

TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVAR
UYGULAMALARI
1. DÖNEM

2019-2020

1. DÖNEM UYGULAMALARI

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ I

1. UYGULAMA: Çözelti-pH-Tamponlar

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ II

1. UYGULAMA: Spektrofotometri-elektron transportu

TIBBİ BİLİMLERE GİRİŞ III

1. UYGULAMA: Enzimler

LABORATUVARA GİRİŞ

GENEL BİLGİLER

Laboratuvar Çalışmalarında Temel Kurallar

- Laboratuvar çalışmalarında ilk kural sessiz ve düzenli olmaktır.
- Laboratuvarda özel laboratuvar kıyafeti (beyaz önlük vb.) ile çalışılır. Enjektörle ve özellikle biyolojik örneklerle çalışırken eldiven giyilir.
- Çalışma yerleri (banko, dolaplar, raflar), aletler, cam eşya ve laboratuvar kıyafeti daima temiz tutulur.
- Kullanılmış cam eşya ve aletlerin kaba temizliği, musluk suyu ile hemen yapılır. Daha sonra da deterjanla yıkanarak musluk suyundan geçirilir, saf su ile durulanır ve etüvde kurutulur. Bu temizlik işlemiyle giderilemeyen biyolojik örnekler (kan vb.) için asitle hazırlanmış özel çözeltiler kullanılır.
- Laboratuvar çalışmalarında çeşitli yöntemlerle saflaştırılmış su kullanılır. Musluk suyunun kaynatılıp buharlaştırılması ve tekrar soğutulması (distilasyonu) ile suyun yapısındaki organik ve anorganik maddeler uzaklaştırılır. Bu yöntemle elde edilen *distile (damıtık) su* bazı elektrolitleri içerdiğinden tamamen saf değildir. Cam eşyanın temizliğinde ve kalitatif analizlerde kullanılır. *Bidistile su* ise distile suyun ikinci kez buharlaştırılması ile elde edilir. *Deiyonize su*, musluk suyunun iyon-değiştirici reçineden geçirilip, bileşimindeki metal iyonlarının ayrılması ile elde edilir. Eser element ve enzim aktivitesi tayinlerinde kullanılır. Günümüzde çeşitli arıtma tekniklerinin bir arada uygulanmasıyla elde edilen *reaktif derecesinde safsu*, üç farklı kademede saflık göstermekte ve laboratuvar çalışmalarının içeriğine göre tercih edilmektedir. Çalışmaya başlamadan önce günlük saf su gereksinimi karşılanır.
- Yapılacak deneyler, ilgili kaynaktan önceden okunur ve küçük notlar alınır. Deney sırasında yapılan işler kaydedilir (deney protokolu). Bunun için her laboratuvar çalışanın bir *protokol defteri* olmalıdır.
- Deneylerde kullanılacak kimyasal maddeler önceden hazır bulundurulur. Gerekinden fazla miktarda madde kullanılmaya özen gösterilir. Kimyasalların ve ayıraçların yeri daima belirlidir ve kullanıldıktan sonra yerlerine konulur.
- Organik çözücüler açık alevli bir ısıtıcıya yakın tutulmaz. Isıtma işlemlerinde açık alevli ısıtıcı

kullanılıyorsa kibrit yakıldıktan sonra ısıtıcı açılır.

- Çalışma sonunda laboratuvarıdan ayrılırken cam eşya ve aletler temizlenir, banko üzerindeki gereçler düzenlenir. Isıtma işleminde ispirto ocağı kullanılıyorsa kapağı kapatılır, ısıtıcının musluğu ve ana gaz musluğu kontrol edilir. Su musluklarının açık kalıp kalmadığı kontrol edilir.
- Çalışmanın sonuçları değerlendirilir ve protokol defterine kaydedilir.
- Laboratuvarıda yiyecek-içecek bulundurulmaz.

Laboratuvarıda Kullanılan Gereçler

Aletler:

Soğutucu ve derin dondurucu:Bazı kimyasalların ve biyolojik materyallerin (doku, kan, vb.) saklanmasıında gereklidir.

Terazi: Tartımlarda kullanılır.



Işık mikroskobu: Biyolojik sıvılarda gözle görülemeyecek kadar küçük cisimlerin saptanması amacıyla kullanılan, merceğı çok güçlü optik aygıttır.



Santrifüj: Dönme ile sağlanan merkezkaç kuvvetinden yararlanılarak çökeltiyi çözültiden ayırmak için kullanılan alettir.



Spektrofotometre: Belirli dalga boyundaki bir ışığın çözelti tarafından emilimini (absorpsiyon) veya geçirgenliğini (transmitans) ölçmekte kullanılan alettir.



Su banyosu: Belirli sıcaklıkta nemli ortam sağlanması gereken deneylerde kullanılır.



Etüv: Bazı deneylerde (hücre kültürü vb.) gerekli olan sabit basınç ve sıcaklıkta kuru ortam sağlamak, rutin çalışmalarda maddeleri (kimyasal madde, doku vb.) ve cam eşyayı kurutmak için kullanılır.



pHmetre: Biyolojik sıvıların, tamponların ve çözeltilerin pH'ını ölçmek ve ayarlamak için kullanılır.



Saf su cihazı: En basit şekliyle, suyu buharlaştırarak gaz fazına geçiren ve daha sonra

yoğunlaştırarak arıtan alettir. Çok geliştirilmiş tipleri vardır.



Elektrikli karıştırıcı (vorteks): Üzerindeki küçük oyuğa yerleştirilen deney tüpünü motor gücüyle döndürerek karıştıran alettir.



Elektrik ocağı: Isıtmalarda ilk seçenektir.



Cam Eşya

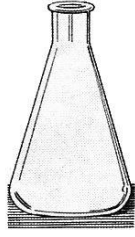
Sıvıların hacim ölçümünde kullanılan *volümetrik cam eşya* ile sıvı ve katı maddelerin tartım, titrasyon, ısıtma gibi işlemlerinde kullanılan, üzerinde alabileceği maksimum hacim yazılı olan *kalitatif cam eşya* olarak gruplandırılır.

Kalitatif cam eşya:

Beher: Geniş ağızlı, kenarı sıvı aktarmaya uygun, silindir biçiminde cam kaplardır.



Beher



Erlenmeyer



Piset

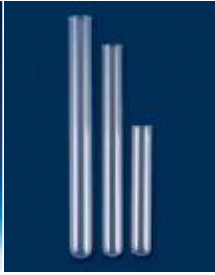
Erlenmeyer: Kalitatif işlemlere uygun, özellikle titrasyonda kullanılan, dar boyunlu, tabanı düz, koni biçiminde cam kaplardır. Alman kimyacı *Carl Emil Erlenmeyer* tarafından 1861'de oluşturulmuş ve onun adını almıştır.

Piset: Camdan veya plastikten yapılmış, saf su koymaya ve aktarmaya yarayan kaplardır.

Altı düz balon: Çözelti hazırlamakta kullanılır. Bu balonlar açık aleve tutulduğu takdirde amyantya da diğer ismiyle asbest (ısıya, aşınmaya, kimyasal maddelere çok dayanıklı lifsel yapıda bir mineral) üzerine yerleştirilmelidir. Direkt ısıtmak için yuvarlak balonlar daha uygundur.



Düz balon



Deney tüpleri



Santrifüj tüpleri

Deney tüpleri: Silindirik biçimindedir. Alt kısmı yuvarlak olduğundan porttüp (tüp taşıyıcı) ile kullanılır. Çöktürme, renklendirme ve diğer laboratuvar işlemleri için gerekli temel eşyadır.

Santrifüj tüpleri: Santrifüj aletinde kullanılır. Altları genellikle koni şeklindedir. Bazı santrifüjlerde altı yuvarlak tüpler kullanılır. Santrifüj tüplerinin biçimi, kullanıldığı santrifüj tipine özgüdür.

Volumetrik cam eşya:

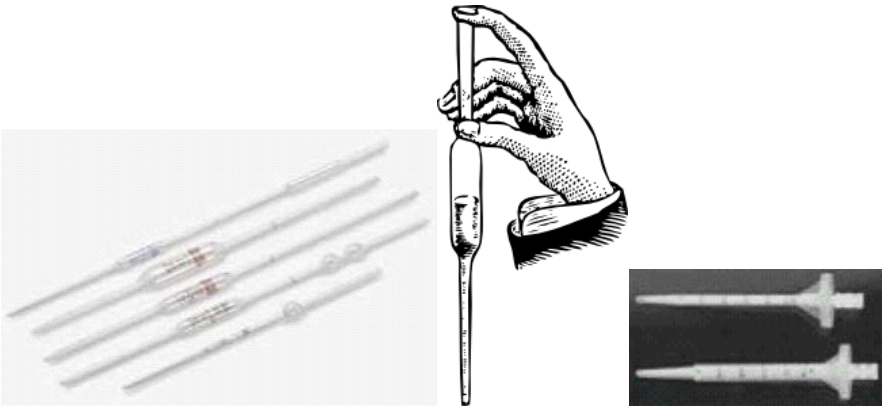
Pipet: Bir sıvıdan belirli bir miktar çekmek ve başka bir kaba aktarmak için kullanılan cam borulardır. Çalışmanın niteliğine göre kullanılmak üzere çeşitli tipleri vardır.

- **Dereceli pipetler:** Bu tip pipetlerin, maksimum hacimlerinin altındaki ölçümlerde kullanılması daha uygundur. Çünkü son damlayı uzaklaştırmak için üfleme gerekir. Örneğin 2 mL'lik bir dereceli pipetle 2 mL'den daha az hacimler ölçülür. Tam 2 mL ölçmek

gerektiğinde büllü pipet tercih edilir.



- *Büllü pipetler:* Dereceli pipete göre daha hassas kalibre edilmiş pipetlerdir. Sıvıyı aktarırken bül (karın) kısmı avuç içerisinde tutularak içindeki havanın genişmesi ve uçtaki damlayı itmesi sağlanır.
- *Mikropipetler:* 0.005 ten 0.25 mL'ye kadar olan hacimleri ölçmekte kullanılır.
- *Kapiller pipetler:* Çok ince cam borucuklardır. Elektroforez ve kromatografi gibi ayırma yöntemlerinde örneği uygulamak amacıyla kullanılır.



Büllü pipet

Mikropipet

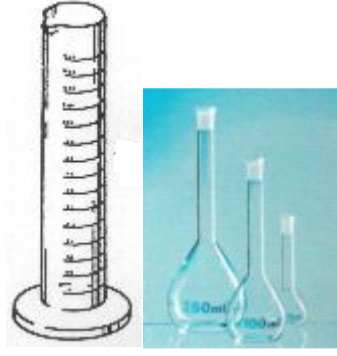
- *Otomatik pipetler:* Sabit (tek hacimlik) ve ayarlanabilir tipleri vardır.



Büret: Sıfırdan başlayarak aşağıya doğru derecelendirilmiş, 1, 2, 5, 25, 50 mL'lik hacimlerde, altta musluğu olan cam borulardır. Metal kıskaç ile ayaklı bir çubuğa tutturulur ve titrasyonda kullanılır.



Büret



Mezür

Ölçü balonu

Ölçü silindiri (mezür): Sıvıların ve idrar gibi biyolojik örneklerin hacim ölçümünde kullanılan, silindirik şekilde cam borulardır. Ölçümlerdeki kesinliği çok yüksek değildir.

Ölçü balonu (Balon joje): Yuvarlak karınlı ve uzun boyunlu, tek bir hacim ölçmeye uygun, boyunlarında bu hacmi sınırlayan çizgi bulunan kaplardır. Çözelti hazırlamakta kullanılır. Ölçüm kesinliği yüksektir.

Diğer Gereçler

Bunzen beki-ispirto ocağı: Isıtma işleminde kullanılır.



Porselen kroze: Çözeltileri kuruluğa kadar buharlaştırmak için kullanılan yüksek kenarlı kaptır.



Porselen kroze



Porselen kapsül



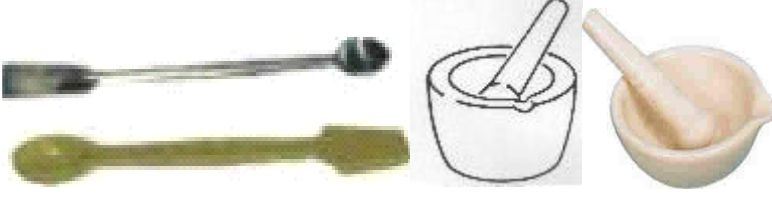
Sacayak

Porselen kapsül: Katı maddelerin açık alevde kurutulmasında kullanılan yuvarlak ve yayvan kaptır.

Bu işlem sırasında ısınan kapsüller bir tahta maşayla alınarak amyant levhalar üzerine konur.

Sacayak: Cam eşya veya porselen kapların ısıtma işlemi sırasında üzerine konulduğu metal ayaktır.

Spatül: Katı maddelerin aktarılmasında kullanılan metal veya plastik kaşıklardır.

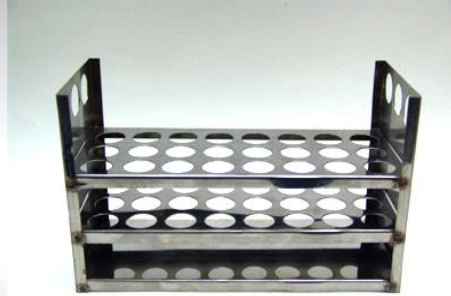


Spatül

Havan

Havan: Katı maddelerin öğütülmesinde kullanılır.

Porttüp: Üzerinde tüplerin çapına uygun delikler bulunan ve deney tüplerini taşımaya yarayan, metal, tahta veya plastikten yapılmış desteklerdir.



Baget: Çeşitli amaçlarla sıvıları karıştırmak ve sıvıların ısıtılması sırasında sıçramaları önlemek için kullanılan ucu yuvarlatılmış cam çubuktur.

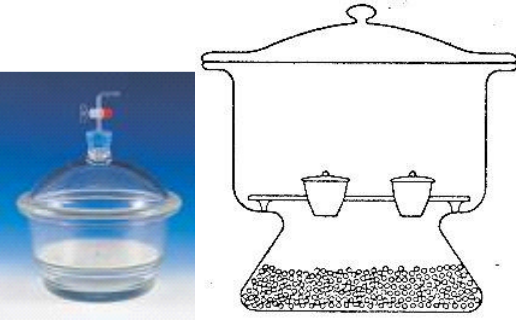
Tahta maşa: Sıcak cam eşyaları tutmak veya açık alevde ısıtmak için kullanılır.



Kıl fırça: Deney tüplerinin temizliğinde kullanılır.



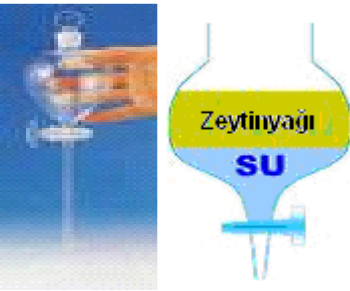
Desikatör: Az miktardaki ayıraçları veya katı maddeleri kurutmak ve nemden korumak için kullanılır. Desikatörün alt kısmında nem çekici maddeler (kalsiyum klorür; CaCl_2 ve magnezyum klorür; MgCl_2) bulunur.



Huni: Çökeltiyi çözülden ayırma işleminde kullanılır.



Ayrma hunisi: Birbiriyle karışmayan (ayrı fazlar oluşturan) sıvıları ayırmak için kullanılan, armut şeklinde veya silindirik, ağzı kapaklı cam kaplardır.



Saat camı: Bazı deneylerde ve tartımda kullanılır.



Lastik puar: Pipetlerin kullanılmasına yardımcı olan küçük yuvarlak pompalardır.



Vakumlu tüp sistemi: Adaptör, iğne ve özel vakumlu tüpten oluşan bu sistemle damar yoluyla gereken miktarda ve özellikle kan alınır. Tüpler, örneğe uygulanacak yöntemle göre gereken antikoagülanı içerir ve kullanım kolaylığı için değişik kapak renkleriyle tanımlanır.



Cam Eşyanın ve Laboratuvar Gereçlerinin Temizlenmesi

Malzemenin temizlenmesinde amaç, kimyasal/biyolojik kalıntıların giderilmesidir. Günümüzde kan ve diğer biyolojik materyal ile çalışılırken otomatik pipetler kullanılmakta ve plastik uçları atılmaktadır. Biyolojik örneklerle çalışırken bulaşmanın (kontaminasyon) önlenmesi için tek kullanımlık (*disposable*) laboratuvar gereçleri tercih edilmelidir.

- Cam eşyanın genel temizliği:

- Deterjanla yıkanır ve musluk suyu ile durulanır.
- % 2'lik hidroklorik asit çözeltisinde 15 dakika bekletilir.
- Tekrar musluk suyu ile yıkanır.
- Saf su ile durulanır ve 90°C'lik etüvde kurutulur.

- Pipetlerin temizliği:

- Pipetler musluk suyu altında kalıntılar gidene kadar yıkanır, yaklaşık 3-4 saat suda bekletilir.
- Saf su ile durulanır. Etüvde kurutulur.

- Kurumuş kan kalıntısı olan cam eşyanın yıkanması:

- Bir gece % 5'lik potasyum hidroksit çözeltisinde bekletilir.

b) 12-24 saat **bikromat çözeltisinde** bekletilir.

c) Musluk suyu ile yıkanır, saf su ile durulanır.

d) Etüvde 90°C’de bir saat kurutulur.

- **Bikromat yıkama çözeltisinin hazırlanması:** Bir litrelik ölçü balonuna 500 mL saf su konur. 250 mL derişik sülfürik asit yavaşça eklenir. Dışarıdan musluk suyuna tutularak soğutulur. 100 g potasyum bikromat eklenir ve karıştırılır. Saf su ile litreye tamamlanır.

- **Tıkanmış büret musluğunun açılması:**

100 mL saf su içinde çözünmüş 100 g potasyum hidroksit (%100’lük) 900 mL %70’lik etil alkolle 1000 mL’ye tamamlanır. Büret bu çözeltide bekletilerek tıkanıklık giderilir.

Basit Laboratuvar İşlemleri

Maddelerin Aktarılması:

Katı maddeler, şişelerinden metal bir spatül veya plastik kaşık ile alınır. Higroskopik (su tutucu) katı maddeler için metal spatül kullanılmaz. Sıvılar, şişe etiketi üstte kalacak şekilde eğilerek boşaltılır ve masanın üzerine şişe kapağı ters olarak bırakılır. Sıvıyı boşaltırken bir gaz çıkışı oluyorsa, sıvı hemen deney tüpüne boşaltılmayarak başka bir tüpe gerektiği kadar konur ve sonra reaksiyon tüpüne katılır. Derişik asitlerle çalışırken buharlarının solunum yollarına zarar verdiği göz önünde önünde tutularak maske ile çalışılmalı ve bu çözeltiler mümkünse çeker ocak altında hazırlanmalıdır. *Asitle çözelti hazırlanırken asidin üzerine su eklenmemelidir.* Çalışılan kaba önce su konularak üzerine asit yavaş yavaş ilave edilmeli, bu işlem sırasında kap musluk altında soğutulmalıdır.

Maddelerin Tartılması:

Tartımlarda kullanılan cihaz terazidir. Basit teraziler 100 mg’a kadar, analitik teraziler ise 0.1 mg hata payıyla tartar. Daha hassas olanlar (0.01 mg ve 0.001 mg) yalnız bilimsel amaçlar için kullanılır. Günümüzde yaygın olarak kullanılanlar dijital terazilerdir.

Tartımda dikkat edilecek noktalar:

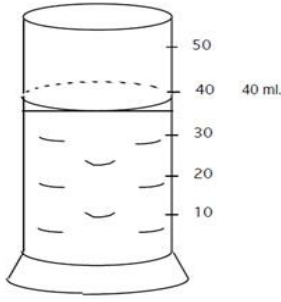
- Terazi yatay bir düzlemde olmalıdır. Dijital terazilerin arkasında bulunan su terazisi yardımı ile

terazinin düz bir zemine yerleştirildiğinden emin olunmalıdır.

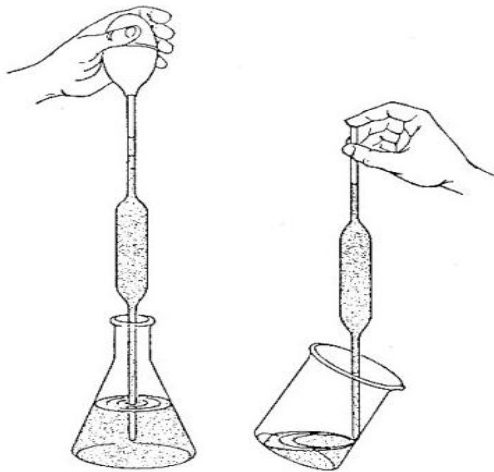
- Titreşimden, asit ve su buharlarından uzak olmalı ve sıcaklık sabit tutulmalıdır.
- Tartılacak maddeler kefeye doğrudan konulmamalıdır. Katılar için tartı kabı gereklidir. Sıvılar beher içinde tartılır.
- Su tutucu kimyasal maddeler hassas terazide tartılmamalıdır.
- İşlem bitince terazi kapatılarak dökülmüş madde varsa kuru bir fırça ile temizlenmelidir.
- Terazilerin doğruluğu belirli aralarla kontrol edilmelidir.

Hacim Ölçülmesi ve Sıvıların Aktarımı:

Bu işlem için ölçü silindiri (mezür), pipet, büret gibi kantitatif cam eşya kullanılır. Bu cam kapların içindeki sıvı seviyesi ölçülürken ölçek (skala) daima göz hizasında olmalıdır. Sıvı yüzeyinin cam eşya içerisinde oluşturduğu konkavlık, hacmi gösteren ölçek çizgisine teğet bulunmalıdır.



Pipetlerin kullanılması: Pipetler, belirli hacim sıvıyı lastik puarla çekip diğer kaba aktarmak için kullanılır. Biyokimya laboratuvarlarında ağız yoluyla pipet kullanılmamasına özellikle dikkat edilmelidir.

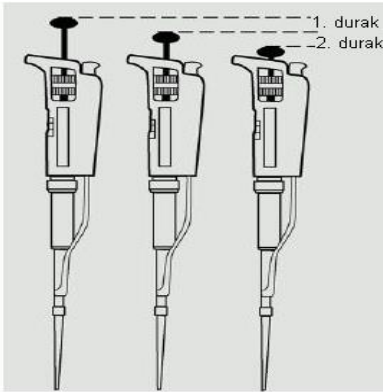


Lastik puarla ve elle pipet kullanımı

Otomatik pipet kullanılması:

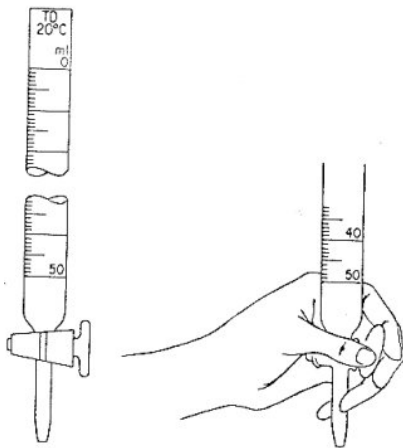
- Otomatik pipet pistonu her gün kullanımdan önce birkaç kez çalıştırılarak yağlanması sağlanır.

- Temiz pipet ucu takılır.
- Piston başparmakla birinci durak noktasına kadar bastırıldıktan sonra pipet ucu örnek içine (2-3 mm) daldırılır.
- Piston yavaşça serbest bırakılır, böylece sıvı pipet ucuna dolar. Piston aniden serbest bırakılırsa sıvı içeriye fışkırarak gireceğinden pipet kirlenebilir.
- Pipet ucu cam kenarına dokundurularak örnekten çıkarılır.
- Pipet, örneğin aktarılacağı tüpe daldırılarak piston ikinci durak noktasına kadar bastırılır.
- İkinci durak noktasındayken pipet ucu kenara dokundurulmadan ayıraçtan dışarı çıkarılır, piston yavaşça bırakılır ve kullanılan uç yıkama kabına atılır.



Büretlerin Kullanılması:

Büretler, değişik hacimlerde, alt tarafı musluklu, derecelendirilmiş cam borulardır. Titrasyonda kullanılır. Büretle birlikte kavrayacak şekilde musluk sol el ile tutulur, sağ eldeki erlenmeyer her damlada çalkalanarak büretten sıvı damlatılır. Gerekliğinde musluk vazelin ile yağlanır. Titrasyon işlemi bittikten sonra büret hemen boşaltılır ve distile su ile yıkanır. Musluk kısmı ayrıca yıkanır ve kullanılacağı zaman bürete takılır.



