

BİYOKİMYADA TEMEL HESAPLAMALAR

Doç. Dr. Ufuk Çakatay

Doç. Dr. Seval Aydın

Prof. Dr. Ahmet Belce



BİYOKİMYADA TEMEL HESAPLAMALAR

BİYOKİMYADA TEMEL HESAPLAMALAR

Doç. Dr. Ufuk Çakatay

**İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Merkez
Laboratuvarı**

Doç. Dr. Seval Aydın

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet Belce

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BİRİM SİSTEMLERİ ve DÖNÜŞÜMLERİ KONSANTRASYON ve DİLÜSYON HESAPLARI

Genel tanımlamalar

Sorular ve cevapları

PIPETLER

Genel açıklamalar

Gravimetrik pipet kalibrasyonu

Fotometrik yöntemle pipet kalibrasyonu

Sorular ve cevapları

SANTRİFÜJ

Genel prensipleri

Rotor tipleri

Rölatif santrifüj kuvvetinin bulunmasında kullanılan eşitliğin hesaplanması

Alternatif rotorun rpm ve sedimentasyon süresinin hesaplanması

Berraklaştırma faktörünün (k) hesaplanması

Sorular ve cevapları

ELEKTROMANYETİK RADYASYON, SPEKTROFOTOMETRİ VE SPEKTROFLOROMETRİ

Elektromanyetik radyasyon

Moleküler orbital teorisi ve elektromanyetik radyasyonun molekül ile etkileşimi

Spektrofotometri

Lambert-Beer eşitliğinin hesaplanması

Lambert-Beer kanunundan sapmalar

Doğrudan spektrofotometrik yöntem ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Spektrofotometrik yöntem ile nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi

Spektrofotometrik yöntem ile enzim aktivitesinin belirlenmesi

Spektroflorometri

Sorular ve cevapları

STANDART EĞRİDEN YARARLANILARAK YAPILAN KONSANTRASYON HESAPLAMALARI

Genel prensipleri

Sorular ve cevapları

pH ve TAMPONLARLA İLGİLİ HESAPLAMALAR

Genel tanımlamalar

Henderson-Hasselbalch eşitliğinin hesaplanması

pH metre ve tamponların hazırlanması

Sorular ve cevapları

YENİ GELİŞTİRİLEN BİR BİYOANALİTİK YÖNTEMİN DENEYSEL GEÇERLİLİĞİNİN TEST EDİLMESİ

Analitik Kesinlik ve Doğruluk

Recovery (Verimlilik)

Lineerite (Doğrusallık)

Sorular ve cevapları

KAYNAKLAR

İNDEKS

ÖNSÖZ

Disiplinler arası bir bilim olan biyokimya; matematik, fizik ve kimyanın prensipleri ile sistematik olarak bütünleşerek, canlılıkla ilgili süreçlerin ayırt edici özelliklerini yapı ve fonksiyon arasındaki ilişkilerin terimleri ile açıklamaya çalışmaktadır. Son yıllarda biyokimyanın hücre biyolojisi ve mikrobiyoloji ile birleşmesiyle oluşan moleküler biyoloji alanı; tıp, tarım, eczacılık ve gıda endüstrisindeki biyolojik süreçlerin anlaşılmasında ve kontrolünde önemli gelişmelere yol açmıştır.

Kitabımızda her bölümün başında verilen temel bilgiler, bölüm sonunda verilen problemlerin çözümüne yardımcı olacak şekilde genişletilmiştir. Bölüm içindeki temel bilgi ve kavramlar problemlerin anlaşılmasına yönelik olarak yer yer şekil ve tablolarla desteklenmiştir. Matematiksel ve fiziksel tanımlamalar ile bu tanımlamalardan türevlenen ilişkiler, her konuyu temel düzeyde anlamaya yetecek ölçüde sınırlı tutulmuştur. Kitabımızdaki bölümlerin sonunda verilen pek çoğu temel ve pratik öneme sahip açıklamalı sayısal soru ve cevapların, farklı disiplinlerden gelen okuyucuların deneysel çalışmalarında benzer modeller oluşturmalarına yardımcı olmasını ümit ediyoruz. Kitabın yayına hazırlanması sırasındaki katkılarından dolayı Karolin Yanar'a teşekkür ederiz.

BİRİM SİSTEMLERİ ve DÖNÜŞÜMLERİ

Bilimsel ölçümler konvansiyonel olarak metrik sistem ile ifade edilir. Ondalık-esaslı olan metrik sistem, matematikte kullanılan ondalık sistemle uyumludur. Bu sistemin önemli bir avantajı; kesirli olarak da gösterilebilen standart ölçü birimlerinin ondalıklı sistemde gösterilebilmesine olanak tanımasıdır. Metrik sistemde; ağırlık, uzunluk, hacim ve zamanın gösterilmesi için kullanılan standart birimler sırasıyla gram (g), metre (m), litre (L) ve saniyedir (s). Standart birimler standart örnek ve sembollerle gösterilir (**Tablo 1.1**). Kantitatif analiz yapılan laboratuvarlarda ondalıklı olarak gösterilen birimlerin 10'un kuvveti şeklinde kullanılması metrik sistem birimlerin birbirine dönüştürülmesinde ve hesaplanmasında kolaylık sağlamaktadır (**Tablo 1.2**).

Metrik sistem bilimsel alanda yaygın olarak kullanılmakla birlikte, rapor edilen birimler bakımından bir laboratuvarın diğerine farklılıklar görülebilmektedir. Bilimin uluslararası niteliğine bağlı olarak, bilim çevreleri arasındaki iletişimi kolaylaştırmak amacıyla, kantitatif ölçümlerle ilgili birimlerin açık olarak tanımlanmasına ve standardizasyonuna ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle 1960 yılında SI (*System International: Système International d'Unités*) kabul edilmiş ve birçok uluslararası bilimsel organizasyon tarafından benimsenmiştir. Zaman içinde orijinal SI sisteminde değişiklikler yapılarak biyokimya laboratuvarı ile ilgili verilerin rapor edilmesine daha uygun bir hale getirilmiştir. Biyokimyada genellikle küçük hacimlerin kullanılması nedeniyle; (SI) yerine konvansiyonel birimler olan litre (L), mililitre (mL), mikrolitre (μ L), nanolitre (nL) günümüzde pek çok bilimsel dergide kullanılmamaktadır (**Tablo 1.2**).

Konvansiyonel konsantrasyon birimini SI karşılığına çevirebilmek için maddenin molekül ağırlığının bilinmesi gerekir. **Tablo 1.3**'teki fiziksel sabitler ve **Tablo 1.4**'teki semboller SI kapsamında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ppm, (İng.: **Parts per million**) milyonda bir birime verilen isimdir. Herhangi bir çözültedeki toplam madde miktarının milyonda (*mikro*) 1 birimlik maddesine 1 ppm denir. Her üç harfi de küçük olarak "**ppm**" şeklinde yazılır. Diğer bir konsantrasyon birimi olan **Ppb** (İng: **Parts per billion**) ise milyarda bir (*nano*) olarak tanımlanır.

Tablo 1.1: Kantitatif terimlerle ilgili yaygın olarak kullanılan birimler, örnek ve semboller

Kat	Önek	Sembol
10^{18}	Exa	E
10^{15}	Peta	P
10^{12}	Tera	T
10^9	Giga	G
10^6	Mega	M
10^3	Kilo	k
10^2	Hekto	h
10^1	Deka	da
10^{-1}	Desi	d
10^{-2}	Santi	c
10^{-3}	Mili	m
10^{-6}	Mikro	μ
10^{-9}	Nano	n
10^{-12}	Piko	p
10^{-15}	Femto	f
10^{-18}	Atto	a

Tablo 1. 2: Konvansiyonel ve uluslararası sistemdeki (SI) hacim ünitelerinin birbirine dönüşümleri

Konvansiyonel		SI	
1 litre (L)	10^3 mL	$=1 \text{ dm}^3$	$=10^{-3} \text{ m}^3$
1 mililitre (mL)	1 mL	$=1 \text{ cm}^3$	$=10^{-6} \text{ m}^3$
1 mikrolitre (μL)	10^{-3} mL	$=1 \text{ mm}^3$	$=10^{-9} \text{ m}^3$
1 nanolitre (nL)	10^{-6} mL	$=1 \text{ nm}^3$	$=10^{-12} \text{ m}^3$

Tablo 1.3: Önemli fiziksel sabitlerin uluslar arası sistemdeki (SI) birimsel değerleri

Fiziksel Sabit	Birim
Avogadro sayısı (N)	6.023×10^{23}
Dalton (D)	$1.661 \times 10^{-24} \text{ g}$
Elektron volt (eV)	$1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$
Elementer yük (proton) (e)	$1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$
Faraday sabiti (F)	$9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
Planck sabiti (h)	$6.626 \times 10^{-34} \text{ J sn}^{-1}$
Universal gaz sabiti (R)	$8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$
Vakumdaki ışık hızı (c)	$2.998 \times 10^8 \text{ m sn}^{-1}$
Kelvin (K)	$273.15 \text{ }^\circ\text{C}$

Tablo 1.4: Bilimsel adlandırmalarda yaygın olarak kullanılan harfler ve okunuşları

A (α) (alfa)	B (β) (beta)	Γ (γ) (gama)	Δ (δ) (delta)
E (ϵ) (epsilon)	Z (ζ) (zeta)	H (η) (eta)	Θ (θ) (teta)
I (i) (iota)	K (κ) (kappa)	Λ (λ) (lambda)	M (μ) (mü)
N (ν) (nü)	Ξ (ξ) ki	O (\omicron) (omikron)	Π (π) (pi)
P (ρ) (ro)	Σ (σ) sigma	T (τ) (tau)	Y (υ) (upsilon)
Φ (ϕ) fi	X (χ) ki	Ψ (ψ) pisi	Ω (ω) (omega)

Sorular ve cevapları

Soru 1: Aşağıda verilen ondalıklı sayıları bilimsel sistemde gösteriniz.

- a) 0.000000000015 b) 0.0000500042 c) 437.28×10^{-7}

Cevap: a) 1.5×10^{-11} b) 5.00042×10^{-5} c) 4.3728×10^{-5}

Soru 2: Aşağıda bilimsel sistemde verilen sayıları ondalıklı sisteme çeviriniz

- a) 4.37×10^5 b) 2×10^1 c) 23.4×10^7 d) 3.2×10^{-4}

Cevap: a) 437000 b) 20 c) 234000000 d) 0.00032

Soru 3: 50 M^{-1} ditiyonit'in konsantrasyonunu mM cinsinden hesaplayınız.

Cevap: $a^{-1}=1/a$ $1/50 \text{ M} = 0.02 \text{ M} = 20 \text{ mM}$

Soru 4: Çözünürlük sabiti (K_d) 3.8 mM olarak verilmektedir. M^{-1} olarak karşılığını hesaplayınız.

Cevap: $3.8 \text{ mM} = 3.8 \times 10^{-3} \text{ M}$ $a^{-1}=1/a$ olduğundan $0.263 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

Soru 5: Aşağıdaki birimlerin birbirine dönüşümlerini hesaplayınız.

$50 \mu\text{L} = ? \text{ mL}$, $0.5 \text{ mg} = ? \mu\text{g}$, $250 \text{ mL} = ? \text{ L}$, $0.05 \text{ mg} = ? \text{ ng}$

Cevap: $50 \mu\text{L} \times 1 \text{ mL} / 1000 \mu\text{L} = 5 \times 10^{-2} \text{ mL}$
 $0.5 \text{ mg} \times 10^3 \mu\text{g} / 1 \text{ mg} = 500 \mu\text{g}$
 $250 \text{ mL} \times 1 / 1000 = 0.25 \text{ L}$
 $0.05 \text{ mg} \times 10^6 / 1 \text{ mg} = 5 \times 10^4 \text{ ng}$

Soru 6: Protein konsantrasyonu 7.8 g/dL olarak saptanan bir serum örneğinin $300 \mu\text{L}$ 'si bir deney tüpüne pipetleniyor. Tüpteki protein miktarını miligram cinsinden hesaplayınız.

Cevap: $7.8 \text{ g/dL} = 7.8 \times 10^3 \text{ mg/dL}$

$1 \text{ dL} = 10^2 \text{ mL} = 10^5 \mu\text{L}$

Tüpteki protein miktarı = $3 \times 10^2 \times 7.8 \times 10^3 / 10^5 = 3 \times 7.8 \times 10^5 \times 10^{-6} = 3 \times 0.78 = 2.34 \text{ mg}$

Soru 7: Molekül ağırlığı 0.4 kDa olan 100 mg doymuş yağ asidi monomoleküler film tabakası halinde su üstüne yayıldığında bir banyo küvetini, ya da bir yüzme havuzunu mu, yoksa bir gölün yüzeyini mi kaplar? $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, 1 yağ asidi molekülü $21 (\text{ \AA})^2$ alan kaplar.

Cevap: $0.4 \text{ kDa} = 400 \text{ Da} = 400 \text{ g}$
 400 g yağ asidi 1 moldür,
 $0,1 \text{ gram}$ yağ asidi = $0.1 \times 1 \text{ mol g} / 400 \text{ g} = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol g}$
 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/g} \times 6.02 \times 10^{23} \text{ molekül} / 1 \text{ mol/g} = 1.5 \times 10^{20} \text{ molekül}$
 $(1.5 \times 10^{20}) \times (21 \text{ \AA}^2 = 21 \times 10^{-20} \text{ m}^2) / 1 \text{ molekül} = 31.5 \text{ m}^2$

Bu alanın yüzme havuzunu kapladığı düşünülebilir.

Soru 8: İnsan diploid genomunu oluşturan DNA molekülü 6×10^9 baz çifti içermektedir. Baz çifti sayısını kilobaz (kb) olarak hesaplayınız.

Cevap: $1 \text{ kb} = 10^3$ baz olacağına göre
 $\text{DNA} = 6 \times 10^9 / 10^3 = 6 \times 10^6 \times 10^{-3} = 6 \times 10^6 \text{ kb}$

Soru 9: 90 mg/dL glukoz değerini, bilimsel sistem olarak kullanılan üstlü sayılar yardımı ile SI'deki karşılığı olan mmol/L 'ye çeviriniz. [MW (molekül ağırlığı) = 180 g/mol]

Cevap: $90 \text{ mg/dl} = 900 \text{ mg/L}$ $180 \text{ g/mol} = 180000 \text{ mg/mol}$
 $\text{mol/L} = (900 \text{ mg/L}) / (180000 \text{ mg/mol}) = (9 \times 10^2 \times 10^{-4}) / 18 = 0.09 / 18$
 $= 0.005 \text{ mol/L} = 5 \text{ mmol/L}$

Soru 10: 4.5 g/dL albumin konsantrasyonunu $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplayınız. (MW=65000 g/mol)

Cevap: $4.5 \text{ g/dL} = 45 \text{ g / L} = 45 / 65000 = 0.000692 \text{ mol/L}$
 $0.000692 \text{ mol/L} \times 10^6 = 692 \mu\text{mol / L}$

Soru 11: 5000 g etanol içinde 5 mg metanol çözüldüğüne göre metanol konsantrasyonunu ppm olarak hesaplayınız.

Cevap: $5 \text{ (mg)} \times 10^6 (\mu) / 5 \times 10^6 \text{ (mg)} = 1 \text{ ppm}$

Soru 12: Araç sürücüsü olarak trafik kazasına karışan kişinin kazadan iki saat sonra Devlet Hastanesi acil servisinde yapılan alkol ölçümü sonucu 250 mg/dL alkollü olduğu anlaşılıyor. Kaza anında bu kişinin kaç promil alkollü olduğunu hesaplayınız. (1 promil alkol = 100 mg/dL)

Cevap: Metabolizma sonucu kandaki alkol düzeyinde bireysel farklılıklar olmakla beraber, bir saatte 0.12 – 0.18 promil, ortalama 0.15 promil azaldığı tıbben bilindiğine göre; kişinin kazadan iki saat sonra $250 \text{ mg/dL} = 2.50 \text{ promil}$ saptanan kan alkol düzeyinin kaza sırasında;

$$2.5 + (2 \text{ saat} \times 0.12) = 2.74$$

$$2.5 + (2 \text{ saat} \times 0.15) = 2.80$$

$$2.5 + (2 \text{ saat} \times 0.18) = 2.86$$

2.74 – 2.86 promil arasında ve ortalama olarak 2.80 promil olduğu kabul edilebilir.

KONSANTRASYON ve DİLÜSYON HESAPLARI

Genel açıklamalar

Belirli konsantrasyondaki çözeltilerin laboratuvar ortamında hazırlanmasında; yüzde konsantrasyon, molarite, normalite ve dilüsyon (sulandırma) hesaplarının anlaşılması önem taşımaktadır. Yüzde konsantrasyon olarak tanımlanan çözeltilerin hazırlanmasında; ağırlık veya hacim birimine ya da molekül ağırlığına bakılmaksızın, ağırlık/ağırlık (w/w), ağırlık/hacim (w/v), hacim/hacim (v/v) olarak gerekli hesaplamalar yapılır. En sık kullanılan yüzde çözelti tipi; ağırlık/hacim (w/v) olarak adlandırılan ve birimi g/dL olan çözeltilerdir. Molarite (M) rutin olarak litredeki mol sayısı (mol/L) veya bazen mililitredeki milimol (mmol/mL) sayısı olarak ifade edilir. Normalite (N) ise litredeki eşdeğer (ekivalen) ağırlık sayısı veya mililitredeki miliekivalen (mEq/mL) ağırlık sayısıdır. Eşdeğer ağırlık, molekül ağırlığının (g/mol), etki değerine bölünmesiyle hesaplanır. Etki değeri asitlerde ortama verilen hidrojen iyonu (H⁺) sayısına, bazlarda ise hidroksil (OH⁻) sayısına eşittir. Redoks reaksiyonlarında alınıp verilen elektron sayısı etki değerliliğini belirler. Normalite genellikle asitlerle ve bazlarla ilgili hesaplamalarda kullanılmaktadır. Bazı bileşiklerin eşdeğer ağırlığı, kendi molekül ağırlığına, ya da başka bir kimyasal maddenin eşdeğer ağırlığına eşit olabilir.

Dilüsyon; konsantre veya stok haldeki maddenin çözeltinin toplam son hacmine oranını gösterir. Dilüsyonlarda konsantrasyon birimi değişmeden kalır. Stok çözeltinin, toplam çözelti hacmine oranına dilüsyon faktörü adı verilir. Dilüsyon faktörü ile konsantrasyon arasında ters bir ilişki vardır. Dilüsyon faktörü arttıkça konsantrasyon azalır. Dilüsyon faktörünü hesaplamak için; ihtiyaç duyulan çözelti konsantrasyonunu stok çözeltinin konsantrasyonuna bölmek yeterlidir. Birbirini takip eden seri dilüsyonlarla konsantre bir çözeltilerden, daha seyreltik çözeltiler elde etmek mümkündür. Standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan çözeltiler hazırlanırken, pediatrik hasta serumu gibi örneğin az olduğu durumlarda, ya da konsantrasyonu yüksek olan bir parametrenin yol açtığı Beer kanunundaki lineerite'den sapmaya bağlı olarak seri dilüsyona başvurulabilir. Seri dilüsyon ilk olarak basit dilüsyonla başlar. Takip eden dilüsyonlar bir önceki dilüsyondan gerçekleştirilir. En son yapılan dilüsyonla elde edilen çözeltinin dilüsyon faktörü, öncekilerin dilüsyon faktörlerinin çarpımına eşittir.

Sorular ve cevapları

Soru 1: 1000 mL %10 (w/v)'luk NaOH hazırlamak için ne kadar NaOH gereklidir?

Cevap: $10 / 100 = x / 1000$
 $x=100$ g

100 g NaOH tartılır son hacim 1000 mL'ye tamamlanır.

Soru 2: Bir mol kristal suyu içeren CuSO₄ 'tan % 10'luk 100 mL'lik bir çözelti hazırlayabilmek için ne kadar CuSO₄ . 1H₂O tartmalıyız. MW (Molekül ağırlığı)= CuSO₄ . 1H₂O= 178 g

Cevap: CuSO₄ = 178 -18 = 160 g
% 10 CuSO₄ = 178 g x 10 / 160 =11.13 gr CuSO₄ . 1H₂O tartılır, 100 mL'ye tamamlanır.

Soru 3: Molekül ağırlığı 135000 g/mol olan proteinin, 2 x 10⁻⁴ mol/L 'lik çözeltisinin mililitrede kaç miligram protein içerdiğini hesaplayınız.

Cevap: $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \times 135000 \text{ g/mol} = 27 \text{ g} = 27000 \text{ mg}$
 $\text{mL'deki protein miktarı} = 1 \text{ mL} \times 27000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL} = 27 \text{ mg/mL}$

Soru 4: Molekül ağırlığı 167000 olan proteinin, 2 mg/mL'lik çözeltisinin molaritesini hesaplayınız.

Cevap: L'deki protein miktarı = $1000 \text{ mL} \times 2 \text{ mg} / 1 \text{ mL} = 2000 \text{ mg} = 2 \text{ g}$
 $M = 2 \text{ g} \times 1 \text{ mol} / 167000 = 1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$

Soru 5: Enzim reaksiyonu 10 mL hacim içerisinde gerçekleştirildikten sonra, reaksiyonu durdurmak için son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ilave ediliyor. Kalsiyum klorürün kristal suyu ile birlikte ağırlığı 219.08 g/mol olduğuna göre, kaç miligram kalsiyum klorür hidrat tartmak gerektiğini hesaplayınız.

