

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Türev Spek. ile Kon. Kon. Mik. Bel.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mithat Sakoğlu

1988

61
43

Kimya
1000 T.C

YILDIZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜREV SPEKTROFOTOMETRE İLE KANDA
KARBOKSİHEMOGLOBİN MİKTAR
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG MİTHAT BAKOĞLU

İSTANBUL 1988

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
KÜTÜPHANE VE DOKÜMANTASYON
DAİRE BAŞKANLIĞI

Yer No (DDC): R 361
243

Kayıt No : 991
Geldiği Yer : Fen Bilimleri Enst.
Tarih : 25.06.2001
Fiyat : 15.000 TL.
Fatura No : X
Ayniyat No : 1/11
Ek :

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

1986-1987 Öğretim yılında almış olduğum "Türev spektrofotometre ile kanda karboksihemoglobin miktar belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tez Çalışmamın danışmanı olarak her konuda yardımlarını esirgemeyen Yıldız Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın hocam Doç. Dr. Esin ÇURCUNLU'ya, desteklerini esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Hüseyin AVŞAR'a, Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Sıdıka SUNGUR'e ve engin bilgilerinden faydalandığım İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Doç. Dr. Sevil ATASOY'A sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deneysel çalışma olanaklarına sağlayan Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanı sayın Prof. Dr. Şemsi GÖK'e ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Araştırma laboratuvarı, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Yardımcılarına ilgi ve yardımlarından ötürü en derin şükranlarımı sunarım.

2.5.1 Türev spektrofotometresi uygulama alanları	24
2.5.2 Türev spektrofotometresinde dikkat edilecek noktalar	26
3. MALİYET VE KURUM	Mithat Bakoğlu 27
3.1 Gereçler	27
3.2 Kimyasal maddeler	29
3.3 Standart çözeltinin hazırlanması	30
3.4 Türev spektrofotometre yöntemi	31
3.5 Türev spektrofotometre yöntemi	35

İ Ç İ N D E K İ L E R

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. Hemoglobin ve yapısı	3
2.1.1 O ₂ ve CO ₂ moleküllerinin hemoglobinle birleşmesine etki eden faktörler	8
2.1.2 Hemoglobin metabolizması ve yıkımı	10
2.2 Hemoglobin çeşitleri	12
2.2.1 Karboksihemoglobin	12
2.2.2 Sülfhemoglobin	13
2.2.3 Azotmonoksit hemoglobin	14
2.2.4 Methemoglobin	14
2.3 Karboksihemoglobinin kantitatif tayin metodları	16
2.3.1 Mikrodifüzyon metodu ile CO tayini	16
2.3.2 Infrared ile CO tayin yöntemi	17
2.3.3 Gaz kromatografi ile CO tayini	17
2.3.4 Spektrofotometrik yöntemlerle karbok- sihemoglobin tayinleri	18
2.5 Türev spektrofotometresi	23
2.5.1 Türev spektrofotometresi uygulama alanları.	24
2.5.2 Türev spektrofotometresinde dikkat edile- cek noktalar	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 Gereçler	27
3.2 Kimyasal maddeler	29
3.3 Standart çözeltilerin hazırlanması	30
3.4 Türev spektrofotometre yöntemi	31
3.5 Tietz spektrofotometre yöntemi	35

3.6 İstatistik formüller	36
3.6.1 Aritmetik ortalama ve standart sapma . .	36
3.6.2 Küçük eşlenmiş serilerde t testi	37
4. DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR	38
4.1 Türev spektrofotometre yöntemi ile karbok- sihemoglobin kalibrasyon eğrisinin çizilmesi	39
4.2 Tietz spektrofotometre yöntemi ile karbok- sihemoglobin kalibrasyon eğrisinin çizilmesi	58
4.3 Türev spektrofotometre yöntemi ile kalibras- yon eğrisinin tekrarlanabilirliği	60
4.4 Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı	61
4.5 Kan örneklerinde karboksihemoglobin dayanıklılığı	62
4.5.1 Türev spektrofotometre yöntemi ile Hb-CO' nun dayanıklılığının incelenmesi	62
4.5.2 Tietz spektrofotometre yöntemi ile Hb-CO' nun dayanıklılığının incelenmesi	68
4.6 Sigara içen ve içmeyen kişilerde karboksi- hemoglobin düzeyleri	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
KAYNAKLAR	81

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Tietz yöntemi sonuçları ile kıyaslan-
mış ve ayrıca sonuçların güvenilirliği istatistik yöntem-
lerle araştırılmıştır. Türev spektrofotometre yönteminde
% 80 Hb-CO'ün altındaki değerlerde kalibrasyon eğrisi doğ-
rusallığı korunmuştur.

Bulguları sunulan bu çalışmada 2. derece türev
spektrofotometre yöntemi ile kandaki karboksihemoglobin mik-
tar belirlenmesi hassas, hızlı, kolay, ucuz ve güvenilir
bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

Ö Z E T

Karbon monoksit gazı kış mevsiminde yakacak olarak kullanılan katı ve sıvı maddelerin yanlış veya tam yanmasından olduğu gibi fabrika bacaları ve otomobil eksozlarından havaya yayılır. Havadaki CO oranı (1/ 200) çok düşük olmasına rağmen kanda kendini gösterir. Bu nedenle teknolojik gelişmeye paralel olarak çevre kirliliğinde CO'in etkisi artmaktadır.

CO'in hemoglobinle birleşerek karboksihemoglobin oluşturması hem oksihemoglobin miktarının azalmasına hem de oksijen taşınımının engellenmesine ve kişilerde Hb-CO düzeylerine bağlı olarak çeşitli semtomlara neden olur.

Hb-CO'in bu etkilerinden dolayı kandaki miktarlarının belirlenmesi klinik, toksikoloji, ve acil laboratuvarlarda önem kazanmaktadır. Kanda Hb-CO miktarı tayin etmek için uygulanan yöntemlerden en önemlilerinden biri Tietz'in kolorimetrik yöntemidir. Fakat bu yöntem ile düşük miktarlardaki Hb-CO tayini yeterince hassas olamamaktadır.

Bu çalışmada türev spektrofotometre yönteminde 2. derece türev spektrumları ile sigara içen ve içmeyen kişilerin kanlarında Hb-CO miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tietz yöntemi sonuçları ile kıyaslanmış ve ayrıca sonuçların güvenilirliği istatistik yöntemlerle araştırılmıştır. Türev spektrofotometre yönteminde % 80 Hb-CO'in altındaki değerlerde kalibrasyon eğrisi doğrusallığı korumuştur.

Bulguları sunulan bu çalışmada 2. derece türev spektrofotometre yöntemi ile kanda karboksihemoglobin miktar belirlenmesi hassas, hızlı, kolay, ucuz ve güvenilir bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

A B S T R A C T

Carbon monoxide flows into the air, because of incorrect or partial combustion of solid and liquid fuels, used in winter, as well as from exhaust gases of motor vehicles. Its concentration in the air is very low (1/200), however CO effects human blood. Because of this reason the effects of CO to the air pollution increase parallel to the technological development.

CO combines with hemoglobin thus prevents oxygen transportation and decreases the available amount of oxyhemoglobin, therefore it shows various symptoms on persons.

Because of the above explained effects of CO, determination of its percentage in human blood is important in the toxicology and emergency laboratories. One of the important methods for the determination of the percentage of COHb is Tietz's colorimetric procedure, but its sensitivity is low for small percentages of COHb.

In the present study, the percentage of COHb contents were determined in smoking and non-smoking persons by using the derivative spectroscopy technique and examining second derivative spectra. The results obtained were compared with the ones obtained through the use of Tietz's method. Furthermore, the experimental data were examined by statistical methods and confidence limits were evaluated. The calibration curve is linear, for concentration values below 80 % COHb, in the derivative spectroscopy method.

According to the results of this study, we can conclude that second derivative spectrophotometer technique for the determination of COHb content in blood, is a very sensitive, fast, easy and cheap procedure.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbon monoksit renksiz, kokusuz ve tatsız bir gazdır. Organik maddelerin iyi yanmamasından oluşur. İlk olarak 1776 yılında Lassone tarafından keşfedilmiş ve aynı yüz yılda Priestley tarafından kimyasal bileşimi açıklanmıştır.

Karbon monoksitin keskin zehirli bir gaz olduğu eskiden bu yana bilinmektedir. Küçük miktarlardaki karbon monoksite uzun süre maruz kalmaya bağlı olarak kronik zehirlenme az bilinir, fakat önemlidir. /1/

Karbon monoksitin başlıca oluşum sebepleri gaz, içten yanmalı motorlar, gazlı aydınlatıcılar, gazlı ısıtıcılar, kusurlu sobalar ve kalorifer kazanlarıdır. Bunlara bağlı olarak iyi havalandırılmayan odalarda, kapalı yerlerde açık mangal kullanılarak ısıtılmak istenildiğinde karbon monoksit zehirlenmeleri olabilir. Çağımızda teknolojik gelişmeye paralel olarak fabrika baca gazları ve otomobil eksozlarından çıkan karbon monoksit gazı endüstri merkezi şehirlerinde çevre kirliliği açısından önem arz etmektedir. Karbon monoksitin zehirlenme etkisi solunum yolu ile alınan CO'nun hemoglobinle birleşerek oksijen taşınımını engellemesi sonucu oluşur. Bu nedenle klinik önemi olan gazdır.

Ülkemizde karbon monoksit zehirlenmeleri önemli boyutlardadır. Kesin ölüm nedeni zehirlenme olan olguların büyük bir kısmını oluşturur. Bu nedenle gerek postmortem toksikoloji gerekse acil toksikoloji açısından kan örneklerinde karbon monoksit belirlenmesi doğru, güvenilir, kolay ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi şarttır. Kanda karbon monoksit düzeylerinin belirlenmesinde kullanılabilecek

en güvenilir yöntemin gaz kromatografisi gibi pahalı, kullanımı oldukça güç bir gereçle yapılabilmesi nedeni ile kanda karbon monoksit gazı yerine karboksihemoglobin düzeylerinin ölçümü daha yaygın olarak gerçekleştirilir.

Hemoglobinin görünür alanda absorbands ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntemin pek çoğunda ya ortamda bulunan hemoglobin pigmentlerinin biri yada bir kaçı hiç tayin edilememekte veya küçük örneklere gerekli duyarlılık bulunamamaktadır. Soret bölgesinde çift bileşenli sistemlerin spektrofotometrik belirtimi ise daha duyarlıdır. Çünkü bu bölgede hemoglobin pigmentlerinin gösterdiği absorbands görünür bölgedeki absorbandslarından yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu gibi tüm hemoglobin pigmentlerinin belirtimini de mümkün kılar. /2/ Ancak Small ve arkadaşlarının /3/ önerdiği bu yöntemle çalışırken tayin edilen hemoglobin pigmentlerinin sayıca fazlalığı nedeni ile ayrıca düzeltilmesi gerektiği gibi kullanılan 4 ayrı dalga boyunun çok dikkatle seçilmesi gereklidir.

Bulguları sunulan bu çalışmada türev spektrofotometresi kullanılarak kanda karboksihemoglobin düzeylerinin belirtimi amaçlandı. Sigara içen ve içmeyen kişilerin kan örnekleri gerek türev spektrofotometresi gerekse yaygın olarak kullanılan bir kolorimetrik yöntemle /4/ incelendi. Aralarındaki korelasyon niteliği ve her iki yöntemin duyarlılığı araştırıldı.

2.I. HEMOGLOBİN VE YAPISI

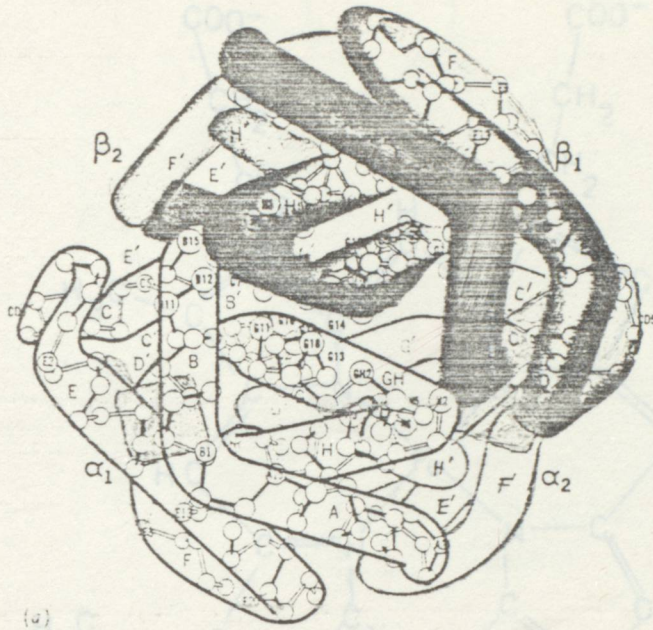
Hemoglobin bir polipeptit zinciri olan dört adet hemin (Ferro protoporfirin III) demirleriyle bir globin molekülünün histidinlerinin imadezol azotlarına bağlanmasından oluşmuş bileşik proteindir. Hemoglobinin % 96'si globin ve % 4'ü hem ihtiva eder. Globin kısmı iki çift polipeptit zinciri yani iki α iki β zincirinden ibarettir. (Şekil 2.I.)

Hemoglobin insan kanında üç farklı biçimde bulunur. Birincisi hemoglobinin büyük bir kısmını oluşturan (% 85) hemoglobin A, α_2 ve β_2 zincirlerinden oluşur. İkinci hemoglobin tipi hemoglobin A₁ (% 3), α_2 δ_2 zincirlerinden oluşur. Üçüncüsü fetusta bulunan hemoglobin F ise α_2 γ_2 zincirlerinden ibarettir.

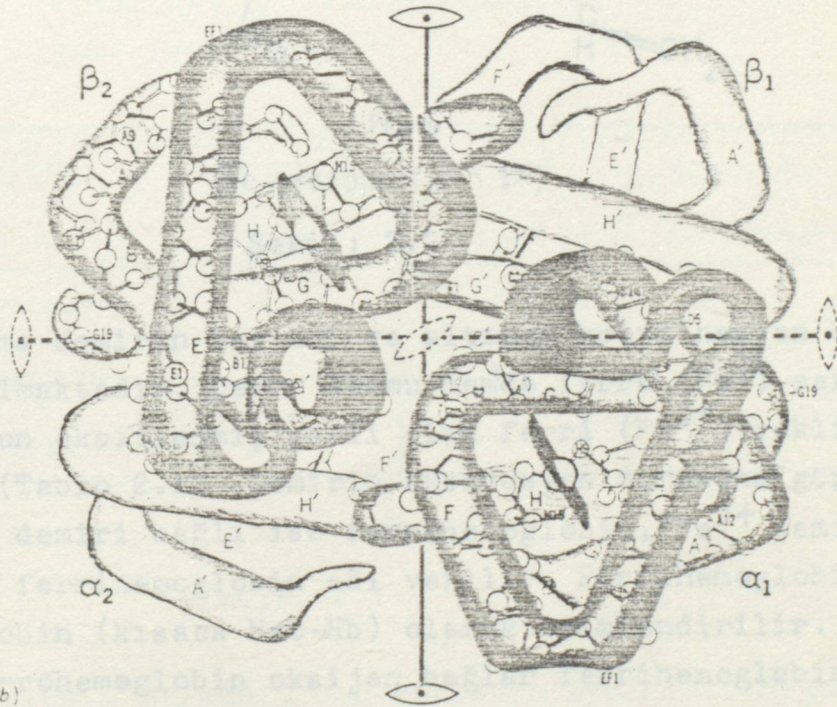
Hemoglobin α ve β zincirlerinin üç boyutlu yapıları ve amino asit dizilişleri myoglobine göre farklı olmasına rağmen benzerlikler vardır.

Hemoglobinin bir kısmını oluşturan hem, organik ve anorganik kısımlardan meydana gelmiştir. Hemin organik kısmı dört pirol gurubunun metin (CH-) köprüleri ile birbirine bağlanarak halkalaşmak suretiyle oluşmuştur. Burada dört metil (CH₃-), iki vinil (CH₂=CH-) ve iki propionik (CH₃-CH₂-COOH) tetra pirol zincirlerin kenarlarına bağlanmıştır. (Şekil 2.2.) Bu substituenler farklı bağlanarak onbeş izomer oluştururlar. Biyolojik sistemlerde sadece onbeş izomeri olan protoporfirin IX'dır. /5/ Protoporfirin IX'de şekil 2.3. de görüldüğü gibi merkezindeki dört azot atomlarına Fe atomu bağlanması hem düzleminin her iki ke-

şeklinde iki bağın katılmasıyla olur. (Şekil 2.3.)



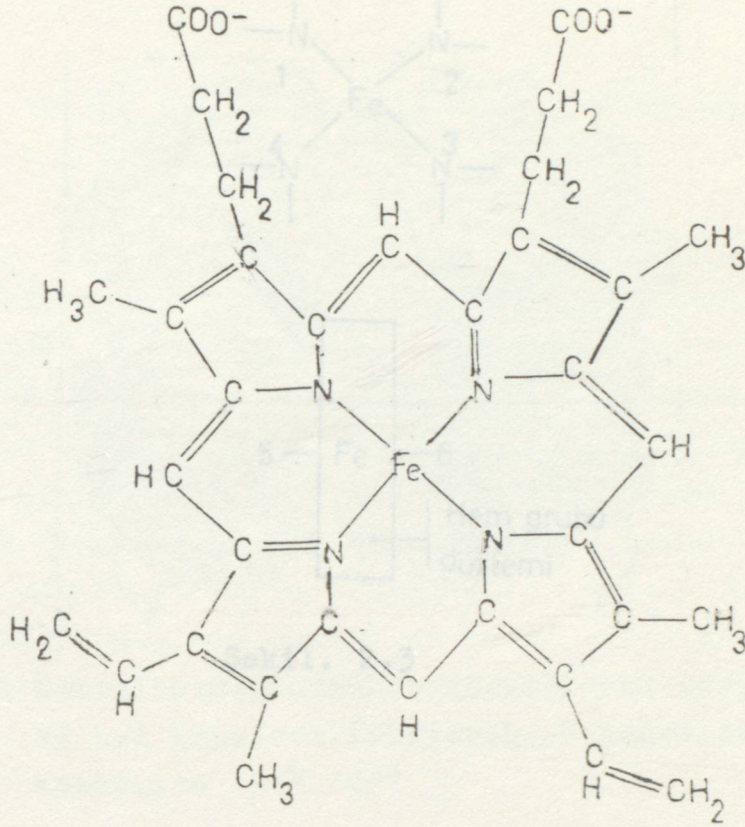
(a)



(b)

Şekil.2.1 Yetişkin insan hemoglobininin (HbA) α , β iki ayrı çift zincirlerinin ($\alpha_2\beta_2$ 'nin) subunit yapısı. (White, A. Handler, P. and et al. Principles of Biochemistry, Tokyo 1978)

narında iki bağı katılmasıyla olur. (Şekil 2.3.)