Büret

Musluğun tutulma şekli

Cökme-Cöktürme:

Berrak iki eriyiğin karıştırılmasıyla ortaya çıkan bulanıklığa *çökme*, bu işleme *çöktürme* denir. Bulanık sıvının bekletilmesi veya santrifüjü ile aşağıda biriken katı kısma *çökelti* (pellet), üstteki sıvı faza *süpernatant* denir.

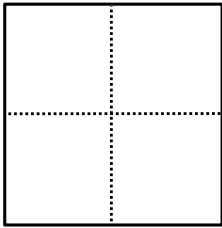
Çökeltinin sıvı fazdan ayrılması:

Bu amaç için aşağıdaki işlemlerden uygun olanı seçilir.

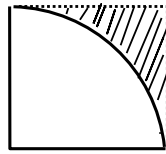
1) *Aktarma (Dekantasyon)*: Çökeltinin dibe oturması için beklenir, üstte kalan saydam çözelti dipteki çökeltiyi gevşetmeden başka yere aktarılır.

2) *Süzme*

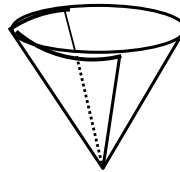
Sıvılardaki çözünmeyen maddeleri uzaklaştırmak için uygulanan işlemlerden en basitidir. Çözelti ince delikli bir süzgeçten geçirilirken katı taneler süzgeç üstünde kalır. En çok kullanılan süzgeç, çeşitli büyüklükte porları olan filtre kâğıtlarının huniye yerleştirilmesiyle elde edilir. Filtre kâğıdı huni yuvarlağından yaklaşık 1 cm aşağıda olmalı ve huniye yerleştirildikten sonra çözücü ile ıslatılmalıdır. Sıvı daima bir cam baget boyunca süzgeç içine akıtılmalı ve filtre kâğıdının 2/3'ünü aşmamalıdır. Çözelti bulanık olursa tekrar süzülür. Süzülecek taneciğin çapına göre, farklı süzme özelliğine sahip filtre kâğıtlarından uygun olanı seçilir. Basit süzme işlemi, yerçekimi etkisiyle gerçekleşir. Süzmenin çabuklaştırılması için vakum uygulanabilir.



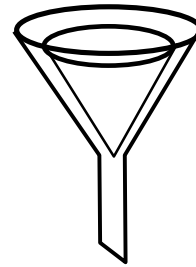
a



b



c



d

Filtre kâğıdının hazırlanması: a) Kare şeklindeki kâğıt dörde katlanır b) Taranmış kısım kesilir c) Şekildeki gibi açılır d) Huniye yerleştirilir.

3) *Santrifüj işlemi*

Santrifüj kuvvetlerinden (dönme ile oluşan merkezkaç kuvvetten) yararlanılarak çökeltiyi çözülden ayırmak için geliştirilmiş bir ayırma yöntemidir. Çökelti süzgeç kağıdıyla tutulamayacak

kadar küçük ise veya ayırma işleminin çabuklaştırılması gerekiyorsa santrifüj yöntemi seçilir. Çok küçük taneciklerin ayırımı için yüksek devirli santrifüjler (ultrasantrifüj) bulunmaktadır. Santrifüj çeşitli büyüklükte ve özellikte olabilir. Basit bir masaüstü santrifüjünde motorla döndürülen bir başlık ve buna asılı tüp kefeleri mevcuttur. Santrifüj yapılacak her tüpün karşısına eşit ağırlıkta tüp konur. Bu dengeleme işleminde terazi kullanılır. Santrifüj tüpleri, santrifüj sırasında oluşan basınca dayanıklıdır. Aleti çalıştırırken ve durdururken hız kademeli olarak çoğaltılıp azaltılmalıdır. Santrifüj kapağı alet tamamen durmadan açılmamalıdır.

Santrifüj hızı, dakika devir sayısı cinsinden belirtilir. Belirli bir işlemde santrifüj kullanılabilmesi için dakika devir sayısı ($rpm=rotation\ per\ minute$) ve santrifüj süresi verilmelidir. Ancak oluşan merkezkaç kuvvet dakikadaki devir sayısı ve dönen başlığın yarıçapı ile ilgili olduğundan, farklı yarıçaplardaki (farklı modellerdeki) santrifüjlerde, aynı rpm'de santrifüj edilen maddenin birim zamandaki çökmesi aynı olmaz. Bu nedenle dakika devir sayısını kullanmak doğru değildir. Bunu yerçekimi kuvveti (g) ile ifade edilen santrifüj merkezkaç kuvvetine çevirmek gerekir.

Santrifüj merkezkaç kuvvetini (g), rpm 'a çevirmek için aşağıdaki formül kullanılır:

$$g = (rpm)^2 \times r \times 1.118 \times 10^{-5}$$

r = tübün dibi ile santrifüj eksenini arasındaki uzaklık (santrifüj başlığının yarıçapı; cm)

TBG-I UYGULAMASI

1- ÇÖZELTİLER ve pH KAVRAMI

Cözelti ve Süspansiyon:

Katı, sıvı veya gaz halindeki bir maddenin, katı, sıvı veya gaz bir ortamda homojen olarak dağılmasından oluşan karışıma *çözelti*, bu olaya *çözünme* denir. Her çözeltide çözen bir ortam (çözücü) ile çözünen bir madde vardır. Ancak tanımdan da anlaşılacağı gibi katı bir maddenin bir sıvı içinde çözünmesi şart değildir. Gaz-gaz, gaz-sıvı, sıvı-sıvı, katı-sıvı bileşiminde çözeltiler bulunabilir.

Bir sıvı içerisinde çözünmeyen bir maddenin, ortama çok küçük parçalar halinde dağılmasıyla oluşan saydam olmayan karışıma *süspansiyon* denir (örnek: tebeşir tozu-su).

ÇÖZELTİ:

- Saydamdır. Renkli olabilir.
- Çözen ve çözünen maddeler mekanik yollarla birbirlerinden ayrılamaz.

SÜSPANSİYON:

- Saydam değildir.
- Süzme vb. ile katı madde sıvıdan ayrılabilir.

Kolloidal çözelti, süspansiyonu meydana getiren parçacıkların, sıvı içerisinde 10^{-4} - 10^{-6} cm arasında ince elementler halinde dağılmasıyla meydana gelir (örnek: nişasta peltesi).

Bir sıvının diğer bir sıvı içerisinde çok küçük parçalar halinde dağılması ile meydana gelen karışıma *emülsiyon* denir (örnek: zeytinyağı-su karışımı). Burada gerçek bir çözünme söz konusu olmadığından miktarı fazla olan sıvıya *çözücü*, miktarı az olan sıvıya *çözünen* denir.

Konsantrasyon, çözeltinin birim hacminde çözünmüş olan madde miktarıdır. Çözeltilerin konsantrasyonları farklı biçimlerde ifade edilebilir.

Konsantrasyon Türleri:

1- % Kütle, % Hacim:

- Ağırlıkça yüzde ağırlık: 100 g çözeltinin içinde çözünen maddenin ağırlığını belirtir. Örneğin % 2 (w/w) bakır sülfat (CuSO_4) çözeltisi, 100 gram çözeltide 2 g CuSO_4 içerir. Konsantrasyonun bu ifade şekli genellikle alaşımların bileşimini, kimyasal maddelerin saflığını, derişik asit ve alkalilerin kuvvetini belirtmekte kullanılır.
- Hacimce yüzde ağırlık: 100 mL çözeltinin içinde çözünen maddenin ağırlığını belirtir. Örneğin % 5 sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (w/v) 100 mL çözeltide 5 g NaCl içerir. 100 mL

içerisinde gram dışında bir ağırlık birimiyle madde içeren çözeltilerde, birim mutlaka belirtilir (% 5 mg gibi). Bu çözeltilerin ağırlık birimi/dL şeklinde ifadesi daha doğrudur (5 mg/dL gibi).

c) **Hacimce yüzde hacim:** 100 mL çözeltide çözünen maddenin hacmini belirtir. Hacim/hacim (v/v) olarak ifade edilir. Örneğin %70 etanol (v/v) çözeltisi, 100 mL çözeltide 70 mL etanol içerir.

2- Milyonda kısım: Kimyasal elementlerin çok düşük konsantrasyonlarını belirtmekte kullanılan ve ppm ile gösterilen **milyonda kısım** (*parts per million*), milyonda bir birimi belirtir. Birimi milyonda kütle (mg/kg) veya milyonda hacim (mL/kL) olabilir. Yerkürenin kabuğunda bulunan veya çevre kirliliğine yol açan eser elementler ile adli tıp analizleriyle saptanan eser elementlerin miktarları bu birimle ifade edilir.

3- Molarite (M): 1 L çözeltide çözülmüş maddenin *mol sayısını* belirtir.

- **Örnekler:** 1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi litresinde 1 mol NaOH içeren çözeltidir. Bu çözeltiyi hazırlamak için 1 mol gram NaOH (40 g) tartılıp, saf su ile 1000 mL'lik balon jode çözülmüş, litre çizgisine kadar su ilave edilir.
- 1 M Oksalik asit [(COOH)₂.2H₂O] çözeltisi, litresinde 1 mol (COOH)₂.2H₂O içeren çözeltidir. Çözeltinin hazırlanmasında oksalik asidin içerdiği 2 mol H₂O, mol ağırlığı hesabına katılır. (COOH)₂.2 H₂O mol ağırlığı=126 g. 126 g oksalik asit tartılıp, 1 L'lik balon jode konur. Bir miktar saf suda çözüldükten sonra suyla litreye tamamlanır.

4- Normalite(N): 1 L çözeltide çözülmüş maddenin *eşdeğer gram(ekivalan gram)sayısını* belirtir. Eşdeğer gram, molekül ağırlığının etkime değerine bölünmesiyle elde edilir. Etkime değeri, asitlerde H⁺, bazlarda OH⁻ iyonlarının sayısına bağlıdır. İndirgen ve yükseltgen maddelerde ise reaksiyon sırasında alınan veya verilen elektron sayısıdır. Bazı kimyasal maddelerin değerlikleri aşağıda verilmiştir.

<i>Asitler</i>	<i>Organik asitler</i>	<i>Bazlar</i>
HCl:1	CH ₃ COOH: 1	NaOH: 1
H ₂ SO ₄ : 2	(COOH) ₂ : 2	Ca(OH) ₂ : 2
H ₃ PO ₄ : 3		Al(OH) ₃ : 3

Örnekler:

- 1 N NaOH çözeltisi, litresinde 1 eşdeğer gram NaOH içerir. NaOH'ın molekül ağırlığı 40, etkime değeri 1'dir. Bu nedenle 1 eşdeğer gram NaOH 40/1 = 40 g'dır. 40 g NaOH bir miktar saf suda çözüldürülür, 1000 mL'ye saf su ile tamamlanır.

- 1 N (COOH)₂.2H₂O çözeltisi 1 eşdeğer gram (COOH)₂.2H₂O içerir. Bu çözeltinin hazırlanması için etkime değeri ve molekül ağırlığı bilinmelidir. (Molekül ağırlığı 126, etkime değeri 2). 1 eşdeğer gramı $126/2 = 63$ 'tür. Bu miktar tartılır, çözündürülerek saf su ile litreye tamamlanır.

Etkime değeri 1 olan bileşiklerin molar ve normal çözeltilerinin konsantrasyonları birbirine eşittir.

5- Molalite (m): 1 kgçözücüde çözünen maddenin mol sayısını belirtir.

Örnekler:

- 10 g NaOH'in 500 g suda çözünmesi ile oluşan çözeltinin molalitesi şu şekilde hesaplanır: 1 mol gram NaOH 40 g olduğu için; $10 \text{ g NaOH} = 10/40 = 0.25 \text{ mol NaOH}$ eder.
- 0.5 kg suda 0.25 mol NaOH varsa; bunun 1 kg.'ında 0.5 mol NaOH bulunur. Molalite = $0.5 \text{ mol}/1 \text{ kg} = 0.5 \text{ m}$ olur.

Ozmolarite-ozmolalite: Bir çözeltinin ozmotik basıncına katkıda bulunan kimyasal maddenin mol sayısına ozmol (Osm) denir. Ozmolarite, 1 litre *çözeltilde* çözünen maddenin ozmol sayısını, ozmolalite ise 1 kgçözücüde çözünmüş maddenin ozmol sayısını belirtir. Seyreltik sulu çözeltilerde ozmolarite ve ozmolalite eşit kabul edilebilir. Hesaplamalarda tuzların iyonlarına ayrıştığı kabul edilir. Dissosiyeye olmayan (ayrışmayan) bir maddenin mol sayısı, ozmol sayısına eşittir. Buna göre 1 mol glikoz=1 ozmol; 1 mol NaCl ise, ayrıştığında 1 mol Na ve 1 mol Cl olduğu için 2 ozmol'dur.

Konsantrasyon Hesapları ve Seyreltmeler:

Konsantrasyonu az olan çözeltilere *seyreltik çözelti*, konsantrasyonu fazla olan çözeltilere ise *derişik çözelti* denir. Çözebileceği en fazla maddeyi çözünmüş halde bulunduran çözeltilere *isedoymuş çözelti*, bunların konsantrasyonlarına *doygunluk konsantrasyonu* denir. Bu konsantrasyonun üstündeki çözeltiler *aşırı doymuş*, altındaki çözeltiler ise *doymamış* çözeltiler olarak adlandırılır. Yüksek sıcaklıkta hazırlanan doymuş çözeltiler, soğumaya bırakıldığında içeriğindeki katı maddenin bir kısmı yeniden çökelerek aşırı doymuş çözelti haline geçer. Sıcaklık, doygunluk konsantrasyonunu artırır.

1- Asitlerden Normal Çözelti Hazırlanması:

Bu işlem aşağıdaki çeşitli örneklerle açıklanabilir.

- Derişik hidroklorik asit (HCl)'den 1 N HCl hazırlanması.
 - a) Önce derişik HCl çözeltisinin molaritesini hesaplamak gerekir: Derişik HCl çözeltisinin piyasada % 37 (v/v) olarak bulunan örneğinin yoğunluğu 1.19 g/mL'dir. Buna göre 1000 mL'si 1190 g olan derişik çözeltinin % 37'si HCl olduğundan, 1 L derişik çözeltilerde $1190 \times 0.37 = 440.3 \text{ g HCl}$ bulunur.

HCl'in mol ağırlığı 36.5'tur. 440.3 g HCl içeren derişik çözelti $440.3/36.5=12.06$ M'dır.

HCl'in etkime değeri 1 olduğu için, bu çözeltinin normalitesi, molaritesine eşittir. 12.06 N HCl'in 1 litresinde 12.06 eşdeğer gram var demektir.

Litresinde 1 eşdeğer gram HCl içeren çözeltiyi hazırlamak için doğru orantı hesabı yapılır:

1000 mL'de 12.06 eşdeğer gram HCl bulunursa kaç mL'de 1 eşdeğer gram HCl bulunur?

$1000/12.06 = 82.9$ mL. Bu miktarda derişik HCl alınıp litreye tamamlanır.

b) 1 L normal HCl çözeltisi için gereken sıvı hacmi (V), aşağıdaki formülle de hesaplanabilir:

$$V(\text{mL}) = \frac{\text{Mol ağırlığı} \times 100}{\text{g/dL} \times \text{Etkime değeri}} = \frac{36.5 \times 100}{44 \times 1} = 82.95$$

- Yoğunluğu 1.84 olan % 98'lik derişik sülfürik asit (H_2SO_4)'ün molaritesinin ve normalitesinin hesaplanması.

a) 1 mL H_2SO_4 , 1.84 gramdır. Buna göre 1 litre %100'lük asidin ağırlığı 1840 g, 1 litre %98'lik asidin ağırlığı $1840 \times 0.98 = 1803$ g olur.

H_2SO_4 'ün mol ağırlığı 98 g'dır. 1803 g H_2SO_4 içerisinde $1803/98=18.4$ mol vardır. Litrede 18.4 mol H_2SO_4 olduğundan çözeltinin molaritesi 18.4 dür.

b) H_2SO_4 'ün etkime değeri 2'dir. Buna göre 1 eşdeğer gram H_2SO_4 , $98/2 = 49$ g'dır.

1 litre H_2SO_4 1803 g olduğundan, litresinde $1803/49 = 36.8$ eşdeğer gram bulunur.

Derişik H_2SO_4 'ün normalitesi 36.8 dir.

- 0.5 N H_2SO_4 çözeltisinin 1.2 litresinde kaç gram H_2SO_4 vardır?

1 N H_2SO_4 , 1 eşdeğer gram madde içerir. Etkime değeri 2 olduğundan eşdeğer gramı $98/2=49$ gram eder. 0.5 N çözeltide ise 0.5 eşdeğer gram madde, yani 24.5 g vardır.

1.2 L'de: $24.5 \times 1.2 = 29.4$ g H_2SO_4 bulunur.

- 300 mL'sinde 10 g sakkaroz ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) bulunan çözeltinin molaritesi kaçtır?

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ mol gram=337 g

Basit doğru orantıyla: 300 mL'de 10 g varsa litrede 33.3 g vardır.

$33.3/337 = 0.099$ M eder.

- 180 mL 0.21 M çözelti hazırlamak için kaç gram magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) alınmalıdır?

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ mol gramı = 203 g

1 mol 203 g ise 0.21 mol: $0.21 \times 203 = 42.6$ g eder.

1000 mL için 42.6 g gerekirse 180 mL için $42 \times 180 / 1000 = 7.66$ g gerekir.

- 11.2 g potasyum hidroksit (KOH)'den kaç mL 0.5 M çözelti hazırlanır? (KOH mol ağırlığı= 56 g)
0.5 M KOH çözeltisinin litresinde 0.5 mol KOH bulunur. Bu da $56 \times 0.5 = 28$ g KOH eder.

Elimizde 11.2 g olduğundan, $11.2 / 28 = 0.4$ L (400 mL) 0.5 M çözelti hazırlanır.

2- Derişik çözeltilerden seyreltik çözelti hazırlanması:

Derişik çözeltilere çözücü ekleyerek konsantrasyonunu azaltma işlemine seyreltme denir. Seyreltme işleminde aşağıdaki formülden yararlanır:

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

Konsantrasyon (C), molar, normal veya % olarak ifade edilebilir. Burada prensip, eşitliğin iki tarafında da madde miktarının eşit olmasıdır. Konsantrasyon molar olarak ifade ediliyorsa $V \times M$, mol sayısını; normal olarak ifade ediliyorsa $V \times N$ eşdeğer gram sayısını verir. % olarak ifade edilen konsantrasyon hesaplarında da $V \times \%C = g$ maddeyi gösterir. Seyreltme yapılan çözeltilerde çözülmüş madde miktarı, başlangıçtaki ve son çözeltilerde aynı olmalıdır.

- % 40 NaOH çözeltilerinden 100 mL % 2 NaOH çözeltilerinin hazırlanması.

Önce 100 mL’inde 40 g NaOH olan çözeltilerin kaç mL’inde 2 g NaOH bulunduğu hesaplanır:

$$100 \times 2/40 = 5 \text{ mL}$$

5 mL % 40 NaOH çözeltilerinden alınıp hacmi distile suyla 100 mL’ye tamamlanırsa % 2’lik NaOH çözeltileri elde edilir.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \text{ formülüne göre hesaplandığında; } V_1 \times 0.4 = 100 \times 0.02$$

$$V_1 = 2/0.4 = 5 \text{ mL}$$

Molar ve normal konsantrasyonlu çözeltilerden daha seyreltik çözeltiler hazırlanmasında da aynı işlem yapılır. Örneğin 12 N HCl’den 3 N HCl hazırlanması için pratik olarak derişik olan çözeltilerden (12 N) 3 mL alınıp 12 mL’ye saf su ile tamamlanır. **Ancak bu işlemde dikkat edilecek nokta, derişik asit üzerine suyun eklenmemesidir.** Kuvvetli derişik asitlerde seyreltme yapılırken aside su katılmasıyla ısınma olacağından, saf suyun üzerine asit yavaşça katılır, soğuyunca da su ile hacmi tamamlanır.

- %10’luk $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mol ağırlığı = 249.61) çözeltilerinden 0.5 mM çözeltilerinin hazırlanması.

% 10’luk çözeltilerinin litresinde 100 g madde bulunacağından,

$$M = 100/249.61 = 0.4 \text{ mol/L} = 400 \text{ mM}$$

0.5 mM çözelti hazırlamak için doğru orantı hesabı yapılır. 1 litrede 400 mmol varsa, litrede 0.5 mmol olması için $0.5 \times 1000/400 = 1.25$ mL gerekir.

1.25 mL 400 mM çözeltilerden alınıp litreye tamamlanır.

- 250 mL 0.15 M H_2SO_4 çözeltilerini, 0.025 M olması için ne kadar seyreltmelidir?

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{M_1 \cdot V_1}{M_2} = \frac{250 \times 0.15}{0.025} = 1500 \text{ mL'ye kadar saf su eklenmelidir.}$$

- 1.5 M bir çözeltinin 75 mL'si 250 mL'ye sulandırılırsa çözeltinin molaritesi ne olur?
Yukarıdaki formülle: $75 \times 1.5 = 250 \times M_2$; $112.5 / 250 = 0.45 \text{ M}$ bulunur.

3- Basit sulandırma (seyreltme):

Çözeltiler bir veya birkaç kat seyreltilebilir. Bunun için çözeltinin belirli bir hacmi üzerine o hacminin istenilen katı kadar su eklenir. Örneğin çözeltiden 1 mL alınıp üzerine 1 mL su eklenirse 1/2 oranında (1 kısım çözelti:1 kısım su) sulandırılmış olur. Ana çözeltiden 1 mL alınıp 4 mL su katılırsa 1/5 oranında sulandırılmış demektir. Bu seyreltmede sulandırma katsayısı 5 olarak da ifade edilir. Toplam 5 mL içerisinde ana çözeltiden 1 mL olduğunu gösterir. On kez sulandırmak için ana çözeltiden 1 hacim alınır, 9 hacim su katılır (1/10 sulandırma).

- 5 mL seruma, 15 mL serum fizyolojik eklenirse seyreltme katsayısı kaç olur?

$$5+15=20 \text{ mL son hacim}$$

Aşağıdaki gibi orantı kurulur.

$$20 \text{ mL'de} \quad 5 \text{ mL varsa,}$$

$$X \text{ mL'de} \quad 1 \text{ mL olur}$$

$$X = 20/5 = 4$$

- 250 mL 1/5 oranında sulandırılmış serum örneği nasıl hazırlanır?

$$X/250 = 1/5 \quad X=250/5=50 \text{ mL}$$

50 mL serum 250 mL'ye sulandırma tamponu ile tamamlanır.

