mor renkli kompleksten ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Bütün amino asitler ninhidrin ile tepkime verirler; ninhidrin tepkimesi, amino asitlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde kullanılır.

Amino grubu değil de imino grubu içeren prolin ve hidroksiprolin de ninhidrin ile tepkimeye girerler; fakat oluşturdukları kompleks mor değil sarıdır.

Amino grubu içeren bazı fosfolipidler ve polipeptidler de ninhidrin ile tepkimeye girerler; fakat bu sırada karbondioksit çıkışı olmaz.

### 6.3.3. Amino asitleri ksantoprotein yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prencip:** Fenil halkası içeren amino asitler, fenil halkasına nitro gruplarının girmesiyle sarı renkli bileşikler oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Seyreltik serum. 2) Konsantre HNO<sub>3</sub> 3) %40'lık NaOH 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL seyreltik serum konur. 2) Tüpteki seyreltik serum üzerine 1-2 damla konsantre HNO<sub>3</sub> damlatılır; tüpte beyaz bir çökelti oluşumu gözlenir. 3) Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılır; bu sırada çökeltinin sarıya dönüştüğü ve çözünerek kaybolduğu gözlenir. 4) Tüp soğutulur ve içindeki karışıma 3-4 damla NaOH damlatılır; karışımın renginin turuncuya dönüştüğü gözlenir.

**Açıklama:** Deney sırasında önce serumda bulunan proteinler HNO<sub>3</sub> etkisiyle denatüre olarak çökmektedirler. Isıtma sırasında proteinlerde bulunan ve aromatik halka içeren fenil alanin, tirozin triptofan amino asitleri ayrılırken bunlardaki aromatik halkaya nitro grubu bağlanır ve suda çözünen, sarı renkli bileşik oluşur. Daha sonra ortamın NaOH ile alkalileşmesi sonucunda nitro ucuna sodyum da bağlanır ve kırmızı renkli bileşik oluşur.

**Tartışma:** Proteinlerin çoğu, fenil alanin, tirozin ve triptofan amino asitlerini içerirler; ksantoprotein reaksiyonunu verirler. Cilde HNO<sub>3</sub> teması sonrasında temas yerinde sararma olması ksantoprotein reaksiyonu sonucudur.

### 6.3.4. Amino asitleri kurşun asetat yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prencip:** Sülfhidril (-SH) veya disülfid (-S-S-) grubu içeren amino asitlerdeki sülfhidril (-SH) ve disülfid (-S-S-) grupları, NaOH ile kaynatma sırasında Na<sub>2</sub>S veya H<sub>2</sub>S şeklinde ayrılır; bunlar da kurşun asetat ile siyah renkli PbS oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Seyreltik serum. 2) %40'lık NaOH 3) Kurşun asetat çözeltisi. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL seyreltik serum konur. 2) Tüpteki seyreltik serum üzerine 2 mL %40'lık NaOH ve 1 mL kurşun asetat çözeltisi eklenip karıştırılır. 3)

Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılır; bu sırada tüpte siyah renkli bir bulanıklık olduğu gözlenir.

**Açıklama:** Sistein ve sistin gibi amino asitleri içeren proteinler, kuvvetli alkali ile ısıtma sonucu hidroliz olurlar ve amino asitlerdeki kükürt,  $\text{Na}_2\text{S}$  veya  $\text{H}_2\text{S}$  şeklinde ayrılırlar. Ortama kurşun asetat çözeltisi eklendiğinde, kurşun asetat ile  $\text{Na}_2\text{S}$  veya  $\text{H}_2\text{S}$ 'ün tepkimesi sonucunda  $\text{PbS}$  oluşur.  $\text{PbS}$ , suda çözünmeyen siyah renkli bir maddedir; tüpte gözlenen siyah renkli bulanıklık, oluşan  $\text{PbS}$ 'den ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Bu deney, sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) veya disülfid ( $-\text{S}-\text{S}-$ ) grubu içeren amino asitler içindir; içerdiği kükürt sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) veya disülfid ( $-\text{S}-\text{S}-$ ) şeklinde olmayan metionin ile  $\text{PbS}$  oluşumu gözlenmez.

### 6.3.5. Sistein amino asidini sodyum nitroprussiyat ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) grubu içeren sistein, serbest sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) grubu vasıtasıyla ağır metallerle ve nitroprussiyatla labil, fakat koyu bir renk kompleksi oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Sistein çözeltisi. 2) %40'lık  $\text{NaOH}$  3) Sodyum nitroprussiyat çözeltisi. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL sistein çözeltisi konur. 2) Tüpteki sistein çözeltisi üzerine 1 mL %40'lık  $\text{NaOH}$  ve 1 mL sodyum nitroprussiyat çözeltisi eklenip karıştırılır. 3) Tüpteki karışımın kırmızı-mor-siyah koyu bir renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** Sistein, içerdiği serbest sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) grubu nedeniyle ağır metallerle ve nitroprussiyatla labil, fakat koyu bir renk kompleksi oluşturur.

**Tartışma:** Bu deney, sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) grubu içeren sistein içindir; içerdiği kükürt sülfhidril ( $-\text{SH}$ ) şeklinde olmayan metionin ve sistin ile negatif sonuç verir.

### 6.3.6. Fenol içeren amino asitleri Millon yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Cıva ve nitro gruplarının fenol içeren amino asitlerdeki fenol grubuna bağlanmasıyla kırmızı renkli cıva-nitro tuzu oluşur.

**Gerekenler:** 1) Tirozin çözeltisi. 2) Millon reaktifi: Konsantre nitrik asid ve cıva nitrat karışımı. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

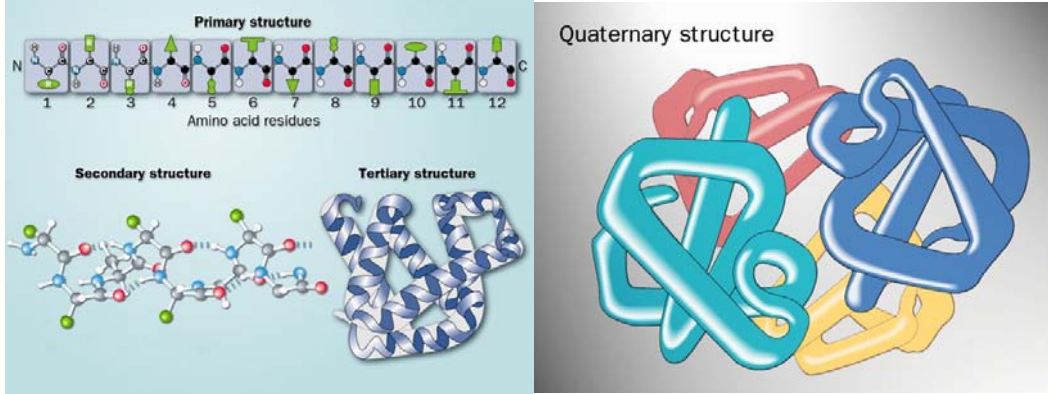
**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL tirozin çözeltisi konur. 2) Tüpteki tirozin çözeltisi üzerine 1 mL su ve 1 mL Millon reaktifi eklenip karıştırılır. 3) Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılır; bu sırada tüpte kırmızı bir renk olduğu gözlenir.

**Açıklama:** Tirozin amino asidi, fenol grubu içermektedir. Tirozin cıva nitrat ve konsantre nitrik asid ile ısıtıldığında cıva ve nitro gruplarının fenol grubuna bağlanmasıyla kırmızı renkli cıva-nitro tuzu oluşur. Tüpte gözlenen kırmızı renk, oluşan cıva-nitro tuzundan ileri gelmektedir.

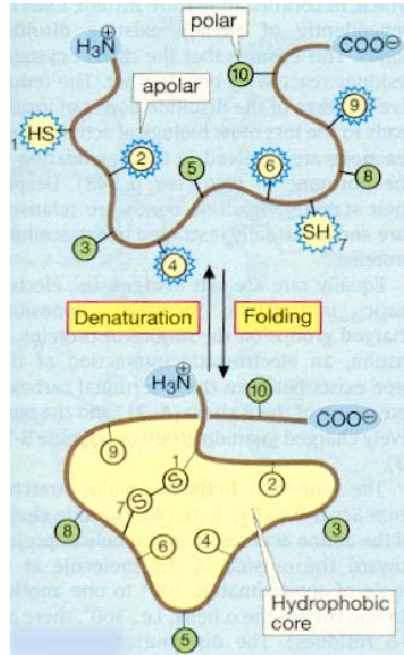
## 7. PROTEİN DENEYLERİ

### 7.1. Proteinler ve Özellikleri

Proteinler, amino asitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir. Protein moleküllerinde primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapı tanımlanır.



**Proteinlerin denatüre olma özellikleri vardır.** Bir proteinin denatürasyonu, molekülündeki yan bağların yıkılması ile polipeptid zincirin katlarının açılması ve sonra yeni bir biçimde yeniden katlanması olayıdır.

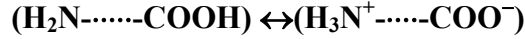


Denatürasyon, proteinin tersiyer yapısının bozulması, sekonder ve primer yapısının korunması biçiminde olursa reversibldir; proteinin tersiyer ve sekonder yapısının bozulması, yalnızca primer yapısının korunması biçiminde olursa irreversibldir.

Bir proteinin denatüre olmasıyla fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişimler görülür; proteinin çözünürlüğü çok azalır, biyolojik aktivitesi kaybolur.

Bir proteinin denatürasyonuna neden olan etkiler, ısı, X-ışını, UV ışınlar, ultrason, uzun süreli çalkalamalar, tekrar tekrar dondurup eritmeler, asit etkisi, alkali etkisi, organik çözücülerin etkisi gibi etkilerdir.

**Proteinler, amfoter elektrolit veya amfolittirler;** hem asit hem baz gibi davranma özellikleri vardır. Bir protein molekülü, her protein için farklı ve karakteristik olan, proteindeki elektriksel yüke sahip R- gruplarının sayıları ve elektriksel yüklerinin çeşidi tarafından belirlenen ve izoelektrik nokta diye tanımlanan bir pH değerinde iyonlaşmış fakat dış ortama karşı elektriksel yönden nötral bir yapıdadır



Bir protein molekülü, izoelektrik noktasından düşük pH ortamında pozitif yüklü kation ( $\text{H}_3\text{N}^+-\text{COOH}$ ) şeklinde bulunur; izoelektrik noktasından yüksek pH ortamında ise negatif yüklü anyon ( $\text{H}_2\text{N}-\text{COO}^-$ ) şeklinde bulunur.

Proteinler, amfolit olma özellikleriyle ilgili olarak da çeşitli özelliklere sahiptirler:

1) *Proteinlerin hem baz hem asit bağlama özellikleri vardır.*

2) *Proteinlerin hem negatif iyon hem pozitif iyon bağlama özellikleri vardır;* proteinlere bağlanan birçok iyon da suda çözünmez tuz oluşturur ve protein çöktürücü olarak etkilidirler. Triklor asetik asit, pikrik asit, tungstik asit gibi çok kullanılan protein çöktürücülerinde asitlerin anyonu, kationlaşmış proteinlerle birleşir.  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  gibi ağır metal kationları anyonlaşmış proteinlerle birleşir ve protein çöktürücü olarak etki ederler.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  gibi bazı ağır metal kationları, geleneksel tuz oluşumu yerine proteinle koordinasyon kompleksleri oluştururlar.

3) *Proteinlerin su bağlama ve bağlı suyu verme yetenekleri vardır;* 1g protein, yaklaşık 0,3-0,5 g su bağlar. Etanol, aseton, nötral tuzlar gibi çok hidrofil maddeler, bir proteinin bağladığı suyu çekerek protein çöktürücü olarak etki ederler.

4) *Proteinler, elektriksel alanda, izoelektrik noktadan düşük pH'larda katoda göçerler; izoelektrik noktadan yüksek pH'larda anoda göçerler.* Elektriksel alanda göçme hızı, proteinlerin net elektrik yüklerine ve ortamın pH değerine bağlıdır.

**Proteinler, polipeptid zincirindeki peptid bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar.** Proteinlerin kısmi hidrolizi ile proteozlar, peptonlar ve peptidler oluşur; tam hidrolizi ile amino asitler oluşur.

## 7.2. Proteinlerin Sınıflandırılmaları

Proteinler, yapılarına ve işlevlerine göre farklı biçimlerde sınıflandırılırlar.

### 7.2.1. Proteinleri yapılarına göre sınıflandırma

Proteinleri yapılarına göre sınıflandırmada basit proteinler, bileşik proteinler ve türev proteinler tanımlanır.

**7.2.1.1. Basit proteinler:** Yalnızca amino asitlerden oluşmuş; hidroliz olduklarında sadece amino asitleri veren, polipeptid zincirleri yapısındaki proteinlerdir. Basit proteinler, değişik niteliklerine göre alt gruplara ayrılarak incelenirler.

**Globüler proteinler:** Molekülünün üç boyutlu şekli rotasyon elipsoid biçiminde olan proteinlerdir. Globüler proteinler de albüminler, globülinler, globinler, glutelinler, prolaminler, protaminler, histonlar gibi alt gruplara ayrılırlar.

**Albüminler,** suda ve sulu tuz çözeltilerinde çözünürler; ısı ile denatüre olurlar; sulu çözeltilerde amonyum sülfat ile doyurulmuş bir ortamda çökerler; molekül ağırlıkları genel olarak 100.000'in altındadır; glisince fakirdirler.

**Globülinler,** suda çözünmezler; sulu nötr tuz çözeltilerinde çözünürler; sulu çözeltilerinden, çözeltilinin amonyum sülfat ile yarı doyurulması suretiyle çöktürme suretiyle ayrılabilirler; ısı ile de denatüre olurlar; molekül ağırlıkları 100.000'den yüksektir; glisince zengindirler.

*Globinler*, genellikle bileşik halde, başlıca hemoglobin yapısında bulunurlar.

*Glutelinler*, bitkisel kökenli basit proteinlerdir; suda ve sulu nötral tuz çözeltilerinde çözünmezler; çok sulu asit ve alkalilerde çözünürler; ısı ile denatüre olurlar.

*Prolaminler*, bitkisel kökenli basit proteinlerdir; suda, nötral tuzlarda ve alkolde çözünmezler; ancak %70-80'lik alkolde çözünürler; adlarını, çok fazla içerdikleri prolin amino asidinden alırlar; sistin ve lizin yönünden fakirdirler.

*Protaminler*, suda, seyreltik asit ve alkalilerde, seyreltik amonyum hidroksit çözeltilerinde çözünürler; fazla miktarda arjinin içermelerinden dolayı kuvvetli bazik karakterde basit proteinlerdir; tirozin, triptofan ve kükürtlü amino asit içermezler.

*Histonlar*, protaminler gibi, fakat daha büyük molekülü, daha az bazik basit proteinlerdir.

**Fibriler proteinler:** Molekülünün üç boyutlu şekli çok gerilmiş elipsoid biçiminde olan proteinlerdir.

*Skleroproteinler (Albüminoidler)*, suda, nötral tuz çözeltilerinde, seyreltik asit ve alkalilerde ve saf alkolde çözünmezler; pepsin ve tripsin gibi enzimlere dirençlidirler; hayvansal kaynaklıdır.

*Fibrinojen*, kan plazması içinde çözülmüş olarak bulunur; kanın pıhtılaşması sırasında görev alır.

*Miyozin*, kasta bulunur; kasın kasılmasında görev alır.

**7.2.1.2. Bileşik proteinler:** Amino asitlerden oluşmuş polipeptit zincirlerinin prostetik grup denen yapılara bağlanmasıyla oluşmuş; hidroliz edildiklerinde amino asitlerden başka değişik nitelikte kimyasal maddeler de veren proteinlerdir.

**Glikoproteinler:** Prostetik grubu karbonhidrat olan bileşik proteinlerdir; %1-80 arasında değişen oranda karbonhidrat içerirler.

**Proteoglikanlar:** %80-95 gibi çok yüksek oranda karbonhidrat içeren bileşik proteinlerdir;

**Lipoproteinler:** Proteinlerin lipidlerle oluşturdukları bileşik proteinlerdir; değişik oranlarda trigliserid, kolesterol ve fosfolipid içerirler. Lipoproteinler, önemli oranlarda lipid içermelerine karşın suda çözünürler; böylece kandaki lipidleri taşırlar.

**Fosfoproteinler:** Prostetik grup olarak fosfat içeren bileşik proteinlerdir.

**Nükleoproteinler:** Protaminler, histonlar ve diğer basit proteinlerin nükleik asitlerle bağlanması sonucu oluşmuş bileşik proteinlerdir.

**Metalloproteinler:** Prostetik grup olarak Fe, Cu, Zn gibi ağır metalleri içeren bileşik proteinlerdir. *Demirli metalloproteinlerden ferritin ve transferrin, bakırlı metalloproteinlerden seruloplazmin, önemli metalloprotein örnekleridirler.*

**Kromoproteinler:** Metal-porfirin kompleks sistemleri ile oluşmuş bileşik proteinlerdir. Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar, peroksidaz, demir içeren önemli kromoprotein örnekleridirler.

**7.2.1.3. Türev proteinler:** İlk iki protein grubunda yer alan proteinlerin belirli etkilerle değişmeleri sonucu oluşan proteinlerdir; primer türev proteinler ve sekonder türev proteinler olmak üzere iki alt grupta incelenirler.

**Primer türev proteinler:** Peptit bağlarına dokunmadan, asit, baz ve ısı gibi etkilerle protein moleküllerinin değişmesi sonucu oluşmuş türev proteinlerdir; **denatüre tip proteinler** olarak da adlandırılırlar.

**Sekonder türev proteinler:** Peptit bağlarını kısmen yıkan asit veya enzimlerin etkisiyle oluşan türev proteinlerdir. Peptit bağlarının bu şekilde parçalanmasıyla protein molekülleri, gitgide daha küçük parçalara bölünürler. Böyle bir parçalanmada büyük parçalara **proteoz (albüminoz)** denir; küçük parçalara **pepton** denir; daha küçük zincirler de **polipeptitler** ve **peptitler**dir.

## 7.2.2. Proteinleri işlevlerine göre sınıflandırma

**7.2.2.1. Katalitik proteinler:** Biyokimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler, yüksek derecede spesiyalize proteinlerdir.

**7.2.2.2. Taşıyıcı proteinler (transport proteinleri):** Spesifik molekülleri veya iyonları bağlayıp bir organdan bir başka organa veya hücre membranının bir tarafından diğer tarafına transport eden proteinlerdir.

**7.2.2.3. Besleyici ve depo proteinler:** Yumurta akının esas proteini *ovalbümin*, sütün esas proteini *kazein* besleyici proteinlerdir; bir çok bitki tohumu da çimlenen tohumun büyümesi için gerekli besleyici proteinleri depolamıştır. *Ferritin*, demir depolayan proteindir.

**7.2.2.4. Kontraktil proteinler:** Kasılabilen veya kendiliğinden hareket edebilen proteinlerdir. *Miyozin* ve *aktin*, iskelet kaslarının kontraktil sisteminde ve aynı zamanda bir çok kas olmayan hücrede işlev görür.

**7.2.2.5. Yapısal proteinler:** Tendonların ve kıkırdağın esas yapısını, çok yüksek gerilme gücüne sahip *kollajen* oluşturmuştur; kösele, hemen hemen saf kollajendir.

**7.2.2.6. Savunma (defans) proteinleri:** Organizmaları diğer türler tarafından istilaya karşı savunan, organizmayı hasardan koruyan proteinlerdir.

**7.2.2.7. Düzenleyici proteinler:** Sellüler düzenleme veya fizyolojik aktiviteye yardım eden proteinlerdir.

**7.2.2.8. Diğer proteinler:** Fonksiyonları henüz daha fazla bilinmeyen ve kolayca sınıflandırılmayan çok sayıda proteindir.

## 7.3. Proteinleri Tanımlama Deneyleri

### 7.3.1. Proteinleri denatürasyon ve çökme tepkimeleri ile tanımlanma deneyleri

#### 7.3.1.1. Proteinleri sülfosalisilik asit ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

**Prensip:** Proteinlerdeki serbest bazik gruplar, sülfosalisilik asit ile, suda çözünmeyen bileşik oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %20'lik sülfosalisilik asit çözeltisi. 2) Seyreltik serum. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. 2) Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 1-2 damla %20'lik sülfosalisilik asit çözeltisi damlatılır. 3) Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Serumda bulunan proteinlerdeki serbest amino grupları gibi bazik gruplar, sülfosalisilik asit ile birleşirler ve protein-sülfosalisilik asit bileşiği oluşur. Oluşan protein-sülfosalisilik asit bileşiği suda çözünmediğinden çöker. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çöken protein-sülfosalisilik asit bileşiğinden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney proteozlar ve peptonlarla yapılsaydı, gene bulanıklık oluşumu gözlenirdi. Fakat bu bulanıklık, tüpün ısıtılmasıyla kaybolur; proteinlerle oluşan bulanıklık ise tüpün ısıtılmasıyla kaybolmaz.

#### 7.3.1.2. Proteinleri konsantre nitrik asit ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi(Heller'in halka deneyi)

**Prensip:** Proteinler, nitrik asit ile, asit-metaprotein (asit-albumin) bileşiği oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Konsantre  $HNO_3$  2) Seyreltik serum. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1-2 mL konsantre  $HNO_3$  konur. 2) Deney tüpündeki konsantre  $HNO_3$  üzerine 1 mL seyreltik serum tabakalandırılır. 3) Deney tüpünde  $HNO_3$  ve serumun temas yerinde beyaz bir halka oluştuğu gözlenir.



**Açıklama:** Serumda bulunan proteinler, nitrik asit ile birleşirler ve beyaz renkli asit-metaprotein (asit-albumin) bileşiği oluştururlar. Deney tüpünde gözlenen beyaz halka, asit-metaprotein (asit-albumin) bileşiğinden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deneyde parlak ve kristalli bir halka oluşumu gözlenirse; bu, üre ile nitrik asidin oluşturduğu bileşikten ileri gelmektedir. Halka değil de çözelti içinde dağınık bir bulanıklık oluşumu gözlenirse; bu, ürat tuzlarından ileri gelmektedir. Ürat tuzlarından ileri gelen bulanıklık, ısıtmakla kaybolur.

### 7.3.1.3. Proteinleri triklorasetik asit (TCA) ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

**Prencip:** Proteinler, triklorasetik asit anyonları ile bağlanarak suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %20'lik TCA çözeltisi. 2) Seyreltik serum. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. 2) Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 1-2 damla %20'lik TCA çözeltisi damlatılır. 3) Deney tüpünde bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Serumda bulunan proteinler, TCA'nın anyonları ile bağlanarak suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar. Gözlenen bulanıklık, bu tuzların çökmesinden ileri gelmektedir.

### 7.3.1.4. Proteinleri ısıtma ile çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

**Prencip:** Proteinler, ısı etkisiyle denatüre olurlar.

**Gerekenler:** 1) Seyreltik serum. 2) Pipet 3) Deney tüpleri. 4) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. 2) Deney tüpü dikkatli bir şekilde ısıtılır. 3) Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Serumda bulunan proteinler ısı etkisiyle denatüre olurlar ve çözünürlükleri azalır. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çözünürlükleri azalan proteinlerin çökmesinden ileri gelmektedir.

### 7.3.1.5. Proteinleri kaynatma-asetik asitle çöktürme suretiyle tanımlama deneyi

**Prencip:** Proteinler, ısı etkisiyle denatüre olurlar; asetik asit de proteinlerin denatürasyonunu artırır.

**Gerekenler:** 1) Seyreltik serum. 2) %3'lük asetik asit. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1-2 mL seyreltik serum konur. 2) Deney tüpü dikkatli bir şekilde ısıtılır. 3) Deney tüpünde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir. 4) Deney tüpündeki bulanıklık üzerine birkaç damla asetik asit damlatılır; bulanıklığın arttığı veya değişmediği gözlenir.

**Açıklama:** Serumda bulunan proteinler ısı etkisiyle denatüre olurlar ve çözünürlükleri azalır. Deney tüpünde gözlenen bulanıklık, çözünürlükleri azalan proteinlerin çökmesinden ileri gelmektedir. Asetik asit, proteinlerin denatürasyonunu artırır.

**Tartışma:** İdrar gibi biyolojik materyallerde bulunan primer kalsiyum fosfat ve kalsiyum bikarbonat da ısıtmakla suda çözünmeyen sekonder veya tersiyer kalsiyum fosfat ve karbonat haline gelerek bulanıklık oluştururlar. Fakat tersiyer kalsiyum fosfat ve karbonattan ileri gelen bulanıklık, asetik asit etkisiyle kaybolur; çünkü asetik asit, tersiyer kalsiyum fosfat ve karbonat ile suda çözünen bileşikler oluşturur.

### 7.3.2. Proteinleri renk tepkimeleri ile tanımlanma deneyleri

#### 7.3.2.1. Proteinleri biüret tepkimesi ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Proteinler, biüret reaktifi ile mor renkli kompleks oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Protein çözeltisi. 2) Glisin çözeltisi. 3) Üre. 4) Biüret reaktifi: 6 g Na-K tartrat, 1,5 g kristalize bakır sülfat, 300 mL %10'luk NaOH, volüm distile suyla 1 litreye tamamlanarak karıştırılıp çözülür. 5) Pipet 6) Deney tüpleri. 7) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Beş deney tüpü alınarak numaralandırılır. 2) 1.tüpe 1-2 mL protein çözeltisi konur; 2.tüpe 1-2 mL glisin çözeltisi konur; 3.tüpe 1-2 mL su konur; 4.tüpe spatül ucu ile üre konur ve bu, 1-2 mL suda çözülür; 5.tüpe spatül ucu ile üre konur ve bu, amonyak kokusu hissedilinceye kadar ısıtılıp soğutulduktan sonra 1-2 mL suda çözülür. 3) Beş deney tüpüne de 1-2 mL biüret reaktifi eklenip karıştırılır. 4) 1.ve 5.tüplerde biüret reaktifinin renginin mora dönüştüğü gözlenir.

**Açıklama:** Biüret reaktifindeki  $Cu^{2+}$  iyonları, alkali ortamda, en az iki peptid bağı içeren maddelerle mor renkli kompleksler oluştururlar. Proteinlerin yapısında en az iki peptid bağı bulunduğundan proteinler, biüret reaktifindeki  $Cu^{2+}$  iyonları ile alkali ortamda, mor renkli kompleksler oluşturmakta ve 1.tüpte mor renk oluşumu gözlenmektedir. Glisin ve ürenin yapısında en az iki peptid bağı bulunmadığından 2.,3.ve 4.tüplerde ise mor renkli kompleks oluşmaz ve bu tüplerde biüret reaktifinin rengi değişmez; su içeren 3.tüp, renkleri karşılaştırma içindir. 5.tüpte ürenin kuru kuruya ısıtılmasıyla iki peptid bağı içeren biüret yapısı olduğundan bu tüpte de  $Cu^{2+}$  iyonları ile mor renkli kompleks oluşumuna bağlı olarak mor renk gözlenmektedir.

**Tartışma:** Deney, en az iki peptid bağı içeren peptidlerle de pozitif sonuç verir; ancak bir peptid bağı içeren dipeptidlerle negatif sonuç verir.

*\*Biüret tepkimesi, biyolojik materyalde proteinlerin kantitatif tayini için de sıklıkla kullanılmaktadır.*

#### 7.3.2.2. Proteinleri ksantoprotein tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik yan zincirli amino asitlerle ilgilidir; amino asitleri tanımlama deneyi olarak yapılmaktadır.

#### 7.3.2.3. Proteinleri kurşun asetat tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan ve sülfhidril ( $-SH$ ) veya disülfid ( $-S-S-$ ) grubu içeren amino asitlerle ilgilidir; amino asitleri tanımlama deneyi olarak yapılmaktadır.

#### 7.3.2.4. Proteinleri Sakagucchi tepkimesi ile tanımlama deneyi

Bu deney, aslında proteinlerin yapısını oluşturan ve guanido grubu içeren arjinin amino asidi ile ilgilidir; amino asitleri tanımlama deneyi olarak yapılmaktadır.

### 7.4. Proteinleri Ayırma ve Saflaştırma Deneyleri

#### 7.4.1. Proteinleri çözünürlüklerine göre ayırma ve saflaştırma deneyleri

Sodyum sülfat veya amonyum sülfat ile çöktürme yöntemleri, proteinlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılan en eski yöntemlerdir.  $38^{\circ}C$ 'de %22,2'lik  $Na_2SO_4$  (doymuş sodyum sülfat) çözeltisi, ve yarı doymuş konsantrasyonda  $(NH_4)_2SO_4$  (amonyum sülfat) çözeltisi globülini çöktürür; tam doymuş konsantrasyonda  $(NH_4)_2SO_4$  (amonyum sülfat) çözeltisi albümini çöktürür.

Tuzların protein çöktürücü etkisi, protein moleküllerinin bağladığı suyu çekmelerinden ileri gelir. Ayırma işlemi sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürmeler soğukta yapılmalıdır. Ayrıca çözeltinin pH değeri değiştirilerek yöntem iyileştirilebilir; proteinin izoelektrik noktasına eşit pH'da çözünürlük en azdır.

#### 7.4.1.1. Amonyum sülfat ile çöktürme suretiyle serumdaki globulinlerle albuminlerin ayrılması deneyi

**Prensip:** Globulinler, yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökerler; albuminler ise tam doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökerler.

**Gerekenler:** 1) Serum. 2) Doymuş amonyum sülfat çözeltisi. 3) Amonyum sülfat kristalleri. 4) Süzgeç kağıdı. 5) Cam huni. 6) Pipet 7) Deney tüpleri.

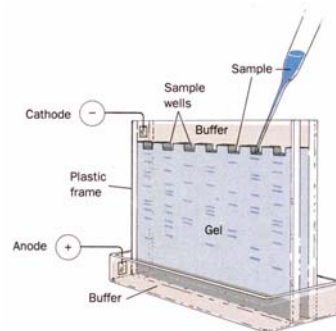
**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL serum konur. 2) Deney tüpündeki serum üzerine 2 mL su eklenerek karıştırılır ve böylece serum seyreltilir. 3) Deney tüpündeki seyreltik serum üzerine 4 mL doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklenerek karıştırılır. Böylece oluşan yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde beyaz bir bulanıklık oluştuğu gözlenir. 4) Deney tüpündeki bulanık karışım süzülür. 5) Berrak olan süzüntüye azar azar amonyum sülfat kristalleri atılıp karıştırılarak doymuş amonyum sülfat çözeltisi elde edilir. Doymuş amonyum sülfat çözeltisi içinde yeniden bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Serumda bulunan globulinler ve albuminler, seyreltik çözeltide çözülmüş haldedirler. Seyreltik çözeltinin yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle globulinler çökerler; yarı doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökme, globulinlerin özelliğidir. Süzme sırasında globulinler süzgeç kağıdının üzerinde kalırken albuminler çözülmüş halde süzgeç kağıdından süzüntüye geçerler ve böylece globulinlerle albuminler birbirlerinden ayrılmış olurlar. Süzüntünün tam doymuş amonyum sülfat çözeltisi haline getirilmesiyle de albuminler çökerler; tam doymuş amonyum sülfat çözeltisinde çökme, albuminlerin özelliğidir. Çözülmüş proteinlerin amonyum sülfat gibi nötral tuzların etkisiyle çökmelerinin nedeni, protein moleküllerindeki bağlı suyun çekilmesidir.

#### 7.4.2. Proteinleri elektrik yüklerine göre ayırma ve saflaştırma deneyleri

**Elektroforez,** proteinleri, izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak ayırma yöntemidir. Elektroforez işleminde proteinler, pH'ı belli bir tampon çözelti içinde ve bir taşıyıcı materyal üzerinde genellikle anoda doğru göç ettirilirler. Farklı göçme hızlarına göre taşıyıcı materyal üzerinde ayrılan proteinler, boyanarak görünür hale getirilir ve elde edilen elektroforegram, kantitatif olarak değerlendirilir.

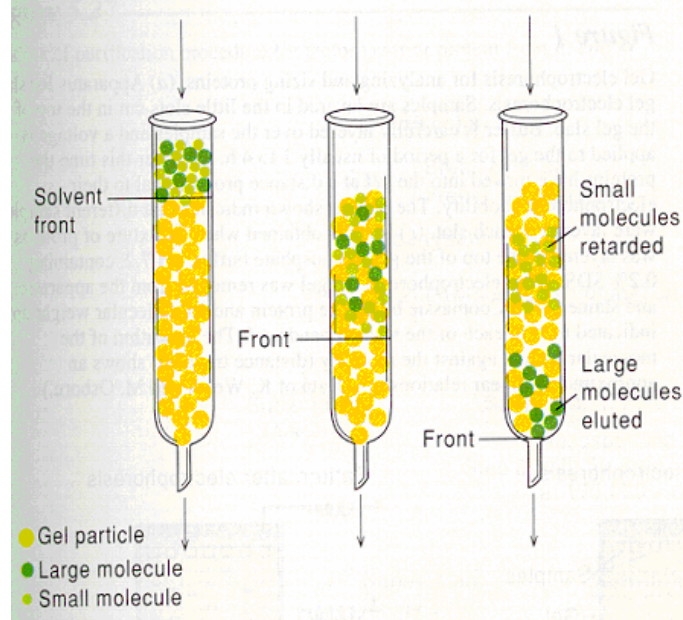
Elektroforezde kullanılan taşıyıcı materyal, kağıt, sellüloz asetat tabakası, nişasta jeli, poliakrilamid jeli, agar jeli gibi maddeler olabilir; taşıyıcı materyalin çeşidine göre de farklı elektroforez yöntemleri tanımlanır.



### 7.4.3. Proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırma ve saflaştırma deneyleri

**Ultrasantrifügasyon**, yer çekimi ivmesinin binlerce katına ulaşan çekim alanlarında büyük moleküllerin sedimente olarak (çökerek) ayrılmasına dayanan yöntemdir.

**Jel filtrasyon kromatografisi (dışlama kromatografisi)**, küçük ve orta büyüklükte protein moleküllerinin, bir kolonda moleküler elek olarak işlev gören bir jelin partiküllerinin oyuklarına girmeleri, daha sonra kolonu uygun bir çözügen yardımıyla yıkama suretiyle dışarı çıkarılmalarına dayanan ayırma yöntemidir:



### 7.5. Proteinlerin Amino Asit Dizilerini Tayin Deneyleri

Proteinlerin amino asit sıralarının aydınlatılması için önce, protein tamamen saf hale getirilir, sonra bir proteolitik enzimle çeşitli peptidlere parçalanır; en son olarak da her peptidin amino asit sırası tayin edilir.

Bir peptit molekülündeki amino asitlerin diziliş sırasını aydınlatmak için çeşitli yöntemlerde peptit zincirinin uçlarındaki serbest amino grubu veya serbest karboksil gruplarından yararlanılır.

**Sanger yöntemi ile bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini** için protein veya peptit, *1-fluoro-2,4-dinitrobenzen* ile reaksiyona sokulur. Daha sonra, asit ile peptit hidrolizi yapılır ve peptidin N-terminalindeki amino asit, 2,4-dinitrofenilamino asit şeklinde elde edilir ve tanısı yapılır.

**Edman parçalanması yöntemi ile bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini** için protein veya peptit, pH 8-9 ortamında *fenil izotiyosiyanat* ile reaksiyona sokulur.