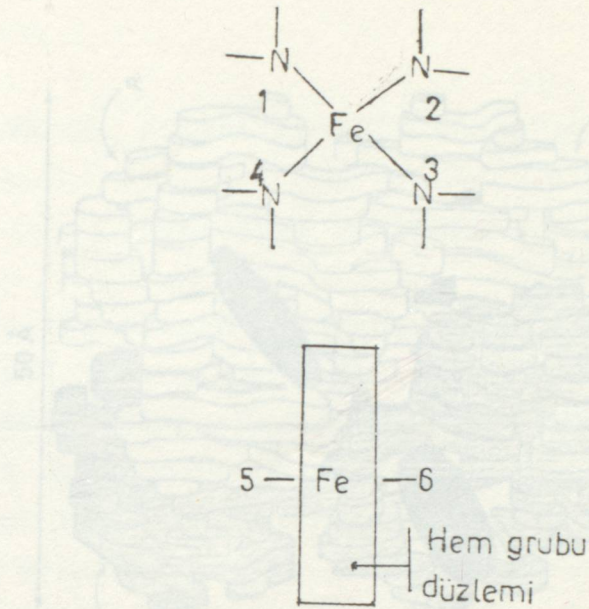


Hem

(Fe-protoporfirin IX)

Şekil: 2.2

Bu bağlanma demirin beşinci ve altıncı koordinasyon basamağında olmaktadır. Demir atomu hemde ferro (Fe^{2+}) şeklinde ve bunun oksitlenmiş şekli olan ferri (Fe^{3+}) şeklinde bulunur. (Tablo 2.1) Demirin oksidasyon durumuna göre heme Fe^{2+} demiri bağlı ise ferrohemoglobin, Fe^{3+} demiri bağlı ise ferrihemoglobin adı verilir. Ferrihemoglobin, methemoglobin (kısaca Met-Hb) olarak isimlendirilir. Yanlız ferrohemoglobin oksijen bağlar ferrihemoglobin oksijen bağlayamaz. Bu durum myoglobindedeydir. Hemoglobin eritrositlerin % 35'ini teşkil eder. Molekül ağırlığı 66 000'dir. /6.7/

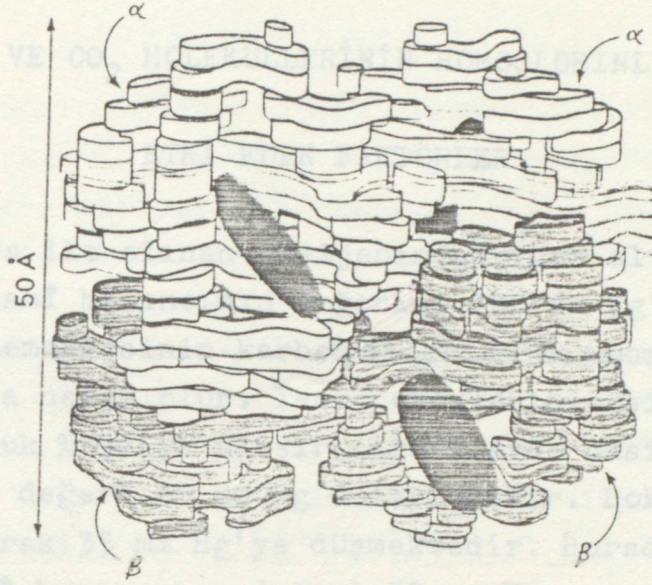


Şekil. 2.3

Hemoglobin şekli	Fe'nin ok. durumu	5.koordi-nasyon yeri	6.koordi-nasyon yeri
Deoksihemoglobin	+2	His F 8	Boş
Oksihemoglobin	+2	His F 8	O ₂
Ferrihemoglobin	+3	His F 8	H ₂ O

Tablo. 2.I

Hemoglobin molekülü son yıllarda aydınlatılmıştır. Hemoglobin molekülü genel olarak küresel yapıya sahip ve 55 Å^o çapındadır. Dört zincir tetrahedral düzende paketlenmiştir. (Şekil.2.4.) Herbir subunitte molekül dış yarıklarına hem grubu yerleşmiştir. Dört oksijen bağı ayrı ayrı uzunlukta



Şekil.2.4 Hemoglobinin düşük çözücülerdeki görünümü. α ve β hem grupları. (Stryer, L. Biochemistry, San Francisco 1975 /5/)

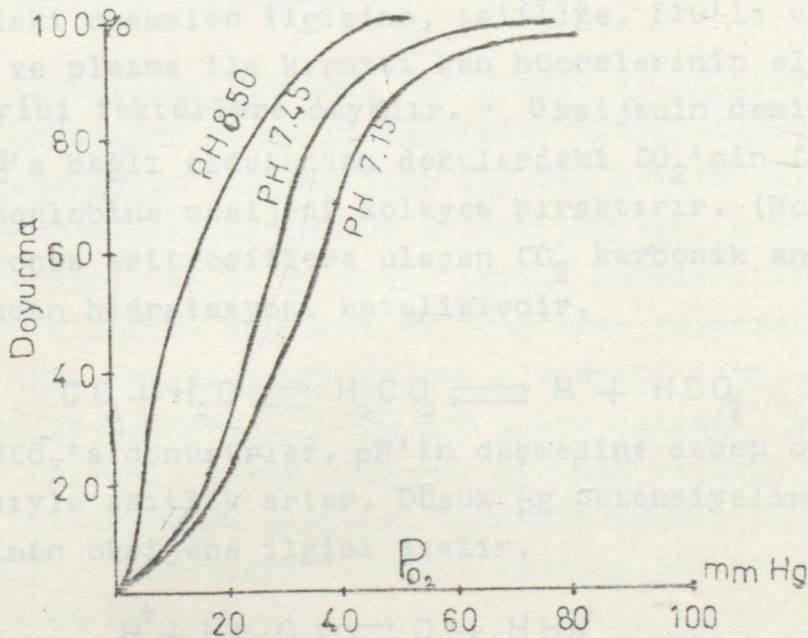
ve birbirine yakın iki demir atomlarının arası 25 \AA 'dır. Her bir α zinciri her iki β zinciri ile temastadır. Aksine iki α ve iki β zinciri kendi arasında birbirine temas etmez.

Hemoglobinin esas fonksiyonu oksijen gerilimi yüksek olan akciğerlerden gerilimin düşük olduğu dokulara oksijeni kendine bağlayarak taşımaktır. Stabil oksijen komplekslerinden ve Fe^{3+} hem'leri dışında oksijenin hemoglobine reversibl olarak birleşmesi eşsiz bir özelliktir. Oksijen hemoglobine birleşerek oksihemoglobin (HbO_2) oluşturur. Demir atomları herbir dört hem grubu molekülüne O_2 bağlar. Burada üç molekül O_2 'nin hemoglobine afinitesi aynı değeri ise farklı seviyededir.

2.1.1. O₂ VE CO₂ MOLEKÜLLERİNİN HEMOGLOBİNLE BİRLEŞMESİNE

ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Hava ile alınan oksijenin akciğer alveollerinde oksijenin kısmî basıncının değerini 100 mm Hg'e ulaştırır. Bu durum hemoglobinin karbon dioksidi bırakmasına oksijeni bağlamasına neden olur. Yani hemoglobin oksijenle doyar. Bu doymuşluk % 96'ya ulaşır. Arterlerde oksijenin kısmî basıncının değeri 40 mm Hg dolayındadır. Dokularda ise daha azalarak 35 mm Hg'ya düşmektedir. Burada karbon dioksidin kısmî basıncının değeri 50 mm Hg civarındadır. Vena kanında hemoglobin oksijenle doymuşluğu % 64'dür. Bu demektirki % 32'lik kısmı dokularda bırakılmıştır. (Şekil. 2.5.)

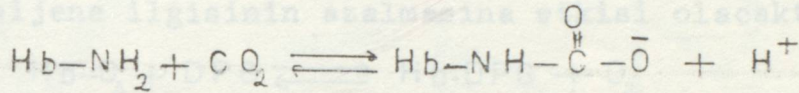


Şekil.2.5 Hemoglobinin oksijen afinitesine PH'in etkisi

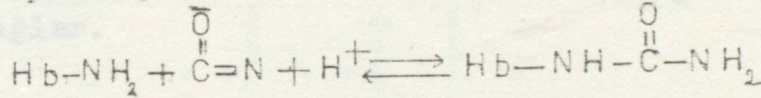
Normal kanın 100 ml'sinde 15 g. hemoglobin vardır. 1 g. hemoglobin 1,34 ml O₂ taşır. 100 ml kanın oksijen taşıma kapasitesi ise

$$0.32 \times 1.34 \times 15 = 6.4 \text{ ml O}_2 \text{ dir.}$$

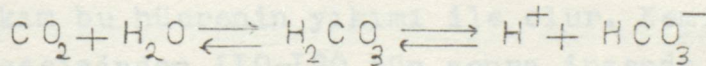
Oksijen hemoglobinden ayrılıp plazma yolu ile dokulara diffuzlenirken CO₂'de tam tersi yol izleyerek dokulardan eritrositlere diffuzlenir. Karbondioksit hemoglobindeki amin grubuyla birleşerek karbhemoglobin oluşturur.



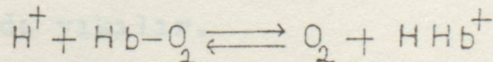
Hemoglobine CO₂ bağlanması reversibildir. Sadece sondaki α amino gurublara CO₂ bağlanır. Bu birleşmeden sonra diğer dört amino gurubu siyanatla reaksiyona girer. CO₂ ile bağ yapamaz.



Hemoglobinin oksijen ve karbon dioksidin dokulardaki yer değişimi, oksijen basıncının düşmesine CO₂'in: oksijene nazaran aynı şartlarda hemoglobine ilgisi daha fazla oluşuna, dokularda oluşan pH değişikliklerine, proteinlerle CO₂' arasındaki reaksiyon ilgisine, asitliğe, DPG'li ortamın etkisi ve plazma ile kırmızı kan hücrelerinin elektrolitik durumu gibi faktörlere dayanır. Oksijenin demire bağlanması pH'a bağlı olduğundan dokulardaki CO₂'nin fazlalığı oksihemoglobine oksijeni kolayca bıraktırır. (Bohr etkisi) Diffuzyonla eritrositlere ulaşan CO₂ karbonik anhidraz tarafından hidratasyona katalizlenir.

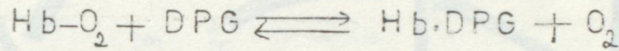


H⁺ ve HCO₃⁻'a dönüşürler. pH'in düşmesine sebep olurlar. Dolayısıyla asitlik artar. Düşük pH potansiyelinde hemoglobinin oksijene ilgisi azalır.



Akciğerlerde CO₂'nin azlığı pH'in artışına ve dolayısıyla hemoglobinin oksijene ilgisini artırır. Oksijenle hemoglobinin doyurulmasına izin verilir.

Bunların yanında oksihemoglobinden oksijenin koparılmasına etki eden enzim 2,3- difosfogliseratdır. (DPG). Bu anorganik fosfat eritrosit fosfatın büyük bir kısmını oluşturur. Hücre arası sıvısındaki konsantrasyonu 4-5 mM'dır. Buda yaklaşık hemoglobin konsantrasyonuna eşittir. Notür PH'da 1/1 molar kompleksinde tetramerik Hb'de DPG bağ sabitini (K_{as}) $10^5 M^{-1}$ 'dır. Hb-O₂ bağ sabitinden yalnızca 1/100 oranında büyüktür. DPG için bağ sabitindeki bu fark Hb'in oksijene ilgisinin azalmasına etkisi olacaktır.

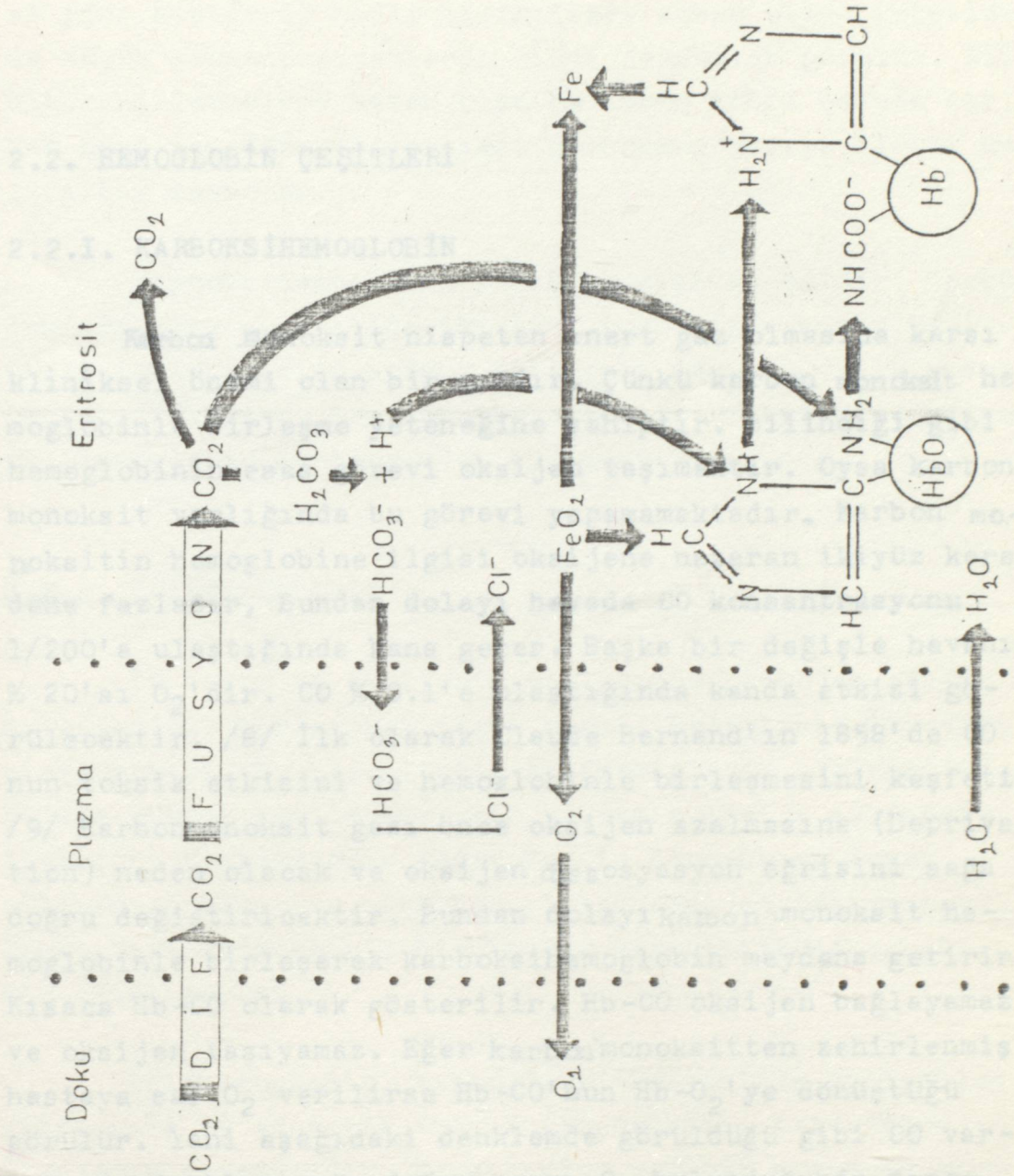


Böylece [Hb-O₂] karışımında [DPG] artması Hb-O₂'nin dissosiasyonunu artırır. Oksijen kısmı basıncının artması Hb-DPG kompleksinin dissosiasyonunu artırarak Hb-O₂'nin düzenlenmesini sağlar.

Dokularda oluşan bu olayları şematik olarak şekil 2.6 da görülmektedir.

2.1.2. HEMOGLOBİN METABOLİZMASI VE YIKIMI

Hemoglobin yetişkin insanlarda kemik iliğinde, fetusta ise karaciğer ve diğer dokularda oluşmaktadır. Yetişkinlerde hemoglobin oluşumu için gereken hem ve globin birbirine uygun miktarlarda günlük olarak yapılırlar. 8 g. globin, 280 g. porfirin ve 27 g. demir hergün yenilenir. Hemoglobin insanda ve birçok hayvanda eritrositler içindedir. Normal olarak yıkım bu hücrenin yıkımı ile olur. Kemik iliğinden dolaşıma geçişinden 110-120 gün sonra insanda özellikle karaciğer, dalak ve kemik iliğinde bulunan retikülo-endotelyal sistem hücrelerinde yıkılır. Retikülo-endotelyal sistemde makrofajlar tarafından fagosite olurlar. Hemoglobin ayrıca karaciğerde de yıkılır.



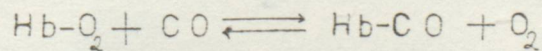
Şekil.2.6 Karbon Monoksitin dokulardan eritrositlere diffüzlennesinin şematik görünümü. (White, A. Handler, P. Principles of Biochemistry, Tokyo 1978 /9/)

Uzun süre cadde ve sokaklarda çalınan trafik polisi gibi kişilerde hafif belirtilere sebep olur. Çocuklar da düşük konsantrasyonlarda ciddi septomalar görülür. Klinik zehirlenmelere neden olan bu durum temiz havada bir

2.2. HEMOGLOBİN ÇEŞİTLERİ

2.2.I. KARBOKSİHEMOGLOBİN

Karbon Monoksit nispeten inert gaz olmasına karşı kliniksel önemi olan bir gazdır. Çünkü karbon monoksit hemoglobinle birleşme yeteneğine sahiptir. Bilindiği gibi hemoglobinin esas görevi oksijen taşımaktır. Oysa karbon monoksit varlığında bu görevi yapamamaktadır. Karbon monoksitin hemoglobine ilgisi oksijene nazaran ikiyüz kere daha fazladır. Bundan dolayı havada CO konsantrasyonu 1/200'a ulaştığında kana geçer. Başka bir deyişle havanın % 20'si O₂'dir. CO % 0.1'e ulaştığında kanda etkisi görülecektir. /8/ İlk olarak Claude Bernard'ın 1858'de CO'nun toksik etkisini ve hemoglobinle birleşmesini keşfetti. /9/ Karbonmonoksit gazı önce oksijen azalmasına (Deprivation) neden olacak ve oksijen dissosyasyon eğrisini sağa doğru değiştirecektir. Bundan dolayı karbon monoksit hemoglobinle birleşerek karboksihemoglobin meydana getirir. Kısaca Hb-CO olarak gösterilir. Hb-CO oksijen bağlayamaz ve oksijen taşıyamaz. Eğer karbonmonoksitten zehirlenmiş hastaya saf O₂ verilirse Hb-CO'nun Hb-O₂'ye dönüştüğü görülür. Yani aşağıdaki denklemde görüldüğü gibi CO varlığında denklem sağa doğru aşırı O₂ bulunduğunda denge sola doğru daha etkin olacaktır.



Karbon monoksit zehirlenmesi sağlıklı kişilerde farklı konsantrasyonlarda belirli sürelerde ayrı ayrı belirtiler gösterir. Bunlar baş ağrısı, baş dönmesi, kuvvet azalması, mide bulantısı, baygınlık, derin koma hali, soluk alamama, solunum engellenmesi ve ölümlle sonuçlanan olaylardır.

Uzun süre cadde ve sokaklarda çalışan trafik polisi gibi kişilerde hafif belirtilere sebep olur. Çocuklar da düşük konsantrasyonlarda ciddi septomlar görülür. Klinik zehirlenmelere neden olan bu durum temiz havada bir kaç saat teneffüs ettirilirse karbonmonoksitle ilgili belirtiler kaybolur.

Karboksihemoglobin pembe kırmızı renklidir. Spektrumları sarı ve yeşilde iki ayrı absorsiyon bandı verir. Güçlü indirgen olan sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ile muamele edildiğinde bu bantlar değişmemekte ve kolayca değişen oksihemoglobin bantlarından ayrılmaktadır. /6/

2.2.2. SÜLFHEMOGLOBİN

In vitro ve oksijenin varlığında hidrojen sülfür hemoglobinle birleşerek yeşil renkli hemoglobin ürevini oluştururlar. Bu hemoglobine sülfhemoglobin adı verilir. Burada kükürt hem'le birleşir ve demir (Fe) +2 değerliklidir. Oksidasyonla demir Fe^{3+} 'e döndürür ve ferri sülfhemoglobin olur. Sülfhemoglobin oksijen taşıyamaz. Fakat karbonmonoksitle birleşerek karboksi-sülfhemoglobin oluştururlar.

Sülfhemoglobin, hastaların tedavisinde kullanılan sülfonamid ve aromatik aminli (Phenacetin, acetanilid) ilaçların alınmasında, Clostridium Welchii yüzünden oluşan bakteriemilerde ve bağırsak bakterilerinin proteinlere etkisi ile oluşan H_2S 'in emilmesi süreti ile olur.

2.2.3.AZOTMONOKSİT HEMOGLOBİN

Dört molekül azot monoksit bir molekül hemoglobinle birleşerek çok stabil Hb-NO'yu oluştururlar. Özellikle hemoglobinin nitritli dumanlarla tütsülenmesi ile oluşur. Pembe renklidir.