Cevap: $219.08 \text{ g/mol} = 219080 \text{ mg/mol}$
 $(10 \text{ mM} \times 219080 \text{ mg/mol}) / 1000 \text{ mM} = 2190.80 \text{ mg}$
1 L=1000 mL
 $10 \text{ mL}(10\text{mM}) = (10 \text{ mL} \times 2190.80 \text{ mg}) / 1000 \text{ mL} = 21.91 \text{ mg}$

Soru 6: 50 mL 20 mM NaOH çözeltisi nasıl hazırlanır? MW (NaOH)= 40 g/mol

Cevap: $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$
 $20 \text{ mM} \times 50 \text{ mL} = 1000 \text{ mM} \times V_2$
 $V_2 = 1 \text{ mL}$ alınır, 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.
ya da

$\text{NaOH (g)} = 40 \text{ g/mol} \times 20 \text{ mM} / 1000 \text{ mM} = 0.8 \text{ g NaOH (1000 mL için)}$
 $= 0.04 \text{ g NaOH (50 mL için)}$

Soru 7: Özgül ağırlığı 1.19 g/mL olan %38'lik derişik HCl'in normalitesi nedir?
MW (HCl) =36.5 g/mol

Cevap: Özgül ağırlık x % = g/mL
 $1.19 \times 0.38 = 0.452 \text{ g/mL} = 452 \text{ g/L}$
 $36.5 \text{ g HCl} / \text{L} = 1 \text{ N}$
 $452 \text{ g/L} / 36.5 \text{ g/Ekivalent ağırlık} = 12.4 \text{ N}$

Soru 8: 24.5 g H_2SO_4 kullanarak bir litre çözelti hazırlandığında çözeltinin molarite ve normalitesi ne olur? MW (H_2SO_4)=98 g/mol

Cevap: $1 \text{ mol} / 98 \text{ g} = x / 24.5 \text{ g}$
 $x = 0.25 \text{ mol/L} = 0.25 \text{ M}$
Etki değeri= Molekül ağırlığı / Değerlilik
Normalite= Molarite x Etki değeri

Sulu çözeltilerinde bir mol sülfirik asit ortama 2 mol hidrojen iyonu verdiğiinden, sülfirik asidin etki değeri ikidir.

$0.25 \text{ M} \times (98 / 2) = 0.25 \times 49 = 0.5 \text{ N}$

Soru 9: 3000 mEq/L konsantrasyonundaki sodyum stok çözeltisinden, 100 mEq/L'lik sodyum çözeltisi hazırlamak için dilüsyon faktörünü hesaplayınız.

Cevap: $100 / 3000 = 1 / 30$

Sodyum stok çözeltisinden 1 mL alınır 30 mL'ye tamamlanır.

Soru 10: 1:20 oranında sulandırılmış 10 M NaOH, 1:5 oranında sulandırılmış 2 M HCl'in konsantrasyonlarını hesaplayınız.

Cevap: NaOH = $1 \text{ mL} \times 10 \text{ M} / 1000 \text{ mL} = 0.01 \text{ mol/mL}$
= $1000 \text{ mL} \times 0.01 \text{ mol/mL} / 20 \text{ mL} = 10 / 20 = 0.5 \text{ M}$
HCl = $1 \text{ mL} \times 2 \text{ M} / 1000 \text{ mL} = 0.002 \text{ mol/mL}$
= $1000 \text{ mL} \times 0.002 \text{ mol/mL} / 5 \text{ mL} = 2 / 5 = 0.4 \text{ M}$

Soru 11: 1000 mg/mL'lik glukoz çözeltisi önce 1:10 daha sonra 1:2 oranında sulandırılıyor. Dilüsyonlar sonucu elde edilen örnekteki glukoz konsantrasyonunu mg/dL olarak hesaplayınız.

Cevap: Glukoz = $1 \text{ mL} \times 1000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL}$
Toplam dilüsyon = ilk dilüsyon x ikinci dilüsyon = $1:10 \times 1:2 = 1:20$
 $1000 \text{ mL} \times 1 \text{ mg} / 20 \text{ mL} = 50 \text{ mg/L} \rightarrow 5 \text{ mg/dL}$

Soru 12: 200 g/L 'lik hemoglobün standartından, 150 g/L, 100 g/L, 50 g/L konsantrasyonlarında, 6 mL hacmindeki çözeltileri hazırlamak için kaç mL standart alınmalı ve ne kadar dilüent eklenmelidir?

Cevap: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$
İlk konsantrasyon x İlk hacim = İstenen konsantrasyon x İstenen hacim
 $200 \text{ g/L} \times V_1 = 150 \text{ g/L} \times 6 \text{ mL}$ $V_1 = 4.5 \text{ mL}$ 1.5 mL dilüent eklenmeli.
 $200 \text{ g/L} \times V_1 = 100 \text{ g/L} \times 6 \text{ mL}$ $V_1 = 3 \text{ mL}$ 3 mL dilüent eklenmeli
 $200 \text{ g/L} \times V_1 = 50 \text{ g/L} \times 6 \text{ mL}$ $V_1 = 1.5 \text{ mL}$ 4.5 mL dilüent eklenmeli

Soru 13: 1.5 mL %0.5'lik SDS çözeltisi hazırlayabilmek için kaç mikrolitre (μL) %20'lik SDS çözeltisine ihtiyaç vardır?

Cevap: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$
İlk konsantrasyon x İlk hacim = İstenen konsantrasyon x İstenen hacim
 $0.005 \times 1.5 \text{ mL} = 0.20 \times V_2$
 $V_2 = 0.0375 \text{ mL} = 37.5 \mu\text{L}$
37.5 μL %0.5'lik SDS'den alınarak 1.5 mL'ye tamamlanır.

Soru 14: Beş tüpten oluşan ve birbirini takip eden aşağıdaki dilüsyon sisteminde birinci ve üçüncü tüplerde kaç kat sulandırma yapıldığını hesaplayınız. Bir'den beşe kadar olan tüplere 0.5'er mL dilüent konur. Birinci tüpe 0.5 mL hasta serumu konulduktan sonra; birinci tüpten ikinciye, ikinciden üçüncüye, üçüncü tüpten dördüncü tüpe ve son olarak dördüncü tüpten beşinci tüpe 0.5 mL örnek aktarılır. En son olarak 5. tüpteki 0.5 mL'lik hacimdeki örnek dışarı atılır.

Cevap: 1 / Sulandırma katsayısı (X) = Transfer edilen hacim / Toplam hacim
 $1 / X = 0.5 / 1$ (İçler,dışlar çarpımı yapılır)
 $0.5X = 1.0 \rightarrow X = 2$ Birinci tüpteki sulandırma oranı 1/2 bulunur.
Üçüncü tüpteki sulandırma oranı = $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$

PİPETLER

Genel açıklamalar

Pipetler belli hacimdeki sıvıları transfer etmeye yarayan cam ya da plastikten yapılmış laboratuvar gereçleridir. Günümüzde pek çok laboratuvar da bu tür pipetlerin yerini otomatik pipetler almaya başlamıştır. To contain (TC) pipetler belirli hacimdeki sıvıyı tamamen içinde tuttuğu halde, tutulan hacimdeki sıvıyı bütünüyle dışarı vermez. Pipet içeriğini tamamen dışarı verebilmek için üfleme gerekir. Daha çok viskozitesi yüksek sıvıları çekmek için kullanılır. To deliver (TD) pipetler ise üzerinde işaretli olan hacmi pipetlemeyle üfleme gerek duyulmadan tam olarak dışarıya bırakır. Düşük viskoziteli sıvılar için kullanılır. Pipetlerin sınıflandırılması **Tablo 3.1**'de verilmiştir.

İyi kaliteli cam pipetler genel olarak borosilikat camdan yapılır. Borosilikat camlar sert, çinko gibi ağır metalleri içermeyen, ısı şokuna ve alkali korozyona dirençli camlardır. Pek çok kez kullanılabilirler. Kalibrasyon bilgisi cam üzerine yakılmak suretiyle yazılmıştır. Bu yüzden sürekli yıkansalar dahi üzerlerindeki kalibrasyon bilgisi okunabilirlik özelliğini yitirmez. Ancak kırık ya da çatlak olduğunda kullanılmaları güvenli değildir.

Mikropipetler biyokimya laboratuvarlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tek hacimli olan bu TC pipetlerle, 1 µL kadar küçük hacimleri çekerek kullanmak mümkündür. Mikropipetlerde yüzeyin hacme oranının çok yüksek olması nedeniyle pipet içeriğinin boşaltılması sırasında önemli bir miktar sıvı cam yüzeylerde asılı kalır. Total hacmi doğru bir şekilde dışarı verebilmek için pipeti birkaç kez çekilecek sıvıyla durulamak gerekir. Daha sonra çekilen hacim tam olarak dışarı pipetlenebilir. Mikropipetlerin yerini günümüzde yarı otomatik mikropipetler almıştır. TD tipinde olan bu pipetlerin kapasitesi 1-1000 µL arasında değişebilmektedir. Bazı modelleri sabit hacimliken, diğerlerinin hacmi ayarlanabilir özelliktedir. Bir piston yardımıyla çekme ve bırakma işlemi gerçekleştirilir. Kullanılıp atılabilir özellikteki silikon kaplı plastik uçların dış ve iç yüzeyi çekilen hacmi bırakma sırasında sıvı tutmama özelliğindedir.

Tablo 3.1: Pipetlerin sınıflandırılması

- I. Tip
 - A. To contain (TC)
 - B. To deliver (TD)
 - II. Tip (Drenaj özelliklerine göre)
 - A. Üflemeli
 - B. Kendiliğinden akan
 - III. Tip
 - A. Ölçülü veya dereceli
 - 1.Serolojik
 - 2.Mohr
 - 3.Bakteriyolojik
 - 4.Ball,Kolmer veya Kahn
 - 5.Mikropipet
 - B. Transfer
 - 1.Volumetrik
 - 2.Ostwald-Folin
 - 3.Pasteur pipetleri
 - 4.Otomatik makro veya mikropipetler
-

Gravimetrik pipet kalibrasyonu

Cam pipetlerin üretim aşamasından sonra laboratuarda yeniden kalibrasyonu genellikle gerekli olmadığı halde, otomatik pipetlerin belirli zaman aralıklarında gravimetrik olarak kalibrasyonu analiz sonuçlarının güvenilirliği bakımından önem taşır. Gravimetrik yöntem en çok tercih edilen pipet kalibrasyon yöntemidir. Gravimetrik pipet kalibrasyonu zaman alıcı bir işlem olduğundan, pipetlerin günlük olarak kalibrasyonu pratik değildir. Otomatik pipetler için yılda dört kez kalibrasyon yapılması önerilmektedir.

Gerekli Materyaller

Otomatik pipet.

10-20 adet pipet ucu

Pipetlenen hacimsel ağırlığın $SD=\pm 0,1$ 'i kadar hassas ve doğru ölçüm yapabilen terazi.

Tartılacak sıvıyı içerisinde tutabilecek büyüklükte tartım kabı.

Deiyonize/Distile su

Termometre ve barometre

İşlemler

1. Kabın ağırlığı (W_v) ve suyun sıcaklığı (t) ölçülerek kaydedilir. Bütün materyallerin oda sıcaklığında olmasına dikkat edilir. Hava basıncı barometreden okunarak kaydedilir.
2. Kalibrasyonu yapılacak pipetle belirli bir miktar deiyonize su çekilir. Dikkatlice pipet ucunun dış kısmı silinir. Bu sırada yanlış kalibrasyona neden olmamak için pipet ucuna değmemeye dikkat edilmelidir.
3. Deiyonize su daha önceden ağırlığı saptanmış olan kap içine pipetlenir.
4. İçinde su bulunan cam kabın ağırlığı hassas terazide tartılarak kaydedilir (W_f).
5. 4. Basamaktan elde edilen ağırlıktan, 1. Basamaktan elde edilen ağırlık çıkartılır. Sonuç kaydedilir.
6. Eğer plastik pipet ucu kullanılıyorsa her pipetlemede pipet ucu değiştirilmelidir. 1-4. basamaklar en az dokuz kez tekrarlanmalıdır.
7. Suyun ortalama ağırlığı hesaplanır. Hesaplanan ortalama ağırlık, sıcaklık ve basınca bağlı olarak *Handbook of Chemistry and Physics*'den bulunan düzeltme faktörü (F_t) ile çarpılır.
8. Pipetin doğruluğu, diğer deyişle pipetin beklenen hacmi veya pipetleme yeteneği (aktüel kapasitesi) aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$(W_f - W_v) \times (F_t) = \text{Aktüel kapasite (mL)}$$

Ölçümler sonucunda elde edilen veri (n) sayısı arttıkça pipet kalibrasyonunun istatistiksel geçerliliği artar. Küçük yüzde sapma değerlerinde kesinlik (precision) daha kuvvetlidir.

$$\% \text{Sapma} = [(\text{Beklenen kapasite} - \text{Aktüel kapasite}) / (\text{Beklenen kapasite})] \times 100$$

Spektrofotometrik yöntemle pipet kalibrasyonu

Kalibrasyon geçerliliğinin denetlenmesinde en çok kullanılan yöntem gravimetrik pipet kalibrasyonu olmasına rağmen, otomatik pipetlerin kalibrasyonu için fotometrik yöntemden de yararlanılabilir. Potasyum bikromat gibi molar ekstinksiyon katsayısı ve konsantrasyonu bilinen bir bileşiğin, test edilecek pipetle dilüsyonu ile meydana gelecek absorban ve konsantrasyon değişiminden hesaplanan aktüel konsantrasyonla, beklenen konsantrasyon arasındaki ilişkiyi yararlanılarak pipetin kalibrasyon geçerliliği kontrol edilir.

Tablo 3.2: Sıcaklık ile suyun yoğunluğu arasındaki ilişki

°C	Yoğunluk
20	0.9982
21	0.9980
22	0.9978
23	0.9976
24	0.9973
25	0.9971
26	0.9968
27	0.9965
28	0.9963
29	0.9960
30	0.9957

Sorular ve cevapları

Soru 1: 10 mL'lik cam pipetin kalibrasyonu ile ilgili veriler aşağıda verilmiştir. Pipetin beklenen hacimden ne oranda saptığını hesaplayınız. Bu sapma kabul edilebilir limitler içinde midir?

$$W_f = 31.9961 \text{ g}$$

$$W_v = 22.0391 \text{ g}$$

$$t = 24 \text{ °C}$$

$$F_t = 1.003771 \text{ (Tablodan)}$$

Cevap:

$$(W_f - W_v) \times (F_t) = \text{Aktüel kapasite (mL)}$$

$$(31.9961 - 22.0391) \times (1.003771) = 9.9945 \text{ mL}$$

$$\%Sapma = [(Beklenen\ kapasite - Aktüel\ kapasite) / (Beklenen\ kapasite)] \times 100$$

$$\%Sapma = [(10 - 9.9945) / (10)] \times 100 = \%0.055$$

Rutin analizlerde % 0.1'den küçük sapmalar veya hatalar dikkate alınmaz. % 0.1'in üstündeki sapmalar için düzeltme değeri dikkate alınmalıdır.

Soru 2: 1 mL'lik otomatik pipete ait n=9 ölçüm sonucunda elde edilen ortalama aktüel kapasite 0.886 mL'dir.

a) Standart kapasiteden % sapma ne kadardır? Bu sapma kabul edilebilir limitler içinde midir?

b) Otomatik pipet 500 µL'ye ayarlandığında pipetle çekilen çözelti hacmi minimum ve maksimum hangi değerler arasında olabilir?

Cevap:

a) Ortalama aktüel kapasite= 0.886 mL

$$\%Sapma = (Beklenen\ kapasite - Ortalama\ aktüel\ kapasite) / (Beklenen\ kapasite) \times 100$$

$$\%Sapma = [(1 - 0.886) / 1] \times 100 = \%0.114\ mL$$

Standart kapasiteden sapma değeri > %0.1 değerinin üstünde olduğu için kabul edilebilir limitler içinde değildir.

b) %Sapma=0.114 mL = 114 µL (1000 µL hacim için), Bu yüzden 500 ± 57 değeri elde edilir.

Minimum=443 µL

Maksimum=557 µL

Soru 3: 1 mL'lik otomatik pipetin kalibrasyon geçerliliğinin değerlendirilmesinde **Tablo 3.3**'deki hangi standart kapasiteden % sapma değeri dikkate alınmalıdır?

Tablo 3.3: Pipet kalibrasyonunda ölçüm sayısı ve % sapma arasındaki ilişki

Ölçüm sayısı (n)	% Sapma
9	0.053
8	0.050
10	0.053
9	0.051
12	0.058
11	0.057
7	0.051

Cevap: n=12 %Sapma=0.058

Soru 4: Cam pipetle 25 °C'de çekilen 10 mL deiyonize suyun ağırlığı ne kadardır?

Cevap: Tablo 3.2'den 25 °C sıcaklıkta, d=0.9971 g/mL olarak verildiğine göre; 10 mL deiyonize suyun ağırlığı 9.971 g olarak hesaplanır.

Soru 5: 10 µL'lik otomatik pipetin spektrofotometrik kalibrasyonu için 0.01 mol/L'lik NaOH'ten 2.5 mL, 105 mg/dL'lik p-nitrofenolden ise 10 µL kullanılıyor. Farklı volumetrik pipetler kullanılarak referans dilüsyonlar, kalibrasyonlu pipet kullanılarak da test dilüsyonları gerçekleştiriliyor. Referans dilüsyonların 401 nm dalga boyundaki ortalama absorpsansı $A_1=0.550$, test dilüsyonlarının ortalama absorpsansı ise $A_2= 0.561$ hesaplanıyor. Test solüsyonunun dilüsyon oranı $D= 1/251$ son hacmi $V=2510$ µL olduğuna göre, aktüel olarak pipetlenen hacim nedir. Pipetlenen hacim analitik olarak kabul edilebilir sınırlar içindedir?

Cevap: Pipetlenen hacim (µL) = $A_2 / A_1 \times D \times V$
= $0.561 / 0.550 \times 1/251 \times 2510$
= 10.20 µL

Hata oranı (%) = $(100 \times 0.20) / 10 = \%2$

Pipetin nominal kapasitesi 10 µL olduğuna göre, hata % 2 oranındadır. Üretici firmalar tarafından, pipetler için kabul edilen hata sınırı genellikle nominal değerin %1'inden küçüktür. Bu nedenle hata oranı kabul edilebilir sınırın üzerindedir.

SANTRİFÜJ

Genel prensipleri

Santrifüjleme; katı materyali santrifüjleme kuvveti kullanarak sıvı haldeki süspansiyondan ayırma işlemidir. Santrifüjle ayırma teknikleri; ayrılacak parçacıkların, uygulanan santrifüj kuvvetine karşı gösterdikleri fiziksel davranışlara bağlıdır. Ayrılması istenilen parçacıkları oluşturan moleküllerin göreceli (rölatif) ağırlıkları, şekli ve yoğunluğu, bu taneciklerin santrifüj kuvvetine karşı gösterdikleri fiziksel davranışları etkiler. Santrifüjle ayırma tekniğinin temeli; süspansiyon halindeki parçacıkları yerçekimi ivmesinden ($g=9.81 \text{ m/sn}^2$) daha büyük bir kuvvetle ve hızla ayırma esasına dayanır. Parçacık tanımı; ortamda çözülmüş veya süspansiyon halinde bulunan, mikroskopik ya da makroskopik boyuttaki çözücü veya süspansiyon sıvısı dışındaki oluşumları kapsadığı için oldukça geniş kapsamlıdır. Biyokimyada santrifüjleme ile ayrılan ve üzerinde çalışılan parçacıklar genel olarak hücreler, organeller, DNA ya da proteinler gibi büyük moleküllerdir.

Santrifüj kuvveti kütle, hız ve yarıçap olmak üzere üç değişkene bağlıdır. Dakikadaki dönme sayısı [*revolutions per minute* (rpm)], oluşan santrifüj kuvveti ise göreceli santrifüj kuvveti [*relative centrifugal force* (RCF) veya *gravite* (g)] olarak ifade edilmektedir. RCF ve santrifüj hızı arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

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

Eşitlikteki 1.118×10^{-5} açısal hızdan hesaplanan bir sabit, r ise cm olarak santrifüj ekseninden test tüpünün yerleştiği bölümün tüp dibiyle temas ettiği noktaya kadar ölçülen mesafedir. RCF değerini ayrıca nomogram yardımıyla da hesaplamak mümkündür (*Şekil 4.1*).

Santrifüjler set üstü veya zemin üstü olmasına, soğutmalı olup olmamasına, ya da rotor başının özelliğine [hareketli-kovalı (*Şekil 4.2*), sabit açılı (*Şekil 4.3*), vertikal rotorlu (*Şekil 4.4*)] göre sınıflandırılırlar. Santrifüjün hızı kalite kontrol amacıyla takometre kullanılarak kontrol edilebilir.

Rotor tipleri

Hareketli-kovalı rotorlar

Örnek tüpü, tüp taşıyıcı kovalardan birinin içine yerleştirilir. Rotorun hızlanmasıyla birlikte kova yer çekimi etkisiyle durduğu dikey pozisyondan, santrifüj kuvveti yönünde yatay pozisyona geçer. Geniş açılı bu rotorlarda, çökme yolu tüpün uzunluğuna eşittir. Santrifüjleme sırasında parçacıklar ilk olarak tüp çeperi etkisiyle tüm çeperlerde birikmeye, daha sonra da birlikte dibe hareket ederek çökelti oluşumuna neden olur. Hareketli-kovalı rotorlar uzun sedimentasyon yolu nedeniyle, çökelti elde etmek için çok uygun değildir.