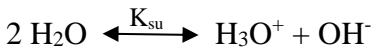
Sorular:

- 1- 10 mL içinde 20 eşdeğer mg çözünen madde içeren çözeltinin normalitesini hesaplayınız.
- 2- 100 mL'sinde 17.14 mg baryum hidroksit $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ içeren çözeltinin normalitesini hesaplayınız. $[\text{Ba}(\text{OH})_2]$ 'in mol ağırlığı=171.4 g]

pH kavramı ve ölçülmesi

Sulu çözeltilerde $[\text{H}^+]$ ve $[\text{OH}^-]$ konsantrasyonlarının çok küçük sayılarla ifade edilmesi gerekebilir. Bu nedenle konsantrasyonlar eksponensiyel olarak belirtilir. Hesaplamalarda kolaylık getirmesi amacıyla bu sayıların negatif logaritması kullanılarak bir cetvel oluşturulmuştur. $[\text{H}^+]$ konsantrasyonunun negatif logaritmasına pH denir.

$$\text{pH} = \log 1/[\text{H}^+] = -\log [\text{H}^+]$$



$$25^0 \text{ C'da } [\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$K_{su} = [H_3O^+] \times [OH^-] = 1.0 \times 10^{-14}$$

$$-\log K_{su} = -(\log [H_3O^+] [OH^-]) = -\log (1.0 \times 10^{-14})$$

$$-(\log [H_3O^+] + \log [OH^-]) = -(-14)$$

$$-\log [H_3O^+] - \log [OH^-] = 14 \quad \mathbf{pH + pOH = 14}$$

pH cetveli 0-14 arasında değişir. 1 M HCl çözeltilisinin pH'sı 0'dır. 1 M NaOH çözeltilisinin pH'sı da 14'tür. pH ölçümü asit-baz endikatörleri veya pHmetre denilen aletle yapılabilir. pHmetre, kullanılan pH elektrodunun voltajını ölçerek bunu mV veya pH değeri olarak gösteren özel bir voltmetredir. pHmetrelerde kullanılan elektrod sistemi iki elektrodan oluşur. Bunlardan biri ölçümü yapan pH'ya duyarlı elektrod, diğeri ise referans elektroddur. pH'ya duyarlı elektrodun voltajı, ölçüm yapılan çözeltilinin pH'sı ile değişir. Referans elektrod ise ölçülen elektrik devresinin tamamlanması için kullanılır. Fonksiyonu, pH'ya duyarlı elektrodun voltajının karşılaştırılacağı değişmeyen (sabit) bir voltajı sağlamaktır. Modern pHmetrelerde bu iki elektrod sistemi tek bir elektrod haline getirilmiş kapalı sistemlerdir.

pHmetrenin doğru ölçüm yapması için standardize edilmesi gerekir. Bu işlem pH'ı bilinen standard tampon çözeltiler kullanılarak yapılır. Standardizasyonun belirli aralarla tekrarlanması aletin doğru ölçüm yapması açısından önemlidir.

pHmetrenin kullanılması:

- 1- Elektrod distile su ile yıkanır ve kuru ve yumuşak bir kağıt havlu ile kurulur.
- 2- Ölçüm yapılacak çözeltilinin içine elektrod daldırılır. Sistemin dengeye gelmesi beklenir.
- 3- pHmetrenin sıcaklık ayar çubuğu ile çözeltilinin sıcaklığının aletin standardize edildiği sıcaklığa uygunluğu denetlenir.
- 4- Çözeltilinin pH'sı göstergeden okunur.
- 5- Ölçüm işleminin sonunda (veya yeniden bir ölçüm yapılmadan önce) elektrod tekrar yıkanır ve *musluk suyu* içeren kabına takılır. Elektrod mutlaka su içinde beklemelidir. Aksi halde kuruyarak fonksiyon yapamaz hale gelir. Elektrod koruma kabına distile su konulmamalıdır. Distile su elektrodun yosun tutmasına yol açar.

Asit-baz indikatörleri: Asit-baz indikatörleri, titrasyonda dönüm noktasını (ekivalans noktayı) gözle görülebilir hale getirebilmek için kullanılan, çeşitli pH alanlarında renk değiştirme özelliğine sahip zayıf organik asit veya bazlardır. Molekül halden iyon haline geçerken veya tersi durumunda renk değiştirirler. Renk değişimi şiddetli olduğu için çok az miktarını kullanmak yeterli olur. İndikatör seçiminde en önemli nokta seçilen indikatörün renk değiştirme aralığının (pH aralığı) reaksiyonun

son noktasının pH'sını da kapsamaktadır. İndikatörler iki çeşittir:

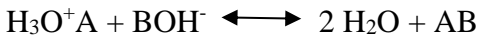
- Sıvı indikatörler: Belirli pH'da renk değiştiren maddelerin çözeltisinden oluşur. Çoğunlukla titrasyon sırasında kullanılır.
- Kağıt indikatörler: Sıvının asit, nötral veya alkali özelliğinde olduğunu gösterir. En basiti turnusol kağıdıdır. Belirli pH aralığına özgü indikatör kağıtları daha hassas pH ölçümü veya ayarlanması amacıyla kullanılır. Sık kullanılan indikatörler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

Adı	pH alanı	Alkali alanda renk	Asit alanda renk
Timol mavisi	1.2 - 2.8	Sarı	Kırmızı
Dimetil sarısı	2.9 - 4.0	Sarı	Kırmızı
Metiloranj	3.0 - 4.4	Turuncu-Sarı	Kırmızı
Kongo kırmızısı	3.0 - 5.2	Kırmızı	Mavi-menekşe
Metil kırmızısı	4.4 - 6.2	Sarı	Kırmızı
Bromtimol mavisi	6.0 - 7.6	Mavi	Sarı
Fenolftalein	8.3 - 10.2	Kırmızı	Renksiz

Zayıf asitler kuvvetli alkalilerle titre edilirken, hafif alkalik ortamda renk değiştiren fenolftalein (pH=8.3-10.2) kullanılır. Zayıf alkaliler şiddetli asitlerle titre edilirken, hafif asit ortamda renk değiştiren metiloranj veya metil kırmızısı (pH=4.4-6.2) kullanılır. Kuvvetli asitlerle kuvvetli alkaliler titre edilirken metiloranj-fenolftalein arasında renk değiştiren bütün indikatörler kullanılabilir.

Asit-Baz Titrasyonu- Nötralleşme

Nötralleşme bir asit ve bir bazın reaksiyonu sonucu tuz ve su oluşmasıdır.



Nötralleşme reaksiyonunda en önemli nokta, reaksiyon sonunda ortamdaki asidin ve bazın tamamen tükenmiş olmasıdır. Bu duruma *nötralleşmenin eşdeğer(ekivalans) noktası* denir. Bu noktada asidin eşdeğer gram sayısı ile bazın eşdeğer gram sayısı eşitlenmiştir. Ekivalans noktasını bulabilmek için aside baz (veya baza asit), titrasyon yöntemi ile katılır. Titrasyonda nötralleştirilecek asidin belirli bir hacmi bir behere konur. Üzerine uygun asit-baz indikatörü damlatılır. Bürete konulan baz, beherdeki asit üzerine belirli bir hızla damlatılarak titrasyon yapılır. Nötralleşmenin ekivalans noktasına gelindiği, indikatörün renk değiştirmesi ile anlaşılır. Buna indikatörün son noktası denir. Dikkat edilmesi gereken durum, indikatörün son noktası ile nötralleşme reaksiyonunun ekivalans noktasının uyumlu olmasıdır. İndikatörün renk değişim pH aralığının, ekivalans noktasının pH'sını da kapsamaması gerekir.

1. DENEY: Zayıf asitle kuvvetli bazın titrasyonu

Zayıf asit olarak asetik asit (CH_3COOH), kuvvetli baz olarak NaOH kullanılır. İndikatör olarak değişim pH'ı, CH_3COOH 'ın ekivalans noktası olan $\text{pH}=8.72$ 'i de kapsayan fenolftalein kullanılır.

- 1- 1 N CH_3COOH çözeltisi 0.1 N olacak şekilde 10 kez sulandırılır.
- 2- Bir beherede 10 ml 0.1 N CH_3COOH çözeltisi konur. Üzerine 1-2 damla fenolftalein damlatılır. Fenolftalein asit ortamda renksizdir.
- 3- 1 N NaOH çözeltisi 0.1 N olacak şekilde sulandırılır.
- 4- Bürete 0.1 N NaOH çözeltisi doldurulup bütetin ayarları yapılır.
- 5- Bütetin musluğu 5 saniyede bir damla akacak hızda açılarak NaOH çözeltisi asit çözeltisinin üzerine damlatılır. Bu arada asit çözeltisi sürekli karıştırılmalıdır.
- 6- Titrasyon sürdükçe NaOH çözeltisinin damlamasıyla asit çözeltisi uçuk pembe renge döner. Bu renk asit çözeltisini karıştırdıkça kaybolur.
- 7- Ekivalans noktasına ulaşıldığında asit çözeltisi, karıştırılınca hemen kaybolmayan uçuk pembe renk alır. Bu noktada bütetin musluğu kapatılmalıdır. Aksi halde devam eden NaOH damlaları, beherde nötralleşecek asit kalmadığından ortamı alkali yapacağı için fenolftaleinin alkali ortamdaki koyu pembe rengi görülür.
- 8- Bütetten harcanan NaOH miktarı okunur.
- 9- *Hesap:* Nötralleşmede asit ve bazın eşit eşdeğer miktarları birbiriyle reaksiyona girdiği için; ekivalans noktasında CH_3COOH ve NaOH çözeltilerinin eşdeğer gram sayıları birbirine eşittir. Normalite=eşdeğer gram sayısı/hacim olduğuna göre; eşdeğer gram sayısı= Normalite x hacim olur. Ekivalans noktasında:

$$\text{Eşdeğer gram sayısı}_{\text{asit}} = \text{Eşdeğer gram sayısı}_{\text{baz}}$$

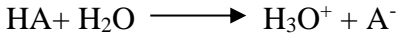
$$N_{\text{asit}} \times V_{\text{asit}} = N_{\text{baz}} \times V_{\text{baz}}$$

Buna göre formüle CH_3COOH 'in normalitesi ve hacmi ile NaOH çözeltisinin bütetten sarfedilen hacmi yazılarak NaOH çözeltisinin kesin konsantrasyonu saptanır.

Tampon çözeltiler

Birçok kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamın belirli bir pH'da bulunması gerekir. Bu nedenle reaksiyon süresince ortam pH'sı sabit tutulmalıdır. Tampon çözeltiler ortamı pH değişikliklerine karşı koruyan çözeltilerdir. Bu fonksiyonlarını H^+ veya OH^- iyonlarını ortamdaki uzaklaştırarak ortamın hidrojen iyon konsantrasyonunun değişmemesini sağlamak suretiyle gerçekleştirirler. Tampon sistemler genellikle bir zayıf asit (veya baz) ve onun tuzunun karışımlarıdır. Bunların belirli oranda birleşmeleriyle çeşitli pH değerlerinde tampon çözeltiler ortaya çıkar. Tampon sistemlerin pH'sı Henderson-Hasselbalch denklemi ile hesaplanır.

Asidik bir tampon sisteminde:

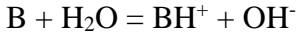


(HA = Ayrışmamış asit; A⁻ = Tuz)

$$K_a = \frac{[\text{A}^-] \times [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]} \quad [\text{H}_3\text{O}^+] = K_a \times \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \text{Log} \left(\frac{\text{Tuz}}{\text{Ayrışmamış asit}} \right) \quad \underline{\text{Henderson-Hasselbalch Denklemi}}$$

Bazik bir tampon sisteminde:



$$K_b = \frac{[\text{BH}^+] [\text{OH}^-]}{[\text{B}]}$$

$$\text{pOH} = \text{p}K_b + \log \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]}$$

Tampon çözeltilerin pH'ları Tuz/Asit veya Tuz/Baz oranlarına bağlı olarak değişmektedir.

Tampon sisteminin en etkili tamponlama kapasitesi pK_a veya pK_b değerinin pH değerine yakın olduğu noktadır.

[A⁻] = [HA] olduğunda [A⁻] / [HA]=1 olur. Buradan:

pH=pK_a+ log 1; pH= pK_a+ 0; pH=pK_a sonucu çıkar. Aynı hesaplama bazik tamponlar için de geçerlidir.

Tamponlama gücü, tuz/asit oranı 1'den uzaklaştıkça azalır. Genellikle tamponlar pH=pK±1 dışında kullanılmaz. İstenilen pH'da güçlü bir tampon çözeltisi hazırlayabilmek için pK_a'sı korunmak istenilen pH'ya çok yakın bir asit/ baz ve onun tuzunun karışımı seçilmelidir. Örneğin pH'sı 4.7 olan güçlü bir tampon hazırlamak için en uygun asit, pK_a'sı 4.76 olan asetik asittir.

(K_{asetik asit} = 1.8 x 10⁻⁵)

2. DENEY: Tampon çözeltilerin hazırlanması ve tampon etkisinin gösterilmesi

1- 0.1 M Sodyum asetat/Asetik asit (CH₃COONa/CH₃COOH) tamponunun hazırlanması:

0.1 M CH₃COONa ve 0.1 M CH₃COOH çözeltileri eşit oranda karıştırılır (1:1; v/v). Bu çözeltinin pH'sı pHmetre kullanılarak ölçülür.

2- Tampon sistemine kuvvetli baz çözeltisinin etkisi:

- 1 L 0.1 M CH₃COONa / CH₃COOH tampon çözeltisine 0.2 g NaOH eklenirse pH kaç olur?

Bu işlem için 1 M NaOH çözeltisi kullanılır. 1 M NaOH çözeltisinin litresinde 40 g NaOH vardır. 5 mL'de 0.2 g NaOH bulunur. O halde 1 L tampona 5 mL 1 M NaOH eklenmesi gerekir.

Bu miktar kullanılacak tampon miktarına oranla ayarlanabilir. İşlemi takiben tamponun pH'sı ölçülerek kuvvetli baz çözeltisinin pH'yı ne kadar değiştirdiği not edilir.

3- Tampon sistemine kuvvetli asit çözeltisinin etkisi:

- 1L0.1 M CH₃COONa/CH₃COOH tampon çözeltisine 5 mmol HCl eklenmesinin pH'a etkisi ne olur?

Bu işlem için 1 M HCl çözeltisi kullanılır. 1 M HCl çözeltisinin litresinde 1 mol (1000 mmol) HCl vardır. Bu çözeltinin 5 mL'sinde 5 mmol bulunur. Şu halde 1 L tampona 5 mL 1 M HCl eklenmesi gerekir. Bu miktar, kullanılacak tampon miktarına oranla ayarlanabilir. İşlemi takiben tamponun pH'ı ölçülerek pH'daki değişiklik not edilir.

4- Suya kuvvetli baz etkisi:

Önce 3. basamakta kullanılan tampon miktarı kadar suyun pH'sı ölçülür. İçine, tampona eklenen miktarda NaOH çözeltisi katılarak yeniden pH'sı ölçülür.

5- Suya kuvvetli asit etkisi:

3. basamakta kullanılan tampon miktarı kadar suyun içine, tampona eklenen miktarda HCl çözeltisi katılarak pH'sı ölçülür.

Sorular:

- 1- Yukarıdaki 1. ve 2. işlemlerde hazırladığımız tamponların pH'sını Henderson-Hasselbalchdenkleminde yararlanarak hesaplayınız. pHmetre ile ölçtüğünüz değeri denklemden bulduğunuzla kıyaslayınız. ($K_{\text{asetik asit}} = 1.8 \times 10^{-5}$)
- 2- Yukarıdaki 3. ve 4. işlemlerin (NaOH ve HCl eklenmesinin) pH üzerine etkisini Henderson-Hasselbalch denklemi yardımıyla gösteriniz.
- 3- Suya NaOH veya HCl eklenmesinin suyun pH'sını ne kadar etkilediğini hesaplayınız. pHmetre ile bulduğunuz sonuçla kıyaslayınız.

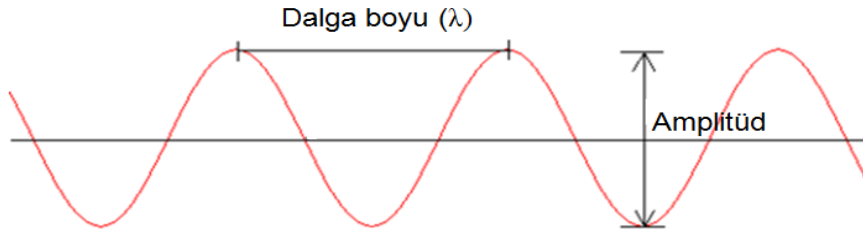
TBG-II UYGULAMASI

1- SPEKTROFOTOMETRİ ve ELEKTRON TRANSPORTU

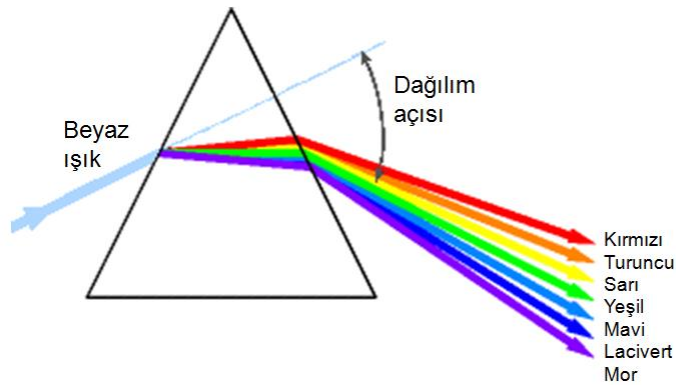
Spektrofotometri

Biri ötekinden daha koyu renkli olan aynı maddenin iki farklı çözeltisine baktığımızda koyu renkli çözeltide daha fazla madde bulunduğunu biliriz. Çözeltinin rengi koyulaştıkça içerdiği maddenin konsantrasyonu da artar. Spektrofotometrinin altında yatan prensip budur: Bir çözeltinin renginin şiddeti içinde bulunan madde miktarının ölçüsüdür.

Bir elektromanyetik radyasyon türü olan ışık, dalga veya foton denilen tanecikler halinde boşlukta yol alır. Işığın dalgalar halinde hareket ederken oluşturduğu iki tepe noktası (pik) arasındaki uzaklık ışığın dalga boyunu verir. Dalga boyu lambda (λ) ile gösterilir ve nanometre ($=10^{-9}$ m) ile ifade edilir.

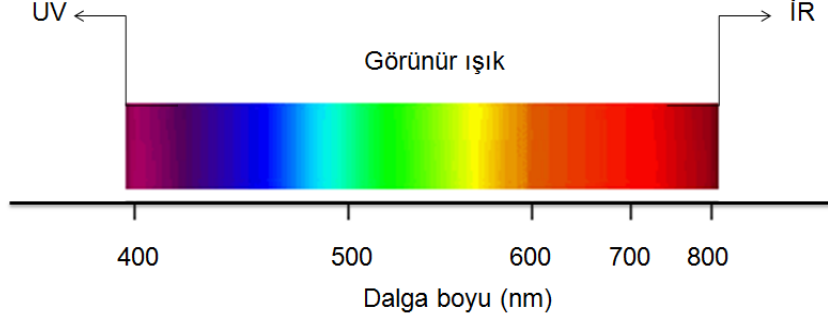


Güneş ışığı veya tungsten lambadan çıkan beyaz ışık, farklı dalga boylarındaki elektromanyetik ışıklardan oluşan bir karışımdır. Eğer bu ışınlar görünür bölgedeki ışınların tamamını kapsıyorsa beyaz renkte görünürler.



Işık spektrumu

Beyaz ışığı oluşturan farklı dalga boylarındaki tek ışıklar kümesine *spektrum* denir. İnsan gözü spektrumun 380-750 nm arasındaki dalga boylarına ait radyasyonu görebilir (görünür ışık). Daha kısa dalga boyuna sahip olanlar ultraviyole (UV; morötesi), daha uzun olanlar infrared (IR: kızılötesi) olarak adlandırılır.



Işık bir maddenin üzerine düştüğünde üç olay gerçekleşebilir:

Madde ışığı yansıtabilir.

Madde ışığı tutabilir (**absorbans**).

Işığın bazı dalga boyları absorplanıp geri kalanı geçirilebilir (**transmitans**) veya yansıtılabilir.

Spektrofotometride ışığın yansıtılması önemli olmadığı için absorbans ve transmitans ele alınır.

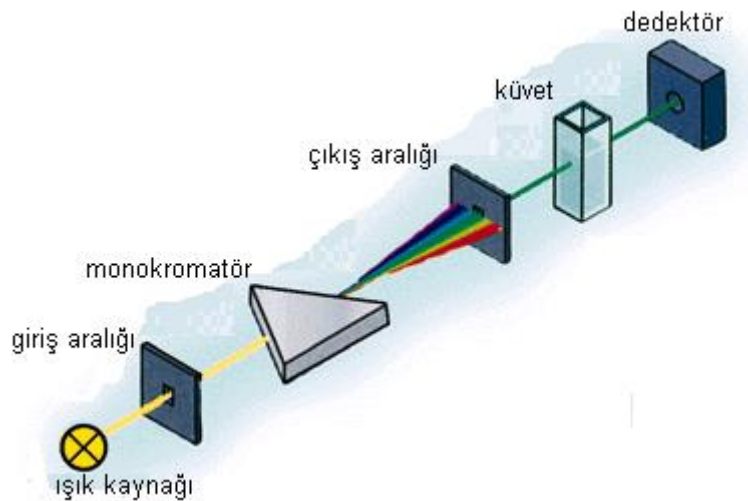
Bir çözeltide görülen renk görünür ışığın bazı dalga boylarının seçimli olarak tutulmasına, geri kalan dalga boylarındaki ışığın geçirilmesine bağlıdır. Bir çözelti beyaz ışığın görünür spektrumundaki bütün dalga boylarındaki ışığı tutarsa o çözelti siyah görünür. Eğer hiçbir dalga boylarındaki ışığı tutmazsa o çözelti beyaz veya renksiz görünür. Görünen her renge ait ışığın bir dalga boyu vardır. Mavi ışığı tutabilen bir çözelti beyaz ışıkla temas ettiğinde, beyaz ışığın mavi renge ait dalga boylarındaki ışınlarını tutar ve geri kalan dalga boylarındaki ışık kümesini geçirir. Geçirilen ışınların bileşkesi gözümüze sarı olarak görünür. Mavi ışığın tamamlayıcı rengi sarıdır. Beyaz ışığın içerdiği farklı renkteki ışık radyasyonlarından oluşan spektruma baktığımız zaman bir çözelti tarafından tutulan ışık dışındaki ışıkların bileşkesi, tutulan rengin tamamlayıcısı olarak adlandırılır ve o çözeltinin gözümüzle gördüğümüz rengini oluşturur.

Bir çözelti içindeki madde miktarını çözeltilen geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri**, bu ölçümü yapan cihazlara ise **spektrofotometre** adı verilir. Spektrofotometrelerde renk yerine ışık şiddeti ölçüldüğünden, görünür ışığın yanı sıra UV dalga boylarında da ölçüm yapılabilmektedir. Çözeltilerde tutulan ışık miktarı **absorbans**, geçirilen ışık miktarı ise **transmittans** olarak adlandırılır. Spektrofotometrede absorbans ölçümlerinde, görünen rengin tamamlayıcısı olan tutulan ışığın rengine ait dalga boyu kullanılır. Örneğin sarı

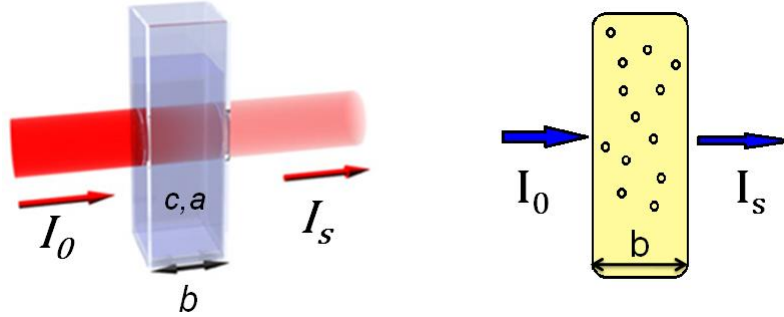
renkli bir çözeltinin absorbansı ölçülecek ise, bu çözelti tarafından tutulan mor ışığın dalga boyu (380-440 nm) kullanılır. Aşağıdaki tabloda spektrofotometrede belirli bir dalga boyu aralığında tutulan ışık renkleri gösterilmektedir.

<i>Işık dalga boyu (nm)</i>	<i>Spektrum aralığı</i>	<i>Tutulan ışığın rengi</i>	<i>Gözle görülen renk</i>
<380	UV	-	-
380-440	Görünür	Mor	Sarı-Yeşil
440-480	Görünür	Mavi	Sarı
480-490	Görünür	Yeşil-mavi	Turuncu
490-500	Görünür	Mavi-yeşil	Kırmızı
500-580	Görünür	Yeşil	Mor
580-600	Görünür	Sarı	Mavi
600-620	Görünür	Turuncu	Yeşil-Mavi
620-750	Görünür	Kırmızı	Yeşil
>750	İR	-	-

Spektrofotometre, teknik olarak, seçilmiş dalga boylarında ışık oluşturan, bu ışığı küvet denilen özel bir tüp içindeki çözeltinin içerisinde geçiren ve tutulan ışığın şiddetini ölçen bir cihazdır. Görünür ışık kaynağı olarak tungsten lamba, UV kaynağı olarak hidrojen veya döteryum lambası kullanılır. Monokromatör, tek renkli (monokromatik) ışık seçimini sağlayan bir tür ışık ayırım filtresidir. Çıkış aralığı, seçilen dalga boyunda dar bir ışık huzmesi eldesini sağlar. Absorbansı ölçülecek sıvıların konulduğu küvetler, kuartz, plastik veya camdan yapılmış, çapı 1 cm olan silindirik tüp veya bir kenarı 1 cm olan dikdörtgen prizma biçiminde haznelerdir. Görünür ışık aralığında cam veya plastik küvetler, UV dalga boylarında yapılan ölçümler için ise kuartz küvetler kullanılır. Küvetten çıkan ışık dedektörde elektrik enerjisine çevrilir. Transmittans veya absorbans, göstergeden okunur. Basit bir spektrofotometre düzeneği aşağıda görülmektedir.