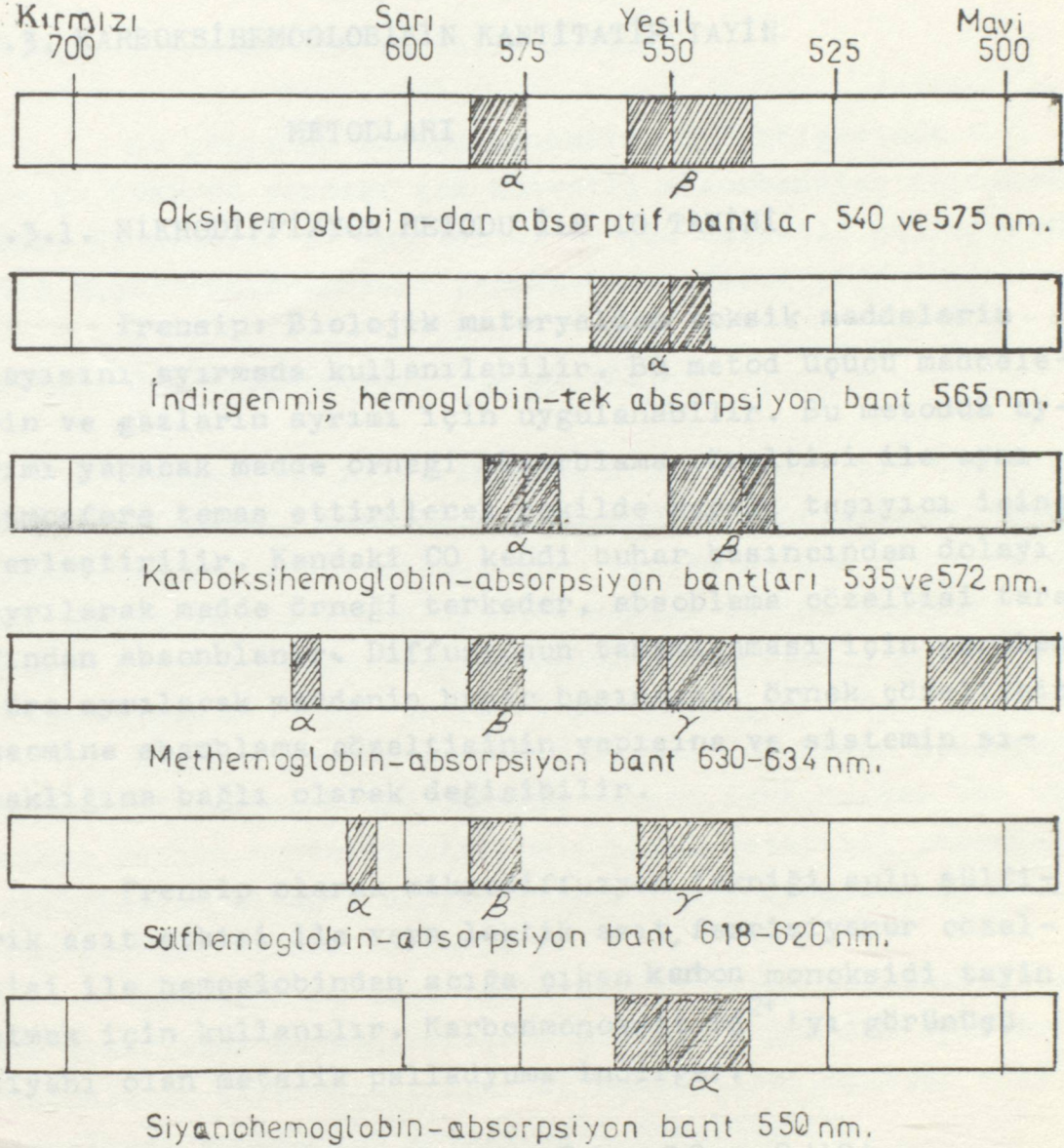
2.2.4.METHEMOGLOBİN

Hemoglobin demirinin oksitlenmesi sonucu Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e dönüşmesi ile olur. Bunun nedeni hemoglobine oksitleyici etkilidir. Salisilatlar,asetanilid, fenasetin amil nitrit,ve sülfamidler gibi ilaçlar bu oksitlenmeye neden olabilmektedir. Methemoglobindeki demir +3 değerlikli olduğundan oksijen bağlayamaz. Methemoglobin asidik veya bazik ortamlarda bir çok anyonlarla birleşebilir. Örneğin CN^{-} ile methemoglobin birleşmesinden siyanomethemoglobin meydana gelmesi gibi azid ve sülfürlerle de birleşebilir.

Methemoglobin kahverenkli bir bileşiktir ve spektrumda kırmızı üzerinde kuvvetli absorpsiyon bantları tipiktir.

Oksihemoglobin açık kırmızı renklidir ve sarı yeşilde 577 ve 540 nm'de iki dar absorpsiyon bantı verirler. Karbhemoglobin spektrumu değiştirmez. Oksihemoglobin ve karbhemoglobin yapıları ile ilgili açıklamalar hemoglobin bahsinde açıklanmıştır.

Hemoglobin ve türevlerinin hangi bölgelerde maksimum absorpsiyon verdiklerini şekil.2.7 'de görülmektedir.



Şekil.2.7

Bu hemoglobin çeşitlerinden başka hemoglobin yapısında değişmeler sonucu oluşan anormal hemoglobinler vardır. Anormal hemoglobinler hemoglobin A, hemoglobin A₁ ve hemoglobin F'nin genellikle protein kısmında globin zincirlerinde anormalisel görünümlerdir. Dünyanın belirli ülkelerinde farklılık gösterirler.

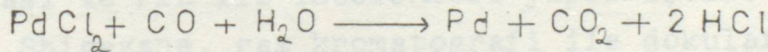
2.3. KARBOKSİHEMOGLOBİNİN KANTİTATİF TAYİNİ

METODLARI

2.3.1. MİKRODİFFÜZYON METODU İLE CO TAYİNİ

Frensip: Biyolojik materyalden toksik maddelerin sayısını ayırmada kullanılabilir. Bu metod uçucu maddelerin ve gazların ayırımı için uygulanabilir. Bu metodda ayırımı yapacak madde örneği absorblama çözeltisi ile aynı atmosfere temas ettirilerek şekilde kapalı taşıyıcı içine yerleştirilir. Kandaki CO kendi buhar basıncından dolayı ayrılarak madde örneği terkeder, absorblama çözeltisi tarafından absorblanır. Diffuzyonun tamamlanması için gereken süre ayrılacak maddenin buhar basıncına, örnek çözeltinin hacmine absorblama çözeltisinin yapısına ve sistemin sıcaklığına bağlı olarak değişebilir.

Frensip olarak mikrodifüzyon tekniği sulu sülfirik asit etkisi ile veya laktik asit, ferrisiyanür çözeltisi ile hemoglobinden açığa çıkan karbon monoksidi tayin etmek için kullanılır. Karbonmonoksit Pd^{2+} 'ya görünüşü siyahı olan metalik palladyuma indirger.



Karbon monoksit miktarı indirekt olarak, indirgenmiş palladyum miktarı tayini veya reaksiyonda oluşan hidroklorik asit miktarı tayini ile yapılabilir. Biri kolorimetrik diğeri titrimetrik metoddur. Bu metodda hemoglobinden karbon monoksidin ayrılmasını sağlamak için % 10'luk H_2SO_4 kullanılması düşünülürse özellikle formik asitten karbon monoksite dönüşebilir oluşu yanlış sonuçlar doğurabilir. Bunu önlemek için laktik asit, ferrisiyanür çözeltisi kullanmak daha uygun olur. /4,10,11/

2.3.2. INFRARED İLE CO TAYİN YÖNTEMİ

Bu yöntemde karbon monoksit I.R.bölgesinde 4.6 $m\mu$ dalga boyunda verdiği çok kuvvetli absorbanstan faydalanılır. Bu metodla CO'nun tanımı ve çok dikkatli kalibrasyon ile miktar belirlenmesi yapılabilir. /12,13,14/

2.3.3. GAZ KROMATOĞRAFI İLE CO TAYİNİ

Kandaki CO miktarını gaz kromatografi ile tayin etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Karboksihemoglobine sülfat asidi etkisi ile oluşan CO'nun uygun kolonda tutularak pik büyüklüğünden miktar tayini yapılır.

Diğer bir teknik karboksihemoglobine $K_3Fe(CN)_6$ etkisi ile methemoglobin ve CO vermelerinden yararlanır.

Genelde karbon monoksit Termal Kondüktör Dedektor (TCD) kullanılarak ölçülmesine rağmen daha hassas bir teknikte karbon monoksit ısıtılmış nikel katalizli kolondan geçirilerek metan'a dönüştürülür. Flame İyonizasyon Dedektorle (FID) tetkik edilebilir.

Teasarık, K. tarafından geliştirilen teknikte havada olabilecek karbon monoksit gazının 1 ppm'den az olduğu durumlarda diğer gazlardan (su buharı, azot, oksijen gibi) ayrılması ve FID ile incelenmesi yapılmıştır.

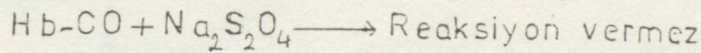
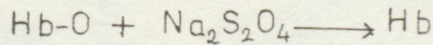
Shigezane, gaz kromatografi ile dokulardaki karboksihemoglobin düzeylerini belirtmiştir. /3,15,16,17,18/

2.3.4. SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMLERLE KARBOKSİHEMOGLOBİN TAYİNİ

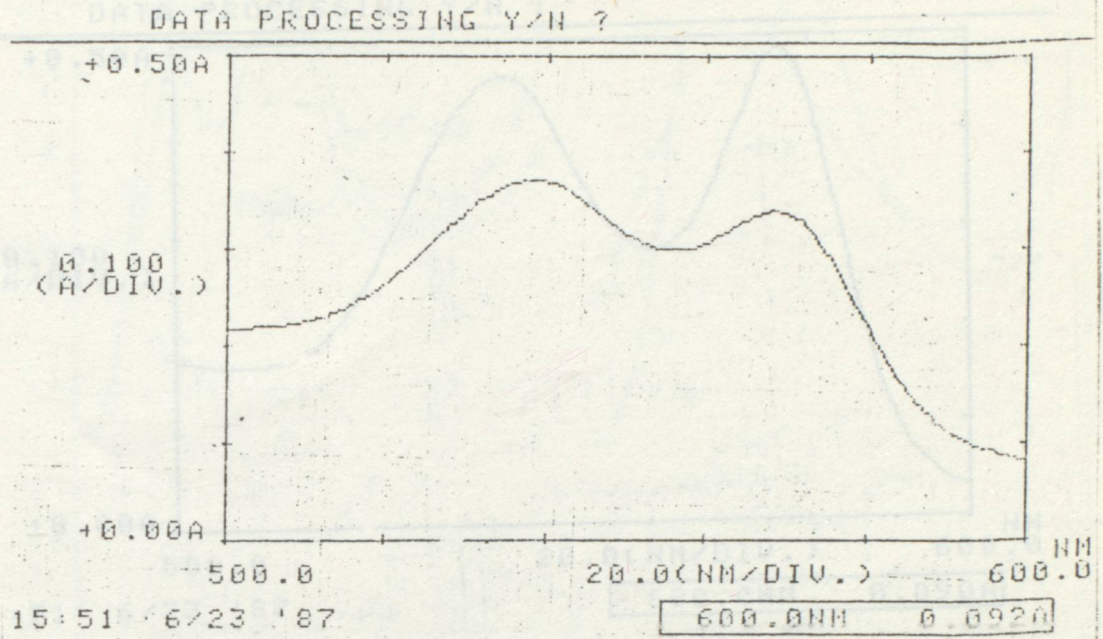
Hemoglobin ve türevlerinin kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan görünür alanda karakteristik absorpsiyon bantları vardır. Oksihemoglobin ve karboksihemoglobin alkali çözeltilerde benzer çift bantlar verirler. Bu bantlar oksihemoglobin için 576-578 ve 540-542 nm, Karboksihemoglobin için 568-572 ve 538-540 nm'dir. Deoksihemoglobin veya başka bir deyişle hemoglobin 555 nm'de bir tek geniş bant verir. (Şekil.2.7)

Zayıf alkali kan çözeltilerine sodyum ditiyonit gibi güçlü indirgeyici ilave edilirse oksihemoglobin ve methemoglobin hemoglobine indirgenir. Karboksihemoglobin bu olaydan etkilenmez. Bu durum % 100 Hb-CO ile % 100 HbO₂ sodyum ditiyonit ilave öncesi ve sonrası alınmış olunan spektrumlarda açıkça görülmektedir. (Şekil.2.8.A-B-C-D)

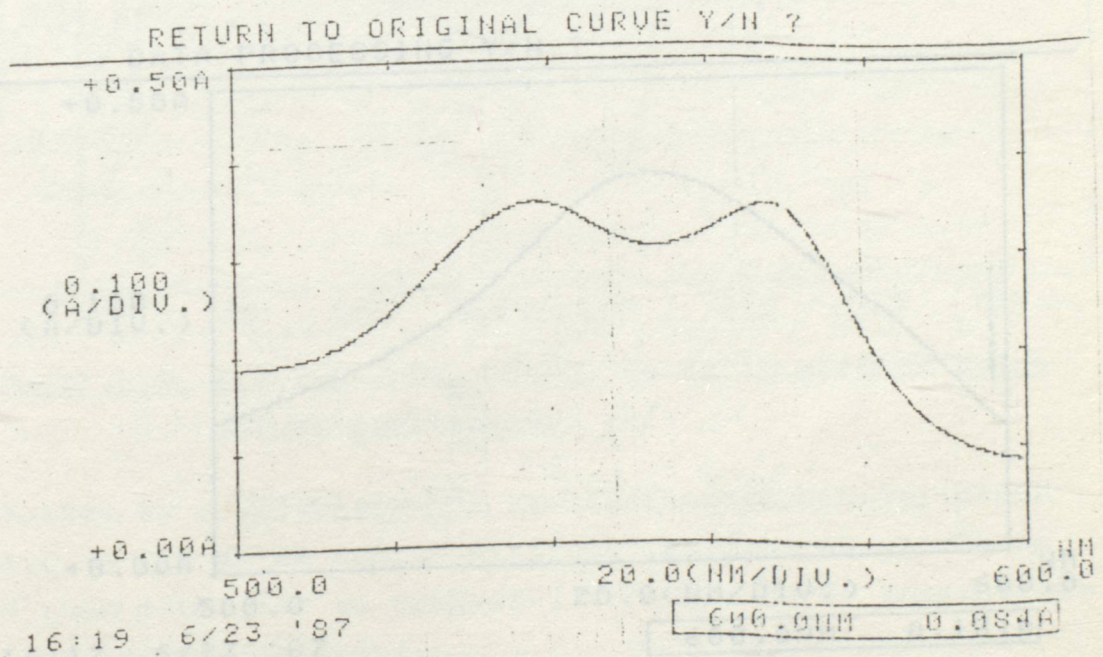
Met-Hb



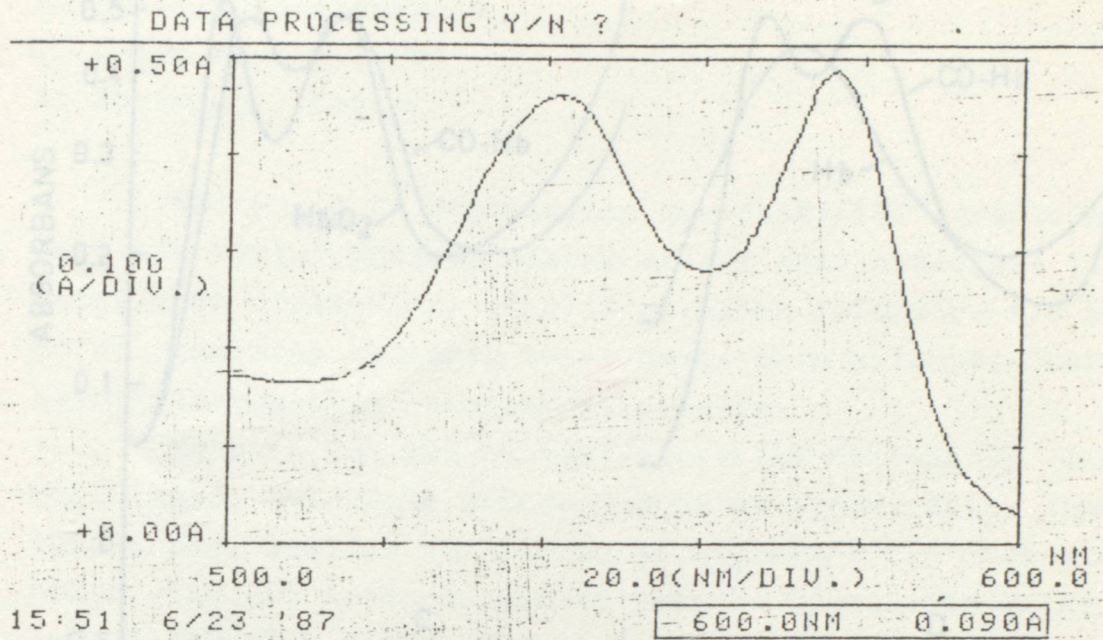
Bu reaksiyonlar karboksihemoglobin miktar belirlenmesinde spektrofotometrik ve başka birkaç yöntemin esasını oluşturur. Spektrofotometrik yöntemde hemoglobin ve türevlerinin görünür ve soğut alanda birden fazla absorpsiyon maksimumu vermeleri (Şekil.2.9.A,B,C,D) değişik dalga boylarından faydalanarak spektrofotometrik çalışmalara imkân vermiştir. Bu nedenle toksikolojide pek çok yöntemler geliştirilmiştir.



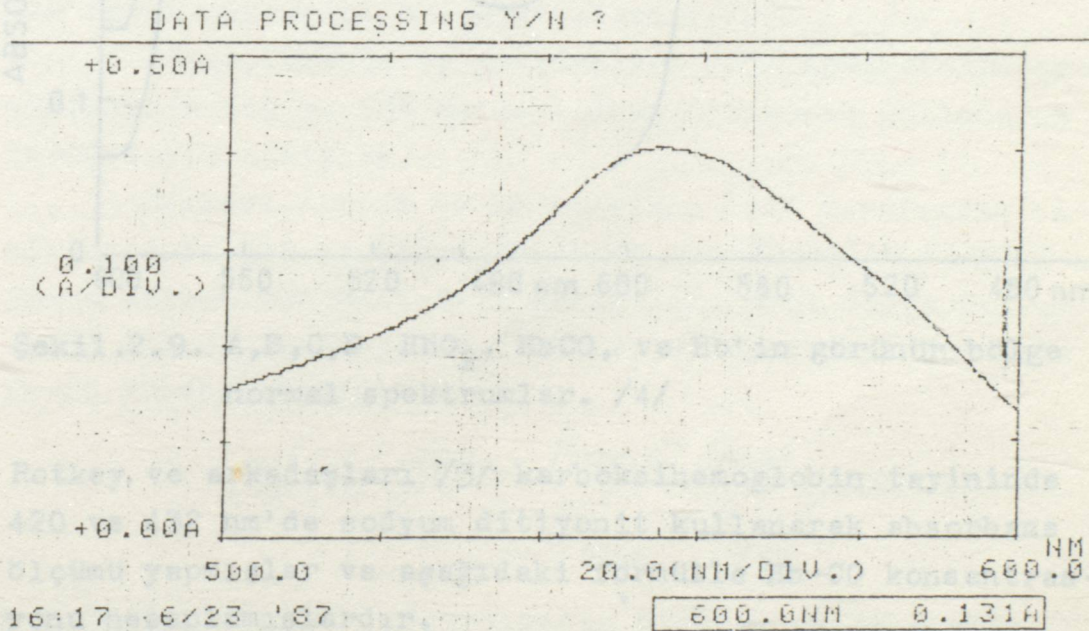
Şekil.2.8.A Karboksihemoglobine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ilave edilmeden 0.derece spektrumu.