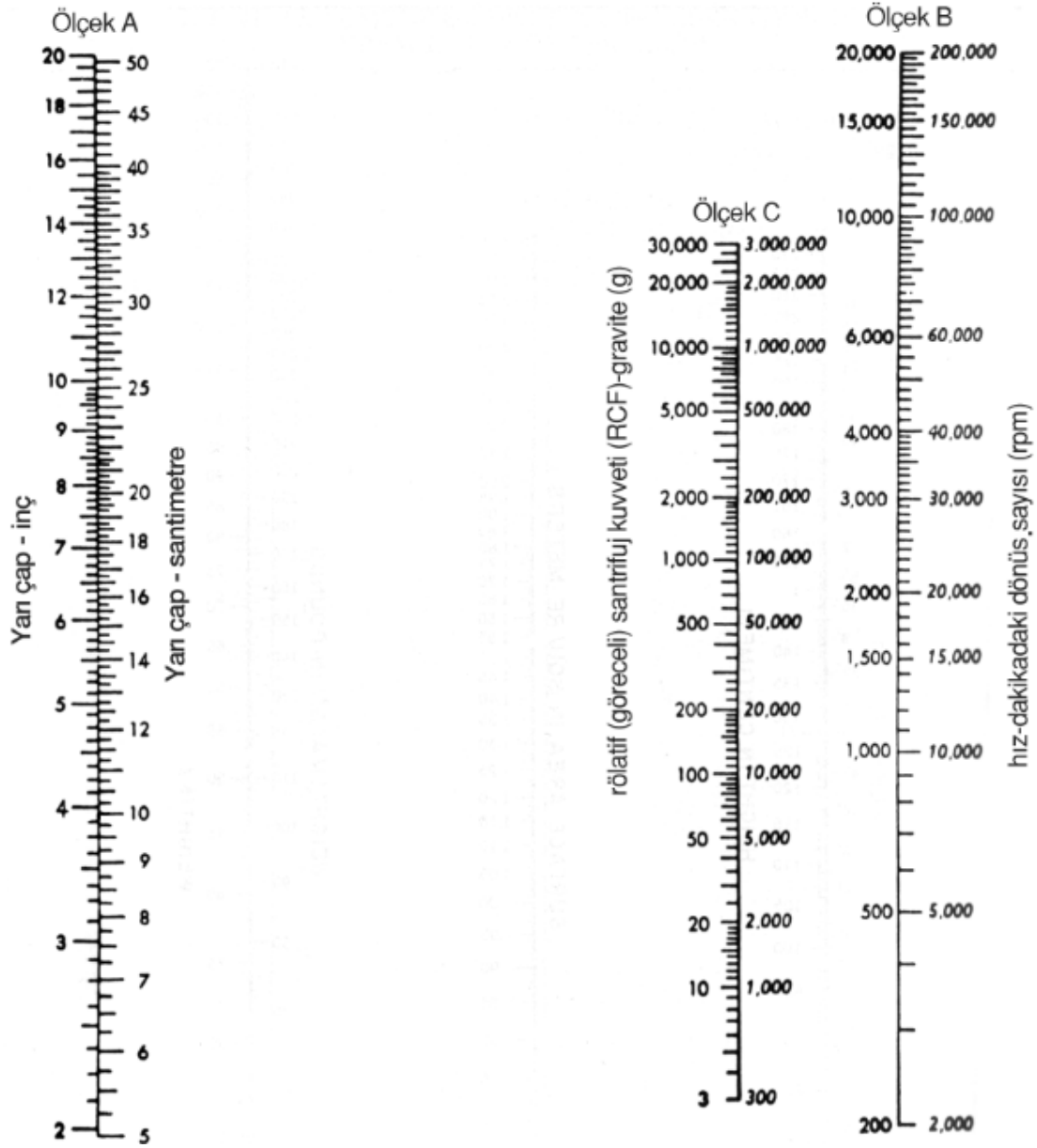
Sabit açılı rotorlar

Örnek tüpleri içinde boşluk bulunmayan rotor içindeki tüp yuvalarına yerleştirilir. Tüplerin açısı, yerleştirme, santrifüjleme ve boşaltma aşamalarında değişmeden kalır. Santrifüj kuvvetinin artmasıyla birlikte, tüpün içindeki çözelti yer değiştirir. Belirli hacimdeki örnek için sabit açılı rotorlardaki çökme yolu, hareketli-kovalı rotora göre daha kısadır. Parçacıklar yanal tüp çeperine hareketli-kovalı rotora göre daha hızlı ulaşır, çeperlerden kayarak çökelti oluşumuna neden olur. Sabit açılı rotorlar çökelti elde etmek için avantajlıdır. Bu yüzden hücre fraksiyonlarını elde etmeye yönelik olarak, diferansiyel santrifüjleme ile DNA ve RNA eldesi için gerçekleştirilen izopiknik santrifüjleme işleminde tercih edilir. Rotor açısının dar olması

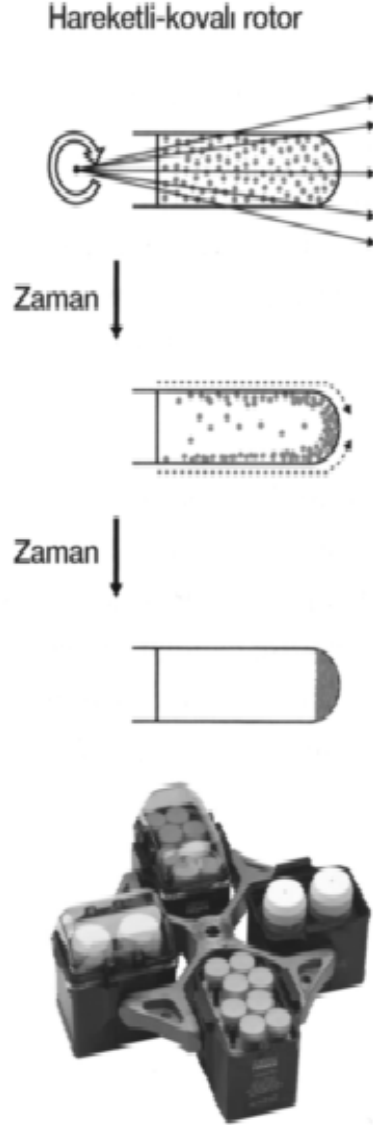
nedeniyle sedimentasyon yolu kısadır. Sedimentasyon yolunun kısıklı çökelti eldesindeki etkinliği artırır. Sabit açılı rotorların açısı 14° ile 40° arasında değişmektedir.

Vertikal rotorlar

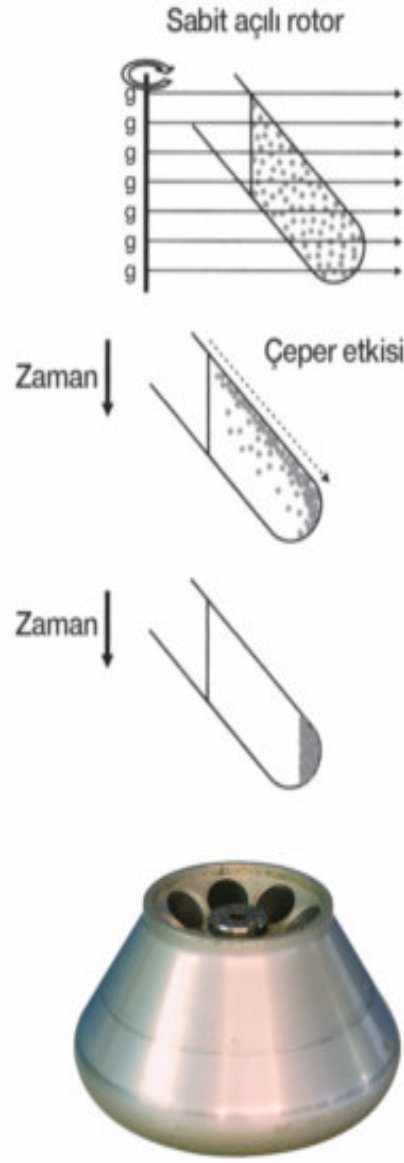
Vertikal rotorlarda tüpler santrifüjleme sırasında dikey pozisyonunu korur. Santrifüj kuvvetinin etkisiyle sıvı g kuvveti yönünde hareket eder. Bu rotorlarda çevrilecek olan tüplerin kapağı kuvvetli hidrostatik basınca karşı koyabilecek özellikte olmalıdır. Adı geçen bu üç tip rotor içinde sedimentasyon yolu en kısa olanıdır. Minimum yarıçap ve g kuvveti ile düşük rotor hızlarında hızlı ayırma sağlanır. İzopiknik santrifüjleme için en uygun olan rotor tipidir. Çökelti eldesi ile ilgili tekniklerde kullanılması önerilmemektedir.



Şekil 4.1. Göreceli santrifüj kuvvetini (RCF) hesaplamakta kullanılan nomogram

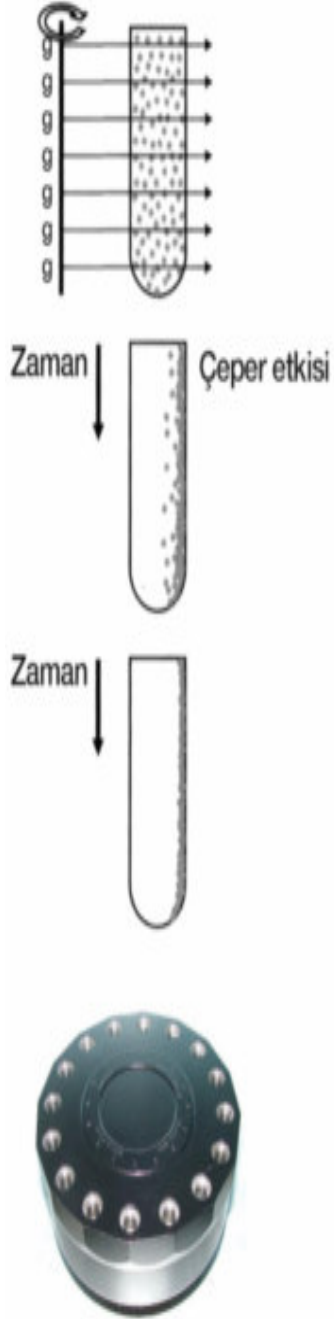


Şekil 4.2. Boyuna kesitte hareketli-kovalı rotorun görünümü



Şekil 4.3. Boyuna kesitte sabit açılı rotorun görünümü

Dik açılı (vertikal) rotor



Şekil 4. 4. Boyuna kesitte vertikal rotorun görünümü

Rölatif (göreceli) santrifüj kuvvetinin bulunmasında kullanılan eşitliğin hesaplanması

Santrifüjle çöktürme işleminin etkinliği oluşan santrifüj kuvvetine (G) bağlıdır. G değeri; rotorun açısal hızının (ω) karesi ile parçacığın dönme merkezine cm olarak ışınsal mesafesine (r) bağlı olarak aşağıda verilen eşitliğe göre belirlenir.

$$G = \omega^2 r \quad (1)$$

Rotorun bir dönüşü 2π radyana eşit olduğu için, rotorun açısal hızını radyan/sn olarak vermek mümkündür. Bu yolla rotor hızını alışlagelmiş bir şekilde dakikadaki (60 sn) dönme hızı (rpm) olarak gösterebiliriz.

$$\omega = 2\pi \text{ rpm} / 60 \quad (2)$$

Santrifüj kuvveti (G)'nin rpm'den yararlanılarak hesaplanması için (2) numaralı eşitlik (1) numaralı eşitlikteki ω^2 yerine konulur ve (3) numaralı eşitlik elde edilir.

$$G = 4 \pi^2 \text{ rpm}^2 r / 3600 \quad (3)$$

Yer çekimi ivmesi ($g=981 \text{ cm/sn}^2$)'dir. Parçacığın santrifüj kuvveti etkisindeki ağırlığının, aynı parçacığın sadece yerçekimi etkisiyle oluşan ağırlığına oranına göreceli santrifüj kuvveti (RCF) adı verilmektedir.

$$\text{RCF} = F_{\text{santrifüjleme}} / F_{\text{gravite}} = m.G / m.g = G / g = \omega^2 r / g \quad (4)$$

(2) numaralı eşitlik (4) numaralı eşitlikte yerine konularak alttaki eşitlik elde edilir.

$$\text{RCF} = 4 \pi^2 \text{ rpm}^2 r / 3600 \times 981 \quad (5)$$

(5) numaralı eşitlik aşağıda olduğu gibi kısaltılarak son halini alır.

$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2 \quad (6)$$

Alternatif rotorun rpm ve sedimentasyon süresinin hesaplanması

Parçacıkları çöktürmek için gerekli süre; rotorun hızına, yarıçapına ve çöken parçacığın kat ettiği mesafeye, yani tüpteki sıvının derinliğine bağlıdır. Santrifüjlemede orijinal koşulların sağlanması arzu edilirse de, bu durum her zaman mümkün olmaz. RCF değeri bilinen orijinal rotordan, yarıçapı bilinen alternatif rotorun rpm değerinin bulunması aşağıdaki eşitliğin hesaplanması ile gerçekleşir.

$$\text{rpm (alternatif rotor)} = 1000 \times \sqrt{\text{RCF (orijinal rotor)} / 11.18 \times r \text{ (cm) alternatif rotor}}$$

Santrifüj süresi ve RCF değeri bilinen orijinal rotordan yararlanarak, alternatif rotorun RCF değerini kullanarak, alternatif rotor için gerekli sedimentasyon süresi hesaplanabilir.

$$\text{zaman (alternatif rotor)} = \text{zaman} \times \text{RCF (orijinal rotor)} / \text{RCF (alternatif rotor)}$$

Berraklaştırma faktörünün (k) hesaplanması

Çökelti oluşturma kapasitesi berraklaştırma faktörü (k) değeri ile ilişkilidir. Küçük (k) değerlerinde daha etkin bir şekilde ayırma, ya da çökelti oluşturma işlemi meydana gelir. (k) değeri aşağıdaki (1) numaralı eşitlikte tanımlanmıştır.

$$k = (t) (s) 10^{13} \quad (1)$$

(t) değeri saat olarak zamanı, (s) ise sedimentasyon katsayısını göstermektedir.

$$s = \ln (r_{\max} / r_{\min}) / \omega^2 (t_2 - t_1) \quad (2)$$

(2) numaralı eşitlikte, (ω) radyan / sn olarak açısal hızı, r_{\max} ve r_{\min} arasındaki fark sedimentasyon mesafesini belirler. Mesafe kısaltıkça, (k) değeri küçülür. Daha kullanışlı bir eşitlik (3) elde etmek için açısal hızın yerine rpm konulur, bu durumda doğal olarak zaman birimi dakikadır.

$$k = 2.53 \times 10^{11} \ln (r_{\max} / r_{\min}) / \text{rpm}^2 \quad (3)$$

Verilen (k) değeri rotora özgü bir değerdir ve 20 °C'deki saf suda parçacığın ulaşabileceği maksimum hızı gösterir. Ortamın viskozitesi ve suyun yoğunluğu arttıkça, (k) değeri doğru orantılı olarak artar. Düşük hızlardaki $k_{\text{aktüel}}$ değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanabilir.

$$k_{\text{aktüel}} = k (\text{rpm}_{\max} / \text{rpm})^2 \quad (4)$$

Sorular ve cevapları

Soru 1: Sabit-açılı rotora sahip bir santrifüjde santrifüjleme işlemi gerçekleştiriliyor. Santrifüj tüpünün üst kısmındaki minimum yarıçap ($r_{\min}=4.8$ cm), alt kısmındaki maksimum yarıçap ise ($r_{\max}=9$ cm) olarak ölçülmüştür. Rotor dakikada 12000 kez döndüğüne göre tüpün alt ve üst kısmındaki göreceli santrifüj kuvvetini hesaplayınız.

Cevap: $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$
 $RCF_{\text{üst}} = 1.118 \times 10^{-5} \times 4.8 \times (12000)^2$
 $RCF_{\text{üst}} = 7728 \text{ g}$

$$RCF_{\text{dip}} = 1.118 \times 10^{-5} \times 9 \times (12000)^2$$
$$RCF_{\text{dip}} = 14489 \text{ g}$$

Hesaplamalardan görüldüğü gibi tüpün alt ve üst kısımlarındaki RCF değerleri arasında yaklaşık iki kat fark bulunmaktadır.

Soru 2: Ultrasantrifüj 58000 rpm'de çalıştırılıyor.

a) Radyan/sn olarak açısal hızını ve merkezden 6.2 cm uzaktaki santrifüj kuvvetini hesaplayınız.

b) Bu santrifüj kuvveti kaç yerçekimi ivmesine eşdeğerdir?

$$\text{Yerçekimi ivmesi (g)} = 980 \text{ cm/sn}^2$$

Cevap:

$$\text{a) } \omega = 2\pi \text{ rpm} / 60 = 2 \times 3.14 \times 58000 / 60 = 6070.7 \text{ radyan/sn}$$
$$G = \omega^2 r = (6070.7)^2 \times 6.2 = 2.285 \times 10^8 \text{ cm/sn}^2$$

$$\text{b) } \text{RCF} = G / g = 2.285 \times 10^8 \text{ cm/sn}^2 / 980 \text{ cm/sn}^2 = 233163 \text{ g}$$

Soru 3: İskelet kası homojenatındaki spesifik bir yapısal protein, sabit açılı rotor kullanılarak 7500 RCF değerinde, yaklaşık 43 dakikada ayrılıyor. Yarıçapı 9 cm olan sabit açılı alternatif rotor kullanıldığında aynı protein kaç rpm'de ayrılır?

Cevap:

$$\text{rpm (alternatif rotor)} = 1000 \times \sqrt{\text{RCF (orijinal rotor)} / 11.18 \times r \text{ (cm, alternatif rotor)}}$$

$$\text{rpm (alternatif rotor)} = 1000 \times \sqrt{7500 / 11.18 \times 9} = 1000 \times \sqrt{7500 / 100.62} = 8633 \text{ rpm}$$

Soru 4: Sabit açılı titanyum rotor maksimum 52000 rpm'de dönebilme özelliğine sahiptir. Rotorun $r_{\max} = 10.8 \text{ cm}$, $r_{\min} = 3.2 \text{ cm}$ olduğuna göre k (berraklaştırma) değerini hesaplayınız. Elde edilen k değerini aşağıda verilen tablodaki değerlerle karşılaştırarak doku homojenatından elde edilen çözünür özellikteki proteinin ayrılabilmesi için en uygun rotoru seçiniz.

Tablo 4.1: Ultra hızlı rotorların k değeri ve total kapasitesi

Rotor Tipi	RCF _{max} (g)	RCF _{min} (g)	Toplam kapasite (mL)	k
Hareketli-kovalı	90300	39300	102	338
Hareketli-kovalı	285000	119000	84	137
Hareketli-kovalı	484200	254000	26.4	45
Sabit açılı (18°)	59200	29600	940	398
Sabit açılı (14°)	94500	63300	210	113
Sabit açılı (29°)	511000	220800	112	38
Vertikal	70000	50400	312	123
Vertikal	240600	173400	280	34
Vertikal	510000	416600	40.8	8

Cevap: a) $k = 2.53 \times 10^{11} \ln(r_{\max} / r_{\min}) / \text{rpm}^2$
 $k = 2.53 \times 10^{11} \ln(10.8 / 3.2) / (52000)^2$
 $k = 2.53 \times 10^{11} \times \ln 3.375 / (5.2 \times 10^4)^2$
 $k = 2.53 \times 10^{11} \times 1.216 / 27.04 \times 10^8$
 $k = 2.53 \times 10^3 \times 1.216 / 27.04$
 $k = 3077 / 27.04 = 114$

b) k=8 olan vertikal rotor

Soru 5: Bir araştırma makalesindeki yöntemle göre; 4 saat santrifüjleme süresi içinde, maksimum hızda, k= 225 olan sabit açılı bir rotor (Rotor A) kullanılarak çökelti oluşturulabilmektedir. Daha kısa sürede, maksimum hızda, k=63 olan farklı bir sabit açılı rotor (Rotor B) kullanarak aynı materyalden çökelti elde edilmesi amaçlanmaktadır. Çökelti oluşturmak için gerekli olan süreyi hesaplayınız.

Cevap: $t_{\text{rotor B}} = (63 \times 4) / 225 = 1.12$ saat

Soru 6: Göreceli santrifüj kuvvetini hesaplamakta kullanılan nomogram (*Şekil 4.1*) yardımı ile $r=10$ cm, 1000 g değerlerine karşılık gelen rpm değerini bulunuz.

Cevap: RCF=1000 g \rightarrow 3000 rpm

ELEKTROMANYETİK RADYASYON, SPEKTROFOTOMETRİ ve SPEKTROFLOROMETRİ

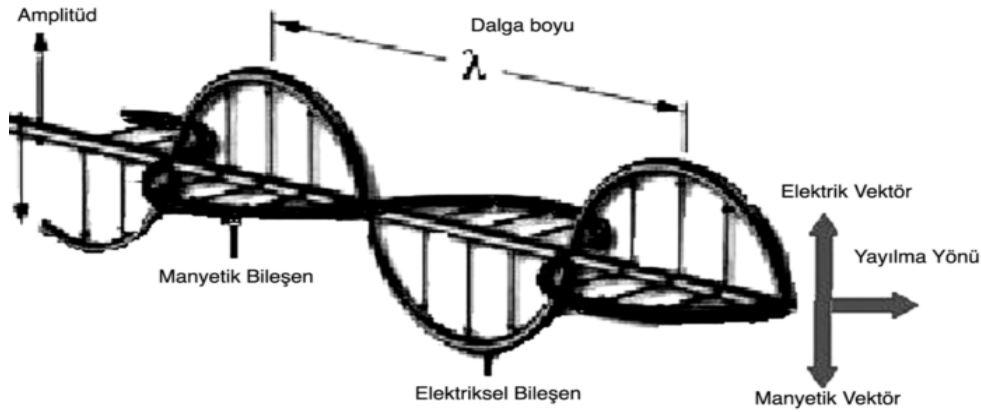
Elektromanyetik radyasyon

Spektrofotometrik ölçümler elektromanyetik radyasyon geçirgenliğinin dedektör tarafından ölçülmesi prensibine dayandığı için, elektromanyetik radyasyonun ana özelliklerinin anlaşılması önem taşımaktadır. Işık elektromanyetik radyasyonun görünen kısmıdır. Elektromanyetik radyasyon birbirine dik iki yatay düzlemde salınım gösteren elektriksel ve manyetik alanlardan oluşur. Işık ve elektromanyetik radyasyon spektrumunun diğer kısmı sinüsoidal dalga hareketi gösteren, foton adı verilen enerji paketlerinden meydana gelmiştir.

Elektromanyetik spektrumda birbirini takip eden sinüsoidal dalga pikleri arasındaki mesafe dalga boyudur (λ). Dalga boyu uluslararası sistemde nanometre ile ölçülür (10^{-9} m). Saniyedeki dalga sayısına ise frekans (ν) adı verilmektedir. Frekans, ışık hızı (c) / dalga boyu (λ) değerine eşittir. Dalga boyu ile enerji arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Uzun dalga boyunda az sayıda foton bulunduğundan enerji, kısa dalga boyuna göre daha düşüktür. Bir diğer ifadeyle yüksek frekanstaki ışığın fotonlarında yüksek enerjilidir.