**Dansil klorür yöntemi bir protein veya peptidin N-terminal amino asidinin tayini** için protein veya peptit, *dansil klorür* ile reaksiyona sokulur

**Lösin amino peptidaz enzimi de proteinlerin N-terminallerinden amino asitleri teker koparır**; proteinlerin veya peptitlerin amino asit dizisini tayinde kullanılır.

**Karboksipeptidazlar ile sınırlı proteoliz yöntemi**, bir protein veya peptidin C-terminal amino asidini tayin için, uygulanabilir.

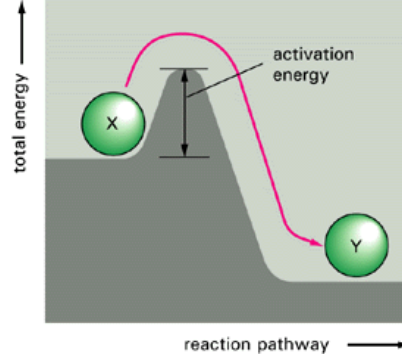
## 8. ENZİM DENEYLERİ

### 8.1. Enzimler ve Özellikleri

Enzimler, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır; biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler.

Bir kimyasal reaksiyonda belirli bazı maddeler (substratlar, S)'dan belirli başka bazı maddeler (ürünler, P) oluşur. Termodinamik bilgilerimize göre, substratların ve ürünlerin belirli serbest enerjileri vardır. Substratlar ve ürünler arasında bir enerjetik bariyer de vardır; termodinamik olarak elverişli reaksiyonların başlangıçta ölçülebilir hızda meydana gelmemesinin nedeni bu enerjetik bariyedir; moleküllerin reaksiyona uğramaları için daha yüksek bir enerji düzeyine ulaşmaları ve bu bariyeri aşmaları gerekir.

Herhangi bir reaksiyon, koordinat diyagramı ile anlatılabilir:



Bir reaksiyonun hızını bu aktivasyon enerjisi yansıtır; yüksek bir aktivasyon enerjisi yavaş bir reaksiyona, düşük bir aktivasyon enerjisi de hızlı bir reaksiyona karşılık gelir. Bir reaksiyon için aktivasyon enerjisi, katalizörler vasıtasıyla azaltılabilir ve reaksiyonun hızlı gerçekleşmesi sağlanabilir. Enzimler,  $10^7$ - $10^{14}$  misli hız artışı sağlayabilen olağanüstü katalizörlerdir.

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Bu nedenle enzimler, proteinlere ait tüm yapısal özellikleri gösterirler.

Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan amino asit kalıntılarından başka kimyasal komponent gerektirmezler. Bazı enzimler ise **kofaktör** diye adlandırılan bir ek kimyasal komponent gerektirirler. Kofaktör, ya  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  gibi bir veya daha fazla **inorganik iyon** ya da **koenzim** denen organik veya metalloorganik kompleks bir moleküldür.

Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, **holoenzim** olarak adlandırılır; holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmı **apoenzim** veya **apoprotein** olarak adlandırılır.

Holoenzimin kofaktör kısmı koenzim ise; koenzim enzime çok sıkı bağlanmış olabildiği gibi, koenzim enzime çok gevşek olarak bağlanmış olabilir. Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayanları **prostetik grup** olarak adlandırılırlar; örneğin biotin, karboksilazlara sıkı bir şekilde kovalent olarak bağlı bulunur yani karboksilazların prostetik grubudur. Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenleri **kosubstrat** olarak adlandırılırlar.

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır.

No.	Class	Type of reaction catalyzed
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group-transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Enzimler için çeşitli spesifiklikler (özgüllükler) tanımlanmıştır.

**Mutlak spesifiklik**, bir enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir.

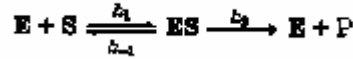
**Grup spesifikliği**, bir enzimin, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyonlaşması özelliğidir.

**Bağ spesifikliği**, bir enzimin proteinlerin peptid bağı, karbonhidratların glukozidik bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir.

**Stereospesifiklik**, bir enzimin yalnızca glukozun D- veya L- izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olması özelliğidir.

## 8.2. Enzim Kinetikleri

Enzimatik reaksiyonların hızlarının deneysel parametrelerdeki değişmelerle nasıl değiştiklerinin incelenmesi, *enzim kinetikleri* olarak bilinir.



**Bir enzimatik reaksiyonun hızı**, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Bir enzimin bir doku ekstratı veya biyolojik bir sıvı içindeki miktarını ölçmek için, örnek içinde bulunan enzimin katalize ettiği tepkimenin hızı ölçülür; ölçülen hız, var olan aktif enzimin miktarıyla doğru orantılıdır.

Birçok enzimin saf örnekleri olmadığından veya miktarlarını saptamak zor olduğundan bu enzimlerin miktarları yerine aktivite ünitesi kullanılır. **Bir enzimin aktivitesi**, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir.

En çok kullanılan **enzim aktivitesi birimi**, IU'dur. **1 IU enzim aktivitesi**, optimal koşullarda, 1 dakikada 1 µmol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılıktır.

Enzim aktivitesi, bazen katal olarak ifade edilir. **1 katal enzim aktivitesi**, optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da  $6 \times 10^7$  IU enzim aktivitesine denktir.  $1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$ ;  $1 \text{ nanokatal} = 10^{-9} \text{ katal} = 0,06 \text{ IU}$

Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için **spesifik aktivite**, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısıdır.

Çeşitli enzimler için özel aktivite birimleri de tanımlanmıştır. **Bodansky ünitesi**, 37°C'de 8,6 pH ortamında 100 mL serumda sodyum gliserofosfattan 1 saatte 1 mg fosfor oluşumunu katalize eden fosfataz enzimi aktivitesidir.



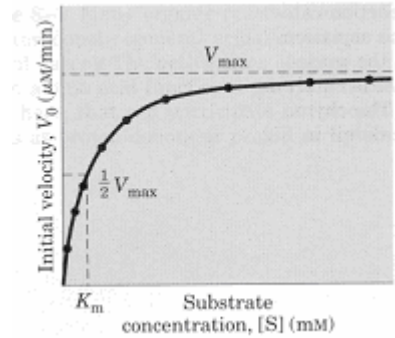
### 8.2.1. Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler

*Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen birçok faktörden bazıları şunlardır:* Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, ısı veya sıcaklık, zaman, ışık ve diğer fiziksel faktörler, iyonların doğası ve konsantrasyonu, hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler, reaksiyon ürünleri.

Substratın çok bol olduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı ( $V_0$ ), enzim konsantrasyonu  $[E]$  ile doğru orantılıdır.



Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda çok küçük bir substrat konsantrasyonunda, enzim moleküllerinin çoğu serbest kalır, ES kompleksi az miktarda oluşur ve dolayısıyla ürüne dönüşen substrat miktarı veya reaksiyonun hızı küçüktür. Substrat konsantrasyonunun belirli artışları ile enzim moleküllerinin yarısının serbest kalıp yarısının ES kompleksi oluşturduğu yarı maksimal hız ( $1/2 V_{max}$ ) noktasına ulaşılır. Substrat konsantrasyonunun belirli artışlarının devamında enzim moleküllerinin hepsinin ES kompleksi oluşturduğu bir noktada reaksiyon hızı maksimumdur ( $V_{max}$ ) ve bu noktadan sonra substrat konsantrasyonunun artışı ile reaksiyon hızı artmaz.



Bir enzimatik reaksiyonda enzim moleküllerinin yarısının substrata doydugu ve böylece yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonuna "**Michaelis-Menten sabiti**" denir ve  $K_m$  ile gösterilir. Enzimatik bir reaksiyon için  $V_0$ ,  $V_{max}$ ,  $K_m$  ve  $[S]$  arasındaki ilişki, "**Michaelis-Menten denklemi**" denen eşitlikle ifade edilir:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

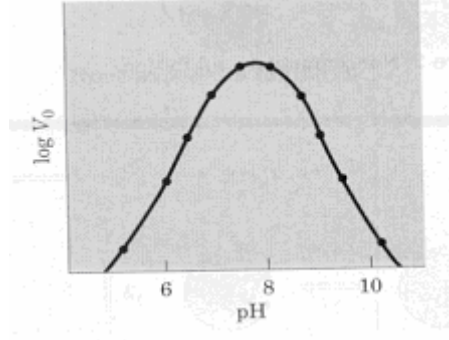
Michaelis-Menten denklemi, bir enzimin, etkili olduğu reaksiyonda, substrat konsantrasyonuna göre ne şekilde davranacağını tanımlar:

- 1)  **$K_m$  çok büyük** ( $[S]$ ,  $K_m$ 'den çok çok küçük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlıdır. *Böyle reaksiyonlar, birinci dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.*
- 2)  **$K_m$  çok küçük** ( $[S]$ ,  $K_m$ 'den çok çok büyük) ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir;  $V_{max}$  değerine eşittir. *Böyle reaksiyonlar sıfırıncı dereceden reaksiyon olarak tanımlanırlar.*

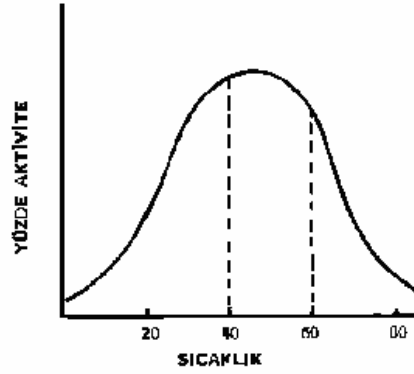


3)  $K_m$ ,  $[S]$ 'ye eşit ise, enzimatik reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonuna bağlı değildir;  $1/2V_{max}$  değerine eşittir.

Enzimlerin aktiviteleri  $H^+$  iyonu konsantrasyonu veya pH değişmelerinden etkilenir. Çünkü, gerek enzimlerin aktif yerleri gerekse substratları, iyonizasyonu pH'ın fonksiyonu olan asidik ve bazik gruplar içerir. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir pH değeri vardır ki bu pH değerine enzimin **optimal pH değeri** denir. Çeşitli enzimlerin optimum pH değerleri farklıdır.



Enzimatik reaksiyonların hızı, sıcaklık değişmelerinden etkilenir. Enzimatik reaksiyonun hızının maksimum olduğu sıcaklık derecesine **optimal sıcaklık** denir.



Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalır. Bunun sebebi, reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesidir.

Işık, enzimlerin aktivitesini artırır veya azaltır.

Birçok enzim, aktiviteleri için metal iyonlarına gereksinim gösterirler. Metal iyonlarının katalitik fonksiyonları, çoğu kez karbonil bağındaki elektronlar veya alkollerdeki oksijen üzerinde bulunan elektron çiftleri gibi elektron çiftleriyle kompleks yaparak fonksiyonel grubu polarize etmek ve yönlendirmektir. Metal iyonlarının ayrıca yapısal fonksiyonu da vardır.

Hormonlar, amino asitler ve diğer bazı maddeler enzimin durumunu etkileyerek reaksiyon hızını değiştirebilirler.

Reaksiyon ürünleri oluştuğunda enzimatik reaksiyonun hızı azalır. Çünkü çoğu enzimatik reaksiyonlar reversibldir; reaksiyon ürünleri kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirirler. Reaksiyon ürünlerinden bir kısmı substrat ile yapısal benzerlik gösterir ve enzimle birleşerek onun aktivitesini azaltabilir.

### 8.3. Enzim Deneyleri

#### 8.3.1. MnO<sub>2</sub>'in katalizörlüğünün incelenmesi

**Prencip:** MnO<sub>2</sub>, hidrojen peroksidin parçalanışını hızlandırır.

**Gerekenler:** 1) Sulandırılmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2) MnO<sub>2</sub> 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL sulandırılmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konur. 2) Tüpteki sulandırılmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine spatül ucu ile toz halindeki MnO<sub>2</sub>'ten eklenir. 3) Tüpte şiddetli bir köpürme olduğu gözlenir.

**Açıklama:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kendiliğinden fakat yavaş olarak su ve moleküler oksijene parçalanmaktadır. MnO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in su ve moleküler oksijene parçalanmasını hızlandırır. Hızlandırılmış olayda moleküler oksijenin açığa çıkışı, su içinde kabarcıklar veya köpürme ile belli olur.

#### 8.3.2. Katalazın etkisinin incelenmesi

**Prencip:** Katalaz, hidrojen peroksidin parçalanışını hızlandırır.

**Gerekenler:** 1) Sulandırılmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2) Kan. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 damla kan konur ve 5 mL su ile sulandırılır. 2) Tüpteki sulandırılmış kan üzerine 1-2 damla sulandırılmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılır. 3) Tüpte şiddetli bir köpürme veya gaz çıkışı olduğu gözlenir.

**Açıklama:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kendiliğinden fakat yavaş olarak su ve moleküler oksijene parçalanmaktadır. Kanda bulunan katalaz enzimi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in su ve moleküler oksijene parçalanmasını hızlandırır. Hızlandırılmış olayda moleküler oksijenin açığa çıkışı, su içinde kabarcıklar veya köpürme ile belli olur.

**Tartışma:** Deney, kan yerine bir parça patates kullanılarak tekrarlanırsa gene gaz çıkışı gözlenir; çünkü patatestede de katalaz vardır.

Kan ve patates ısıtıldıktan sonra deney yapılırsa gaz çıkışı gözlenmez; çünkü ısıtma ile, bir protein olan katalaz enzimi denatüre olur ve özelliklerini kaybeder.

#### 8.3.3. Peroksidazın etkisinin incelenmesi

**Prencip:** Peroksidaz, uygun bir substrattan hidrojen alıp bunları hidrojen peroksid molekülü üzerine taşıyarak hidrojen peroksidin suya dönüşümünü ve substratın oksitlenmesini katalize eder.

**Gerekenler:** 1) %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi. 2) Bazik benzidinin glasiyal asetik asitdeki %1'lik taze çözeltisi. 3) Sulandırılmış kan. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi konur ve üzerine 1-2 damla benzidin çözeltisi damlatılarak karıştırılır. 2) Tüpteki karışım üzerine 1-2 damla sulandırılmış kan damlatılır. 3) Tüpte mavi-yeşil renk oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Kanda bulunan peroksidaz enzimi, benzidinden hidrojen alarak bunları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moleküllerinin üzerine taşır; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suya indirgenirken benzidin de yükseltgenir. Ortamdaki yükseltgenmiş benzidin ile henüz yükseltgenmemiş benzidin karışımı, benzidin mavisi diye bilinen mavi-yeşil bir renk oluşturur. Gözlenen renk değişimi bundan ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney, kan yerine bir parça patates kullanılarak tekrarlanırsa mavi-yeşil renk oluşumu gözlenir; çünkü patatestede de peroksidaz vardır.

Patates ısıtıldıktan sonra deney yapılırsa gaz çıkışı gözlenmez; çünkü ısıtma ile, bir protein olan peroksidaz enzimi denatüre olur ve özelliklerini kaybeder. Kandaki hemoglobinin de peroksidatik etkisi vardır; benzidin ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyonu katalizler. Kanın ısıtılmasıyla peroksidazın katalitik etkisi ortadan kalktığı halde hemoglobinin peroksidatik etkisi devam edebilir.

### 8.3.4. Tükrük amilazının etkisinin incelenmesi

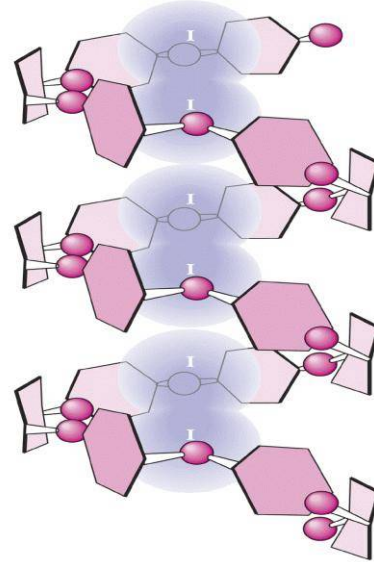
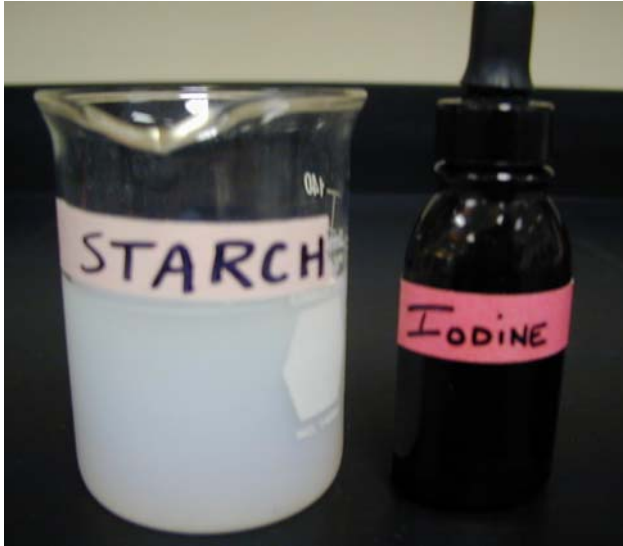
**Prensip:** Tükrükteki  $\alpha$ -amilaz, nişastayı hidrolitik olarak parçalar.

**Gerekenler:** 1) Nişasta çözeltisi. 2) İyot çözeltisi. 3) Tükrük. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL nişasta çözeltisi konur. 2) Tüpteki nişasta çözeltisi üzerine 1-2 damla iyot çözeltisi damlatılır; çözeltilde mavi bir renk oluştuğu gözlenir. 3) Tüpteki mavi renkli çözeltiliye bir miktar tükrük eklenir ve tüp  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilir; bir süre sonra çözeltildeki mavi rengin açıldığı gözlenir.

**Açıklama:** Nişasta, içerdiği amilopektin nedeniyle gözenekli bir molekül yapısındadır. İyot, nişasta molekülünün boşluklarına girerek çözeltinin mavi renkli görünmesine neden olur. Tükrükteki  $\alpha$ -amilaz, nişastayı hidrolitik olarak parçalar; nişasta molekülünün boşluklarına girmiş olan iyot moleküllerinin serbestleşmesine ve sonuçta mavi rengin kaybolmasına neden olur.

**Tartışma:** Mavi renkli nişasta çözeltisinin tükrük katılmadan ısıtılması da nişasta molekülünün boşluklarına girmiş olan iyot moleküllerinin serbestleşmesine ve sonuçta mavi rengin kaybolmasına neden olur; çözelti soğuyunca da iyot molekülleri tekrar nişasta moleküllerinin boşluklarına döner ve çözelti tekrar mavi renk alır.



### 8.3.5. Üreazın etkisinin incelenmesi

**Prensip:** Üreaz, üreyi parçalayarak amonyak oluşumuna neden olur.

**Gerekenler:** 1) Üre. 2) Üreaz çözeltisi. 3) Fenolfitaleyn. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) İki deney tüpü alınarak numaralandırılır ve her iki tüpe 2'şer mL üreaz çözeltisi konur. 2) 1.tüp bunzen beki alevinde bir süre dikkatlice ısıtıldıktan sonra soğutulur. 3) Her iki tüpteki üreaz çözeltileri üzerine 2'şer mL üre çözeltisi ve 1-2 damla fenolfitaleyn eklenip karıştırılır. 4) Tüpler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilir; bir süre sonra ısıtılmayan tüpte pembe renk oluşumu gözlenirken ısıtılan tüp renksiz kalır.

**Açıklama:** Üreaz, üreyi amonyak ve karbondioksit olarak parçalar. Oluşan amonyak, suda bazik ortam oluşturur ve bazik ortamda fenolfitaleyn pembe renk alır. Isıtılan tüpte denatüre olan üreaz, üreyi parçalama özelliğini kaybettiği için bu tüpte üre parçalanmaz; amonyak oluşmaz ve renk değişimi gözlenmez.

### 8.3.6. Lipazın etkisinin incelenmesi

**Prensip:** Lipaz, nötral yağları parçalayarak yağ asidi oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Süt. 2) Pankreas ekstresi. 3) Fenolfitaleyn. 4)  $Na_2CO_3$  çözeltisi. 5) Pipet 6) Deney tüpleri. 7) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün  $\frac{1}{4}$ 'üne kadar süt konur ve bu tüpteki süte 1-2 damla fenolfitaleyn damlatılır. 2) Tüpteki karışıma, pembe renk gözleninceye kadar  $Na_2CO_3$  çözeltisi damlatılır. 3) Tüpteki pembe renkli süt karışımına bir miktar pankreas ekstresi eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki son karışımın yarısı ikinci bir tüpe aktarılır. 5) Birinci tüp bunzen beki alevinde bir süre dikkatlice ısıtıldıktan sonra soğutulur. 6) Her iki tüp  $37^\circ C$ 'de inkübe edilir; bir süre sonra ısıtılmayan tüpte pembe rengin kaybolduğu gözlenirken ısıtılan tüp pembe renkli kalır.

**Açıklama:** Tüplerdeki son karışım,  $Na_2CO_3$ 'tan ileri gelen bazik ortamda fenolfitaleynin pembe renkli olması nedeniyle pembe görünümündedir. Pankreas ekstresinde bulunan lipaz, trigliseridleri gliserol ve yağ asitlerine parçalar; oluşan yağ asitleri, ortamın bazikliğini nötrleştirir ve fenolfitaleynin renginin kaybolmasına neden olur. Isıtılmayan tüpte önceki pembe rengin kaybolması, pankreas ekstresinde bulunan lipazın trigliseridleri parçalaması ile oluşan yağ asitlerinin ortamın bazikliğini nötrlestirmesi nedeniyledir. Isıtılan tüpte lipaz inaktive olur; trigliseridleri parçalayamaz; yağ asitleri oluşmaz; ortamın bazikliği nötrleşmez; fenolfitaleynin pembe rengi kaybolmaz.

## 9. LİPİD DENEYLERİ

### 9.1. Lipidler ve Özellikleri

Lipidler, ya gerçekten ya da potansiyel olarak yağ asitleri ile ilişkileri olan heterojen bir grup bileşiktir.

Lipidler, suda çözünmeyen, apolar veya hidrofob bileşiklerdir; ancak yapılarında hidroksil ve karboksil grupları gibi polaritesi fazla olan hidrofilik grupları fazla miktarda içeren lipidler suda kısmen çözünebilirler. Lipidler, kloroform, eter, benzen, sıcak alkol, aseton gibi organik çözücülerde çözünebilirler.

Lipidler, yapısal olarak dört sınıfa ayrılarak incelenirler.

**Basit lipidler:** Yağ asitlerinin çeşitli alkollerle oluşturdukları esterlerdir.

1) *Nötral yağlar (Trigliseridler, Triaçilgliseroller):* Gliserol (gliserin) ile üç yağ asidi molekülünün esterleşmesi sonucu oluşmuş basit lipidlerdir. Trigliseridler, hava, ışık, rutubet, ısı ve bakteri etkisiyle kendilerine özgü özelliklerini ve lezzetlerini kaybederek acılaşırlar. Trigliseridler, sıcakta su ve asitlerle hidroliz olarak gliserol ve yağ asitlerine parçalanırlar. Trigliseridler, lipaz etkisiyle de enzimatik olarak hidroliz edilebilirler. Trigliseridler, KOH ve NaOH gibi alkalilerle saponifikasyon olayı sonunda sabunları oluştururlar.

2) *Mumlar:* Yağ asitlerinin gliserolden daha büyük moleküllü alkollerle oluşturdukları esterlerdir.

3) *Kolesterol esterleri:* Yağ asitlerinin kolesterol ile oluşturdukları esterlerdir.

4) *Vitamin A esterleri:* Yağ asitlerinin vitamin A ile oluşturdukları esterlerdir.

5) *Vitamin D esterleri:* Yağ asitlerinin vitamin D ile oluşturdukları esterlerdir.

**Bileşik lipidler:** Yağ asitleri ve alkole ek olarak başka gruplar içeren lipidlerdir.

1) *Fosfolipidler:* Yağ asitleri ve alkole ek olarak bir **fosforik asit** içeren bileşik lipidlerdir. Önemli bir fosfolipid olan lesitin (fosfatidil kolin), NaOH ile ısıtma suretiyle parçalanır ve yapısındaki kolinden balıkxanelere kokusunu veren karakteristik kokulu trimetil amin ayrılır. Fosfolipidlerin alkol olarak gliserol yerine uzun zincirli bir amino alkol olan sfingozin içerenleri, *sfingomiyelinler*dir.

2) *Sfingolipidler:* Gliserol içermeyen, yağ asidi ve uzun zincirli bir amino alkol olan sfingozin içeren bileşik lipidlerdir. Sfingolipidlerin fosfat içerenleri, *sfingomiyelinler*dir; fosfat içermeyip karbohidrat içerenleri *glikolipidler* olarak bilinirler.

3) *Lipoproteinler:* Trigliserid, kolesterol ve fosfolipidlerin değişik oranlarda protein ile kombinasyonu sonucu oluşan moleküler agregatlarıdır; suda çözünürler, organik çözücülerde çözünmezler..

4) *Proteolipidler:* Lipidlerin proteinlerle oluşturdukları komplekslerdir; suda çözünmezler, organik çözücülerde çözünürler.

**Lipid türevleri:** Basit lipidlerin hidroliz veya değişim ürünleridirler.

1) *Yağ asitleri:* Hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir (**H<sub>3</sub>C–.....–COOH**). Yağ asitleri, ısı ve asit etkisiyle alkollerle esterleri oluştururlar. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar, platin, nikel veya bakır varlığında hidrojen ile doyurularak doymuş yağ asitleri elde edilebilir. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara F, Cl, Br, I gibi halojenler de katılabilir; renkli olan Br ve I çift bağa katıldıklarında renklerini kaybederek renksiz bileşikler oluştururlar.

2) *Monoaçilgliserol ve diaçilgliseroller:*

3) *Alkoller:* Gliserol ve sfingozin. Gliserol, üç karbonlu yüksek değerli bir alkoldür. Gliserol, KHSO<sub>4</sub> ile ısıtma sonucunda su kaybederek keskin kokulu bir doymamış aldehid olan akroleine dönüşür.

4) *Yağ aldehydleri:* Yağ asitlerinin indirgenmesiyle oluşan bileşiklerdir.

5) *Keton cisimleri:* Asetoasetik asit, β-hidroksi bütirik asit, aseton

**Lipidlerle ilgili diğer maddeler:** İzoprenoidler, tokoferoller ve naftokinonlardır.

1) *İzoprenoidler:* Terpenler, seski, fitol, skualen ve hepen asıl izoprenoidlerdir. Karotenoidler ve steroidler izoprenoid lipidlerdir. İzoprenoid lipidlerden önemli bir steroid lipid kolesteroldür. Kolesterol, steran halkası içerir. Kolesterolün steran halkasında C-3'de bir hidroksil grubu bulunur; C-5 ile C-6 arasında bir çift bağ vardır; C-10 ve C-13'e birer metil grubu bağlanmıştır; C-17'ye 8 karbonlu bir yan kol bağlanmıştır. Kolesterol, C-3'e bağlı hidroksil grubu ve C-5 ile C-6 arasındaki çift bağ ile ilişkili kimyasal özelliklere sahiptir; esterleşme, ketonlaşma, çift bağın doyurulması önemlidir. Ayrıca kolesterolün renk reaksiyonları da vardır.

2) *Vitamin E:* Tokoferoller

3) *Vitamin K:* Naftokinonlar

## 9.2. Lipidleri Tanımlama Deneyleri

### 9.2.1. Yağ asitlerini brom ile doyurma deneyi

**Prensip:** Doymamış yağ asitlerindeki çift bağa F, Cl, Br, I gibi halojenler katılarak bağ doymuş hale getirirler.

**Gerekenler:** 1) Zeytin yağı. 2) Kloroform. 3) Bromun kloroformdaki %2'lik çözeltisi. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 damla zeytin yağı konur ve tüpteki zeytin yağının üzerine 2 mL kloroform eklenerek karıştırma suretiyle zeytin yağı kloroformda çözülür. 2) Tüpteki karışım üzerine bromun kloroformdaki %2'lik çözeltisinden birer birer damlatılır ve her damlatmada tüp çalkalanır. İlk damlalarda çalkalama ile bromun renginin hemen kaybolduğu, fakat birçok damladan sonra bromun renginin çözeltide kaldığı gözlenir.

**Açıklama:** Zeytin yağının %80'ini C:18  $\Delta^9$  oleik asit oluşturur. Deney sırasında ilk damlatılan bromlar, oleik asitdeki çift bağa katılırlar ve renksiz bir bileşik olduğundan karakteristik brom renginin hemen kaybolduğu gözlenir. Çözeltide bulunan oleik asit moleküllerinin tamamındaki çift bağlar doyduktan sonra ise damlatılan brom ortamda kalır ve rengi ortamda gözlenir.

**Tartışma:** Deney brom yerine iyot ile yapılsaydı benzer gözlemler elde edilirdi. 100 g yağın gram cinsinden bağladığı iyot miktarı, **iyot indeksi** olarak bilinir ve yağın doymamışlık derecesinin ölçüsü olarak kullanılır.

### 9.2.2. Gliserolü akrolein kokusu ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Gliserol,  $KHSO_4$  ile ısıtma sonucunda su kaybederek keskin kokulu doymamış aldehid olan akroleine dönüşür.

**Gerekenler:** 1) Zeytin yağı. 2)  $KHSO_4$  3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL zeytin yağı konur ve tüpteki zeytinyağının üzerine spatül ucu ile  $KHSO_4$  eklenerek karıştırılır. 2) Tüp dikkatlice ısıtılırken tüpten karakteristik keskin koku yayıldığı hissedilir.

**Açıklama:** Deney sırasında, önce zeytin yağındaki trigliseridler gliserol ile yağ asitlerine parçalanırlar. Trigliseridlerin parçalanması ile oluşan gliserol de  $KHSO_4$  ile su kaybederek bir doymamış aldehid olan akroleine dönüşür. Hissedilen keskin koku, oluşan akroleinden ileri gelmektedir.

### 9.2.3. Gliserolü amonyaklı gümüş nitrat ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Gliserol,  $KHSO_4$  ile ısıtma sonucunda su kaybederek keskin kokulu doymamış aldehid olan akroleine dönüşür; akrolein de gümüş nitrattaki gümüşü indirgeyerek elementel gümüş açığa çıkarır.

**Gerekenler:** 1) Zeytin yağı. 2)  $KHSO_4$  3) Amonyaklı gümüş nitrat çözeltisi. 4) Şerit filtre kağıdı. 5) Pipet 6) Deney tüpleri. 7) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL zeytin yağı konur ve tüpteki zeytinyağının üzerine spatül ucu ile  $KHSO_4$  eklenerek karıştırılır. 2) Tüp dikkatlice ısıtılırken içine amonyaklı gümüş nitrat çözeltisi ile ıslatılmış bir filtre kağıdı sarkıtılır. 3) Tüp içine sarkıtılan filtre kağıdının siyahlaştığı gözlenir.

**Açıklama:** Deney sırasında, önce zeytin yağındaki trigliseridler gliserol ile yağ asitlerine parçalanırlar. Trigliseridlerin parçalanması ile oluşan gliserol de  $KHSO_4$  ile su kaybederek bir doymamış aldehid olan akroleine dönüşür. Oluşan akrolein, aldehid grubu ile gümüş nitrattaki gümüşü indirger ve elementel gümüş açığa çıkarır. Filtre kağıdı üzerinde gözlenen siyahlaşma, açığa çıkan elementel gümüşten ileri gelmektedir.

### 9.2.4. Gliserolü Fuksin- $H_2SO_4$ ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Gliserol,  $KHSO_4$  ile ısıtma sonucunda su kaybederek keskin kokulu doymamış aldehid olan akroleine dönüşür; akrolein de Fuksin- $H_2SO_4$  ile tepkimeye girerek kırmızı renkli bileşik oluşturur

**Gerekenler:** 1) Zeytin yağı. 2)  $KHSO_4$  3) Fuksin- $H_2SO_4$  4) Şerit filtre kağıdı. 5) Pipet 6) Deney tüpleri. 7) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL zeytin yağı konur ve tüpteki zeytinyağının üzerine spatül ucu ile  $KHSO_4$  eklenerek karıştırılır. 2) Tüp dikkatlice ısıtılırken içine Fuksin- $H_2SO_4$  ile ıslatılmış bir filtre kağıdı sarkıtılır. 3) Tüp içine sarkıtılan filtre kağıdının kırmızılaştığı gözlenir.

**Açıklama:** Deney sırasında, önce zeytin yağındaki trigliseridler gliserol ile yağ asitlerine parçalanırlar. Trigliseridlerin parçalanması ile oluşan gliserol de  $KHSO_4$  ile su kaybederek bir doymamış aldehid olan akroleine dönüşür. Oluşan akrolein, Fuksin- $H_2SO_4$  ile tepkimeye girerek kırmızı renkli bir bileşik oluşturur; filtre kağıdı üzerinde gözlenen kırmızı renk oluşumu, bundan ileri gelmektedir.

### 9.2.5. Kolesterolü Salkowski yöntemi ile tanımlama deneyi

**Prensip:** Kolesterol, sülfürik asitle renk tepkimesi verir ve kırmızı renkli bir bileşik oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Kolesterolün kloroformdaki çözeltisi. 2) Konsantre  $H_2SO_4$  3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL kolesterolün kloroformdaki çözeltisinden konur. 2) Tüpteki çözelti üzerine dikkatli olarak 2 mL konsantre  $H_2SO_4$  tabakalandırılır. 3) Tabakaların temas yerinde kırmızı halka ve sülfürik asidin açık yeşil fluoresansı gözlenir.

**Açıklama:** Deney sırasında, önce 2 molekül kolesterolün su çıkışıyla kondense olması sonucu bikolestadien oluşur. Daha sonra bikolestadien ve sülfürik asitten de kırmızı renkli bikolestadien-disülfonik asit oluşur. Temas yerinde oluşan halkada gözlenen kırmızı renk, bikolestadien-disülfonik asitten ileri gelmektedir.



### 9.2.6. Kolesterolü Liebermann-Burchardt yöntemi ile tanımlama deneyi

**Preşip:** Kolesterol, anhidrasetik asit ve sülfürik asitle renk tepkimesi verir ve yeşil renkli bir bileşik oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Kolesterolün kloroformdaki çözeltisi. 2) Konsantre  $H_2SO_4$  3) Anhidrasetik asit. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL kolesterolün kloroformdaki çözeltisinden konur. 2) Tüpteki çözelti üzerine 2 mL anhidrasetik asit eklenir ve karıştırılır. 3) Tüpteki karışıma 1 mL konsantre  $H_2SO_4$  eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpte mor-mavi üzerinden yeşil renk oluşumu gözlenir.

**Açıklama:** Deney sırasında, önce 2 molekül kolesterolün su çıkışıyla kondense olması sonucu bikolestadien oluşur. Daha sonra anhidrasetik asit varlığında bikolestadien ve sülfürik asitten de bikolestadien-monosülfonik asit oluşur. Tüpte mor-mavi üzerinden yeşil renk gözlenmesi, bikolestadien-monosülfonik asit oluşumundan ileri gelmektedir.

### 9.2.7. Keton cisimlerinin Lieben yöntemi ile tanımlanması

**Preşip:** Aseton, alkali ortamda iyot ile iyodoform oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Asetonlu sıvı. 2) Lugol çözeltisi: 5g iyot ve 10 g KI, 100 g distile suda çözünür; 1/5 oranında sulandırılarak kullanılır. 3) 2N NaOH çözeltisi. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL asetonlu sıvı ve 2 mL 1/5 oranında sulandırılmış lugol çözeltisi konarak karıştırılır. 2) Tüpteki karışıma, lugolün rengi giderilinceye kadar damla damla 2N NaOH çözeltisi eklenir. 3) Tüpte sarı renkli çökelti oluştuğu gözlenir ve iyodoform kokusu hissedilir.