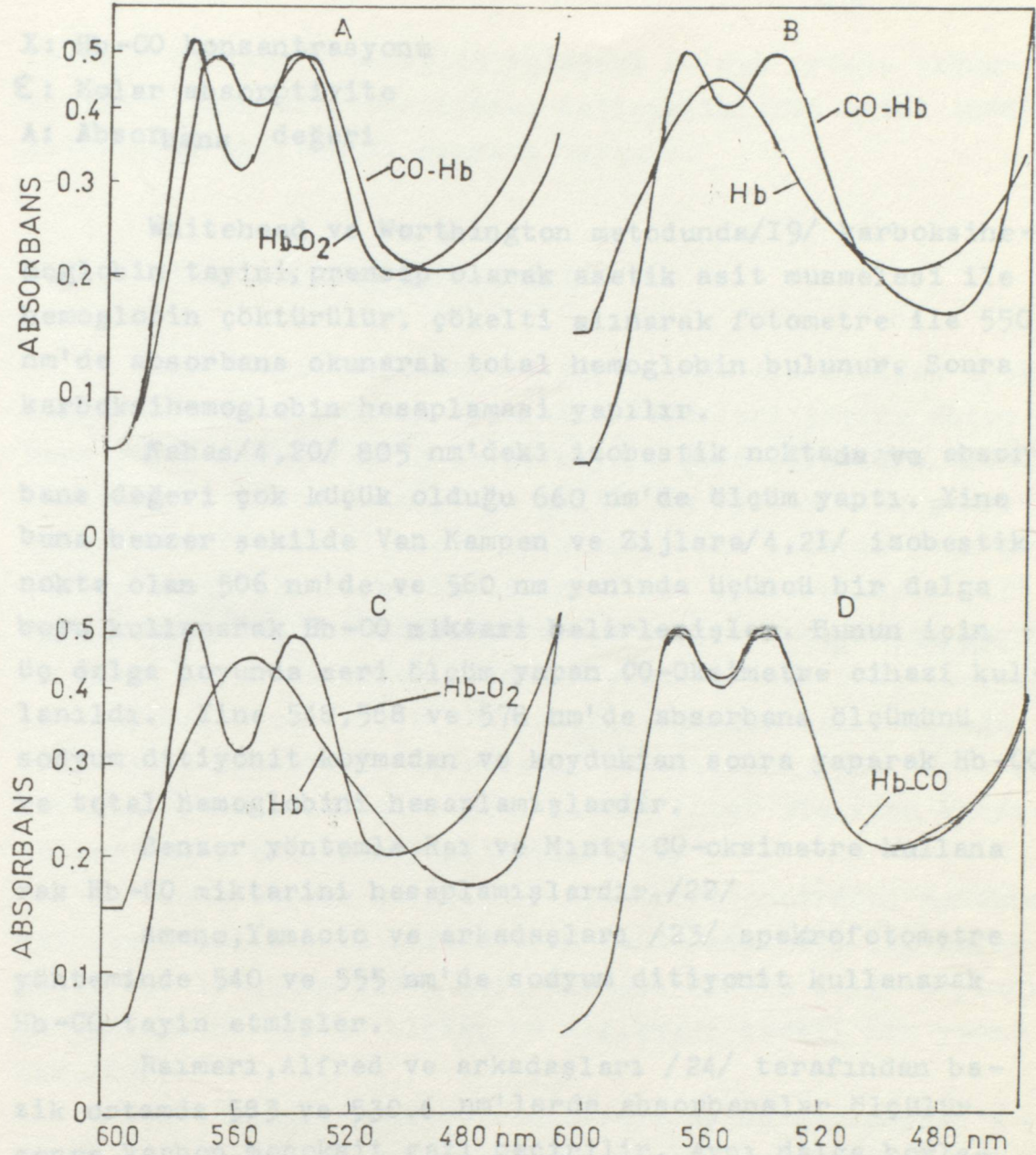
Şekil.2.8.B Karboksihemoglobine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ilave edildikten sonra 0.derece spektrumu.



Şekil.2.8.C. Oksihemoglobine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ilave edilmeden 0.derece spektrumu.



Şekil.2.8.D. Oksihemoglobine $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ilave edildikten sonra 0.derece spektrumu.



Şekil.2.9. A,B,C,D HbO₂, HbCO, ve Hb'in görünür bölge normal spektrumları. /4/

Rotkey ve arkadaşları /3/ karboksihemoglobin tayininde 420 ve 432 nm'de sodyum ditiyonit kullanarak absorban ölçümü yapmışlar ve aşağıdaki formülle Hb-CO konsantrasyonu hesaplamışlardır.

$$X = \frac{(A_{432} \epsilon_{420}^{Hb}) - (A_{420} \epsilon_{432}^{Hb})}{[A_{420} (\epsilon_{432}^{HbCO} - \epsilon_{432}^{Hb})] - [A_{432} (\epsilon_{420}^{HbCO} - \epsilon_{420}^{Hb})]}$$

X: Hb-CO konsantrasyonu
 E: Molar absorptivite
 A: Absorbans değeri

Whitehead ve Worthington metodunda/19/ karboksihemoglobin tayini, prensip olarak asetik asit muamelesi ile hemoglobin çöktürülür. çökelti alınarak fotometre ile 550 nm'de absorbans okunarak total hemoglobin bulunur. Sonra karboksihemoglobin hesaplaması yapılır.

Nahas/4,20/ 805 nm'deki izobestik noktada ve absorbans değeri çok küçük olduğu 660 nm'de ölçüm yaptı. Yine buna benzer şekilde Van Kampen ve Zijlsra/4,21/ izobestik nokta olan 506 nm'de ve 560 nm yanında üçüncü bir dalga boyu kullanarak Hb-CO miktarı belirlemişler. Bunun için üç dalga boyunda seri ölçüm yapan CO-Oksimetre cihazı kullanıldı. Yine 548,568 ve 578 nm'de absorbans ölçümünü sodyum ditiyonit koymadan ve koyduktan sonra yaparak Hb-CO ve total hemoglobini hesaplamışlardır.

Benzer yöntemle Rai ve Minty CO-oksometre kullanarak Hb-CO miktarını hesaplamışlardır./22/

Ameno, Yamaoto ve arkadaşları /23/ spektrofotometre yönteminde 540 ve 555 nm'de sodyum ditiyonit kullanarak Hb-CO tayin etmişler.

Raimeri, Alfred ve arkadaşları /24/ tarafından bazı ortamlarda 583 ve 530.6 nm'lerde absorbanslar ölçülür. sonra karbon monoksit gazı geçirilir. Aynı dalga boylarında tekrar absorbanslar ölçülür. ve aşağıdaki formülle Hb-CO yüzdesi hesaplanır.

$$\% \text{Hb-CO} = \frac{A_{530.6} - A_{583}}{A'_{530.6} - A'_{583}} \times 100$$

A : Karbon monoksit geçirilmeden ölçülen absorbanslar.

A' : Karbon monoksit geçirildikten sonraki absorbanslar.

Bu yöntemlere ilaveten elektrokimyasal olarak Ecolyzer model 2600 cihazı ile Hb-CO tayini yapılmıştır /25/

Prensip olarak elektrolit içindeki CO'nun ortaya çıkması ile oluşan elektrokimyasal değişikliklerin metal indikatörlerle gözlenmesi esasına dayanır.

2.5. TÜREV SPEKTROFOTOMETRESİ

Türev spektrofotometre yönteminde absorpsiyon spektrumlarında ordinat olarak absorbens değerleri yerine absorbens yada tranmitransin dalga boyuna göre türevleri alınarak yeni spektrumlar meydana gelir. Bu spektrumlar genel olarak absorbens-dalgaboyu spektrumlarına nazaran daha açık ve ayrıntılı bilgi verirler. Türev spektrumları, çift ışınlı veya başka spektrofotometre araçlarında dalga boyuna karşı türev okumaları verecek şekilde bazı modifikasyonlar yaparak elde edilir. Bu modifikasyonlar basit olduğu gibi uygun elektronik devrelerle donatılarak yada türev recording spektrofotometre gibi direkt türev alabilen kompüterler ilave edilerek yapılabilir./26/

Basit olarak normal bir spektrofotometrede, monokromatorlara osilatörlü reflaktörün monte edilmesi ile hareketli bir levhanın ileri geri dönmesi sonucu dalga boyları sinuzdidal hareketle birkaç nm değişmesi sureti ile yapılır./27/

Çift ışınlı spektrofotometrelerde bu değişmeler λ ve $\lambda + \Delta\lambda$ ise bu dalga boylarında monokromatorlerde bir türev çıkış sinyali gözlenir. Ölçülen bu türev sinyalleri S_λ ve $S_{\lambda + \Delta\lambda}$ olsun. Bunu şöyle yazabiliriz.

$$S_\lambda = I_\lambda D_\lambda e^{-\epsilon c l}$$

$$S_{\lambda + \Delta\lambda} = I_{\lambda + \Delta\lambda} D_{\lambda + \Delta\lambda} e^{-\epsilon c l}$$

Burada I ışık yoğunluğu, D cihaz fonksiyonu, c örnek konsantrasyonu, l kuvvet kalınlığıdır. S_λ 'nin $S_{\lambda + \Delta\lambda}$ 'ya oranı ve şahıdı hesaba alarak her terimin logaritması alınır sonuç olarak;

$$\log \frac{S_{\lambda}}{S_{\lambda+\Delta\lambda}} - \log \frac{S'_{\lambda}}{S'_{\lambda+\Delta\lambda}} = C(\epsilon_{\lambda} - \epsilon_{\lambda+\Delta\lambda})$$

bulunur.

$S'_{\lambda}, S'_{\lambda+\Delta\lambda}$ şahit için alınan sinyallerdir. Bu bize birinci türev değerlerini kantitatif olarak ayrılmasını sağlar. /28,29/

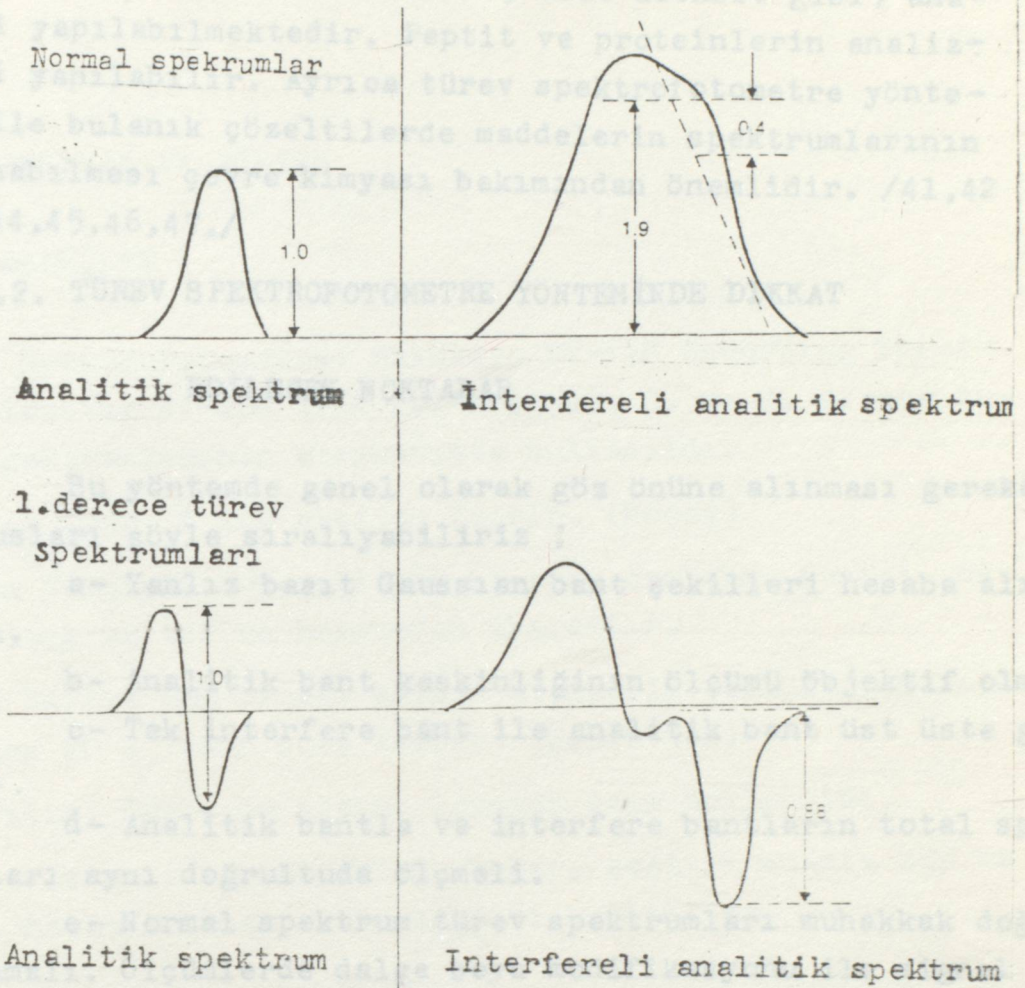
Niçin türev spektrumu istenir? Çünkü önemli küçük spektral özellikleri ortaya çıkarır. Görünmeyen saklı kalmış pek küçük benzer spektrumların belirli bir hal almasını sağlar. Normal spektrumda yalnız analitik bant ile interfereli analitik bantın birinci türev spektrumunda oluşan değişiklik % 12 azalmaya neden olur. (Şekil.2.10) Şekilde görülen normal spektrumda interferelinin 0.4 cm iken 0.88 olması interfere bantın keskin değişik tesirleri uygun hale indirgenmesidir. /30,31,32/

Türev spektrumu normal spektrumlarıdan farklı olarak bipolar özellik gösteren pikler oluşturması ve çok daha hızlı karakteristik profil gradienti çıkararak aynı nm'de yeni şekil alması ile olur. /33,34,35,36 /

2.5.1. TÜREV SPEKTROFOTOMETRESİ UYGULAMA ALANLARI

Türev yöntemi otuz yıldır bilinmesine rağmen önceleri differansiyel hesaplamalar yüzünden pek çalışma yapılamamıştır. Son on yılda bilgisayarların gelişmesi ile bu yöntem kullanımı oldukça artmıştır. Buna rağmen istenilen düzeye gelinebilmiştir. Türev spektrofotometre yöntemi analitik kimyada yeni olmasına rağmen kullanım alanları oldukça genişlemiş ve uygulanabilir oluşu ve kararlılığı bakımından Elektroferez, Kromatografi ve termal analitik yöntemlere denktir. /37/

Bu yöntemin tek dezavantajı yeni eklenen ünitelerin çalışma kolaylığı yanında fiyatının artmasıdır. Fakat denk analitik cihazlara göre daha ucuzdur.



Şekil.2.10 İnterfere bantın analitik banta etkisi

Türev yöntemi klinik, toksikoloji, acil laboratuvarlar dışında kimyasal alanlarda önemli uygulamaları vardır ve çalışmalar devam etmektedir. Benzer absorpsiyon spektrumları veren nadir toprak elementlerinin kalitatif ve kantitatif analizleri diğer başka yöntemlere göre daha başarılı olmuştur./28/ Nitrit ve nitratın ayrılması/38/, sülfür dioksit analizi /39/, organik kimyada polinükleer aromatik hidrokarbonların analizi yapılabilmektedir. /40/

Çevre kimyası bakımından önemli olan bazı maddeler analiz edilebilir.

Hava içinde eser miktarlardaki gazların (amonyak, ozon, cıva buharları, azot monoksit, azot dioksit gibi) analizi yapılabilmektedir. Peptit ve proteinlerin analizleri yapılabilir. Ayrıca türev spektrofotometre yöntemi ile bulanık çözeltilerde maddelerin spektrumlarının alınabilmesi çevre kimyası bakımından önemlidir. /41,42 43,44,45,46,47, /

2.5.2. TÜREV SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİNDE DIKKAT

EDİLECEK NOKTALAR

Bu yöntemde genel olarak göz önüne alınması gereken hususları şöyle sıralıyabiliriz ;

- a- Yanlız basit Gaussian bant şekilleri hesaba alınmalı.
- b- Analitik bant keskinliğinin ölçümü objektif olmalı.
- c- Tek interfere bant ile analitik bant üst üste gelmeli.
- d- Analitik bantla ve interfere bantların total spektrumları aynı doğrultuda ölçmeli.
- e- Normal spektrum türev spektrumları muhakkak doğrulamalı. Ölçümlerde dalga boyu modifikasyonu ile signal düzenlenmelerinin özel durumları göz önüne alınmalı.
- f- Analitik ölçümleri tekrarlıyarak sınırları standart sapma ile hesaplamalı hataları en küçük değere indirilmeli.

Bir analitik çalışmada birinci sistem; Nisbi yükseklik, genişlik ve interfere bant ayırmadır.

İkincisi; sayısal pratik, normal spektrumda ölçüm metodu ve iki türevin ayrılmasında ilavelerin etkisi.

Sonuncusu; seçilen çift bant için total hata hesaplamasıdır.

Analitik spektrumların yanında interfere bantlar, bilinmeyenler veya şiddetli kararsızlıklar üst üste gelebilir. Türev spektrumlarında bu duruma rastlanmaz ancak kompleks peyk piklerin oluşması safsızlıklardan oluşan interfere etkiler yüksek türev spektrumlarının analitik ayırma gücünü azaltacaktır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

Türev Spektrofotometre: Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160 (P/N 204-04550). 0. ve 2. derece türev spektrumlarının alınmasında kullanıldı.

Oksijen Tüpü: % 100 oksijen içerir. (Habaş)

Karbon Monoksit Düzeneği: Su banyosu, damlatma hunısı, nuçe erleni ve teflon hortumdan ibarettir.

Anket Kartı: Kan örneği alınan kişilerin cevaplaması istenilen 20'e yakın soru içerir. (Şekil.3.1)

Parafilm: Tüplerin ağzını kapamak için kullanıldı.

Yeterli sayıda erlen, beher, çeşitli ebatta tüp ve 5 ml. hacimli örnek alma şişeleri kullanıldı.

Şekil.3.1 Anket kartı. Kan alınan kişilerin özelliklerini not edilmesi amacı ile hazırlanmıştır.

3.2 KİMYASAL MADDELER

Saf Oksijen (ANKET KARTI ÖRNEĞİ) kullanılır. (Şekil.3.1)

Saf Karbon Monoksit Gazı: Karbon monoksit düzeneği kulla-

SOYADI:	ADI:	TARİH :
MESLEĞİ:	CİNSİYETİ () KADIN	KART NO:
YAŞI:	() ERKEK	KAN VERME NO: (ÖRNEK NO)
TÜTÜN KULLANIYORMU?	İÇMEYİ BIRAKMIŞSA SÜRESİ	İÇME TARZI
1 () EVET	7 () GÜN	14 () DUDAK TIRYAKISI
2 () HAYIR	8 () AY	15 () İNHALASYON
KULLANMA SÜRESİ	9 () YIL	KAN VERMEDEN ÖNCE TÜTÜN KULLANDINIZMI?
3 () AY	KULLANDIĞI TÜTÜN CİNŞİ	16 () MİKTARI
4 () YIL	10 () SİCARA	17 () SAATI
KULLANDIĞI MİKTAR	11 () SİGARILLO	DİĞERLERİ
5 () GÜNLÜK ADET	12 () SİGAR	18
6 () GÜNLÜK MİKTAR	13 () PİPO	19
		20
AÇIKLAMA:		ANKETİ YAPAN (İLK HARFLER)

Şekil.3.1 Anket kartı. Kan alınan kişilerin özelliklerini not edilmesi amacı ile hazırlanmıştır.

3.2 KİMYASAL MADDELER

Saf Oksijen Gazı: Oksijen tüpü kullanılır. (habaş)

Saf Karbon Monoksit Gazı: Karbon monoksit düzeneği kullanılarak $70-80^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosu üzerinde sülfat asidi ile formik asitten bir molekül su ayrılması ile elde edilir.

Formik Asit: Saf derişik formik asit kullanıldı. (Merck)

Sülfat Asidi: Saf derişik sülfat asidi kullanıldı. (Merck)

Amonyak Çözeltisi: Derişik amonyaktan (Merck) 0.12 M amonyak çözeltisi hazırlanır.

Sodyum Ditiyonit Çözeltisi: 0.015 M sodyum ditiyonit çözeltisi hazırlanır ve ayrıca katı sodyum ditiyonit kullanılır. (Merck)

E.D.T.A. Çözeltisi: Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu (Merck) kullanılarak 0.13 M EDTA çözeltisi hazırlanır.

Standart Kan Örneği: Sağlıklı ve sigara içmeyen bir kişiden 20 ml. kan alınır.

Burada belirtilen madde ve malzemeler Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı ve Biyokimya kürsüsünden sağlanmıştır.

3.3 STANDART ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Standart çözeltilerin hazırlanması amacı ile sağlıklı ve sigara içmeyen şahıstan içinde 3 ml. EDTA çözeltisi bulunan tüpe 20 ml kan alındı. Hb-O₂ ve Hb-CO stok standart çözeltilerinin hazırlanması için iki kısma ayrıldı.

Oksihemoglobin standart çözeltisinin hazırlanması;
Kan örneğinin birinci kısmına oksijen tüpünden 10 dakika oksijen gazı geçirildi. Kuru ve temiz tüpe alınarak tüpün ağzı parafilimlendi. Bu % 100 oksihemoglobindir.