Bu ilişki Planck sabiti ($h=6.62 \times 10^{-34} \text{Js}^{-1}$)'nin yer aldığı aşağıdaki eşitlikte görülmektedir.

$$E=h \nu = h c / \lambda$$



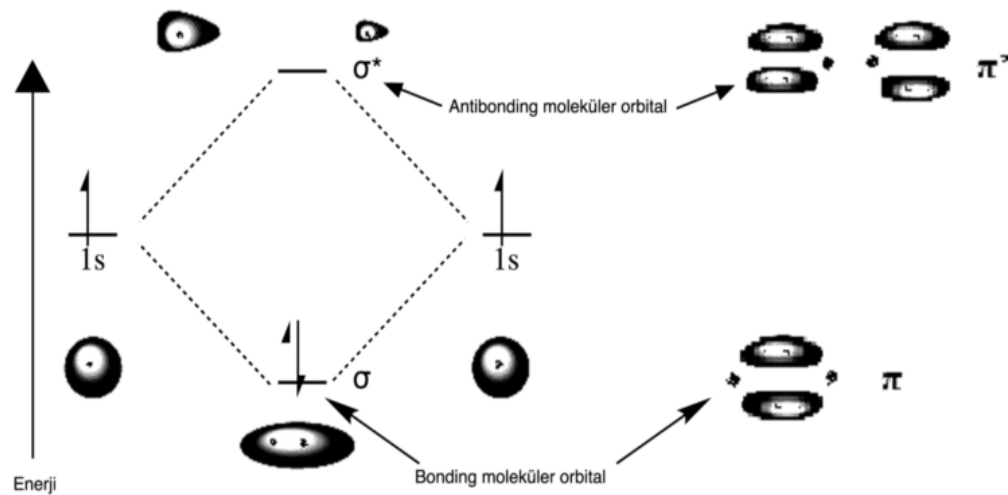
Şekil 5.1. Elektromanyetik dalga

Moleküler orbital teorisi ve elektromanyetik radyasyonun molekül ile etkileşimi

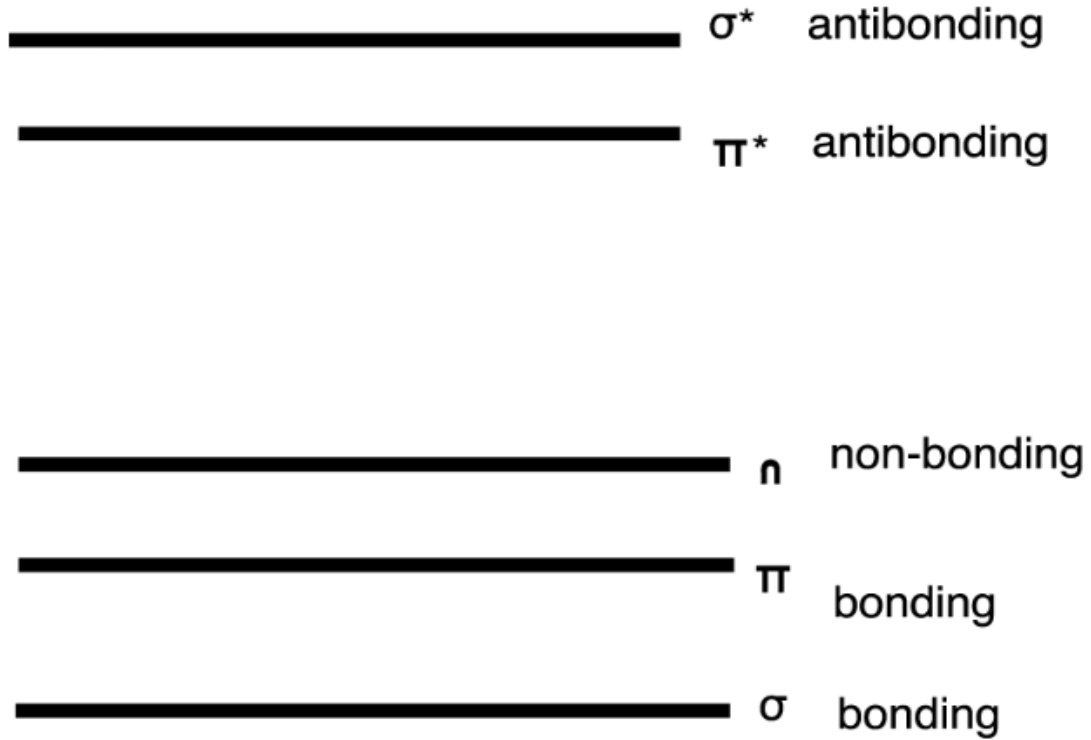
İki atom arasında kimyasal bağ oluştuğunda, atomlardan her biri bağ oluşumuna katılır ve bağ elektronları moleküler orbital adı verilen yeni bir orbitalde yerini alır. Bağ oluşturan iki atomun iki atomik orbitali birleşerek düşük enerjili bir "bonding" moleküler orbital ve aynı zamanda bir de yüksek enerjili "antibonding" moleküler orbital meydana getirir. Sigma (σ) bağı ilk oluşan moleküler bağıdır, iki s orbitali arasında veya s orbitali ile p_x orbitali arasında meydana gelir. Antiparalel konumdadır. Pi (π) bağı, birbirine paralel iki π orbitali arasında meydana gelir. Moleküler orbital teorisine göre her "bonding" σ ve π orbitaline sırasıyla birer "antibonding" σ^* ve π^* orbitali eşlik eder. Kimyasal bağ oluşumuna katılmayan değerlilik elektronları non-bonding ya da "n" elektronlar olarak adlandırılır. Moleküler orbitallerdeki elektron bulutlarının dağılımı **Şekil 5.2'**de görülmektedir. Organik moleküllerde n elektronlar azot, oksijen, kükürt ve halojenlerin atomik orbitallerinde yer alır.

Elektromanyetik radyasyon madde içinden geçerken çeşitli değişimlere neden olur. Madde tarafından absorplanan foton, molekülde elektron geçişlerine, titreşimlere ve dönme hareketlerine neden olur. Absorpsiyona bağlı olarak uyarılmış atom veya moleküllerin elektronları hızla temel enerji düzeylerine dönerlerken, absorpladıkları enerjinin bir kısmını elektromanyetik radyasyon veya ısı şeklinde ortama salıverirler. Organik moleküllerdeki elektron geçişleri; elektromanyetik spektrumun görünür ışık veya ultraviyole bölgesindeki radyasyonun moleküllerdeki σ , π ve n orbitallerinin elektronları tarafından absorpsiyonu sonucunda, elektronların yüksek enerjili antibonding orbitallere (σ^* , π^* n*) geçmesiyle meydana gelir. Moleküler orbitallerin enerji düzeyleri **Şekil 5.3'**de görülmektedir.

Moleküllerdeki atomlar sürekli titreşim halinde olduklarından moleküller statik yapılar değildir. Titreşim frekansı moleküldeki atomların sayısına ve bu atomları birbirine bağlayan bağların gerginliğine bağlıdır. Bazı moleküler titreşimler bütün bir molekül için parmak izi gibi tanımlayıcı bir özellik taşırlarken, diğer titreşimler belli bir fonksiyonel gruba özgüdür. Kırmızı ötesi ve mikrodalga radyasyonu ise, moleküllerin dönme enerjilerini değiştirerek etkisini gösterir.



Şekil 5.2. Bonding ve antibonding moleküler orbitaller



Şekil 5.3. Elektronik moleküler orbitallerin enerji seviyeleri

Spektrofotometri

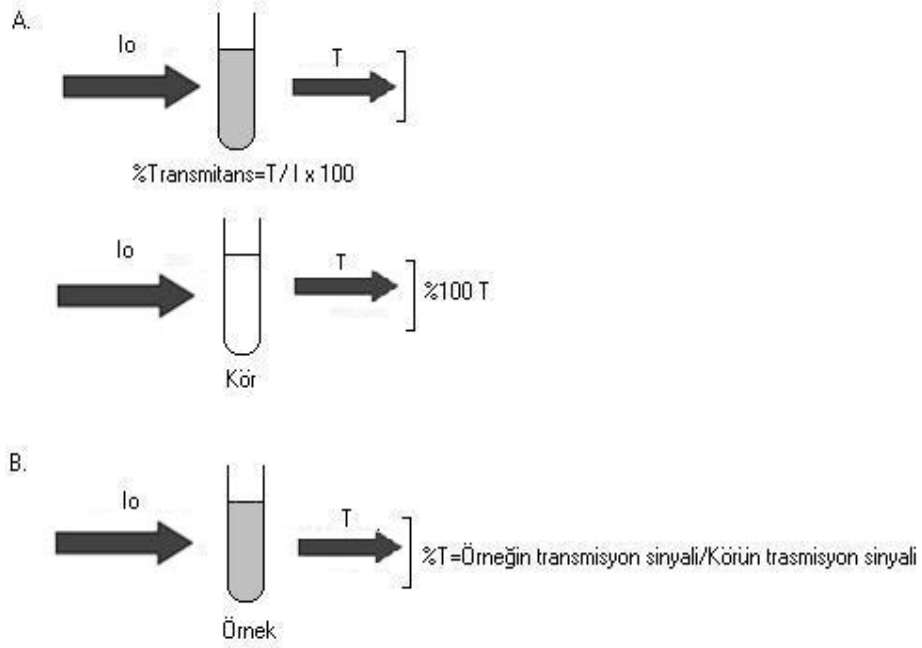
Lambert-Beer eşitliği; ışık şiddeti, konsantrasyon ve ışık yolunun uzunluğu arasındaki matematiksel ilişkiyi açıklar. Eşitlikteki I_0 ve I sırasıyla küvete giren ve küvetten çıkan ışığın şiddetini, T ise ışık geçirgenliği olan transmittansı ifade etmektedir.

$$A = \log(I_0/I) = (1/T) = a b c$$

(a) absorptivite adı verilen oransal bir sabittir. (b) santimetre olarak ışık yolunun uzunluğunu, (c) ise ışığı absorbe eden maddenin konsantrasyonunu göstermektedir. Işığın dalga boyuna ve ışığı absorbe eden maddenin özelliğine bağlı olan absorbansın (A) birimi yoktur. Konsantrasyonun molarite olarak verildiği durumda, (ϵ) molar absorpsiyon katsayısı olarak adlandırılır ve eşitlik $A = \epsilon b c$ şeklinde gösterilir. Bu koşulda (ϵ)'nin biriminin $L/mol.cm$ olduğu eşitlikten hesaplanabilir. Konsantrasyonun mg/mL , %1 olarak verildiği durumda ise, (a) spesifik absorpsiyon katsayısı olarak adlandırılmaktadır.

Çözeltiye gelen monokromatik ışığın bir kısmı çözelti tarafından absorbe edilir, diğer kısmı ise ortamdan serbestçe geçerek dedektör üzerine düşer ve fotoelektrik olay sonucunda elektriksel sinyale dönüşür. Yüzde transmittans (%T); örnekten geçen ışığın enerjisinin, örneğe gelen ışık enerjisine oranının 100 ile çarpımına eşittir. Gelen ışığın tamamının absorbe edildiği durumda %T=0, tamamının geçtiği durumda ise %T=100 değerine eşittir. Absorbans ölçülecek maddeyi içermeyen çözücü (kör, blank tüpünün içeriği) ışık yoluna yerleştirilir. Bu olay sonucunda küvete gelen ışık büyük oranda geçerek dedektöre ulaşır, kısmen de çözücü ve küvet tarafından absorbe edilir. Bu durumda cihazın göstergesi %100 T'a ayarlanır. Işığı absorplayan örneği içeren küvet ışık yoluna yerleştirilerek yeniden transmisyon ölçülür. İki transmisyon

ölçümü arasındaki fark absorbansı ölçülecek maddeden kaynaklanmaktadır. Spektrofotometrelerde örnekten kaynaklanan transmisyon değerinin, körün transmisyon değerine bölünmesiyle elde edilen değer %T değerini verir (Şekil 5.4).



Şekil 5. 4. Yüzde transmittans (% T)

Lambert-Beer kanununun hesaplanması

Lambert-Beer eşitliğinin bulunması aşağıda açıklaması yapılan bir dizi matematiksel hesaplama ile mümkün olmaktadır.

$$-dI / I \propto bdc$$

veya

$$-dI / I = kbdc$$

-dI ile gösterilen ışık transmisionundaki (T) küçük bir azalma, sabit bir ışık yolu uzunluğunda hesaplanan dc konsantrasyonunda bir artışa yol açmaktadır. Oransal bir sabit olan k konsantrasyonu araştırılan maddenin özelliğine bağlıdır. Işık şiddeti ve konsantrasyonla ilgili olarak, limitler arasının integralinin alınması ile işlemlere devam edilir.

$$\int_{I_0}^I -dI / I_0 = kb \int_0^c dc$$

$$-\ln I / I_0 = kbc$$

Yukarıdaki eşitliğin başındaki (-) işaretinden eşitliği, kurtarabilmek için ln'li ifadedeki pay ve payda yer değiştirir

$$\ln I_0/I = kbc$$

Üstteki eşitlikte yer alan e tabanına göre logaritma aşağıdaki şekilde de yazılabilir

$$2.3 \log I_0/I = kbc$$

$$\log I_0/I = k/2.3 b c$$

log I₀/I yerine A, k/2.3 yerine ise a yazılarak Lambert-Beer eşitliği bulunur.

$$A = a b c$$

Lambert-Beer eşitliğinden sapmalar

Absorplayıcı sistemlerin çoğu dilüe çözeltilerde Lambert-Beer kanununa uygunluk gösterir. Bazı sistemlerde ise absorbansla konsantrasyon arasında lineer olmayan bir ilişki görülür. Bu durum Lambert-Beer kanunundan sapma olarak adlandırılır. Absorplayıcı maddenin yüksek konsantrasyonda bulunması absorbe edilen ışığın kırılma indeksinde değişime yol açarak Lambert-Beer'den sapmaya neden olur. Bu yüzden absorplayıcı sistemin 10⁻⁷ ile 10⁻² mol/L arasındaki konsantrasyonları genellikle absorbansla lineer bir ilişki içindedir.

Doğrudan spektrofotometrik yöntem ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Proteinlerin kromoforik amino asit kısımları ultraviyole (UV) bölgesinde absorpsiyon yaparak, spektrofotometrik yöntemle doğrudan protein konsantrasyonunun belirlenmesine olanak sağlar. 280 nm dalga boyundaki UV'de absorpsiyonun ölçülmesine dayanan bu doğrudan yöntem; protein yapısını bozmadan konsantrasyonun bulunmasına olanak sağlamakla birlikte, çok da duyarlı bir yöntem değildir. Yine de az miktarda örnekle çalışıldığında tercih edilen bir yöntemdir. UV'de proteinlerin absorbansının ölçümü büyük ölçüde interferans'dan etkilenir ve konsantrasyonu bulunacak olan proteinin amino asit içeriğinin bilinmesine gereksinim gösterir.

280 nm’de ölçülen absorbansın yüksekliği, proteinin triptofan ve tirozin içeriğine bağlıdır. 1 mg/mL konsantrasyonundaki farklı proteinlerin 280 nm’deki absorbansları büyük oranda farklılıklar göstermektedir; Söz konusu absorbanslar sığır serum albumini ovalbumin, sığır immünglobulini ve yumurta akı lizozimi için sırasıyla 0.63, 0.70, 1.38, 2.65 değerlerine sahiptir. Kas, beyin ve bazı endokrin sistem dokularında bulunan parvalbumin gibi aromatik amino asitleri içermeyen proteinler 280 nm’de çok küçük bir absorpsiyon değerine sahiptir.

260 nm’deki UV ışığında nükleik asitler maksimum absorbans gösterdikleri halde, 280 nm dalga boyunda da kuvvetli absorbans gösterirler. Bu nedenle homojenatların protein konsantrasyonu ölçülürken, ortamdaki DNA ve RNA’nın interferansa neden olmasına bağlı olarak, yüksek protein konsantrasyonları bulunur. Aşağıda verilen eşitlik yardımıyla nükleik asitlerin absorbansı çıkartılarak protein konsantrasyonunun hesaplanmasında düzeltme yapılabilir.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

Spektrofotometrik yöntem ile nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi

Spektrofotometrik yöntemler, 1 µg/mL’nin üzerindeki nükleik asit konsantrasyonlarını belirlemek için çok uygundur. 50 µg / mL konsantrasyonundaki çift zincirli DNA’nın 260 nm’de absorbansı (1)’dir. Tek polinükleotid zincirli nükleik asitler aynı dalga boyunda daha yüksek ekstinksiyon katsayısına sahiptirler. Tek zincirli nükleik asitlerde 260 nm’de (1) değerindeki absorbansı elde etmek için 40 µg / mL (ssDNA), 33 µg / mL (ssRNA) konsantrasyonlarında nükleik asit gereklidir. Bu değerler ortalama baz bileşimindeki nükleik asitler için verilen değerlerdir.

Biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan nükleik asitlerdeki kontaminasyonu belirlemek için 260nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılır. Protein kontaminasyonu içermeyen DNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı 1.8 değerine çok yakındır. Proteinlerin ve izolasyon sırasında kullanılan fenolün varlığında 1.8’in altında, RNA varlığında ise üstünde bir oran elde edilir. Saf RNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı (2)’ye oldukça yakındır.

Spektrofotometrik yöntem ile enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzimler biyolojik materyalde çok düşük konsantrasyonlarda bulduklarından aktivitelerinin ölçülmesi tercih edilir. Enzim aktivitesinin ölçülmesiyle ilgili metotlarda genellikle fotometrik olarak artmış ürün konsantrasyonu, azalmış substrat veya koenzim konsantrasyonu, ya da değişime uğramış koenzim konsantrasyonundaki artış ölçülür. Laboratuarda enzim aktivitesinin ölçülmesi; ortamda fazla miktarda substrat ve koenzim varlığında yani “*sıfırıncı derece kinetikte*” gerçekleşir. Bu durumda enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı doğrudan enzim aktivitesine bağlıdır. NADH, laboratuarlarda en sıklıkla ölçülen koenzimdir. NADH 340 nm’de maksimum absorbans yaptığı halde, NAD bu dalga boyunda absorbans yapmaz. Enzim aktivitesi lineer fazda (ilk 6-8 dakikalık zaman) ölçülürken yöntemde önerilen sabit sıcaklık ve pH değerleri sağlanmalıdır. Spesifik koşullar altında (sabit sıcaklık, pH, substrat, aktivatörler) dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına bir internasional ünite (U) adı verilmektedir. Genellikle U/L olarak ifade edilir. Enzim aktivitesinin SI’deki karşılığı ise katal’dır. Katal saniyede bir mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. $1 \text{ U} \approx 16.7 \text{ nkat}$ ’dir

Biyokimyasal redoks sistemlerinde, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar NAD^+ (NADP^+)’nin ve NADH (NADPH)’in birbirlerine dönüşümü ile gözlemlenebilir. 260 nm dalga boyunda her iki koenzimin de yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları ışığı absorblarken, 340 nm dalga boyunda piridin nükleotid yapısındaki bu koenzimlerin sadece indirgenmiş şekilleri ışığı absorbe eder. NADH’in 340 nm’deki molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$ değerine sahiptir. Absorbans değişikliğini internasional üniteye çevirmek için aşağıdaki formülden yararlanılır.

$$U/L = \mu\text{mol}/\text{dk}/L = \Delta A / \text{min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol}/\text{mol}) / \epsilon \times V_s \times l$$

$\Delta A/\min = \text{Dakikadaki absorbans değişimi}$, $V_t = \text{Toplam reaksiyon hacmi} = \text{Örnek} + \text{Reaktif} + \text{Dilüent}$
 $V_s = \text{Örnek hacmi}$ $\epsilon = \text{ekstinksiyon katsayısı}$

Spektroflorometri

Spektrofotometrede absorbansı ölçülecek çözelti içine giren ışık; çözülden doğrudan geçebildiği gibi, kullanılan ışığın dalga boyuna ve madde konsantrasyonuna bağlı olarak kısmen ya da tamamen absorbe edilebilir. Işığın çözelti tarafından absorpsiyonu ile birlikte ortamdaki moleküllere enerji transfer edilir. Foton (kuantum) enerjisinin moleküldeki π elektronları tarafından absorpsiyonu ile birlikte, molekülde titreşim, dönme veya floresans gibi enerji değişimleri meydana gelir. Normal durumdaki, diğer bir deyişle temel enerji düzeyindeki moleküllerde elektronlar zıt spinlidir. Singlet durum adı da verilen zıt spinli durumda elektronlar en düşük vibrasyon (titreşim) düzeylerinden birinde bulunur. Foton enerjisinin moleküldeki π elektronları tarafından absorpsiyonu ile birlikte π elektronu daha yüksek bir vibrasyonel enerji seviyelerinden birine uyarılma (eksitasyon) sonucunda sıçrar. Uyarılmış bu yüksek enerjili elektron fazla enerjisini diğer moleküller ile çarpışarak ya da kendi titreşim ve dönme hareketleri ile dışarı vererek düşük titreşim düzeyli temel enerji düzeyine döner. Temel enerji düzeyindeki elektronu uyarabilmek için gerekli enerji, bu enerji düzeyindeki elektronun enerjisinden daha yüksektir. Uyarılmış durumdaki elektron 10^{-9} veya 10^{-5} saniye içinde emisyon adı verilen bir olayla foton enerjisi salıvererek temel enerji düzeyinde bulunan düşük titreşimli enerji düzeylerden birine döner. Bu emisyonla floresans adı verilmektedir. Floresans olayı ile dışarı verilen foton enerjisi uyarılma için gerekli olana göre daha düşüktür ve dolayısıyla daha uzun dalga boyunda bir ışın ortama salınır. Çift bağ ya da konjuge çift bağ içeren moleküller ortama floresans verme özelliğindedir. Uyarılma ve emisyonun maksimum dalga boyları arasındaki farka Stokes kayması adı verilir. Her molekül için spesifik bir uyarılma ve emisyon dalga boyu vardır.

Belirli konsantrasyondaki standartlar ve rölatif floresansları arasında standart bir eğri çizilerek, örneğin vermiş olduğu floresanstan konsantrasyonu hesaplanabilir. Floresans özelliği gösteren bileşiğin artan konsantrasyondaki standartları ile floresans şiddeti arasında doğru bir orantı vardır. Lineerite korunduğu sürece tek bir standart kullanılarak örneğin floresansından konsantrasyonu aşağıda verilen eşitlikle hesaplanabilir.