Fotometrinin prensiplerini düzenleyen ve Beer-Lambert diye adlandırılan kanuna göre bir çözülden geçen ışık miktarı, çözeltinin konsantrasyonu ve ışığın çözelti içinde katettiği yolla logaritmik olarak ters orantılı; tutulan ışık miktarı ise doğru orantılıdır.



Buna göre çözüliye giren ışık şiddeti ile çözülden çıkan ışık şiddeti arasında matematiksel bir ilişki vardır. Giren ışığın şiddeti I_0 ile gösterilir. Çözülden çıkan ışığın şiddeti, giriş şiddetine eşit değildir ve I_s şeklinde gösterilir. Çözeltide renk oluşturan madde, konsantrasyonu ölçülecek maddedir.

Transmittans (T) = I_s / I_0 (Çıkan ışık/Giren ışık) olur.

Transmittans değerinin 100 ile çarpımı % T i verir. % T monokromatik (tek dalga boyuna sahip) ışığın renkli çözülden geçiş oranını belirtir. Absorbans (A) ile transmittans (T) arasında şu bağıntı vardır:

$$A = -\log T \quad A = -\log I_s/I_0$$

Beer-Lambert kanununun ifadesi aşağıdaki gibi gösterilir:

$$T = I_s / I_0 = 10^{-k \cdot c \cdot b} \quad A = -\log T \quad \text{olduğundan:}$$

$$A = \log_{10} (I_0 / I_s)$$

$$A = k \cdot c \cdot b$$

k = Absorptivite katsayısı

c = Konsantrasyon (g/L)

b = Işık yolu (cm, ışığın çözelti içinde katettiği yol)

$$k = \frac{A}{c \cdot b} \quad c = \frac{A}{k \cdot b}$$

Buna göre maddenin konsantrasyonu, ışık geçirgenliği (transmitans) ile ters ve logaritmik; tutulan ışık miktarı (absorbans) ile doğru orantılıdır.

Molar absorptivite (E) spesifik bir maddenin 1 mol/L'sinin belirli dalga boyundaki ışığı tutma miktarıdır. Bu değer, o madde ve o dalga boyu için sabittir. Birimi $M^{-1} cm^{-1}$ dir. Konsantrasyon birimi (c), mol/L cinsinden alındığında $A = k.c.b$ formülünde **k** yerine molar absorptivite (E) yazılır.

Ölçümü yapılan maddenin o dalga boyundaki absorptivite katsayısı biliniyorsa absorbans ölçümü ile $A = k.c.b$ formülünden çözeltinin konsantrasyonu hesaplanır. Işığın geçtiği yol (b), 1 cm olarak alınır.

Eğer absorptivite katsayısı bilinmiyorsa, konsantrasyonu bilinmeyen çözelti ile birlikte aynı maddenin konsantrasyonu bilinen bir çözeltisinin (**standart çözelti**) absorbansları ölçülüp doğru orantı kurularak konsantrasyon hesaplanır.

$$A_1 = k_1 \cdot b_1 \cdot c_1 \quad c_1 = \text{Standart çözeltinin konsantrasyonu}$$

$$A_2 = k_2 \cdot b_2 \cdot c_2 \quad c_2 = \text{Bilinmeyen çözeltinin (deney) konsantrasyonu}$$

Her iki çözelti de aynı maddeyi içerdiği için aynı absorptivite katsayısına sahiptir. Işık aynı tür kuvvetlerden geçtiği için ışık yolu (b) 1 cm'dir. Bu durumda $k_1 \cdot b_1 = k_2 \cdot b_2$ olacağından,

$$\frac{A_1}{c_1} = \frac{A_2}{c_2}$$

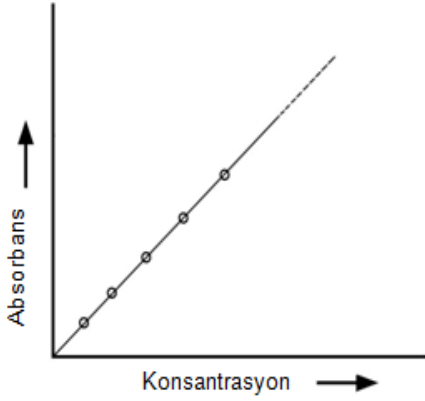
$$c_2 = \frac{A_2}{A_1} \times c_1$$

$$c_2 = \frac{\text{Deneyin absorbansı}}{\text{Standartın absorbansı}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

formülüne ulaşılır.

Molar absorptivite bilinmediği durumlarda bir maddenin bilinmeyen konsantrasyonunu bulmak için *standart eğri* kullanılır. Bu amaçla aynı maddenin konsantrasyonu bilinen bir çözeltisi (*standart çözelti*) hazırlanır ve bu çözeltinin değişik oranlarda seyreltilmesi ile farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edilir. Elde edilen standart çözeltilerin absorbansları uygun dalga boyunda ölçülür. Standart çözelti konsantrasyonları yatay eksene (x), bu konsantrasyonların verdiği absorbanslar dikey eksene (y) yerleştirilerek elde edilen grafiğe **standart eğri (kalibrasyon eğrisi)** denir. Bu eğride ölçülen absorbanslar ve çözeltilerin konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişki

olduğu görülür. Böyle bir eğrinin yardımı ile absorbansı ölçülen ancak konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin konsantrasyonu hesaplanabilir.



Lambert-Beer kanununun grafikte ifadesi

Spektrofotometre kullanımı:

- Spektrofotometre açılarak, lambalarının ısınması için 5 dk beklenir.
- Cihaz, uygun dalga boyuna ayarlanır. Bunun için önceden maksimum absorbans tayini yapılmalı ve uygun dalga boyu saptanmalıdır.
- Kullanılacak küvetlerin temiz ve lekesiz olmasına, parmak izi bulunmamasına dikkat edilir.
- Doğru ölçüm için önce cihaz kalibrasyonu yapılır. İçinde saf su (veya ayıraç körü) olan bir küvet yerleştirilerek cihaz sıfır absorbansa ayarlanır. Saf su, ışığı absorbe etmeyerek %100 transmittans verir. Genellikle absorbansı ölçmek için ortama katılan ayıraçlar, ortama katıldıkları konsantrasyonda küvete konulup sıfır absorbans ayarı yapılır. Buna ayıraç körü denir. Böylece ortamdaki miktarı tayin edilecek madde dışındaki maddelerin absorbanslarının katkısı yok edilmiş (sıfırlanmış) olur.
- Ayar yapıldıktan sonra konsantrasyonu bulunacak maddenin çözeltisi küvete konulup absorbansı ölçülür. Bu çözelti berrak olmalı, içerisinde partikül bulundurmamalıdır.
- Küvetin içindeki çözeltinin hacmi, ışık yolunu tamamen kapatmaya yeterli olmalıdır. Eğer hacim buna yeterli değilse mikroküvetler kullanılmalıdır.
- Ölçüm UV alanında ise alette uygun lambda ayarı (hidrojen veya döteryum) yapılmalıdır.

1. DENEY: Maksimum absorbans tayini

Bir çözeltinin rengi bize hangi renge ait ışık radyasyonunun tutulup geri kalanların bileşkesinin gördüğümüz renk olduğunu belirtmektedir. Örneğin kırmızı bir çözeltinin yeşil renge ait ışığı tuttuğunu anlayabiliriz. Buna göre yeşil renge ait spektrumdaki dalga boylarında ölçüm yapılarak en yüksek absorbansın ölçüldüğü dalga boyunu saptayabiliriz. Bu dalga boyu o çözeltinin konsantrasyonunu bulmak amacıyla absorbansını ölçerken kullanmamız gereken dalga boyudur.

Bu deneyde kırmızı renkli yemek boyası çözeltisinin maksimum absorbanı spektrofotometre ile bulunur.

Gereçler:

- Spektrofotometre
- Küvetler
- Kırmızı yemek boyası çözeltisi, % 2.5 mg
- Grafik kağıdı

Deneyin yapılışı:

- Temiz küvetler hazırlanır.
- Küvetlerden birine saf su, diğerine yemek boyası çözeltisi konur.
- Saf su konulan küvetle spektrofotometrenin sıfır ayarı yapılır.
- 420-580 nm arasındaki dalga boylarında 10 nm'lik aralıklarla örneğin absorbanı okunarak kaydedilir. Her dalga boyunda kör ile sıfır ayarı yapılmalıdır.
- Grafik kağıdında dalga boyları (nm) yatay, ölçülen absorbanlar dikey eksene işaretlenerek grafik çizilir. Grafikteki eğrinin tepe noktası çözeltinin maksimum absorbanını ve bunun ölçülebildiği dalga boyunu belirtir.

2. DENEY: Standart eğri ile konsantrasyonu bilinmeyen bir örneğin konsantrasyonunun hesaplanması

Bu deneyde 2.5 mg/dL'lik kırmızı yemek boyası çözeltisi ile standart eğri çizimi yapılarak konsantrasyonu bilinmeyen örneğin konsantrasyonu hesaplanır.

	Kör	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	Örnek
<i>Sulandırma oranı</i>	-	1/4	1/2	3/4	1	-
%2.5 mg boya çözeltisi (mL)	0	1	2	3	4	0
Saf su (mL)	4	3	2	1	0	0
Örnek (mL)	-	-	-	-	-	4

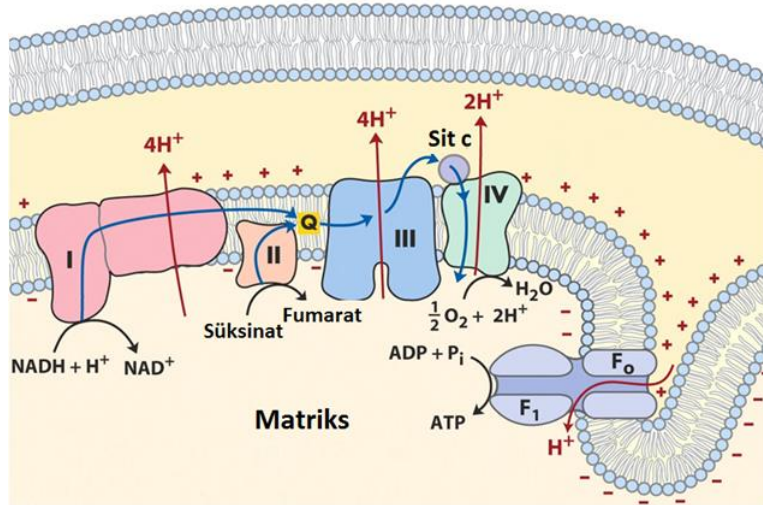
- % 2.5 mg.lık boya çözeltisi yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda sulandırılır.

- Spektrofotometre, bir önceki deneyde maksimum absorbansın ölçüldüğü dalga boyuna ayarlanır.
- Kör ile sıfır ayarı yapılır. Çözeltilerin açık renkten koyuya doğru absorbansı ölçülür.
- Bilinmeyen miktarda boya çözeltisi içeren örnek tüpünün absorbansı okunur.
- Konsantrasyonlar yatay (x), absorbanslar dikey eksene (y) yerleştirilerek bir grafik çizilir.
- Örneğin absorbansı grafiğe yerleştirilerek standart eğriden konsantrasyonu saptanır.
- Örneğin absorbansına en yakın olan standart boya çözeltisi seçilerek aşağıdaki formül ile de hesaplama yapılır.

$$\text{Örneğin konsantrasyonu (C}_d\text{)} = \frac{\text{Örneğin absorbansı (A}_d\text{)} \times \text{Standartın konsantrasyonu (A}_s\text{)}}{\text{Standartın absorbansı (A}_s\text{)}}$$

Elektron transportu

Aerobik organizmaların çoğunda bir substratın yükseltgenmesi ile substrattan elektron ve proton birlikte uzaklaşır. Uzaklaştırılan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılar (elektron transport zinciri) üzerinden O_2 'ne aktarılmasıyla oluşur. Elektron transport zinciri, hücrenin *mitokondri* adı verilen organelinde gerçekleşen ve *solunum zinciri* olarak da bilinen elektron taşıma sistemidir. Metabolik reaksiyonlar (karbonhidrat, lipid ve protein yıkımı) sırasındaki oksidasyonlara katılan NAD^+ ve FAD koenzimleri, yükseltgenen substratlardan aldıkları elektronlarla $NADH + H^+$ ve $FADH_2$ 'ye indirgenir. Bunların rejenerasyonları, mitokondrisi olan dokularda solunum zincirinde gerçekleşir. Elektron transport zinciri aracılığı ile elektron aktarımı sırasında protonlar (H^+) açığa çıkar ve bu protonlar mitokondriyal matriksin dışına pompalanır.



Solunum zincirinde elektron transportu

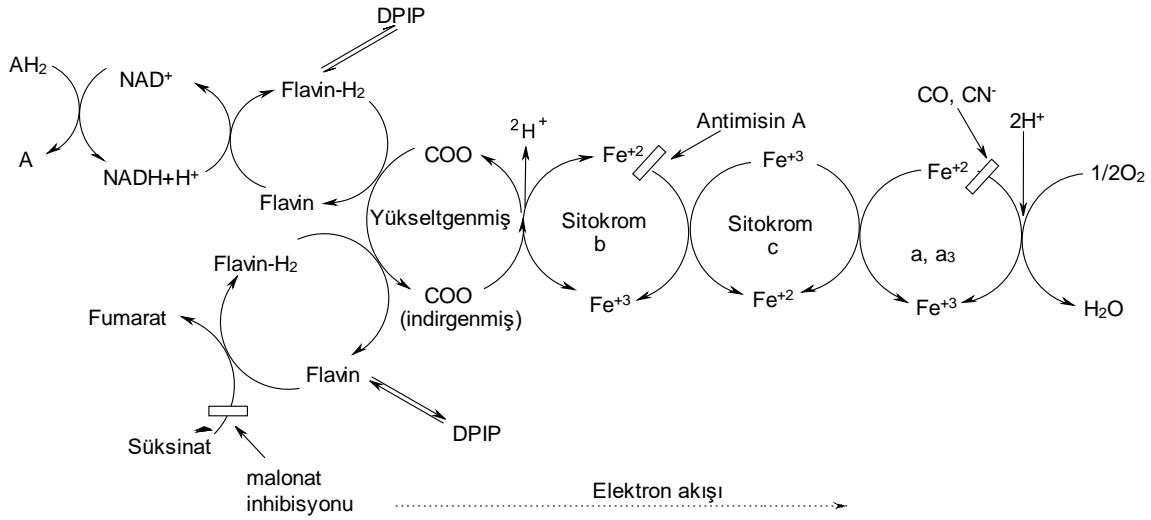
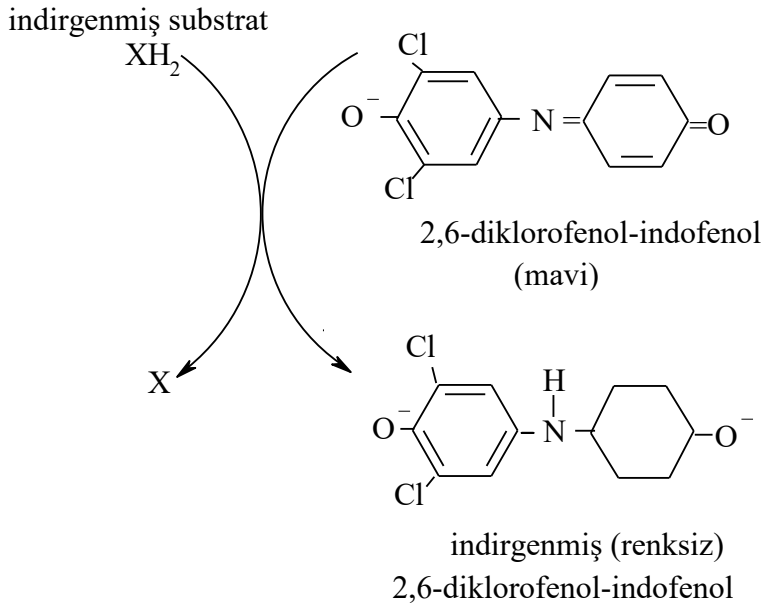
Mitokondri membranının iç ve dış yüzeyleri arasındaki proton konsantrasyonu farkı, biyolojik oksidasyon reaksiyonlarında sağlanan enerjinin temel kaynağıdır. Bu hipoteze kemiozmotik teori adı verilir. Matriks membranının dışında H⁺ iyonları fazla olduğu için pH daha düşüktür. Bu farkın oluşturduğu proton gradyanı ile protonlar ATP sentaz enzimi üzerinden akarak matrikse geri dönerler. Bu geçiş sırasında 1 mol NADH'dan 2.5 mol ATP, 1 mol FADH₂'den 1.5 mol ATP sentezlenir.

Zedelenmiş mitokondri tanecikleri olarak tanımlanabilen Keilin-Hartree kalp tanecikleri mitokondrinin sadece elektron transportu için gerekli bazı fraksiyonlarını içermektedir. Keilin-Hartree kalp taneciklerinde sitrik asit siklusu, oksidatif fosforillenme gibi reaksiyon dizilerinin yürütülmesi için gerekli aktiviteler kaybolmuş olmasına rağmen, fonksiyonel flavoproteinler ve sitokromların tümü bulunmaktadır. Bu nedenle ortama eksojen substrat eklendiğinde taneciklerde yükseltgenme, elektron taşınması ve oksijen harcanması olayları kataliz edilebilir. Böyle bir sistem tarafından eksojen substrat yükseltildiğinde yükseltgenmenin şiddeti O₂ harcanması ile doğrudan ilişkilidir. Ortamın O₂ konsantrasyonunun ölçülmesiyle substratın yükseltgenme şiddeti belirlenebilir.

Laboratuvarda yükseltgenmenin ve elektron transportunun deneysel olarak gösterilmesi için elektron transport sistemi olarak Keilin-Hartree kalp tanecikleri, eksojen substrat ve son elektron alıcısı olarak oksijen yerine bir boya kullanılır. Bu boya, elektronları aldığı anda indirgenerek renk değişimine uğrar. Renk değişimi spektrofotometrede ölçülür.

3. DENEY: Elektron Transportunun Spektrofotometrik Ölçümü

Bu deneyde Keilin-Hartree kalp tanecikleri, eksojen substrat olarak süksinat ve son elektron alıcısı olarak O₂ yerine mavi renkli 2,6-Diklorofenol indofenol (DPIP) boyası kullanılacaktır. Süksinat fumarata yükseltgenirken elektron transport zincirine verilen elektronlar DPIP tarafından sistemden alınır. Bu sırada DPIP indirgenir ve renk şiddeti azalır. Bu değişim spektrofotometrede ölçülerek biyolojik oksidasyonun göstergesi olarak kullanılır. Burada birim zamandaki absorban değişimi ölçülmektedir. Bu yöntem **kinetik okuma yöntemi** denir. Aşağıdaki iki şekilde bu süreçler gösterilmektedir. Bu yükseltgenme süksinata yapıcı benzeyen malonatın ortama eklenmesi ile durdurulabilir. Deneyin ikinci aşamasında elektron taşınmasının durdurulmasının sonuçları gösterilmektedir.



Ayrıçlar:

- 1- Keilin-Hartree kalp tanecikleri homojenatı: Taze koyun kalbinden elde edilen bu tanecikler soğukta (1-4° C) en az bir hafta dayanıklıdır.
- 2- 0.3 M potasyum fosfat tamponu (pH=7.4).
- 3- 0.5 M süksinat: İndirgenmiş substrat olarak kullanılır.
- 4- 2,6-Diklorofenol indofenol (DPIP) çözeltisi: 13.5 mg DPIP, 50 mL saf suda eritilir.
- 5- 0.5 M malonat: Elektron transport zinciri inhibitörü olarak kullanılır.

Deneyin yapılışı:

Beş tüp alınır ve aşağıdaki tabloda gösterilen miktarda ayrıçlar **kalp tanecikleri ve süksinat dışında** sırasıyla konulur.

Ayıraçlar (mL)	Tüpler				
	1 (Kör)	2	3	4	5
DPIP	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.3 M Potasyum fosfat (pH:7.4)	1.125	1.125	1.125	1.125	1.125
0.5 M malonat (inhibitör)	-	-	0.025	-	0.025
H ₂ O	1.025	0.975	0.950	0.875	0.850
Kalp tanecikleri	-	0.025	0.025	0.025	0.025
0.5 M süksinat	-	0.025	0.025	0.125	0.125

- Öncelikle 1 no'lu tübün absorbansı 30'ar sn. aralarla 2 dk. boyunca kaydedilir. Absorbansta bir değişiklik olmadığı gözlenir.
 - 2 no'lu tübe kalp taneciği süspansiyonundan 0.025 mL eklenerek karıştırılır.
 - 2 no'lu tübün absorbansı 600 nm'de 30'ar saniyelik aralarla 2 dk. süreyle kaydedilir. Bu çalışma, endojen substratların verdiği reaksiyonu elimine etmek içindir.
 - Daha sonra 2 no'lu tübe süksinat eklenir, karıştırılır ve köre karşı 30 saniyelik aralarla 2 dk. süreyle 600 nm'de absorbans değerleri kaydedilir.
 - Her deney için absorbans y eksenine, zaman (saniye) x eksenine yerleştirilerek grafikler hazırlanır.
- Aynı işlemler tabloda gösterilen diğer (3, 4 ve 5 no'lu) tüpler için tekrarlanır.

Sorular:

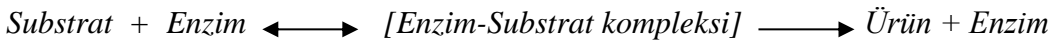
1. Kalp tanecikleri ve süksinat deney ortamına neden en son eklenir?
2. 3 ve 5 no'lu tüplerde neler gözlediniz? Nedenini açıklayınız.
3. 2 ve 4 no'lu tüplerde neler gözlediniz? Nedenini açıklayınız.
4. Antimisin A ve KCN'nin deney ortamına eklenmesi DPIP'ın indirgenmesini ne yönde etkiler?

TBG-III UYGULAMASI

ENZİMLER

Enzimler, genellikle protein yapılı olan biyolojik katalizörlerdir. Substratlarının aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun tamamlanmasını hızlandıran ve reaksiyon sonunda miktarları değişmeyen (tüketilmeyen) enzimler, reaksiyon sırasında substratları ile kompleks oluşturur. Reaksiyon tamamlandığında substrat ürüne dönüşürken enzim ilk haline döner.

Enzimle katalizlenen bir reaksiyon:



Kısaca: $\text{Substrat} \longrightarrow \text{Ürün}$ şeklinde gösterilebilir.

Bazı enzimatik reaksiyonlarda katalizin gerçekleşmesi için reaksiyon ortamında görev yapan küçük, organik moleküllere *koenzim* denir.

Klinikte enzim konsantrasyonunu ölçmekte kullanılan yöntem, enzim aktivitesinin saptanmasıdır. Enzim aktivitesi ise, bir enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının ölçülmesi ile belirlenir. Bunun için birim zaman aralığında (örneğin 1 dk veya 1 sn):

- Azalan substrat,
- Oluşan ürün,
- Dönüşüme uğrayan koenzim

miktarlarından yonteme uygun olan herhangi biri ölçülür.

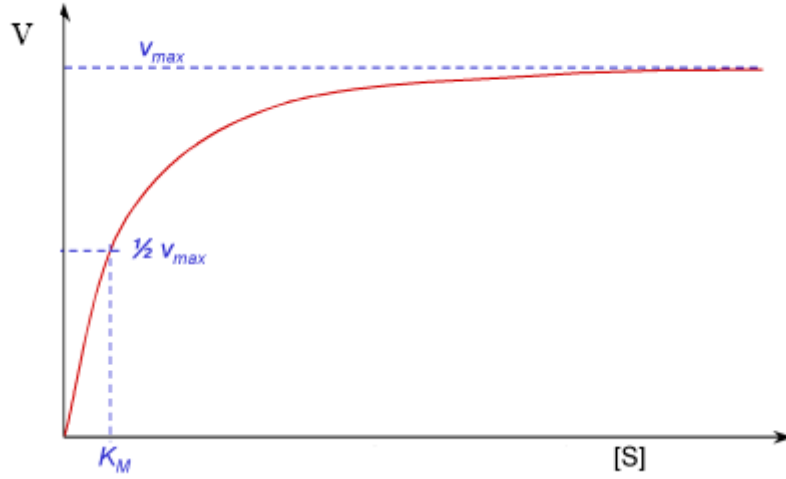
Enzim aktivitesi, *İnternasyonal Ünite* (IU) veya *katal* birimleriyle ifade edilir. **IU**, bir dakikada, 1 μmol substratı ürüne dönüştüren (veya 1 μmol ürün oluşturan) enzim miktarını gösterir. **Katal** ise saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren (veya 1 mol ürün oluşturan) enzim miktarını ifade eder.