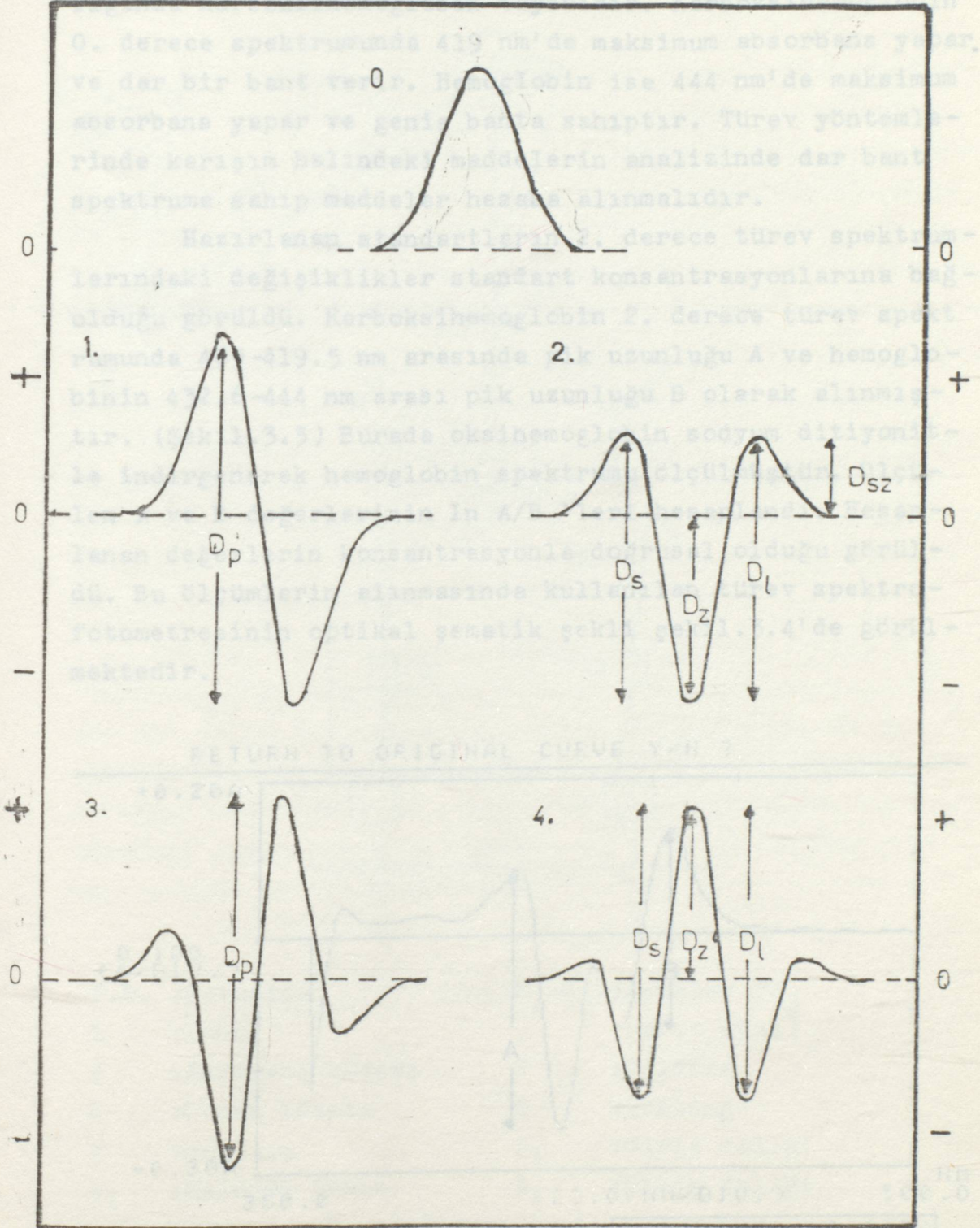
Karboksihemoglobin standart çözeltisinin hazırlanması;

İkinci kısma 70-80°C'ye ayarlanmış su banyosu üzerine yerleştirilen karbon monoksit düzeneğinden elde edilen gaz 10 dakika geçirildi. Kuru ve temiz tüpe alınarak tüpün ağzı parafilimlendi. Bu % 100 karboksihemoglobindir.

Hazırlanan bu stok standart çözeltilerinden belli miktarlarda karıştırılarak % 0-100 arasında bir seri standart karboksihemoglobin çözeltileri hazırlandı. Bu standart çözeltiler türev ve Tietz yönteminde kullanıldı. (Tablo.3.I)

Stand. No	Hb-O ₂ ml.	Hb-O ₂ %	Hb-CO ml.	Hb-CO %	Top. ml.	Toplam %
1	0.40	20	1.60	80	2	100
2	0.80	40	1.20	60	2	100
3	1.00	50	1.00	50	2	100
4	1.20	60	0.80	40	2	100
5	1.40	70	0.60	30	2	100
6	1.60	80	0.40	20	2	100
7	1.80	90	0.20	10	2	100
8	2.00	100	—	—	2	100
9	—	—	2.00	100	2	100

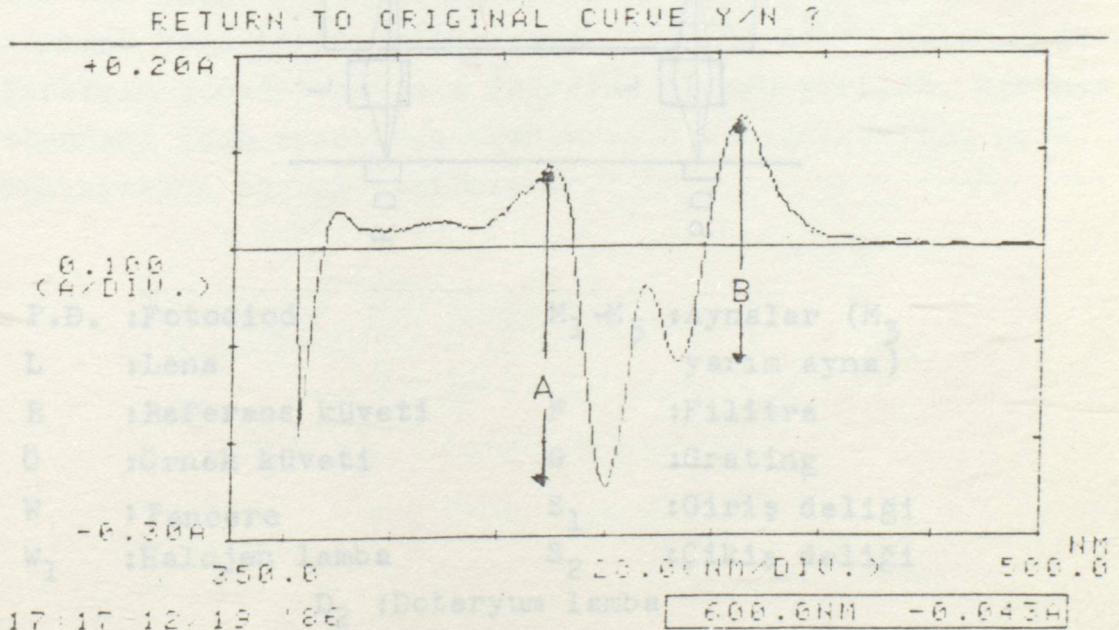
Tablo. 3. I



Şekil.3.2 Gaussian bir analitik spektrumun 0-4 derece arası türev spektrumları ve D_L , D_P , D_S , D_Z , D_{SZ} değerleri. gösterilmesi

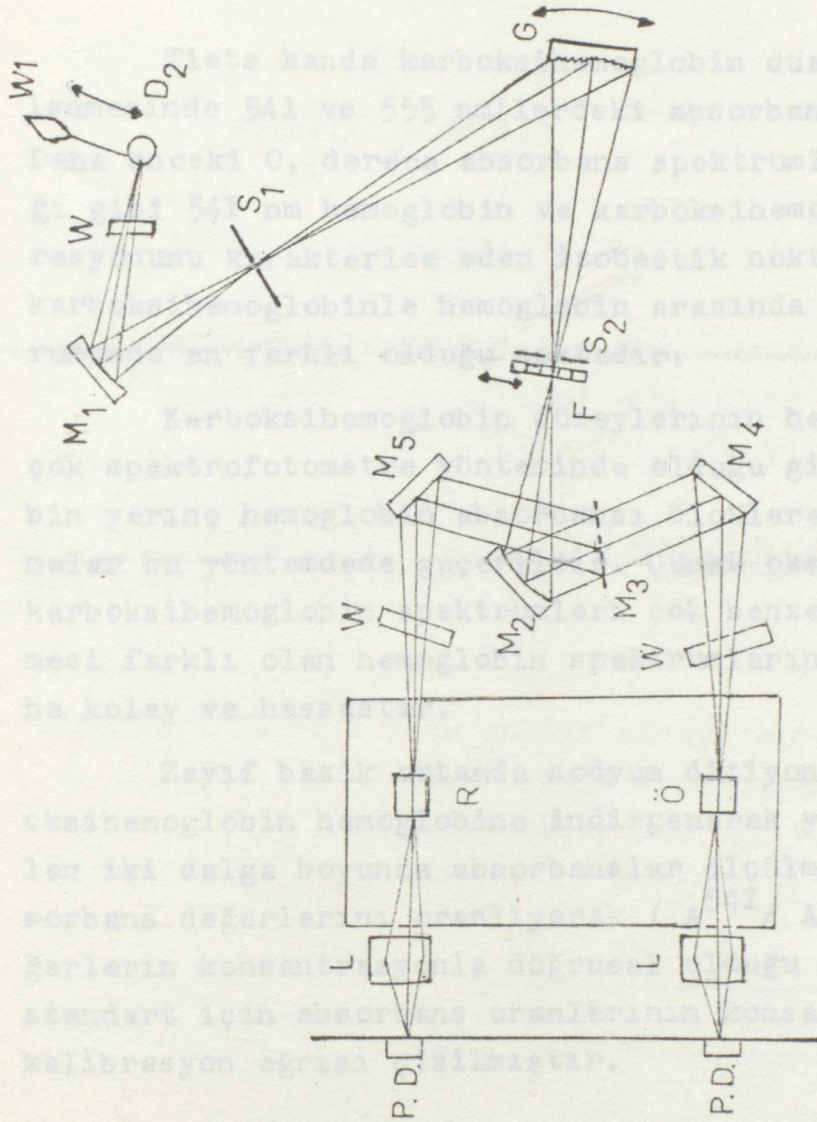
Bulguları sunulan bu çalışmada amaç hemoglobin varlığında karboksihemoglobin tayinidir. Karboksihemoglobin 0. derece spektrumunda 419 nm'de maksimum absorbans yapar ve dar bir bant verir. Hemoglobin ise 444 nm'de maksimum absorbans yapar ve geniş banta sahiptir. Türev yöntemlerinde karışım halindeki maddelerin analizinde dar bant spektruma sahip maddeler hesaba alınmalıdır.

Hazırlanan standartların 2. derece türev spektrumlarındaki değişiklikler standart konsantrasyonlarına bağlı olduğu görüldü. Karboksihemoglobin 2. derece türev spektrumunda 409-419.5 nm arasında pik uzunluğu A ve hemoglobinin 432.6-444 nm arası pik uzunluğu B olarak alınmıştır. (Şekil.3.3) Burada oksihemoglobin sodyum ditiyonit ile indirgenerek hemoglobin spektrumu ölçülmüştür. Ölçülen A ve B değerlerinin $\ln A/B$ 'leri hesaplandı. Hesaplanan değerlerin konsantrasyonla doğrusal olduğu görüldü. Bu ölçümlerin alınmasında kullanılan türev spektrofotometresinin optikal şematik şekli şekil.3.4'de görülmektedir.



Şekil.3.3 Hb-CO ve Hb'in 2. derece türev spektrumlarında A ve B'nin gösterilmesi

3.5 TIBTİ SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ



P.D. :Fotodiod

L :Lens

R :Referans küveti

Ö :Örnek küveti

W :Pencere

W₁ :Halojen lambaD₂ :Doteryum lambaM₁-M₅ :Aynalar (M₃
yarım ayna)

F :Filtre

G :Grating

S₁ :Giriş deliğiS₂ :Çıkış deliği

Şekil.3.4 Türev spektrofotometresi optikal şeması

3.5 TİETZ SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ

Tietz kanda karboksihemoglobin düzeylerinin belirlenmesinde 541 ve 555 nm'lerdeki absorpsiyonları kullandı. Daha önceki 0. derece absorpsiyon spektrumlarında görüleceği gibi 541 nm hemoglobin ve karboksihemoglobin konsantrasyonunu karakterize eden izobestik noktadır. 555 nm ise karboksihemoglobinle hemoglobin arasında absorpsiyon spektrumunda en farklı olduğu noktadır.

Karboksihemoglobin düzeylerinin belirlenmesinde birçok spektrofotometre yönteminde olduğu gibi oksihemoglobin yerine hemoglobin absorpsiyonu ölçülerek yapılan çalışmalar bu yöntemde geçerlidir. Çünkü oksihemoglobin ve karboksihemoglobin spektrumları çok benzer özellik göstermesi farklı olan hemoglobin spektrumlarından ayırmak daha kolay ve hassastır.

Zayıf bazik ortamda sodyum ditiyonit ilavesi ile oksihemoglobin hemoglobine indirgenerek yukarıda belirtilen iki dalga boyunda absorpsiyonları ölçülmüştür. Bu absorpsiyon değerlerini oranlayarak (A^{541} / A^{555}) bulunan değerlerin konsantrasyonla doğrusal olduğu görüldü. Her bir standart için absorpsiyon oranlarının konsantrasyona göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

3.6.2 KÜÇÜK EŞLENMİŞ SERİLERDE t - TESTİ

Aynı diziye ilişkin birey, olay veya nesnelerin iki ayrı halde (iki ayrı zamanda) incelenmeleri halinde 1. ve 2. incelenme sonuçları arasında tespit edilen farkların değerlendirilmesi söz konusudur. Bu gibi hallerde her vak'ada 1. hal veya zamanı deneye 1. deneye veya

3.6 İSTATİSTİK FORMÜLLER

3.6.1 ARİTMETİK ORTALAMA VE STANDART SAPMA

Aritmetik ortalama : Bir analiz sonucu elde edilen değerlerin toplamının analiz sayısına bölümünden elde edilen değerdir.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

Standart Sapma : Bir analiz sonucu elde edilen ortalama değer sapmalarının karelerinin toplamı deney sayısının bir eksiğine bölümünün kareköküne denir. /48/

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i : Analiz değerleri

\bar{x} : Aritmetik ortalama

S : Standart sapma

n : Deney sayısı

3.6.2 KÜÇÜK EŞLENMİŞ SERİLERDE t - TESTİ

Aynı diziye ilişkin birey, olay veya nesnelerin iki ayrı halde (iki ayrı zamanda) incelenmeleri halinde 1. ve 2. inceleme sonuçları arasında tespit edilen farkların değerlendirilmesi söz konusudur. Bu gibi hallerde her vak'ada 1. hal veya zamandaki değerin 2. hal veya zamandaki değere nazaran "kontrol" niteliğini taşımakta olduğu ve bu suretle eşlenmiş iki dizinin meydana geldiği kabul edilir. /49/

Yapılacak işlem örneğimizde farklar dizisine ilişkin değerleri ve ölçüleri bu formülde yerlerine koyarak t değerini bulmaktır. Bulunan t değerini, serbestlik derecesini göz önüne alarak t tablosundan P değeri bulunur.

Çalışılan iki kalibrasyon eğri değerleri arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı araştırıldı.

Standart sapmaların eşlenmiş serilerin 7 gün süre ile 0-40 arasında eşyanıklılığını inceledi.

gök eşlenmiş serilerde t testi" uygulayarak iki yöntem arasında bir anlamlilik olup olmadığı araştırıldı.

$$t = \frac{|m - 0|}{s / \sqrt{n}} \quad s^2 = \frac{T_2 - \frac{T_1^2}{n}}{n - 1}$$

m : Farklar dizisinin ortalaması

s : Farklar dizisinin standart sapması

n : Farklar dizisindeki birim sayısı

(n - 1) : Serbestlik derecesi

T₁ : Farkların toplamı

T₂ : Farkların karelerinin toplamı

4.1. TÜREV SPEKTROFOTOMETRİ

KALİBRASYON DENEYLERİ

4. DENEYSEL ÇALIMA VE BULGULAR

Bulguları sunulan bu çalışmada kanda karboksihemoglobin miktarı belirlenmesi için kullanılan iki yöntemin hangisinin daha duyarlı olduğunu saptamak amacı ile sigara içen ve içmeyen kişilerde Hb-CO düzeyleri araştırıldı. Bu amaçla 2 defa kalibrasyon eğrileri hazırlandı.

Bu iki eğri değerlerinin ortalamaları alınarak üçüncü esas eğri oluşturuldu. Bu esas kalibrasyon eğriyi kullanarak yukarıda bahsedilen kişilerin Hb-CO miktarları belirlendi. İki yöntem göre belirlenen Hb-CO miktarları "küçük eşlenmiş serilerde t testi" uyguluyarak iki yöntem arasında bir anlamlılık olup olmadığı araştırıldı.

Çalışılan iki kalibrasyon eğri değerleri arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı incelendi.

Standartlarla hazırlanan karboksihemoglobinin 7 gün süre ile 0-4°C arasında dayanıklılığı incelendi.

4.I. TÜREV SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ İLE Hb-CO

KALİBRASYON EĞRİSİNİN ÇİZİLMESİ

Yeni hazırlanmış 250 ml amonyaklı sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) çözeltisinden bir seri tüplere 10 ar ml konur. Her bir tüp standart sayısından bir fazlasına kadar numaralandı. Bu fazla tüp spektrofotometre ölçümünde referans tüp olarak kullanıldı. Daha önce hazırlanmış % 0-100 karboksihemoglobin standart çözeltilerinden 10 ar ml otomatik pipetle numaralanmış her bir tüpe konuldu.