$\text{Örneğin floresansı} / \text{İnternal standartın floresansı} = \text{Örneğin konsantrasyonu} / \text{İnternal standartın konsantrasyonu}$

Floresans şiddeti konsantrasyon dışında pH, sıcaklık, viskozite ve diğer bileşiklerin interferanslarından etkilenir.

Sorular ve cevapları:

Soru 1: 550 nm dalga boyundaki ışığın frekansını ve bu dalga boyundaki bir fotonun enerjisini volt olarak hesaplayınız. $c = 3 \times 10^8 \text{ m/sn}$, $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J. Sn}$.

Cevap: $1 \text{ m} = 10^9 \text{ nm} \rightarrow 550 \text{ nm} = 5.5 \times 10^{-7} \text{ m}$

$\nu = c / \lambda = 3 \times 10^8 / 5.5 \times 10^{-7} = 5.45 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$

$E = h \nu = 6.62 \times 10^{-34} \times 5.45 \times 10^{14} = 3.62 \cdot 10^{-19} \text{ J/foton}$

Bir elektronun yükü = Faraday sabiti (F) / Avogadro sayısı (N)

$1.602 \times 10^{-19} \text{ J V}^{-1} = 9.6485 \times 10^4 \text{ J V}^{-1} / 6.023 \times 10^{23} \text{ foton/mol}$

$3.62 \cdot 10^{-19} \text{ J/foton} / 1.602 \times 10^{-19} \text{ J V}^{-1} = 2.260 \text{ V}$

Soru 2: 5 g/L konsantrasyonundaki ışığı absorbe etme özelliğindeki, molekül ağırlığı 410 mol/g olan A maddesini içeren çözelti, 2 cm ışık yolu uzunluğundaki küvete konuluyor. Küvet spektrofotometreye yerleştirildiğinde λ dalga boyundaki ışığın çözeltiden geçmesi sağlanıyor. Spektrofotometrede okunan transmisyon değeri %80 olarak kaydediliyor. Çözeltinin absorbansını ve A maddesinin molar ekstinksiyon katsayısını hesaplayınız.

Cevap: Transmisyon (T)=%80=100 x I_t / I_0

I_0 =%100 olduğuna göre, I_t =%80 olarak ifade edilebilir

$$I_t / I_0 = 80 / 100 = 0.8$$

$$\text{Absorbans} = A = \log(1 / T) = \log(1 / 0.8) = \log(1.25) = 0.0969$$

$$A = \epsilon \times l \times c = \epsilon \times 2 \times 5 \text{ eşitliğinden,}$$

ekstinksiyon katsayısı,

$$\epsilon = 0.0969 / 10 = 9.69 \times 10^{-3} \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1} \text{ olarak hesaplanır.}$$

Ekstinksiyon katsayısı genel olarak molar ekstinksiyon katsayısı olarak ifade edilir.

Bu nedenle,

$$\epsilon_m = \epsilon \times 410 = 9.69 \times 10^{-3} \times 410 = 3.973 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1} \text{ olarak hesaplanabilir.}$$

Soru 3: ATP çözeltisinin absorbansı 1 cm'lik küvette, 0,17 olarak okunuyor. ATP'nin molar ekstinksiyon katsayısı $1.54 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$ olduğuna göre, ATP çözeltisinin konsantrasyonunu, 1 cm'lik küvetten geçen ışığın transmisyonunu, ve 4 cm'lik küvetteki $2.5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ 'lık çözeltinin absorbansını hesaplayınız.

Cevap: Lambert-Beer kanunundan yararlanılarak konsantrasyon hesaplanabilir.

$$A = \log(I_0 / I_t) = \epsilon_\lambda \times c \times l$$

$$0.17 = 1.54 \times 10^4 \times c \times 1$$

$$c = [\text{ATP}] = 0.17 / 1.54 \times 10^4 \times 1 = 1.104 \times 10^{-5} \text{ mol / L}$$

$$A = \log(I_0 / I_t) = \log(1/T)$$

$$0.17 = \log(1/T)$$

$$1/T = \text{antilog}(0.17) = 1.4791$$

$$T = 0.676 \text{ veya } \%67.6$$

Verilen konsantrasyonu mol/L'ye (M) çevirmemiz gerekir.

$$2.5 \times 10^{-2} \text{ mM} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$A = 1.54 \times 10^4 (\text{mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}) \times 2.5 \times 10^{-5} (\text{mol/L}) \times 4 (\text{cm}) = 1.54$$

Birimler birbirini götürdüğünden absorbansın biriminin olmadığı görülmektedir.

Soru 4: Biyokimyasal redoks sistemlerinde, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar NAD^+ (NADP^+)'nin ve NADH (NADPH)'ın birbirlerine dönüşümü ile gözlemlenebilir. 260 nm dalga boyunda her iki koenzimin yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları ışığı absorblarken, 340 nm dalga boyunda koenzimlerin sadece indirgenmiş formları ultraviyole ışığını absorbe eder. 1 cm'lik küvette NAD^+ ve NADH 'ı birlikte içeren bir örneğe ilişkin veriler aşağıda verilmiştir, NAD ve NADH konsantrasyonlarını hesaplayınız.

260 nm'de NADH ve NAD^+ için molar ekstinksiyon katsayıları ($\text{mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$) sırasıyla, 1.5×10^4 ve 1.84×10^4 tür.

340 nm'de sadece ortamdaki NADH ışığı absorblar $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \times \text{L} \times \text{cm}^{-1}$.

Nukleotid karışımını içeren çözeltinin absorbansları 260 nm'de 1.362, 340 nm'de ise 0.382 olarak saptanmıştır.

Cevap: 340 nm'de karışımın verdiği absorbansın tümü NADH kaynaklıdır.

$$A_{\text{NADH}} = \epsilon \times l \times c$$

$$0.382 = 6.22 \times 10^3 \times 1 \times c$$

$$c = [\text{NADH}] = 0.382 / 6.22 \times 10^3 \times 1 = 6.141 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

NADH'in 260 nm'deki konsantrasyonu değişmez, diğer taraftan bu dalga boyunda NAD⁺ 'de ışığı absorblar.

$$A_{\text{NADH}} = 1.5 \times 10^4 \times 6.141 \times 10^{-5} \times 1 \\ = 0.9212$$

260 nm'de NAD⁺ ve NADH için toplam absorbans deneysel olarak $A_t = 1.362$ gözlemlenmişti . Buradan,

$$A_{\text{NAD}^+} = A_t - A_{\text{NADH}} (260 \text{ nm}) \\ = 1.362 - 0.9212 \\ = 0.4408$$

Buradan okside formun konsantrasyonu Lambert-Beer kanunundan hesaplanabilir.

$$c = [\text{NAD}^+] = 0.4408 / 1.84 \times 10^4 \times 1 = 2.40 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Soru 5: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi Mg²⁺ ve NADP⁺ varlığında glukoz-6-fosfat'ın, 6-fosfoglukonik asid- δ-laktone dönüşümünü katalizler.

Glukoz 6-fosfat içeren 1 mL'lik örnek üzerine, fazla miktarda NADP⁺ ve MgCl₂ içeren çözeltiliden 1 mL pipetlenir. 1 cm'lik küvette 340 nm'de absorbans değişimi, glukoz-6-fosfatın tamamının tüketilmesi ile 0.61 değerine ulaşır. Örnekteki Glukoz-6-fosfat konsantrasyonunu hesaplayınız. NADPH için 340 nm'de molar ekstinksiyon katsayısı, 6.22 x 10³ mol⁻¹L cm⁻¹ değerine sahiptir

Cevap: Fazla miktarda koenzimin varlığında reaksiyon, ürünlerin oluşumu yönünde, yani sağa doğru ilerler. 340 nm'de maksimum absorbans veren NADPH'in son konsantrasyonunun hesaplanması stokiyometrik olarak Glukoz-6-fosfat'ın tüketimiyle ilişkilidir.

$$A = \epsilon \times l \times c$$

$$0.61 = 6.22 \times 10^3 \times 1 \times c$$

$$c = 0.61 / 6.22 \times 10^3 \times 1 = 98.07 \text{ mol/L}$$

Orijinal konsantrasyonu hesaplamak için çıkan sonucu dilüsyon faktörünü göz önüne alarak 2 ile çarpmamız gerekir.

$$C_{\text{ori}} = 196.14 \text{ mol/L}$$

Soru 6: 1 molarlık bilirubin standartı önce 1:60700 ve daha sonra 1:2 oranında sulandırdığımızda son dilüsyonu 1/121400 olur. 1 cm'lik küvette final dilüsyondaki bilirubin standartının absorbansı 0.495 okunduğuna göre, bilirubin standartının molar ekstinksiyon katsayısını hesaplayınız.

$$\text{Cevap: } \epsilon = 0.495 (121400) / 1 \text{ mol/L (1cm)} = 60093 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Soru 7: B ve C biyokimyasallarını içeren bir karışımın 1 cm'lik küvette, 460 ve 500 nm dalga boylarındaki absorbansları sırasıyla 0.63 ve 0.52 olarak okunmuştur. 460 nm'de B'nin molar absorbansı 1.03 x 10³, C'nin 4.57 x 10³, 500 nm'de ise B için 7.12 x 10³, C için 1.43 x 10³ olarak verilmektedir. Absorbans değerlerinin toplanabilir olduğunu göz önüne alarak B ve C maddelerinin konsantrasyonlarını hesaplayınız.

$$\text{Cevap: } 0.63 = 1.03 \times 10^3 \times 1 \times [\text{B}] + 4.57 \times 10^3 \times 1 \times [\text{C}] (460 \text{ nm})$$

$$0.52 = 7.12 \times 10^3 \times 1 \times [\text{B}] + 1.43 \times 10^3 \times 1 \times [\text{C}] (500 \text{ nm})$$

Eşitliklerin sağ tarafındaki 10³ ler sadeleştirildiğinde eşitlikler aşağıdaki gibi yazılarak iki bilinmeyenli bir denklem sistemi elde edilir.

$$0.63 = 1.03 \times [\text{B}] + 4.57 \times [\text{C}]$$

$$0.52 = 7.12 \times [\text{B}] + 1.43 \times [\text{C}]$$

Üstteki denklem -7.12, alttaki 1 ile çarpılarak denklem sistemindeki bilinmeyen sayısı bire indirilir ve [C] hesaplanır.

$$-7.12 / 0.63 = 1.03 \times [B] + 4.57 \times [C]$$

$$1 / 0.52 = 7.12 \times [B] + 1.43 \times [C]$$

$$-4.49 = -7.33 [B] - 32.54 [C]$$

$$0.54 = 7.33 [B] + 1.47 [C]$$

$$-31.07[C] = -3.95 \rightarrow [C] = 0.125 \text{ mM}$$

Bulunan [C] değeri yukarıdaki denklemlerden birinde yerine konularak

$$[B] = 0.125 \text{ mM} \text{ olarak bulunur.}$$

Soru 8: Kabaca bir yaklaşımla 1 mg/mL'lik bir protein çözeltisinin 280 nm'deki absorbanasının 1 absorban üitesi kadar olduğu söylenebilir. Eğer deney absorbanı 280 nm'de 2.0'dan yüksekse çalıştığımız protein çözeltisini dilüe etmemiz gerekir. Saflaştırılmış bir protein çözeltisinin 0.2 mL'si 1 cm ışık yoluna sahip bir kuvet içerisinde 1mL'ye dilüe ediliyor. Spektrofotometredeki absorban değeri 0.75 olarak okunduğuna göre protein konsantrasyonunu hesaplayınız.

Cevap: Dilüe örnekteki protein miktarı = 0.75 Ab. x 1 mg/mL / 1 Ab. = 0.75 mg/mL

$$\text{Orijinal örnekteki protein miktarı} = 1 \text{ mL} \times 0.75 \text{ mg/mL} / 0.2 \text{ mL} = 3.75 \text{ mg/mL}$$

Soru 9: Nükleik asitler 260 nm'de maksimum absorban verdikleri gibi, 280 nm'de de yüksek absorban verirler. Nükleik asitleri içeren saflaştırılmamış protein ekstralarında protein konsantrasyonu, 260 nm'deki düzeltme faktörü göz önüne alınmadığı takdirde hatalı bir şekilde yüksek olarak hesaplanır. Bu ilişki aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

Araştırmacı 10 µL ekstraktı 1cm ışık yoluna sahip kuartz kuvette tampon çözeltiyle 1 mL son hacme tamamlıyor, 260 nm'de spektrofotometreyi tampona karşı sıfırladıktan sonra ekstranın A₂₆₀ değerini 0.075 olarak okuyor. Aynı işlemi A₂₈₀ için tekrarladığında absorbanı 0.25 olarak okuyor. Protein ekstradaki yaklaşık protein konsantrasyonunu hesaplayınız.

$$\text{Cevap: mg/mL} = (1.55 \times 0.25) - (0.76 \times 0.075) = 0.39 - 0.06 = 0.33 \text{ mg/mL}$$

Bir mL kuvetteki yaklaşık protein konsantrasyonu 0.33 mg/mL'dir. 10 µL ekstraktı 1000'ye tamamlamakla örneği 1000 µL / 10 µL = 100 kez dilüe etmiş olduğundan, sonuç 33 mg/mL olarak hesaplanır.

Soru 10: Standart koşullar altında bir µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına 1 internasyonal üite (U) adı verilmektedir. Absorban değişikliğini internasyonal üiteye çevirmek için aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$U/L = \mu\text{mol/dk/L} = \Delta A / \text{min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol/mol}) / \epsilon \times V_s \times l$$

$$\Delta A / \text{min} = \text{Dakikadaki absorban değişimi}$$

$$V_t = \text{Toplam reaksiyon hacmi} = \text{Örnek} + \text{Reaktif} + \text{Dilüent}$$

$$V_s = \text{Örnek hacmi}$$

ϵ = ekstinksiyon katsayısı

10^6 µmol/mol faktörü sonucu µmo/dk/L cinsinden hesaplayabilmek için gereklidir.

Alkalin fosfataz aktivitesini belirlediğimiz serum örneğinden elde edilen değerler aşağıdaki gibidir. Enzim aktivitesini hesaplayınız.

$$\Delta A = 0.070$$

$$\epsilon (\text{p-nitrofenol}) = 50,000 \text{ L / mol} \cdot \text{cm}$$

$$t = 15 \text{ dk}$$

$$V_t = 5.5 \text{ mL}$$

$$V_s = 0,005 \text{ mL}$$

Cevap: $U/L = 0.070 (10^6 \mu\text{mol/mol}) (5.5 \text{ mL}) / 15 \text{ dk} (50,000 \text{ L} / \text{mol} \cdot \text{cm}) (0.005 \text{ mL}) (1\text{cm})$
 $U/L = 0.070 \times 5.5 \times 1000 / 50 \times 0.075 = 103 \text{ U/L}$

Soru 11: Enzim reaksiyonu sonucu dakikada meydana gelen absobans değişimi $\Delta A=0.250$ ölçülmüştür. Reaksiyon sonucu oluşan ürünün 425 nm 'de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ deki molar absorbtivitesi 12.2×10^3 olarak verilmektedir. Enzim aktivitesi ölçülürken ortamın sıcaklığı $30 \text{ }^\circ\text{C}$ de korunmuştur. Deneyde 1 mL reaktif, 0.050 mL örnek kullanıldığına göre enzim aktivitesini internasyonal ünite olarak hesaplayınız.

Cevap: $c = (0.250) (10^6) (1.050 \text{ mL}) / (12.2 \times 10^3) (0.050 \text{ mL}) (1\text{cm}) = 615 \text{ U}$

Soru 12: Laboratuar teknisyeni 10 mg/mL konsantrasyonunda 50 mL NADH (MW=663.44) çözeltisi hazırlamayı istemektedir. Bu çözeltiyi doğru olarak hazırlayabilmek için 50 mg/mL konsantrasyonunda stok bir çözelti hazırlaması gerekmektedir. Stok çözeltinin 1: 1000 oranında dilüe edilmesiyle elde edilen çözeltinin 340 nm dalga boyundaki absorbans ölçülerek ve $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.22 \times 10^3$ kullanılarak aktüel konsantrasyon hesaplanır. Bu prosedürü izleyen teknisyen absorbans 0.562 olarak okuyor. Stok çözeltideki NADH konsantrasyonunu mmol/L ve mg/L olarak hesaplayınız. 10 mg/mL 'lik NADH çözeltisi hazırlamak için hangi oranda bir dilüsyon yapmak gereklidir.

Cevap: Absorbans=0.562 x dilüsyon faktörü (1:1000)=562

$$562 = 6.22 \times 10^3 \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = 0.09035 \text{ mol/L} = 90.35 \text{ mmol/L}$$

$$663440 \text{ mg} \times 0.09035 / 1 \text{ mol} = 59942 \text{ mg /L}$$

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

$$50 \text{ mL} \times 10 \text{ mg/mL} = V_2 \times 59942 \text{ mg/mL}$$

$$V_2 = 0.00834 \text{ mL} (8.34 \mu\text{L}) \text{ alınır, } 50 \text{ mL}'\text{ye tamamlanır ve } 10 \text{ mg/mL}'\text{lik çözelti elde edilir.}$$

Soru 13: Biyolojik bir kaynak'tan saflaştırılan nükleik asitlerdeki protein kontaminasyonu hakkında bir fikir elde edebilmek için 260 nm 'deki absorbansın, 280 nm 'deki absorbansa oranına bakılır. Protein kontaminasyonu içermeyen saf DNA örneklerinde A_{260} / A_{280} oranı 1.8 civarındadır. Ortamda protein ya da fenol kontaminasyonu varsa bu oran 1.8'in altında, RNA varlığında ise 1.8'in üstündedir. Saflaştırılmış RNA içeren örneklerde A_{260} / A_{280} oranı 2.0 değerine çok yakındır. 260 nm 'de $2 \mu\text{g/mL}$ kadar düşük DNA konsantrasyonları tespit edilebilir. Çift zincirli DNA'da 1 absorbans birimi (A_{260}) $50 \mu\text{g DNA} / \text{mL}$ değerine karşılık gelmektedir. $50 \mu\text{L}$ 'lik DNA süspansiyonunun $20 \mu\text{L}$ 'si distile su ile $1000 \mu\text{L}$ son hacme tamamlanıyor. Dilüe örneğe ait absorbans değerleri $A_{260} = 0.550$ ve $A_{280} = 0.324$ olarak saptanıyor.

a) $50 \mu\text{L}$ 'lik DNA süspansiyonundaki DNA konsantrasyonunu hesaplayınız

b) A_{260} / A_{280} oranını bulunuz.

Cevap: a) DNA (mL) = $0.550 A \times 50 \mu\text{g DNA} / \text{mL} / 1 A = 27.5 \mu\text{g DNA} / \text{mL}$

$$\text{DNA} (50 \mu\text{L}) = 50 \mu\text{L} \times 27.5 \mu\text{g} / 20 \mu\text{L} = 68.75 \mu\text{g DNA}$$

$$\text{b) } A_{260} / A_{280} = 0.550 / 0.324 = 1.697$$

Soru 14: Domuz kalp dokusundan hazırlanan doku homojenatında ilk basamak aspartat aminotransferazın (AST) hazırlanmasıdır. Hücre kalıntılarının filtrasyonla, nükleik asitlerin ise polietilenimin muamelesi ile uzaklaştırılması sonucunda 2 L hacminde total ekstre elde edilir (Solüsyon A). Bu ekstrenin $50 \mu\text{L}$ 'lik bir kısmı 1 cm ışık yoluna sahip küvete aktarıldıktan sonra üzerine 3 mL tampon eklenir. Örneğin absorbansı 280 nm dalga boyunda 1.7 olarak okunduğuna göre;

- Ekstrenin protein konsantrasyonunu hesaplayınız.
- Bir ünite AST; 260 nm dalga boyunda, dakikada, 3 mL substrat çözeltisi içinde, 0.1 absorbans değişimine yol açan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 100 µL ekstrenin üzerine 3 mL substrat çözeltisi ilave edilir, absorbans değişimi 0.08 dk⁻¹ olarak kaydedilir. Ekstrenin 1 mL'indeki enzim ünitesini ve ekstredeki toplam enzim ünitesini hesaplayınız.
- Enzimin spesifik aktivitesini (Ünite / mg protein) hesaplayınız.

Cevap:

- 1 mg/mL'lik protein çözeltisinin, 1 cm ışık yoluna sahip küvette, 280 nm'deki absorbansının 1 olduğunu kabul edersek; küvetteki protein konsantrasyonu 1.7 mg/mL olarak bulunur. 50 µL örnek üzerine 3 mL (3000 µL) tampon eklendiğine göre örneğimiz 3050/50=61 kez dilüe olmuştur.
Çözelti A'nın protein konsantrasyonu= 1.7 mg/mL x 61 = 104 mg/mL
Çözelti A daki total protein miktarı = 104 mg/mL x 2000 mL = 208000 mg
- 1 Ünite enzim dakikada 0.1 absorbans değişimine yol açtığına göre
Küvetteki enzim ünitesi= 0.08 / 0.1=0.8
0.8 enzim ünitesi küvete pipetlenen 100 µL ekstreten gelmektedir.
1 mL ekstrede= 8.0 U
2000 mL ekstraktta= 2000 x 8.0 =16000 U bulunur.
- Spesifik aktivite= 8.0 U / 1,7 mg/mL = 4.72 U/mg protein

Soru 15: M metaboliti beyin omurilik sıvısından (BOS) izole ediliyor $\lambda=280$ nm'deki eksitasyonu takiben $\lambda=360$ nm'de emisyon veriyor.

- Metabolit'in içinde çözündüğü tamponla cihazın skalası sıfırlanır. Daha sonra 100 ng/dL'lik saf haldeki M standartı ile floresans skala'da %100'e ayarlanır.
- M metaboliti dışındaki bileşenleri içeren kör çözeltisinin toplam floresansı %11.2 olarak okunuyor.
- M metabolitini içeren ekstrenin floresansı %67 olarak okunuyor.
- Saf haldeki M metabolitin ekstrete katılmasıyla hazırlanan internal standartın konsantrasyonu 1 µg / L (100 ng/dL), floresansı %92'dir.