Spesifik aktivite, enzimin 1 miligramının birim zamanda oluşturduğu ürün miktarıdır. Diğer bir deyişle 1 mg enzimin gösterdiği aktivitedir. Spesifik aktivitenin hesaplanması için deney ortamındaki enzim miktarı da bilinmelidir.

Enzimatik reaksiyonlarda, enzim konsantrasyonunun sabit olduğu koşullarda substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyonun hızı da artar. Bu artış bir noktadan sonra durur, substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın, reaksiyon hızı sabit kalır. Bu noktada, enzim substrat ile doymuştur ve bu hıza V_{max} (maksimum hız) adı verilir. Enzim aktivitesi ölçümleri, maksimum

hıza ulaşıldığında yapılır.

Michaelis-Menten'in kinetik eğrisi, enzimle katalizlenen bir reaksiyonda hız ile substrat konsantrasyonu arasındaki bağıntıyı gösterir. Maksimum hızın yarısına ulaşmak için gerekli substrat konsantrasyonuna K_M denir. Her enzimin spesifik substratı için sabit bir K_M değeri vardır. Bu değer enzim aktivitesi tayinlerinde mutlaka bilinmelidir, çünkü ortama konulması gereken substrat miktarı K_M değerine göre hesaplanır.



Michaelis- Menten Grafiği

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonda reaksiyon hızını belirleyen faktörler, enzim ve substrat konsantrasyonları ile ortamın sıcaklığı ve pH'sıdır. Ayrıca ortamdaki inhibitörün varlığı da reaksiyon hızını etkiler. Maksimum hıza (V_{max}) ulaşıldığında birim zamanda oluşan ürün miktarı, yani **reaksiyonun hızı** sabittir. Bu nedenle aktivite ölçümleri V_{max} 'da yapılır. Bu koşullarda oluşan ürün miktarı, ortamdaki enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Birim zaman aralığında (dakika veya saniye) oluşan ürün miktarından enzim aktivitesi hesaplanabilir (Mevcut enzimin çalışmasını engelleyen inhibitör gibi faktörlerin varlığında enzim kinetiği değişir).

Laboratuvarlarda enzim tayinleri çeşitli hastalıkların tanınmasında ve izlenmesinde yol göstericidir. Reaksiyon hızını ölçmek için iki yol kullanılır.

1) *Kinetik reaksiyonlar (Devamlı izleme)*: Bu tip reaksiyonlarda, substrat, ürün veya koenzim miktarındaki değişim reaksiyon devam ederken belirli aralıklarla izlenir. Bu amaçla, belirli miktarda substrat içeren bir tübe, enzim içeren örnekten belirli hacim eklenir ve absorban spektrofotometrede bir dakika aralarla okunur. Bir dakikadaki ortalama absorban değişiminden (ΔA) enzim aktivitesi hesaplanır.

2) *End-point (son nokta) reaksiyonları*: Bu tip reaksiyonlarda, substrat, ürün veya koenzim

miktarındaki değişim reaksiyon sona erdirildikten sonra belirlenir. Bu amaçla, belirli miktarda substrat, enzim içeren belirli hacimdeki örnekle belirli bir süre inkübe edilir. Süre bitiminde enzim aktivitesi durdurulur. Bunun için genellikle ortamın pH'ı veya sıcaklığı değiştirilir. Ortamda oluşan ürünün konsantrasyonu hesaplanarak enzim aktivitesi bulunur (Bazı yöntemlerde substrat veya koenzimin ölçüldüğü unutulmamalıdır).

Biyolojik örneklerde ölçülen enzim aktivitesi genellikle o örneğin birim hacmi başına ifade edilir. Örneğin; plazmada (veya serumda) 5 IU/L olarak ifade edilen bir enzim aktivitesi, 1 L plazmada (veya serumda) 1 dakikada 5 µmol ürün oluşturan enzimin varlığını gösterir.

Enzim kinetiğine ait özelliklerin incelenmesi amacıyla soya filizinden elde edilen asit fosfataz kullanılabilir. Asit fosfataz, pH:5.0'de fosfat esterlerinin hidrolizini kataliz eder. Substrat olarak p-nitrofenilfosfat (PNPP) kullanıldığında asit fosfataz fenol halkasına bağlı fosfat grubunu uzaklaştırır. Reaksiyon sonunda oluşan p-nitrofenol, renkli bir üründür. Ürün miktarındaki değişim spektrofotometrede 410 nm'de izlenebilir.

1. DENEY: Enzimatik reaksiyonda oluşan ürünün (p-nitrofenol; PNP) standart eğrisinin çizilmesi

Bilindiği gibi spektrofotometrik ölçümlerde absorbasın konsantrasyona çevirilmesi için molar absorptivite katsayısı veya standart eğri kullanılır. Asit fosfataz enziminin katalizlediği reaksiyonun ürünü olan p-nitrofenolün çeşitli konsantrasyonları ile 410 nm'deki okunan absorbans arasındaki ilişkiyi gösteren standart eğrinin çizilmesi için;

Ayıraçlar:

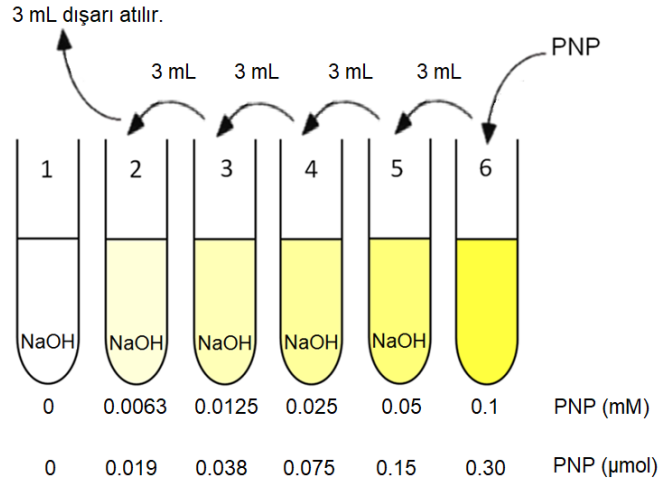
1- 0.1 mM p-nitrofenol stok çözeltisi

2- 0.05 M NaOH

Deneyin yapılışı:

- Deney tüpleri 1'den 6'ya kadar işaretlenir. Hazırlanan ayıraçlar aşığıdaki tabloda belirtilen miktarda deney tüplerine konulur.

	Deney Tüpleri					
Ayıraçlar (mL)	1 (Kör)	2	3	4	5	6
0.1 mM PNP	–	–	–	–	–	6
0.05 M NaOH	3	3	3	3	3	–



- En sondan başlayarak bir tüpten bir önceki tüpe 3'er mL çözelti aktarıldığında giderek daha seyreltik konsantrasyonlarda p-nitrofenol çözeltileri elde edilmiş olur. 2. tüpten uzaklaştırılan 3 mL çözelti ATILIR.
- Spektrofotometre 410 nm dalga boyunda 1. tüpteki 0.05 M NaOH çözeltisine karşı sıfırlanır ve diğer tüplerdeki çözeltilerin absorbanları okunur.
- x eksenine her tüpteki p-nitrofenol konsantrasyonu, y eksenine ise ölçülen absorban değerleri yazılarak standart eğri grafiği çizilir.
- Çizilen standart eğri grafiği kullanılarak sonraki deneylerde okunan absorbanlara karşılık gelen p-nitrofenol konsantrasyonları hesaplanacaktır.

1. DENEY: Substrat Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi

Soya filizinden elde edilen asit fosfataz enziminin katalizlediği reaksiyonda substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi incelenir. Bu amaçla sabit konsantrasyonda enzim içeren örnek üzerine değişik oranlarda sulandırılmış substrat konularak reaksiyon hızı belirli bir zaman dilimi sonunda ölçülür.

Ayırıcılar:

- 1- 3 mM p-nitrofenilfosfat (PNPP)
- 2- Etilendiamin-sitrat tamponu (pH: 5.0)
- 3- Asit fosfataz çözeltisi (deneysel olarak daha önceden saptanan uygun konsantrasyonda hazırlanmış)
- 4- 0.1 M NaOH

Deneyin yapılışı:

Deney üç aşamalıdır. **İlk aşamada** sabit konsantrasyonda enzim, değişen konsantrasyonlarda

substrat ile belirli süre inkübe edilir. **İkinci aşama**, alkali ilavesi ile reaksiyonun durdurulmasıdır. **Üçüncü aşamada**, oluşan ürün spektrofotometrik yöntemle tayin edilir.

- Deney ve kontrol tüpleri 1'den 6'ya kadar işaretlenir. Hazırlanan ayıraçlar aşağıdaki tabloda belirtilen miktarda deney ve kontrol tüplerine sırasıyla konulur. Bu işlem sonunda, 1'de 6'ya kadar numaralandırılmış deney ve kontrol tüplerinde sırasıyla 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mM substrat (PNPP) bulunur.

Ayıraçlar (mL)	Deney Tüpleri						Kontrol Tüpleri					
	1	2	3	4	5	6	1*	2*	3*	4*	5*	6*
3 mM PNPP	–	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	–	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Distile su	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	–	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	–
Etilendiamin-sitrat tamponu (pH:5.0)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Distile su	–	–	–	–	–	–	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Enzim çözeltisi	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	–	–	–	–	–	–

Deney ve kontrol tüpleri iyice karıştırılır, 37°de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyon süresi tamamlandığında alkali ilavesi ile reaksiyon sonlandırılır.

Ayıraçlar (mL)	1	2	3	4	5	6	1*	2*	3*	4*	5*	6*
0.1 N NaOH	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

Deney tüplerinin absorbansları kontrol tüplerine karşı 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

Sorular:

- 1- Reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi grafikte gösteriniz. [Hız için dakikada oluşan ürün miktarı ($\mu\text{mol/dk}$), substrat konsantrasyonu için her tüpteki PNPP miktarı (mM) olarak alınacaktır].
- 2- Lineweaver-Burk grafiğini kullanarak K_M değerini hesaplayınız.
- 3- Reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki Michaelis-Menten ilişkisine uyuyor mu? Artan substrat konsantrasyonunun hız üzerindeki etkisi nedir? Açıklayınız.

2. DENEY: pH'nın Reaksiyon Hızına Etkisi

Bu deneyde asit fosfataz enziminin katalizlediği reaksiyonda pH'nın reaksiyon hızına etkisi incelenir.

Ayıraçlar:

1- 3 mM p-nitrofenilfosfat (PNPP)

2- Etilendiamin-sitrat tamponu (üç farklı pH'da: 3.0; 5.0; 8.0)

4- Asit fosfataz çözeltisi (deneysel olarak daha önceden saptanan uygun konsantrasyonda hazırlanmış)

5- 0.1 M NaOH

Deneyin yapılışı:

- Deney ve kontrol tüpleri 1'den 3e kadar işaretlenir. pH'sı 3.0, 5.0 ve 8.0 olan 3 ayrı etilendiamin-sitrat tamponu hazırlanır ve aşağıdaki tabloda belirtilen miktarda deney ve kontrol tüplerine sırasıyla konulur.

Ayıraçlar (mL)	Deney Tüpleri			Kontrol Tüpleri		
	1	2	3	1*	2*	3*
Etilendiamin-sitrat tamponu (pH:3.0)	0.5	–	–	0.5	–	–
Etilendiamin-sitrat tamponu (pH:5.0)	–	0.5	–	–	0.5	–
Etilendiamin-sitrat tamponu (pH:8.0)	–	–	0.5	–	–	0.5
3 mM PNPP	0.5	0.5	0.5	–	–	–
Distile su	–	–	–	0.5	0.5	0.5
Enzim çözeltisi	0.5	0.5	0.5	–	–	–

Deney ve kontrol tüpleri iyice karıştırılır, 37°'de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyon süresi tamamlandığında alkali ilavesi ile reaksiyon sonlandırılır.

0.1 N NaOH	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Deney tüplerinin absorbansı kontrol tüplerine karşı 410 nm'de okunur.

Sorular:

Belirtilen her pH noktasına karşı gelen reaksiyon hızını $\mu\text{mol ürün/dk}$ olarak hesaplayınız.

1- Reaksiyon hızı ile pH arasındaki ilişkiyi grafik üzerinde gösteriniz.

2- Enzim aktivitesi için optimum pH nedir?

TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVAR
UYGULAMALARI

2. DÖNEM

2019-2020

2.DÖNEM UYGULAMALARI

METABOLİZMA-I

Metabolizma ürünlerinin incelenmesi

ÜREME-ÜROGENİTAL-I

İdrar incelenmesi

METABOLİZMA-I DİLİMİ UYGULAMALARI

Uygulama 1 ve 2

METABOLİZMA ÜRÜNLERİNİN İNCELENMESİ

A- KARBONHİDRAT METABOLİZMASI İLE İLGİLİ İNCELEMELER

Karbonhidrat metabolizması ile ilgili değerlendirmeler, genellikle vücut sıvılarında glikoz düzeyi ölçülerek yapılır. Bu amaçla en sık kullanılan örnek kan ve idrardır. Kanda glikoz düzeyi tam kan, serum veya plazmada ölçülebilir. Kan örneği oda sıcaklığında tam kan halinde bekletildiğinde, kan hücrelerindeki glikolitik enzimlerin glikozu metabolize etmesi sonucu glikoz düzeyi saatte yaklaşık %7-10 oranında azalır. Bu nedenle, ölçüm için tam kan örneği kullanılacaksa, işlem hemen yapılmalıdır; serum ya da plazma kullanılacaksa, kan hücreleri en geç yarım saat içinde santrifüj edilerek uzaklaştırılmalıdır. Ölçüm hemen yapılmıyorsa serum veya plazma buzdolabında (+4°C) saklanmalıdır. Rutin uygulamada bu süreler uymak güç olduğundan, glikoz düzeyi ölçülecek kan örneklerinin NaF-Na₂EDTA, KF-Na₂EDTA veya NaF-K-oksalat içeren florürlü tüplere (gri kapaklı) alınması önerilir. Florür iyonu, glikolizde görevli enolaz enziminin inhibitörüdür. Florürlü plazma örneklerinin glikoz düzeyi oda ısısında 8 saat, +4°C'de 72 saat stabildir.

Glikoz ölçümü genellikle 8–12 saatlik açlıktan sonra (açlık kan şekeri tayini) sabah alınan venöz kan örneğinde yapılır. Ayrıca herhangi bir öğünden sonraki 2. saatte alınan kan örneğinde (tokluk kan şekeri tayini) veya oral glikoz tolerans testinin (OGTT) bir bileşeni olarak da yapılabilir.

Plazma glikoz düzeyi		
	Açlık	Tokluk (2. Saat)
Normal	70-100 mg/dL	<140 mg/dL
Bozulmuş glikoz toleransı	100-125 mg/dL	140-199 mg/dL
Diabetes Mellitus	≥126 mg/dL	≥200 mg/dL
Hipoglisemi	<55 mg/dL	

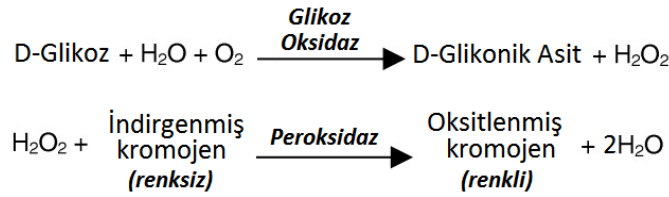
Tam kanın %84'ü, serum ve plazmanın ise %90–93'ü sudan oluşur ve glikoz ölçümleri kanın sulu fazında yapılır. Örneklerin su içeriğindeki fark nedeniyle glikoz düzeyi, ölçümde kullanılan örneğin tipine göre farklılık gösterir. Plazma glikoz düzeyi, tam kan glikoz düzeyinden yaklaşık %10–15, serumdan ise yaklaşık %5 daha yüksektir. Glikoz düzeyi kan örneğinin alındığı yere göre de farklılık gösterir. *Kapiller* ve *arteriyel* kan *glikoz düzeyleri* venöz kandan yaklaşık %5–10 daha

yüksektir.Örneğin, venöz plazmada 126 mg/dL olarak ölçülen glikoz düzeyi tam kanda 112 mg/dL, kapiller kanda 118 mg/dL, serumda ise 120 mg/dL olarak ölçülür.

Klinik biyokimya laboratuvarlarında glikoz ölçümü için *indirgeme yöntemleri* ve *enzimatik yöntemler* kullanılabilir. Somogyi-Nelson ya da dinitrosalisilik asit yöntemi gibi indirgeme yöntemleri glikozun sıcak ve alkali ortamda indirgeyici özelliğine dayanır. Bu yöntemler ürik asit, kreatinin, glutatyon gibi diğer indirgeyici maddeler tarafından da etkilendiği için glikoza spesifik değildir, rutinde kullanımları giderek azalmıştır. Enzimatik yöntemler ise glikoz oksidaz veya heksokinaz enzimleri kullanılarak yapılır. Bu nedenle glikoza özgü, hassas yöntemlerdir ve rutinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan *heksokinaz yöntemi* glikoz ölçümünde referans metod olarak kabul edilmektedir.

1. DENEY: Glikoz Oksidaz Yöntemi ile Serum Glikoz Düzeyinin Ölçülmesi

Prensip: Glikoz, glikoz oksidaz enzimi ile oksitlenerek glikonik aside dönüşürken hidrojen peroksit oluşur. Oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz enziminin kataliziyle suya indirgenirken ortamdaki renksiz kromojen madde (*o*-dianisidin, 4-aminoantipirin+fenol veya aminofenazon+fenol) oksitlenerek renkli bir bileşiğe dönüşür. Sonuçta ortamdaki glikoz miktarına eşit olan oksitlenmiş kromojen miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.



Ayırıcılar: 1- Çalışma Ayırıcı: >11kU/L glikoz oksidaz, >20U/L peroksidaz ve 4-aminoantipirin ve fenol içeren 200 mM pH 7.5 potasyum fosfat tamponu

2- Standart: 200 mg/dL glikoz çözeltisi

Deneyin yapılışı: Üç tüp alınır ve aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlanır.

	Kör	Standart	Deney
Çalışma ayırıcı	2 mL	2 mL	2 mL
Distile su	20 µL	–	–
Standart	–	20 µL	–
Plazma	–	–	20 µL

Tüpler karıştırılır, 37°C'de 10 dakika veya 20-25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra deney ve standart tüplerin absorbanları 505 nm'de ayıraç körüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\text{Glikoz (mg/dL)} = \frac{\text{Deney Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu (200 mg/dL)}$$

İdrarda Glikoz Aranması

Dolaşımdaki glikoz, glomerüler filtrata geçer ancak tamamı proksimal tubuluslardan geri emildiğinden normal koşullarda idrarda glikoz veya diğer monosakkaritler bulunmaz. Ancak sütte bulunan bir disakkarit olan laktozun gebelik ve lohusalık dönemlerinde idrarda çıkması fizyolojiktir. İdrarda glikozun varlığı genellikle kan glikoz düzeyinin yükseldiğine işaret eder. Kan glikoz düzeyi, tubuluslardan glikoz geri emilimi için böbrek eşiği olan 160 mg/dL'yi aştığında idrara glikoz çıkmaya başlar. İdrarda glikoz bulunmasına **glikozüri** denir.

İdrarda glikoz veya diğer monosakkaritlerin varlığı karbonhidratların indirgeyici özelliklerine dayanan testlerle kolaylıkla gösterilebilir. Bu testler glikozun sıcak ve alkali ortamda indirgeyici olmasından yararlanılarak geliştirilmiş yöntemlerdir. Glikozun yanında laktoz, früktoz, galaktoz, pentoz gibi diğer bazı karbonhidratlarla ve ürik asit, kreatinin, glutatyon gibi indirgeyici özelliği olan maddelerle de pozitif sonuç verdiği için özgün değildir.

Günümüzde hızlı sonuç verdiği ve uygulaması kolay olduğu için idrarda glikoz aramak için genellikle glikoz oksidaz, peroksidaz ve indirgenmiş bir kromojenin birlikte emdirildiği *idrara stripleri* (kağıt şeritler) kullanılmaktadır.

İdrarda şeker bulunması durumunda bu şeker(ler)in türünü saptamak için polarimetre, fermentasyon, ozazon oluşumu veya Seliwanoff testi (früktoz), Bial'in orsinol testi (pentozlar) gibi özel kimyasal testler uygulanabilir.

2. DENEY: İdrarda Fehling Testi ile Glikoz Aranması

Ayırıcılar:

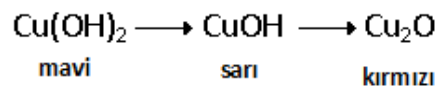
1- Fehling I: %7 CuSO₄ çözeltisi

2- Fehling II: 350 g sodyum-potasyum tartarat ve 100 g NaOH içeren çözelti

Deneyin yapılışı: Deneyin başlangıcında, bir deney tüpüne eşit hacim Fehling I ve Fehling II ayırıcıları konur ve açık alevde kaynatılır. Bu işlem deney ortamında indirgen bir madde olup olmadığını belirlemek için yapılır. Isıtmakla ayırıcının rengi değişmemelidir.

Ayıracın renginin değişmediği görüldükten sonra kaynatılmış ayıraç bulunan tüpe, ayıracın hacmi kadar idrar eklenir ve tekrar kaynatılır. İdrarda glikoz (veya diğer indirgen şekerler) varsa turuncu-kırmızı bir renk oluşur.

Deneyin prensibi: Fehling I ve Fehling II ayıraçları karıştırıldığında $\text{CuSO}_4 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{Cu(OH)}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ reaksiyonu gerçekleşir. Oluşan bakır (iki) hidroksit (Cu(OH)_2), mavi renklidir ve alkali ortamda çökme eğilimindedir. Bu çökelmeyi Fehling II ayıracındaki sodyum-potasyum tartarat önler. Yapılarında serbest aldehit ve keto grubu bulunan şekerler, sıcak ve alkali ortamda Fehling I ayıracındaki iki değerlikli bakır indirger. İndirgeme sonucu mavi renkteki Cu(OH)_2 , önce sarı renkli bakır(bir) hidroksite (CuOH), ısıtılmaya devam edildiğinde de kiremit kırmızısı rengindeki bakır



(bir) oksite (Cu_2O) dönüşür. Ortamda indirgen şeker yoksa ısıtma sonucu mavi renk değişmez.

Serbest aldehit grubuna sahip disakkaritler de Fehling deneyinde pozitif (+) sonuç verir. Glikozun aldehit grubu ile früktozun keto grubunun kondansasyonu ile oluşan sakkaroz, serbest aldehit veya keto grubuna sahip olmadığından Fehling deneyinde negatif (-) sonuç verir.

Fehling testi glikoz ve diğer şekerler için spesifik bir test değildir. Ürik asit, kreatinin, aldehitler, fenoller, aminofenoller, formik asit, rezorsinol gibi birçok bileşik Fehling ayıracı ile pozitif reaksiyon verir.

B- LİPİT METABOLİZMASI İLE İLGİLİ İNCELEMELER

Lipitler, yapılarında önemli miktarda nonpolar hidrokarbon zinciri içeren bu nedenle suda çözünmeyen, dokulardan kloroform, aseton, eter gibi organik çözücüler ile ekstre edilebilen, bir grup heterojen yapıya sahip organik bileşiktir. Yüksek enerjili bu bileşikler vücutta endojen olarak sentezlenebildikleri gibi bitkisel ve hayvansal kaynaklı besinlerle eksojen olarak da alınırlar. Trigliseritler, fosfolipitler, sfingolipitler, glikolipitler ve steroidler gibi alt sınıflara ayrılarak incelenirler. Tıbbi biyokimya laboratuvarlarında dislipidemilerin saptanması ve aterosklerotik damar hastalığı riskini belirlemek ve tedavi takibi için lipit metabolizması ile ilgili incelemeler yapılır. Bu amaçla öncelikle serumda trigliserit, total kolesterol, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri ölçülür. Hipolipoproteinemi ve hiperlipoproteinemi tiplerinin belirlenmesinde serum lipoprotein elektroforezi, apoprotein düzeylerinin ölçümü ve serumun buzdolabında bir gece bekletildikten sonra incelenmesi gibi yöntemler kullanılır.