**Açıklama:** Deney sırasında aseton, sodyum hidroksit ve iyot ile tepkimeye girerek iyodoform oluşturur. İyodoform sarı renklidir, suda güç çözünür ve karakteristik kokuludur. Tüpte gözlenen sarı çökelti ve hissedilen koku, oluşan iyodoform ile ilgilidir. İstenirse çökeltinin lam-lamel arasında mikroskopta incelenmesiyle altı köşeli ya da yıldız şeklinde iyodoform kristalleri görülebilir.

### 9.2.8. Keton cisimlerinin Legal yöntemi ile tanımlanması

**Preşip:** Aseton, alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kiraz kırmızısı renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Asetonlu sıvı. 2) %5'lik taze sodyum nitroprussiyat çözeltisi. 3) %10'luk NaOH çözeltisi. 4) Asetik asit. 5) Pipet 6) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL asetonlu sıvı, 1 mL sodyum nitroprussiyat çözeltisi ve 2 mL %10'luk NaOH çözeltisi konarak karıştırılır. 2) Tüpteki karışımın kırmızı renk aldığı gözlenir. 3) Tüpteki kırmızı renkli karışıma 1-2 damla asetik asit damlatılır; rengin mora dönüştüğü gözlenir.

**Açıklama:** Deneyde önce alkali ortamda aseton ve sodyum nitroprussiyat arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli izonitroaseton bileşiği oluşur. Daha sonra izonitroaseton ile asetik asit arasındaki tepkime sonucunda mor renkli bir kompleks oluşur.

**Tartışma:** Deney asetonlu sıvı yerine kreatinin içeren sıvı ile yapıldığında da ilk aşamada kırmızı renk gözlenir. Fakat bu kırmızı renk, asetik asit ilavesiyle mora dönüşmez; kaybolur.

## 10. SAFRA DENEYLERİ

### 10.1. Safra ve Özellikleri

Safra, karaciğerden devamlı olarak salgılanan ve hepatik kanala boşalan, safra kesesinde toplanan sıvıdır. Safranın bileşiminde %97 oranında su ve ayrıca bilirubin gibi safra renkli maddeleri, safra tuzları, kolesterol, musin, protein bulunur.

**Bilirubin**, hemoglobinin yıkılımı ile oluşan yeşil renkli biliverdinin indirgenmesiyle oluşan turuncu renkli safra pigmentidir.

**Safra asitleri**, 24 karbonlu steroidlerdir; steran halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu ve 5 karbonlu yan zincirlerinde bir karboksil grubu içerirler. Kolik asit (3, 7, 12-trihidroksikolanik asit) ve kenodezoksi kolik asit (3, 7-dihidroksikolanik asit), **primer safra asitleri** olarak bilinirler. Dezoksikolik asit (3, 12-dihidroksikolanik asit) ve litokolik asit (3-hidroksikolanik asit) de **sekonder safra asitleri** olarak bilinirler.

Safra asitleri, insan safrasında ya glisin konjugelerinin ya da bir sistein türevidir olan taurin konjugelerinin sodyum tuzları şeklinde bulunurlar. Bu nedenle sıklıkla safra asitleri yerine safra tuzlarından sözedilir. Safra tuzları, apolar yapıya apolar moleküller arası kuvvetlerle bağlanırlar ve yüzey gerilimini azaltırlar.

### 10.2. Safra Deneyleri

#### 10.2.1. Safra müsinini tanımlama deneyi

**Prencip:** Safrada bulunan müsin, mukopolisakkarid yapısındadır; asetik asit etkisiyle denatüre olarak çöker.

**Gerekenler:** 1) Safra. 2) 2 N asetik asit. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL safra konur. 2) Tüpteki safra içine 1 damla 2 N asetik asit damlatılır. 3) Tüpteki karışımda bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Safrada bulunan müsin, mukopolisakkarid yapısındadır; asetik asit etkisiyle denatüre olarak çöker. Gözlenen bulanıklık, çöken müsinin ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Asetik asidin fazla damlatılması durumunda safra asitleri de çökerler ve daha koyu bulanıklık gözlenir.

#### 10.2.2. Pettenkofer yöntemi ile safra asitlerini tanımlama deneyi

**Prencip:** Pentozların su kaybetmesiyle oluşan furfural ve heksozların su kaybetmesiyle oluşan 5-hidroksimetil furfural, safra asitleriyle kırmızı renk kompleksi oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Safra. 2) %5'lik glukoz çözeltisi. 3) Konsantre  $H_2SO_4$  4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL safra konur. 2) Tüpteki safra 4 mL distile su ile seyreltilir. 3) Seyreltilmiş safra üzerine 1 mL %5'lik glukoz çözeltisi eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki karışım üzerine 4 mL konsantre  $H_2SO_4$  tabakalandırılır. 5) Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde kırmızı halka oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Konsantre  $H_2SO_4$  glukozdan su çekerek onu dehidre eder ve 5-hidroksimetil furfural oluşturur. 5-hidroksimetil furfural da safra asitleri ile tepkimeye girer ve kırmızı renkli bir kompleks oluştururlar. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen kırmızı renkli halka, oluşan renk kompleksinden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney glukoz çözeltisi yerine bir başka heksoz veya pentoz çözeltisi ile yapılsaydı; gene tüpte temas yerinde kırmızı halka gözlenirdi. Çünkü konsantre  $H_2SO_4$ , bütün monosakkaridlerden su çekerek onları dehidre eder; pentozlardan furfural oluşur, heksozlardan da 5-hidroksimetil furfural oluşturur. Furfural ve 5-hidroksimetil furfural da safra asitleri ile tepkimeye girerler ve kırmızı renkli bir kompleks oluştururlar.

Monosakkaridlerin tanımlanması deneylerinden Molisch deneyinde  $\alpha$ -naftol ile furfural ve 5-hidroksimetil furfuralin mor renkli trifenil metan oluşturduğunu; Bialin orcin deneyinde orcin ile furfuralin mavi renk oluşturduğunu, 5-hidroksimetil furfuralin ise sarı-kahverengi renk oluşturduğunu; anilin asetat deneyinde anilin asetat ile furfuralin koyu kırmızı renk maddesi oluşturduğunu, 5-hidroksimetil furfuralin ise renk oluşturmadığını; Seliwanoff deneyinde rezorcin ile furfuralin mavi-yeşil renkli bir kompleks oluşturduğunu, 5-hidroksimetil furfuralin ise kırmızı renkli bir kompleks oluşturduğunu, fruktoz gibi ketoheksozlarla koyu kırmızı renk, glukoz gibi aldoheksozlarla ise açık kırmızı renk oluşturduğunu hatırlayınız.

### 10.2.3. Hay deneyi ile safra asitlerini tanımlama deneyi

**Prensip:** Safra asitlerinin sıvıların yüzey gerilimini azaltıcı etkisi vardır.

**Gerekenler:** 1) Safra. 2) Su. 3) Kükürt tozu. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün yarısına kadar su doldurulur. 2) Tüpteki su üzerine bir miktar kükürt tozu serpilir; kükürt tozlarının suyun dibine batmayıp yüzeyde yüzdüğü gözlenir. 3) Tüpteki, yüzeyinde kükürt tozları yüzen suya 1-2 damla safra damlatılır; yüzeydeki kükürt tozlarının dibine çöktüğü gözlenir.

**Açıklama:** Su yüzeyindeki su molekülleri, suyun üzerindeki hava moleküllerinden daha büyük bir kuvvetle suyun merkezine doğru çekilirler ve sonuçta su yüzeyindeki moleküllerin daha sık bulunmalarından dolayı su yüzeyinde ince ve elastiki bir zar oluşur. Bir sıvı yüzeyinde bir zar oluşturan ve bu zarı yırtılmaya karşı koruyan etki, *yüzey gerilim* olarak tanımlanır. Yüzey gerilim etkisiyle su yüzeyinde oluşan ve yırtılmaya karşı korunan zar nedeniyle de su yüzeyine dikkatle bırakılan kükürt tozları batmadan su yüzeyinde kalabilirler.

Su içinde bazı maddelerin çözünmüş olması, suyun yüzey gerilimini değiştirir; yüzey geriliminin azaldığı durumlarda su yüzeyindeki zar kolay yırtılır. Deneyde suya damlatılan safrada bulunan safra tuzları, yüzey gerilimi küçültürler ve bu nedenle su yüzeyindeki zar yırtılır; sonuçta kükürt tozları suyun dibine inerler.

### 10.2.4. Gmelin yöntemi ile bilirubini tanımlama deneyi

**Prensip:** Bilirubin, nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur; biliverdinden de biliverdin oksidasyon ürünleri oluşur.

**Gerekenler:** 1) Bilirubinli sıvı. 2) Konsantre  $HNO_3$  3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL konsantre  $HNO_3$  konur. 2) Tüpteki konsantre  $HNO_3$  üzerine 2 mL bilirubinli sıvı tabakalandırılır. 3) Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Deneyde önce bilirubin, nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur; daha sonra biliverdin de oksitlenerek biliverdin oksidasyon ürünleri oluşur. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, oluşan biliverdinden ileri gelmektedir; diğer renkler de biliverdin oksidasyon ürünlerinden ileri gelmektedir.

### 10.2.5. Rosin yöntemi ile bilirubini tanımlama deneyi

**Prensip:** Bilirubin, iyot ile yeşil renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Bilirubinli sıvı. 2) Rosin reaktifi: %1'lik iyot-alkol çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL bilirubinli sıvı konur. 2) Tüpteki bilirubinli sıvı üzerine 2 mL Rosin reaktifi tabakalandırılır. 3) Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Deneyde bilirubin, ya iyot ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur ya da iyot ile bilirubinin birleşmesi sonucu yeşil renkli bir madde oluşmaktadır. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, biliverdinden ya da oluşan yeşil renkli iyot-bilirubin bileşiğinden ileri gelmektedir.

#### **10.2.6. Diazo reaksiyonu (Van den Bergh reaksiyonu) ile bilirubini tanımlama deneyi**

**Prensip:** Bilirubin, diazo reaktifi ile kırmızı renkli azobilirubin bileşiği oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Bilirubinli sıvı. 2) Diazo A çözeltisi: 1 g sülfanilik asit ve 15 mL konsantre HCl, volüm 1000 mL'ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülür. 3) Diazo B çözeltisi: %0,5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisi. 4) Taze diazo reaktifi: 5 mL Diazo A çözeltisi ile 1 mL Diazo B çözeltisi karıştırılarak hazırlanır. 5) Pipet 6) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL bilirubinli sıvı konur. 2) Tüpteki bilirubinli sıvı üzerine 1-2 mL taze diazo reaktifi eklenerek karıştırılır. 3) Tüpteki karışımın kırmızı renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** Taze diazo reaktifinin hazırlanması sırasında, önce diazo A çözeltisindeki HCl ile diazo B çözeltisindeki NaNO<sub>2</sub>'ten HNO<sub>2</sub> ve NaCl oluşur. Daha sonra HNO<sub>2</sub> ile sülfanilik asitten de diazobenzosülfonik asit oluşur. Taze diazo reaktifi, diazobenzosülfonik asit içermektedir. Deney sırasında, taze diazo reaktifindeki diazobenzosülfonik asit ile bilirubin arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli azobilirubin bileşiği oluşur. Gözlenen kırmızı renk, oluşan azobilirubin bileşiğinden ileri gelmektedir.

## 11. İDRARIN FİZİKSEL BAKISI

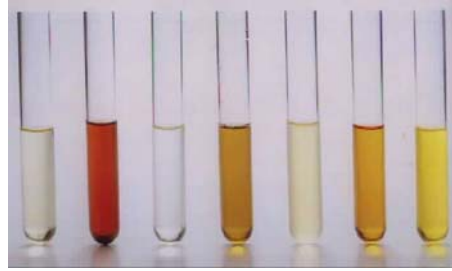
### 11.1. İdrarın Fiziksel Özellikleri

İdrar, böbreklerde oluşan ve idrar yolları ile atılan sıvıdır. İdrarın rengi, 24 saatlik volümü, transparan özelliği, kokusu, kıvamı, dansitesi, pH'ı gibi fiziksel özellikleri, çeşitli patolojik durumlarda değişebilmekte ve bunların incelenmesi, patolojik durumların saptanmasında yararlı olmaktadır.

### 11.2. İdrarın Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi

#### 11.2.1. İdrarın renginin incelenmesi

İdrarın rengi, örnek temiz ve renksiz bir cam kaba konduktan sonra gözle incelenir.



**İdrarın normal rengi**, amber sarısıdır; bu renk, idrarda bulunan, ürokrom denen ve yapısı tam olarak bilinmeyen maddelerden ileri gelir.

**Çok açık sarı, yeşilimsi sarı veya renksiz idrar**; kronik interstisyel nefritte, diyabetes mellitusta, diyabetes insipitusta, demir metabolizması bozukluğunda ve anemilerde görülebilir.

**Sarı idrar**; ürobilinojen ve ürobilin artışında, bazı ilaçların alınması ve havuç yenmesi durumlarında görülür.

**Çay rengi idrar**; hepatitlerde idrarda bilirubin bulunması durumunda görülür, idrar çalkalanınca iki dakikadan uzun süre kalan sarı-yeşil renkli köpük oluşur.

**Yeşil idrar**; idrar yolları antiseptiği olarak metilen mavisi kullanılmasında, indikan fazlalığında, idrarda bilirubin bulunmasında, Psödomonas aeruginosa gibi bakterilerin varlığında görülür.

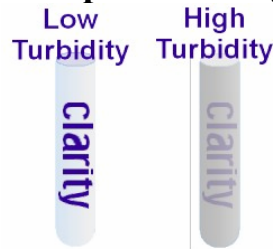
**Kırmızı idrar**; hematüri ve hemoglobüri durumlarında, bazı ilaçların ve kırmızı pancar gibi yiyeceklerin alınması durumlarında görülür.

**Pembe-kahverengi idrar**; porfiriyalarda görülür.

**Siyah idrar**; melanin bulunması durumunda, indikan artışında görülür. Alkaptonüride idrar beklemekle siyahlaşır.

**Süt görünümü idrar**; fosfat ve ürat artışında, idrarda yağ ve prostatik sekresyon bulunması durumunda görülür.

#### 11.2.2. İdrarın türbiditesinin (transparan özelliğinin) incelenmesi



Taze ve hafif asit olan idrar normalde berraktır; üreme organlarından karışan salgularla mesane ve idrar yolları duvarının yüzeylerinden karışan çok az miktarda musin türünden bazı maddeler, durmakla sigara dumanı dalgaları şeklinde ayrılabilir ve dibe doğru inerek *nubekula* denen çökelti oluştururlar.

**İdrarda bulanıklık**, üratlar, fosfatlar, okzalatlardan, hücresel elemanlar ve bakterilerden ileri gelebilir.

**Üratlardan ileri gelen bulanıklık**, soğukta oluşur; ısıtma ve asetik asit etkisiyle kaybolur.

**Fosfatlardan ileri gelen bulanıklık**, alkali idrarda oluşur; ısıtma ile belirginleşir, asetik asit etkisiyle kaybolur.

**Okzalatlardan ileri gelen bulanıklık**, hafif asit ve hafif alkali idrarda oluşur; asetik asit etkisiyle kaybolmaz, HCl etkisiyle kaybolur.

**Dejenere olmuş lökosit gibi iltihap cisimciklerinden ileri gelen bulanıklık**, idrara %10'luk NaOH çözeltisi damlatıldığında jelatinsel bir saydamlığa dönüşür.

**Bakterilerden ileri gelen bulanıklık**, ısıtma, asitlendirme ve alkalileştirme ile kaybolmaz.

### 11.2.3. İdrarın kokusunun incelenmesi



Her idrar kendine has özel bir kokuya sahiptir; idrarın kokusu, alınan ve idrarla atılan ilaçlardan etkilenebilir.

**Meyve esansı veya asetonlu gibi kokan idrar**; asitoz, ketoz ve ileri derecede diyabetes mellitusta olabilir.

**Amonyak kokusu**; beklemiş ve kokuşmuş idrarda olabilir.

**Sıçan gibi kokan idrar**; fenil ketonüride olabilir.

**Karamela gibi kokan idrar**; akçaağaç şurubu idrar hastalığında olabilir.

### 11.2.4. İdrarın kıvamının incelenmesi



İdrar, normalde akıcıdır ve çalkalamakla oluşan köpük çabuk kaybolur.

İltihaplı, albuminli, kanlı idrarlarda çalkalamakla oluşan köpük çabuk kaybolmaz.

### 11.2.5. İdrarın volümünün incelenmesi

İdrar volümü, dereceli silindir (mezür) ile ölçülür.



24 saatte çıkarılan idrar miktarı ortalama olarak erkeklerde 1500 mL, kadınlarda 1200 mL kadardır. Alınan su miktarı, böbrek dışı yollardan su kaybı ve diyet, günlük idrar miktarını etkiler; proteinden zengin beslenmede ürenin diüretik etkisi nedeniyle idrar miktarı artar.

24 saatlik idrar miktarının devamlı olarak 400 mL'den az olması **oligüri** olarak tanımlanır; 50 mL'den az olması **anüri** olarak tanımlanır; 2000 mL'den fazla olması **poliüri** olarak tanımlanır.

**Oligüri;** akut renal yetmezlikte, obstrüktif üropatilerde, kronik renal yetmezliğin preterminal ve terminal döneminde, akut glomerülonefritte, yanıklarda, ağır dehidratasyonda, travmatik şokta, birçok ameliyattan sonra görülen aşağı nefroz sendromunda görülür.

**Poliüri;** diyabetes mellitusta, diyabetes insipitusta, kronik renal yetmezliğin başlangıç döneminde görülür.

### 11.2.6. İdrarın dansitesinin incelenmesi

İdrarın dansitesi (spesifik gravidite), ürinometre, özel elektronik cihazlar ve idrar stripleriyle ölçülür.



İdrarın dansitesi, yetişkin insanlarda normalde 1015-1025 arasında değişir; alınan su miktarına bağlı olarak 1002'ye kadar düşebilir veya 1040'a kadar yükselebilir.

İdrar dansitesinin devamlı olarak 1007'den düşük olması **hipostenüri** olarak tanımlanır; 1010 civarında olması **izostenüri** olarak tanımlanır; 1030'dan yüksek olması **hiperstenüri** olarak tanımlanır.



**Hipostenüri;** normalde idrar ile atılan maddelerin atılmadığı böbrek hastalıklarında ve diyabetes insipitusta görülür.

**İzostenüri;** kronik glomerülonefritin terminal döneminde görülür.

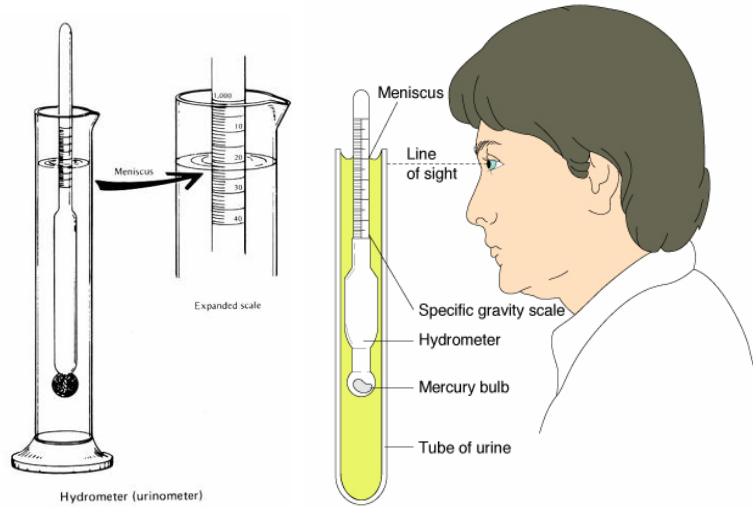
**Hiperstenüri;** diyabetes mellitusta ve dehidratasyonda görülür.

### 11.2.6.1 Ürinometre ile idrar dansitesinin ölçülmesi

**Prensip:** İdrar, dansitesine göre içine bırakılan ürinometreye kaldırma kuvveti uygular.

**Gerekenler:** 1) Ürinometre 2) 100 mL'lik dereceli silindir.

**Uygulama:** 1) İdrar, dereceli silindire, üstte uygun bir boşluk kalacak şekilde konur. 2) İdrar üzerindeki köpük bir filtre kağıdı ile alınır. 3) Ürinometre, dereceli silindirdeki idrar içine, dibe ve kenarlara değmeden yüzecek şekilde bırakılır. 4) Ürinometrenin skalasından, sıvı yüzeyinin ürinometreyi kestiği yerdeki sayı, idrar dansitesi olarak okunur.



**Açıklama:** İdrar içine bırakılan ürinometreye, idrarın dansitesine göre değişen kaldırma kuvveti uygulanır. Ürinometre, bu kaldırma kuvveti ve ağırlığının etkisiyle idrar içinde belli bir derecede batarak yüzer. Ürinometrenin ağırlığı sabit olduğundan, idrar içine batma derecesi, idrarın dansitesinin ölçüsü olmaktadır. Bu da ürinometrenin üzerindeki skaladan okunabilmektedir.

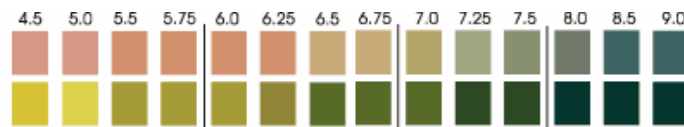
**Tartışma:** Ürinometrenin skalası, 15°C'deki değişik dansiteli sıvılar kullanılarak bölmelenmiştir. 15°C'ın üzerindeki sıcaklıklarda okunan sayıya her 3°C için 0.001 eklenir; 15°C'ın altındaki sıcaklıklarda okunan sayıdan her 3°C için 0.001 çıkarılır.

İdrar numunesinin yeterli volümde olmadığı durumlarda, 1 mL idrarın hassas terazide tartılmasıyla da idrar dansitesi ölçülebilir.

Okunan idrar dansitesinin son iki rakamının oluşturduğu sayının 0,233 ile çarpımı, % g olarak idrarda çözülmüş bulunan madde miktarını verir. İdrar dansitesini her %1 g glukoz 0.004 artırır, her %1 g protein de 0.003 artırır.

### 11.2.7 İdrarın pH'mın incelenmesi

İdrar pH'ı, pH kağıtlarıyla veya idrar stripleriyle ölçülür; turnusol kağıdı ile de incelenebilir.



### 11.2.7.1. Turnusol kağıdı ile idrar pH'nın incelenmesi

**Prensip:** Turnusol kağıdı, alkali (bazik) ortamda mavi; asit ortamda kırmızıdır.

**Gerekenler:** 1) Mavi turnusol kağıdı. 2) Kırmızı turnusol kağıdı.

**Uygulama:** 1) Bir mavi turnusol kağıdı, idrar içine daldırılır; turnusol kağıdında renk değişimi olup olmadığına bakılır ve sonuç not edilir. 2) Bir kırmızı turnusol kağıdı, idrar içine daldırılır; turnusol kağıdında renk değişimi olup olmadığına bakılır ve sonuç not edilir.

**Açıklama:** Turnusol kağıtları, rengi pH'a göre değişen ve indikatör denen maddeleri içermektedirler. Turnusol kağıtlarındaki indikatörün rengi, alkali ortamda mavidir, asit ortamda ise kırmızıdır.

İdrara daldırılan **mavi turnusol kağıdının rengi** değişmezse; idrar pH'ı 7'den büyüktür veya 7'dir; idrar, alkali veya nötrdür. Mavi turnusol kağıdının rengi kırmızıya dönüşürse, idrar pH'ı 7'den küçüktür; idrar, asidiktir.

İdrara daldırılan **kırmızı turnusol kağıdının rengi** değişmezse; idrar pH'ı 7'den küçüktür veya 7'dir; idrar, asidik veya nötrdür. Kırmızı turnusol kağıdının rengi maviye dönüşürse, idrar pH'ı 7'den büyüktür; idrar, alkalidir.

**Tartışma:** Karışık besin alan sağlıklı bir insanın idrarının pH'ı normalde 6,2 civarındadır; 4,8'e kadar inebilir veya 8,2'ye kadar çıkabilir.

Proteinden zengin beslenmede idrar pH'ı asit tarafa kayar. Meyve ve bitkisel besinlerden zengin beslenmede idrar pH'ı alkali tarafa kayar, ancak erik ve kıvılcık gibi benzoik asit içeren meyveler idrar pH'ını asit tarafa kaydırır.

NH<sub>4</sub>Cl alınması idrar pH'ını asit tarafa kaydırır; bikarbonat alınması da alkali tarafa kaydırır.

Kuvvetli hiperpne hallerinde idrar pH'ı alkali tarafa kayar; kuvvetli bir sindirim sırasında mideden fazla HCl salgılandığında da idrar alkali olur.

Kassal çalışma idrar pH'ını asit tarafa kaydırır.

Potasyum yetmezliğinde ve hiperaldosteronizmde idrar alkalidir.

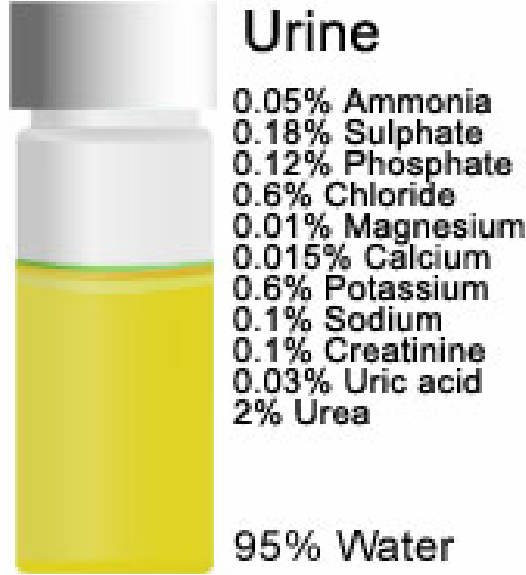
Renal yetmezlik ve renal tübüler hastalıklar gibi durumlarda ortaya çıkan renal asitozda idrar alkalidir.

Mesane ve idrar yolu iltihaplarında mikropların etkisiyle üre parçalanır ve idrar pH'ı alkali tarafa kayar.

## 12. İDRARIN KİMYASAL BAKISI

### 12.1. İdrarın Kimyasal Yapısı

Normal bir idrarın bileşimi, %95 oranında su ve geri kalanı suda çözülmüş olarak bulunan inorganik katyon ve anyonlar ile organik maddelerden oluşur.



24 saatlik idrarda bulunan inorganik maddeler 20-25 g arasında, organik maddeler ise 35-45 g arasında değişir. İdrarda bulunan organik maddeler, azotlu organik maddeler ve azotsuz organik maddeler olmak üzere iki gruptur.

## 12.2. Normal Bir İdrardaki Maddelerin Tanımlanması Deneyleri

### 12.2.1. İdrarda sülfat tanımlama deneyi

**Prensip:** İdrardaki sülfat,  $BaSO_4$  halinde çöktürülebilir.

**Gerekenler:** 1) 2N HCl 2) %10'luk  $BaCl_2$  çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur ve idrara 1-2 damla 2 N HCl damlatılır. 2) Tüpteki, asitlendirilmiş idrar üzerine 3-4 damla %10'luk  $BaCl_2$  çözeltisi damlatılır. 3) Tüpteki karışımda beyaz çökelti oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** İdrarda bulunan  $SO_4^{2-}$  iyonları,  $BaCl_2$  çözeltisindeki  $Ba^{2+}$  iyonları ile suda güç çözünen  $BaSO_4$  bileşiği oluştururlar. Gözlenen beyaz çökelti, oluşan  $BaSO_4$  bileşiğinden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deney sırasında, idrarda serbest  $SO_4^{2-}$  iyonları bağlanarak çökmüştür; sülfürik asit esterleri, ancak HCl ile kaynatma suretiyle hidroliz edildikten sonra çöktürülebilirler.

### 12.2.2. İdrarda amonyum tanımlama deneyi

**Prensip:** İdrardaki amonyum, idrarın ısıtılmasıyla  $NH_3$  şeklinde ayrılır.

**Gerekenler:** 1) %10'luk  $Na_2CO_3$  çözeltisi. 2) Kırmızı turnusol kağıdı. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar, 1 mL  $Na_2CO_3$  çözeltisi ile alkalileştirilir. 3) Su ile ıslatılmış bir kırmızı turnusol kağıdı, idrara değdirilmeden tüpün içine sarkıtılır. 4) Tüp, dikkatli bir şekilde ısıtılır; bu sırada kırmızı turnusol kağıdının renginin maviye döndüğü gözlenir.

**Açıklama:** İdrarda bulunan  $\text{NH}_4^+$  iyonları, ısıtma ile  $\text{NH}_3$  ve  $\text{H}^+$ 'e ayrışır. Açığa çıkan  $\text{NH}_3$  gazı, ıslatılmış kırmızı turnusol kağıdındaki suda çözünerek  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{OH}^-$  iyonlarını oluşturur.  $\text{OH}^-$  iyonları da ortamı alkalileştirir ve kırmızı turnusol kağıdının maviye dönüşmesine neden olur.

### 12.2.3. Üreaz ile idrarda üre tanımlama deneyi

**Preşip:** İdrardaki üre, üreaz etkisiyle  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$ 'e parçalanır.

**Gerekenler:** 1) Üreaz çözeltisi. 2) Fenolftaleyn çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL üreaz çözeltisi ve 2 mL idrar konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışıma 1-2 damla fenolftaleyn çözeltisi damlatılır. 3) Tüp,  $37^\circ\text{C}$ 'de bir süre inkübe edilir. 4) Bir süre sonra tüpteki karışımın pembe renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** İdrarda bulunan üre, üreaz etkisiyle  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$ 'e parçalanır. Açığa çıkan  $\text{NH}_3$ , suda çözünerek  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{OH}^-$  iyonlarını oluşturur.  $\text{OH}^-$  iyonları da ortamı alkalileştirir ve fenolftaleynin pembe renkli görünmesine neden olur.

### 12.2.4. Sodyum hipobromit ile idrarda üre tanımlama deneyi

**Preşip:** İdrardaki üre, sodyum hipobromit ile tepkimeye girerek sodyum bromür, su, karbondioksit ve azot gazı oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %40'lık NaOH 2) Brom. 3) Taze NaOBr çözeltisi: 1 mL %40'lık NaOH çözeltisine 2 damla brom damlatılarak hazırlanır. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 1 mL taze sodyum hipobromit çözeltisi eklenir. 3) Tüpteki karışımda gaz çıkışı gözlenir.

**Açıklama:** İdrarda bulunan üre, sodyum hipobromit ile tepkimeye girerek sodyum bromür, su, karbondioksit ve azot gazı oluşturur. Açığa çıkan  $\text{CO}_2$ , ortamda bulunan NaOH tarafından tutulur; fakat  $\text{N}_2$  gazı, sulu ortamda kabarcıklar halinde belli olur.

**Tartışma:** İdrardaki azotlu maddelerin hepsi sodyum hipobromit ile tepkimeye girerek  $\text{N}_2$  gazı oluştururlar; fakat üre dışındaki maddelerin oluşturduğu azot, total azotun ancak %16'sı kadardır.

### 12.2.5. Jaffé yöntemi ile idrarda kreatinin tanımlama deneyi

**Preşip:** İdrardaki kreatinin, alkali ortamda pikrik asit ile sarı-kırmızı renkli madde oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Doymuş pikrik asit. 2) %10'lık NaOH 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 2 mL doymuş pikrik asit ve 2 mL %10'luk NaOH eklenip karıştırılır. 3) Tüpteki karışımın kırmızı-turuncu renk aldığı gözlenir.

**Açıklama:** İdrarda bulunan kreatinin, alkali ortamda pikrik asit üzerine indirgeyici etki gösterir; pikrik asidin nitro grubunu amino grubuna çevirerek sarı-kırmızı renkli pikramik asit oluşturur. Pikramik asit de NaOH ile birleşerek kırmızı renkte pikramik asit-sodyum tuzu oluşur ve renk koyulaşır. Kreatininin pikrik asit ile bir kondensasyon ürünü oluşturması da olasıdır.

### 12.2.6. Weyl yöntemi ile idrarda kreatinin tanımlama deneyi

**Preşip:** Kreatinin, alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kırmızı renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %5'lik taze sodyum nitroprussiyat çözeltisi. 2) %10'luk NaOH çözeltisi. 3) Asetik asit. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 10 mL idrar, 1 mL sodyum nitroprussiyat çözeltisi ve 2 mL %10'luk NaOH çözeltisi konarak karıştırılır. Tüpteki karışımın koyu kırmızı renk aldığı gözlenir. 2) Tüpteki kırmızı renkli karışıma 2 mL asetik asit eklenip karıştırılır; karışımın renginin kaybolduğu gözlenir.

**Açıklama:** İdrardaki kreatinin alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kırmızı renkli bir bileşik oluşturur. İdrarda aseton bulunmadığı durumlarda kreatinin ile sodyum nitroprussiyatın oluşturduğu kırmızı renkli bileşik, asetik asit etkisiyle parçalanır ve kırmızı renk kaybolur.

**Tartışma:** İdrarda aseton varlığında önce alkali ortamda aseton ve sodyum nitroprussiyat arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli izonitro aseton bileşiği oluşur. Daha sonra izonitro aseton ile asetik asit arasındaki tepkime sonucunda mor renkli bir kompleks oluşur.

### 12.2.7. İdrarda klorür tanımlama deneyi

**Prensip:** Klorür, asidik ortamda gümüş nitrat ile suda çözünmeyen gümüş klorür oluşturur.

**Gerekenler:** 1) 0,1 N AgNO<sub>3</sub> 2) Konsantre HNO<sub>3</sub> 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur ve 1-2 damla konsantre HNO<sub>3</sub> damlatılır. 2) Tüpteki asitlendirilmiş idrar üzerine şiddetli bir beyaz bulanıklık gözleninceye kadar 0,1 N AgNO<sub>3</sub> eklenip karıştırılır.

**Açıklama:** İdrardaki klorür, asidik ortamda gümüş nitrat ile suda çözünmeyen gümüş klorür oluşturur.

## 12.3. İdrarda Patolojik Maddelerin Aranması Deneyleri

Sodyum, potasyum, kalsiyum, kreatinin, ürik asit gibi normalde idrarda bulunan bazı maddeler, bazı patolojik durumlarda idrarda artabilirler; bazı patolojik durumlarda da azalabilirler.

İdrarda bakteri bulunması durumlarında nitrit saptanabilir.

Bazı patolojik durumlarda, normalde idrarda saptanamayan protein, amino asitler, porfirinler, hemoglobin, bilirubin gibi *azotlu organik maddeler*; glukoz, laktoz, pentozlar, keton cisimleri gibi *azotsuz organik maddeler*; diazo cisimleri gibi *bileşimi tam olarak bilinmeyen maddeler* saptanabilir.

İdrarda patolojik maddelerin aranması ve saptanması, mevcut patolojinin tanısı açısından oldukça yararlıdır.

### 12.3.1. Fehling yöntemi ile idrarda şeker arama deneyi

**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren şekerler, indirgeyici özellikleriyle Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>'e indirgerler.