BOS örneğindeki M metabolitinin konsantrasyonunu µg / L olarak hesaplayınız.
Stokes kayması ne kadardır?

Cevap: Örneğin floresansı / İnternal standartın net floresansı=Örneğin konsantrasyonu/İnternal standartın konsantrasyonu

$$I_{\text{standart}} = \%100$$

$$I_{\text{kör}} = \%11.2$$

$$I_{\text{toplam}} = \%67$$

$$I_{\text{internal st}} = \%92$$

$$I_{\text{örnek}} = I_{\text{toplam}} - I_{\text{kör}} = 67 - 11.2 = \%55.8$$

$$I_{\text{net internal}} = I_{\text{internal st}} - I_{\text{toplam}} = 92 - 67 = \%25$$

$$55.8 / 25 = \text{Örneğin konsantrasyonu} / 1 \mu\text{g} / \text{L}$$

$$\text{Örneğin konsantrasyonu} = 55.8 / 25 = 2.34 \mu\text{g} / \text{L}$$

$$\text{Stokes kayması} = \lambda_2 - \lambda_1 = 360 - 280 = 80 \text{ nm}$$

STANDART EĞRİDEN YARARLANILARAK YAPILAN KONSANTRASYON HESAPLAMALARI

Genel prensipler

Beer kanununa uyan yöntemlerde; analiz boyunca ışık yolu uzunluğu ve ışığı absorbe eden reaksiyon ürününün molar absorptivitesi değişmediği sürece, absorbans konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Laboratuvar otomasyon sistemlerinde Beer kanununa uygunluğun kontrol edilmesi; test yönteminin doğrusallığının geniş bir konsantrasyon aralığı boyunca sıklıkla denetlenmesi esasına dayanır. Manuel çalışmalarda konsantrasyon sonuçları standart grafik olarak da bilinen, Beer kanunu grafiği kullanılarak hesaplanabilir. Grafik belirli konsantrasyondaki standartlara karşılık gelen absorbans değerlerinden yararlanılarak çizilir. Pekçok spektrofotometrik deneyde reaktif körü kullanılarak başlangıç absorbansı sıfıra (0) ayarlandığından, grafiğin başlangıç noktası sıfırdır. Yatay eksen x eksenini, dikey eksen ise y eksenini ifade eder. Genellikle x ekseninde konsantrasyonlar, y ekseninde ise ilgili absorbans değerleri bulunur. Standart grafikte ise sadece standart konsantrasyonları ve ilgili absorbanslar yer alır(*Şekil 6.1*).

Sorular ve cevapları

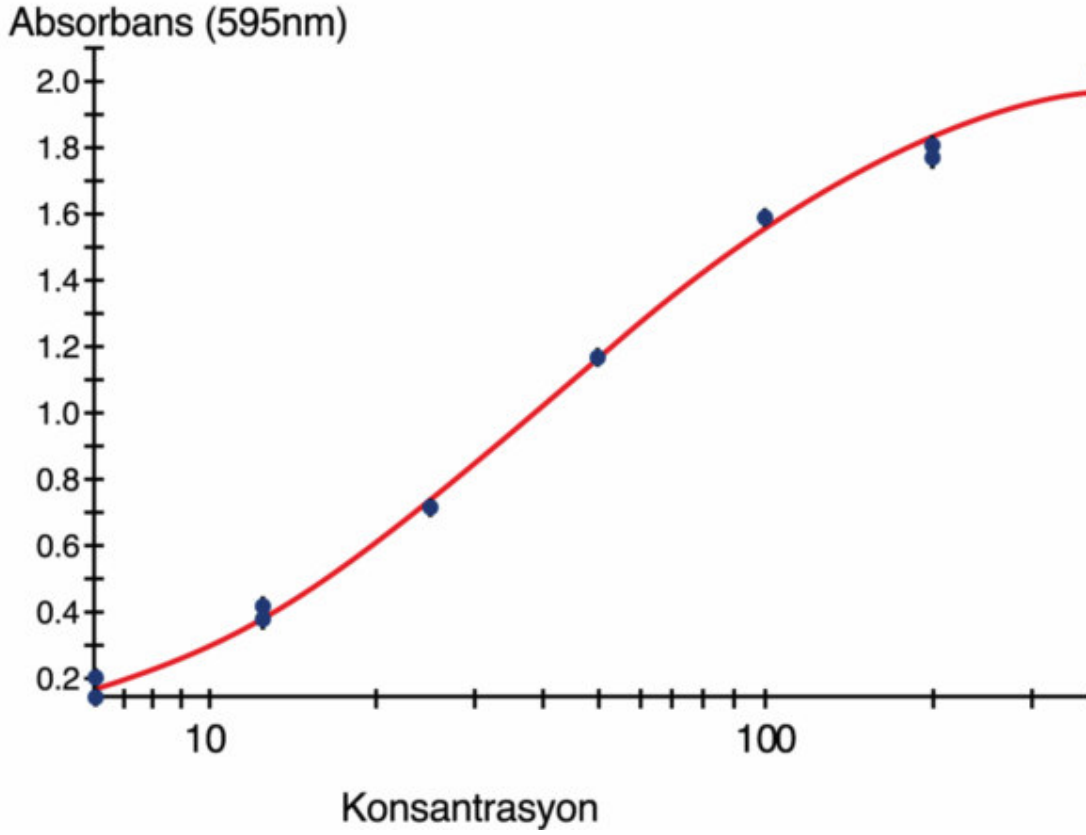
0.1 mL tampon çözeltisi içinde 10-100 µg arasında sığır serum albumini (BSA) içeren bir seri standart çözelti hazırlanır. Her tüpe 5'er mL Bradford boya reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra, standartlar 2 dakika süreyle karanlıkta bekletilir ve absorbansları 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki gibi bulunur.

Tablo 6.1: BSA standartları ve 595 nm'deki absorbansları

mg BSA	A_{595}
10	0.11
20	0.21
30	0.30
40	0.39
50	0.48
60	0.58
75	0.71
100	0.88

Soru1: Konsantrasyonu bilinmeyen saflaştırılmış proteinin 2 µL'si son hacim 100 µL olacak şekilde dilüe ediliyor ve protein standartlarında olduğu gibi Bradford reaktifi ile reaksiyona sokuluyor. 595 nm'deki absorbansı 0.44 olarak okunuyor. Orijinal örnekteki protein miktarını mg/mL olarak bulunuz.

Cevap: *Tablo 6.1*'deki verilerden yararlanılarak standart bir eğri çizilir (*Şekil 6.1*). y eksenindeki 0.44 absorbans değeri x eksenindeki 46 µg değerine karşılık gelmektedir. 46 µg proteinin 2 µL örnek içinde temsil edildiği düşünülebilir. Buradan aşağıdaki hesaplamalar yoluyla mg/mL olarak protein miktarı hesaplanabilir.



Şekil 6.1. BSA standartları ve 595 nm'deki absorbansları

$$(46 \mu\text{g} \cdot 1000 \mu\text{L}) / 2 = 23000 \mu\text{g/mL} = 23 \text{ mg/mL}$$

Soru 2: Serum protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan biüret yöntemi oldukça stabil olup, Lambert-Beer kanununa uygunluk gösterir. Çok sayıda standart çalışıp lineer bir standart eğri oluşturmak yerine, 6 g/dL'lik tek bir standart çalışılıyor ve standart'ın absorbansı spektrofotometrede 0.400 olarak okunuyor. Serum örneğinin, biüret reaksiyonunu takiben spektrofotometrede okunan absorbansı 0.350 olduğuna göre örnekteki protein konsantrasyonunu hesaplayınız.

Cevap: Standart konsantrasyonu (C_s) / Standart absorbansı (A_s) = Örnek konsantrasyonu (C_u) / Örnek Absorbansı (A_u)

$$C_u = (0.350) (6 \text{ g/dL}) / (0.400) = 5.25 \text{ g/dL}$$

Cihaz, ya da reaktifin lot numarası gibi sistem unsurları değişmedikçe bu tip hesaplamalar kabul edilebilir bir özellik taşır. Herhangi bir sistem değişikliğinde ise mutlaka yeni bir standart eğri oluşturulmalıdır.

Soru 3: Örneklerdeki AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) konsantrasyonunu hesaplayabilmek için molekül ağırlığı 281.69 g/mol olan Kloramin-T kullanılarak aşağıdaki tabloda görülen standartların her birinden 1000 mL stok çözelti hazırlanıyor. Stok çözeltiler son hacmi 10 mL olacak şekilde 1/100 oranında dilüe edildikten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede okunuyor. Standartların stok ve 1/100 oranındaki dilüe çözeltilerinde bulunan Kloramin-T konsantrasyonunu hesaplayınız

Tablo 6.2: Kloramin-T standartları ve 340 nm'deki absorbansları

Kloramin-T ($\mu\text{mol/L}$)	Absorbans
15	0.144
30	0.449
40	0.555
55	0.850
70	0.880
85	1.183
100	1.280

Cevap: $281.69 \text{ g/mol} = 281690 \text{ mg} / 10^6 \mu\text{mol}$

$$15 \mu\text{mol/L} = 15 \times 281690 / 10^6 = 4.23 \text{ mg/L}$$

4.23 mg tartmak için çok küçük bir miktar olduğundan 423 mg tartılarak 1 litreye tamamlanır ve böylelikle 100 kez konsantre 1500 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda bir çözelti hazırlanır.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1500 \mu\text{mol/L} \times V_1 = 15 \mu\text{mol/L} \times 10 \text{ mL}$$

$V_1 = 0.1 \text{ mL}$ stok çözeltilerden alınır, 10 mL son hacme deiyonize su ile tamamlanır. Böylelikle stok çözelti 1/100 oranında dilüe edilmiş olur.

0.1 mL çözelti içindeki madde miktarı 10 mL son hacim içerisinde temsil edildiğinden.

$$1/100 \text{ dilüe çözeltilerdeki madde miktarı } (15 \mu\text{mol/L}) = 0.1 \times 423 / 1000 = 0.0423 \text{ mg}$$

Diğer standartlar için de aynı yolla hesaplama yapılarak aşağıdaki değerler bulunur.

Tablo 6.3: Stok ve dilüe edilmiş Kloramin-T çözeltilerinin konsantrasyonları

Stok (mg/L)	1/100 dilüe (mg/10 mL)
423	0.0423
845	0.0845
1127	0.1127
1549	0.1549
1922	0.1922
2395	0.2395
2817	0.2817

Soru 4: 6250 U/ mL aktivitesindeki SOD (Süperoksid dismutaz) standartından 20 μL alınarak üzerine 1.98 mL dilüsyon tamponu ilave ediliyor. Elde edilen bu SOD stok solüsyonundan A'dan G'ye kadar sıralanan 7 tüpe aşağıdaki tabloda görülen hacimlerde pipetlendikten sonra, üzerine dilüsyon tamponu ilave ediliyor. Tüplerin her birinin içindeki SOD aktivitesini hesaplayınız. (Süperoksid radikalini %50 oranında dismutasyona uğratan enzim miktarı 1 SOD ünitesi olarak tanımlanmaktadır).

Tablo 6.4: Standart eğriyi oluşturmak üzere SOD standartlarının hazırlanışı

Tüp	SOD stok solüsyonu (μL)	Dilüsyon tamponu (μL)	SOD aktivitesi (U/mL)
A	0	1000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

Cevap:

SOD standardı ($20 \mu\text{L}$) = $(20 \mu\text{L} \times 6250 \text{ Ünite}) / 1000 \mu\text{L} = 125 \text{ Ünite}$

SOD standartının dilüsyon oranı = $20 \mu\text{L} / 1980 \mu\text{L} = 1 / 100$

125 U 100 kez dilüe edildiği için

SOD stok çözeltisinin aktivitesi = $125 / 100 = 1.25 \text{ U}$ olarak bulunur

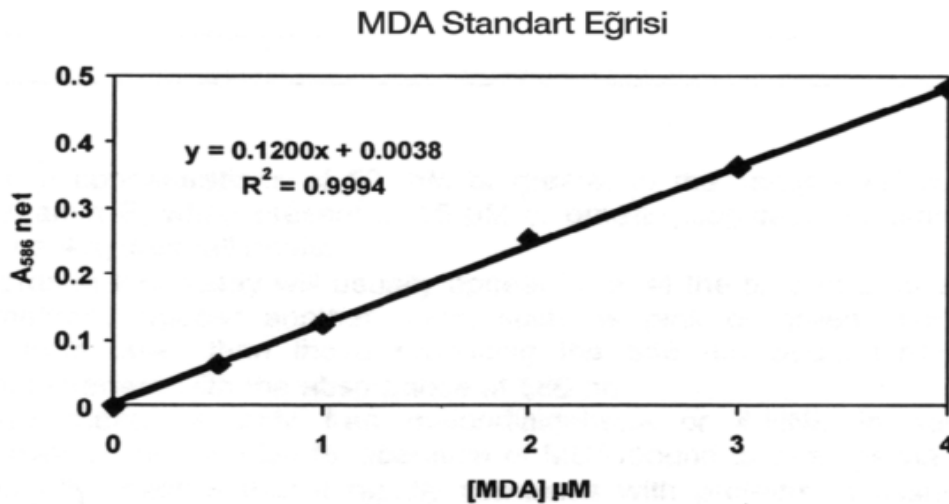
A tüpündeki son SOD aktivitesi, $20 / 980 = 1 / 50$ dilüsyona karşılık gelir

Aktivitenin dilüsyon oranına bölünmesiyle, A tüpündeki final SOD aktivitesi

$1.25 / 50 = 0.025 \text{ U/mL}$ değerine eşittir.

SOD stok çözeltisinden pipetlenen miktarlar birbirinin katı şeklinde olduğundan, diğer tüplerdeki SOD aktiviteleri kolaylıkla hesaplanabilir.

Soru 5: MDA (Malondialdehit) standardı olarak kullanılan 1,1, 3, 3- tetrametoksipropan'dan ($0-4 \mu\text{mol}$) konsantrasyon aralığında standartlar hazırlanıp, 586 nm dalga boyunda absorbansları okunuyor. MDA standart eğrisinin lineer regresyon denklemi $y=0.1200x + 0.0038$ olarak bulunduğuna göre, absorbansı 0.420 olarak okunan örneğin konsantrasyonunu hesaplayınız.



Şekil 6.2. Malondialdehit (MDA) standart eğrisi

Cevap: $y = ax + b = 0.1200x + 0.0038$

a = regresyon katsayısı

b = intercept (Standart eğrinin grafik eksenini kestiği nokta)

A_{586} = Örneğin absorpsansı

y = Örneğin konsantrasyonu

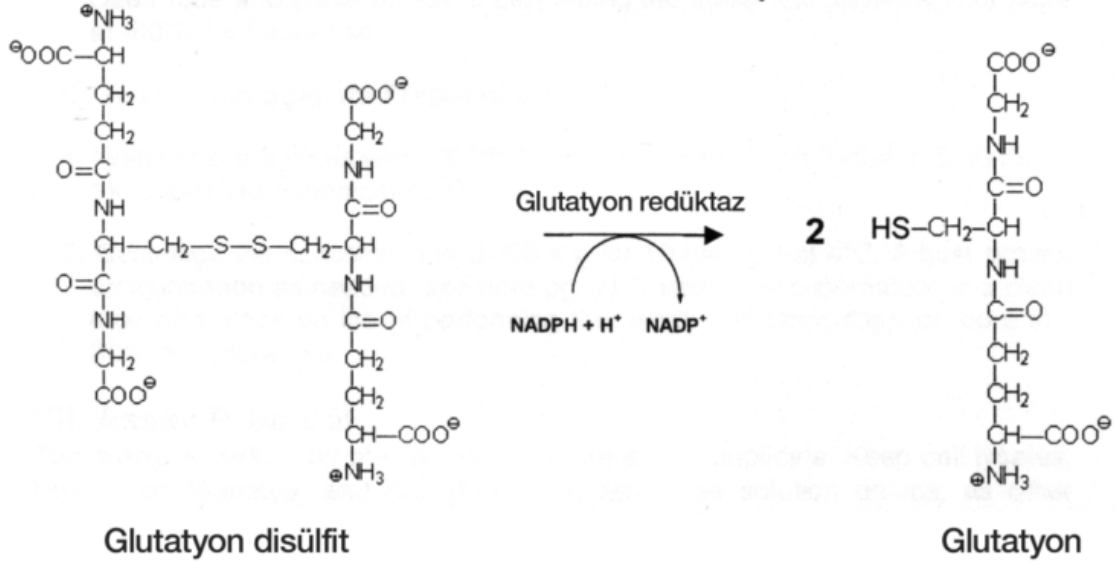
$$[MDA] = a [MDA] + b$$

$$a [MDA] = [MDA] - b$$

$$[MDA] = [MDA] - b / a$$

$$[MDA] = [A_{586}] - b / a = (0.420 - 0.0038) / 0.1200 = 3.47 \mu\text{mol}$$

Homodimerik flavoprotein yapısındaki glutatyon redüktaz (GR) hücredeki indirgenmiş glutatyon (GSH) konsantrasyonunun optimum düzeyde korunmasını sağlar. GR kofaktörü olan NADPH varlığında, okside glutatyonun (glutatyon disülfid, GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalizler (**Şekil 6.3**).

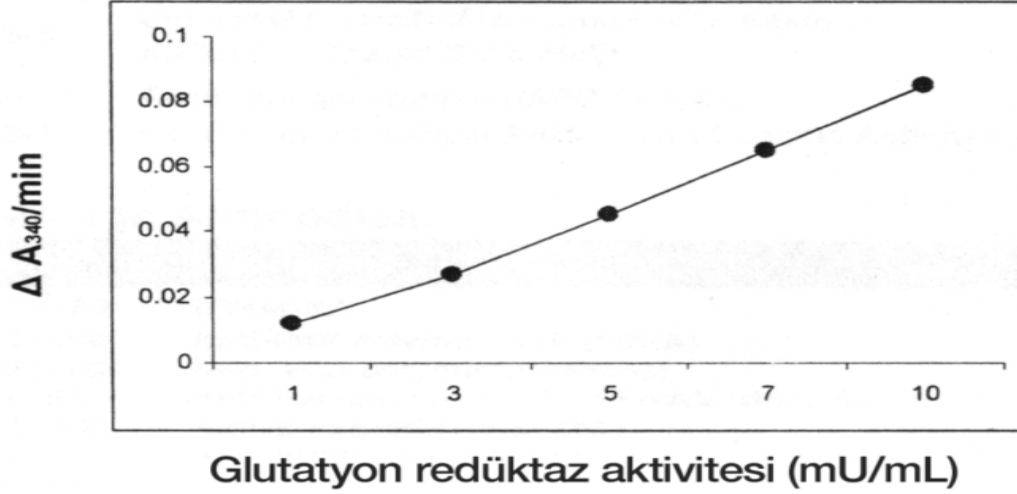


Şekil 6.3. Glutatyon disülfit'in (GSSG), Glutatyon redüktaz ve NADPH tarafından indirgenme reaksiyonu

1 U GR, standart koşullarda (pH 7, 25 °C), 1 dakikada 1 μmol GSSG indirgeyen, 1 dakikada 1 μmol NADPH tüketen veya 1 mU GR dakikada 1 nmol NADPH tüketen enzim

miktarı olarak tanımlanabilir. NADPH için molar ekstinksiyon katsayısı, 340 nm'de, $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değerine eşittir

Örneklerdeki GR aktivitesi standart eğriden ya da NADPH'ın molar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanabilir. Reaksiyon ortamına NADPH çözeltisinin pipetlenmesiyle reaksiyon başlar. Örnek, standart ve kör absorbansları beş dakika süreyle her 60 saniyede bir 340 nm dalga boyunda okunur. Deney sonucu standartların dakikadaki ortama absorbans değişimi ($\Delta A_{340}/ \text{dk}$; y eksenini) ve GR aktivitesi (1,3,5,7,10 mU/mL; x eksenini) değerlerinden yararlanılarak GR standart eğrisi elde edilir (*Şekil 6.4*).



Şekil 6. 4. Glutasyon redüktaz enziminin standart eğrisi

Soru 6: 200 μL hacmindeki eritrosit hemolizatının 1/50 oranında dilüsyonu sonucunda aşağıda verilen ortalama ve net absorbans değişimi değerleri elde ediliyor. 200 μL dilüe örnek için kullanılan toplam reaktif hacmi 800 μL olduğuna göre GR aktivitesini standart eğriden ve molar ekstinksiyon katsayısını kullanarak hesaplayınız.

Örneğin ortalama absorbans değişimi $\Delta A_{340}/ \text{dk} = 0.0325 \Delta A_{340}/ \text{dk}$

Körün ortalama absorbans değişimi $\Delta A_{340}/ \text{dk} = 0.0005 \Delta A_{340}/ \text{dk}$

Net absorbans değişimi $\Delta A_{340}/ \text{dk} = 0.0320 \Delta A_{340}/ \text{dk} (0.0325-0.0005)$

Cevap:

Standart eğriden hesaplama:

Standart eğriden (*Şekil 6.4*) GR aktivitesi 5.14 mU/mL olarak bulunur.

200 μL dilüe örnek için kullanılan reaktif hacmi 800 μL olduğuna göre;

Deneyin dilüsyon doğrulaması= $1000 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L} \times 5.14 = 25.7 \text{ mU/mL}$

1/50 oranında dilüe edilmiş orijinal örnekteki dilüsyon doğrulaması sonucu örnekteki GR aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır

GR= $50 \times 25.7 = 1285 \text{ mU/mL}$

Molar ekstinksiyon katsayısından hesaplama:

$\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol}$

Net absorbans değişimi $\Delta A_{340}/ \text{dk} = 0.0320$

GR aktivitesi= $\Delta A_{340}/ \text{dk} / 6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol} = 0.0320 / 6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol} = 5.14 \text{ mU/mL}$ olarak bulunur.

Dilüsyon oranlarından hemolizattaki orijinal GR aktivitesi yukarıdaki gibi hesaplanabilir.

pH ve TAMPONLARLA İLGİLİ HESAPLAMALAR

Genel tanımlamalar

Tamponlarla ilgili açıklamalara ve örnek problemlere geçmeden önce asit, baz, pH ve pK_a gibi temel tanımlamalara kısaca göz atmanın gerekli olacağı kanısındayız. Suda çözüldüğü zaman (H⁺) iyonu veya hidronyum iyonu veren maddeler asit, (OH⁻) iyonu verenler ise baz olarak tanımlanmaktadır. Matematiksel olarak pH (*power of Hydrogen*), hidrojen iyonu molar konsantrasyonunun negatif logaritmasıdır.