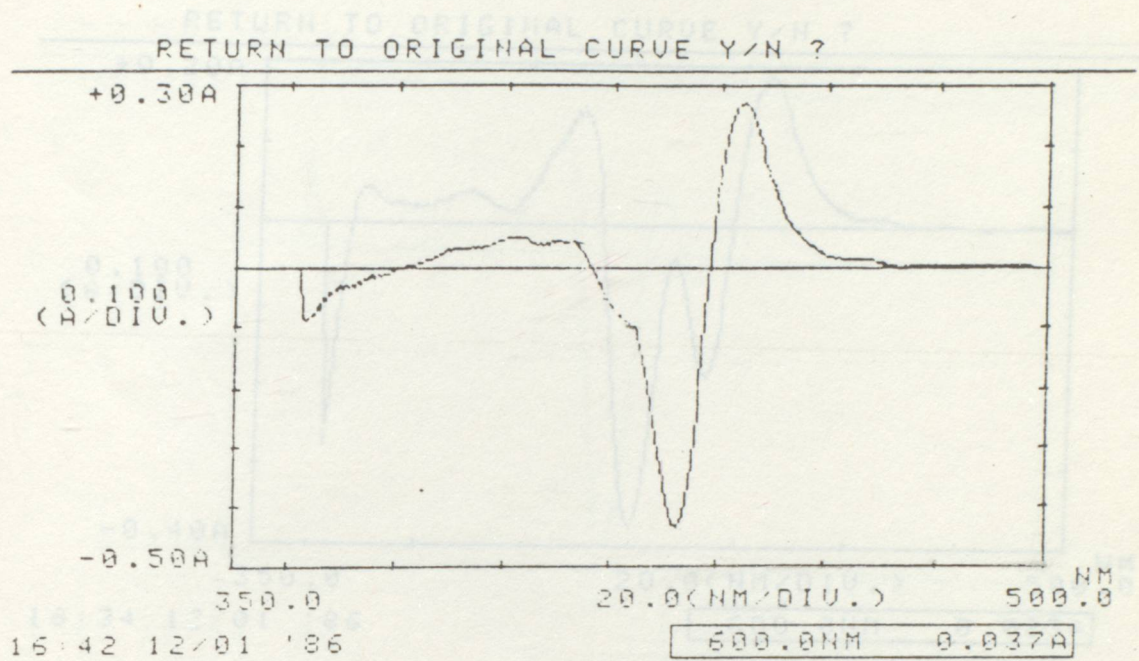
Standart çözeltinin reaktif çözeltisine konulduktan tam 15 dakika sonra türev spektrofotometresi ile 350-600 nm arasında 0. ve 2. türev spektrumları alınır. (Spektrofotometre hücrelerinin ışık yolu 1 cm.dir) 2. derece türev spektrumları 350-500 nm arasındaki kısmı yazıcıya kayıt ettirildi. (Şekil.4.1-10 , Tablo.4.1)

Türev spektrofotometre yöntemi ile iki ayrı zamanda iki kere kalibrasyon eğrisi çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarla ilgili türev spektrumları ve hesaplanan $\ln A / B$ değerleri her şeklin altında belirtilmiştir. Bu iki kalibrasyon eğrisinin $\ln A / B$ değerlerinin aritmetik ortalamaları alınmış ve üçüncü bir eğri çizilerek bu eğriden örneklerin Hb-CO düzeyleri bulunmuştur. (Şekil.4.21, Tablo.4.3)

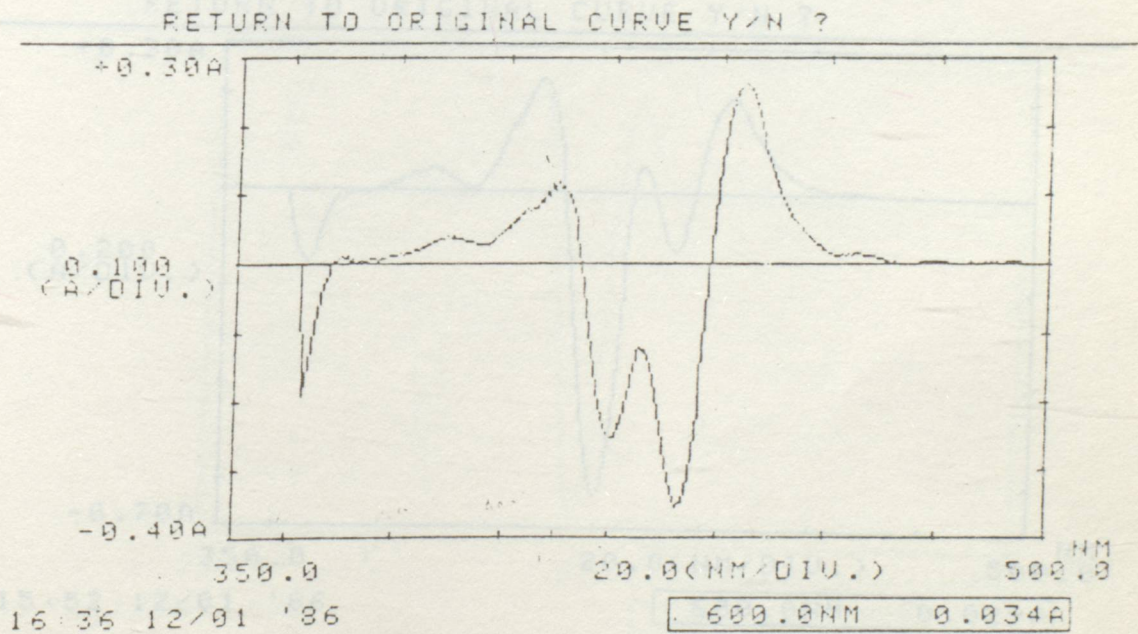
İkinci kalibrasyon çalışmalarında elde edilen türev spektrumları yanısıra 0. derece spektrumlarında maksimum absorbanans değerinin nasıl değiştiğini görebilmek amacı ile her bir türev spektrumları yanında normal absorbanans spektrumunda görülen bazı dalga boylarının absorbanans değerleri görülmektedir. (Şekil.4.11-20, Tablo.4.2)

16. 12/81 25

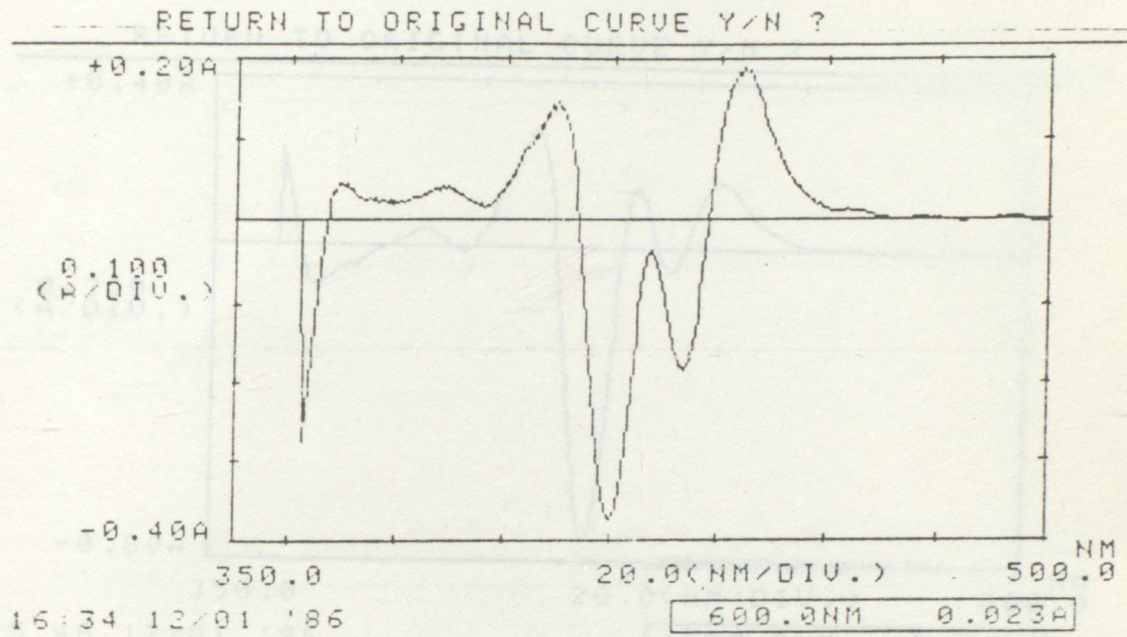
Şekil.4.2 X 10 Hb-CO . A=3.30 , B=5.55 , $\ln A/B = -0.52$



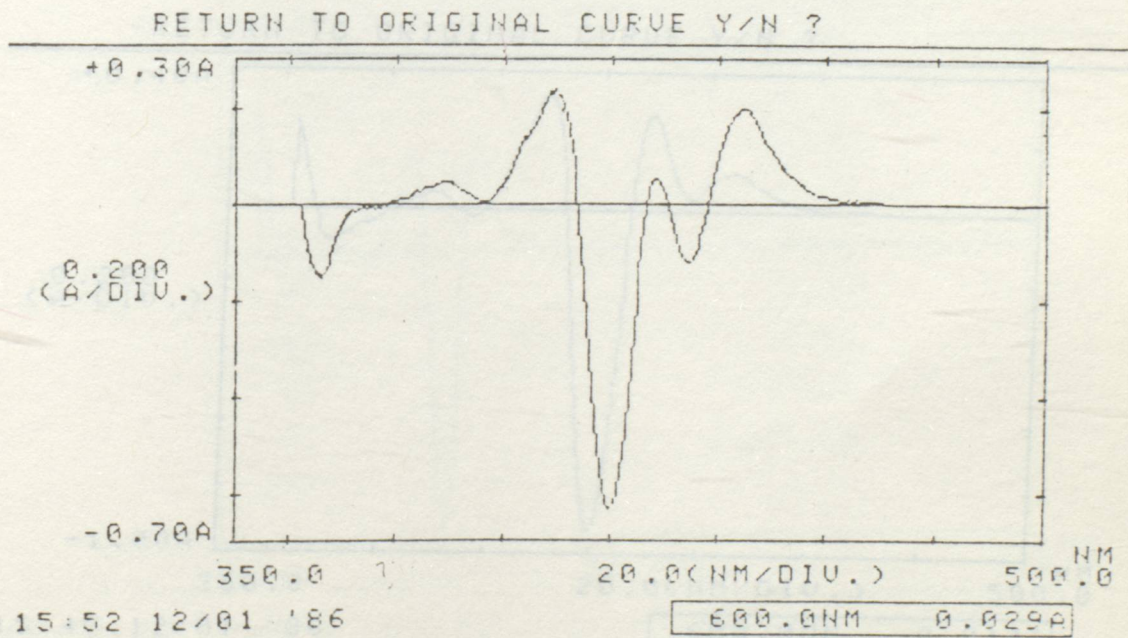
Şekil.4.1 % 0 Hb-CO . A=1.15 , B=5.50 , $\ln A/B = -1.56$



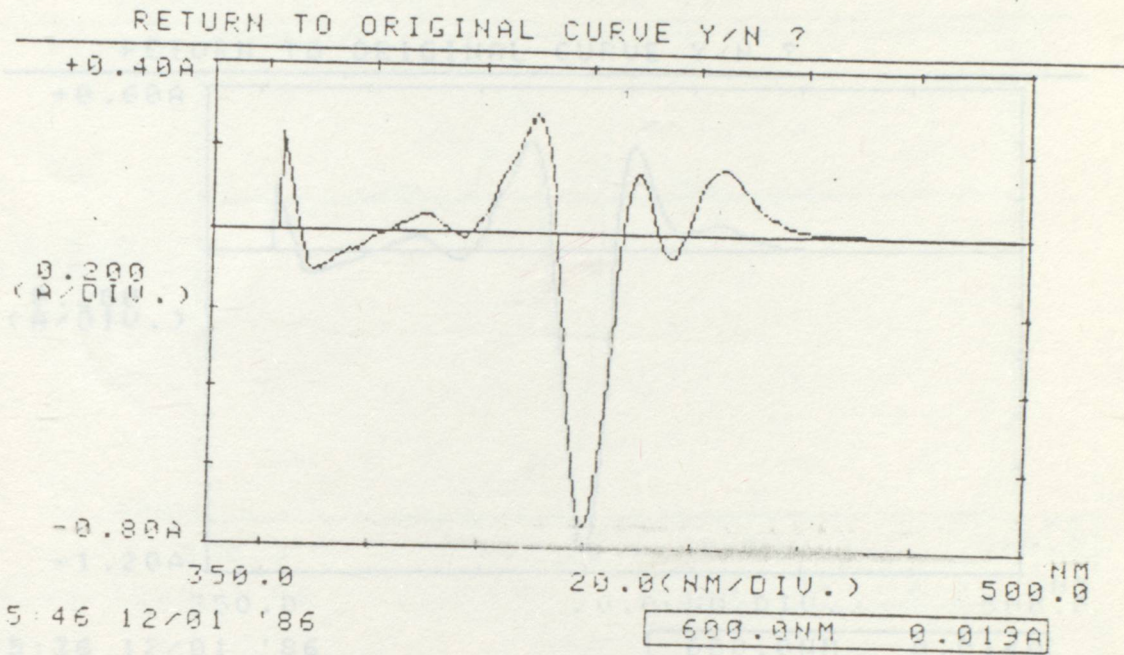
Şekil.4.2 % 10 Hb-CO . A=3.30 , B=5.56 , $\ln A/B = -0.52$



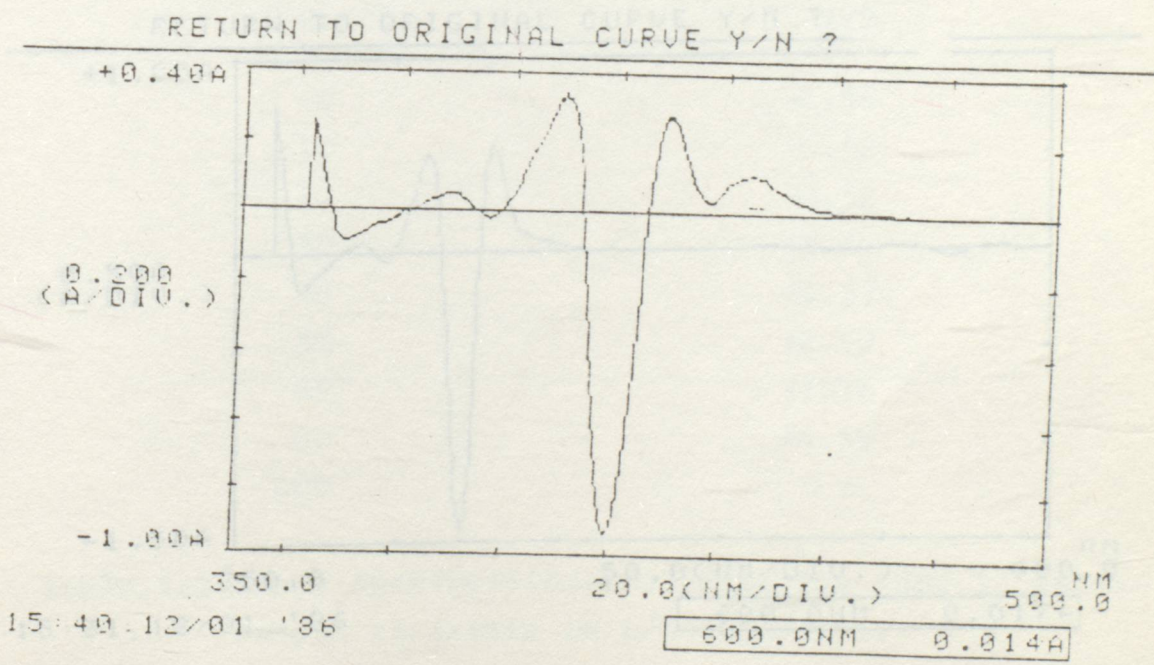
Şekil.4.3 % 20 Hb-CO. $A=5.42$, $B=3.95$, $\ln A/B = +0.32$



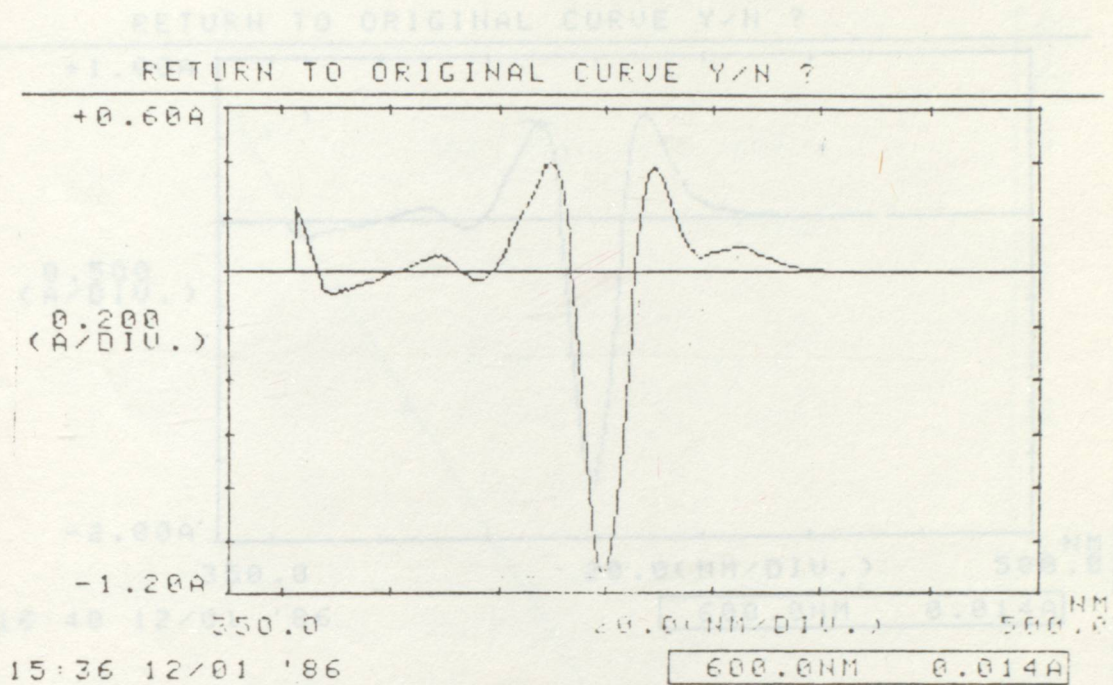
Şekil.4.4 % 30 Hb-CO. $A=5.45$, $B=1.95$, $\ln A/B = +1.02$



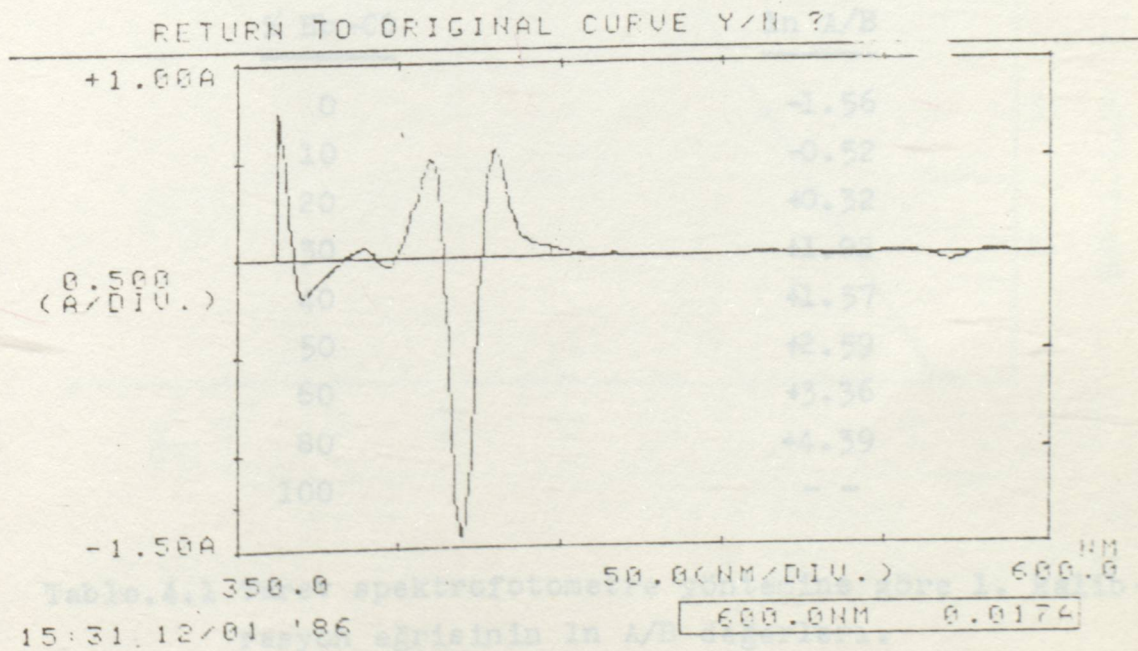
Şekil.4.5 % 40 Hb-CO. A=5.42, B=1.12, ln A/B=+1.57



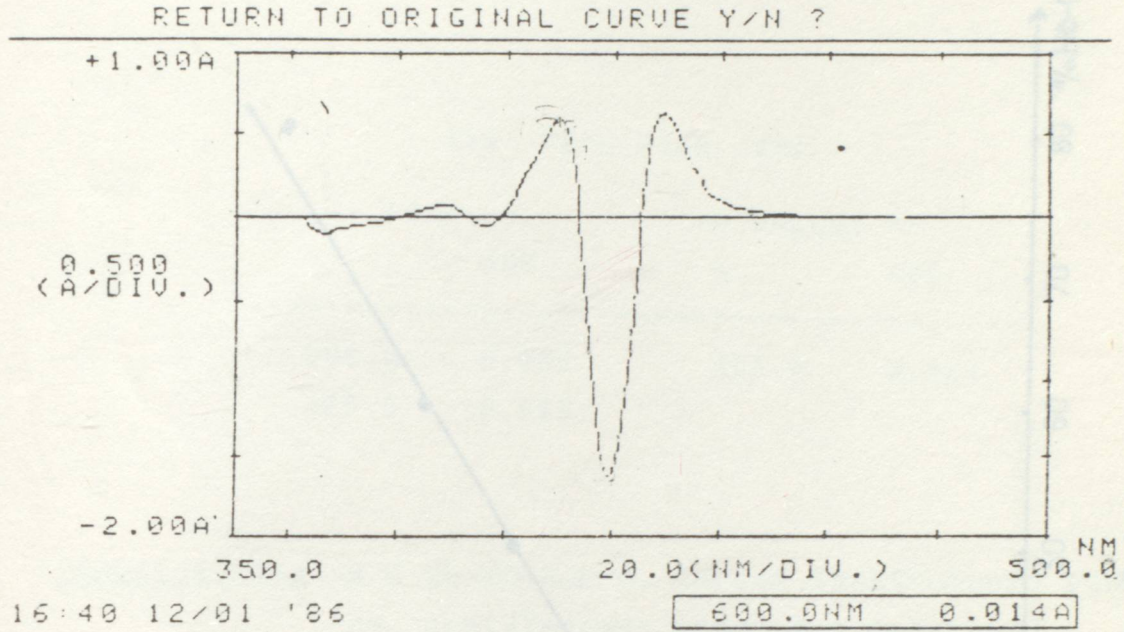
Şekil.4.6 % 50 Hb-CO, A=5.62, B=0.42, ln A/B=+2.59