Serum lipitleri incelenecek kişi, analizden önceki 2–3 gün normal bir diyetle beslenmeli, lipit düzeylerini etkilediği bilinen ilaçlar (oral kontraseptif, tiroid hormonu, steroid vb.) ve alkol kullanmamalı, normal fiziksel aktivitesinin dışına çıkmamalıdır. Hastanın akut bir hastalık geçirip geçirmediği (akut miyokard infarktüsü gibi) sorgulanmalıdır.

Lipit incelemeleri tercihen 12–14 saatlik açlıktan sonra alınan kan örneklerinde yapılır. Ölçümler için serum veya plazma kullanılabilir; ölçümler aynı gün yapılmayacaksa EDTA'lı plazma tercih edilmelidir.

Serum lipit düzeyleri	
Trigliserit Normal: ≤ 150 mg/dL Orta derecede yüksek: 150–199 mg/dL, Yüksek: 200–499 mg/dL, Çok yüksek: ≥ 500 mg/dL	Total kolesterol Normal: < 200 mg/dL Ateroskleroz risk sınırı: 200–239 mg/dL Ateroskleroz riski yüksek: ≥ 240 mg/dL
LDL-Kolesterol Normal: < 130 mg/dL Ateroskleroz risk sınırı: 130–159 mg/dL Ateroskleroz riski yüksek: ≥ 160 mg/dL	HDL-kolesterol: Normal: erkek: >45 mg/dL, Normal: kadın: >55 mg/dL Ateroskleroz riski yüksek: <40 mg/dL

Serum örneğinin LDL düzeyi direkt yöntemlerle ölçülebileceği gibi trigliserit, total kolesterol ve HDL kolesterol düzeyleri biliniyorsa *Friedwald Formülü* ile de hesaplanabilir. Bu formül trigliserit düzeyi 400 mg/dL'den yüksekse uygulanmaz.

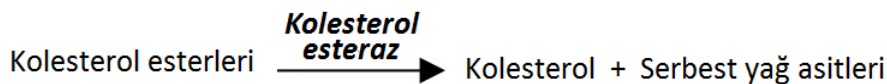
Friedwald Formülü;

LDL-kolesterol = Total kolesterol – (HDL-kol. + VLDL-kol.)

VLDL-kolesterol = Trigliserit/5

3. DENEY: Kolesterol Esteraz Yöntemi ile Serum Total Kolesterol Düzeyinin Ölçülmesi

Prensip: Bu yöntem üç aşamalıdır, 1. aşamadakolesterol esteraz enzimi ile ester kolesterolleri hidroliz

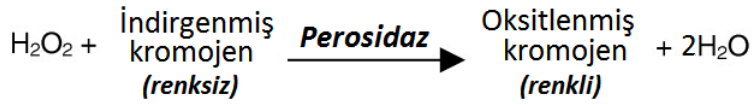


edilerek kolesterol serbestleştirilir.



2. aşamada kolesterol, kolesterol oksidaz enzimi ile oksitlenirken hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturulur.

3. aşamadaoluşan H₂O₂, deney ortamında bulunan peroksidaz enzimi ile suya indirgenirken ortamdaki renksiz kromojen madde (*o*-dianisidin, 4-aminoantipirin+fenol veya aminofenazon+fenol) oksitlenerek renkli bir bileşiğe dönüşür. Sonuçta ortamdaki kolesterol miktarına eşit olan oksitlenmiş kromojen



miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Ayıraçlar:

1. Çalışma Ayıracı: >0.5 kU/L kolesterol esteraz, >0.15 kU/L kolesterol oksidaz, >0.25 kU/L peroksidaz ve 4-aminoantipirin ve fenol içeren 75 mM pH 6.8 PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) tamponu
2. Standart: 200 mg/dL kolesterol çözeltisi

Deneyin yapılışı: Üç tüp alınır ve aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlanır.

	Kör	Standart	Deney
Çalışma ayıracı	2 mL	2 mL	2 mL
Distile su	20 µL	—	—
Standart	—	20 µL	—
Serum	—	—	20 µL

Tüpler karıştırılır, 37°C'de 10 dakika veya 20-25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra deney ve standart tüplerin absorbanları 512 nm'de ayıraç körüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\text{Kolesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Deney Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu (200 mg/dL)}$$

KETON CİSİMLERİ

Normal beslenme koşullarında beyin, eritrositler, lökositler periferik sinirler ve böbrek medullasının kullandığı temel enerji kaynağı glikozdur. Ancak glikozun vücutta depolanması oldukça sınırlıdır. Karaciğer ve kas glikojeni başlıca beyin fonksiyonları ve akut gereksinimler için kullanılır. Açlıkta ya da Diabetes Mellitusta olduğu gibi glikoz kullanımının bozulduğu koşullarda, dokuların glikoz gereksinimini karşılamak üzere bir seri hormonal düzenleme sonucu karaciğerde bir taraftan glikoneojenez aktiflenirken, diğer taraftan da yağ asitlerinin oksidasyonu uyarılır. Yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan asetil-KoA'lar enerji sağlamak üzere sitrik asit siklusunda oksitlenir. Açlık uzadıkça, asetil-KoA düzeyi artarken oksalasetat düzeyi azalmaya başlar. Bu durumun sitrik asit siklusunun işleyişini bozması nedeni ile asetil-KoA'lar karaciğerde ketojenez denilen bir yolla keton cisimlerine dönüştürülür. Bu maddeler kan yolu ile başta iskelet kası, kalp kası ve böbrek korteksi olmak üzere ekstrahepatik dokulara taşınır ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar.

Keton cisimleri *asetoasetik asit* (β -ketobutirik asit), β -hidroksibutirik asit ve *asetondur*. Normal kan düzeyleri 0.5–1.5 mg/dL kadardır. Keton cisimlerinin %75-80'ini β -hidroksibutirat, %20'si asetoasetat ve %2 kadarı asetondan oluşur. Suda çözünebilir oldukları için, dolaşımında taşınabilmeleri için lipoproteinlerin yapısına katılmalarına ya da bir proteine bağlanmalarına gerek yoktur. Uzun süren açlık, karbonhidratlardan fakir diyetle veya yağlardan zengin diyetle beslenme, kusma, ishal ya da Diabetes Mellitus durumlarında kan ve idrarda keton cisimlerinin düzeyi artar. Kanda keton cisimlerinin artmasına *ketonemi*, idrarda keton cisimlerinin çıkmasına *ketonüri* denir. Normal koşullarda idrarla atılan keton cisimleri miktarı çok düşüktür (20–70 mg/ gün) ve rutinde kullanılan yöntemlerle gösterilemez. Bu nedenle idrarda keton cisimleri bulunmadığı kabul edilir. Aseton, asetoasetatın dekarboksilasyonu ile oluşur ve vücuttan solunum yolu ile de uzaklaştırılır. Bu nedenle ketonemili kişilerin nefesinde ve idrarında aseton kokusu vardır.

Aseton dışındaki keton cisimleri orta derecede kuvvetli asitlerdir ve tampon sistemler tarafından kolaylıkla tamponlanabilirler. Keton cisimlerinin kan düzeyinin tamponlama kapasitesini aşacak kadar yükselmesi kan pH'sının asit yöne kaymasına ve *ketoasidoz* adı verilen bir klinik tabloya neden olur. Ketoasidoz tedavi edilmezse ketoasidoz komasına ve ölüme neden olabilir.

Ketoasidozun tanı ve takibi için kan ve idrarda keton cisimleri tayini yapılır. Keton cisimlerinin üçünü birden gösterebilen bir yöntem yoktur. β -hidroksibutirat kan ve idrarda en fazla miktarda

bulunan keton cismi olmasına rağmen pratik bir ölçüm metodu bulunmadığından rutin analizlerde aranmaz. Diğer keton cisimlerinin tayini için sıklıkla nitroprüsiyat kullanılan yöntemler uygulanır. Bu yöntemler asetona asetoasetattan 15–20 kat daha duyarlıdır.

Günümüzde hızlı sonuç verdiği ve uygulaması kolay olduğu için idrarda keton cisimleri aramak için yaygın olarak *idrar stripleri* kullanılmaktadır. Bu şeritler keton cisimleri içeren idrar örneğine batırıldıktan sonra üreticisi tarafından belirtilen süre kadar beklenir ve stripte oluşan renk değişikliği kutunun üzerindeki renk ile karşılaştırılarak semikantitatif bir ölçüm yapılabilir.

4. DENEY: Rothera Tozu ile Serumda Asetoasetat ve Aseton Aranması

Ayraçlar: Sodyum nitroprüsiyat, susuz Na_2CO_3 ve susuz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ karışımından oluşan Rothera tozu

Deneyin yapılışı: Bir porselen kaba fındık büyüklüğünde Rothera tozu konur, ortası çukurlaştırılır ve üzerine bir damla serum damlatılarak bir dakika kadar beklendikten sonra tozdaki renk değişimi değerlendirilir. Normal serum Rothera tozunda bir renk değişikliğine neden olmaz. Ketonemili serum ise eflatun-mor bir renk oluşturur. Sonuç oluşan rengin şiddetine göre değerlendirilir: renk değişikliği yok: (-), Kirlili mavi renk: (\pm), açık mor-menekşe renk: (+), koyu menekşe renk: (++) . Reaksiyonu (++) olan serum, bu renk oluşmayınca kadar sulandırılarak test tekrarlanır ve sonuç sulandırma katsayısı ile çarpılarak raporlanır. Örneğin koyu menekşe renk oluşan serum 4 kez sulandırılmış ise sonuç $4 \times (++) = (8+)$ olarak belirlenir.

5. DENEY: Weyl-Legal yöntemi ile İdrarda Aseton Aranması

Ayraçlar: 1N NaOH, % 20'lik CH_3COOH ve % 5'lik sodyum nitroprüsiyat çözeltisi

Deneyin yapılışı: 2–3 mL idrar, üzerine birkaç damla NaOH damlatılarak alkalileştirilir. Daha sonra bu alkali idrarın üzerine birkaç damla Na-nitroprüsiyat çözeltisi eklenir ve kırmızı renk olduğu gözlenir. Hem aseton hem de idrarın normal bir bileşeni olan kreatinin bu kırmızı renge neden olur. Bunu ayırt etmek için deney ortamına birkaç damla % 20'lik CH_3COOH damlatılır. Kreatininin oluşturduğu kırmızı renkli kompleks asit ortamda parçalanır ve renk kaybolur. Asetonun oluşturduğu renk ise kaybolmaz, aksine daha koyu kırmızıya döner.

6. DENEY: Gerhardt yöntemi ile İdrarda Asetoasetat Aranması

Ayraçlar: %10'luk FeCl_3 çözeltisi

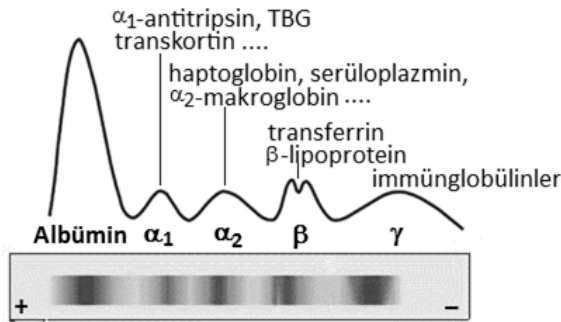
Deneyin yapılışı: Deney tüpünün 1/3'üne kadar idrar konarak üzerine birkaç damla %10'luk FeCl_3

damlatılır. Normal idrarda FeCl_3 eklenmesi ile fosfatların çökmesi sonucu kirli beyaz bir çökelti oluşur. Asetoasetat bulunan idrarda ise kırmızı bir renk oluşur.

Asetoasetatın FeCl_3 reaksiyonu ile oluşan bu renk, idrarda salisilat, fenol ve antipirin gibi bileşikler bulunduğu da ortaya çıkar. Ayırt edebilmek için kırmızı rengin olduğu idrar açık alevde kaynatılır. Asetoasetattan kaynaklanan renk, idrarın kaynatılması ile kaybolur, ilaçlardan kaynaklanan renk ise kaybolmaz. İdrarın kaynatılması ile rengin kaybolmasının nedeni asetoasetatın ısı ile asetona dönüşmesi, asetonun da bu reaksiyonu vermemesidir.

C- PROTEİN METABOLİZMASI İLE İLGİLİ İNCELEMELER

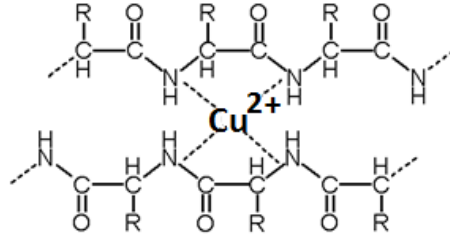
Serumda total protein miktarı 6.0–8.3 g/dL kadardır ve bunun çoğunu karaciğerde sentezlenen albümin ve lenfositler tarafından üretilen immünglobülinler oluşturur. Serum albümin düzeyi 3.5–5 g/dL, globülin düzeyi 2.3–3.5 g/dL, albümin / globülin oranı ise 2:1 kadardır. Serum protein düzeyleri sıklıkla genel sağlık ve beslenme durumunun değerlendirilmesi, karaciğer, böbrek ve kemik iliği kaynaklı hastalıkların tanısı ve takibi amacıyla ölçülür. Klinik biyokimya laboratuvarlarında proteinlerle ilgili olarak serum ve idrarda protein tayinin yapılır. Serum proteinlerini incelemek amacıyla öncelikle total protein ve albümin düzeyi ölçülür. Altmış kadar farklı proteini içeren globülinler ise total protein miktarından albümin miktarı çıkarılarak hesaplanır. Gerekğinde protein elektroforezi yapılarak globülin alt gruplarındaki (α_1 -, α_2 -, β - ve γ -globülinler) değişiklikler saptanır ya da immunometrik yöntemlerle globülinlerin bireysel olarak düzeyleri ölçülebilir. Serum protein düzeyinin artmasına *hiperproteinemi*; azalmasına *hipoproteinemi*; yapıcı çoğu kez immünglobülinlere benzeyen ve normalde kanda bulunmayan bazı atipik proteinlerin varlığına ise *paraproteinemi* adı verilir. Örneğin, multipl myelomda immünglobülin hafif zincirleri artışı.



Serum protein elektroforezinin normal paterni

7. DENEY: Biüret Yöntemiyle Serumda Total Protein Tayini

Prensip: Proteinlerdeki peptid bağlarının alkali ortamda bakır tuzları (Cu^{2+}) ile menekşe renkli kompleks oluşturması prensibine dayanır. Oluşan rengin şiddeti peptid bağlarının sayısı ile orantılıdır.



Ayrıçlar: 1- Biüret ayırıcı: 30 mM potasyum iyodit, 100 mM Na^+ - K^+ tartarat, 30 mM CuSO_4 ve 3.8 M NaOH içeren çözelti

2- Standart: 7 g/dL'lik protein çözeltisi

Deneyin yapılışı: Üç tüp alınır ve aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlanır.

	Kör	Standart	Deney
Biüret ayırıcı	2 mL	2 mL	2 mL
Distile su	40 μL	–	–
Standart	–	40 μL	–
Serum	–	–	40 μL

Tüpler karıştırılır, 37°C'de 10 dakika veya 20-25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra deney ve standart tüplerin absorbansları 555 nm'de ayıraç körüne karşı okunur.

$$\text{Total protein (g/dL)} = \frac{\text{Deney Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu (7 g/dL)}$$

Hesaplama:

İdrarda Protein Aranması

Normal koşullarda idrarla günde 20–150 mg kadar protein atılır. İdrar proteinlerinin yaklaşık yarısını albümin, geri kalanını distal tubuluslardan salgılanan üromukoid oluşturur. Bu eser miktardaki protein, rutinde kullanılan protein arama yöntemleri ile saptanamaz ve pratikte idrara protein çıkmadığı kabul edilir. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek, böbrek hastalıklarını ve böbrek hasarını erken dönem saptamak için idrarda protein tayini yapılır. İdrarın protein düzeyin artmasına (≥ 300

mg/gün) *proteinüri* ya da eski adıyla *albuminüri* denir.

Proteinüriler fonksiyonel veya organik proteinüriler olarak başlıca iki grupta incelenir. Fonksiyonel proteinüriler, herhangi bir hastalığa bağlı olmayıp idrarda az miktarda protein bulunması ve bu durumun gelip geçici olmasıyla tanınır; maraton koşusu gibi ağır egzersiz, uzun süre ayakta kaldıktan sonra görülen proteinüri (≤ 300 mg/gün) ve gebelikte görülen hafif albuminüri (150 mg/gün) bu grupta yer alır. Organik proteinüriler ise prerenal, renal ya da postrenal nedenlere bağlı olarak ortaya çıkar. Prerenal proteinüriler kalp yetersizliği, karında sıvı birikmesi, karın içi tümörler, karaciğer hastalıkları, ateşli hastalıklar gibi böbrek dolaşımını güçleştiren durumlarda görülür. Renal proteinüriler, nefrit ve nefroz gibi böbreğin filtrasyon kapasitesinde bozukluğa yol açan hastalıklarda ortaya çıkar. Postrenal proteinürilerde ise üreterler, mesane, prostat ve üretranın inflamatuvar hastalıkları, tümör veya travmaları gibi alt üriner sistem hastalıklarında görülür.

İdrarda protein için tayini kalitatif, semikantitatif ve kantitatif yöntemler kullanılır.

Kalitatif yöntemler proteinlerin çeşitli kimyasallar ile denatüre edilerek çöktürülmesi prensibine dayanır ve oluşan bulanıklığın şiddeti protein miktarı ile doğru orantılıdır. Semikantitatif yöntemlerde tetrabromfenol mavisi, tetraklorofenol veya tetrabromsulfonfitalin gibi albuminle reaksiyona giren anyonik boyalar ve tampon emdirilmiş idrar stripleri kullanılır.

Kalitatif ve semikantitatif yöntemler genellikle idrar protein konsantrasyonu 300–500 mg/gün'ü aştığında pozitif sonuç verdiği için hassas değildir. Ayrıca diyabetik hastalardaki mikroalbuminüriyi ya da paraproteinürileri saptayamazlar. Bu durumda immunometrik yöntemlerle idrarda mikroalbumin tayini ya da idrarda immunfiksasyon elektroforezi gibi ileri tayin yöntemleri tercih edilir.

8.DENEY: Heller'in Halka Deneyi ile İdrarda Protein Aranması

Ayraçlar: Derişik nitrik asit (HNO_3)

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne bir miktar idrar konur ve tüp 45° kadar eğik tutularak bir pipet yardımıyla yavaşça derişik HNO_3 sızdırılır. HNO_3 idrardan daha yoğun olduğu için tüpün dibine doğru hareket eder. İdrarda protein varsa, HNO_3 ile idrarın temas yüzeyinde proteinlerin asit etkisiyle denatüre olması sonucu beyaz bulanık bir halka oluşur.

ÜREME-ÜROGENİTAL-I UYGULAMALARI

İDRAR İNCELEMESİ

İdrar; böbrek glomerül ve tubuluslarında filtrasyon, reabsorpsiyon, sekresyon ve ekskresyon mekanizmaları ile oluşan bir sıvıdır. % 95'i su, % 5'i organik ve inorganik maddelerden oluşan kanın böbrekler tarafından oluşturulan ultrafiltratdır. Bileşiminde başlıca üre, ürik asit, kreatinin, sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, fosfat, oksalik asit, sitrik asit, vitaminler, hormonlar ve hormon metabolitleri bulunur.

Böbrekler, idrar oluşturmanın yanında organizmada şu fonksiyonları üstlenir:

- Düzenleyici fonksiyonu: Su-elektrolit ve pH dengesinin sağlanmasında temel rol oynar (sıvı homeostazi).
- Boşaltım fonksiyonu: Metabolizma son ürünlerinin ve karaciğerde zehirsizleştirilen (suda erir hale gelen) toksik ürünlerin vücuttan atılmasını sağlar (ekskresyon).
- Endokrin fonksiyonu: Renin, eritropoietin ve kalsitriol hormonlarının ve bazı metabolitlerin (örn. kreatin) sentezinde görev alır

Normalde her iki böbrekten dakikada geçen plazma miktarı 650 mL'dir (1200 mL kan). Bunun dakikada 125 mL'si glomerüllerden süzülür ve glomerüler filtratı oluşturur. Glomerüler filtrata plazma proteinleri ve proteine bağlı maddeler dışında kalan tüm maddeler geçer. Daha sonra bu filtratın içeriği tubulusun farklı kısımlarında değişikliğe uğrar, vücut için gerekli maddeler geri emilirken zararlı veya yararlı maddeler tubuler filtrata salgılanır. Böylece bu maddelerin idrar yolu ile atılımı sağlanır. Kısaca *idrar, kanın böbrekler tarafından oluşturulan bir ultrafiltratı olarak tanımlanabilir*. İdrar, öncelikle böbrek ve üriner sistem fonksiyonunun göstergesi olarak incelenir. Bunun yanında, bazı sistemik hastalıklar da idrarın bileşiminde değişikliğe yol açabilir. Bu değişiklik, normalde çıkan maddelerin konsantrasyonunda değişme veya normalde bulunmayan bazı ürünlerin patolojik atılımı şeklinde olabilir. İdrar analizi klinik tanıya önemli katkıda bulunur.

İdrarın incelenmesi genellikle üç aşamada gerçekleştirilir:

- 1) İdrar toplanması
- 2) Tam idrar tahlili
 - a) İdrarın fiziksel özelliklerinin incelenmesi
 - b) İdrarın kimyasal özelliklerinin incelenmesi
 - c) Mikroskopik inceleme
- 3) Mikrobiyolojik inceleme

İdrar Toplanması

İdrar örneği, hastanın yaşına ve yapılması istenilen analize göre, temiz (tercihen steril) bir kaptan toplanır. İdrar analizi, örnek hastadan alındıktan sonra 30 dakika içinde tamamlanmalıdır. Eğer bu mümkün değilse, ağzı kapalı bir kaptan buzdolabında saklanmalı, gerekirse koruyucu madde eklenmelidir.

İdrar analizleri için aşağıdaki idrar örnekleri kullanılabilir:

Rastgele idrar örneği (spot idrar):Gün içinde, herhangi bir zamanda elde edilen idrar örneğidir. İdrarın mesanede ne kadar süreyle kaldığı bilinmediği için elde edilen sonuçların yorumlanması zordur. İdrar seyreltik olduğunda düşük konsantrasyondaki bileşikler saptanamayabilir.

Sabah ilk idrar örneği:Rutin idrar analizleri için tercih edilen örnektir. Gece yatmadan önce mesane boşaltılır ve sabah ilk idrar toplanır. Bu örnekler rastgele örneğe kıyasla daha sabit, daha derişik ve asit karakterdedir. Hücrelerin, silindirlilerin ve mikroorganizmaların incelenmesi için uygun bir örnektir.

Orta-akım idrar:Özellikle idrarın bakteriyolojik incelemeleri ve idrar kültürü için istenen idrar örneğidir. İdrarın ilk kısmı tuvalete yapıldıktan sonraki kısım toplanır, son kısım tekrar tuvalete yapılır. Özel kaptan çok temiz koşullarda toplanmalıdır.

24 saatlik örnek: Sabah ilk idrar örneği atılarak 24 saat süreyle ertesi gün sabah ilk idrar örneği dahil bir kaba toplanır. Toplanan idrarın 24 saatlik olduğundan şüphe duyuluyorsa, idrarda kreatinin ölçümü yapılır. Bunun nedeni günlük kreatinin atılımının kas kütesine bağlı sabit olmasıdır. (Erkeklerde 20-24 mg/kg/gün, kadında 18-22 mg/kg/gün)

Kateterize örnek: Ureteral veya mesaneye ait örnek toplanabilir. Mesaneye ait idrar örneği genelde önce mesane yıkandıktan sonra alınmalıdır.

Tam İdrar Tahlili

Biyokimya laboratuvarlarında yapılan bu işlem üç aşamalıdır.