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

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

Su molekülü; hidronyum (H₃O⁺) ve hidroksil (OH⁻) iyonlarına ayrışır. Hidronyum iyonunu basit olarak H⁺ iyonu olarak göstererek aşağıdaki ayrışma reaksiyonunu yazmak mümkündür.



Suyun ayrışma sabiti (K_d) aşağıdaki eşitlikte verilmiştir. Köşeli parantez içindeki terimler molar konsantrasyonu ifade etmektedir. (1000 g /18 g=55.6 M) suda 25 °C'de, 10⁻⁷ mol [H⁺] iyonu ve 10⁻⁷ mol [OH⁻] iyonu bulunur.

$$K_d = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] / [\text{H}_2\text{O}]$$

Suyun konsantrasyonu (55.6 M) iyonizasyon ile çok az değiştiğinden yukarıdaki eşitliği aşağıdaki şekilde basitleştirerek yazmak mümkündür. Eşitlikteki K_{su} ifadesine suyun iyon ürünü adı verilmektedir.

$$K_{su} = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-14} \text{ M}^2$$

H⁺ ve OH⁻ konsantrasyonları birbiri ile ilişkilidir; biri artarken, diğeri azalır. [H⁺]=10⁻² olduğu durumda [OH⁻]=10⁻¹² 'dir. Bu nedenle pH skalası 0-14 arasında düzenlenmiştir. Alttaki eşitlik pH ve pOH arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

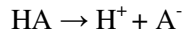
Asit ve bazların göreceli kuvvetleri kadar, suda çözünebilirlik özellikleri de derecelendirilebilir. Çözünürlük sabiti (K_d değeri, iyonizasyon sabiti) tablolarını pek çok biyokimya kitabında bulmak mümkündür. Yüksek K değerine sahip asitler sulu çözeltilerinde daha yüksek oranda iyonlarına ayrılırlar. pK; proton alıcısı ve proton vericisi formlarını eşit konsantrasyonlarda bulunduğu pH değerindeki iyonizasyon sabitinin (K) negatif logaritmasıdır. Kuvvetli asitlerin pK değerleri 3.0'ın altında, kuvvetli bazların pK değerleri ise 9.0'ın üstündedir. Asitler kendi pK değerlerinin üstünde bir pH'da H⁺ iyonu vererek iyonlarına ayrılırlar. Bazlar ise

pK değerlerinin altında bir pH'da ortama (OH⁻) iyonu verirler. Birden fazla pK değerine sahip bileşikler ortama birden fazla H⁺ iyonu verme ya da alma özelliğindedir.

Biyokimyasal reaksiyonlar her reaksiyona özgü sabit bir pH değerinde meydana gelir. Bu bakımdan reaksiyon ortamının pH değerinin tampon sistemlerle sabit olarak korunması önem taşır. Tamponlar zayıf bir asit veya baz ile ilgili tuzundan oluşan ve reaksiyon ortamındaki pH değişikliğine karşı koyan sistemlerdir. Tamponun etkinliği, tampon sistemin pK değeri ile ortamın pH değerine bağlıdır. Tamponun pK değeri ortamın pH değerine ne kadar yakınsa o kadar kuvvetli tamponlama etkisi meydana gelir. Proton alıcısının molar konsantrasyonunun, proton vericisinin molar konsantrasyonuna eşit olduğu durumlarda, Henderson-Hasselbalch eşitliğine göre pH=pK olduğundan maksimum tamponlama kapasitesi görülür. Genel bir kural olarak, tamponun optimum pH'sı pH=pK±1 sınırları içinde olmalıdır. Asetik asit/Asetat tamponunun pH=pK değeri 4.73'dür. Yukarıda verilen genel kurala uygun olarak Asetik asit/Asetat tamponunun optimum tamponlama kapasitesi 4.0-5.5 değerleri arasındadır. Bu aralığın altındaki ve üstündeki değerlerde tamponlama kapasitesi önemli ölçüde azalır. Kan plazmasının pH'sı 7.4; bikarbonat-karbonik asit, laktik asit-laktat, amonyum-amonyak sistemlerinin pK değerleri ise sırasıyla 6.1, 3.9, 9.4'dür. Bu tampon sistemler içinde en yüksek tamponlama kapasitesine yukarıdaki açıklamaya bağlı olarak bikarbonat-karbonik asit sistemi sahiptir.

Henderson-Hasselbalch eşitliğinin hesaplanması

Henderson-Hasselbalch eşitliği tampon etkisinin ve organizmadaki asit-baz dengesinin anlaşılmasında önem taşır. Zayıf bir asidin (HA) ayrışması ile H⁺ ve A⁻ iyonları oluşur.



Asidin çözünürlük sabiti (K_a) aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$K_a = [H^+] [A^-] / [HA]$$

[H⁺] eşitliğin sol tarafına çekilir.

$$[H^+] = K_a [HA] / [A^-]$$

Eşitliğin her iki tarafının negatif logaritması alınır.

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log [HA] / [A^-]$$

$-\log [H^+]$ yerine pH, $-\log K_a$ yerine ise pK_a konulur.

$$pH = pK_a - \log [HA] / [A^-]$$

$-\log [HA] / [A^-]$ ifadesindeki pay ve paydanın yer değiştirmesiyle (-) işareti (+) ya dönüşür ve Henderson-Hasselbalch eşitliği elde edilir.

$$pH = pK_a + \log [A^-] / [HA^+]$$

$$pH = pK_a + \log [\text{proton alıcısı}] / [\text{proton vericisi}]$$

Tablo 7.1: Tampon çözeltilerde sıklıkla kullanılan bazı asit ve bazların pKa değerleri

Asit veya Baz	pK _a (25 °C)
Asetik asit	4.75
Barbiturik asit	3.98
Karbonik asit	6.10, 10.22
Sitrik asit	3.10, 4.76, 5.40
Glisilglisin	3.06, 8.13
Hepes*	7.50
Fosforik asit	1.96, 6.70, 12.30
Fitalik asit	2.90, 5.51
Pipes**	6.80
Süksinik asit	4.18, 5.56
Tartarik asit	2.96, 4.16
Tris***	8.14

*4(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansülfonik asit

**1,4-piperazindietansülfonik asit

***2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol

pHmetre ve tampon hazırlanması

pHmetreler elektrokimyasal esasa göre çalışan cihazlardır. Tamponun pH'sı HCl yada NaOH ile ayarlanmadan önce, pHmetrenin kalibrasyon ayarı pH 7.0 ve daha sonrada asit ya da alkali pH'daki (pH 4.0 veya 9.0) standart tamponlarla yapılmalıdır. pH ölçümünün kesinliği örnekle temas halindeki cam (indikatör) elektrotun ve içerdiği tamponun özelliğine, ortam sıcaklığına, kalibrasyon tamponunun doğruluğuna ve referans elektrot içindeki elektrolitin özelliğine bağlıdır. Referans elektrot, referans elektrolit (3 M KCl) ile dolu haldedir. Referans elektrolit eksildiğinde hazırlanılarak tamamlanması gerekebilir. Normalde cam elektrotun ömrü 1-3 yıl arasındadır. Cam elektrot eskidikçe kalibrasyonu güçleşir. Sadece hidrojen iyonlarına geçirgen olan cam elektrot rejenerasyon amacıyla, önce 5 dakika %4'lük NaOH içinde, daha sonrada %4'lük HCl içinde tutulur. Cam elektrot kullanılmadığı zamanlar mutlaka deiyonize veya distile su içinde tutulmalıdır. pH ölçümü, indikatör elektrotla, referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçülmesi temeline dayanır.

Tamponlar tampon maddenin son miktarının bir miktar distile suda çözünmesiyle hazırlanır. Tampon çözeltinin pH'sı duruma göre HCl veya NaOH ile titre etmek suretiyle ayarlanır. İstenilen konsantrasyondaki son hacme ise distile su eklenerek ulaşılır. Henderson-Hasselbalch eşitliği gereğince distile su eklemekle $\frac{[\text{proton akseptörü}^-]}{[\text{proton donörü}]}$ oranı değişmeyeceğinden tamponun pH'sı sabit olarak kalır. Spesifik bir pH değerindeki potasyum (ve sodyum) fosfat tamponları; K_2HPO_4 veya KH_2PO_4 tuzlarından ayrı, ayrı hazırlanan belirli konsantrasyonlardaki çözeltilerin, yine belirli hacimlerde karıştırılmasıyla hazırlanır. Tamponların hazırlanmasıyla ilgili oran ve konsantrasyonları içeren tablolar değişik başvuru kitaplarının eklerinde yer almaktadır. pH, sıcaklık ile ilişkili olduğundan tamponun pH değeri 25 °C de ayarlanmalıdır. Fazla miktarda tampon gerektiğinde, konsantre olarak hazırlanan tampondan uygun oranda dilüsyon yapılarak arzu edilen konsantrasyonda tampon hazırlanabilir.

Sorular ve cevapları

Soru 1: pH değeri 3.75 olan kırmızı şarabın hidrojen iyonu konsantrasyonunu hesaplayınız.

Cevap: $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$
 $-\log [\text{H}^+] = 3.75$

Eşitliğin her iki tarafı -1 ile çarpılır.

$$\log [\text{H}^+] = -3.75$$

Eşitliğin her iki tarafının antilogaritması alınır.

$$[\text{H}^+] = 1.8 \times 10^{-4}$$

Soru 2: 0.02 M'lık NaOH çözeltisinin pH'sını hesaplayınız.

Cevap: Kuvvetli bir baz olan NaOH sulu çözeltilerde tamamıyla Na^+ ve OH^- iyonlarına ayrılır. Dolayısıyla OH^- iyonu konsantrasyonu, 0.02 M olan NaOH konsantrasyonuna eşittir. Kuvvetli bazlarla ilgili pH hesaplamalarında suyun iyonizasyonu ile ortaya çıkan H^+ iyonu konsantrasyonu çok küçük olduğundan ihmal edilebilir. Problemin çözümünde ilk aşama pOH değerinin hesaplanmasıdır. Daha sonra pOH değeri 14'ten çıkarılarak pH değeri hesaplanır.

$$\begin{aligned} \text{pOH} &= -\log (0.02) \\ &= -(-1.7) = 1.7 \\ \text{pH} + \text{pOH} &= 14 \\ \text{pH} &= 14 - 1.7 = 12.3 \end{aligned}$$

Soru 3: 0.1 M NaOH çözeltisindeki H^+ iyonu konsantrasyonunu hesaplayınız.

Cevap: $K_d = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-14} \text{ M}^2$ $[\text{H}^+] = K_d / [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-14} \text{ M}^2 / 10^{-1} \text{ M} = 10^{-13} \text{ M}$

Soru 4: H^+ iyonu konsantrasyonu 0.00013 M olan çözeltideki, OH^- iyonu konsantrasyonunu hesaplayınız.

Cevap: $K_d = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 1.0 \times 10^{-14} \text{ M}^2$
 $[\text{OH}^-] = K_d / [\text{H}^+] = 1.0 \times 10^{-14} \text{ M}^2 / 1.3 \times 10^{-4} = 7.7 \times 10^{-11} \text{ M}$

Soru 5: 1 mL 0.1 mol HCl çözeltisinin, 10 mL 0.1 M sodyum asetat ve 10 mL 0.1 M asetik asitten oluşan tampon çözelti üzerine ilave edildiğini düşünelim. Bu durumda yeni karışımın pH değeri ne olur?

Cevap: 1 mL 0.1 M HCl tampon çözeltide bulunan 1 mL 0.1 M sodyum asetat ile reaksiyona girerek asetik asite dönüşecektir. Bu durumda yeni çözeltideki [Tuz] / [Asit] oranı 9 / 11 olur. Asetik asidin pKa değeri Tablo 1'den bulunur. Çözeltinin pH sı aşağıda görüldüğü gibi hesaplanır.

$$\text{pH} = 4.73 + \log 9/11 = 4.73 + \log 9 - \log 11 = 4.73 + 0.9542 - 1.0414 = 4.64$$

olarak hesap edilir.

1 mL 0.1 mol HCl ilavesinden önce çözeltinin pH sı

$$\text{pH} = 4.73 + \log 10/10 = 4.73 + 0 = 4.73$$

$$\text{pH değişimi} = 4.73 - 4.64 = 0.09$$

Soru 6: 1.025 g anhidrit sodyum asetat'ın (MW=82) 100 mL 0.25 M asetik asitte çözünmesiyle hazırlanan tamponun pH' sını hesaplayınız. Asetik asit $pK_a = 4.75$ (Tablo 1)

Cevap: [Sodyum asetat]=10.25 g/L = 10.25 g/L x 1 mol / 82 g/mol = 0.125 M
 $pH = pK_a + \log ([Asetat] / [Asetik asit])=4.75 + \log (0.125 / 0.250)$
 $pH= 4.75 -0.30 =4.45$

Soru 7: 1 L, $pH=7.1$, 0.1 M fosfat tamponu hazırlamak için, kaç g NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 gereklidir. ($PK_{a2}=6.8$, Na=23 P=31 O=16)

Cevap: $H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-}$
 $7.1=6.8 + \log ([HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-])$
Eşitliğin her iki tarafında 6.8 değeri çıkartılır.
 $0.3= \log ([HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-])$
Eşitliğin her iki tarafının antilogaritması alınır.
 $2.0 = ([HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-])$

Yukarıdaki eşitliğin sol tarafındaki “2” değeri 1 L çözelti içindeki konjuge baz/ konjuge asit molar konsantrasyonunu vermektedir.

$[HPO_4^{2-}] = 2[H_2PO_4^-]$ olduğuna göre, toplam iyon konsantrasyonunu gösteren aşağıdaki denklemde $[HPO_4^{2-}]$ yerine $2[H_2PO_4^-]$ konulur.

$[H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{2-}] = 0.1 M$
 $[H_2PO_4^-] + 2[2 H_2PO_4^-] = 0.1 M$
 $5 H_2PO_4^- = 0.1 M$
 $[H_2PO_4^-] = 0.020$

Eşitlikteki “2” değerini elde edebilmek için $[HPO_4^{2-}] = 0.040$ olmalıdır. Buradan aşağıdaki miktarlar kolaylıkla hesaplanabilir.

$[HPO_4^{2-}] = 0.040 \text{ mol} = 0.040 \times 142 = 5.68 \text{ g}$
 $[H_2PO_4^-] = 0.020 \text{ mol} = 0.020 \times 120 = 2.40 \text{ g}$

Soru 8: 2 L, 1 M, $pH=8.0$ sodyum fosfat tamponu hazırlanması istenmektedir. 1 M monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) ve 1 M dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4) stok çözeltilerinden ne kadar alıp karıştırılarak istenen tampon hazırlanabilir.

Cevap: Monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) suda Na^+ ve $H_2PO_4^-$ iyonlarına ayrılır. $H_2PO_4^-$ (fosforik asit, konjuge asit) daha sonra HPO_4^- (konjuge baz) ve H^+ şeklinde iyonize olur. Bileşiğin $25^\circ C$ 'de pK_a değeri 6.82'dir.

pH ve pK_a değerleri Henderson-Hasselbalch denkleminde yerine konulur.

$pH = pK_a + \log [A^-] / [HA]$
 $= 6.82 + \log [HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$

Eşitliğin her iki tarafında 6.82 değeri çıkartılır.
 $1.18 = \log [HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$

Logaritmik bir değer olan 1.18'in ve $\log [HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$ antilogaritması alınır.
 $[HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-] = 15.14$ olarak bulunur.

15.14 kısım $[\text{HPO}_4^{2-}]$ 1 kısım $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ile karıştırılarak toplam 16.14 kısım tampon elde edilir.

2 L tampon için

$$[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 15.14 / 16.14 \times 2 \text{ L} = 1.876 \text{ L}$$

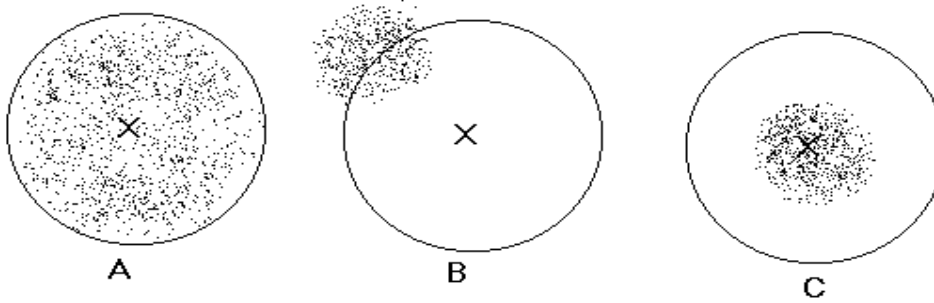
$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 1 / 16.14 \times 2 \text{ L} = 0.124 \text{ L}$$

Hesaplanan bu iki hacimdeki çözeltilerin karıştırılmasıyla gerekli olan tampon hazırlanır.

YENİ GELİŞTİRİLEN BİR BİYOANALİTİK YÖNTEMİN DENEYSEL GEÇERLİLİĞİNİN TEST EDİLMESİ

Laboratuvar ortamında, objektif olarak saptanmış kalite kontrol performans verilerine dayanarak yeni bir biyoanalitik yöntemin geçerliliğinin test edilmesi, ölçülecek parametrenin düzeyinin güvenilir olarak belirlenmesinde önem taşımaktadır. Çalışılmaya başlanacak yeni yöntemin doğruluk “*accuracy*” ve kesinlik “*precision*” performansının test edilmesi, yeni yöntem üzerinde etkili olan analitik faktörlerin yeterli olarak anlaşılması ve değerlendirilmesine bağlıdır. Kesinlik ve doğruluk sinonim terimler değildir (**Şekil 8.1**). Kesinlik, doğruluk ve saptama sınırı “*detection limit*” gibi analitik performans kriterleri büyük ölçüde mevcut deney koşullarına ve kullanılan analitik sistemin özelliklerine bağlıdır. Hem manuel hem de otomasyon sistemlerinde gerçekleştirilen analizlerde pipetleme, zaman ve reaksiyon hızı gibi faktörlere bağlı olarak sistematik ya da tesadüfi hatalar oluşsa da, otomasyon yöntemlerinde genel olarak kesinlik daha yüksektir. Denge durumundaki bir reaksiyonda ileri ve geriye doğru olan reaksiyon hızları birbirine eşit olduğundan, oluşan ürünlerin konsantrasyonu denge durumunda ölçülmelidir. Analiz edilecek maddenin düşük konsantrasyonda bulunması, reaktiflerin pipetleme sırası, pipetleme tekniği, reaksiyon ortamının sıcaklığı, inkübasyon süresi, reaksiyona giren maddelerin karışma hızı gibi faktörler reaksiyon hızını ve kimyasal dengeyi etkiler.

Biyoanalitik yöntemler ortaya koydukları sonuçların özelliğine göre üç grupta incelenebilir. Kalitatif yöntemler herhangi bir analitin analiz edilecek örnekteki varlığı ya da yokluğunu, kantitatif yöntemler ise o örnekteki analit konsantrasyonunu belirlemede kullanılır. Semikantitatif yöntemler ölçülen madde konsantrasyonunun daha önceden belirlenmiş olan referans konsantrasyonunun altında ya da üstünde olup olmadığını gösterirler.



Şekil 8.1. Şekildeki (x) örneğin test edilen parametre için gerçek “*accurate*” değerini ifade etmektedir. A,B ve C dairelerinin içinde görülen noktalar aynı örneğin üç farklı yöntem ile çalışılması sonucu elde edilen değerlerin dağılımını göstermektedir. A: Kesin değil fakat doğru B: Kesin fakat doğru değil C: Kesin ve doğru

Analitik Kesinlik ve Doğruluk

Analitik yöntemlerdeki belirsizlik iki büyük grup altında incelenebilir: Tesadüfe bağlı hata *random error* (RE) tüm deneysel verilerde vardır. Önceden kestirilmesi veya tamamen ortadan kaldırılması olanaksızdır. Biyokimyasal reaksiyonların oluşum mekanizmalarında reaksiyona giren moleküller arasındaki çarpışmaların tesadüfi olması nedeniyle, ya da ölçüm yapılan cihazdaki küçük voltaj oynamalarına bağlı olarak meydana gelir. Tesadüfi hata herhangi bir zaman aralığında gerçek değerden pozitif ya da negatif yönde sapmalara neden olur ve sonuçların kesinliğini etkiler. Sistematik hata "*systematic error*" çok veya az sayıda sabit hata sonucu oluşur. Bu durumda gerçek değere göre, ölçülen değerde sürekli olarak görülen pozitif ya da negatif yönde bir sapma mevcuttur. Oransal sistematik hata yüksek konsantrasyon düzeylerinde, sabit sistematik hata ise analitik ölçüm sınırları içinde görülür. Sistematik hataya, spektrofotometrik ölçüm sırasında örnek absorbansının analit içermeyen körün absorbansına göre düzeltilmediği durumu örnek olarak gösterebiliriz. Bu durumda hatalı olarak analiz edilen örnekte yüksek analit konsantrasyonu saptanır. Örnek matrisindeki hemoliz gibi interferans oluşturan nedenler sistematik hataya neden olur. Sonuçların doğruluğunu etkileyen sistematik hata sertifikalı referans (kalite kontrol) materyali kullanılarak gerçek değerden sapmanın gözlenmesi sonucu, gerekli düzeltici ve önleyici faaliyetlerin yapılmasıyla ortadan kaldırılabilir. Sistematik (SE) ve tesadüfi hatanın (RE) toplamı, toplam hatayı (TE) verir.

$$TE=SE + RE$$

Deney yöntemini kalibre etmekte kullanılan, bilinen miktarda analit içeren çözeltilere standart (kalibrant) adı verilir. Deney sonuçları elde edilen bu kalibrasyon değerlerinden hesaplanır. Deney yöntemi bir kez kalibre edildikten sonra, deneyin kesinlik ve doğruluğu kontroller kullanılarak izlenir. Yöntemin kesinliği konsantrasyonla değiştiğinden; kesinlik ölçüm yapılacak konsantrasyon aralığında, düşük, orta ve yüksek konsantrasyon düzeylerindeki kontrol materyali kullanılarak test edilmelidir.