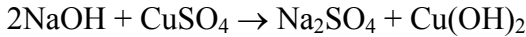
**Gerekenler:** 1) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O ve 5 mL konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 1 mL Fehling A ve 1 mL Fehling B çözeltisi konup karıştırılarak *taze Fehling reaktifi* hazırlanır. 2) Bir başka deney tüpüne 2 mL idrar konur. 3) Taze Fehling reaktifi olan tüp ile idrar olan tüp beraberce kaynatılmadan ısıtılır; bu sırada taze Fehling reaktifinde renk değişimi olması reaktifin bozulduğunu gösterir; bu reaktif deneyde kullanılmamalıdır. 4) Birinci tüpteki ısıtılmış taze Fehling reaktifi üzerine ikinci tüpteki ısıtılmış idrar yavaş yavaş eklenir ve birinci tüpü ısıtmaya devam edilir; iki dakika daha ısıtmadan sonra tüp soğumaya bırakılır. 5) Isıtılan son karışımda renk değişimi ve çökelti olup

olmadığına bakılır ve gözlenenler not edilir. 6) Isıtılan son karışımda gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Fehling reaktifi ve idrarı karıştırdıktan hemen sonra sarı-kırmızı çökelti oluştuysa idrarda şeker (++++)'dir; 10-15 saniye sonra sarı-kırmızı çökelti oluştuysa idrarda şeker (+++)'dir; 1 dakika sonra sarı-kırmızı çökelti oluştuysa idrarda şeker (++)'dir; karışım soğuduktan sonra sarı-kırmızı çökelti oluştuysa idrarda şeker (+)'dir; sarı-kırmızı çökelti oluşması gözlenmezse idrarda şeker (-)'dir.

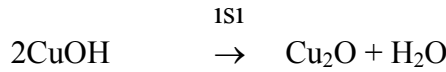
**Açıklama:** Seignette tuzu,  $\text{Cu(OH)}_2$ 'i çözünür hale getirerek indirgeyici şeker ile daha kolay tepkimeye girmesini sağlar;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de Fehling A'daki  $\text{CuSO}_4$ 'ın bozulmasını önler. İdrarda indirgeyici bir şeker bulunması durumunda; önce taze Fehling reaktifi hazırlama sırasında  $\text{NaOH}$  ile  $\text{CuSO}_4$  arasında tepkime olur ve  $\text{Cu(OH)}_2$  oluşur.



Daha sonra, indirgeyici şekerin serbest yarı asetal hidroksili ile  $\text{Cu(OH)}_2$  arasında tepkime olur; indirgeyici şeker,  $\text{Cu(OH)}_2$ 'i  $\text{CuOH}$  haline indirger.

Oluşan  $\text{CuOH}$ , suda çözünmez ve sarı renkli çökelti halinde çöker.

Isıtma sırasında;  $\text{CuOH}$ , su kaybederek  $\text{Cu}_2\text{O}$  haline dönüşür.



Oluşan  $\text{Cu}_2\text{O}$ , suda çözünmez ve kırmızı renkli çökelti halinde çöker.

Tüpteki çökelti, içerdiği  $\text{CuOH}$  ve  $\text{Cu}_2\text{O}$  miktarlarına, bir bakıma da indirgenen bakır miktarına ve dolayısıyla idrardaki indirgeyici şeker konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte olur.

**Tartışma:** Deney sırasında sarı-yeşil çökelti oluştuğu gözlenirse, idrarda şeker varlığı şüphelidir; bu durumda 9 mL idrar 1 mL Courtonne reaktifi (300 g kurşun asetat 500 mL distile suda çözülür; asetik asit damlatılarak çözelti nötrleştirilir; daha sonra volüm, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır) ile karıştırılıp sonra süzülerek idrar, deneyi bozucu maddelerden arındırılır ve Fehling deneyi süzüntü ile tekrarlanır.

İdrarda serbest yarı asetal hidroksili içermeyen bir şeker varlığında,  $\text{Cu}^{2+}$  indirgenemez; Fehling testi (-) sonuç verir.

İdrardaki glukuronatlar, ürik asit, kreatinin, nükleoproteinler ve homogentizik asit, mentol, timol, antipirin, fenol de Fehling (+) sonuca neden olabilirler. Kreatinin,  $\text{Cu}_2\text{O}$  ile kompleksleşerek yalancı (-) sonuca da neden olabilir.

İdrardaki fosfatlar, Fehling reaktifindeki alkali ile kirli beyaz çökelti oluştururlar.

### 12.3.2. Benedict yöntemi ile idrarda şeker arama deneyi

**Prencip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren şekerler, indirgeyici özellikleriyle  $\text{Cu}^{2+}$ 'ı  $\text{Cu}^+$ 'e indirgerler.

**Gerekenler:** 1) Benedict reaktifi: 173 g sodyum sitrat ve 100 g susuz  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 700-800 mL distile suda çözülür; bu karışıma 17,3 g kristalize  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ 'ün 100 mL distile sudaki çözeltisi yavaş yavaş eklenir ve karıştırılır; volüm, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır. 2) Pipet 3) Deney tüpleri. 4) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL Benedict reaktifi konur ve bunun üzerine 0,5 mL idrar eklenir. 2) Tüp, kuvvetli bir alev üzerinde 1-2 dakika kaynatılır; daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. 3) Soğuyan tüpteki karışımda renk değişimi ve çökelti olup olmadığına bakılır ve gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Kırmızı renkli bir çökelti oluştuysa idrarda şeker (++++)'dir; turuncu renkli bir çökelti oluştuysa idrarda şeker (++++)'dir; sarı renkli bir çökelti oluştuysa idrarda şeker (++)'dir; açık yeşil renkli bir çökelti oluştuysa idrarda şeker (+)'dir; çökelti oluşması gözlenmezse idrarda şeker (-)'dir.

**Açıklama:** İdrarda indirgeyici bir şeker bulunması durumunda; Benedict reaktifindeki  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CuOH}$  ve  $\text{Cu}_2\text{O}$  haline indirgenir. Oluşan  $\text{CuOH}$ , suda çözünmez ve sarı renkli çökelti halinde çöker. Oluşan  $\text{Cu}_2\text{O}$  da suda çözünmez ve kırmızı renkli çökelti halinde çöker.

Tüpteki çökelti, içerdiği  $\text{CuOH}$  ve  $\text{Cu}_2\text{O}$  miktarlarına, bir bakıma da indirgenen bakır miktarına ve dolayısıyla idrardaki indirgeyici şeker konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan kırmızıya kadar değişen renkte olur.

**Tartışma:** İdrarda serbest yarı asetal hidroksili içermeyen bir şeker varlığında,  $\text{Cu}^{2+}$  indirgenemez; Benedict testi (–) sonuç verir.

### 12.3.3. Causse Bonnans yöntemi ile idrarda kantitatif şeker tayini

**Prensip:** Serbest yarı asetal hidroksili içeren şekerler, indirgeyici özellikleriyle  $\text{Cu}^{2+}$ 'ı  $\text{Cu}^{+}$ 'e indirgerler.

**Gerekenler:** 1) %1'lik glukoz çözeltisi. 2) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 5 mL konsantr  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 4) Taze Fehling reaktifi: Eşit miktarlarda Fehling A ve Fehling B çözeltileri karıştırılarak hazırlanır. 5) %10'luk Potasyum ferro siyanür çözeltisi. 6) Erlene. 7) Pipet 8) Sacayak 9) Amyant tel kafes 10) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir erlene 5 mL Fehling A ve 5 mL Fehling B çözeltisi konup karıştırılarak taze Fehling reaktifi hazırlanır. 2) Erlendeki Fehling reaktifi üzerine 2,5 mL %10'luk potasyum ferro siyanür çözeltisi eklenip karıştırılır. 3) Erlendeki karışım kaynatılır; kaynama sırasında ölçülü pipetle damla damla %1'lik glukoz çözeltisi damlatılır ve karıştırılır. Böylece, sarıya dönen karışımda esmer bir renk oluşumu gözleninceye kadar titrasyon yapılır. Titrasyon sırasında harcanan %1'lik glukoz çözeltisinin volümü hesaplanır; bu, yaklaşık 2,1 mL kadardır. Buna göre 10 mL Fehling reaktifini indirgemek için  $\frac{2,1 \times 1}{100} = 0,021$  g glukoz kullanıldığı hesaplanır. 4) İlk üç basamaktaki işlemler, %1'lik glukoz çözeltisi yerine idrar kullanılarak tekrarlanır ve kullanılan idrar volümü (v) bulunur; bu volümdeki idrarda 0,021 g glukozu denk indirgeyici şeker olduğu bilgisine göre de orantı kurularak 100 mL idrarda kaç gram indirgeyici şeker olduğu veya idrarda % g cinsinden şeker miktarı saptanmış olur.

**Açıklama:** İdrarda indirgeyici bir şeker bulunması durumunda; indirgeyici şeker, Fehling reaktifindeki  $\text{Cu}^{2+}$ 'ı indirger.

### 12.3.4. Sülfosalisilik asit ile idrarda protein arama deneyi

**Prensip:** Proteinlerdeki serbest bazik gruplar ile sülfosalisilik asit, suda çözünmeyen bileşik oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %20'lik sülfosalisilik asit. 2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. 2) Deney tüpündeki berrak idrar üzerine %20'lik sülfosalisilik asit çözeltisinden damla damla eklenir; bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. 3) İdrar üzerine %20'lik sülfosalisilik asit damlatıldıktan sonra gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (–)'dir; ancak siyah bir zemin üzerinde görülebilen bir bulanıklık oluşursa idrarda protein (hafif eser)'dir; belirgin bulanıklık oluşur fakat granülasyon ve flokulasyon oluşmazsa idrarda protein (+)'dir; yoğun bulanıklıkla birlikte granülasyon oluşup flokulasyon oluşmazsa idrarda protein (++)'dir; çok yoğun bulanıklıkla birlikte belirgin flokulasyon da oluşursa idrarda protein (++++)'dir; çok fazla yoğun bulanıklıkla birlikte çok fazla flokulasyon oluşursa idrarda protein (++++)'dir.



**Açıklama:** İdrarda protein olması durumunda proteinlerin serbest amino grupları sülfosalisilik asit ile bağlanır ve suda çözünmeyen protein-sülfosalisilat bileşiği oluşur. Gözlenen bulanıklık, granülasyon ve flokulasyon, oluşan protein-sülfosalisilat bileşiğinden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Protein aranacak idrar, berrak olmalıdır; mavi turnusol kağıdını hafifçe kırmızılaştıracak kadar asidik olmalıdır; yeteri kadar tuz içermelidir; dansitesi 1010'dan küçük olmamalı, çok da yüksek olmamalıdır.

### 12.3.5. %20'lik triklorasetik asit (TCA) ile idrarda protein arama deneyi

**Prencip:** Proteinlerdeki katyonlar ile TCA anyonları, suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %20'lik TCA 2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. 2) Deney tüpündeki berrak idrar üzerine %20'lik TCA damla damla eklenir; bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. 3) İdrar üzerine %20'lik TCA damlatıldıktan sonra gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir; ancak siyah bir zemin üzerinde görülebilen bir bulanıklık oluşursa idrarda protein (hafif eser)'dir; belirgin bulanıklık oluşur fakat granülasyon ve flokulasyon oluşmazsa idrarda protein (+)'dir; yoğun bulanıklıkla birlikte granülasyon oluşup flokulasyon oluşmazsa idrarda protein (++)'dir; çok yoğun bulanıklıkla birlikte belirgin flokulasyon da oluşursa idrarda protein (++++)'dir; çok fazla yoğun bulanıklıkla birlikte çok fazla flokulasyon oluşursa idrarda protein (++++)'dir.

**Açıklama:** Proteinlerdeki katyonlar ile TCA anyonları, suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar. Gözlenen bulanıklık, granülasyon ve flokulasyon, oluşan suda çözünmeyen tuzlardan ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Protein aranacak idrar, berrak olmalıdır; mavi turnusol kağıdını hafifçe kırmızılaştıracak kadar asidik olmalıdır; yeteri kadar tuz içermelidir; dansitesi 1010'dan küçük olmamalı, çok da yüksek olmamalıdır.

### 12.3.6. Kaynatma-asetik asit yöntemi ile idrarda protein arama deneyi

**Prencip:** Isı, proteinleri denatüre ederek çözünürlüklerinin azalmasına neden olur; asetik asit de proteinlerin denatürasyonunu artırır, fakat suda çözünmeyen kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonatı suda çözünen şekillere dönüştürür.

**Gerekenler:** 1) %3'lük asetik asit. 2) Pipet 3) Deney tüpleri. 4) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. 2) Deney tüpündeki berrak idrar üstten ısıtılır; bu sırada ısıtılan kısımda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. 3) Isıtılan bölgede bulanıklık gözlenirse idrara 1-2 damla %3'lük asetik asit damlatılır; bulanıklığın değişimi gözlenir. 4) Isıtma ve asetik asit damlatma sonucunda gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Isıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir. Isıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık oluşur ve asetik asit damlatma ile bulanıklık artarsa idrarda protein (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarı ısıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık oluşması, proteinlerin ısı etkisiyle denatüre olmasından veya fosfat ve karbonatların suda çözünmeyen şekillere dönüşmesinden ileri gelebilir. Asetik asit damlatma ile proteinlerin denatürasyonu ve dolayısıyla bulanıklık artar; suda çözünmeyen fosfat ve karbonatlar ise yeniden suda çözünen şekillere dönüşürler. Bu nedenle ısıtma sonucunda fosfat ve karbonatlardan ileri gelen bulanıklık, asetik asit damlatma ile kaybolur.

**Tartışma:** Protein aranacak idrar, berrak olmalıdır; mavi turnusol kağıdını hafifçe kırmızılaştıracak kadar asidik olmalıdır; yeteri kadar tuz içermelidir; dansitesi 1010'dan küçük olmamalı, çok da yüksek olmamalıdır.

### 12.3.7. Tanret deneyi ile idrarda protein arama deneyi

**Prensip:** Isı, proteinleri denatüre ederek çözünürlüklerinin azalmasına neden olur; Tanret reaktifi de proteinlerin denatürasyonunu artırır, fakat suda çözünmeyen kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonatı suda çözünen şekillere dönüştürür.

**Gerekenler:** 1) Tanret reaktifi: 36 g KI ve 13,55 g HgCl<sub>2</sub> bir miktar distile suda çözüldükten sonra volüm 1000 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltinin 100 mL'si 20 mL glasiyal asetik asit ile karıştırılarak kullanılır. 2) Pipet 3) Deney tüpleri. 4) Bunzen beki alevi

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. 2) Deney tüpündeki berrak idrar üstten ısıtılır; bu sırada ısıtılan kısımda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. 3) Isıtılan bölgede bulanıklık gözlenirse idrara 1-2 damla Tanret reaktifi damlatılır; bulanıklığın değişimi gözlenir. 4) Isıtma ve Tanret reaktifi damlatma sonucunda gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Isıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir. Isıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık oluşur ve Tanret reaktifi damlatma ile bulanıklık artarsa idrarda protein (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarı ısıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık oluşması, proteinlerin ısı etkisiyle denatüre olmasından veya fosfat ve karbonatların suda çözünmeyen şekillere dönüşmesinden ileri gelebilir. Tanret reaktifi damlatma ile proteinlerin denatürasyonu ve dolayısıyla bulanıklık artar; suda çözünmeyen fosfat ve karbonatlar ise yeniden suda çözünen şekillere dönüşürler. Bu nedenle ısıtma sonucunda fosfat ve karbonatlardan ileri gelen bulanıklık, asetik asit damlatma ile kaybolur.

**Tartışma:** Protein aranacak idrar, berrak olmalıdır; mavi turnusol kağıdını hafifçe kırmızılaştıracak kadar asidik olmalıdır; yeteri kadar tuz içermelidir; dansitesi 1010'dan küçük olmamalı, çok da yüksek olmamalıdır.

### 12.3.8. Heller deneyi ile idrarda protein arama deneyi

**Prensip:** Proteinler nitrik asit ile denatüre olurlar; çözünürlükleri azalır.

**Gerekenler:** 1) Konsantre HNO<sub>3</sub> 2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney 2 mL konsantre HNO<sub>3</sub> konur. 2) Deney tüpündeki konsantre HNO<sub>3</sub> üzerine 2 mL idrar tabakalandırılır; tabakaların temas yerinde beyaz bir halka oluşup oluşmadığına bakılır. 3) İdrar ve konsantre HNO<sub>3</sub> tabakalarının temas yerinde beyaz bir halka oluşup oluşmadığına göre sonuç rapor edilir:

Beyaz bir halka oluşumu gözlenmezse idrarda protein (-)'dir. Beyaz bir halka oluşumu gözlenirse idrarda protein (+)'dir.

**Açıklama:** Proteinler nitrik asit ile denatüre olurlar; çözünürlükleri azalır. İdrar ve konsantre HNO<sub>3</sub> tabakalarının temas yerinde gözlenen beyaz halka, denatüre olan proteinlerden ileri gelmektedir.

**Tartışma:** İdrardaki üre ve ürik asit de HNO<sub>3</sub> ile beyaz renkli bileşikler oluşturabilirler. Üre-nitrat bileşikleri nedeniyle oluşan beyaz halka parlak kristalli gözükür. Ürik asit-nitrat bileşikleri halka oluşturmaz; idrarın her tarafında dağınık bulanıklık oluşturur ve bu bulanıklık idrarın ısıtılmasıyla kaybolur.

### 12.3.9. Modifiye Purdy metodu ile idrarda kantitatif protein tayini

**Prensip:** Proteinlerdeki katyonlar ile TCA anyonları, suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) %20'lik TCA 2) Pipet 3) 15 mL'lik konik ve derecelenmiş santrifüj tüpü. 4) Santrifüj cihazı.

**Uygulama:** 1) 15 mL'lik konik ve dereceli bir santrifüj tüpüne, 10 mL çizgisine kadar berrak idrar konur. 2) Santrifüj tüpündeki berrak idrar üzerine, 15 mL çizgisine kadar %20'lik TCA eklenir; idrarda protein varsa bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık ve çökelti oluşur. 3) Tüp alt-üst edilir ve 5 dakika beklenir. Daha sonra idrar tüpü, yaklaşık dakikada 1500 devirli bir santrifüje bir başka tüple dengelenerek konur ve 5 dakika santrifüj edilir. 4) Dereceli konik tüpteki çökeltinin yüksekliği, tüp üzerindeki skaladan okunur. Okunan çökelti yüksekliğinin 0,21 ile çarpımı, % gram cinsinden idrardaki protein miktarını verir.

**Açıklama:** Proteinlerdeki katyonlar ile TCA anyonları, suda çözünmeyen tuzlar oluştururlar.

### 12.3.10. Rosin yöntemi ile idrarda bilirubin arama deneyi

**Prensip:** Bilirubin, iyot ile yeşil renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Rosin reaktifi: %1'lik iyot-alkol çözeltisi. 2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne tüpün 2/3'üne kadar idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 2-3 mL Rosin reaktifi tabakalandırılır. 3) Tüpte sıvı tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır ve gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

İdrar ve Rosin reaktifi tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. İdrar ve Rosin reaktifi tabakalarının temas yerinde yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda bilirubin varlığında; bilirubin, ya iyot ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur ya da iyot ile bilirubinün birleşmesi sonucu yeşil renkli bir madde oluşmaktadır. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, biliverdinden ya da oluşan yeşil renkli iyot-bilirubin bileşiğinden ileri gelmektedir.

### 12.3.11. Gmelin yöntemi ile idrarda bilirubin arama deneyi

**Prensip:** Bilirubin, nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur; biliverdinden de biliverdin oksidasyon ürünleri oluşur.

**Gerekenler:** 1) Konsantre  $HNO_3$  2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL konsantre  $HNO_3$  konur. 2) Tüpteki konsantre  $HNO_3$  üzerine 1 mL idrar tabakalandırılır. 3) Tüpte konsantre  $HNO_3$  ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır ve gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Konsantre  $HNO_3$  ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. Konsantre  $HNO_3$  ve idrar tabakalarının temas yerinde aşağıdan yukarıya doğru sarı üzerinden kırmızı, mor, yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda bilirubin varlığında önce bilirubin, nitrik asitle oksitlenerek yeşil renkli biliverdin oluşturur; daha sonra biliverdin de oksitlenerek biliverdin oksidasyon ürünleri oluşur. Tüpte tabakaların temas yerinde gözlenen yeşil renk, oluşan biliverdinden ileri gelmektedir, diğer renkler de biliverdin oksidasyon ürünlerinden ileri gelmektedir.

### 12.3.12. Fouchet yöntemi ile idrarda bilirubin arama deneyi

**Prensip:** Bilirubin,  $FeCl_3$  ve TCA ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin ve biliverdin oksidasyon ürünleri oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %10'luk  $BaCl_2$  çözeltisi. 2) Fouchet reaktifi: 10 mL suda 2,5 g TCA çözülür ve bu çözeltiliye %10'luk taze  $FeCl_3$  çözeltisinden 1 mL eklenip karıştırılır. 3) Filtre kağıdı. 4) Huni 5) Pipet 6) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 10 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 5 mL %10'luk  $BaCl_2$  çözeltisi eklenir ve karıştırılır; bir çökelti oluştuğu görülür. 3) İkinci basamakta oluşan çökelti, karışımın filtre kağıdından süzülmesiyle filtre kağıdı üzerine alınır. 4) Üzerinde çökelti olan filtre kağıdı, kuru bir başka filtre kağıdının üzerine konur. 5) Filtre kağıdı üzerindeki çökelti üzerine 1-2 damla Fouchet reaktifi damlatılır ve Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılır; gözlenenlere göre sonuç rapor edilir:

Filtre kağıdı üzerindeki çökeltide Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluştuğu gözlenmezse idrarda bilirubin (-)'dir. Filtre kağıdı üzerindeki çökeltide Fouchet reaktifi damlatılan yerde yeşil renk oluştuğu gözlenirse idrarda bilirubin (+)'dir.

**Açıklama:**  $BaCl_2$  idrardaki sülfat iyonlarını bağlayarak  $BaSO_4$  şeklinde çöktürür. İdrarda bilirubin varlığında  $BaSO_4$  idrardaki bilirubini adsorbe ederek beraberinde çöktürür. Süzme sonucunda  $BaSO_4$  ve adsorbe ettiği bilirubin filtre kağıdının üzerinde kalırlar. Filtre kağıdı üzerindeki çökeltiye Fouchet reaktifi damlatıldığında, çökeltideki bilirubin, Fouchet reaktifindeki  $FeCl_3$  ve TCA ile oksitlenerek yeşil renkli biliverdin ve biliverdin oksidasyon ürünleri oluşturur.

### 12.3.13. Legal yöntemi ile idrarda aseton arama deneyi

**Prensip:** Aseton, alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kiraz kırmızısı renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %5'lik taze sodyum nitroprussiyat çözeltisi. 2) %10'luk NaOH çözeltisi. 3) Asetik asit. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 10 mL idrar, 1 mL sodyum nitroprussiyat çözeltisi ve 2 mL %10'luk NaOH çözeltisi konarak karıştırılır. Tüpteki karışımın kırmızı renk aldığı gözlenir. 2) Tüpteki kırmızı renkli karışıma 2 mL asetik asit eklenip karıştırılır ve karışımın renginde bir değişiklik olup olmadığına bakılır. Karışımın renginde gözlenen değişime göre de sonuç rapor edilir:

Son karışımın rengi açılırsa idrarda aseton (-)'dir. Son karışımın rengi kiraz kırmızısına veya vişne çürüğü rengine dönüşürse idrarda aseton (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda aseton varlığında önce alkali ortamda aseton ve sodyum nitroprussiyat arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli izonitro aseton bileşiği oluşur. Daha sonra izonitro aseton ile asetik asit arasındaki tepkime sonucunda mor renkli bir kompleks oluşur.

**Tartışma:** İdrardaki kreatinin de alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kırmızı renkli bir bileşik oluşturur. İdrarda aseton bulunmadığı durumlarda kreatinin ile sodyum nitroprussiyatın oluşturduğu kırmızı renkli bileşik, asetik asit etkisiyle parçalanır ve kırmızı renk kaybolur.

### 12.3.14. İmbert-Lange deneyi ile idrarda aseton arama deneyi

**Prensip:** Aseton, alkali ortamda sodyum nitroprussiyat ile kiraz kırmızısı renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) %10'luk taze sodyum nitroprussiyat çözeltisi veya kristal sodyum nitroprussiyat. 2) Derişik amonyak çözeltisi. 3) Glasiyal asetik asit. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar ve 0,5 mL glasiyal asetik asit konarak karıştırılır. 2) Tüpteki karışıma 0,5 mL %10'luk taze sodyum nitroprussiyat çözeltisi veya birkaç sodyum nitroprussiyat kristali eklenip karıştırılır. 3) Tüpteki son karışımın üzerine 2 mL derişik amonyak tabakalandırılır ve sıvı tabakalarının temas yerinde birkaç dakika içinde mor bir halka oluşup oluşmadığına bakılarak gözlenenlere göre sonuç raporu verilir:

Son karışımın üzerine 2 mL derişik amonyak tabakalandırıldığında sıvı tabakalarının temas yerinde birkaç dakika içinde mor bir halka oluşmazsa idrarda aseton (–)'dir. Son karışımın üzerine 2 mL derişik amonyak tabakalandırıldığında sıvı tabakalarının temas yerinde birkaç dakika içinde mor bir halka oluşursa idrarda aseton (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda aseton varlığında önce alkali ortamda aseton ve sodyum nitroprussiyat arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli izonitro aseton bileşği oluşur. Daha sonra izonitro aseton ile asetik asit arasındaki tepkime sonucunda mor renkli bir kompleks oluşur.

**Tartışma:** İdrarda fazla miktarda amorf urat bulunması halinde sıvı tabakalarının temas yerinde sarı-esmer bir halka oluşabilir.

### 12.3.15. Lieben yöntemi ile idrarda aseton arama deneyi

**Prensip:** Aseton, alkali ortamda iyot ile iyodoform oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Lugol çözeltisi: 5g iyot ve 10 g KI, 100 g distile suda çözünür; 1/5 oranında sulandırılarak kullanılır. 2) 2 N NaOH çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 2 mL idrar ve 4 mL 1/5 oranında sulandırılmış lugol çözeltisi konarak karıştırılır. 2) Tüpteki karışıma, lugolün rengi giderilinceye kadar damla damla 2 N NaOH çözeltisi eklenir. 3) Tüpte sarı renkli çökelti oluşup oluşmadığına bakılır ve iyodoform kokusu hissedilip hissedilmediği araştırılır:

Tüpte sarı renkli çökelti oluşmaz ve iyodoform kokusu hissedilmezse idrarda aseton (–)'dir. Tüpte sarı renkli çökelti oluşur ve iyodoform kokusu hissedilirse idrarda aseton (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda aseton varlığında; aseton, sodyum hidroksit ve iyot ile tepkimeye girerek iyodoform oluşturur. İyodoform sarı renklidir, suda güç çözünür ve karakteristik kokuludur. Tüpte gözlenen sarı çökelti ve hissedilen koku, oluşan iyodoform ile ilgilidir. İstenirse çökeltinin lam-lamel arasında mikroskopta incelenmesiyle altı köşeli ya da yıldız şeklinde iyodoform kristalleri görülebilir.

### 12.3.16. İdrarda diazo cisimleri arama deneyi

**Prensip:** Patolojik hallerde idrarda bulunan ve bileşimi tam olarak bilinmeyen diazo cisimleri, diazobenzosülfonik asit ile kırmızı renkli azo maddelerini oluştururlar.

**Gerekenler:** 1) Diazo A çözeltisi: 1 g sülfanilik asit ve 15 mL konsantre HCl, volüm 1000 mL'ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülür. 2) Diazo B çözeltisi: %0,5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisi. 3) Taze diazo reaktifi: 5 mL Diazo A çözeltisi ile 1 mL Diazo B çözeltisi karıştırılarak hazırlanır. 4) Pipet 5) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 6 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 6 mL taze diazo reaktifi eklenerek kuvvetle çalkalanır. 3) Kuvvetle çalkalama sonucunda tüpteki karışımın üzerinde koyu kırmızı renkli köpük oluşup oluşmadığına bakılarak sonuç rapor edilir:

Kuvvetle çalkalama sonucunda tüpteki karışımın üzerinde koyu kırmızı renkli köpük oluşmazsa idrarda diazo cismi (-)'dir. Kuvvetle çalkalama sonucunda tüpteki karışımın üzerinde koyu kırmızı renkli köpük oluşursa idrarda diazo cismi (+)'dir.

**Açıklama:** Taze diazo reaktifinin hazırlanması sırasında, önce diazo A çözeltisindeki HCl ile diazo B çözeltisindeki  $\text{NaNO}_2$ 'ten  $\text{HNO}_2$  ve NaCl oluşur; daha sonra  $\text{HNO}_2$  ile sülfanilik asitden de diazobenzosülfonik asit oluşur; taze diazo reaktifi, diazobenzosülfonik asit içermektedir. İdrarda diazo cisimlerinin varlığında taze diazo reaktifindeki diazobenzosülfonik asit ile diazo cisimleri arasındaki tepkime sonucunda kırmızı renkli azo maddeleri oluşur.

**Tartışma:** İdrarda bulunan fenoller, pürinler gibi aromatik maddeler de diazobenzosülfonik asit ile alkali ortamda kırmızı renkli azo maddeleri oluştururlar; fakat bunlar köpüğe geçmezler. İdrarda diazo cisimleri, tifo, ilerlemiş tüberküloz, kızamık gibi bazı ateşli hastalık durumlarında saptanır.

### 12.3.17. Benzidin deneyi ile idrarda kan (hemoglobin) arama deneyi

**Prensip:** Hemoglobin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile benzidin arasındaki oksidoredüksiyon reaksiyonunu katalizler.

**Gerekenler:** 1) %3'lük  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi. 2) Bazik benzidin'in glasiyal asetik asitdeki %1'lik taze çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne bazik benzidin'in glasiyal asetik asitdeki %1'lik taze çözeltisinden 2-3 mL ve aynı miktarda da %3'lük  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden konup karıştırılır. 2) Tüpteki karışım üzerine damla damla idrar eklenip karıştırılır; yeşil veya mavi-yeşil renk oluşup oluşmadığına bakılarak sonuç rapor edilir.

Tüpte yeşil veya mavi-yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda hemoglobin (-)'dir. Tüpte yeşil veya mavi-yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda hemoglobin (+)'dir.

**Açıklama:** İdrarda hemoglobin varlığında; benzidin ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  arasında oksidoredüksiyon reaksiyonu hızlanır;  $\text{H}_2\text{O}_2$  suya indirgenirken benzidin de yükseltgenir. Ortamdaki yükseltgenmiş benzidin ile henüz yükseltgenmemiş benzidin karışımı, benzidin mavisi diye bilinen mavi-yeşil bir renk oluşturur.

**Tartışma:** İdrarda lökosit varlığında da bunlardaki peroksidazın etkisiyle (+) sonuç elde edilir; ancak idrar kaynatılırsa, peroksidazın etkisi ortadan kaldırılabilir. Çok fazla miktarda kullanılan vitamin C ise hemoglobinin etkisini önler ve (-) sonuca neden olabilir. İdrarda az miktarda hemoglobin bulunması durumunda da fazla damlatılan idrar benzidini çökeltir ve bu durumda (-) sonuç elde edilir.

### 12.3.18. Ehrlich yöntemi ile idrarda ürobilinojen arama deneyi

**Prensip:** Ürobilinojen, Ehrlich reaktifi ile kırmızı renk oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Ehrlich reaktifi: 2 g p-dimetil aminobenzaldehid, 100 mL %20'lik HCl'de çözülerek hazırlanır. 2) %10'luk  $\text{BaCl}_2$  çözeltisi. 3) Pipet 4) Deney tüpleri. 5) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne taze ve bilirubinsiz idrar konur. (idrara bilirubinli ise, 10 mL'sine 5 mL %10'luk  $\text{BaCl}_2$  eklenip karıştırıldıktan sonra süzülerek bilirubinsizleştirilir.) 2) Tüpteki bilirubinsiz idrar üzerine 1 mL Ehrlich reaktifi eklenip karıştırılır ve birkaç dakika beklenir. Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşup oluşmadığına bakılır:

Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşumu gözlenirse idrarda ürobilinojen artmıştır.

Tüpteki karışımda kırmızı renk oluşumu gözlenmezse tüp ısıtılır. Isıtma sonucunda kırmızı renk oluşumu gözlenirse idrarda ürobilinojen normaldir. Isıtmaya rağmen kırmızı renk oluşumu gözlenmezse idrarda ürobilinojen (-)'dir.

**Açıklama:** İdrarda ürobilinojen varlığında; ürobilinojen, Ehrlich reaktifi ile kırmızı renk oluşturur.

**Tartışma:** İdrarda porfirin bulunması da Ehrlich reaktifi ile (+) kırmızı renk verir. İdrarda porfobilinojen bulunması da Ehrlich reaktifi ile (+) kırmızı renk verir; ancak porfobilinojen ile oluşan bileşik kloroformda çözünmez. İdrarın Ehrlich reaktifi ile uzun süre kaynatılması durumunda açığa çıkan indol nedeniyle test (+) olabilir. Formol ve E.coli'nin oluşturduğu nitritler deneyi (-)'leştirir.

### 12.3.19. Sulkowitch yöntemi ile idrarda kalsiyum arama deneyi

**Premsip:** Kalsiyum, asidik ortamda amonyum okzalat ile suda çözünmeyen kalsiyum okzalat oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Sulkowitch reaktifi: 2,5 g Okzalik asit, 2,5 g amonyum okzalat ve 5 mL derişik asetik asidi distile suda volüm 150 mL'ye tamamlanarak çözmek suretiyle hazırlanır. 2) Pipet 3) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur. 2) Tüpteki idrar üzerine 5 mL Sulkowitch reaktifi eklenip karıştırılır; karışımda bulanıklık oluşup oluşmadığına göre sonuç rapor edilir:

Tüpteki idrar üzerine Sulkowitch reaktifi eklendiğinde bulanıklık oluşmazsa idrarda kalsiyum (*yoktur veya azalmış*)'tır. Tüpteki idrar üzerine Sulkowitch reaktifi eklendiğinde bulanıklık oluşursa idrarda kalsiyum (*normal*)'dir. Tüpteki idrar üzerine Sulkowitch reaktifi eklendiğinde süt gibi bulanıklık oluşursa idrarda kalsiyum (*artmış*)'tır.

**Açıklama:** İdrardaki kalsiyum, asidik ortamda amonyum okzalat ile suda çözünmeyen kalsiyum okzalat oluşturur.

## 12.4. İdrar Yolları Taşlarının İncelenmesi

İdrarda bulunan kalsiyum fosfat, ürik asit gibi bazı maddeler, koruyucu kolloidlerin etkisiyle aşırı doymuş çözeltiler halinde çökmeden atılabilmektedirler. Ancak, idrarda koruyucu kolloidlerin azalması durumunda, normalde aşırı doymuş çözeltiler halinde atılan maddeler idrar yollarında çökerler ve idrar yolları taşlarını oluştururlar. İdrar yolları taşları, fosfat taşları, okzalat taşları, ürat taşları, miks taşlar olabilir.

*Fosfat taşları*, açık renkli toprak gibidirler; elle kolayca ezilirler.

*Okzalat taşları*, pürüklü yüzeyli, esmer renklidirler; çok serttirler.