I. Fiziksel inceleme:İdrarın görünüm, koku, yoğunluk ve pH'sının değerlendirilmesidir.

Görünüm:

- a) **Renk:** İdrarın görüntüsü ve rengi cam silindirde incelenir. Taze idrar kehribar sarısıdır. Bu rengi ürokromlar verir. Az miktarda üro- ve koproporfirin de renge katkıda bulunur. İdrar rengindeki değişimler patolojik durumlar hakkında ipucu verir.
- Açık renkli idrar fazla su atılmasına bağlıdır, genellikle yoğunluğu düşüktür.
 - Normal idrar örneği bekletilirse ürokrom pigmenti oksitlendiği için koyu renk alır.
 - Çay rengine idrar, bilirübin veya kan varlığını düşündürür.
 - Bekletilmekle siyahlaşan idrarda homojentisik asit (alkaptonüri) veya melanin pigmenti varlığı düşünülmelidir.
 - İdrarda normalden fazla ürobilin varsa renk koyu sarı-turuncu olur, beklemekle kahverengine değişir.
- b) **Berraklık:** Taze ve normal idrar berraktır. Berraklık, idrarın pH'na ve içinde maddelerin tam olarak erimiş olmasına bağlıdır.

Bulanıklık sebepleri;

- Aşırı hücresel eleman (eritrosit, lökosit, bakteriler) bulunması
- Protein bulunması
- Kristaller bulunması
- Tuzların oda sıcaklığında çökmesi
- Mukus bulunması, lipidüri

Koku: İdrarın kendine özgü kokusu vardır. Bu koku idrardaki fenollerden kaynaklanır. Bunun dışında bazı patolojik durumlarda idrarın kokusu değişir. Örneğin kontrol edilemeyen diyabet hastalığında keton cisimleri çıktığı için idrarda aseton kokusu alınır. Bekletilmiş ve bakteri üremiş idrarda amonyak kokusu olur. Bunun nedeni bakteride bulunan üreaz enziminin üreyi parçalayarak amonyak oluşturmasıdır.

İdrar hacmi: Normal idrar miktarı 24 saatte 1000-1800 mL /gün'dür.

24 saatlik idrar hacminin >2000 mL'nin üzerinde olmasına **poliüri**, <400mL olmasına **oligüri**, <100 mL olmasına veya hiç idrar olmamasına **anüri** denir.

Poliüri aşağıdaki sebeplere bağlı olabilir:

- Aşırı sıvı alımı (polidipsi)
- Diüretik kullanımı,
- Kafein, alkol kullanımı
- Eksüda ve ödemlerin resorpsiyonuna bağlı olarak
- I.V. glikoz veya tuz çözeltilerinin kullanımı
- Diabetes mellitus; aşırı glikoz atılımına bağlı diürez

- Antidiüretik hormon (ADH) yapımında (*hipotalamik diabetes insipidus*) veya etkisindeki yetersizlik (*nefrojenik diabetes insipidus*),
- Progresif kronik böbrek yetersizliğinde doku kaybına bağlı olarak böbreğin idrarı konsantre etme yeteneğinin kaybı.

Oligüri sebepleri; az su içmek, çok terlemek, diyare ve kusma gibi sıvı kaybının çok olduğu durumlar, yaygın ödem oluşumuna yol açan haller, kanama, şok, kalp yetmezliği gibi böbrek kan akımının azaldığı durumlar ve böbrek yetmezlikleri olabilir.

Anüri taş, tümör, hipertrofik prostat gibi nedenlerle idrar akımının önlendiği durumlarda ve böbrek yetmezliğinde görülebilir.

Pollaküri: İdrar miktarında artış olmadan idrara çıkma sıklığının artmasına pollaküri denir. Genellikle idrara çıkma sıklığı 24 saatte 4-5 kez olur. Psikojenik veya organik nedenlerle (üriner sistem enfeksiyonları, sistit) görülür. Tanıda pollaküri ile poliüriyi birbirinden ayırmak gereklidir.

Özgül ağırlık (dansite):

Belli bir hacimdeki idrar ağırlığının aynı hacim ve ısıdaki saf suyun ağırlığına oranına idrarın özgül ağırlığı (dansite) denir. Oran olarak ifade edildiği için birimi yoktur. Normal beslenen bir kişide idrar dansitesi 1.015-1.020/gündür. Günün herhangi bir saatinde alınan idrar örneğinin dansitesi 1.001-1.030 arasında değişebilir. İdrar dansitesinin suya nazaran fazla olmasının başlıca sebebi içerdiği üre ve NaCl'dür.

İdrar dansitesi ürometre adı verilen gereçle ölçülür. Süzölmüş idrar bir ölçü silindire konur ve ürometre idrarın içine yavaşça bırakılır. Ürometrenin dengeye gelmesi ve sabit durması beklenir. Bu işlem sırasında ürometrenin cam silindirin çeperlerine değmemesine dikkat edilir. İdrarın üst yüzeyinin ürometre üzerindeki seviyesi okunur. Ürometre 15°C'lik sıvı için ayarlanmıştır. Daha sıcak veya soğuk bir idrarın gerçek dansitesi hesaplama yolu ile bulunur. Bunun için idrarın sıcaklığı bir termometre ile ölçülür. 15°C üzerindeki her 3°C'lik sıcaklık farkı için okunan değere 1 eklenir, 15°C'nin altındaki her 3°C için 1 çıkartılır. Örneğin 21°C'deki idrarın okunan dansitesi 1.005 ise, gerçek dansitesi 1.007 olacaktır.



Proteinsiz plazmanın özgül ağırlığına eşit (250-350 mosm/L) idrar çıkarılmasına **izostenüri** denir. Bu durumda idrarın dansitesi 1.010'dur. İdrar dansitesinin artması (1.035-1.040) **hiperstenüri**; dansitenin 1.010'dan düşük olması **hipostenüri** olarak tanımlanır.

Hiperstenüri nedenleri:

- İdrarda çözülmüş madde miktarının artması, örneğin çok miktarda NaCl, protein veya glikoz çıkması (idrarda madde fazının artması) .
- Az su içilmesi veya terleme nedeniyle normalde atılan maddelerin çok az idrarla çıkarılması (idrarda sulu fazın azalması).

Hipostenüri nedenleri:

- Normalde çıkarılması gereken maddelerin idrarla atılamaması (böbrek fonksiyon bozukluğu)
- Çok fazla su içilmesi sonucunda idrar yoğunluğunun azalması (çözülmüş madde miktarının idrar hacmine oranının azalması).
- Vücut fonksiyonlarındaki bozukluklar sonucu, vücudun su tutma yeteneğinin ortadan kalkması (diabetes insipidus).

İzostenüri nedenleri:

- Genellikle anurinin başlangıç dönemini takiben ilerlemiş böbrek hastalıklarında ortaya çıkar.
- Hasarlı tubuluslar glomerüler filtratı konsantre /dilüe etme yeteneğini kaybetmiştir.

İdrar pH:

İdrar pH'sı beslenmeye bağlı olarak değişmekle birlikte, normal beslenme koşullarında idrar hafif asittir. Normal idrar pH'sı 5-8, ortalama 6'dır. İdrar pH'sı genellikle yapısındaki primer fosfatlardan ileri gelir. İdrar örneği beklemekle alkaliye dönüşeceğinden pH taze idrarda tayin edilmelidir. Keton cisimlerinin varlığı pH'yı düşürür. Üreyi parçalayıp amonyak oluşturan bakteriler idrar pH'sını alkalileştirir.

İdrar pH'ı turnusol ve indikatör kâğıtları yardımı ile ölçülür. İndikatör kâğıdı üzerine idrar değindirildiğinde ortaya çıkan renk skaladan karşılaştırılarak pH saptanır. Turnusol kâğıdı ile idrarın asit veya alkali olduğu anlaşılabilir.

II. Kimyasal inceleme:

Klinik biyokimya laboratuvarlarında, idrarda protein, glikoz, bilirübin, ürobilinojen, keton cisimleri gibi bileşiklerin varlığı öncelikle kalitatif metotlarla araştırılır. Daha sonra gerekirse bu bileşiklerin düzeyleri kantitatif yöntemlerle tayin edilir. Uygulaması kolay ve hızlı sonuç verdiği için rutin idrar

analizinde tercih edilen bir yöntem de idrar stripleridir. İdrar stripleri, uygun ayıraçlar emdirilerek hazırlanmış şeritlerdir. Glikoz, keton cisimleri gibi tek bir analiz için geliştirilmiş olanların yanı sıra idrar dansitesi, lökosit, eritrosit, nitrit, keton cisimleri, bilirubin, ürobilinojen, protein ve glikoz varlığını birlikte gösteren tipleri de mevcuttur. Bu stripler üreticiler tarafından belirtilen süre boyunca idrar içinde tutulur, bu sürenin sonunda şerit üzerinde oluşan renk değişikliği kullanma kılavuzu üzerinde bulunan her parametre için belirtilen farklı değerlere ait renklerle karşılaştırılarak sonuçlar semikantitatif olarak saptanır. Süreli deneyler için kronometre kullanılır.



Strip idrara daldırılır. İdrarın fazlası süzülür.





Oluşan renk şiddeti karşılaştırılır.

İDRARDA GLİKOZ ARANMASI

Normal koşullarda glikoz veya diğer bir monosakkarit idrarda bulunmaz. Monosakkaritler arasında idrar patolojisi açısından en önemlisi glikozdur. Dolaşımdaki glikoz böbrek glomerüllerinden süzülür ve tubulustan geri emilir. İdrarda glikozun varlığı genellikle kan glikoz düzeyinin yükseldiğine işaret eder. Normalde kan glikoz düzeyleri 70-100 mg/dL arasındadır. Kandaki konsantrasyon, glikozun tubulustan geri emilimi için böbrek eşiği olan 160 mg/dL'yi aştığında idrara glikoz çıkmaya başlar. İdrarda glikoz bulunmasına *glikozüri* denir. Glikozürinin başlıca sebebi Diabetes Mellitus hastalığıdır. Diabet olmadan da bu tablo oluşabilmektedir (renal glikozüri). Eğer hastanın proksimal tubuler fonksiyonlarını bozan bazı toksinler veya ilaçlar söz konusu ise, veya genel proksimal tubuler fonksiyon bozukluğuna yol açan **Fanconi sendromu**, **multiplmyelom**, **Wilson hastalığı** gibi durumlar varsa renal glikozüri görülebilir. Bunlarda altta yatan hastalık tedavi edilebildiği takdirde glikozüri ortadan kalkar. Proksimal tubullerdeki hasar genellikle tüm tubuler geri emilme fonksiyonlarını olumsuz etkilediğinden, hastalarda tek başına glikozüri değil, aynı zamanda **aminoasidüri** (idrarda aminoasitlerin olması) ve **renal tubuler asidoz** (bikarbonat kaybına bağlı olarak kan pH'sının düşmesi) da tabloya eşlik eder.

1. DENEY: İdrarda kalitatif yöntemle glikoz aranması- Benedict deneyi

Kalitatif yöntem: Benedict Testi

Benedict ayıracı: 173 g sodyum sitrat, 100 g Na₂CO₃, 17.3 g CuSO₄ saf su ile litreye tamamlanır.

Deneyin yapılışı: Bir tübe 5 mL Benedict ayıracı konur. Üzerine 8 damla idrar katılır, karıştırılır ve kaynar su banyosunda 3 dakika tutulur. (İdrar 8 damladan fazla konulmamalıdır. Ortamda fazla idrar varsa fosfatlar çökeleceğinden sonuç net olmaz.)

Tüp kaynar su banyosundan çıkarıldıktan sonra aşağıdaki gözleme dayanarak değerlendirme yapılır:

	<u>Sonuc</u>	<u>Glikoz (g/dL)</u>
Çökelek yok, mavi-yeşil renk	0	-
Sarı çökeleklili yeşil renk	1+	0.3
Zeytin yeşili renk	2+	1.0
Kahverengi-turuncu renk	3+	1.5
Tuğla kırmızısı renk	4+	>2.0

Kül rengi veya beyaz çökelti fosfatlardan ileri gelir.

Striple glikoz aranması:

Kullanılan şeritler glikoza spesifiktir. Bu şeritler glikoz içeren idrar örneğine batırıldıktan sonra üreticisi tarafından belirtilen süre kadar beklenir ve stripte oluşan renk değişikliği kutunun üzerindeki renk ile karşılaştırılarak semikantitatif bir ölçüm yapılabilir. İdrar stripleri ile ölçüm, indirgeme yöntemlerinden daha hassastır. Ancak idrarda askorbik asit ve ürik asit miktarları artmışsa glikoz reaksiyonu baskılanabilir.

Bu yöntemle glikoz dışındaki diğer indirgen şekerleri (laktoz, galaktoz ve fruktoz) saptamak mümkün değildir. Bu nedenle galaktoz ve fruktoz metabolizmasını etkileyen herediter hastalıkların tanınmasında strip kullanılamaz.

İDRARDA PROTEİN ARANMASI

Protein, normal şartlarda idrarda basit deneylerle saptanamayacak kadar az çıkan bir organik maddedir. Günlük idrarda 20-150 mg protein bulunması normal kabul edilir. Bazı kaynaklarda üst sınır 100 mg/gün olarak alınır. Bu miktarın yaklaşık olarak yarısını albümin, geri kalanını distal tubuluslardan ve Henle kulpunun çıkan kolundan salgılanan Tamm-Horsfall glikoproteini (üromukoid) oluşturur. Pratik olarak idrara protein çıkmadığı kabul edilir ve bu eser miktardaki proteinler, günlük analizler için kullanılan protein arama yöntemleri ile gösterilemez. İdrarda protein çıktığı hallere *proteinüri* ya da eski adıyla *albüminüri* denir. Ağır proteinürilerde günde idrarla atılan protein miktarı 4 gramdan fazla olabilir.

Proteinüriler geçici ve sürekli olarak gruplandırılabilir. Geçici olanlar herhangi bir hastalığa bağlı olmayıp idrarda az miktarda protein bulunması ve bu durumun geçici olmasıyla karakterizedir. Örneğin maraton gibi ağır egzersiz koşullarında ve uzun süre ayakta kalındığında ve gebelikte görülen hafif albuminüri bu grupta yer alır.

Proteinürinin devamlı olarak saptanması altta yatan sistemik veya renal bir hastalık göstergesidir ve mutlaka yakın izleme gerektirir. Glomerüler, tubuler ve taşma (overflow) proteinüri olmak üzere üç grupta incelenir. Glomerüler hastalıklarda (nefrotik sendrom gibi), glomerül geçirgenliğinin artması proteinüri ile sonuçlanır. Tubuler proteinüride tubulointerstisiyel hasar nedeniyle düşük molekül ağırlıklı çok sayıda proteinin geri emilimi bozulmuştur. Taşma proteinürisi ise nefronun normal geri emme kapasitesini aşacak miktarda düşük molekül ağırlıklı protein üretilmesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (multiple myeloma, Bence-Jones proteinürisi gibi). Ayrıca postrenal proteinüri, böbrek sonrası idrar yollarından kaynaklanan proteini içerir ve genellikle inflamasyon, kanama ve malignite nedeniyle görülür.

2. DENEY: İdrarda kalitatif yöntemlerle protein aranması

Kaynatma Deneyi

İdrarda protein aranmasında en basit yöntemdir. Deney tüpünün yarısına kadar konulan süzölmüş idrar açık alevde kaynatılır, patolojik miktarda protein bulunması halinde bulanıklık görülür. İdrarda çok miktarda fosfat ve karbonat bulunması halinde de kaynatmakla bulanıklık oluşabilir. Ayırıcı tanı kaynatılmış idrar üzerine birkaç damla % 3'lük CH_3COOH damlatılarak yapılır. Bulanıklık sürerse proteinden, kaybolursa fosfat ve karbonatlardan kaynaklandığı düşünülür.

Sülfosalisilik Asit Deneyi

En güvenilir protein arama yöntemidir. Bir miktar süzölmüş idrarın üzerine eşit miktarda % 3 'lük sülfosalisilik asit konular, karıştırılır ve 10 dakika beklenir. Protein varsa miktarına göre, hareli veya net bulanıklık görülür. Bulanıklık nedeni, sülfosalisilik asit ile proteinlerin amin ($-\text{NH}_2$) gruplarının bağlanması sonucu oluşan çözünmeyen komplekstir. Oda ısısında oluşan bulanıklık ve/veya çökmenin derecesi aşağıdaki tanımlamalara göre yapılabilir.

Negatif- Bulanıklık oluşmaz (≤ 5 mg/dL)

Eser- Farkedilebilir bulanıklık (≈ 20 mg/dL)

(+) = Bulanıklık var, granülasyon yok (≈ 50 mg/dL)

(+ +) = Granülasyon birlikte bulanıklık (≈ 200 mg/dL)

(+++) = Granülasyon ve çökme ile bulanıklık (≈ 500 mg/dL)

(++++)= Çökmüş protein kümeleri veya katı çökelti oluşumu (≥ 1.0 g/dL)

Esbach yöntemi

Protein miktar ölçümünde semi-kantitatif yöntemdir. Bunun için 24 saatlik idrar kullanılır. Bu yöntem, çift asitle proteini çöktürerek (% 1 pikrik asit ve % 2 sitrik asit karışımı) çökeltinin yüksekliğini okuma prensibine dayanmaktadır. Duyarlılığı düşük olup 0.5 g/L'den az protein miktarını tam göstermez. Esbach tübü üzerinde U (urine) çizgisine kadar idrar, R (reactive) çizgisine kadar Esbach ayıracağı (% 1 pikrik asit ve % 2 sitrik asit karışımı) konulur. Mevcut proteinin çökmesi için 24 saat bekletildikten sonra çökeltinin hizasındaki sayı litrede gram (g/L) cinsinden protein miktarını verir. Esbach yöntemi ile 0.5-12 g/L arasındaki protein düzeyleri ölçülebilir.



Striple protein aranması:

Albumine en hassas olan bromfenol mavisi indikatör boyası kullanılarak (pH=3) oluşan renk ile protein tayinin yapılması esasına dayanır. Globulinler ve Bence-Jones proteinine duyarlı değildir. Eser pozitif; 10 mg/dL veya 150 mg/24 sa (normalin üst sınırı).

(+) = 200-500 mg/24sa,

(++) = 0.5-1.5 g/24sa,

(+++)= 2-5 g /24 sa,

(++++)= 7 g veya > 7 g/24 sa

Sağlıklı bireylerin konsantre idrarlarında eser protein görülebilir. Alkali ve/veya tamponlanmış idrar (alkali tedavi alan kişilerde veya bakteriyel kontaminasyon) proteinüri yokluğunda da pozitif sonuçlara sebep olabilir. Bu yöntem idrar bulanıklığı, radyografik madde veya ilaç ve ilaç metabolitlerinden etkilenmez.

İDRARDA BİLİRÜBİN ARANMASI

Bilirubin hemoglobinin yıkım ürünüdür. Retikuloendotelial sistemde oluşan bilirubin (serbest bilirubin = indirekt bilirubin) albümine bağlanarak kan dolaşımı ile karaciğere gelir, burada glikuronik asitle birleşir ve suda çözünebilen bağlı bilirubin (direkt bilirubin) haline geçer. Direkt bilirubin karaciğer hücresinden safra yollarına verilir, safra yollarıyla da ince bağırsağa gelir.

İdrarda normalde bilirubin bulunmaz. Bilirubinün idrara çıkışına *bilirubinüri* denir. Bilirubinüri görülebilmesi için, direkt bilirubinün kanda artması gerekir. *Sadece direkt (bağlı) bilirubin idrara geçebilir.* Serbest bilirubin suda çözünmediğinden kan düzeyleri artsa bile idrarda bulunmaz. Ancak lipofilik özelliği nedeniyle kan-beyin engelini kolayca aşabilir. Normalde kanda total bilirubin % 0.2-1 mg'dır. Direkt bilirubin düzeyi 0.2 mg/dL'yi geçmez. Direkt bilirubin için böbrek eşiği çok düşük olduğundan, normal düzeyin üzerine çıktığında idrarda saptanabilir. Kanda bilirubin 2-2.5 mg'ı geçmesi halinde dokulara yayılır ve sarılık (ikter) görülür.

İdrarda direkt bilirubinün bulunması safra taşları veya tümör nedeniyle safra kanalı tıkanıkları veya hepatosellüler hastalıklar nedeniyle hepatositlerin bilirubinüni safraya verememesine bağlı olarak ortaya çıkar. Bilirubinüri idrarın rengi sarı-kahve renkten yeşil-kahveye değişiklik gösterir. Safra kanalı tıkanıklığı tamsa sarılık ile birlikte akolik dışkı da görülebilir.

İdrarda bilirubin testinin (+), ürobilinojen (-) olması intrahepatik ve ekstrahepatik safra kanalı tıkanıklıklarını düşündürür. Bilirubinüri hemolitik sarılıklarda görülmez.

3. DENEY: İdrarda kalitatif yöntemlerle bilirubin aranması

Kalitatif yöntemler, bilirubinün yeşil renkli bir pigment olan biliverdine oksidasyonuna dayanır.

Gmelin testi: Bir deney tübüne 2 mL idrar konulur. Tüp eğilir ve kenarından, altında tabakalanmak üzere, derişik HNO₃ yavaşça dökülür. İdrarda bilirubin varsa, idrarın HNO₃ ile değinme yüzeyinin biraz üzerinde yeşil renkli bir halka (biliverdin) oluşur.

Rosin-Trousseau testi: Deney tübüne bir miktar idrar konulur. Tüp eğik durumda iken üzerine birkaç mL %1'lik alkol-iyot karışımı pipetlenerek tabakalanması sağlanır. İdrarda bilirubin varsa, değinme yüzeyinde belirgin yeşil bir halka oluşur.

Striple bilirubin aranması:

Striple bilirubin reaksiyonu, bilirubinün asit ortamda diazo tuzlarıyla reaksiyonlaşması esasına dayanır. Diazo tuzunun türüne göre farklı renkler görülebilir. 2,6-diklorbenzen-diazonyum tetraflorborat içeren striple pembeden menekşeye kadar değışen renk oluşur.

İdrar örneği taze olmalıdır, çünkü idrarda bulunan bilirubin glikuronid hızla daha az reaktif serbest bilirubine hidroliz olur. Örneğin uzun süre ışığa maruz kalması ile yalancı-negatif sonuçlar görülebilir. Çok miktarda askorbik asit ve nitrit bulunması bilirubin sonuçlarını azaltabilir. Piridin türevi ilaçlar sonucu maskelerken, rifampisin ve klorpromazin metabolitleri yalancı-pozitifliğe sebep olabilir.

İDRARDA ÜROBİLİNOJEN ARANMASI

Bilirubin karaciğerde glikuronidleşerek safra yoluyla bağırsağa atıldıktan sonra β -glikuronidaz enziminin kataliziyleglikuronik asitten ayrılır ve bağırsak bakterileri tarafından indirgenerek önce ürobilinojen, sonra tekrar indirgenerek sterkobilinojen denilen tetrapirrol bileşiklerini oluşturur. Ürobilinojen, bağırsağın üst kısımlarında enterohepatik dolaşım ile karaciğer hücrelerine geri döner. Bu sırada bir miktar ürobilinojen böbreklerden süzülerek idrara geçer. Bu nedenle idrarda az miktarda ürobilinojen bulunabilir (< 4 mg/ gün).

Sarılıkların ayırıcı tanısında idrarda ürobilinojen aranması önemlidir. İdrarda ürobilinojen miktarı, hemolitik sarılıklar, viral hepatit, toksik nedenler, ilaçlara bağlı hepatosellüler hasar ve bazı siroz olgularında artar. Kolestatik sarılıklarda ise tıkanmaya bağlı barsağa direkt bilirubin akışı azalacağından, idrarda ürobilinojen saptanmaz. Ürobilinojen ışığa duyarlı bir bileşik olduğundan taze örnekle çalışılması gerektiği unutulmamalıdır.

4. DENEY: İdrarda kalitatif yöntemlerle ürobilinojen aranması

Ehrlich deneyi

3-5 mL idrara birkaç damla Ehrlich ayırıcı damlatılır ve çalkalanır. Ürobilinojen ya da sterkobilinojen varsa, zayıf ya da kuvvetli pembe-kırmızı bir renk görülür (beyaz zemine tutulan tübün üst kısmından bakılmalıdır).

Normal idrarda az miktarda ürobilinojen çıktığından hafif pembe renk oluşabilir. Daha koyu pembe-kırmızı renk değişimi için (+), (++) , (+++) olarak değerlendirme yapılır.