Şekil.4.7 % 60 Hb-CO, A=5.22, B=0.18, ln A/B=+3.36



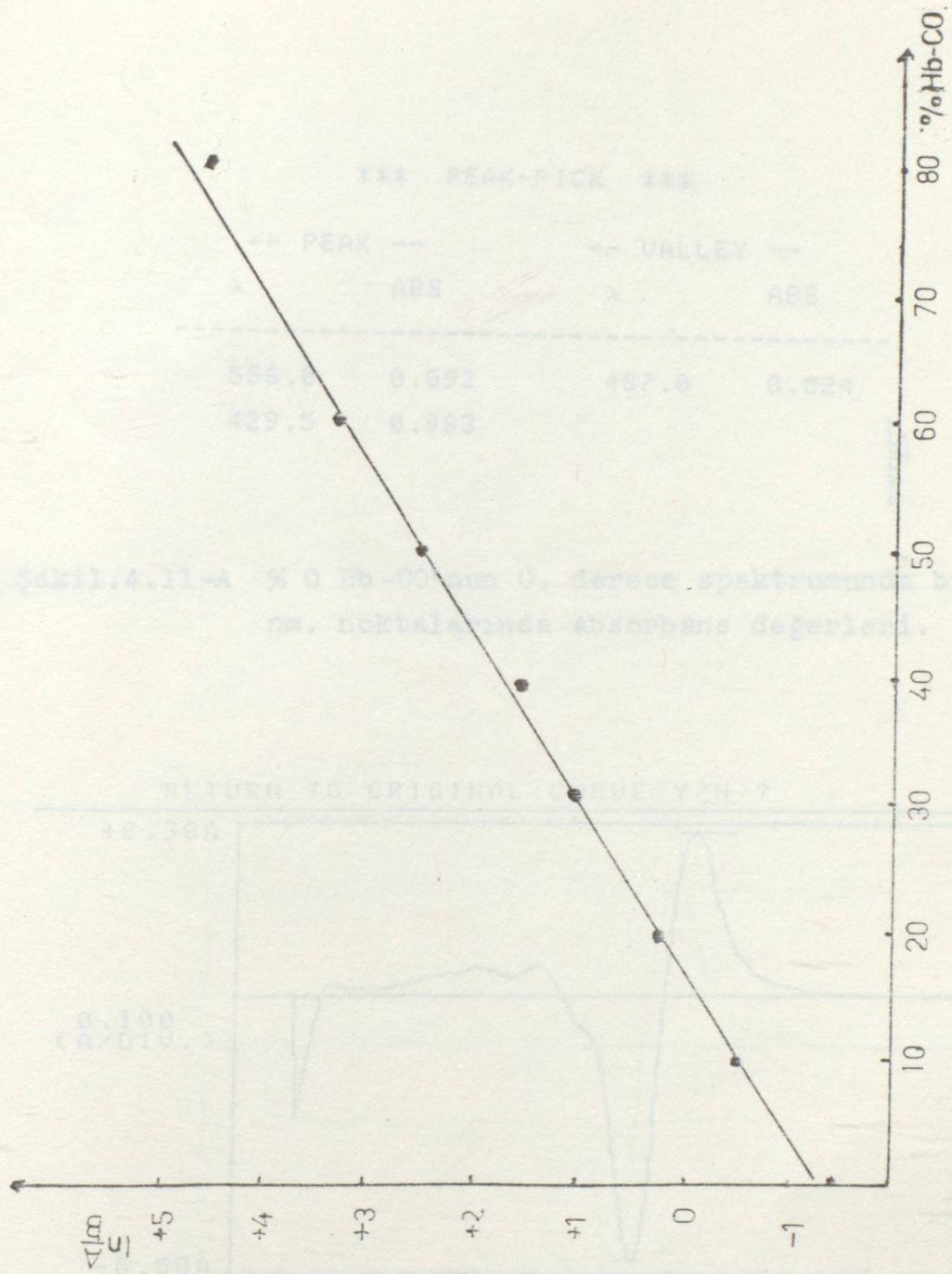
Şekil.4.8 % 80 Hb-CO, A=4.85, B=0.06, ln A/B=+4.39



Şekil.4.9 % 100 Hb-CO. A=5.75, B ?

<u>% Hb -CO</u>	<u>ln A/B</u>
0	-1.56
10	-0.52
20	+0.32
30	+1.02
40	+1.57
50	+2.59
60	+3.36
80	+4.39
100	- -

Tablo.4.1 Türev spektrofotometre yöntemine göre 1. kalibrasyon eğrisinin ln A/B değerleri.



Şekil.4.10 1. Kalibrasyon eğrisi. $r = 0.996$
 $y = 0.0745x - 1.30$

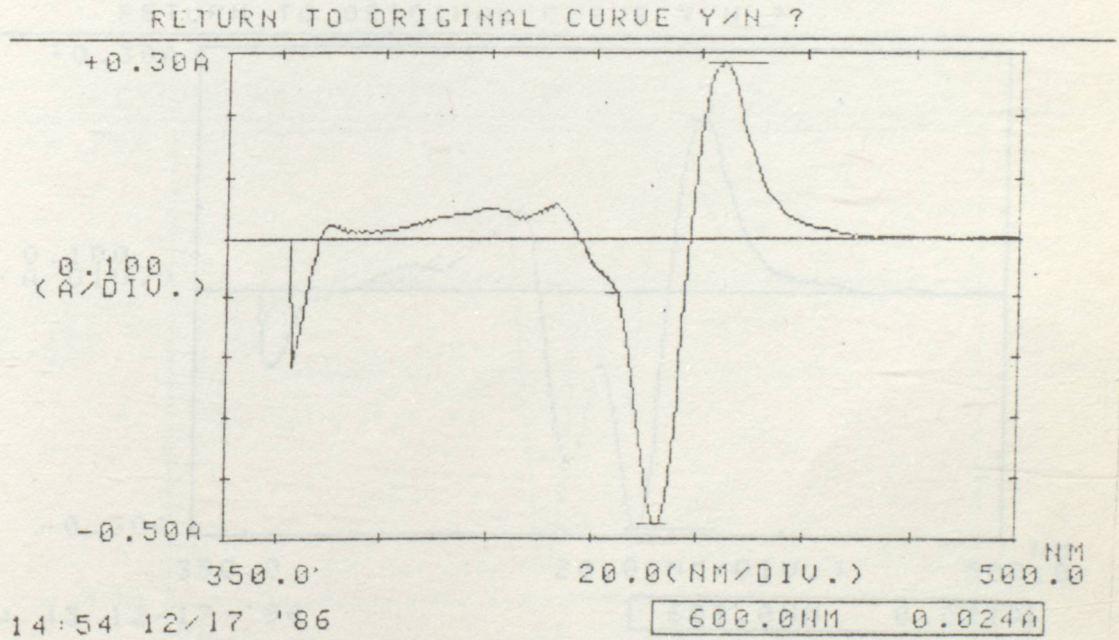
Şekil.4.11-A X O Hb-CO, A=1.20, B=6.00, ln A/B = -1.69

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
556.0	0.092	487.0	0.024
429.5	0.983		

Stana

Şekil.4.11-A % 0 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm. noktalarında absorbans değerleri.



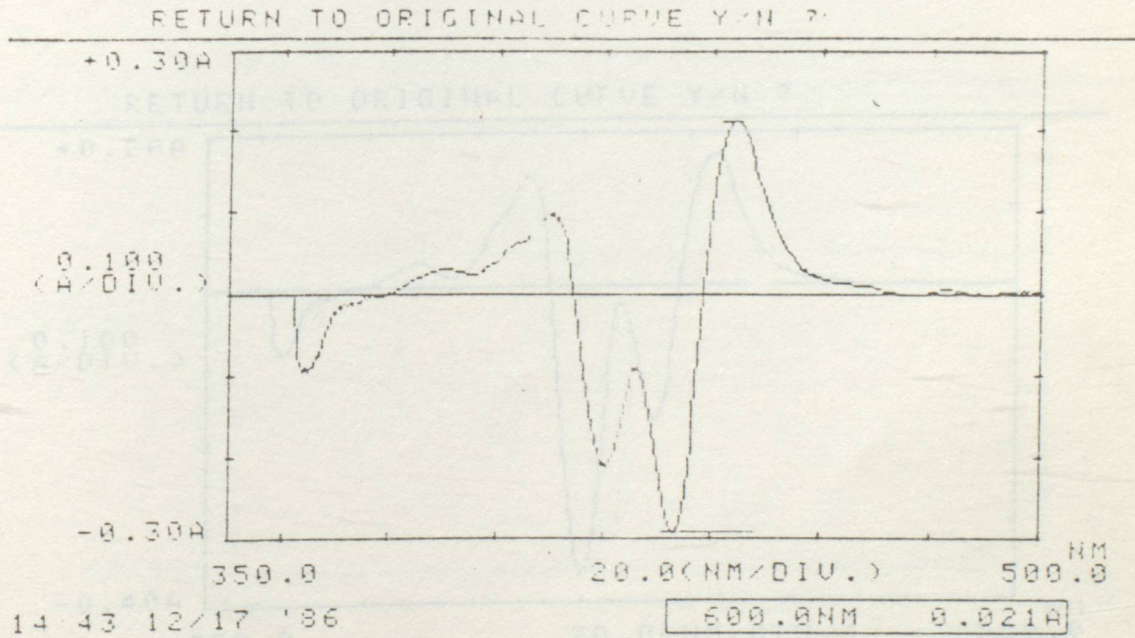
Şekil.4.11-B % 0 Hb-CO. $A=1.20$, $B=6.00$, $\ln A/B = -1.60$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK *** PEAK-PICK *** --

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
558.0	0.083	487.0	0.025
424.5	0.834		

Şekil.4.12-A % 10 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm. noktalarında absorbens değerleri.



Şekil.4.12-B % 10 Hb-CO. $A=3.15$, $B=5.25$, $\ln A/B = -0.51$

*** PEAK-PICK ***

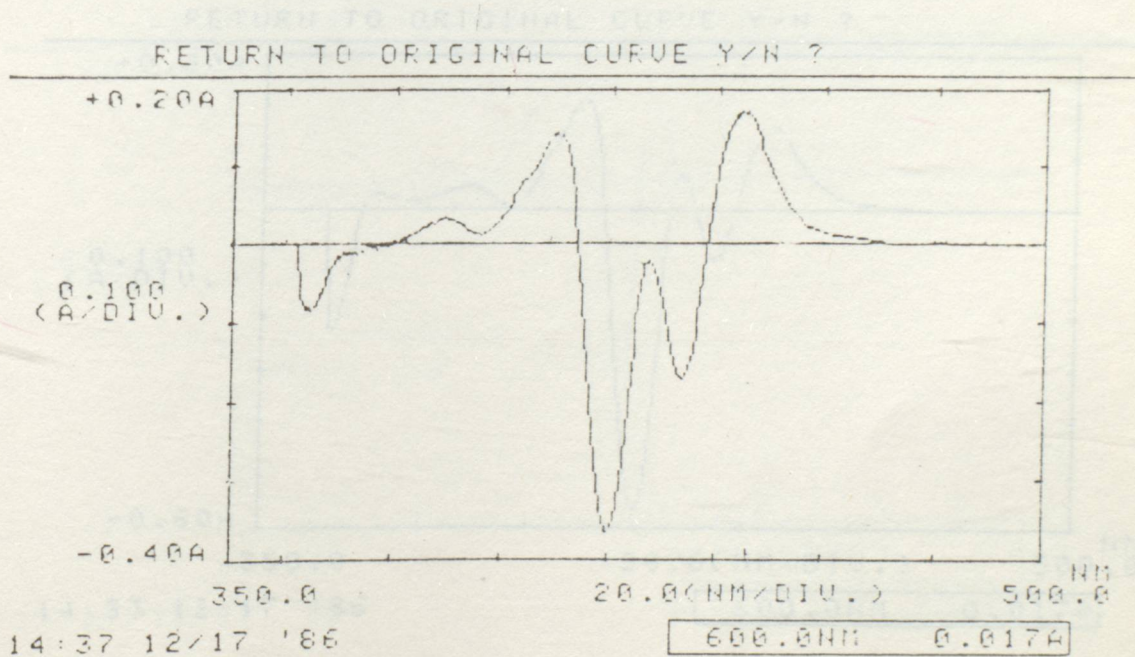
-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
555.0	0.076	486.0	0.024
421.0	0.855		

221-25412

412002A

01

Şekil.4.13-A % 20 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbands değerleri.

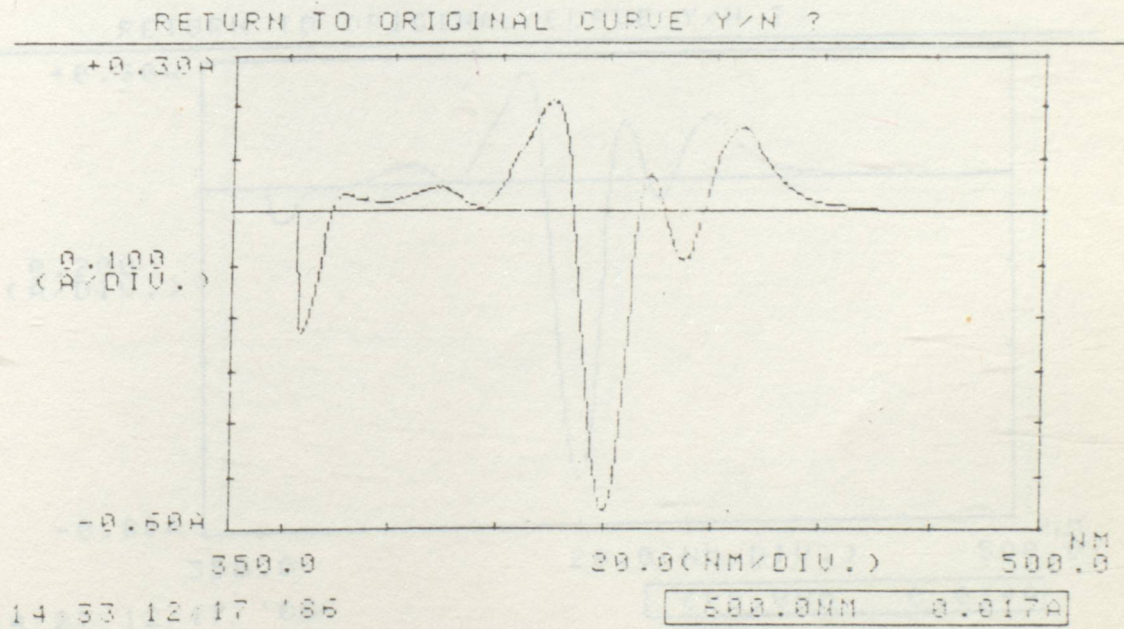


Şekil.4.13-B % 20 Hb-CO. $A=5.22$, $B=3.65$, $\ln A/B = +0.35$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
564.5	0.086	486.5	0.028
420.0	0.997	380.5	0.221
364.5	0.267		

Şekil.4.14-A % 30 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorban değerleri.

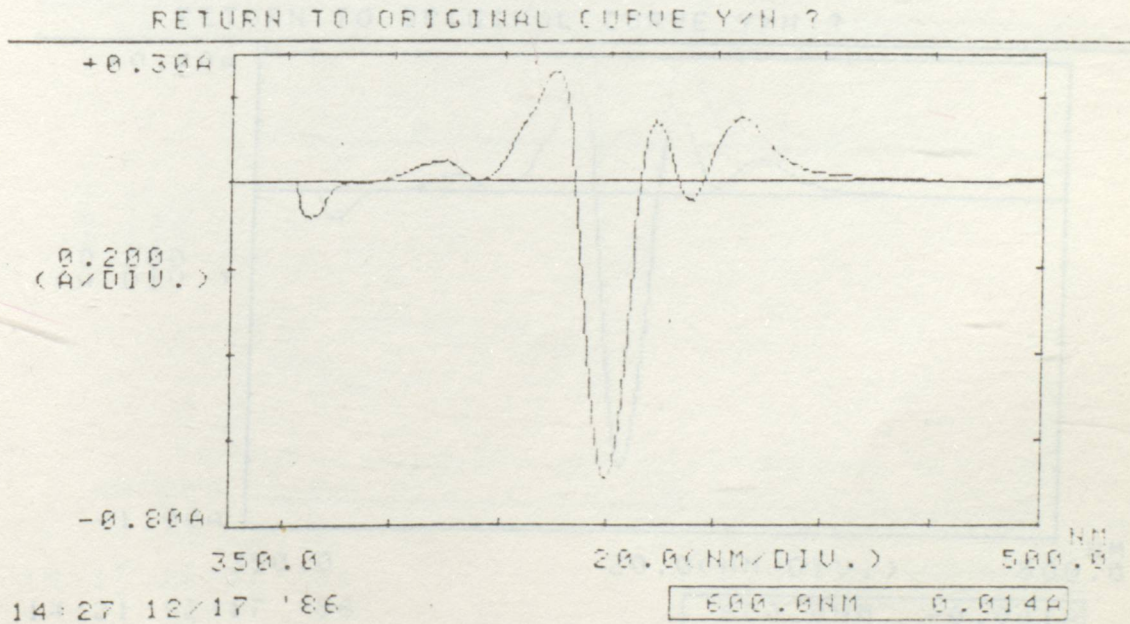


Şekil.4.14-B % 30 Hb-CO. $A=5.30$, $B=1.80$, $\ln A/B = +1.07$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
565.5	0.068	486.5	0.028
420.0	1.068	356.0	0.047

Şekil.4.15-A % 40 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbans değerleri.



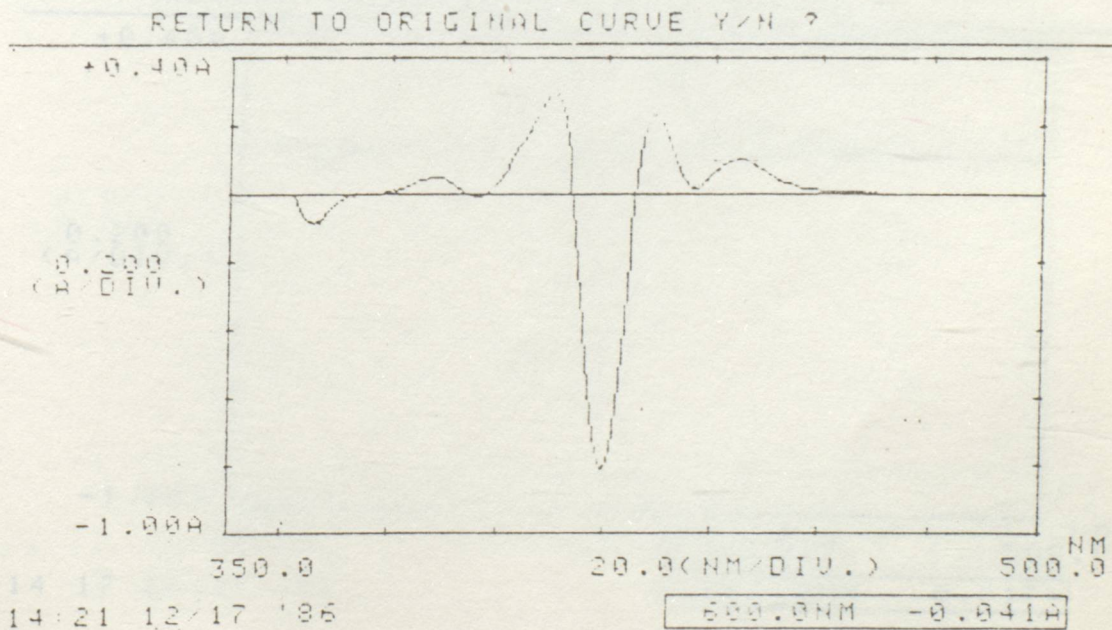
Şekil.4.15-B % 40 Hb-CO. $A=5.42$, $B=1.05$, $\ln A/B = +1.64$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
565.5	0.096	552.5	0.078
540.5	0.082	496.0	0.032
419.5	1.065		

Standard

Şekil.4.16-A % 50 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbands değerleri.