*Ürat taşları*, düzgün yüzeyli, esmer renkli, küçük taşlardır; serttirler.

*Miks taşlar*, fosfat-okzalat veya okzalat-ürat karışımı taşlardır.

### 12.4.1. Bir idrar yolu taşının ürat taşı olup olmadığının incelenmesi (mürexid deneyi)

**Premsip:** Ürik asit ile nitrik asidin birlikte ısıtılması sonucunda purpurik asit oluşur.

**Gerekenler:** 1) İdrar yolu taşı. 2) Porselen havan ve havaneli. 3) Konsantre HNO<sub>3</sub> 4) % 20'lik NaOH çözeltisi. 5) Porselen kapsül. 6) Bunzen beki alevi. 7) Sacayak 8) Amyant tel kafes.

**Uygulama:** 1) İdrar yolu taşı havanda ezilerek toz haline getirilir ve bir porselen kapsüle bu tozdan bir miktar konur. 2) Kapsüldeki idrar yolu taşı üzerine 1-2 damla konsantre HNO<sub>3</sub> damlatılır. 3) Porselen kapsül, bir sacayak üzerinde, içindeki madde kuruyuncaya kadar ısıtılır ve sonra soğutulur. 4) Soğuyan kapsüldeki leke üzerine 1 damla NaOH damlatılır; lekedeki renk değişimine göre sonuç rapor edilir:

Soğuyan kapsüldeki leke üzerine 1 damla NaOH damlatıldığında mavi-menekşe renk gözlenirse, idrar yolu taşının ürat taşı olduğu sonucuna varılır.



Soğuyan kapsüldeki leke üzerine 1 damla NaOH damlatıldığında mavi-menekşe renk gözlenmezse, idrar yolu taşı ürat taşı değildir.

**Açıklama:** İdrar yolu taşının ürat taşı olması durumunda, deney sırasında önce ürik asit ile nitrik asidin birlikte ısıtılması sonucunda purpurik asit oluşur, daha sonra da purpurik asidin NaOH ile reaksiyonlaşması ile mavi-menekşe renkli izopurpurik asit sodyum tuzu oluşur; gözlenen mavi-menekşe renk, oluşan izopurpurik asit sodyum tuzundan ileri gelmektedir.

**Tartışma:** Deneyde NaOH yerine amonyak çözeltisi kullanılsaydı, ürat taşı ile mavi-menekşe renk yerine mor renk oluştuğu gözlenirdi. Çünkü, purpurik asit ile amonyağın oluşturduğu izopurpurik asit amonyum tuzu, mavi-menekşe değil, mor renklidir. Bazen ısıtma sırasında porselen kapsüldeki idrar yolu taşında bulunan üreden amonyak oluşur ve bu, idrar yolu taşının ürat taşı olması durumunda lekenin kendiliğinden mor renk almasına neden olabilir.

#### **12.4.2. Bir idrar yolu taşının fosfat taşı olup olmadığının incelenmesi deneyi**

**Prensip:** Fosfat, amonyum molibdat ile ısıtma sonucunda suda güç çözünen, sarı renkli amonyum fosfomolibdat oluşturur.

**Gerekenler:** 1) İdrar yolu taşı. 2) Porselen havan ve havaneli. 3) Konsantre HNO<sub>3</sub> 4) % 12,5'lik amonyum molibdat çözeltisi. 5) Pipet 6) Deney tüpleri. 7) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) İdrar yolu taşı havanda ezilerek toz haline getirilir ve bir deney tüpüne bu tozdan bir miktar konur. 2) Deney tüpündeki idrar yolu taşı üzerine 1 mL konsantre HNO<sub>3</sub> eklenerek karıştırılır ve taş tozu çözülür. 3) Tüpteki karışım üzerine 2 mL %12,5'lik amonyum molibdat çözeltisi eklenir ve karıştırılır. 4) Tüpteki son karışım, kaynama noktasına kadar ısıtılır; renk değişimine göre sonuç rapor edilir:

Kaynama noktasına kadar ısıtılan son karışımda limon sarısı bir renk ve çökelti oluşumu gözlenirse, idrar yolu taşının fosfat taşı olduğu sonucuna varılır. İstenirse lam-lamel arasına alınan çökelti mikroskopta incelenerek iğne demeti şeklinde fosfat kristalleri görülebilir.

Kaynama noktasına kadar ısıtılan son karışımda limon sarısı bir renk ve çökelti oluşumu gözlenmezse; idrar yolu taşı, fosfat taşı değildir.

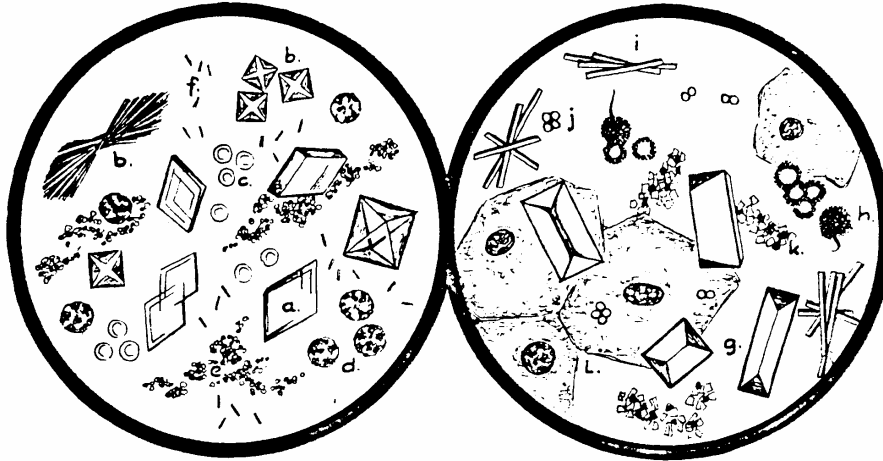
**Açıklama:** İdrar yolu taşının fosfat taşı olması durumunda, deney sırasında fosfat ile amonyum molibdatın ısıtılması sonucunda amonyum fosfomolibdat oluşur; gözlenen limon sarısı renk ve çökelti, oluşan amonyum fosfomolibdattan ileri gelmektedir.

### 13. İDRAR SEDİMENTİNİN İNCELENMESİ

İdrar sedimentinin incelenmesi için, bir santrifüj tüpüne idrar numunesinden bir miktar konur. Bu santrifüj tüpü, bir başka tüple dengelenerek santrifüj aletine konur ve dakikada 1500-200 devirde 3-5 dakika santrifüj edilir. İdrar tüpü santrifüjden alınır ve aşağıya doğru 45° eğilerek içindeki berrak idrar, başka analizler için başka tüplere alınır veya dökülür. Santrifüj tüpünün dibindeki çökelti yeniden çalkalanarak süspansiyon haline getirilir ve bu süspansiyondan 1 damla bir lam üzerine alınır. Lamdaki damla, kenarlardan taşmayacak ve hava kabarcığı da kalmayacak şekilde bir lamelle kapatılır. Böylece hazırlanan preparat, mikroskopta incelenir. Önce, mikroskopun küçük objektifi (10X) ile 100 defa büyüterek bütün alanlar kontrol edilir ve şekilli elemanların bol olduğu yerler büyük objektif (40X) ile 400 defa büyütük incelenir. Direkt, fakat parlak olmayan ışıktaki şekilli elemanlar daha iyi görülür; genellikle kondensatör uzaklaştırılır veya diyafram kısılır.



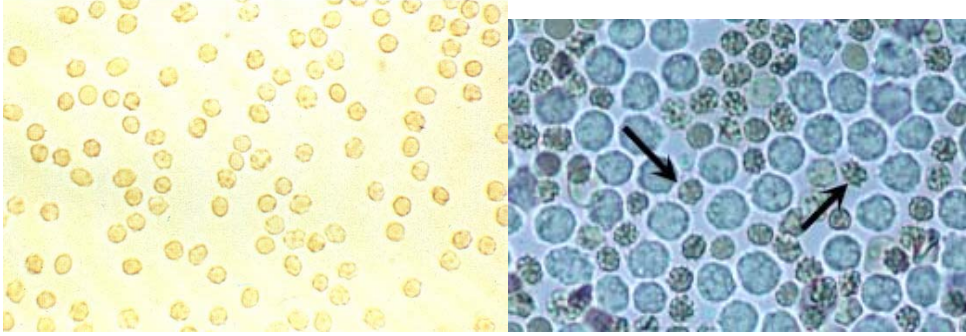
İdrar sedimentinde eritrositler, lökositler, epitel hücreleri, silendirler, kristaller, bakteri, mantar ve parazit hücreleri araştırılır ve incelenir.



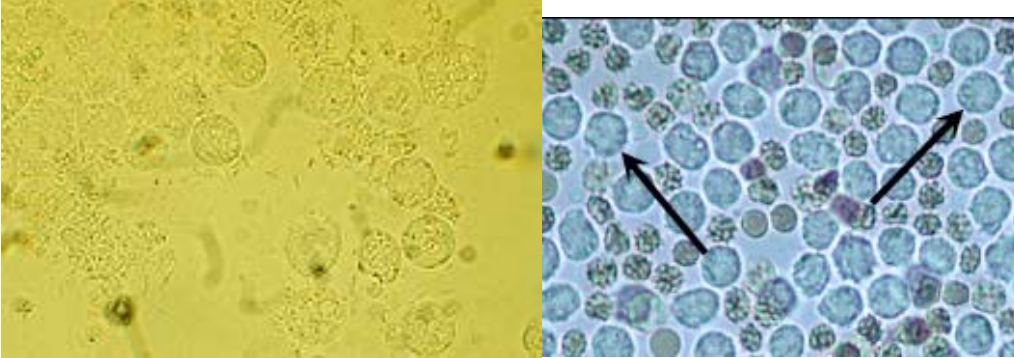
İdrar sedimentini incelemenin sonucu, 400 defa büyütmede 20 mikroskopik alanda raslanan şekilli elemanların ortalamasına göre rapor edilir: 0-2 şekilli eleman, nadir; 2-4 şekilli eleman, tek tük; 5-20 şekilli eleman, sayısıyla; 50'den fazla şekilli eleman, bol olarak ifade edilir.

İdrar sedimentinde şekilli elemanlar, çeşitli özellikleriyle tanınırlar:

**13.1. İdrar sedimentinde eritrositler.** İyi korunmuşlarsa açık yeşilimtrak renkte ve yuvarlak görülürler; mikro-vida hafifçe oynatıldığında iç içe iki halka saptanabilir. Dikine duran eritrositler bisküvi şeklinde görülürler. Konsantre idrarda eritrositler büzüşmüş, orak şeklinde görülebilirler.



**13.2. İdrar sedimentinde lökositler.** Eritrositlere göre daha büyük ve granüllüdürler; görünüşleri, idrar pH'ına göre değişir. Lökositler, asit veya hafif alkali idrarda granüllü bir sitoplazma ve belirgin renksiz bir çekirdek içeren yuvarlak, büyük hücrelerdir; alkali idrarda ise şeffaf, sınırları kaybolmuş bir sitoplazma ve belirgin olmayan çekirdek içeren şişmiş, büyük hücrelerdir. İdrar sedimentindeki lökositler, % 3' lük asetik asitten 1 damla lamelin kenarına damlatıldığında daha belirgin olurlar; asetik asit, sitoplazmadaki küçük granüllerin yok olmasını, fakat lökosit çekirdeğinin belirgin görülmesini sağlar.



İdrar sedimentinde bol lökosit olması halinde, asit ve nötral idrarlarda beyaz bir çökelti gözlenir; alkali idrarlarda bulanık bir boyanmış sediment görünümü gözlenir.

İdrar sedimentinde görülen lökositlerin biraraya gelerek küme oluşturup oluşturmadıkları da araştırılır ve lökosit kümeleri görülürse, bunlar da değerlendirme sonuç raporunda belirtilir.



**13.3. İdrar sedimentinde epitel hücreleri:** Yassı epitel hücreleri, idrar yolları epiteli hücreleri, böbrek epiteli hücreleri olabilir.



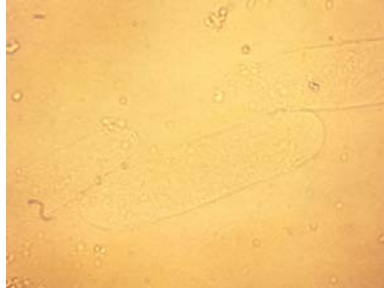
**Yassı epitel hücreleri**, küçük çekirdekli, yassı veya poligonal, idrar sedimentindeki en büyük hücrelerdir; genellikle kenarları katlanmış görünümündedirler. Bazen birbirine bağlı olarak birkaç hücre bir arada bulunabilir.

**İdrar yolları epiteli hücrelerinden** üst kat hücreleri, küçük yassı epitel hücrelerine benzerler; orta kat hücreleri, genellikle armut veya iğ şeklinde görülürler; en alt tabaka hücreleri, yuvarlak, nispeten küçük çekirdekli hücrelerdir.

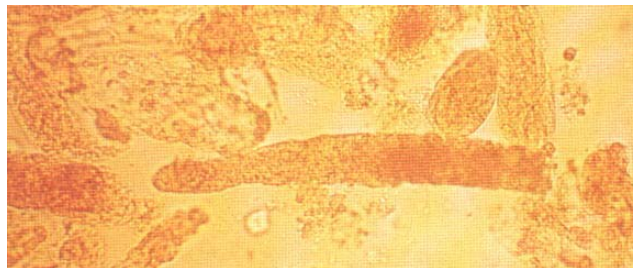
**Böbrek epiteli hücreleri**, büyük bir damla şeklinde çekirdekleri olan yuvarlak veya poligonal hücrelerdir; genellikle yağ damlacıkları içeren bir sitoplazmaları vardır; bazen küme, bazen de zincir şeklinde sıralanan hücre toplulukları halinde görülürler.

**13.4. İdrar sedimentinde silindirler:** Distal tubulus boşluğu içinde hücre ve proteinlerin birikmesiyle oluşmuş, çeşitli uzunlukta ve oluştuğu tubulus çapına uygun kalınlıkta silindir şeklinde elemanlardır; keskin sınırlı, yuvarlak veya künt uçludurlar; düz veya eğri, nadiren köşeli veya spiral şekilli olabilirler. Özellikle lamelin kenarlarında ve küçük büyütme ile aranmalıdır.

**Hiyalin silindirler**, homojen, şeffaf, jelatine benzer bir maddeden yapılmışlardır.



**Granüle silindirler**, bazen büyük bazen küçük protein granülleri ve yağ damlalarından oluşmuşlardır.





**Epitelial silendirler**, genellikle granül ve yağ damlacıkları içerirler; otoliz nedeniyle hücre ve çekirdek sınırları kısmen kaybolmuştur.



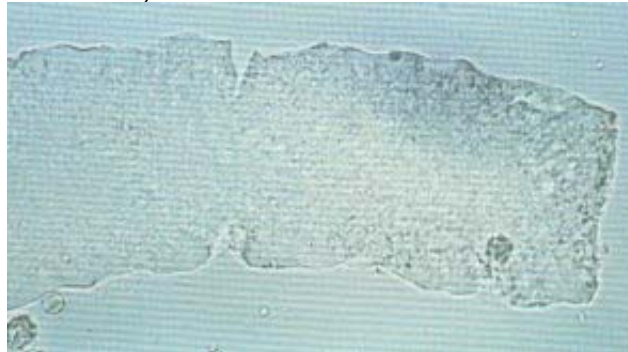
**Lökosit silendirleri**, ya birbirine yapışmış lökositlerden ya da hiyalin silendir üzerine oturmuş lökositlerden oluşmuşlardır.



**Eritrosit silendirleri**, ya birbirine yapışmış eritrositlerden ya da hiyalin silendir üzerine oturmuş eritrositlerden oluşmuşlardır.



**Mum silendirler**, genellikle diğer silendirlerden daha büyük ve geniştirler; ana madde, homojen, ışığı şiddetle kırar ve açık sarımsı renktedir.

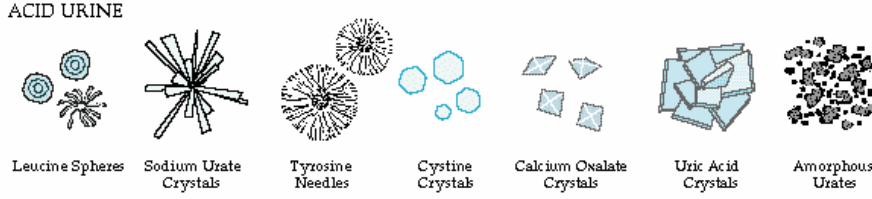


**Dev silendirler**, kısmen hiyalin kısmen granüle karışık silendirlerdir.

**Yağ silendirleri**, ışığı şiddetle kırar silindir şeklinde elemanlardır.

**13.5. İdrar sedimentinde kristaller.** İdrar pH'ına göre çeşitli olabilirler:

**13.5.1. Asit idrarda görülebilen kristaller:** Amorf ürat, ürik asit kristalleri, sistin kristalleri, lösin kristalleri, tirozin kristalleri olabilir.



**Amorf ürat,** makroskopik olarak balçık renginde çökelti oluşturur; mikroskopta küçük tanecikler halinde ve genellikle küçük topluluklar oluşturmuş halde görülürler; silindirik şeklinde de toplanabilirler ve bu durumda granüle silindirlerden güç ayırđedilirler.

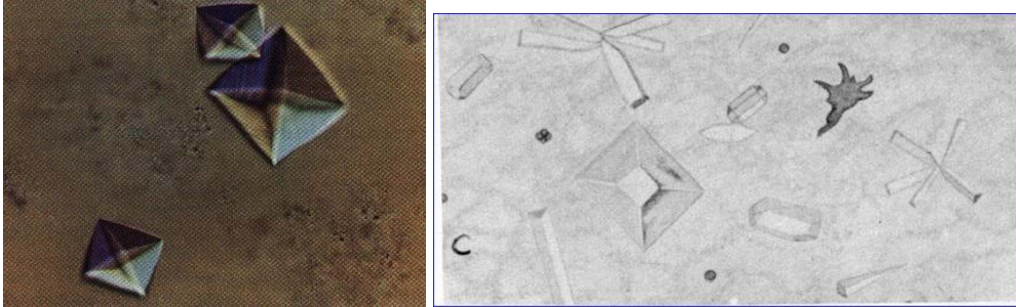
**Ürik asit kristalleri,** makroskopik olarak sarımsak kahverengi tanecikler şeklinde idrar toplama kabının kenarlarında tanınabilirler. mikroskopta sarımsak kahverengi veya kırmızı renkte, çeşitli boy ve şekillerde görülürler; bileği taşı, halter, fiçı şekilleri sıktır ve rozet şeklinde toplanma eğilimi gösterirler.

**Sistin kristalleri,** ürik asit kristallerine benzerler; ışığı fazla kıran sekiz köşeli plaklar şeklindedirler ve genellikle birbirini örtmüş olarak bulunurlar.

**Lösin kristalleri,** nadirdirler; küre şeklindedirler ve genellikle radyer veya konsantrik hatlara sahiptirler.

**Tirozin kristalleri,** ince iğneler şeklindedirler.

**13.5.2. Hafif asit, nötral veya hafif alkali idrarda görülebilen kristaller:** Kalsiyum okzalat kristalleri, tersiyer kalsiyum fosfat kristalleri, sulfonamidler olabilir.

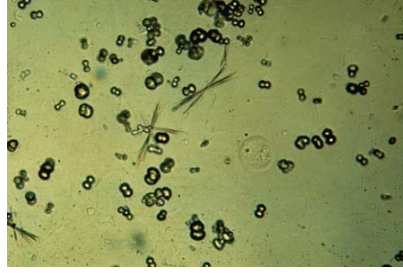


**Kalsiyum okzalat kristalleri,** ışığı şiddetle kıran zarf, nadiren halter veya bisküvi şeklindedirler; büyüklükleri değişiktir; ikterik idrarda sarı renkli görülürler; sık görülen şekilli elemanlardır.

**Tersiyer kalsiyum fosfat kristalleri,** renksiz, genellikle bir ucu kama şeklinde sivri iğneler şeklindedirler; sivri uçları biraraya toplanarak rozet şekli oluşturabilirler.

**Sulfonamidler,** makroskopik olarak sarı bir çökelti oluştururlar; mikroskopta amorf veya sarı yeşil renkli iğne, halter, yıldız şekillerinde görülürler.

**13.5.3. Nötral veya alkali idrarda görülebilen kristaller:** Magnezyum fosfat, kalsiyum karbonat kristalleri olabilir.



*Magnezyum fosfat kristalleri*, makroskopik olarak bütün renkleri veren yanar döner ince pulcuklardır; ince bir yağ tabakasını hatırlatırlar. mikroskopta kenarları kırılmış lameller düzensiz dizilmiş görünümü verirler.

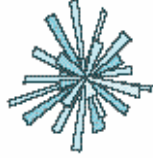
*Kalsiyum karbonat kristalleri*, makroskopik olarak nadiren fosfatlar gibi bir çökelti oluştururlar; mikroskopta amorf tanecikler veya küre şeklinde görülürler; genellikle halter şeklinde birbirleri ile birleşmişlerdir.

**13.5.4. Alkali idrarda görülebilen kristaller:** Amorf fosfat, tripel fosfat(amonyum magnezyum fosfat), amonyum urat olabilir.

ALKALINE URINE



Triple Phosphate Crystals



Calcium Phosphate Crystals



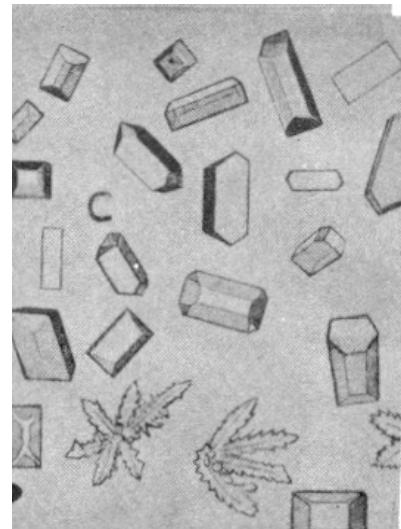
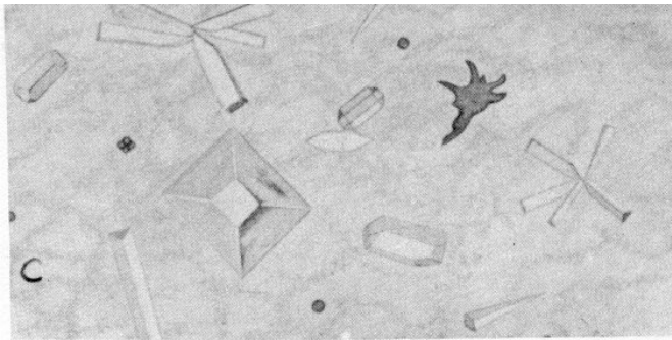
Ammonium Urate Crystals



Calcium Carbonate Crystals



Amorphous Phosphates

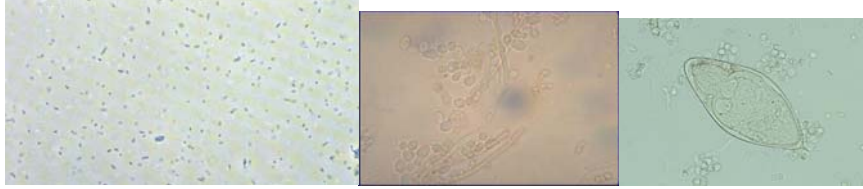


*Amorf fosfat*, makroskopik olarak bol bulunan lökositler gibi çökelti oluştururlar; mikroskopta ince taneli renksiz kitleler olarak görülürler.

*Tripel fosfat(amonyum magnezyum fosfat)*, idrar çabuk soğumuşsa kar tanesine benzer, yavaş soğumuşsa tabuta benzer prizmalar şeklinde görülürler.

*Amonyum ürat*, yer elması veya şalgama benzer şekillerde görülürler.

### 13.5.5. İdrar sedimentinde bakteri, mantar ve parazit hücreleri



**13.5.6. İdrar sedimentinin incelenmesinde hata kaynakları:** İdrar sedimentinin incelenmesinde çeşitli kaynaklı hatalar olabilir:

Hızlı ve uzun süre santrifüj, silindirleri bozabilir.

Santrifüjden sonra santrifüj tüpünün dibinde kalan sedimentin çalkalanarak süspansiyon haline getirilmesi iyi yapılmamış olabilir.

Lamelin altında hava kabarcığı kalması ve lamelin dışına idrar taşması hatalı değerlendirmeye neden olabilir.

Eritrositler, mantar hücreleri, ürat kristalleri ve yağ damlaları ile karıştırılabilirler. Ayırıcı tanı şu şekilde yapılır: Lamelin kenarına %3'lük asetik asit damlatılmasıyla eritrositler erirler; mantar hücreleri genellikle zincir oluşturmuş halde görülürler ve asetik asitde erimezler; ürat kristalleri koyu kahverengi ve çeşitli büyüklükte dirler; yağ damlaları ışığı şiddetle kırarlar, çeşitli büyüklükte dirler ve genellikle ovaldirler.

Parçalanmış lökositler amorf fosfatlar ile karıştırılabilirler. Ayırıcı tanı şu şekilde yapılır: Lamelin kenarına %3'lük asetik asit damlatılmasıyla fosfatlar, eriyerek kaybolurlar.

Silindirler, düşük dansiteli, alkali ve uzun süre beklemekle bakteri üremiş idrar örneklerinde hızla bozulurlar; böbrek yetmezliğine bağlı olarak idrar konsantre ve asit olamıyorsa birkaç NaCl kristali veya birkaç damla konsantre HCl eklenmek suretiyle silindirler korunabilir.

Silendiroidler ve psödosilindirler, silindir sanılabilirler. Ayırıcı tanı şu şekilde yapılır: Silendiroidler musin veya epitel hücrelerinden oluşurlar, şerit şeklinde ve uçları pürüklüdür; psödosilindirler asetik asitle eriyen fosfat veya ısıtmakla eriyen üratlardan oluşan şekilli elemanlardır.

Normal idrarda da bir miktar bulunabilen ve durmakla çöken müküs, mikroskopta uzun ve saydam şeritler şeklinde görülür, kristalleri ve hatta hücreleri örtebilir.



## 14. SÜT DENEYLERİ

### 14.1. Süt ve Özellikleri

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



İlk süt olan kolostrumda total katı madde miktarı, kolesterol ve lesitin miktarı fazladır. Sütte karbohidrat olarak laktoz bulunur.

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. Bebeklerin mide sıvısında bulunan rennin de kalsiyumu çöktürür.

Sütte palmitik, oleik, stearik, miristik asitler ve yüksek yağ asitlerinin trigliseridleri bol miktarda bulunur.

Sütte potasyum, sodyum, kalsiyum ve fosfor da bulunur; demir ve bakır azdır. Sütte vitamin A, D, E, K, C ve B<sub>2</sub> ile katalaz, peroksidaz, fosfataz enzimleri bulunur.

Turp, soğan, sarımsak, havuç gibi bazı maddeler sütün tadını ve aromasını değiştirirler; bazı toksik maddeler de sütle çıkarılırlar.

### 14.2. Süt Deneyleri



### 14.2.1. Süt kazeininin eldesi ve tanımlanması deneyi

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

**Gerekenler:** 1) 2 N asetik asit. 2) Biüret reaktifi: 6 g Na-K tartrat, 1,5 g kristalize bakır sülfat, 300 mL %10'luk NaOH, volüm distile suyla 1 litreye tamamlanarak karıştırılıp çözülür. 3) Filtre kağıdı. 4) Huni 5) Pipet 6) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne 5 mL süt konur ve bu, 5 mL su ile sulandırılır. 2) Tüpteki sulandırılmış süt üzerine damla damla 2 N asetik asit çözeltisi eklenir ve küçük topaklar halinde bir çökelti oluştuğu görülür. 3) İkinci basamakta oluşan çökelti, karışımın filtre kağıdından süzülmesiyle filtre kağıdı üzerine alınır; süzüntü de bir başka tüpte toplanır ki süzüntü ile sonraki deney yapılacaktır. 4) Filtre kağıdı üzerine alınan çökelti ile proteinleri tanımlama deneylerinden biüret deneyi yapılır ve (+) sonuç gözlenmesiyle kazeinin protein olduğu tanımlanmış olur.

**Açıklama:** Asetik asit, sütteki kazeini yağ ile birlikte çöktürür. Süzme sırasında kazein ve yağlar filtre kağıdının üzerinde kalırken sütte bulunan laktalbumin ve laktoglobulin proteinleri, laktoz, fosfat ve kalsiyum süzüntüye geçerler. Süzüntüde laktalbumin ve laktoglobulin proteinleri, laktoz, fosfat ve kalsiyum, tanımlama deneyleriyle tanımlanabilirler.

### 14.2.2. Sütteki laktalbumin ile laktoglobulini çöktürme ve tanımlama deneyi

**Prensip:** Sütteki laktalbumin ile laktoglobulin ısı etkisiyle denatüre olurlar ve proteinleri tanımlama yöntemleriyle tanımlanabilirler.

**Gerekenler:** 1) Deney 14.2.1'de elde edilen süzüntü. 2) Metil kırmızısı indikatörü. 3) %5'lik NaOH 4) Kurşun asetat çözeltisi. 5) %40'lık NaOH 6) Filtre kağıdı 7) Huni 8) Pipet 9) Deney tüpleri. 10) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne deney 14.2.1'de elde edilen süzüntüden 3 mL konur. 2) Tüpteki süzüntüye 2 damla metil kırmızısı indikatörü damlatılır ve karıştırılır. 3) Tüpteki karışıma, renk sarı oluncaya kadar %5'lik NaOH damlatılarak asitlik giderilir. 4) Tüp, küçük bir alev üzerinde dikkatlice ısıtılarak karışım kaynatılır; bu sırada tüpte bir bulanıklık veya çökelti oluştuğu gözlenir. 5) Tüpteki karışım soğutulur ve soğuduktan sonra bir filtre kağıdından süzülür; çökelti, filtre kağıdı üzerine alınır, süzüntü de bir başka tüpte toplanır ki süzüntü ile sonraki deneyler yapılacaktır. 6) Filtre kağıdı üzerine alınan çökelti ile proteinleri tanımlama deneylerinden kurşun asetat deneyi yapılır ve (+) sonuç gözlenmesiyle laktalbumin ile laktoglobulinin protein olduğu tanımlanmış olur.

**Açıklama:** Sütteki laktalbumin ile laktoglobulin ısı etkisiyle denatüre olurlar ve çökerek ayrılırlar. Çökeltideki laktalbumin ile laktoglobulin de proteinleri tanımlama yöntemleriyle tanımlanabilirler.

### 14.2.3. Sütteki laktozu tanımlama deneyi

**Prensip:** Sütteki laktoz, indirgeyici bir disakkariddir; indirgeyici şekerleri tanımlama yöntemleriyle tanımlanabilir.

**Gerekenler:** 1) Deney 14.2.2'de elde edilen süzüntü. 2) Fehling A çözeltisi: 1000 mL'de 35 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ve 5 mL konsantre  $H_2SO_4$  3) Fehling B çözeltisi: 1000 mL'de 150 g Na-K Tartrat (Seignette tuzu) ve 300 mL %33'lük NaOH 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne deney 14.2.2'de elde edilen süzüntüden 1 mL konur. 2) Tüpteki süzüntüyle indirgeyici şekerleri tanımlama deneylerinden Fehling deneyi yapılır ve (+) sonuç gözlenmesiyle laktoz, bir indirgeyici şeker olarak tanımlanmış olur.

**Açıklama:** Sütteki laktoz, indirgeyici bir disakkariddir; denatüre olmaz ve indirgeyici şekerleri tanımlama yöntemleriyle tanımlanabilir.

#### 14.2.4. Sütteki fosfatı tanımlama deneyi

**Preşip:** Sütteki fosfat, amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat oluşturur.

**Gerekenler:** 1) Deney 14.2.2'de elde edilen süzüntü. 2) 2 N HNO<sub>3</sub> 3) %12,5'luk amonyum molibdat çözeltisi. 4) Pipet 5) Deney tüpleri. 6) Bunzen beki alevi.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne deney 14.2.2'de elde edilen süzüntüden 1 mL konur. 2) Tüpteki süzüntüye 1 mL 2 N HNO<sub>3</sub> ve 1 mL %12,5'luk amonyum molibdat çözeltisi eklenerek karıştırılır. 3) Tüpteki karışım kaynatılır; sarı renk veya sarı renkli çökelti oluşumu gözlenir.

**Açıklama:** Sütteki fosfat, amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat oluşturur.

#### 14.2.5. Sütteki kalsiyumu tanımlama deneyi

**Preşip:** Kalsiyum, asidik ortamda amonyum okzalat ile suda çözünmeyen kalsiyum okzalat oluşturur.

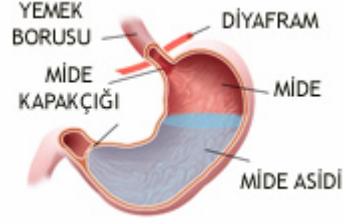
**Gerekenler:** 1) Deney 14.2.2'de elde edilen süzüntü. 2) Sulkowitch reaktifi: 2,5 g okzalik asit, 2,5 g amonyum okzalat ve 5 mL derişik asetik asidi distile suda volüm 150 mL'ye tamamlanarak çözmek suretiyle hazırlanır. 3) Pipet 4) Deney tüpleri.

**Uygulama:** 1) Bir deney tüpüne deney 14.2.2'de elde edilen süzüntüden 2 mL konur. 2) Tüpteki süzüntü üzerine 2 mL Sulkowitch reaktifi eklenip karıştırılır; karışım da bulanıklık oluştuğu gözlenir.

**Açıklama:** Sütteki kalsiyum, asidik ortamda amonyum okzalat ile suda çözünmeyen kalsiyum okzalat oluşturur.

## 15. MİDE SIVISI DENEYLERİ

### 15.1. Mide Sıvısı ve Özellikleri



Mide sıvısı, gastrik mukozada meydana gelen salgıların bir karışımıdır. Yemek borusunun mideye açıldığı yerdeki kardiyak bezler ve mide çıkışında yer alan pilorik bezlerden **mukus** salgılanır; kardiya ve fundus kısmındaki nonpariyetal hücrelerden **pepsinojen** salgılanır; pariyetal hücrelerden **HCl** salgılanır.

Erişkin bir insanda 24 saatte 2-3 litre mide sıvısı salgılanır. İnsanlarda mide sıvısının pH'ı 1,1-1,8 arasındadır.

Mide sıvısında total asidite 30-60 mL 0,1N NaOH/100 mL olarak ölçülür. Mide sıvısındaki total asiditenin 20-50 mL 0,1N NaOH/100 mL'si serbest HCl tarafından oluşturulur; diğer kısmı da besin proteininden oluşan tampon maddeler, asidik fosfat ve laktik asit gibi organik asitler tarafından oluşturulur.

### 15.2. Mide Sıvısı Deneyleri



#### 15.2.1. Kongo indikatör kağıdı ile mide sıvısında serbest HCl'nin kalitatif tayini

Bir deney tüpündeki mide sıvısı ile bir Kongo indikatör kağıdı ıslatılır; indikatör kağıdındaki renk değişimlerine göre sonuç rapor edilir.

Kongo indikatör kağıdı mavi-mor renk alırsa mide sıvısında *normal asidite* vardır.

Kongo indikatör kağıdı açık mavi renk alırsa mide sıvısında *hiperasidite* vardır.