Kesinlik bir testin aynı sonucu verme yeteneğinin, tekrarlı ölçümlerle test edilmesidir. Tekrarlı ölçümler tek bir defada, ya da farklı zaman aralıklarında yapılabilir. Kesinlikle ilgili veri analizi yeni biyoanalitik yöntemin geçerliliğinin test edilmesindeki ilk basamaktır. Eğer yöntemin kesinliği zayıfsa bu durumda yöntemin geçerliliğinin test edilmesiyle ilgili diğer deneyler, istenilen kesinliğe ulaşıncaya kadar ertelenir. Kesinliğin test edilmesinde aşağıdaki eşitlikte verilen değişim katsayısı "*coefficient of variation*" %CV değeri kullanılır. Tesadüfi hatayı (RE) saptamakta kullanılan %CV standart sapmanın büyüklüğü ile ortalama arasındaki ilişkiden etkilenir. Standart sapma (SD) değeri arttıkça %CV değerinin arttığı görülür. % CV ve RE'nin hesaplanmasında kullanılan eşilikler aşağıda verilmiştir.

$$\%CV=(\text{Standart sapma}/\text{ortalama}) \times 100$$

$$RE = 2.58 \times SD$$

$RE < E_A$ (Allowable error: İzin verilebilir hata) durumunda tesadüfi hata kabul edilebilir sınırlar içindedir

Yöntemin %CV değeri analizin yapıldığı laboratuardaki ortam koşullarından önemli ölçüde etkilenir. Ortama bağlı değişkenler arasında reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık, reaktiflerin kaynağı, kalitesi ve reaktiflerin pipetlenmesindeki tekrarlanabilirlik sayılabilir. Precision çalışması aynı laboratuarda yapılıyorsa "*intralaboratory study*", farklı laboratuarlarda "*interlaboratory studies*" yapılana göre daha yüksek bir kesinlik değeri beklenir. Laboratuvar içi kesinlik çalışması *intraassay* (*within-run*) ve *interassay* (*between-run*) olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilir.

Intraassay precision çalışma aynı lot numarasına sahip reaktifler kullanılarak, kontrol olarak kullanılan örneğin analiz sisteminde tek bir kerede çalışılması esasına dayanır. Interassay kesinlik profili ise kontrol olarak kullanılacak örneğin farklı analiz tekrarlarında, ya da farklı günlerde çalışılmasıyla elde edilir. Interassay kesinlik profili intraassay'e göre genellikle daha zayıftır.

Accuracy (Doğruluk) yeni ya da mevcut analitik yöntemin doğru sonucu verme yeteneğidir. Analiz sonucunda gözlenen değer, gerçek değere ne kadar yakınsa yöntem analitik olarak o kadar doğrudur. Yeni yöntemin referans yöntemle karşılaştırılabilmesi için minimum 40 örnekten oluşan hasta grubunun her iki yöntemle de çalışılması ve sonuçların eşlendirilmiş t-testi ve lineer regresyon analizi gibi istatistiksel metotlarla analiz edilmesi gereklidir. Sabit hata "Constant error" (CE) "bias" olarak da adlandırılır. Aynı örnek her iki yöntemle çalışıldıktan sonra sonuçlar arasındaki fark CE'ı verir.

$$CE=[Y-X]$$

İdeal olan analitik yöntemin interferans ya da çapraz-reaktivite olmadığı takdirde örnekteki analiz edilecek maddenin tamamını %100 verimlilikle saptayabilmesidir. Yöntemin doğruluğunu test etmek için, standart referans materyal olarak kullanılan örnekteki yüksek kesinlik ve doğruluktaki analit konsantrasyonları ile test sonucu elde edilen değerleri karşılaştırmak gereklidir.

Recovery (Verimlilik)

Recovery çalışması üzerinde çalışılan yöntemin, örnekteki analiz edilecek maddenin tamamını ölçüp ölçmediğini anlamak için yapılır ve yöntemin analitik doğruluğunu anlamamıza yardımcı olur. Örneği oluşturan matriksin yapısındaki bileşenlerin ölçülecek madde ile oluşturdukları kompleksler kimi zaman maddenin tamamının ölçülmesini engelleyebilir. Standart referans materyal olarak kullanılan örnek yüksek derecede saf ve matriks etkisi göstermeyen bir özelliğe sahiptir.

Recovery çalışmasında hasta örnekleri üzerine ölçülecek olan analitten belli miktar ve konsantrasyonda ilave edilir. Baseline (Temel düzeydeki) örnek olarak seçilen, ölçülecek olan analiti düşük konsantrasyonda içeren hasta örneği üzerine saf ve yüksek konsantrasyonda bulunan standarttan belli bir miktar ilave edilir. İlave edilen hacim hasta örneğini 1:10'dan daha fazla oranda dilüe etmemelidir. Aşağıdaki eşitliklerden faydalanılarak recovery hesaplamaları gerçekleştirilebilir.

$$\text{Eklenen konsantrasyon} = \text{Standart konsantrasyonu} \times [\text{mL standart} / (\text{mL standart} + \text{mL örnek})]$$

$$\text{Recovery konsantrasyonu} = \text{Analit eklenmiş örneğin konsantrasyonu} - \text{Baseline konsantrasyonu}$$

$$\% \text{ Recovery} = (\text{Recovery konsantrasyonu} / \text{Eklenen konsantrasyon}) \times 100$$

% 95'in üzerindeki recovery değerleri analitik olarak kabul edilebilir özellik taşır.

Ortalama recovery hesaplandıktan sonra oransal hata *proportional error* (PE) aşağıdaki eşitlikten faydalanılarak hesaplanabilir.

$$(PE)=[(\% \text{ Recovery}-100) \times (\text{Ortalama} / 100)]$$

Lineerite (Doğrusallık)

Yeni analitik yöntemin doğruluğunun test edilmesindeki ilk basamak lineerite'nin kontrol edilmesidir. Lineerite çalışması istenilen analitik aralık içindeki belirli konsantrasyondaki standartların genellikle üçlü olarak çalışılması esasına dayanır. Grafik gösterim metodunda x eksenine beklenen analit konsantrasyonları, y eksenine ise gözlenen konsantrasyonlar yerleştirilir. Böylelikle analitik aralığın alt ve üst sınırları da belirlenmiş olur. Bu noktalardan geçen doğru eksenlerle 45°'lik bir açı gösteriyorsa yöntemin doğrusallığı onaylanır. Matematiksel yöntemde ise her standart için % recovery değeri aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$\% \text{ Recovery} = (\text{Ölçülen konsantrasyon} \times 100) / \text{Hesaplanan konsantrasyon}$$

% recovery %95 değerine eşit ya da daha yüksek bir değer taşıyorsa yöntemin doğrusallığı kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.

Sorular ve cevapları

Soru 1: Günlük olarak analiz edilen, glukoz için tanısal karar düzeylerindeki kontrol çözeltileri A (~120 mg/dL) ve B (300 mg/dL) için aşağıdaki verileri kullanarak ortalama (\bar{X}), standart sapma (SD) ve %CV değerlerini hesaplayınız.

Tablo 8.1: Kontrol çözeltilerinde ölçülen glukoz konsantrasyonları

Kontrol Çözeltisi A (mg/dL)	118	120	121	119	125	118	122	116	124	123	117	117	121
	120	120	119	121	123	120	122						
Kontrol Çözeltisi B (mg/dL)	295	308	296	298	304	294	308	310	296	300	295	303	305
	300	308	297	297	305	292	300						

Cevap: Kontrol çözeltisi A

$$\bar{X} = \sum x / n = 2406 / 20 = 120.3$$

$$SD = \sqrt{\sum (x - x_i)^2 / n-1} = 2.43 \text{ mg/dL}$$

$$\%CV = (SD / \bar{X}) \times 100 = (2.43 / 120.3) \times 100 = \% 2.0$$

Kontrol çözeltisi B

$$\bar{X} = \sum x / n = 6011 / 20 = 300.5 \text{ mg/dL}$$

$$SD = \sqrt{\sum (x - x_i)^2 / n-1} = 5.45 \text{ mg/dL}$$

$$\%CV = (SD / \bar{X}) \times 100 = (5.45 / 300.5) \times 100 = \% 1.8$$

Soru 2: Klinik biyokimya laboratuvarında kullanılacak bir glukoz kitinin prospektüsünde yer alan listede 120 mg/dL glukoz konsantrasyonunda standart sapmanın (SD) 4'e eşit olduğunu ve farklı glukoz konsantrasyonlarında SD'nin değişmediği yazmaktadır. Ayrıca bu konsantrasyon

değerinde %CV'nin %3 olarak hesaplandığı belirtilmektedir. Verilen SD değerinin precision üzerine olan etkisini 50 ve 250 mg/dL glukoz konsantrasyonlarında hesaplayarak açıklayınız.

Cevap: %CV = (Standart sapma / Ortalama) x 100

$$\%CV = 4 / 50 \times 100 = \% 1.2$$

$$\%CV = 4 / 250 \times 100 = \% 6.2$$

Kitin vermiş olduğu sonuç 50 mg/dL değerinde, %CV'nin küçük olması nedeniyle daha yüksek bir precision değerine sahiptir.

Soru 3: Bir hastaya ait serumun örneği tek bir defada 10 kez çalışılıyor. Çalışma sonucu ortalama glukoz konsantrasyonu 119.2 mg/dL, standart sapma ise 2.01 mg/dL olarak hesaplanıyor. Intraassay precision ve tesadüfi hata değerini hesaplayınız. Glukoz ölçümü için *Clinical Improvement Amendments of 1988 (CLIA-88)* izin verilen toplam hata (TE) ya da diğer bir ifadeyle izin verilebilen hata (E_A) değeri: hedef değer ± 6 mg/dL değerine eşittir.

Cevap: %CV = (Standart sapma / Ortalama) x 100

$$\%CV = (2.01 / 119.2) \times 100 = 1.7$$

$$RE = 2.58 \times SD = 2.58 \times 2.01 = 5.18$$

$RE < E_A$ olduğundan tesadüfi hata kabul edilebilir düzeydedir.

Soru 4: *Clinical Improvement Amendments of 1988 (CLIA-88)* düzenlemelerine göre potasyum için izin verilen $E_A=0.5$ mmol/L değerindedir. Kontrol serumu 20 gün süreyle her gün bir kez olmak üzere test ediliyor. Elde edilen potasyum sonuçlarının ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla 5.5 mmol/L ve 0.07 mmol/L olarak bulunuyor. Tesadüfi hatayı (RE) hesaplayınız. Bu hata kabul edilebilir sınırlar içindedir?

Cevap: $RE=2.58 \times S=2.58 \times 0.07$ mmol/L= 0.18

$RE < E_A$ olduğu için RE kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Soru 5: Aşağıdaki tabloda verilen recovery verilerinden yararlanarak her bir deney için ayrı, ayrı ve ortalama değer olarak % recovery hesaplamasını yapınız. Sonuçları değerlendiriniz. Deneyler iki farklı konsantrasyon düzeyinde standart kullanılarak, A'dan E'ye kadar beş farklı hasta serumunda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8. 2: Recovery deneyi sonuçları

Örnek	0.9 mL Serum + 0.1 mL su	0.9 mL Serum + 0.1 mL 500 mg/dL standart	0.9 mL Serum + 0.1 mL 1000 mg/dL standart
A	59	110	156
B	63	112	160
C	76	126	175
D	90	138	186
E	225	270	320

Eklenen konsantrasyon = standart konsantrasyonu x [mL standart / (mL standart + mL serum)]

Recovery konsantrasyonu = Analit eklenmiş örneğin konsantrasyonu – Baseline konsantrasyonu

% Recovery = (Recovery konsantrasyonu / Eklenen konsantrasyon) x 100

Cevap:

Eklenen konsantrasyon = 500 mg/dL x [0.1 mL standart / (0.1 mL standart + 0.9 mL serum)]

Eklenen konsantrasyon = 50 mg/dL

Recovery konsantrasyonu = Analit eklenmiş örneğin konsantrasyonu – Baseline konsantrasyonu
= 110 – 59 =51

% Recovery = (Recovery konsantrasyonu / Eklenen konsantrasyon) x 100

% Recovery = (51 / 50) x 100=%102

Diğer değerler için % Recovery hesaplamaları benzer şekilde yapılarak aşağıdaki değerler elde edilir.

Eklenen konsantrasyon = 50 mg/dL	100 mg/dL
Recovery (%)	Recovery (%)
102	97
98	97
100	99
96	96
90	95
% Recovery	%97.2
Ortalama Recovery	R=%97
	%96.8

Her iki standart için ortalama % recovery >%95 olduğu için kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Soru 6: Kalsiyum için yapılan recovery çalışmasında örnekler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Örnek 1: 2.0 mL serum + 0.1 mL H₂O

Örnek 2: 2.0 mL serum + 0.1 mL 20 mg/dL kalsiyum standartı

Örnek 3: 2.0 mL serum + 0.1 mL 50 mg/dL kalsiyum standartı

Örnek 1,2 ve 3 için ölçülen kalsiyum değerleri sırasıyla 7.50 mg/dL, 8.35 mg/dL, 9.79 mg/dL olarak bulunmuştur. % Recovery değerlerini hesaplayınız.

Cevap:

Eklenen konsantrasyon = 20 mg/dL x [0.1 mL standart / (0.1 mL standart + 2 mL serum)]=0.95

Recovery konsantrasyonu = 8.35 – 7.50=0.85

% Recovery = (0.85 / 0.95) x 100=%89.47

Eklenen konsantrasyon = 50 mg/dL x [0.1 mL standart / (0.1 mL standart + 2 mL serum)]=2.38

Recovery konsantrasyonu = 9.79 – 7.50=2.29

% Recovery = (2.29 / 2.38) x 100=%89.47=%96.22

Soru 7: Potasyum için ortalama recovery % 99, ortalama kontrol serumu değeri ise 5.5 mmol/l olarak bulunduğuna göre oransal hatayı hesaplayınız. $E_A=0.5$ mmol/L

Cevap: $(PE) = [(recovery-100) \times (ortalama/100)]$

$$PE = [(99-100) \times (5.5/100)] = 0.05 \text{ mmol/L}$$

$PE < E_A$ olduğundan oransal hata kabul edilebilir düzeydedir.

Soru 8: Kalsiyum yöntemine, ortamdaki magnezyumun interferansını test etmek için örnekler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Örnek 1: 1.0 mL serum + 0.1 mL H₂O

Örnek 2: 1.0 mL serum + 0.1 mL 10 mg/dL magnezyum standartı

Örnek 3: 1.0 mL serum + 0.1 mL 20 mg/dL magnezyum standartı

Örnek 1,2 ve 3 için ölçülen kalsiyum değerleri sırasıyla 9.80 mg/dL, 10.53 mg/dL, 11.48 mg/dL olarak bulunmuştur. Örnek 2 için eklenen magnezyumun konsantrasyonunu ve interferans değerini hesaplayınız.

Cevap:

Eklenen konsantrasyon = standart konsantrasyonu x (mL standart / mL standart + mL serum)

Interferans = Analit eklenmiş testin konsantrasyonu – Baseline konsantrasyonu

Eklenen konsantrasyon = 10 mg/dL x (0.1 mL standart / 0.1 mL standart + 1 mL serum) = 0.909

Interferans = 10.53 – 9.80 = 0.73

Soru 9: Laboratuvar yeni glukoz yöntemi için bir dizi lineer standart satın alıyor. Standartlar yeni metotla üçlü olarak çalışılıyor. Her standart için çalışmaların ortalaması alınıyor ve sonra % recovery değerleri hesaplanıyor. Yöntemin doğrusallığını değerlendiriniz.

Cevap: % Recovery aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak hesaplanır.

$$\% \text{ Recovery} = (\text{Ölçülen değer} / \text{Beklenen değer}) \times 100$$

Tablo 8.3: Glukoz standartlarındaki ölçülen ve beklenen glukoz değerlerinin recovery üzerine etkisi

Standart No.	Beklenen Glukoz Değerleri	Ölçülen Glukoz Değerleri	% Recovery
1	25	24	96.0
2	60	57	95.0
3	100	96	96.0
4	120	115	95.8
5	250	241	96.4
6	400	390	97.5

Açıklama: % Recovery değeri tüm standartlar için %95'in üstünde olduğundan yöntem lineerdir.

Soru 10: Potasyum için yöntem karşılaştırma çalışması yapılıyor. Lineer regresyon analizi sonucu elde edilen $y=ax + b$ doğru denkleminde $y= -0.057$ $a=1.02$ olarak hesaplanılıyor. Potasyum için ortalama kontrol serumu değeri 5.5 mmol/l olduğuna göre sistematik hatayı hesaplayınız. Toplam hata 0.23 mmol/L olduğu durumda, tesadüfi hata oranı nedir? $E_A=0.5$ mmol/L

Cevap: $SE=[(y + a \times \text{konsantrasyon}) - \text{konsantrasyon}]$

$$SE=[(-0.057 + 1.02 \times 5.5) - 5.5] = 0.053$$

$SE < E_A$ olduğundan sistematik hata kabul edilebilir düzeydedir.

$$TE = RE + SE$$

$$0.23 = RE + 0.053 \rightarrow RE = 0.177$$

KAYNAKLAR

- Anderson SC, Cockayne S. *Clinical Chemistry*, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993.
- Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. *Clinical Chemistry*, 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Bisswanger H. *Practical Enzymology*, 1st ed., Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- Burtis CA, Ashwood ER. (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994.
- Cornish-Bowden A. *Basic Mathematics for Biochemists*, 2nd ed., Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry Theory, Analysis and Correlation*, 5th ed., Missouri: Mosby-ELSEVIER, Inc., 2010.
- Mikkelsen SR, Corton E. *Bioanalytical Chemistry*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004
- Pecsok RL, Shields LD. *Modern Methods of Chemical Analysis*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1968
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J, Jeltsch A. *Biochemical Methods*, 1st ed., Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.
- Stephenson FH. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology, A guide to mathematics in the laboratory*, Academic Press, An Imprint of Elsevier, Amsterdam, 2003.
- Sutton R, Rockett B, Swindells P. *Chemistry for the Life Sciences*, 1st ed., London: Taylor & Francis, 2000.
- Wison K, Walker J. (eds.) *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, 5th ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

İNDEKS

Absorbans
Accuracy
Açısal hız
Aktüel kapasite
Allowable error
Alternatif rotor
Analit
Antibonding moleküler orbital
AOPP (Advanced Oxidation Protein Products)
Avogadro sayısı
Basit dilüsyon
Beer kanunu
Beklenen kapasite
Berraklaştırma faktörü
Between-run precision
Bias
Bilimsel sistem
Biyoanalitik metot
Bonding moleküler orbital
Coefficient of variation (%CV)
Constant error
Çapraz reaktivite
Çözünürlük sabiti
Dakikadaki absorbans değişimi
Dakikadaki dönme sayısı
Dalga boyu
Dalton
Dilüsyon faktörü
Disosiasyon reaksiyonu
Disosiasyon sabiti
DNA
Doğruluk
Doğrusallık
Eksitasyon
Elektromanyetik dalga
Elektromanyetik radyasyon
Elektron volt
Elementer yük
Emisyon
Enternasyonal ünite
Enzim aktivitesi
Eşdeğer ağırlık
Etki değerliliği
Faraday sabiti
Fiziksel sabitler
Flavoprotein
Floresans
Fotometrik pipet kalibrasyonu

Foton
Frekans
Glutatyon
Glutatyon redüktaz
Göreceli santrifüj kuvveti
Gravimetrik pipet kalibrasyonu
Gravitasyon
Handerson-Hasselbalch denklemi
Hareketli-kovalı rotor
Hemoliz
Hidrojen iyonu
Hidroksil iyonu
Hidronyum iyonu
İndikatör elektrot
Interassay precision
Intercept
İnterferans
Interlaboratory study
İnternal standart
Intraassay precision
Intralaboratory study
İyonizasyon
İyonizasyon sabiti
İzin verilebilir hata
İzopiknik santrifüjleme
Kalibrant
Kalibrasyon
Kalitatif metot
Kalite kontrol materyali
Katal
Kesinlik
Kloramin-T
Koenzim
Kristal suyu
Kromoforik amino asit bakiyeleri
Kuantum
Kuvvetli asit
Kuvvetli baz
Lambert-Beer eşitliği
Lineerite
Lineer regresyon analizi
Lineer regresyon denklemi
MDA (Malondialdehit)
Metrik sistem
Molar absorpsiyon katsayısı
Molar ekstinksiyon katsayısı
Molarite
Molekül ağırlığı
NADH
NADPH
Normalite
Ondalık sistem

Optimum tamponlama kapasitesi
Orijinal rotor
Ortalama
Ovalbumin
Özgül ağırlık
Parvalbumin
pH
pH-metre
Pi bağı
pK_a
Planck sabiti
ppb
ppm
Precision
Promil alkol
Protein konsantrasyonu
Proton alıcısı
Proton vericisi
Random error
RCF
Reaktif köri
Referans elektrolit
Referans elektrot
Regresyon katsayısı
RNA
Rölatif santrifüj kuvveti
rpm
Sabit açılı rotor
Sabit hata
Santrifüj kuvveti
Sedimentasyon
Semikantitatif metot
Seri dilüsyon
Sertifikalı referans materyali
Sığır serum albumini (BSA)
Sigma bağı
Singlet durum
Sinüsoidal dalga
Sistem enternasyonal
Sistematik hata
Spektroflorimetri
Spektrofotometri
Spesifik absorpsiyon katsayısı
Standart eğri
Standart konsantrasyonu
Standart sapma
Stokes kayması
Substrat
Süperoksit dismutaz
Temel enerji düzeyi
Tesadüfi hata
Tetrametoksipropan

Tirozin
To contain pipetler (TC)
To deliver pipetler (TD)
Toplam hata
Toplam reaksiyon hacmi
Triptofan
Universal gaz sabiti
Vakumdaki ışık hızı
Verimlilik
Vertikal rotor
Within-run precision
Yerçekimi ivmesi
Yüzde konsantrasyon
Yüzde sapma
Yüzde transmitans
Zıt spinli durum