Ayıraçlar:

- *Ehrlich ayırıcı*: 2 g p-dimetilaminobenzaldehit 50 mL distile suda çözünür, üzerine 50 mL derişik HCl eklenir.
- *Doymuş sodyum asetat*
- *Kloroform*

Striple ürobilinojen aranması:

Striple idrar ürobilinojeni Erlich aldehit reaksiyonu ile saptanır. Ürobilinojen oldukça labil bir madde olup süratle asit idrarda non-reaktif metabolitine dönüştüğünden taze idrar kullanılmalıdır.

Fenazopiridin türevi ilaçların metabolitleri ile yalancı-pozitif reaksiyon görülebilir.

İDRARDA KETON CİSİM ARANMASI

Karbonhidratların bulunmadığı veya kullanılmadığı koşullarda organizma için gerekli enerji yağ asitlerinin oksidasyonundan sağlanır. Yağ asitlerinin yıkımı sonucu oluşan asetil KoA lar ortamda yeterli oksalasetat bulunmadığından sitrik asit siklüsünde oksitlenemez. Asetil KoA'lar bu nedenle keton cisimleri sentezinde kullanılır. Keton cisimleri; aseton , asetoasetik asit ve β -hidroksi bütirik asittir. Sulu fazda çözünebilirler. Mitokondrisi olmayan eritrosit hariç tüm dokular keton cisimlerini oksitleyip enerji elde edebilirler. Ancak oluşumu kullanım kapasitesini aştığında kanda artar (*ketonemi*), idrarda çıkar (*ketonüri*). Aseton dışındaki keton cisimleri asit olduğundan ketonemide serum pH'sı asit yöne kayar (*ketoasidoz*). Kontrolsüz tip I diyabette günde 5 gram kadar keton cismi idrarla atılabilir. İdrarda keton cisimlerinin en az birini saptayan metod, ketonürinin saptanması için yeterlidir. Diyabetin takibinde önemlidir.

5. DENEY: İdrarda kalitatif yöntemlerle keton cisim aranması

Weyl-Legal (nitroprussiyat) Deneyi

Ayırıcılar: 1 N NaOH, CH₃COOH (% 20), sodyum nitroprussiyat (% 5)

Deneyin yapılışı: 2-3 mL idrar bir deney tüpüne alınarak üzerine NaOH çözeltisi damlatılıp alkalileştirilir. Sonra sodyum nitroprussiyat çözeltisi eklenir ve kırmızı renk oluştuğu gözlenir. Bu renk hem aseton, hem de idrarın normal bileşeni olan kreatinin nedeniyle oluşabilir. Ancak kreatininin ayıraçla oluşturduğu renk, asit ortamda kaybolur. Asetonun oluşturduğu renk ise kaybolmaz. Bunu ayırt etmek için tübe % 20'lik asetik asit damlatılır. Aseton varsa asit ilavesiyle renk daha koyu kırmızıya döner. Kreatininin oluşturduğu kırmızı renkli kompleks asit ortamda parçalanır ve renk kaybolur.

Gerhardt Deneyi

Gerhardt yöntemi ile sadece asetoasetik asit saptanabilir, bu yöntem 3-hidroksi bütirata hassas değildir.

Deneyin yapılışı:

Deney tüpünün 1/3'üne kadar idrar konur, üzerine %10'luk demir (III) klorür (FeCl₃) ayırıcı damlatılır. Normal idrarda fosfatların çökmesiyle kirli beyaz bir çökelti oluşur. İdrarda asetoasetik

asit varsa, FeCl₃ eklenmesi ile kırmızı renk görülür. Asetoasetik asidin FeCl₃ ile verdiği reaksiyon sonucu oluşan bu renk; idrarda salisilat, fenol ve antipirin gibi bileşikler bulunduğunda da ortaya çıkar. Bu nedenle aşağıdaki işlemle asetoasetatın ayırıcı tanısı yapılır.

Kırmızı rengin oluştuğu idrar açık alevde kaynatılır. Asetoasetik asitten ileri gelen renk sıvının kaynatılması ile kaybolduğu halde, ilaçlardan ileri gelen renk kaynatmakla değişmez. İdrarın kaynatılması ile rengin kaybolmasının nedeni; asetoasetik asidin ısı ile asetona dönüşmesi, asetonun da bu reaksiyonu vermemesidir.

Striple keton cisim aranması:

Günümüzde keton cisimleri için kullanılan strip, sodyum nitroprussiyat reaksiyonu esasına dayanır. Bu yöntemle aseton ve asetoasetik asit tayin edilebilir, β-hidroksibutirik asit tayin edilemez. Sodyum nitroprussiyat öncelikle asetoasetik asitle reaksiyona girer. Üç keton cisiminden idrarda en çok miktarda çıkan β-hidroksi butirik asittir. Ancak, pratik direkt bir metodu bulunmadığından rutin idrar analizinde aranmaz. Fenolsülfoftalein veya fenilketonlar, L-DOPA metabolitleri ile yalancı renk reaksiyonu oluşabilir.

İDRARDA HEMOGLOBİN ARANMASI

İdrarda anormal sayıda kırmızı kan hücrelerinin bulunmasına **hematüri**, eritrositlerin parçalanmasına bağlı serbest hemoglobinin bulunmasına ise **hemoglobinüri** denir.

Hematüri (nefrit, taş, travma), hemoglobinüri (hemoliz), miyoglobinüri (rabdomiyoliz) hemoglobin reaksiyonunun pozitif olması nedenleri arasında sayılabilir.

Striple hemoglobin aranması:

Serbest hemoglobindeki hem yapısının peroksidaz benzeri aktivitesi bulunur. Hem bu aktivitesi ile stripte bulunan bir organik peroksit ile renklendirici madde tetrametilbenzidin arasındaki reaksiyonu katalizler. Tetrametilbenzidinin oksitlenmesine bağlı olarak idrarda strip ile 0.05-0.3 mg/dL hemoglobin saptanabilir. Yüksek dansiteli ve protein düzeyi yüksek olan idrarda test duyarlılığı azalır.

Askorbik asit gibi indirgen ajanlar ile yalancı negatif sonuç oluşabilir. İdrarda yüksek miktarda nitrit olması reaksiyonu geciktirir. Hipoklorit gibi oksitleyici ajanlar, cilt dezenfektanı olarak kullanılan iyot yalancı-pozitif reaksiyona sebep olur. Ayrıca üriner enfeksiyonlarla ilişkili olarak mikrobiyal peroksidazlarla da yalancı-pozitiflik ortaya çıkabilir.

İdrar sedimentinin normal olduğu fakat hemoglobin reaksiyonunun (+) bulunduğu durumda taze idrar örneği alınarak eritrositler açısından incelenmelidir, çünkü alkali idrar veya 1.010' dan düşük dansiteli idrar eritrositlerin parçalanmasına sebep olabilir.

İDRARDA NİTRİT ARANMASI

Buyöntem idrarda belirli miktarda ($>10^5$ - 10^6) bakterinin bulunması halinde, bu bakterilerin nitratı nitrite indirgeyen enzimleri ile oluşan bir reaksiyondur. Başlıca mikroorganizmalar Escheria. Coli, Klebsiella, Enterobakter, Proteus, Psödomonas türevleridir. Negatif sonuç bakteriüri olmadığını göstermez. Enterokoklara bağlı enfeksiyonlarda bakterinin nitrat indirgeyen enzimleri olmadığından nitrit reaksiyonu negatif kalır. Nitrit testinin pozitif olması halinde kültür çalışması yapılmalıdır.

Bakterinin idrardaki nitratı nitrite dönüştürmesi için bir gece boyunca (minimum 4 saat) idrarın mesanede kalması (inkübasyonu) gerektiği için sabahki ilk orta akım örneğinin kullanılması önerilir. Uygun olmayan şartlarda toplanan ve saklanan örneklerde yalancı-pozitif sonuçlar görülebilir. Mesanede nitrite indirgenme için gerekli olan süre nedeniyle rastgele toplanan veya kateterden alınan örneklerle çalışılan nitrit reaksiyonu ile bakteriüri arasında korelasyon saptanmamıştır. Askorbik asit, ürobilinojen, düşük pH (pH<6.0) yalancı-negatifliğe sebep olabilir.

İDRARDA LÖKOSİT ESTERAZ ARANMASI

İnsandaki nötrofil azurofilik granüller esteraz aktivitesi gösteren 10 kadar protein içerir ve esteraz aktivitesi bu hücreler için bir marker olarak kullanılır. İdrarda nötrofil ve diğer hücreler labil olduğundan lökosit esteraz aktivitesi mikroskopta saptanamayan bu hücrelerin kalıntılarının saptanması için gereklidir.

İdrarda belirli miktarda nötrofilin bulunması idrar yolu enfeksiyonunu düşündürür. Pozitif lökosit esteraz bulgusu, idrarda bozulmamış veya parçalanmış (lize) nötrofil varlığını gösterir. Negatif lökosit esteraz üriner enfeksiyon ihtimalinden uzaklaştırmakla birlikte idrar, bakteri varlığı açısından sediment ve/veya kültür ile incelenmelidir.

Okside edici ajanlar ve menstrüel kontaminasyon ile interferans görülebilir. Yüksek askorbik asit varlığı reaksiyonu inhibe edebilir. Yüksek dansite, glikoz ve protein varlığı test sonuçlarını azaltabilir. İdrarın vajinal sıvı ile kontaminasyonu yalancı-pozitif sonuca sebep olabilir, mikroskopta çok miktarda skuamöz epitel hücreleri ve bakteri görülebilir. Trikomonas ve eozinofiller de yalancı-pozitifliğe sebep olabilecek alternatif hücrel esteraz kaynağı oluştururlar.

SEDİMENT İNCELEMESİ

İdrarın mikroskopik incelenmesi; santrifuj edilen ve daha sonra üst fazı atılan idrarın tüp dibinde kalan sedimenti kullanılarak yapılır. En az 10 saha değerlendirilerek ortalaması alınmalıdır.

Eritrositler: Normal idrarda 0-2 eritrosit bulunur. >3 eritrosit üzeri anormal olarak kabul edilir.

İdrarda eritrosit görülmesi; menstruasyon, ağır egzersiz, travma, damar yaralanması, böbrek/ üreter taşları, glomerülonefrit, piyelonefrit veya sistite bağlı olabilir. Lökositlerle birlikte eritrositlerin varlığı enfeksiyonu düşündürür.

Lökositler: İdrarda daha çok polimorfonükleer lökositler bulunabilir. Her sahada 4-5'den fazla lökosit anormal olarak kabul edilir. Hipotonik ve alkali idrarda lökositler hızla parçalanabileceğinden oda ısısında 2-3 saatte bekleme ile lökositlerin yaklaşık % 50'si kaybolabilir. Bu nedenle sediment lökosit açısından çabuk değerlendirilmelidir. Akut glomerülonefrit, intertisyel nefrit ve üriner sistem enfeksiyonlarında görülür.

Bakteri: Normal idrar sterildir, bakteri bulunmaz. Az sayıda bakteri cilt ve hava kontaminasyonuna bağlı görülebilir

- Taze örnekte lökositte, az veya çok sayıda bakteri üriner enfeksiyonu gösterir.
- Her sahada >20'den fazla bakteri anlamlıdır.
- İdrarda görülen en patojen bakteriler; gram(-) E.Coli ve proteus'dur.

Silendirler: Silendirler tubulusların şeklini almış silindirik yapılarıdır. Distal tubulusda veya toplayıcı kanallarda oluşur. Proksimal tubul ve henle kulpu silendirlerin oluşumu için uygun değildir. Tamm-Horsfall proteini Henle kulpunun çıkan kolunun kalın kısmından sekrete edilen bir glikoprotein olup bütün silendirlerin matriksini oluşturur. Bu proteinin oluşturduğu fibril ağı, tübüler filtratta bulunabilen hücre, hücresel parçalar veya granüler materyalleri tutar. Glomerüler geçirgenliğin artmasına sebep olan bir glomerüler hasar, Tamm Horsfall proteinine diğer proteinlerin (albumin ve globülinlerin) de katılmasına sebep olur.

Normal kişinin idrar sedimentinde çok az sayıda silendire rastlanır. Böbrek hastalıklarında çok sayıda ve değişik formlarda görülür. Çok miktarda silendir proteinüri ile birlikte ağır egzersizi takiben normal kişide görülebilir.

Düşük pH, artmış iyonik konsantrasyon, tubuler sıvıda hücre veya hücre döküntüsü bulunması ile nefronun tıkanması sonucu silendirlerin oluşumu artar. Tubuluslara giren normal düzeyden fazla miktardaki plazma proteinleri silendir oluşumunu arttırır. Genellikle miktarı fazla olan protein albümindir, ancak Bence Jones immünglobulini, hemoglobin, miyogloblin gibi globülinler de silendir oluşumuna katılabilir.

Matriks Silendirleri

- **Hyalin silendirler:** Hemen hemen tamamı Tamm-Horsfall proteininden oluşan bu silendirler matriksleri temiz, jelatinöz, hücre veya partikül içermeyen yapılardır. Hyalin silendir glomerüller kaçığı gösterir.
- **Mumsu silendirler:** Kronik böbrek hastalıklarında bazı silendirler görünüşte daha yoğun hal alır ve bunlara mumsu silendirler denir. Sarımsı, parlak görünümlü, keskin sınırlı, sıklıkla uçları açık olarak görülür. Tubuler inflamasyon veya harabiyeti gösterir.

Hücresel silendirler

- **Eritrositik silendirler:** Nefrondaki kanamayı gösterir. Renal glomerüller hasar eritrositlerin tubule kaçmasına sebep olur. Bu kaçış, proteinüri ile birlikte gerçekleştiğinde distal nefronda silendir oluşumu için optimal koşullar sağlanmış olur. Glomerüller hasarla eritrosit silendirleri oluşur.
- **Lökositik silendirler:** Kırılgan, granüllü yapılardır. Nötrofilik eksüda ve intersitisyel inflamasyonla birlikte görülen tubulointerstisyel hastalığı gösterir. Bu hastalığın en sık rastlanan örneği piyelonefrittir. Komplemanın kemotatik etkisine bağlı olarak glomerüller hastalıklarda görülebildiği gibi interstisyel nefrit, lupus nefriti ve nefrotik sendromda da görülürler.
- **Epitelyal silendirler:** Lökositik silendirler ile ayırmak güçtür. Renal tubuler hücrelerin dökülmesi ve birleşmeleri ile ortaya çıkar. Renal tubuler hücrelerin en karakteristik özelliği tek, yuvarlak çekirdeğidir. Akut tubuler nekroz, sitomegalovirus enfeksiyonu gibi viral hastalıklar ve ağır metal zehirlenmesinde görülür.
- **Granüler silendirler:** Kaba ve ince granüllü olarak iki gruptur. Hasarlı glomerüllerden tubulusa geçen plazma proteinlerinin agregatları veya lökosit, eritrosit hücrelerinin artıkları veya hasarlı renal tubuler hücreler granülleri oluşturur. Glomerüller, tubuler, tubulointerstisyel hastalıklarda ve renal allograft rejeksiyonunda görülür. Ayrıca kronik kurşun zehirlenmesi, piyelonefrit ve viral enfeksiyonlara da eşlik edebilir.
- **Yağlı silendirler:** Lipid granüller içeren kaba granüler silendirlerdir. Genellikle ağır proteinüride görülür. Nefrotik sendromun bir göstergesidir.

Pigment silendirleri

- **Hemoglobin silendirleri:** Sarıdan kırmızıya değişen renkteki bu silendirler glomerüller hastalığında görülür. Daha seyrek olarak da tubuler kanama ve nadiren hemoglobinüriyle birlikte ortaya çıkar.

- **Hemosiderin silendirleri:** Pigment yüklü renal tubuler hücrelerden kaynaklanır.
- **Miyoglobin silendirleri:** Kırmızı-kahverengi olan bu silendirler akut kas hasarı sonucu miyoglobinüri ile birlikte görülür.

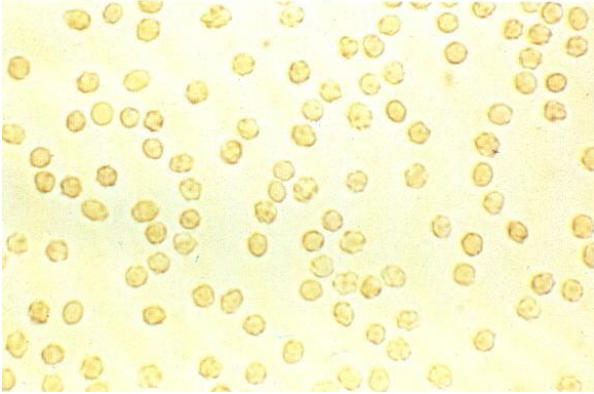
Kristaller

Normal asit idrarda görülenler:

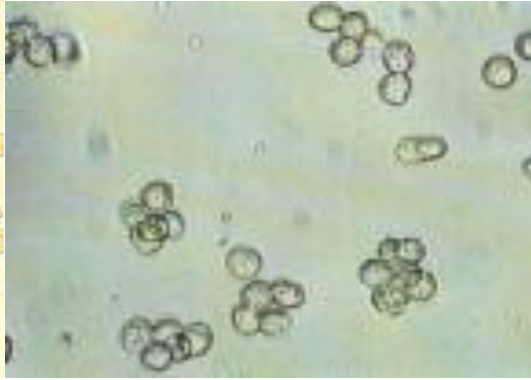
- Kalsiyum oksalat: Renksiz, zarf biçimi görünüşlü
- Amorf urat: Sarı-kırmızı, tuğla tozu görünüşlü
- Ürik asit: Sarı- kırmızı kahve renkli, düzensiz, rozet, prizma görünüşlü

Normal alkali idrarda görülenler:

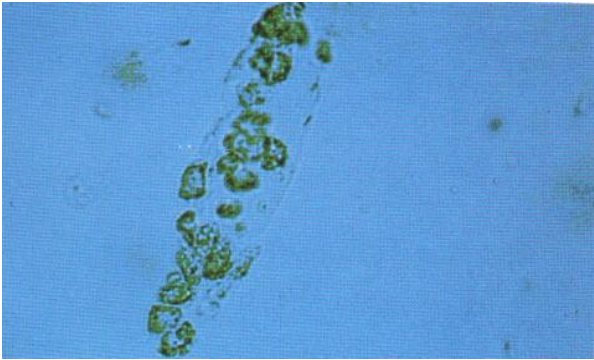
- Amorf fosfat: Renksiz, ince kum görünüşlü
- Kalsiyum karbonat: Renksiz, ufak yuvarlak görünüşlü
- Triple fosfat: Renksiz 3-6 kenarlı prizma (tabut) görünüşlü



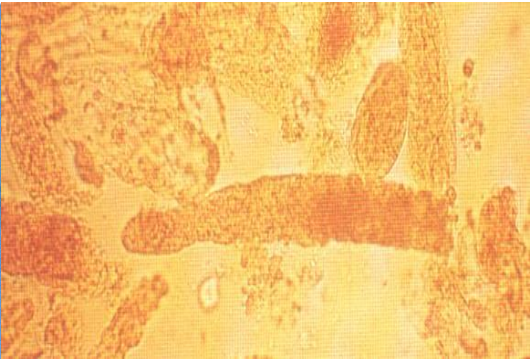
Eritrosit



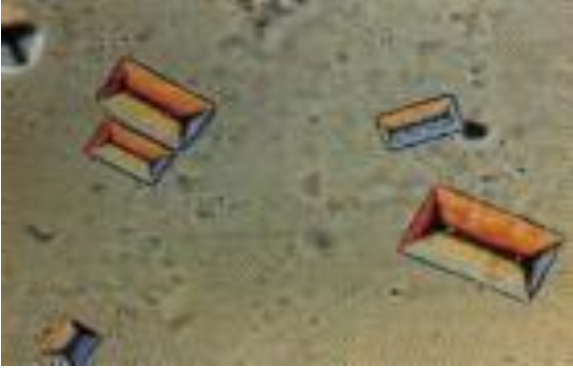
Lökosit



Lökosit silendiri



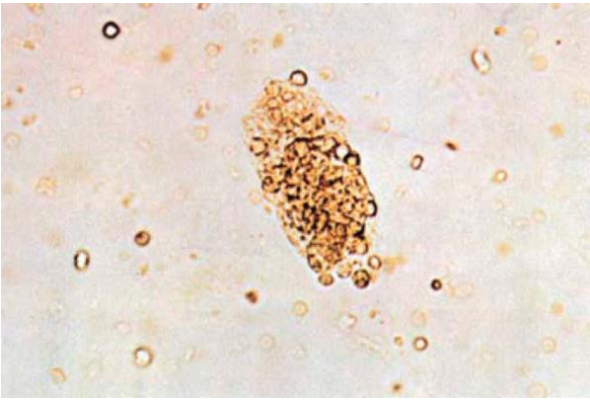
Hiyalin silendiri



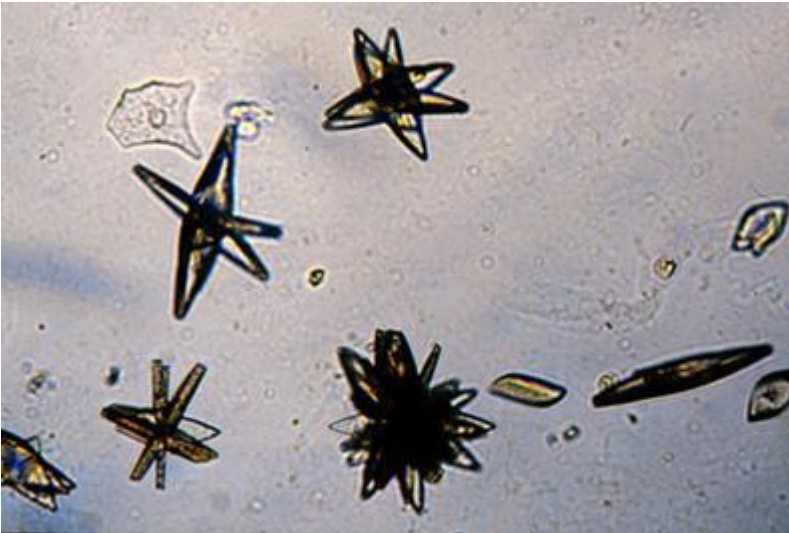
Tripl Fosfat kristali



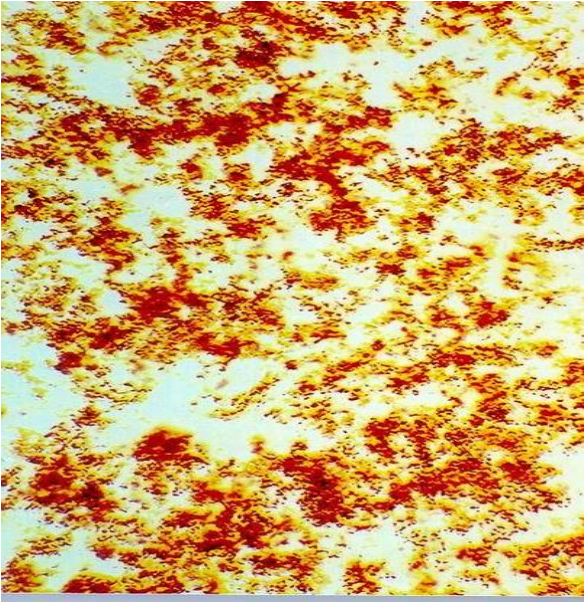
Oksalat kristali



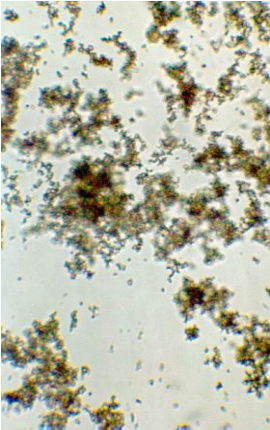
Eritrosit silendiri



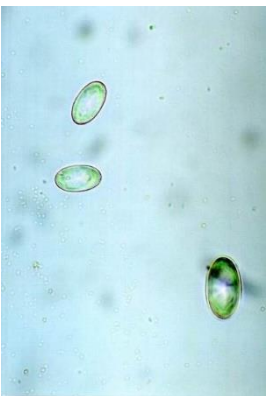
Ürik asit kristalleri



Amorf ürat kristali



Kalsiyum karbonat kristali



Amorf fosfat kristali