Kongo indikatör kağıdı kırmızı renk alırsa mide sıvısında *hipoasidite veya anasidite* vardır.

### 15.2.2. Uffelman yöntemi ile mide sıvısında laktik asidin kalitatif tayini

5 mL fenol çözeltisi ile 1-2 damla %10'luk FeCl<sub>3</sub> çözeltisi karıştırılır. Oluşan mavi renkli çözeltiye 12 damla mide sıvısı damlatılır. Karışımın rengi sarı-yeşile dönüşürse mide sıvısında laktik asit fazladır; karışımın rengi kaybolursa mide sıvısında serbest HCl fazladır.

### 15.2.3. Mide sıvısında serbest HCl ve total asiditenin titrimetrik tayini

Bir erlene 10 mL mide sıvısı konur ve buna 1-2 damla dimetil sarısı ile 3-4 damla fenolftaleyn damlatılıp karıştırılır. Serbest HCl varlığında dimetil sarısı ile kırmızı renk oluşur.

Erlendeki karışım, rengi kirli sarıya dönüşünceye kadar 0,1 N NaOH ile titre edilir ve kullanılan 0,1 N NaOH volümü (v<sub>s</sub>) not edilir. Bundan sonra titrasyona karışımın rengi pembeye dönüşünceye kadar devam edilir ve kullanılan toplam 0,1 N NaOH volümü (v<sub>t</sub>) de not edilir.

v<sub>s</sub>/v<sub>t</sub> oranı, mide sıvısındaki serbest HCl/total asidite oranıdır. Mide sıvısındaki serbest HCl/total asidite oranı,

$$\frac{V_s \times 0,1 \times 1000}{10} = \text{mEq HCl/L mide sıvısı}$$

eşitliği ile serbest asidite hesaplanabilir.

$$\frac{V_t \times 0,1 \times 1000}{10} = \text{mEq total asidite/L mide sıvısı}$$

eşitliği ile de total asidite hesaplanabilir.

## 16. KLİNİK BİYOKİMYA LABORATUVARLARINDAN SIK İSTENEN BAZI TESTLER

### 16.1. Klinik Biyokimya Laboratuvarı



Klinik Biyokimya laboratuvarlarında, biyolojik materyallerde, hastalıkların tanısı, ayırıcı tanısı, bir hastalığın şiddetinin belirlenmesi, bir hastalığın sağaltımının izlenmesi, bulgu vermeyen bir hastalığın ortaya çıkarılması amacıyla laboratuvar analizleri yapılır.

#### 16.1.1. Analiz türleri

**Kalitatif (nitel) analizler:** Tanımlama testleridir; sonuçları var-yok veya pozitif-negatif olarak ifade edilir.

**Kantitatif (nicel) analizler:** Miktar veya aktivite belirleme analizleridir; sonuçları miktar veya aktivite büyüklüğünü gösteren bir sayı ve birimle ifade edilir.

$\%g = g/dL = 1000 \text{ mg/dL}$

$\%mg = mg/dL = 1000 \mu g/dL$

$\%\mu g = \mu g/dL = 1000 \text{ ng/dL}$

$\%ng = ng/dL = 1000 \text{ pg/dL}$

$\%pg = pg/dL$

$\text{Mol/L} = 1000 \text{ mMol/L} = 1000000 \mu\text{Mol/L}$

$\text{mMol/L} = 1000 \mu\text{Mol/L}$

$\text{Eq/L} = 1000 \text{ mEq/L}$

$\text{IU/L} = 0,001 \text{ IÜ/mL}$

$\text{IU/mL} = 1000 \text{ IU/L}$

### 16.1.2. Klinik biyokimya laboratuvarının organizasyonu

İyi gelişmiş bir klinik biyokimya laboratuvarında bulunması gereken bölümler:

- İdari bölüm
- Kan alma ve numune kabul bölümü
- Serum ayırma bölümü
- Biyokimyasal analizler bölümü
- Hormon analizleri bölümü
- İdrar ve gaita analizleri bölümü
- Kan gazları ve elektrolit analizleri bölümü
- Elektroforez bölümü
- Manuel deneyler bölümü
- Araştırma ve metabolizma bozuklukları bölümü
- İlaç analizleri bölümü
- Çözelti ve kit hazırlama bölümü
- Distile, deiyonize, redistile su üretimi, malzeme yıkama-kurutma-sterilizasyon bölümü
- Ambar ve soğuk depo
- Acil laboratuvarı
- Bilgi işlem merkezi

**İdari bölüm,** laboratuvarın her türlü sevk ve idaresinin yapıldığı bölümdür. Klinik Biyokimya laboratuvarlarını biyokimya uzmanları idare ederler. Biyokimya uzmanlarının başlıca görevleri şunlardır: Laboratuvarın her türlü sevk ve idaresini sağlamak. Satın alma ve maliyet hesapları. Laboratuvar personeli arasında iş bölümünün sağlanması. Analiz sonuçlarının kalite kontrolü ve istatistik çalışmaları. Yeni analiz metodlarının geliştirilmesi ve rutine sokulması, laboratuvarda yapılan analiz sayısının ve günlük kapasitenin artırılması. Reaktiflerin hazırlanması ve kit imalatı. Hasta ve klinsyenlerle diyalogu sağlamak, problemleri çözmek. Cihazların bakımlarını düzenli yaptırmak ve en verimli şekilde çalışmalarını sağlamak.

**Kan alma ve numune kabul bölümünde,** poliklinik hastalarından kan alınır ve servislerden gönderilen kan, idrar, BOS ve benzeri numuneler kabul edilir. Bu bölümde, kan alma ve materyal kabulü için gerekli sarf malzemeleri bulunur. Bu bölümde mutlaka bir muayene masası bulunmalıdır. Kan alma sırasında fenalaşan veya bayılan hastalar bu masaya yatırılarak bir süre dinlenmeleri sağlanır.

**Serum ayırma bölümünde,** kan alma bölümünden gelen numuneler gerekli işlemden geçirilerek serum, plazma, tam kan v.b. şeklinde analize hazır hale getirilir. Gerekli dilüsyon işlemleri ve bulanık numunelerde santrifüj işlemleri yapılır. Aynı gün işlenmeyecek numuneler ayrılarak uygun şartlarda saklanır. Bu bölümde tüp dengeleme terazileri ve en az iki adet santrifüj bulunmalıdır. Ayrıca çeşitli kapasitede otomatik pipetler, serum ayırmak için pipet uçları, serum ayırma küvet ve depoları, tüp sporları gibi malzemeler bulunmalıdır.

**Biyokimyasal analizler bölümünde,** otoanalizör, spektrofotometre ve reaktiflerin saklanması için buzdolabı bulunmalıdır. Bu bölümde tüm biyokimyasal analizler yapılır: Kan şekeri (glukoz) tayini. Üre tayini. Kreatinin tayini. Bilirubin tayini. Kan lipidleri (trigliserid, total kolesterol, HDL-kolesterol) tayini. Plazma proteinleri (total protein, albümin) tayini. Ürik asit tayini. Enzim tayinleri.

**Hormon analizleri bölümü,** Hormon analizlerinin yapıldığı bölümdür. Bu bölümde gama sayacı, kemilüminometre, ELİSA cihazlarından biri veya birkaçı bulunur. Radyoaktif madde ile çalışılan bölüm insanlardan uzak ayrı bir yerde olmalı ve bu işi yapan kişiler mutlaka kurşun önlük giymelidirler. Radyoaktif atıklar kurşun çöp bidonları içinde saklanır



ve atılacakları zaman insan topluluklarından uzak yerlerde yere gömülmek suretiyle ortadan kaldırılır.

**İdrar ve gaita analizleri bölümü**, Tam idrar ve gaita analizlerinin yapıldığı bölümdür. İdrar ve gaita analizleri bölümünde; idrar analizörü, refraktometre, bunzen beki, mikroskop, dansitometre ve gerekli cam malzeme bulunur.

**Distile su üretimi ve malzeme yıkama bölümü**, laboratuvardaki dispoziabl (tek kullanımlık) olmayan malzemenin yıkandığı ve deneyler için uygun hale getirilip kurutulduğu bölümdür. Bu bölümde distile, deiyonize ve redistile su cihazları, etüv ve fırın bulunur. Çok kalabalık laboratuvarlarda cam malzemeyi yıkamak için otomatik yıkama cihazı bulunur. Etüv: Plastikten yapılmış malzemelerin kurutulmasında kullanılır. Fırın: Cam malzemelerin kurutulması ve sterilizasyonunda kullanılır.

**Çözelti ve kit hazırlama bölümü**, laboratuvar için gerekli çözelti ve kitlerin hazırlandığı yerdir. Bu bölümde hassas terazi, geri soğutucu, vorteks, manyetik karıştırıcı, çeşitli cam malzeme, otomatik pipetler v.s. bulunmalıdır.

**Kan gazları ve elektrolit analizleri bölümü**, kan gazları (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH) ve elektrolit (Na, K, Li) analizlerinin yapıldığı bölümdür. Bu bölümde Na, K, Li cihazı (ISE veya fleym fotometre) ve kan gazları analiz cihazı bulunur.

**Elektroforez bölümü**, elektroforez çalışmalarının yapıldığı bölümdür.

**Manuel deneyler bölümü**, otoanalizörde yapılamayan böbrek taşı, mide suyu, VMA, 17-KS, metanefrin, salisilat, HbA<sub>1C</sub> gibi bazı spektrofotometrik ve kolonkromatografik testlerin çalışıldığı bölümdür. Bu bölümde spektrofotometre, santrifüj, benmari, bunzen beki, otomatik ve cam pipetler bulunmalıdır.

**İlaç analizleri bölümünde**, terapötik ilaçlar ile bazı kimyasal maddelerin kan ve idrardaki düzeyleri ölçülür.

**Araştırma ve metabolizma bozuklukları bölümünde**, nadir görülen metabolizma hastalıkları araştırılır ve eser element tayinleri yapılır. Bu bölümde laboratuvarın gelişmişlik seviyesine göre şu cihazlar bulunabilir: Atomik absorpsiyon cihazı (Cu, Zn, Mg, Co gibi eser elementlerin tayinine yarar). HPLC (yüksek performanslı likit kromatografisi) ki VMA, metanefrin, 17-KS ve ilaç analizlerinin yapılmasında kullanılır. Gaz kromatografisi. Kütle spektrofotometresi. ELİSA okuyucusu. Nefelometre.

**Bilgi işlem merkezi**, laboratuvar sonuçlarının bilgisayar ortamında kaydedilip, sonuç raporlarının düzenlenerek hasta veya hekimlere iletiildiği yerdir. Kaydedilmiş verilerle laboratuvar istatistikleri yapılır.

**Acil laboratuvarı**, Acil analizlerin yapıldığı yerdir. Acil laboratuvarının rutin laboratuvar içinde olması en idealdir.

**Ambar ve soğuk depo**, Kitlerin ve kimyasal maddelerin saklandığı yerdir. Soğuk depodan başka laboratuvarda mutlaka yeterli buzdolabı ve derin dondurucu bulunmalıdır. Derin dondurucu, uzun süre saklanması gereken numunelerin -20°C veya -80°C'de dondurularak saklanmasına yarar.

### 16.1.3. Klinik laboratuvarlarda uyulması gereken kurallar

- Laboratuvarlarda mutlaka beyaz önlükle çalışılmalıdır.
- Temizliğe ve laboratuvar düzenine uyulmalıdır. Kullanılan malzeme tekrar yerli yerine yerleştirilmelidir.
- Hiçbir kimyasal maddeye elle dokunulmamalı ve koklanmamalıdır.
- Reaktif kapları sürekli kapalı tutulmalıdır.
- Yeni hazırlanan reaktiflerin üzerine etiketleme yaparak hazırlama tarihi, hazırlayanın adı-soyadı ve biliniyorsa son kullanma tarihi yazılmalıdır.
- Reaktifler ve kimyasal maddeler uygun şartlarda saklanmalıdır.

- Bozulan ve son kullanma tarihi geçen reaktifler kullanılmamalıdır.
- Çalışma sırasında kirli ve temiz maddeler birbirine karıştırılmamalıdır.
- Bütün çalışmalarda distile su kullanılmalıdır.
- Her çalışmadan sonra eller sabunlu su ile yıkanmalıdır.
- Yanıcı ve tahriş edici maddelerin cilt ile temasında gecikmeden bol su ile yıkayıp görevlilere haber verilmelidir.
- Laboratuvar ortamında sigara içilmemeli, herhangi bir şey yenilmemelidir.
- Laboratuvar ortamında son derece sakın ve sessiz çalışılmalıdır.
- Malzeme ve cihazlar kullanılırken son derece özen gösterilmeli; her bir cihaz usulüne uygun tarzda dikkatlice kullanılmalıdır.
- Çalışma sırasında laubali hareketlerden, gürültü ve şakalaşma gibi tavırlardan kaçınılmalıdır.
- Laboratuvarda yapılan çok küçük bir hatanın bile bir hastanın hayatına mal olabileceği unutulmamalıdır.
- Hijyen şartlarına azami dikkat gösterilmelidir. Rutin çalışmalarda devamlı eldivenle çalışılmalıdır. Kan ve kan ürünleri ile herhangi bir şekilde temas olursa eller zefiranlı su gibi antiseptik bir madde ile yıkandıktan sonra bol sabunlu su ve ardından çeşme suyu ile yıkanmalıdır. Kan örneklerinin işlendiği cam malzemelerin mümkünse sterilize edildikten sonra kullanılması tercih edilmelidir.

## 16.2. Klinik Biyokimya Laboratuvarı için Numuneler

Klinik biyokimya laboratuvarlarından istenen testler için gerekli biyolojik materyaller sıklıkla kan, idrar, beyin-omurilik sıvısı (BOS, serebrospinal sıvı), plevra sıvısı, eklem sıvısı (sinovyal sıvı) gibi sıvılardır.

### 16.2.1 Kan numuneleri

**Tam kan (total kan):** Serum veya plazması ayrılmamış kandır. 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 kısımdır. Birçok analiz için tercih edilir.

**Plazma:** Pıhtılaşması antikoagulanlarla önlenmiş kandan şekilli elemanlar (eritrosit, lökosit, trombosit) ayrıldıktan sonra geri kalan sıvı kısımdır. Bazı özel analizler için gereklidir. Antikoagulanlar, pıhtılaşmayı önlerler; fakat elde edilecek plazmada yapılacak analizlerin bir kısmını bozabilirler.

ADI	ANTIKOAGÜLAN GÜCÜ	ETKİ ŞEKLİ
Heparin	Amonyum, Li, 20 U/1 ml Kan	Anitrombin gibi etki ederek protrombinin trombine dönüşmesini engeller.
Heparin Na tuzları	0,2 mg	
EDTA (Na <sub>2</sub> , K <sub>2</sub> tuzları)	1-2 mg/1 ml kan	Pıhtılaşma için gerekli olan Ca'ü bağlar.
Florür (Na)	2 mg/ml kan	Bilinmiyor. Glikolik enzimlerini inhibe ettiğinden (enolaz inhibitörü) glukozu koruyucu olarak kullanılır. Akai halde glukoz 25 °C'de 10 mg/h azalır.
Sitrat (Na)	1 ml(%3,6)/9 ml kan	Ca'ü bağlar
Oksalat (Na, K, Li, amonyum)	1-2 mg/1 ml kan	Ca'ü bağlar.
Iyodasetat (Na)	2 mg/1 ml kan	Gliseraldehid 3 fosfat DH inhibisyonu.

### 16.2.1.1. Tam kanda yapılan analizler:

**Na sitratlı tam kanda yapılan analizler:** Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı (APTT), Eritrosit sedimantasyon hızı (ERS, Sed. Hızı).

**EDTA'lı tam kanda yapılan analizler:** Hemogram [Eritrosit sayısı (RBC), Hematokrit (HCT), Total hemoglobin (Hb), Ortalama hücre hemoglobini (MCH), Ortalama hücre hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), Ortalama hücre volümü (MCV), Lökosit sayısı (WBC), Platelet sayısı (trombosit sayısı, PLT)], Serotonin, Sickle Cell testi.

**Heparinli tam kanda yapılan analizler:** L-Laktat (Laktik asit), Osmotik fragilite testi (OF), Nitritler, Kan gazları ve pH, Fenil alanin

**Hemolizatta yapılan analizler:** Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (G6PD), Redüe glutatyon (GSH), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon redüktaz, Glikolize hemoglobin (Hemoglobin A<sub>1C</sub>), Hemoglobin elektroforezi.

**16.2.1.2. Serumda yapılan analizler:** Asit fosfataz, Prostatik asit fosfataz (PAP), Adenozin deaminaz (ADA), Alanin amino transferaz (ALT, SGPT), Albümin (Alb), Aldolaz (ALD), Alkalin fosfataz (ALP, AP) ve izoenzimleri, Amilaz, Serum amiloid A protein (SAA), Androstenedion, Anjiotensin konverting enzim (ACE),  $\alpha$ 1-Antitripsin, Apolipoprotein A-1 (ApoA-1), Apolipoprotein B (Apo B), Aspartat amino transferaz (AST, SGOT), Total bilirubin, Konjuge bilirubin, Kalsitonin (CT), İyonize kalsiyum, Total kalsiyum, Karsino embriyonik antijen (CEA), Seruloplazmin (Cp, bakır oksidaz), Klorür (Cl<sup>-</sup>), Total kolesterol, Kolin esteraz (S-psödokolinesteraz, SChE), Koriyonik gonadotropin (hCG), Bakır (Cu), C-Peptid, Kreatin kinaz (CK) ve izoenzimleri, Kreatinin, Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S, DHEA-SO<sub>4</sub>), Dihidrotestosteron (DHT), Enolaz, Nöron spesifik enolaz (NSE), Estradiol (E2), Serbest estriol (FE3), Total estriol (E3), Estron (E1), Ferritin,  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), Folat, Fruktozamin, Gastrin, Glukoz,  $\gamma$ -Glutamil transferaz (GGT, glutamil transpeptidaz), Total Heksozaminidaz ( $\beta$ -N-Asetil glukozamin, NAG), Heksozaminidaz A, Heksozaminidaz B, Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-C), 17-Hidroksi progesteron (17-OHP), Serbest insülin, Demir (Iron, Fe), Total demir bağlama kapasitesin (TIBC), İzositrat dehidrojenaz (ICD), Laktat dehidrojenaz (LD, LDH) ve izoenzimleri, Lösin amino peptidaz (LAP), Lipaz, Lipoprotein (a) [Lp(a)], Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-C), Magnezyum (Mg), Miyogloblin (Mb), 5'-Nükleotidaz (5'-NT), Osteokalsin, Paratiroid hormon (Paratirin, PTH), İnorganik fosfor (Pi), Plasental laktojen (PL), Potasyum (K), Pregnenolon, Progesteron (P<sub>4</sub>), Prolaktin (PRL), Prostat spesifik antijen (PSA), Total protein, Protein elektroforezi, Pirüvat kinaz (PK), Sodyum (Na), Serbest testosteron, Total testosteron, Tirotropin (Tiroid stimülan hormon, TSH), Serbest tiroksin (FT4), Total tiroksin (T4), Transferrin (siderofilin), Trigliseridler (TG), Serbest triiyodotironin (FT3), Total triiyodotironin T3), Troponin-I (kardiyak spesifik), Troponin-T (kardiyak spesifik), Üre azotu (BUN), Ürik asit, Vitamin B12, Vitamin A (Retinol), Vitamin C, 1,25-Dihidroksi Vitamin D (1,25-Dihidroksi kalsiferol) Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol).

### 16.2.1.3. Plazmada yapılan analizler:

**EDTA'lı plazmada yapılan analizler:** Adrenokortikotropik hormon (ACTH), Aldosteron, Amonyak (NH<sub>3</sub>), Antidiüretik hormon (ADH), Anti-DNA, Antimitokondriyal antikor, Antinötrofilsitoplazmik antikor (ANCA), Antinükleer antikor (ANA), Glukagon, Plazma renin aktivitesi (PRA).

**Na-sitratlı plazmada yapılan analizler:** Antitrombin III (AT-III), Protein S, Protein C, Faktör II, V, VII, X, Faktör VIII, IX, XI, XII, Protrombin zamanı (PT), Fibrinojen, Plazminojen (PMG), Plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1).

**Heparinli plazmada yapılan analizler:** Hidroksiprolin (Hyp)

**16.2.1.4 Kan numunelerinin alınması:** Kan analizleri için ven, arter veya kapillerden kan alınır.

*Venöz kan*, genel olarak tercih edilen kandır ve vene girilerek (flebotomi) alınır.

*Arteriyel kan*, kan gazları analizi için alınır.

*Kapiller kan*, periferik yayma (formül lökosit) yapmak için ve çocuklardan bazı analizler için alınır.

**Venöz kan alınması:** Tam kan, kan hücreleri veya plazma kullanılacaksa, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) tayini yapılacaksa antikoagulanlı tüplere kan alınır. Serum kullanılacaksa antikoagulansız tüpe kan alınır. Venöz kan, enjektör iğnesiyle alınıp tüplere boşaltılır veya iğne ucu ile vakumlu tüplere alınır. Kan alınacak vakumlu tüpler, kapak renklerine göre özellik gösterirler.

Kapak rengi	Hedef materyal	İçerik
Gri	Plazma/tam kan	Na/K Oksalat, Na florür, Na iyodoasetat
Sarı	Steril kan	
Yeşil	Plazma/tam kan	Na/Li/NH <sub>4</sub> Heparin
Kırmızı	Serum	
Kırmızı/siyah	Serum	Seperatör jel
Mavi	Plazma/tam kan	Na sitrat
Lavanta	Plazma/tam kan	Na <sub>2</sub> /K <sub>2</sub> EDTA
Siyah	ESR tayini	Na Sitrat

**Venöz kan alınmasında dikkat edilecek hususlar:** Hasta 10-12 saat aç olmalıdır. Hasta en az 15 dakika kadar rahat bir pozisyonda bulunmalıdır. Kol omuz hizasında düz durmalıdır. Hasta mastektomili ise kan sağlam taraftan alınmalıdır. Hem geniş hem yüzeye yakın damar seçilmelidir. Hastaya İV infüzyon yapılıyorsa infüzyona 5 dakika ara verdikten sonra kan alınmalıdır. Proximale en fazla 1 dakika uygun sıkılıkta turnike uygulanmalıdır. Enjektöre alınmış kan, hemoliz olmaması için, iğne çıkarıldıktan sonra yavaşça ve tüp kenarından kaydırarak tüpe boşaltılmalıdır.

**Hemoliz**, eritrositlerin parçalanmasıdır. Hemoliz sonucunda, eritrosit içindeki maddeler seruma geçerler. Serumda hemoglobin konsantrasyonu 20 mg/dL'nin üzerinde olursa hemoliz olduğu gözle anlaşılır. Hemoliz olması durumunda hücre içindeki konsantrasyonları hücre dışındakinden yüksek olan maddelerin serumdaki konsantrasyonları anormal yüksek bulunur. Aldolaz, asit fosfataz, LDH enzimleri ile K, Mg ve fosfatlar hemoliz durumunda yüksek bulunur. Genel bir ifade olarak hemoliz, 400-500 nm arasında okunan deneyleri bozabilir.

-Kan almaya başlamadan önce hastanın adı sorularak kimliği doğrulanmalıdır.

-Diurnal değişim gösteren kan testleri için kan alma zamanı önemlidir.

-Hastanın 10-12 saat aç olduğu öğrenilmelidir.

- Hasta rahatça oturtulmalı ve kan almadan önce 20 dakika kadar bu pozisyonda kalmalıdır.
- Hastanın kolunu omuzdan bileğe kadar düz uzatması sağlanmalıdır.
- Büyük yaralı veya hematumlu koldan, mastektomili kadınlarda memenin alındığı taraftaki koldan kan alınmamalıdır.
- Hastadan ne kadar hacimde kan alınacağı belirlenmeli, istenen testler için uygun sayıda ve türde tüp ve uygun iğne seçilmelidir. En sık kullanılan iğneler 19-22 numaradır (numara büyüdükçe çap küçülür, normal erişkinde genellikle 20 numara iğne tercih edilir).
- Uygun ven seçilir. Yetişkinlerde antekubital fossada kalın ve derinin yüzeyine yakın ven tercih edilir. Elle yoklama ven seçimini kolaylaştırır. İnfüzyon yapıyorsa infüzyon 3 dakikalığına durdurulmalı ve sonra tercihan diğer koldan kan alınmalıdır.
- Kan alınacak bölgenin çevresi, %70'lik izopropanolle doymuş gazlı bezle, dairesel hareketlerle ve kan alma bölgesinden dışa doğru temizlenmelidir.
- Derinin kendi kendine kuruması beklenmelidir.
- Kan alma bölgesinin 10-15 cm üzerinden turnike uygulanır.



Turnikenin uzun süre tutulması kanın bileşimini belirgin değiştirir.

- Vene girilmeden önce yumruk açılıp kapatılmamalıdır; bu hareket, plazma potasyum, fosfat ve laktat konsantrasyonlarını artırır.

**Vakumlu kan tüpüne kan almak için**, kan alma tüpü tutucusuna iğnesi vidalanır. Vene girmek için iğne, kan alınacak venle hizalanmalı ve deriye yaklaşık 15 derecelik açı yapacak şekilde venin içine itilmelidir.

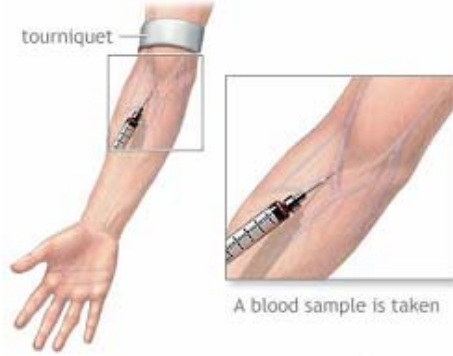


İğne yerine yerleştikten sonra tüp, tıpayı delmek ve vakumu boşaltmak amacıyla ileri (adaptöre doğru) bastırılmalıdır. Kan tüpün içine akmaya başladığında iğne hareket ettirilmeden turnike gevşetilmelidir.

Vakum bitinceye kadar tüp doldurulur, sonra tüp adaptörden çekilir ve yerine başka tüp sokulur. Önce katkı maddesiz tüplere sonra katkı maddeli tüplere kan alınır.

**Enjektöre kan almak için**, iğne enjektörün ucuna sıkı bir şekilde yerleştirilir ve iğnenin üzerindeki kılıf çıkarılır.

Enjektör ve iğne kan alınacak vene paralel tutulur ve iğne deriye yaklaşık 15 derecelik bir açıyla venin içine itilir. Ven duvarı delinirken ilk anda hissedilen direnç ortadan kalktığı zaman, enjektördeki basınç gevşer ve piston geri çekilirken enjektöre kan dolar.



-İkinci enjektöre kan alınacaksa, iğne sabit tutularak takılı enjektör nazik fakat çabuk çekilir ve ikinci enjektör yerleştirilir, kan almaya devam edilir.

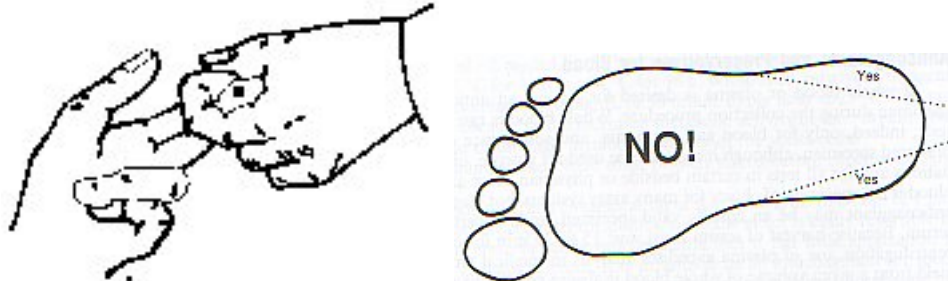
-Enjektöre alınmış kan, hemoliz olmaması için, iğne enjektörden uzaklaştırıldıktan sonra, hazırlanmış tüplere yavaşça ve tüp kenarından kaydırarak dikkatli bir şekilde aktarılmalıdır.

-Tüplerin ağzı kapatılmalı, tüplerin içinde katkı maddesi veya antikoagulan varsa tüpler yavaşça 5-10 kez ters çevirerek karıştırılmalıdır.

-Kan alma işlemi tamamlandığında, iğne geri çekilir ve sızıntı olmaması için hastaya kuru gazlı bez veya pamuk verilerek kan alınan bölgeye bastırması ve kolunu yukarıya doğru tutması söylenir.

-Kullanılan ve kirlenen malzemeler uygun atık kaplarına atılır.

**Kapiller kan alınması:** Kapiller kan, elin 3., 4. veya 5. parmak ucundan, kulak memesinin alt kenarından, bebeklerde topuktan veya ayak baş parmağından alınır.



-Kan alınacak bölge %70 izopropanol içinde bekletilmiş gazlı bezle temizlenir

-Alkolün tamamen buharlaşması beklenir

-Lanset çabuk bir şekilde saplanır. Kesinin derinliği 2,5 mm'yi geçmemelidir.

-Parmak, kan alınmasını kolaylaştıracak ve yer çekiminden yararlanılacak şekilde tutulmalıdır. Kan akışını uyarmak için parmağa masaj yapılmamalıdır.

-Kanın ilk damlası silindikten sonra, ardından açığa çıkan damlalar, bastırılmadan nazik bir şekilde uygun tüplere alınır. Pıhtılaşmayı önlemek için tüp hızlı doldurulmalı, tüpün içine hava kabarcıklarının girmesi önlenmelidir.

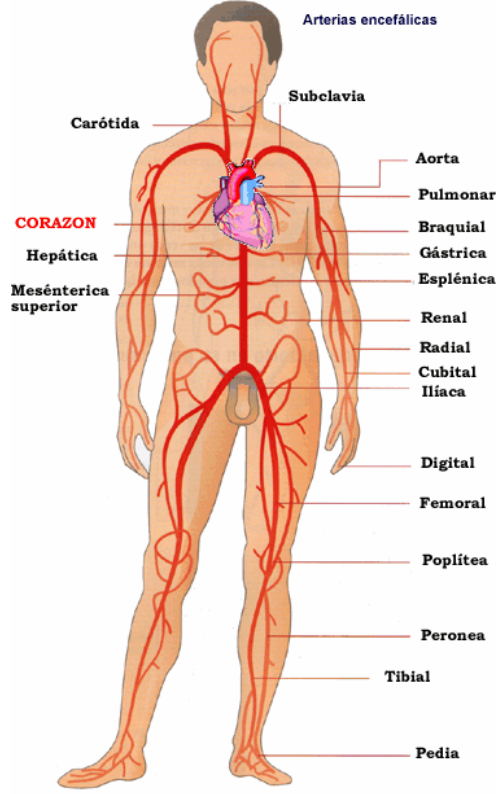
-Kan, kapiler tüplere kapiler etki ile de alınabilmektedir.

-Yeni doğan taramaları için filtre kağıdına kan alma işleminde filtre kağıdı, büyük bir kan damlasına nazikçe bastırılır. Kan işaretli dairenin içini dolduruncaya kadar kağıda nüfuz etmesi sağlanır.

-Emilimin tam olup daireyi doldurduğundan emin olduktan sonra bütün daireler doluncaya kadar işlem tekrarlanır.

-Filtre kağıdı havada kurutulur.

**Arteriyel kan alınması:** El bileğindeki radial arterden, dirsekteki brakial arterden, kasıktaki femoral arterden, yeni doğanlarda umbilikal arterden (kateter ile)



- Arter kanını hekim veya tecrübeli bir hemşire almalıdır.
- Uygun arter seçimi yapılır. Femoral arterden sızma olasılığı nedeniyle kol bölgesi tercih edilir.
- Bölge temizlenir, turnike gerekmez.
- Steril eldiven giyilerek damar 2. ve 3. parmaklarla palpe edilir ve iki parmak arasından enjektör dik olarak tutularak artere girilir.
- Heparinize enjektör kullanılır.
- Enjektör, arterin basıncıyla kendi kendine dolar ve hava kalmaz.
- Enjektörün iğnesi kıvrılmalı ve buz üzerinde olarak, hava alması engellenerek çabucak laboratuvara ulaştırılmalıdır.

### 16.2.2 İdrar numuneleri

**Tek örnek (spot idrar, porsiyon idrar, rutin idrar, random idrar örneği):** Herhangi bir zamanda alınan idrar örneği.

**Random idrar örneğinde yapılan analizler:** Rutin idrar analizi [Spesifik gravite (dansite), pH, Glukoz, Albumin (protein), Bilirubin, Ürobilinojen, Aseton (keton cisimleri), Nitrit, İdrar sedimenti], Mikroalbuminüri testi, Koriyonik gonadotropin (hCG), Total Heksozaminidaz (NAG), Mukopolisakkaridler (MPS), Porfobilinojen (PBG), Porfirinler, Osmolalite, Hemoglobin (gizli kan).



**Sabah idrarı**, sabah yataktan kalkınca yapılan ilk idrardır. Sabah idrarı, genellikle bir biyokimya laboratuvarında rutin idrar incelemeleri için tercih edilir. Sabah idrarı, gün boyunca alınacak örneklerden daha yoğun ve daha asittir.

**Postprandial idrar**, yemekten iki saat sonra alınan idrardır. Bu örnekte patolojik durumlarda protein ve glukoz bulunması daha fazla olasıdır.

**24 saatlik idrar**, 24 saat boyunca toplanan idrardır. 24 saatlik idrar toplanacağı zaman sabah kalkınca örneğin saat 08.00'de dışarıya idrar yapılarak mesane boşaltılır. Bundan sonra 24 saat boyunca yapılan tüm idrarlar ve 24 saat sonunda (ertesini gün saat 08.00'de) yapılan idrar bir kapta toplanır. Solut maddelerin idrarda gün boyu değişim göstermeleri nedeniyle, kimyasal analizlerin çoğu için 24 saatlik idrar gerekir. 24 saatlik idrarda kreatinin, erkekte 20-26 mg/kg vücut ağırlığı kadar ve kadında 14-22 mg/kg vücut ağırlığı kadardır ki idrarda kreatinin tayini ile, toplanan idrarın 24 saatlik olup olmadığı kontrol edilebilir.

**24 saatlik idrarda yapılan analizler:** Albümin, Aldosteron, Amino asitler (total),  $\delta$ -Aminolevulinik asit ( $\delta$ -ALA, ALA), Amilaz, Klorür (Cl<sup>-</sup>), Serbest kortizol, Kreatinin, Dehidroepiandrosteron (DHEA), Dihidrotestosteron (DHT), Estradiol (E2), Estriol (E3) Homovanilik asit (HVA), 17-Hidroksikortikosteroidler (17-OHCS), 5-Hidroksiindolasetik asit (5-HIAA), 17-Hidroksipregnenolon, Serbest hidroksiprolin (FHyp), Total hidroksiprolin (THyp), 17-Ketojenik steroidler (17-KGS), 17-Ketosteroidler (17-KS), Magnezyum (mg) Osmolalite, Fenil alanin, İnorganik fosfor (Pi), Porfobilinojen (PBG), Porfirinler, Potasyum (K), Pregnanediol, Pre, Ürik asit, Vanililmandelik asit (VMA)

**Gündüz idrarı**, saat 08.00-20.00 arasında toplanan idrardır.

**Gece idrarı**, saat 20.00-08.00 arasında toplanan idrardır.

**16.2.2.1. İdrar örneklerinin toplanması:** Yapılacak analizin özelliğine göre idrar toplanır.

-Herhangi bir anda ve kantitatif analiz için idrar numunesi: Sabah idrarı olması uygundur. Bu idrar daha konsantredir; nadiren çıkan maddeler kolayca tespit edilebilir.

-2, 4, 24 saat gibi belli sürelerde çıkarılan idrar numunesi: Kantitatif analizler için kullanılır. Hastaya toplama şekli iyice anlatılmalıdır. Toplama sırasında hastaya gereken diyet de uygulanabilir.

-24 saatlik idrar toplamak için temiz, steril ve renkli şişe kullanılmalıdır. Renkli şişe bulunamazsa idrar kabı karanlık bir yerde saklanmalı veya şişenin etrafı gazete ile sarılmalıdır.

-Bebekler ve küçük çocukların idrarı özel torbalar içinde toplanır. Ticari olarak sağlanan bu torbalar, çocuğun genital organlarının etrafına yapıştırılır. Çocuk idrarını yaptıktan sonra bekletilmeden laboratuvara iletilir.

-Çok kritik hastalarda idrarın bakteriyolojik analizi için, idrar yollarının tıkanıdığı durumlarda idrar, mesaneden kateterle alınır. Bu tip idrar numuneleri, ilgili hekimler tarafından toplanır.

-Bazı durumlarda erkeklerde, idrardaki kan veya iltihabın nereden kaynaklandığını anlamak için üç kap içine idrar toplanır. Bunun için, hasta bir defada boşalttığı idrarını 1.ve 3.tüpe az 2.tüpe ise daha fazla olmak üzere toplar. Her üç tüpte çıplak gözle bulanıklık, mikroskopta lökosit ve eritrosit aranır.

**16.2.2.2 İdrar örneklerinin saklanması:** İdrarın soğukta saklanması hemen her analiz için koruyucu nitelik sayılır. İdrarda kantitatif olarak tespit edilecek maddelerin sentezini, parçalanmasını veya yapı değiştirmesini önlemek için uygun koruyucunun eklenmesi gerekir. Bu koruyucular analizden analize farklıdır. En sık kullanılan koruyucu maddeler, glisiel asetik asit ve derişik hidroklorik asittir.

**Fenol veya trikrezol**, genellikle uzaktaki laboratuvarlara gönderilecek idrarlara konur. İdrarın 30 mL'sine 1 damla konmalıdır.

**Formol**, idrar sedimentinin incelenmesi için en uygun koruyucudur. İdrarın 30 mL'sine 1 damla konmalıdır. Fazla damlatılırsa üre ile çökelti oluşturur ve mikroskopik muayeneyi bozar. Glukoz tayininde de hatalara neden olur.

**Timol**, idrarın 100 mL'sine birkaç kristal eklenir. Protein analizini bozar.

**Toluol**, idrar yüzeyine ince bir tabaka halinde yayılır. İyi koruyucudur.

**Benzoik asit**, %3'lük benzoik asit veya %5'lik sodyum benzoat şekli kullanılır.

**Asetik asit, hidroklorik asit, sülfürik asit**; konsantre ise 5 mL, 6N HCl'den 10 mL 24 saatlik idrar için yeterlidir.

**Kloroform**, idrar üzerine tabaka oluşturacak şekilde ilave edilir.

**Borik asit**, 24 saatlik idrar için 1 g kullanılır.

### 16.2.3. Dışkı (feçes, gaita) örneği

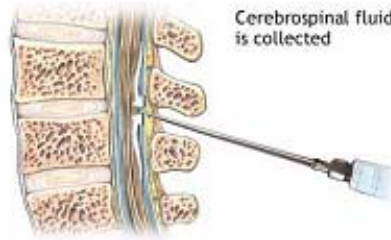
Gizli kan analizi için az miktarda dışkı yeterlidir. Test, gastrointestinal sistemdeki bir kanamayı tespit etmek için yapılır. Kan gaitanın herhangi bir kısmında gizli kalabileceğinden, analiz belli sürelerde tekrarlanmalıdır. Yalancı reaksiyonların önlenmesi için hasta üç gün süreyle proteinsiz diyetle tabi tutulmalıdır.

Barsaktan emilimin tam olup olmadığını belirlemek amacıyla 72 saatlik örnekte yağ analizi yapılır.

Gastroenterite neden olan etkenin tespiti, parazit veya yumurtasının aranması için de gaita numunesi alınır.

### 16.2.4. Beyin-omurilik sıvısı (BOS)

BOS, genellikle lomber bölgeden ponksiyonla alınır. Bazen ameliyat sırasında servikal bölgeden, beyindeki bir boşluktan veya ventrikülden sıvı alınır.



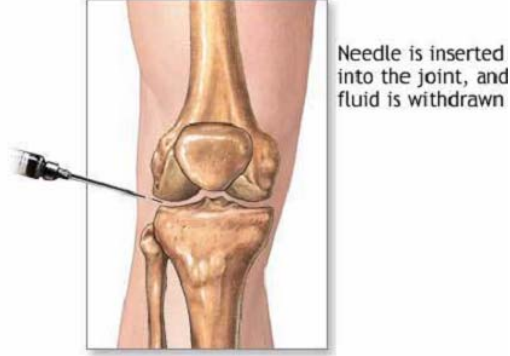
Bizzat hekim tarafından ponksiyonla alınan sıvı üç ayrı tüpe bölünür: Birinci tüp biyokimyasal ve serolojik testler, ikinci tüp mikrobiyolojik testler, üçüncü tüp mikroskopik ve sitolojik muayene için kullanılır.

Erişkinde bir kişiden 20 ml'ye kadar BOS almak zarar vermez.

BOS'ta biyokimyasal analiz için Klorür, Glukoz, Laktat Dehidrojenaz (LD, LDH), Magnezyum (Mg), pH, Potasyum (K), Sodyum (Na), Protein ölçümü (Pandy reaksiyonu) önemlidir. BOS'ta glukoz, hiç vakit geçirilmeden tayin edilmeli ve aynı anda kan glukozu da ölçülmelidir.

### 16.2.5. Sinovyal sıvı

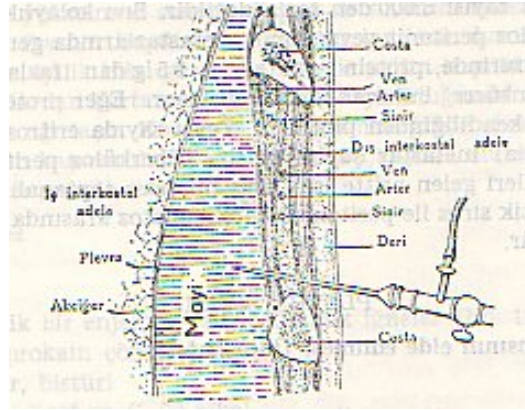
Artrosentez ile alınır.



Mikroorganizma, total lökosit, lökosit formülü, glukoz ve protein tayinleri yapılır. Na ürat kristalleri varlığını araştırma, Müsin pıhtı oluşumu testi, pH ölçümü önemlidir.

### 16.2.6. Plevra sıvısı

Torasentez ile alınır.



Plevra sıvısı gibi ponksiyon sıvılarında transüda-eksüda karakterini saptamak önemlidir. Bunun için Dansite, Protein, Glukoz, Total lipid, LDH aktivitesi, Bakır ölçümleri ve Rivalta testi yapılır.

### 16.3. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Numunelerin İşlenmesi

-Örneğin kimliklendirilmesi ve kimliklendirmenin sürdürülmesi: Materyalin alınacağı kap üzerine hasta adı, laboratuvar veya hastane numarası, tarih ve saat gibi tanıtıcı bilgiler yazılmalıdır. Kimlik bağı, örnek alma süreci, örneğin laboratuvara nakli, bunu izleyen analiz ve raporun hazırlanması aşamaları boyunca korunmalıdır.

-Örneklerin korunması: Materyal alımı veya toplanması sırasında istenen analizi etkileyecek şartların oluşumu önlenmelidir. Materyal istenen analizde değişikliğe neden olmayacak koşullarda, plastik bir çantada ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Materyal ile birlikte hasta ile ilgili demografik bilgilerin ve istenen analizlerin yazıldığı istek kağıdı da laboratuvara gönderilmelidir. Hepatit ve HIV enfeksiyonu riski taşıyan bir hasta örneği özel uyarı etiketiyle belirtilmelidir.

-Örneklerin ayrılması ve saklanması: Bazı analizler için örneğin buz üzerinde veya soğukta (4°C) taşınması, bazı analizler için örneğin ışıktan korunması önemlidir.

-Örnek transportu

-Örnek ve istek formu aynı numara ile kodlanır ve numune üzerindeki isimle istek formundaki isim karşılaştırılır.

-Örneğin çalışılacak teste uygun ve yeterli olup olmadığı kontrol edilir.

-Toplanmış olarak laboratuvara getirilen idrarın, dikkatlice volümü (hacmi) ölçülür. Hacim kaydedilir ve iyice homojen hale getirildikten sonra yeterli miktar alınıp analizde kullanılır.

-Bazı örnekler, hastadan alındıktan sonra analize kadar soğukta tutulur; buna dikkat edilmelidir. Gerekirse serum veya plazma ayırımı soğutmalı santrifüjde yapılır.

-Plazma veya serum şekilli elemanlardan santrifügasyonla ayrılır. Bu işlem, kan alındıktan sonra en geç 2 saat içinde yapılmış olmalıdır.

-Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda serum ayrıldıktan sonra da pıhtı oluşabilir. Buna dikkat etmelidir.

-Analiz hemen yapılmayacaksa serum +4, -20, -40 veya -70°C'ta ağzı kapalı olarak saklanmalıdır.

-Serum veya plazma elde edildikten sonra en geç 4 saat içinde çalışılmayacaksa +4°C'de ağzı kapalı olarak 1 gün saklanabilir. Ancak bilirubin ve askorbik asit gibi ışığa ve havaya duyarlı maddeler hemen çalışılmalıdır.

-Örneğin bulunduğu ortamın sıcaklığının fazla olması numunede buharlaşmaya ve serumdaki analitlerin konsantrasyonunda rölatif artışa neden olabilir.

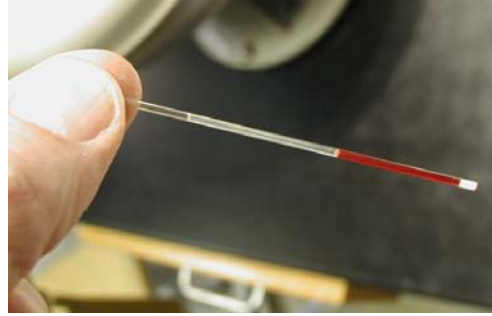
-24 saatten fazla bekletilen serum ve idrarda +4°C'de saklansa bile bakteri üremesi olabilir. Bu yüzden serumun dondurulması daha doğrudur ve bu sayede serumdaki birçok analit bozulmadan aylarca saklanabilir.

-Dondurulmuş serum çalışılacağı zaman eritilip oda sıcaklığına getirilmelidir.

-Kanı dondurmamak hemolize neden olur. Serum veya plazması ayrılmadan kanı dondurmamalıdır.

## 16.4. Klinik Biyokimya Laboratuvarından İstenen Bazı Testler

### 16.4.1. Santrifüstasyon Yöntemi ile Hematokrit (HCT, Hct) Ölçümü



1) Kapiller hematokrit pipetine, heparinli ucundan, uzunluğunun  $\frac{3}{4}$ 'üne kadar kapiller tam kan veya iyice karıştırılmış EDTA'lı venöz tam kan kapillerite ve yerçekiminden yararlanılarak doldurulur.

2) Kapiller hematokrit pipetinin kandan uzak ucu, macunla veya kapiller pipet iki parmak arasında döndürülerek alev üzerinde kapatılır.

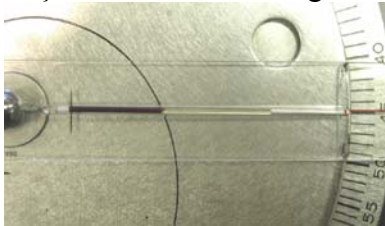
3) Kapiller hematokrit pipeti, açık ucu merkeze gelecek şekilde mikrohematokrit santrifüjündeki özel yere yerleştirilir ve yerleştirildiği yerdeki numara hastanın adına kaydedilir; hematokrit pipetinin yerleştirildiği yerin karşısındaki özel yere de bir başka hastaya ait veya boş bir hematokrit pipeti yerleştirilir.



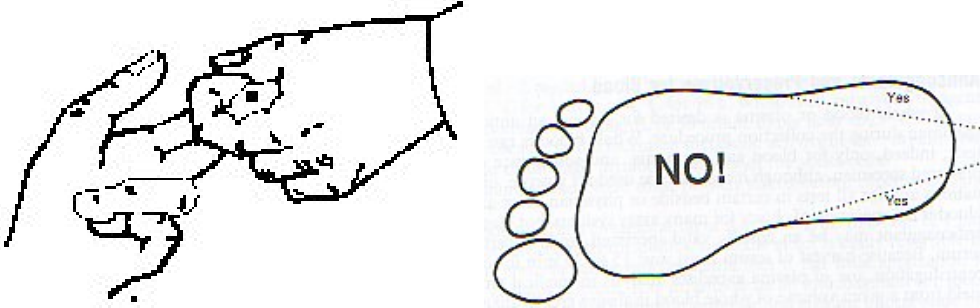
4) Hematokrit santrifüjünün kapağı kapatılır ve 4 dakika süre ile santrifüj edilir.



5) Hematokrit santrifüjünden alınan hematokrit pipeti mikrohematokrit ölçeğine uygun bir şekilde yerleştirilir ve ölçekten hematokrit değeri okunur.



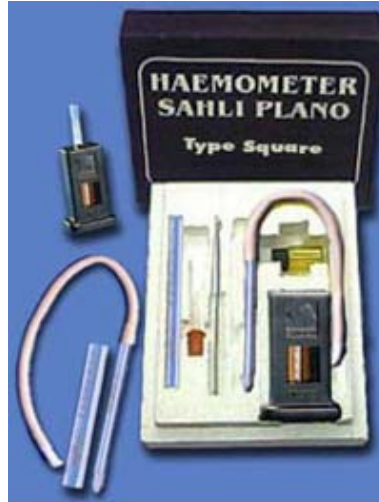
**\*\* Kapiller kanın alınması:** Kapiller kan alma yeri olarak sol elin 3.,4. veya 5. parmak ucunda orta hattın biraz yanı seçilir; kulak memesinin alt kenarından da kan alınabilir, fakat bu kanın hücresel kapsamı daha çok sapma gösterir; çocuklarda topuktan veya ayak başparmağından kan alınabilir.



Siyanozlu, ödemli, iltihaplı veya vazokonstriksiyondan dolayı soğuk yerler kapiller kan alma yeri olarak seçilmez. Kapiller kan alma yeri, eter, alkol-eter karışımı veya alkol ile temizlenir. Temizlenen yer kuruduktan sonra steril ve kuru küçük bir lanset veya enjektör iğnesi ile çabucak 2-3 mm derinliğinde delinir. Delme bazen damarlarda spazm oluşturabildiğinden bir süre kanın akması beklenir; yeteri kadar kan akıyorsa, aktif bir hiperemi sağlamak için hafif bir basınç uygulanır. İlk çıkan damla, doku sıvısı ve deri yüzeyindeki yabancı maddelerle karıştığından kullanılmaz; silinir. Daha sonra akan kana kapiller hematokrit pipetinin kırmızı çizgi ile işaretli olan heparinli ucu sokulur ve uzunluğunun ¾'üne kadar kapillerite ve yerçekiminden yararlanılarak kan ile doldurulur. Örnek alınmadan kanama durmuşsa, kan doku sıvısı ile sulanacağından aynı yerden ikinci bir delme yapılmamalıdır.

#### 16.4.2. Sahli'ye Göre Hemoglobün (Hb) Tayini

**Kullanılanlar:**



- 1) 0,1 N HCl çözeltisi(Hemoglobün miyarı): 2,1 mL konsantre HCl, distile su ile 250 mL'ye tamamlanarak sulandırılır.
- 2) Sahli hemometresi.
- 3) Hemoglobün pipeti.
- 4) Kapiller kan almak için parmak delmede gerekli lanset, alkol, pamuk.

## İşlem:



- 1) Sahli hemometresinin dereceli tüpünün kırmızı % Hb skalasındaki 10 çizgisine veya beyaz % g Hb skalasındaki 2 çizgisine kadar 0,1 N HCl (Hemoglobin miyarı) doldurulur.
- 2) Hemoglobin pipetinin 20 çizgisine kadar parmak ucundan kapiller kan (20  $\mu$ L =0,020 mL) çekilir.
- 3) Hemoglobin pipetindeki 20  $\mu$ L kapiller kan,sahli hemometresinin dereceli tüpündeki asit çözeltisinin altında tabaka oluşturmak üzere bırakılır; üst taraftaki berrak asit çözeltisi iki defa pipete çekilip boşaltılarak hemoglobin pipeti,hemometrenin dereceli tüpünün içinde yıkanır.
- 4) Hemometrenin dereceli tüpü sallanarak köpürtülmeden karıştırılır.
- 5) 10 dakika bekledikten sonra hemometrenin dereceli tüpündeki karışıma birkaç damla distile su damlatılır ve ince bir baget (veya yıkanmış olan hemoglobin pipeti ) yardımı ile karıştırılır.Daha sonra damla damla distile su eklemeye devam edilerek hemometrenin renk sütunları ile dereceli tüpteki karışımın renginin aynı olması sağlanır.
- 6) Hemometrenin renk sütunları ile hemometrenin dereceli tüpündeki karışımın rengi aynı olduğunda tüpteki karışımın üst yüzeyinin skalada denk geldiği beyaz çizgideki sayı % g Hb olarak veya kırmızı çizgideki sayı % Hb olarak, gözü bu çizgi ile aynı hizaya getirmek suretiyle okunur. Bazen dereceli tüpteki karışımın rengi hemometrenin renk sütununa göre biraz koyu olur, fakat sulandırılınca eşitlik sağlanmadan daha açık renk elde edilir; bu durumda koyu ve açık renk değerlerinin ortalaması alınmalıdır.

### Hata Kaynakları:

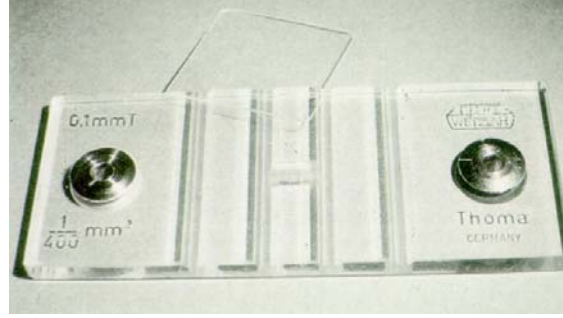
- 1) Hemometredeki renk sütunları ve dereceli tüpün skalası standart olmayabilir.
- 2) Çok yüksek lökosit değerlerinde kahverengi flokülür oluşur ve ölçme hatalı olabilir.
- 3) Yeteri kadar beklemeden sulandırma,pratik olarak hematin oluşumunu durdurur. Hemoglobinin asit hematine dönüşümü genellikle ilk dakikalarda çok hızlı, daha sonra yavaş olarak seyreder.
- 4) Bekleme zamanının uzaması durumunda, hematinin parçalanması nedeniyle yanlış değerler elde edilir.
- 5) Yaygın güneş ışığı yerine suni ışıkta okuma yapılması ve okumanın göz hizasında yapılmaması hataya neden olabilir.
- 6) Hemometreden okunan hemoglobin değeri % 40 Hb'nin altında ise ölçme hassasiyetini kaybeder. Bu durumda hemoglobin pipetine iki defa 20  $\mu$ L (toplam 40



$\mu\text{L}$ ) kapiller tam kan alınarak hemometrenin dereceli tüpüne aktarılır ve sonuç raporuna ölçüm sonunda okunan değerin hesaplanan yarısı yazılır.

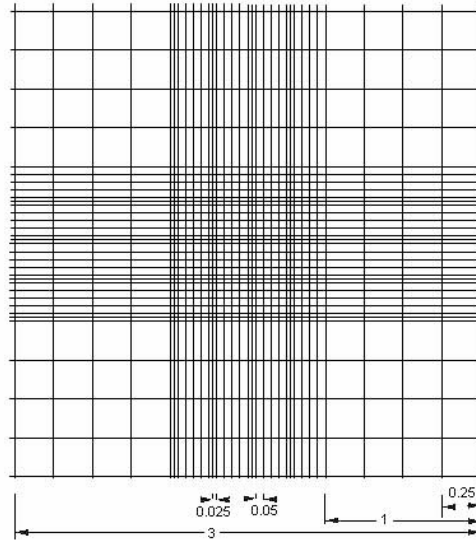
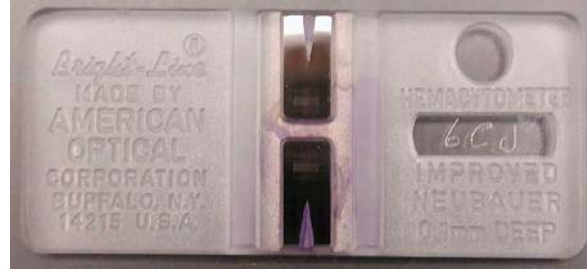
### 16.4.3. Thoma Lamı ile Lökosit Sayılması

#### Kullanılanlar:



- 1) Türk çözeltisi (Lökosit miyarı): 2,0 mL glasiyal asetik asit, 98,0 mL distile su ile sulandırılır ve ince pipet ucu ile birkaç metilen mavisi kristali eklenip karıştırılır.
- 2) Thoma sayma kamarası (Thoma Lamı)
- 3) Lökosit sulandırma pipeti: Beyaz boncukludur, 0 - 11 bölmelidir.
- 4) Kapiller kan almak için parmak delmede gerekli lanset, alkol, pamuk.

#### İşlem:



- 1) Beyaz boncuklu lökosit sulandırma pipetinin 0,5 çizgisine kadar parmak ucundan direkt olarak kapiller kan çekilir ve daha sonra pipetin ucu silinip 11 çizgisine

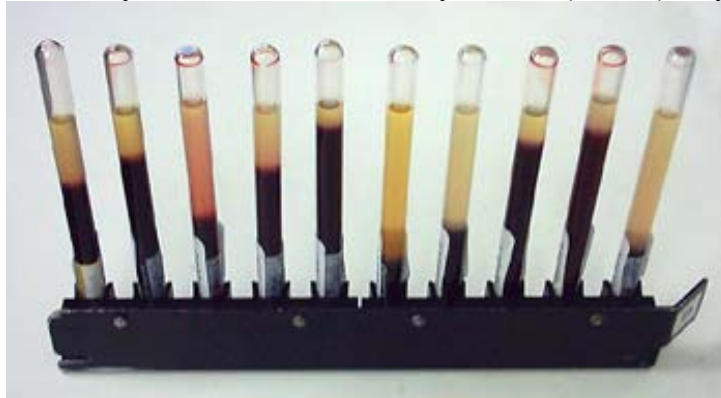
kadar da Türk çözeltisi(Lökosit miyarı) çekilir. Böylece kan 20 misli sulandırılmış olmaktadır; lökosit sayısının çok fazla olması durumunda 0,1 çizgisine kadar kan ve 11 çizgisine kadar Türk çözeltisi çekilerek 100 misli sulandırma yapılabilir; lökosit sayısının çok az olması durumunda da 1 çizgisine kadar kan ve 11 çizgisine kadar Türk çözeltisi çekilerek 10 misli sulandırma yapılabilir.

- 2) Pipet iki ucunu kapatacak şekilde bir elin baş ve orta parmakları arasında tutulup sallanarak kan ve Türk çözeltisinin iyice karışması sağlanır.
- 3) Kalın bir lamel, Thoma laminin hafifçe nemlendirilmiş iki yüksek sütunu üstünde iki elin parmakları ile bastırılarak Newton'un renkli tayfları görülünceye kadar arkadan öne doğru yavaşça sürmek suretiyle Thoma laminin üzerine kapatılır.
- 4) Lökosit sulandırma pipetinde yeniden iyice karıştırılmış olan karışımın ilk 4damlası dışarıya atılır, sonra pipet ucunda yarı asılı damla oluştuğunda Thoma laminin orta platosu üzerine lamelin kenarından pipetin ucu değdirilerek kapiller kuvvetle sayma kamarasının dolması beklenir; bu sırada sıvının yan oluklara taşmaması ve hava kabarcıklarının oluşmaması gerekir.
- 5) Thoma lamı yaklaşık 3 dakika düz bir yere bırakılarak hücrelerin düzgün dağılması beklenir.
- 6) Sayma kamarası mikroskop tablasına konur ve küçük büyütme ile  $1\text{mm}^2$ 'lik sayma alanının tümündeki lökositler sayılır. Önce yandan bakılarak objektif sayma alanının ortasına getirilir, sonra okülerden bakılarak makro ve mikro-vida ile hücrelerin net görülmesi sağlanır; bölmeleme çizgisi hiç belirmemişse, mikro-vida oynatılarak çizgiler aranmalı ve kondensatör veya diyafram ile ışık ayarlanmalıdır; eğer bir çizgi seçiliyorsa onun boyunca gidilerek bu çizgiyi kesen çizgi ve sayma alanı aranır.
- 7)  $1\text{mm}^2$ 'lik sayma alanının tümünde sayılan lökosit sayısı 20 misli sulandırma halinde 200 ile çarpılarak  $1\text{mm}^3$  kandaki lökosit sayısı bulunur ve rapor edilir.

#### **Hata Kaynakları:**

- 1) Boyanmış toz parçacıkları lökosit ile karıştırılabilir; lökositlerde çekirdeği çevreleyen plazmaya dikkat edilmelidir.
- 2) Kanda çok sayıda eritroblast varsa, sayma kamarasında güçlükte ayırt edilir ve lökosit diye sayılabilirler.
- 3) En iyi bir teknikte bile % 10 - 15 hata olduğu unutulmamalıdır.

#### **16.4.4. Westergren Makroyöntemi ile Sedimentasyon Hızı (E.S.R.) Tayini**



2 mL'lik enjektöre 0,4 mL %3,8'lik sodyum sitrat çözeltisi ve 1,6 mL venöz kan çekilir.

Sodyum sitrat çözeltisi ile kan enjektörde karıştırılır.

Enjektördeki kan, köpürtülmeden ve hemoliz edilmeden Westergren sedimantasyon pipetinin 0 çizgisine kadar doldurulur.

0 çizgisine kadar %3,8'lik sodyum sitratlı kan doldurulmuş olan Westergren sedimantasyon pipeti, Westergren sedimantasyon aletindeki yerine dik olarak yerleştirilir.



Westergren sedimantasyon aletindeki yerine dik olarak yerleştirilen pipetteki eritrosit sütununun yüksekliği, pipet üzerindeki skaladan, ½ saat ve 1 saat sonra okunur. Sedimantasyon sonucu ½ saatte mm ve 1 saatte mm olarak rapor edilir.

**Hata kaynakları:**

- 1) Westergren pipetinin alettaki yerine eğri yerleştirilmesi sedimantasyonu hızlandırır.
- 2) Sodyum sitratın az oluşu sedimantasyonu hızlandırır.
- 3) Kan çekildikten sonra 5 saat içinde tayin yapılmazsa sedimantasyon yavaşlar.
- 4) Sedimantasyon, sıcak havada hızlanır; soğuk havada yavaşlar.

**16.4.5. Duke Metodu ile Kanama Zamanı Tayini**



Kulak memesi veya parmak ucu, alkol veya alkol-eter karışımı ile temizlenir.

Temizlenen yerde, lanset ile 4 mm derinliğinde bir delme yapılır ve hemen kronometre çalıştırılır.

Bundan sonra her 30 saniyede bir, delme yerinin üzerindeki kan bir filtre kağıdına emdirilerek alınır.

Kanama durduğu anda kronometre de durdurulur ve okunur.

Kronometrede okunan zaman değeri kanama zamanı olarak belirlenir.

**Hata kaynakları:**

- 1) Nasırlaşmış ve sklerotik yerlerden delme yapılması durumunda kanama zamanı kısa bulunur.
- 2) Delme yerinin çevresine basınç uygulanması, doku trombokinazının kanla temasına ve sonuçta kanama zamanının kısalmasına neden olur.

**16.4.6. Lam Metodu ile Pıhtılaşma Zamanı Tayini**

Parmak ucu, alkol veya alkol-eter karışımı ile temizlenir.

Temizlenen yerde, lanset ile 4 mm derinliğinde bir delme yapılır ve hemen kronometre çalıştırılır.

Delme yerinden akan kandan 1-2 damla bir lam üzerine alınır.

Bundan sonra kan içinde fibrin oluşup oluşmadığı, kan belli aralıklarla lanset ile yoklanarak araştırılır.

Lansetin ucuna fibrin lifleri takıldığı an kronometre durdurulur ve okunur.

Kronometrede okunan zaman değeri pıhtılaşma zamanı olarak belirlenir.

**16.4.7. İdrarda Bence-Jones Proteini Araştırılması (Bradshaw Testi)**

Bir deney tüpüne 5 mL konsantre HCl konur.

Deney tüpündeki konsantre HCl üzerine 7-8 mL idrar tabakalandırılır.

HCl ile idrar arasındaki temas yüzeyinde **mor halka** oluşup oluşmadığına bakılır:

Mor halka gözlenirse idrarda Bence-Jones proteini pozitif (+)'dir.

Mor halka gözlenmezse idrarda Bence-Jones proteini negatif (-)'dir.

**16.4.8. İdrarda Fenilpirüvik Asit Araştırılması [Ferrik klorür (FeCl<sub>3</sub>) testi]**

Bir deney tüpüne 5 mL taze idrar konur.

Deney tüpündeki taze idrar üzerine birkaç damla 1N HCl damlatılarak idrar asitlendirilir (test için idrar taze ve pH'ı 2-3 olmalıdır).

Deney tüpündeki asitlendirilmiş idrar üzerine 5-6 damla %10'luk FeCl<sub>3</sub> çözeltisi damlatılır ve karıştırılır.

Deney tüpündeki karışımda 30 dakika kadar stabil **yeşil renk** oluşup oluşmadığına bakılır:

Yeşil renk oluşumu gözlenirse idrarda fenilpirüvik asit pozitif (+)'dir.

Yeşil renk oluşumu gözlenmezse idrarda fenilpirüvik asit negatif (-)'dir.

*İdrarında 100-300 µg/mL fenilpirüvat bulunan fenilketonüri (FKU)'lilerin idrarında test pozitif (+)' dir. Fenilketonüri (FKU)'li bebeklerin %50' sinde test çeşitli nedenlerle negatif (-)' dir.*

*Hayatın ilk haftasında fenilketonüriyi yenidoğanların idrarında test negatif (-)' dir. Proteinden fakir diyetle beslenen bazı bebeklerde fenilketonüri gizli kalabilir; testten önce bebekler en azından 24 saat süt ile beslenmelidirler.*

*Hepatit veya direkt bilirubin artışında da idrarda bilirubin varlığına bağlı olarak yeşil renk oluşabilir; fakat bu durumda oluşan yeşil renk 30 dakika stabil değildir. Histidinemide de idrarda imidazolpirüvik asit varlığına bağlı olarak yeşil renk oluşabilir; fakat bu durumda oluşan yeşil renk hızla solar. Alkaptonüride de idrarda Homogentizik asit varlığına bağlı olarak mavi - yeşil renk oluşabilir; fakat bu durumda oluşan mavi - yeşil renk hızla solar. Lizol ile zehirlenmede de idrarda lizol varlığına bağlı olarak yeşil renk oluşabilir.*

#### 16.4.9. İdrarda Mukopolisakkarid Araştırılması (Toluidine Blue Testi-Leke Testi)

##### Kullanılan reaktifler :

- 1) 0,2 M Asetat tamponu (pH 2): 250 mL balon jöjeye 50 mL 1 N Na-asetat çözeltisi (6,8 g Na-asetat-3H<sub>2</sub>O distile suda volüm 50 mL'ye tamamlanarak çözülür) konur ve üzerine 52,5 mL 1 N HCl eklenir, daha sonra distile su ile volüm 250 mL'ye tamamlanır.
- 2) % 0,04 Toluidine blue: 100 mg Toluidine blue, 250 mL asetat tamponda çözülür.
- 3) % 96 Alkol
- 4) Kondroitin sülfat-C test çözeltisi: 250 mg Kondroitin sülfat-C, 100 mL fizyolojik NaCl çözeltisinde çözülür.

##### Testin yapılışı :

- 1) 0,25 mL idrar, filtre kağıdı üzerine bir saç kurutma cihazı ile sağlanan sıcak hava akımı altında damlatılır ve sürdürülen sıcak hava akımı ile filtre kağıdı üzerinde kurutulur.
- 2) Kurutulan filtre kağıdı 1 dakika süre ile Toluidine blue çözeltisinde bekletilir.
- 3) Toluidine blue çözeltisinden çıkarılan kurutma kağıdı alkol ile iyice yıkanır.
- 4) Kurutma kağıdı üzerinde idrar damlatılan yerde menekşe rengi leke olup olmadığına bakılır:

Menekşe rengi leke oluşumu gözlenirse test pozitif (+)'dir.

Menekşe rengi leke oluşumu gözlenmezse test negatif (-)'dir.

*\*\*Hasta idrarı yerine Kondroitin sülfat-C test çözeltisi (veya sağlıklı yenidoğan idrarı) kullanılarak kontrol testi yapılır.*

*\*Bağ dokusu hastalığı olan mukopolisakkaridozlarda, çeşitli glikozaminoglikanların enzimatik yıkılımlarında doğumsal defektler vardır. Bu nedenle asit mukopolisakkaridler ve çeşitli türevlerinin idrarla atılımı artmıştır.*

*\* Test, mutlak bir doğruluğa sahip değildir.*

#### 16.4.10. BOS'ta Pandey Reaksiyonu

Bir saat camı içine yaklaşık 1 mL kadar Pandey ayırıcı konur ve saat camı siyah bir zemin üzerine yerleştirilir.

Saat camındaki Pandey ayırıcı üzerine 1 damla BOS damlatılır.

Pandey ayırıcı üzerine 1 damla BOS damlatılmasıyla belirgin bulutlanma veya şiddetli bir bulanıklık gözlenmesi Pandey (+) olarak rapor edilir.

Belirgin bulutlanma veya şiddetli bir bulanıklık gözlenmemesi Pandey (-) olarak rapor edilir.

Hafif bulanıklık gözlenmesi normaldir.

Pandey (+) sonuç, BOS'ta globulin artışını gösterir.

*\*Pandey ayırıcı: 8-10 g fenol 100 mL distile suda çözülür; çözelti birkaç saat 37°C'deki etüvde ve sonra oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra üst kısmı kullanılır. Pandey ayırıcı berrak olmalı ve koyu renkli şişede saklanmalıdır.*

#### 16.4.11. Sinoviyal Sıvıda Musin Pıhtı Formasyon Testi

1 kısım sinoviyal sıvı ile 4 kısım %2'lik asetik asit bir cam tüpte bir cam çubukla karıştırılır.

Sinoviyal sıvı ile %2'lik asetik asidin bir cam tüpte bir cam çubukla karıştırılması sonucu kompakt kitle oluşması normaldir ve musin pıhtı formasyonu (+) diye rapor edilir.

Parçalanmış kitle oluşması inflamasyonu gösterir ve musin pıhtı formasyonu (-) diye rapor edilir.

#### 16.4.12. Plevral Ponksiyon Sıvısında Rivalta Testi



Distile su ile doldurulmuş deney tüpüne 2 damla %10'luk glasiyal asetik asit damlatılır ve karıştırılır.

Tüpteki karışıma santrifüj edilmiş ponksiyon sıvısının üst kısmı damlatılır.

Glasiyal asetik asit damlatılmış distile su içine ponksiyon sıvısı damlatılmasıyla sigara dumanı şeklinde bulanıklık oluştuğunun gözlenmesi, eksüdada globuline benzer cisimlerin varlığını gösterir ve Rivalta (+) olarak rapor edilir.

Glasiyal asetik asit damlatılmış distile su içine ponksiyon sıvısı damlatılmasıyla sigara dumanı şeklinde bulanıklık oluştuğunun gözlenmemesi Rivalta (-) olarak rapor edilir.

#### 16.4.13. Plevral Ponksiyon Sıvısında Eter Özütlemesi Testi

Bir deney tüpünde eşit miktarlarda bulanık plevra sıvısı ile eter karıştırılır.

Eter ile karıştırma sonucunda bulanık plevra sıvısı berraklaşırsa bulanıklığın nedeni şilotorakstır ve eter özütlemesi testi (+) olarak rapor edilir.

Eter ile karıştırma sonucunda da bulanık plevra sıvısı berraklaşmazsa bulanıklığın nedeni şilotoraks değildir ve eter özütlemesi testi (-) olarak rapor edilir.

#### 16.4.14. Wohlk Deneyi ile İdrarda Laktoz Aranması

Bir deney tüpüne 5 mL idrar, 2-3 mL derişik amonyak ve 5 damla %10'luk KOH konup karıştırılır.

Karışım, 50-70°C'lik su banyosunda ısıtılır.

Karışımın ısıtılması sırasında birkaç dakika içinde kırmızı renk oluşumu gözlenmesi laktoz (+) olarak rapor edilir.

Karışımın ısıtılması sırasında birkaç dakika içinde kırmızı renk oluşumu gözlenmemesi laktoz (-) olarak rapor edilir.

## 16.5. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Analizleri Etkileyen Faktörler

Laboratuvar testleriyle elde edilen sonuçların hastada gerçek değerler olduğuna inanılır. Ancak birçok faktör bir örnekteki bir veya daha fazla madde ile ilgili analiz (ölçüm) sonucunu değiştirebilir. Laboratuvar test sonuçlarına etki eden faktörler ölçümden önce, ölçüm sırasında veya ölçümden sonra etki ederek hatalara neden olabilirler.

Esasen rutin laboratuvarlarda her zaman belli oranda hata vardır. Bu hatalar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- Numune (örnek) alınmadan önce yapılan hatalar
- Numune alınırken yapılan hatalar
- Numunenin laboratuvara ulaştırılmasında yapılan hatalar
- Laboratuvarda analize hazırlama ve analizi hazırlama sırasında yapılan hatalar
- Analiz (ölçüm) hataları
- Sonucu rapor ederken yapılabilen hatalar

Laboratuvar test sonuçlarına analizden önce etki eden faktörler topluca “Hataların Preanalitik Kaynakları” olarak da tanımlanırlar. Laboratuvar test sonuçlarına ölçümden önce etki eden faktörler örneğin alınmasından önce etkili faktörler, örneğin alınması sırasında etkili faktörler ve örneğin alınmasından sonra etkili faktörler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılarak incelenebilirler

Laboratuvar test sonuçlarını etkileyen preanalitik faktörler iki sınıfa ayrılarak incelenebilirler:

- Kontrol edilebilen faktörler
- Kontrol edilemeyen faktörler

### 16.5.1. Laboratuvar test sonuçlarını etkileyen, kontrol edilebilen preanalitik faktörler:

- Postür (hastanın duruşu)
- Sürekli yatma ve hareketsizlik
- Egzersiz
- Sirkadiyen varyasyon (gün içi değişiklikler)
- Seyahatler
- Alınan gıdaların etkisi
- Sigara ve alkolün etkisi
- İlaç kullanımı ve transfüzyonun, ateşin etkisi

**Postürün analiz sonuçlarına etkisi:** Normal bir erişkinin dik oturma halindeki kan hacmi, yatay pozisyondaki kan hacminden 600-700 ml daha azdır (%10'luk azalma). Plazma hacmindeki azalma daha fazladır. Bütün proteinlerin konsantrasyonu artar. Proteine bağlı taşınan ilaçlar, kalsiyum, bilirubin konsantrasyonu artar. Glomerüler permeabilite artışına bağlı ortostatik proteinüri görülebilir.

**Birkaç günlük yatak istirahatinde** plazma ve ekstrasellüler sıvı hacmi düşer. Hematokrit %10 artar. Uzun süreli yatak istirahatinde sıvı retansiyonu olur. Serum proteinlerinde azalma meydana gelir. İdrarda azotlu maddeler, kalsiyum, sodyum, potasyum, fosfat ve sülfat miktarları artar. İdrarla katekolamin ve VMA, H<sup>+</sup> atılımı azalır.

**Egzersiz analiz sonuçlarına etkisi:** Egzersizin vücut sıvılarına etkisi, fizik aktivitenin süre ve derecesine bağlıdır. Orta derecede egzersiz, serum glukozunu ve insülin seviyesini artırır. İskelet kası faaliyeti arttığında pirüvat ve laktat da artar. Renal kan akımı azalır; serum kreatinin düzeyi artabilir. Arteriyal pH ve pCO<sub>2</sub> azalır. İskelet kasına ait enzimler (CK, AST, LDH, Aldolaz) artar. Ağır egzersizde hematüri ve proteinüri de görülebilir.

**Sirkadiyen varyasyon (gün içi değişiklikler):** Oturuş biçimi, fizik aktivite, yenilen besinler, stres, aydınlık-karanlık, uyku gibi faktörler, bazı maddelerin düzeylerinde gün içi değişikliklere neden olur. Serum demir, kortizol ve potasyum düzeyleri sabah yüksek öğleden



sonra düşüktür. Erkeklerde testosteron kadında prolaktin gece yükselir. TSH düzeyi saat 02.00-04.00 arasında maksimumdur. Büyüme hormonu uykuda maksimum düzeye ulaşır.

**Seyahatin analiz sonuçlarına etkisi:** Seyahat, normal sirkadiyen ritmi değiştirir. Uçuş sırasında glukokortikoid salıverilişi uyarılır; serum glukoz ve trigliserid konsantrasyonu artar. Uzun süren uçuşta sıvı ve sodyum retansiyonu olur.

**Alınan gıdaların analiz sonuçlarına etkisi:** Gıda alınmasına bağlı olarak serum glukozu, demir, total lipid ve alkalen fosfataz düzeyleri yükselir. Akşam proteince zengin gıda alınmışsa serum üre, fosfor ve ürat konsantrasyonu 12 saat sonra da yüksek olabilir. Kafein, kan bileşenlerinin konsantrasyonunu değiştirir; glukoz, kortizol, serbest yağ asitlerini, trigliserid ve total lipid seviyelerini yükseltir. Soğan, plazma glukozunu ve glukoz insülinin cevabını azaltır.

**Sigaranın analiz sonuçlarına etkisi:** Adrenal medullayı uyarmak suretiyle nikotin, plazma epinefrin konsantrasyonunu artırır. Sigara içiminden sonraki on dakika içerisinde plazma glukoz seviyesi 10 mg/dl yükselir. Glukoz yükselmesine insülin cevabı gecikir. Plazma büyüme hormonu seviyesi sigara içimiyle yükselir. Sigara içenlerde  $\beta$ -lipoprotein, kolesterol, TG düzeyi yüksektir. Sigara içenlerde kan eritrosit sayısı daha yüksektir.

**Alkolün analiz sonuçlarına etkisi:** Sarhoş edecek kadar alkol alımı kan glukoz seviyesini %20-50 oranında artırır. Bu artış diyabetlilerde daha fazladır. Laktat ve ürat seviyesi artar. Hipertrigliseridemi görülür. Alkol intoksikasyonu (zehirlenmesi), plazma kortizol ve katekolaminlerinin artmasına yol açar. Akut alkol alımı erkekte hızlı bir testosteron azalmasına ve LH yükselmesine sebep olur.

**İlaç kullanımının analiz sonuçlarına etkisi:** İlaçların laboratuvar testlerine hem in vivo hem in vitro etkileri vardır. İM enjeksiyon, kas irritasyonuna ve kas enzimlerinin (CK, Aldolaz, LDH gibi) artışına yol açar. Morfin ve meperidine gibi opiatlar, Oddi sfinkterinin spazmına ve sonuçta karaciğer ve pankreas enzimlerinin serumda artışına yol açar. Diüretikler hiponatremiye yol açarlar. Fenitoin, kalsiyum ve fosfor düzeyini azaltır ALP'ı yükseltir.

**Transfüzyonun analiz sonuçlarına etkisi:** Total kan ve plazma transfüzyonu, verilen miktara bağlı olarak plazma protein konsantrasyonunu yükseltir. Verilen eritrositlerin parçalanma oranına bağlı olarak serum LDH aktivitesi artar. Yaralanmaya bağlı kan kaybını yerine koyacak transfüzyonlar, sodyum, klorür ve su retansiyonunu düşürür. Kanama sebebiyle düşen serum demir ve transferrin konsantrasyonları transfüzyonla yükselir. Beklemiş kanın transfüzyonu serum potasyumunu yükseltebilir.

**Ateşin analiz sonuçlarına etkisi:** Ateş, birçok hormonal cevabı hızlandırır. Ateş başlangıcında hiperglisemi oluşur. Hiperglisemi insülin salgısını uyarır ve toleransı düzeltir. Ateş, tiroksin salgılanmasını azaltır. Ateş, kortikotropin salgısını arttırarak kortizol seviyelerini yükseltir. Aldosteron sekresyonu artar; sodyum ve klorür retansiyonu görülür. ADH artması vücutta su birikimine yol açar.

#### 16.5.2. Laboratuvar test sonuçlarını etkileyen, kontrol edilemeyen preanalitik faktörler:

- Yaş
- Cinsiyet
- İrk
- Çevre ile ilgili faktörler
- Uzun süreli periyodik değişiklikler
- Şişmanlık

**Yaşın analiz sonuçlarına etkisi:** Hemen her analitin kan seviyesi, hastanın yaşı ile az veya çok değişir.

Yenidoğan döneminde: CK, GGT, AST enzimlerinin aktiviteleri doğum esnasındaki travmaya bağlı olarak yüksektir. Doğumun 3.veya 5.günlerine kadar bilirubin seviyeleri

yükselir. Plazma glukoz seviyesi düşük bulunur. Na, K, Cl, Ca seviyeleri doğumda yüksektir; 12 saatte normale döner.

Çocukluk-puberte döneminde: Çocukluk devresinde serum enzimlerinin çoğunda azalma vardır; bunlar puberteye yakın normale ulaşır. Serum ALP, bebeklikte yüksek, çocuklukta normal, puberteden sonraki büyüme devresinde yüksektir. Büyüme devresinde iskelet kasının gelişmesiyle serum kreatinin düzeyleri artar. Ürik asit seviyeleri 7-10 yaşına kadar düşük, daha sonra yüksek bulunur.

**Cinsiyetin analiz sonuçlarına etkisi:** Kız ve erkek arasında puberteye kadarki laboratuvar değerlerinde farklılık hemen hemen yoktur.

Puberteden sonra: Serum ALP, AST ve ALT, CK, aldolaz seviyeleri erkekte kadınlardan daha yüksektir. Total LDH iki cinsten de aynıdır; izoenzimleri farklı olabilir. Albumin, Ca ve Mg konsantrasyonları erkekte yüksektir. Kadında hemoglobin, üreme döneminde Fe düşüktür.

**İrkin analiz sonuçlarına etkisi:** Siyahlarda total protein beyazlardan daha yüksektir. Albumin, siyahlarda düşüktür (IgG %40 daha yüksek). Siyahlarda kas kütlelerinin fazlalığına bağlı olarak CK, LDH, ALP daha yüksek bulunmuştur. Glukoz toleransı siyahlarda daha azdır. Beyazlarda ileri yaşlarda kolesterol ve trigliserit seviyeleri siyahlardan daha yüksektir.

**Çevre ile ilgili faktörlerin analiz sonuçlarına etkisi:** Yüksek rakımda yaşayanlarda eritrosit sayısı, eritrosit volümü ve hemoglobin konsantrasyonu, azalmış atmosferik pO<sub>2</sub> nedeniyle artmıştır. Güneş ışığına uzun süre maruz kalmak serum Ca ve D vitamini düzeylerini artırır. Yaz aylarında plazma glukoz düzeyi ve glukoz toleransı düşük bulunur. Sert suların tüketildiği bölgelerde plazma kolesterol, trigliserit, Mg düzeyleri önemli oranda yüksektir.

**Uzun süreli periyodik değişikliklerin analiz sonuçlarına etkisi:**

**Menstrüal siklusun etkisi:** Luteal fazda plazma kortikosteronu yükselir. Serum kolesterolü, ovulasyon sırasında düşüktür, menstürasyonun hemen başlangıcında yükselir. Kolesterolün düşük olduğu devrede serum protein ve albumini de aşağı seviyededir. Menstürasyonda serum fosfatı düşerken kreatinin ve ürat yükselir. Serum Fe ve Mg' u da oldukça düşüktür.

**Gebeliğin etkisi:** Serum albumin konsantrasyonu belirgin azalır, fibrinojen artar. DM gelişebilir. Gebeliğin 2.yarisından sonra plazma lipid seviyeleri artar. Bakır ve seruloplazmin artar. Kalsiyum ve magnezyum düzeyleri hafif azalır.

**Şişmanlığın analiz sonuçlarına etkisi:** Serum kolesterolü, trigliserit ve β-lipoprotein (LDL) seviyeleri şişmanlıkla doğru orantılı olarak artar. Serum ürat konsantrasyonu özellikle 80 kg üzerindeki şahıslarda yüksektir. Şişman erkeklerde serum AST, kreatinin ve total protein, kan hemoglobin seviyeleri artar. Kadında serum kalsiyumu artan kilo ile yükselir; fosfat seviyesi her iki cinsten de düşer. Kortizol artar, büyüme hormonu düşer.

### 16.5.3. Numune (örnek) alınmadan önce yapılan hatalar

-Testlerin seçiminde hata: Rastgele ve çok sayıda analiz istemek klinisyenlerin sık yaptığı hatadır.

-Acil olmayan vakalarda acil istek yapılması

-Hastanın aldığı ilaçların ve gıdaların neden olduğu hatalar

-Prostat mesajının oluşturduğu hatalar

#### 16.5.4. Numune alınırken yapılan hatalar

- Kirli malzeme kullanılması
- Islak malzeme kullanılması
- Venöz stazla kan almak: İntravasküler sıvıya ait su ve küçük moleküllerin ekstrasvasküler alana kaçmasına neden olur.
- İnfüzyon yapılan ekstremiteden numune alma
- Tam kan, serum, plazma cinsinden uygun numune almamak
- Aç karnına alınması gereken numunelerin yeterli açlık sağlanmadan alınması

#### 16.5.5. Örneklerin laboratuvara ulaştırılmasında yapılan hatalar

- Bekletilmiş numunenin gönderilmesi: Kanda glukoz, Na ve K sonuçlarında önemli hatalar olur. İdrarda üre ve amonyak hatalı çıkar; pH alkali tarafa kayar.
- İstek formlarının tam olarak doldurulmaması
- Yanlış etiketleme

#### 16.5.6. Laboratuvarda analize hazırlama hataları

- Ekipmanın ve personelin hazır olmaması: Ön deneme ve standardizasyon çalışmalarını yapmadan rutin çalışmaya başlamak.
- Gecikme: Numunenin laboratuvarda bekletilmesi
- Etiketleme hataları
- Reaktiflerin bayatlaması ve bozulması
- Rutin biyokimya laboratuvarında solüsyon hazırlamanın bilinmemesi
- Depolama hataları

#### 16.5.7. Analiz hataları

- Dürüst olmayan personelin çalıştırılması
- Personelin iyi yetiştirilmemiş olması
- İyi seçilmemiş kitleler ve iyi hazırlanmamış reaktiflerle çalışma
- Hatalı ölçüm yapan volümetrik kaplar kullanma
- Aşırı sıcak veya aşırı soğuk, havalandırılmaz, birtakım kimyasal maddeler kokan, dar ve rahatsız edici bir laboratuvar ortamı
- Cihazların doğru olarak kullanılamaması
- Standart grafiklerini uzun süre kullanmak

#### ***Başlıca üç çeşit analitik hata tanımlanır.***

Büyük hatalar: Yanlış deney planlama ve hesaplama ile ilgili. Deney tekrarlanmalı veya sonuçlar iptal edilmeli.

Sistematik hatalar (SE): Analiz sonucunu sabit ve belirli düzeyde değiştiren, nedeni bilinen ve ölçülebilen kesin değerlere sahip hatalar. Sabit ve oransal hata (CE ve PE) olmak üzere iki tiptir. Analiz sonucunun doğruluğunu etkilerler.

Rasgele hatalar (RE): Düzeltilemeyen ve kontrol edilemeyen birçok değişkene bağlı hatalar. Analizin kesinliğine etki ederler, standart sapmanın büyük olmasına neden olurlar.  $N > 30$  ise hataların birbirlerini götüreceği ve sonuçlar üzerine pek yansımayacağı kabul edilir.

$$\text{Toplam hata (TE)} = \text{SE} + \text{RE}$$

#### 16.5.8. Analiz sonuçlarını yanlış rapor etme hataları

- Numunelerin kabulü ve rapor sekreteriyasının kurulmaması
- Analiz metodlarının ve normal değerlerin rapora kaydedilmemesi

### 16.5.9. Sonuçların yorumlanmasında yapılan hatalar

- Bazı fizyolojik farklılıkları gözardı etmek
- Bölgesel farklılıklar olabileceğini gözardı etmek
- Başka laboratuvarların veya bölgelerin, başka ülkelerin normal değerleri ile karşılaştırmak

### 16.5.10. Diyalog hataları

- Laboratuvarcının eleştiri kabul etmemesi
- Klinikçinin şüpheli veya yanlış gördüğü sonuçları laboratuvara haber vermemesi
- Haberleşme yetersizliği

## 16.6. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Kalite Kontrol ve Standardizasyon

Kalite kontrol yöntemleri, verilen hizmetin önceden saptanmış özellikleri taşıyıp taşımadığının ve ne ölçüde güvenilir olduğunun incelenmesi için kullanılan yöntemlerdir: Laboratuvarında yapılan analiz metodlarının, araç ve gereçlerin, çıkan sonuçların kontrolünün yapılması. Yöntemlerin standartlaştırılması amacıyla laboratuvarlar arası kalite denetiminin yapılması.

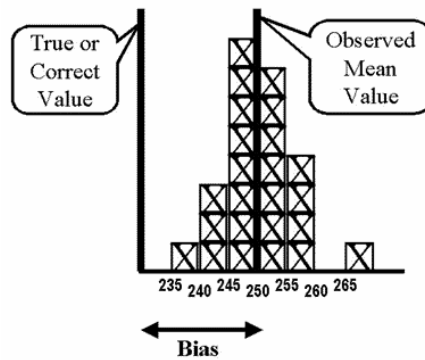
### 16.6.1. Analiz metodlarının performans parametreleri

- Doğruluk (Accuracy)
- Spesifiklik
- Tekrarlanabilirlik (Precision, kesinlik)
- Tayin limiti
- Linearite sınırları
- Analitik hassasiyet
- Bozucu etkenler (interferans)
- Recovery
- Referans aralığı

Bir analiz metodunun performansının değerlendirilmesi, bir bakıma analitik hataların araştırılması çalışmalarıdır. Bunun için çeşitli deneyler yapılır:

- Art arda yapılan ölçümler (tekrarlanabilirlik deneyleri)
- İnterferans deneyleri
- Geri elde (geri kazanım, recovery) deneyleri
- Yöntem karşılaştırma deneyleri

**Analiz metodunun doğruluğu:** Ölçülen değer gerçek değere yakınlığı ile ifade edilir. Gerçek değerle ölçülen değer arasındaki fark, hata (bias) olarak tanımlanır.

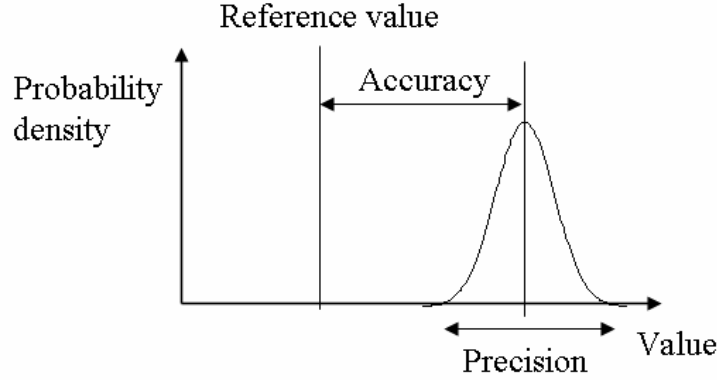


Günlük uygulamada bir metodun doğruluğunun değerlendirilmesi eksternal kalite kontrol uygulamaları ile yapılır.

**Analitik özgüllük (analitik spesiflik):** Diğer ilişkili substratlarla etkileşmeden, asıl substratı ölçme yeteneğidir. Metodun doğruluğu ile ilgili bir parametredir.

**Kesinlik (precision, tekrarlanabilirlik):** Aynı örnekten yapılan tekrar çalışmalarında metodun aynı sonucu verebilme gücüdür. Rasgele hataların (RE) bir ölçüsü olarak kullanılır.

Normal kontrol serumu 20 kez ardışık olarak çalışılır ve standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (%CV) ile rasgele hata (RE) hesaplanır.



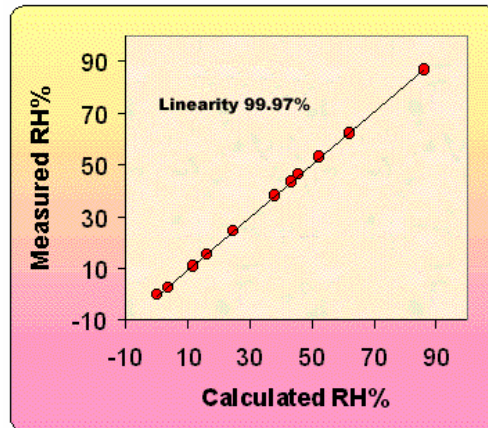
$$\%CV=(SD/Ortalama)\times 100$$

$$RE=4\times SD$$

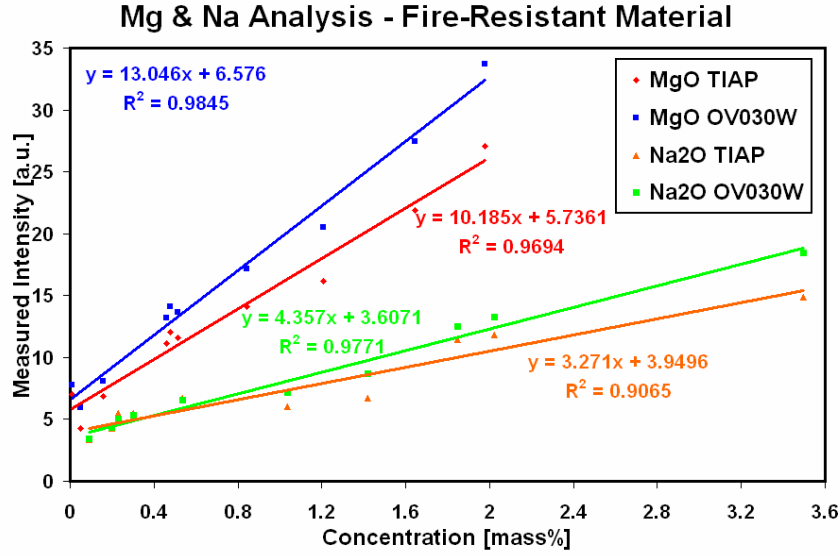
Varyasyon katsayısının (%CV) küçük olması, tekrarlanabilirliğin (kesinliğin) yüksek olduğunu gösterir. Metodların gün içi (çalışma içi, intra-assay) ve günler arası (çalışmalar arası, inter-assay) kesinliği, internal kalite kontrol uygulamaları ile takip edilir. Çoğu yöntem için tercih edilen, %CV'nin 5'ten küçük olmasıdır.

**Deteksiyon limiti:** Metodun kabul edilebilir tekrarlanabilirlikle ölçebildiği en düşük analit konsantrasyonudur.

**Analiz aralığı:** Herhangi bir modifikasyon yapılmaksızın bir metodun ölçüm yapabildiği aralıktır. Analiz aralığı, linearite (doğrusallık) çalışmaları yapılarak belirlenir. Değişik konsantrasyonlarda bir dizi standart en az 2 kez çalışılıp ortalamaları alınır ve bu ortalamalar, beklenen standart değerlerine karşı grafiğe geçirilir.



**Analitik duyarlılık (analitik sensitivite):** Analizi yapılan maddenin (analit) konsantrasyon değişimine karşı ölçüm sinyalinde meydana gelen değişikliktir. Kalibrasyon eğrisinin (kurv) eğimi, analitik duyarlılığı ifade eder.



**Bozucu etkenler (interferans, girişim):** İnterferans deneyleri, sabit sistematik hata (CE) hakkında bilgi sağlar, yöntemin özgülüğünde problem olduğunu gösterir.

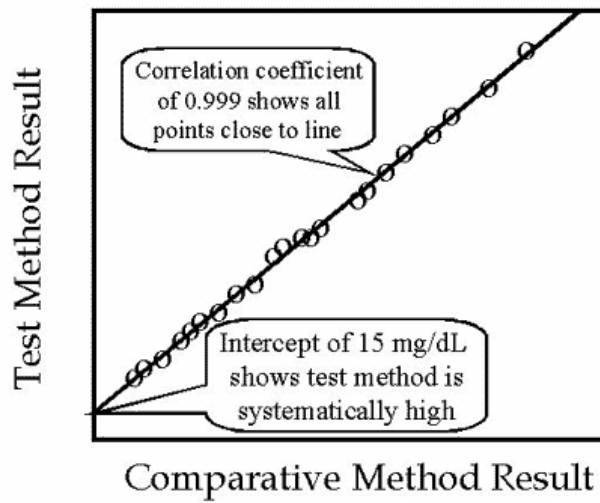
Ölçümünü yapacağımız analiti içeren örneğe, interferans oluşturabileceği öngörülen materyal eklenir. Aynı miktardaki örneğe, materyalin eklendiği miktardaki saf dilüent eklenir. Her iki örnek analiz edilir. Aradaki fark saptanır.

**Recovery (geri elde):** Metodun numuneye eklenen belirli miktardaki analiti doğru olarak okuyabilme yeteneğidir. Oransal sistematik hata (PE) hakkında bilgi sağlar.

Analitin ölçümünün yapılacağı hasta örneğine, analit standart çözeltisinden eklenir. Aynı miktardaki hasta örneğine standart çözeltinin hazırlandığı çözücünden aynı miktarlarda eklenir. Her iki örnek analiz edilir. Ölçülen miktar ile eklenmiş olan miktar karşılaştırılır.

**Yöntem karşılaştırma deneyleri:** Ortalama sistematik hatanın (SE) hesaplanmasını sağlarlar. Aynı zamanda sistematik hatanın sabit veya oransal olup olmadığı hakkında bilgi elde edilebilir.

En az 40 hasta örneği alınır. Temel alınan yöntem ve karşılaştırılacak yöntemle analiz edilir. Veriler grafikte gösterilir.



**Referans aralığı (normal değer):**

-Tolerans aralığı

-Tahmin edilen aralık

-%95 interpercentile aralığı: Belirlenmesi kolay, genelde en çok kullanılan ve IFCC tarafından kabul edilen metoddur. %2,5 ve %97,5 aralıkları arasındaki dağılım referans aralığını belirler. Alt ve üst sınırların güven aralığının %90 olabilmesi için tavsiye edilen denek sayısı en az 120'dir.

**16.6.2. Tanısal yeterlilik parametreleri:**

Tanısal duyarlılık (sensitivity)

Tanısal özgüllük (specificity)

Önceden tahmin değeri (prediktif değer)

**Tanısal sensitivite (duyarlılık):** Analizin doğru olarak gösterdiği spesifik bir hastalığa sahip olanların oranıdır. Aranan hastalığın hastada bulunması durumunda test sonucunun pozitif olma olasılığıdır.

$$\text{Duyarlılık (\%)} = [\text{DP}/(\text{DP}+\text{YN})] \times 100$$

**Tanısal spesifisite (özgüllük):** Analizin doğru olarak gösterdiği spesifik bir hastalığa sahip olmayanların oranıdır. Aranan hastalığın hastada bulunmaması durumunda test sonucunun negatif olma olasılığıdır.

$$\text{Özgüllük (\%)} = [\text{DN}/(\text{DN}+\text{YP})] \times 100$$

**Önceden tahmin değeri (prediktif değer):** Laboratuvar testinin uygulanmakta olduğu topluluktaki hastalığın yaygınlık oranına (prevalansına) göre testin doğru tanı koydurma olasılığıdır.

*Pozitif prediktif değer:* Testin uygulandığı toplulukta (+) sonucu olanların gerçekte hasta olma olasılığıdır. Prevalans ve özgüllükten etkilenir.

*Negatif prediktif değer:* Testin uygulandığı toplulukta (-) sonucu olanların gerçekte hasta olmama olasılığıdır. Prevalans ve duyarlılıktan etkilenir.

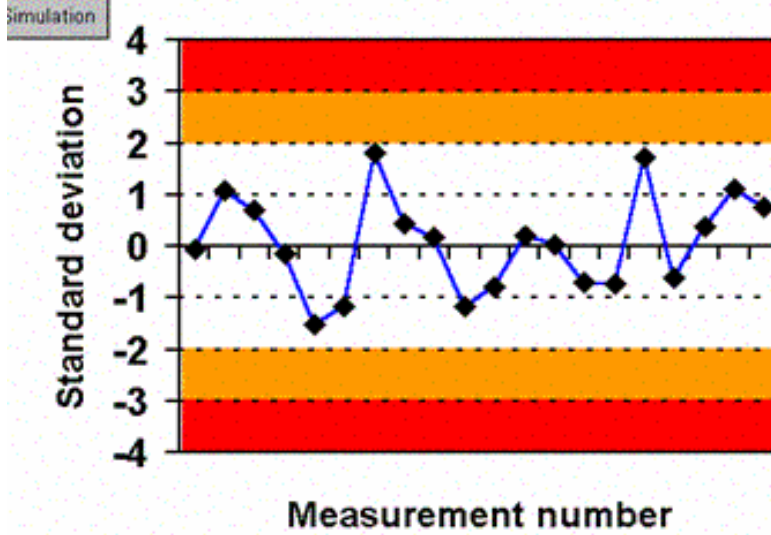
**16.6.3. Laboratuvarların kalite kontrolünde basamaklar:**

İnternal kalite kontrol: Laboratuvar içi kontrol

Eksternal kalite kontrol: Laboratuvarlar arası kontrol. Ülke düzeyinde kalite kontrol. Uluslararası denetim.

**16.6.3.1. İnternal kalite kontrol:** Test değerleri bilinen kontrol serumları kullanılarak günlük ölçüler yapılır ve bunlar Levey-Jennings kontrol kartlarında Westgard kurallarına göre değerlendirilir.





Her analitik çalışmada kontrol örnekleri çalışılır, elde edilen değerler grafik üzerine işaretlenir.

Çalışılan kontrol değerleri seçilen kontrol sınırları içerisinde olduğu zaman o çalışmanın geçerli olduğuna karar verilir.

**Westgard çoklu kontrol kuralları:**

1<sub>2s</sub>: Bir kontrol sonucunun  $\pm 2s$  sınırları dışında olması. Kontrol sonucunun diğer kurallar ile de kontrol edilmesini sağlayan uyarı.

1<sub>3s</sub>: Bir kontrol sonucunun  $\pm 3s$  sınırları dışında olması. Rastgele hatalara hassas bir reddetme nedeni.

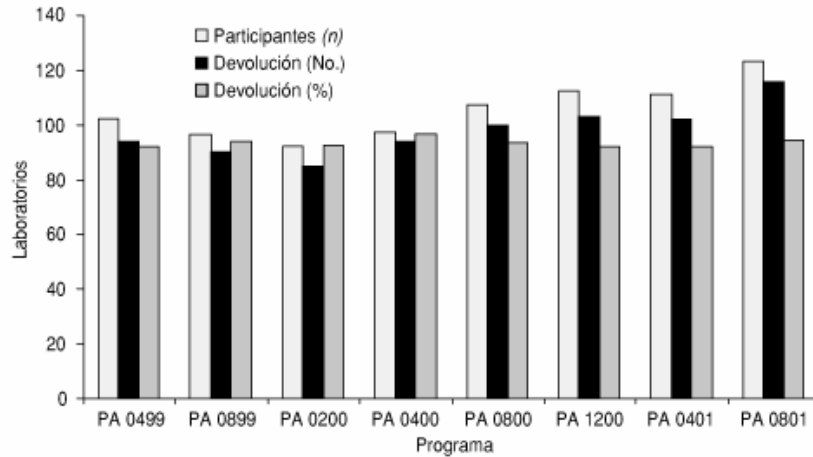
2<sub>2s</sub>: İki ardışık kontrol sonucunun ortalamadan aynı yönde  $+2s$  veya  $-2s$  sınırları dışında olması. Sistemik hatalara hassas bir reddetme nedeni.

R<sub>4s</sub>: İki ardışık kontrolden birinin ortalamadan  $+2s$  değerinin  $-2s$  sınırları dışında olması. Rastgele hatalara hassas bir reddetme nedeni.

4<sub>1s</sub>: Dört ardışık kontrol sonucunun ortalamadan aynı yönde  $+1s$  veya  $-1s$  sınırları dışında olması. Sistemik hatalara hassas bir reddetme nedeni.

10x: On ardışık kontrol sonucunun ortalamadan aynı yönde yer alması. Sistemik hatalara hassas bir reddetme nedeni.

**16.6.3.2. Eksternal kalite kontrol:** Kalite kontrol programlarından sağlanan ve değeri bilinmeyen serumlarla çalışma yapılarak laboratuvarın bir dış denetleme birimi tarafından denetlenmesi ve bu şekilde diğer laboratuvarla da karşılaştırılması yapılır.



## **YARARLANILAN KAYNAKLAR**

- 1) Laboratuvar Aletleri. Prof.Dr. Bahattin ADAM. Nobel Yayın Dağıtım. 2000
- 2) laboratuvarlarda Güvenli Çalışma. Doç.Dr. Ayhan YILMAZ. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 2004
- 3) Biyokimya Laboratuvar Uygulamaları. Editörler: Dr.H.Hakan Aydın, Dr.Ferhan Külahçioğlu Girgin. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı. İzmir, 1998
- 4) Biyokimya. Prof.Dr. K.Muzaffer ÜSTDAL. Medipres 2003
- 5) Klinik Biyokimya. Prof. Dr. Kazım ARAS, Dr. Gülseren ERŞEN
- 6.) Klinik Tanıda Laboratuvar. A.H.İMREN, O.TURAN
- 7) Klinik Biyokimya Laboratuvar Çalışmaları. Prof.Dr.Mutahhar YENSON
- 8) Google arama motoru ile erişilen çok sayıda web sayfası