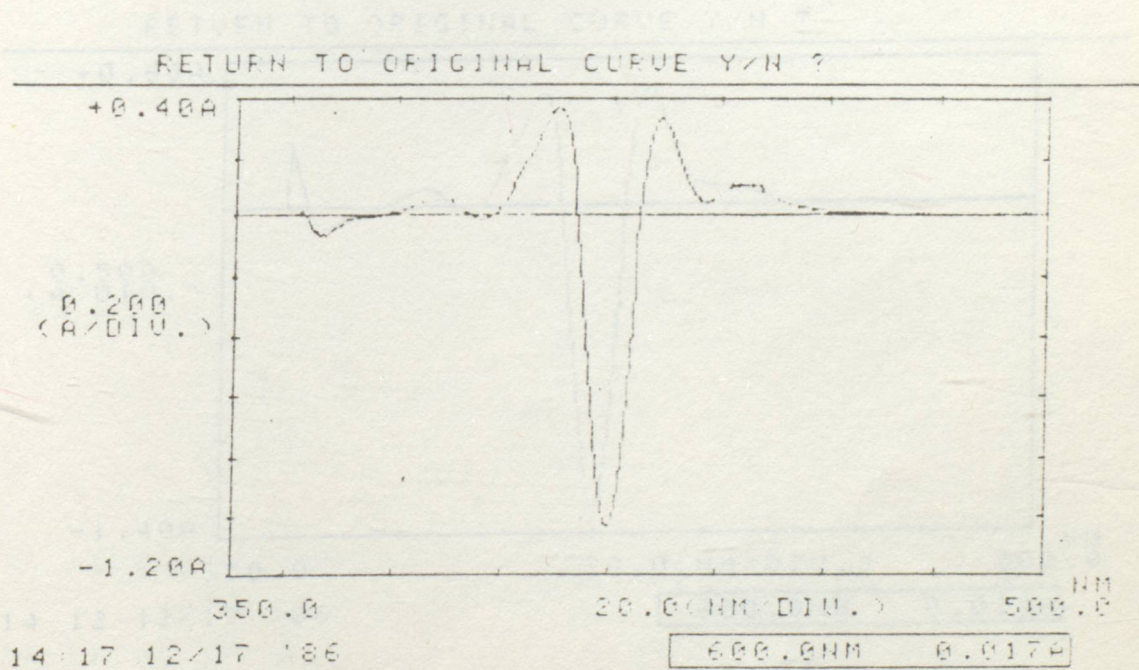
Şekil.4.16-B % 50 Hb-CO. $A=4.85$, $B=0.20$, $\ln A/B = +2.49$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
567.0	0.101	554.0	0.090
540.5	0.098	494.0	0.037
419.5	1.261	358.0	0.020

5412
4170074
0110

Şekil.4.17-A % 60 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbans değerleri.

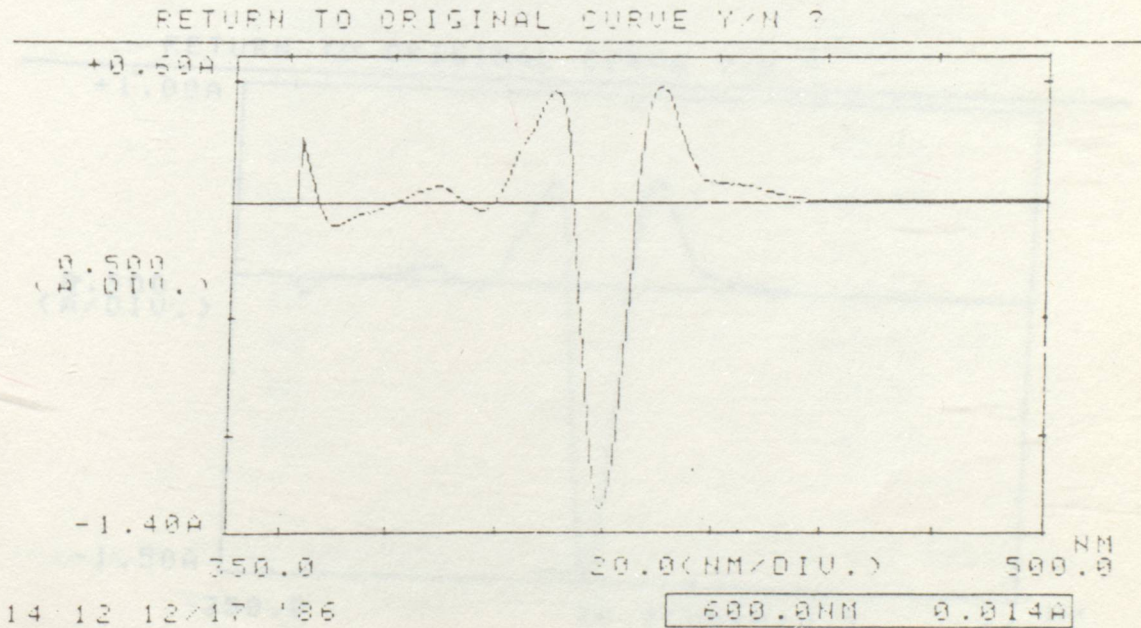


Şekil.4.17-B % 60 Hb-CO. $A=5.45$, $B=0.23$, $\ln A/B = +3.16$

*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
568.0	0.105	554.0	0.089
540.0	0.103	494.0	0.040
419.5	1.385	360.0	-0.155

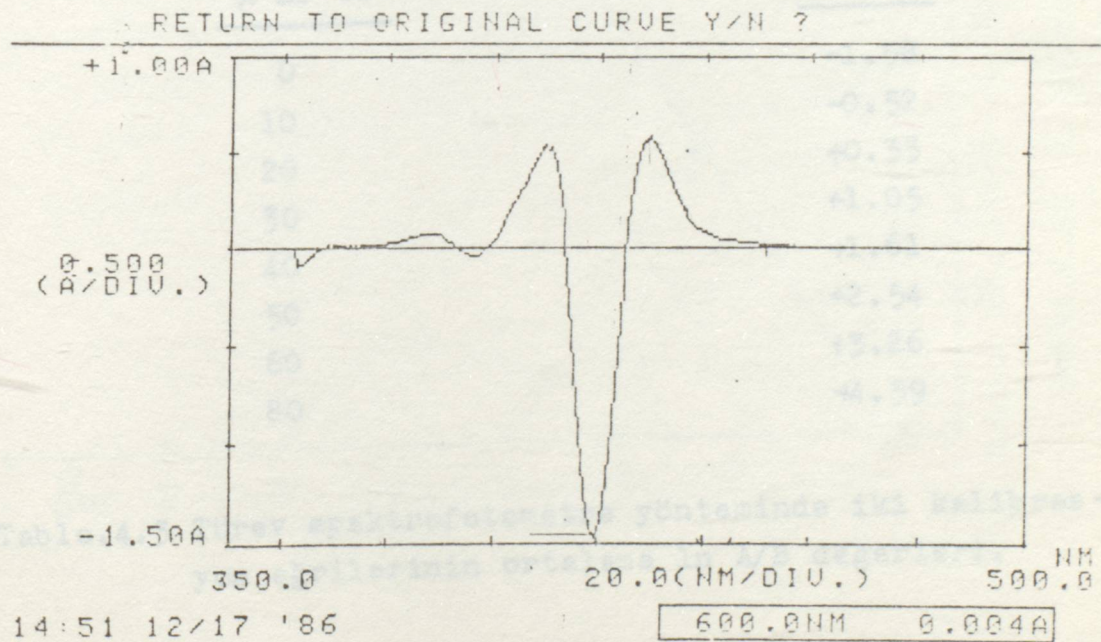
Şekil.4.18-A % 80 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbans değerleri.



Şekil.4.18-B % 80 Hb-CO. $A=5.60$, $B=0.07$, $\ln A/B = +4.38$

--- PEAK ---		--- VALLEY ---	
λ	ABS	λ	ABS
567.5	0.099	554.0	0.072
538.0	0.097	492.0	0.031
419.0	1.423		

Şekil.4.19-A % 100 Hb-CO'nun 0. derece spektrumunda bazı nm'lerdeki absorbans değerleri.



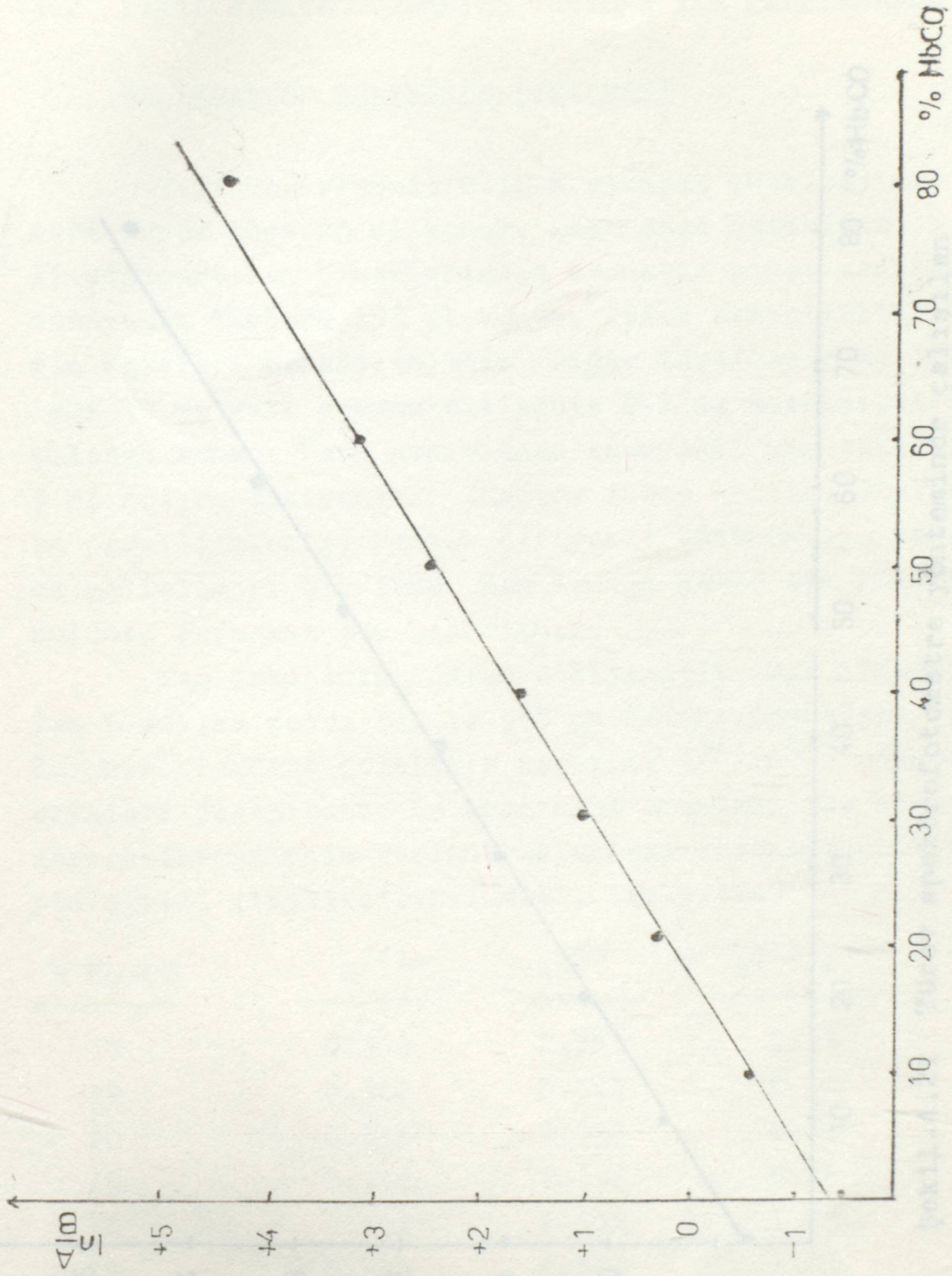
Şekil.4.19-B % 100 Hb-CO. A=5.02, B ?

<u>% Hb -CO</u>	<u>ln A/B</u>
0	-1.60
10	-0.51
20	+0.35
30	+1.07
40	+1.64
50	+2.49
60	+3.16
80	+4.38
100	- -

Tablo.4.2 Türev spektrofotometre yönteminde 2. kalibrasyon eğrisi ln A/B değerleri.

<u>% Hb -CO</u>	<u>ln A/B</u>
0	-1.58
10	-0.52
20	+0.33
30	+1.05
40	+1.61
50	+2.54
60	+3.26
80	+4.39

Tablo.4.3 Türev spektrofotometre yönteminde iki kalibrasyon eğrilerinin ortalama ln A/B değerleri.



Şekil.4.20 2. Kalibrasyon eğrisi $r=0.996$
 $y = 0.0734x - 1.28$

4.2 TIETZ SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ İLE KARBOKSİHEMOGLOBİN

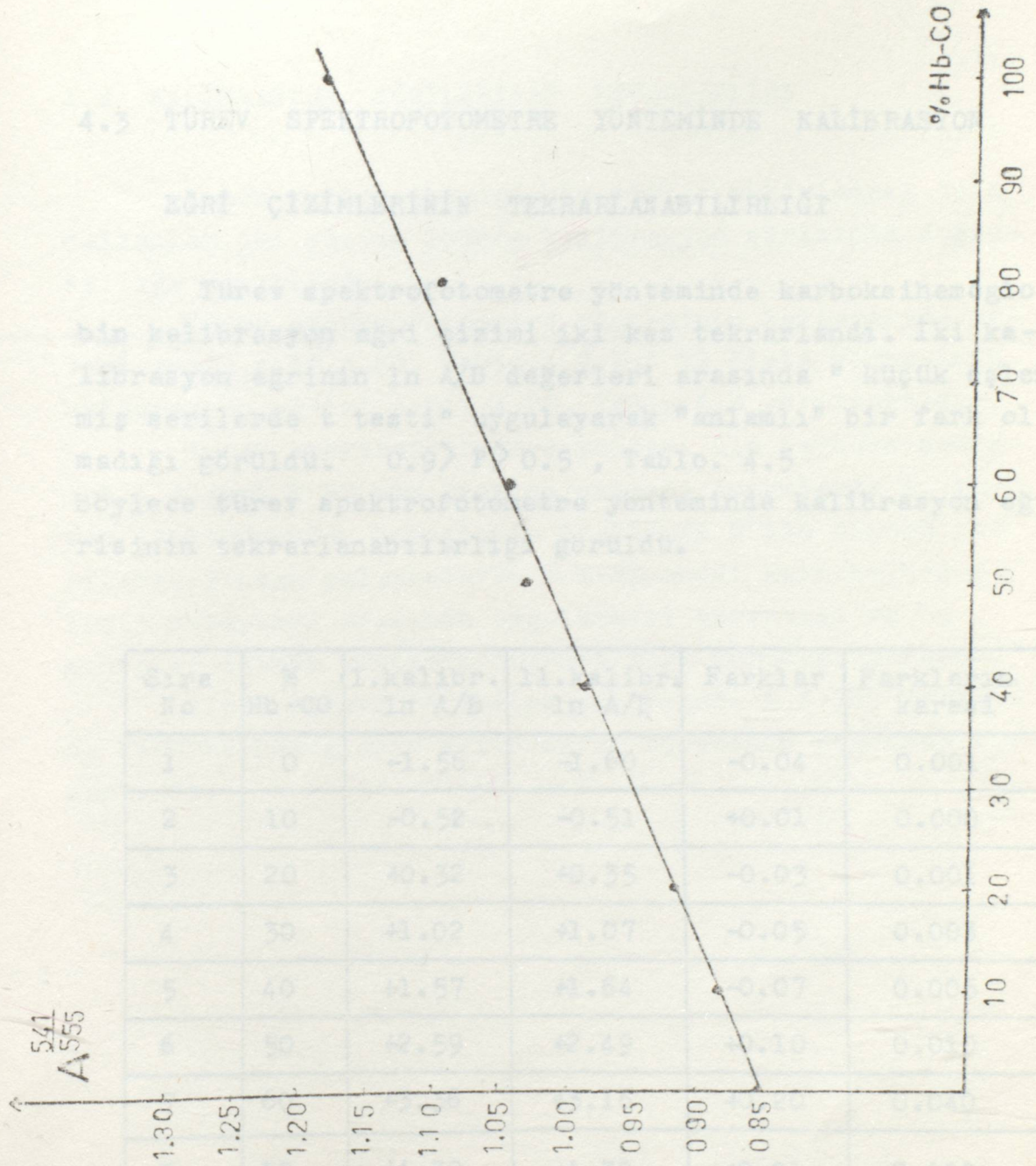
KALİBRASYON EĞRİSİNİN ÇİZİLMESİ

Yeni hazırlanmış 0.12 M amonyak çözeltisinden bir seri büyük tüpe 25 ml konur. Daha önce hazırlanan E.D.T.A. li standart kan örneklerinden otomatik pipet vasıtası ile amonyaklı tüplere 100 µl konur. İyice karıştırılır. Tüplerin ağızları parafilimlenir. Diğer taraftan 5 ml'lik tüplere 10 mg katı sodyum ditiyonit 0.1 mg hassasiyetle tartılarak konur. Önce hazırlanan amonyaklı kan çözeltisinden 3 ml sodyum ditiyonitli tüplere ilave edilir. Tüplerin ağızı parafilimlenir. Sodyum ditiyonit çözününceye kadar iyice çalkalanır. Bir tüpe kan örneği hariç tüm reaktiflerin bulunan referans tüp hazırlanır.

Kan örneğinin sodyum ditiyonitli tüpe ilavesinden tam 5 dakika sonra 541 ve 555 nm de absorbanları okunur. Her bir standart çözeltiye karşılık A^{541}/A^{555} absorban oranları hesaplanır. Bu absorban oranları ile standart karboksihemoglobin konsantrasyonları arasında kalibrasyon eğrisi çizilir. (Şekil.4.22, Tablo.4.4)

<u>% Hb-CO</u>	<u>A⁵⁴¹</u>	<u>A⁵⁵⁵</u>	<u>A⁵⁴¹/A⁵⁵⁵</u>
0	0.309	0.363	0.85
10	0.302	0.341	0.88
20	0.331	0.358	0.92
40	0.356	0.358	0.99
50	0.394	0.377	1.04
60	0.398	0.377	1.05
80	0.404	0.365	1.10
90	0.436	0.370	1.18

Tablo.4.4 Tietz spektrofotometre yönteminde absorban ve absorban oranları.



Şekil.4.22 Tietz kalibrasyon eğrisi. $r=0.994$
 $y=0.0325x - 0.85$

Tablo.4.5 kalibrasyon eğrisinin tekrarlanabilirliği
 $t=0.015$, $s=0.09$, $t=0.502$, $0.9 > |t| > 0.5$

4.3 TÜREV SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİNDE KALİBRASYON

EĞRİ ÇİZİMLERİNİN TEKRARLANABİLİRLİĞİ

Türev spektrofotometre yönteminde karboksihemoglobin kalibrasyon eğri çizimi iki kez tekrarlandı. İki kalibrasyon eğrinin $\ln A/B$ değerleri arasında "küçük eşlenmiş serilerde t testi" uygulayarak "anlamlı" bir fark olmadığı görüldü. $0.9 > P > 0.5$, Tablo. 4.5

Böylece türev spektrofotometre yönteminde kalibrasyon eğrisinin tekrarlanabilirliği görüldü.

Sıra No	% Hb-CO	1.kalibr. $\ln A/B$	11.kalibr. $\ln A/B$	Farklar	Farkların karesi
1	0	-1.56	-1.60	-0.04	0.001
2	10	-0.52	-0.51	+0.01	0.000
3	20	+0.32	+0.35	-0.03	0.001
4	30	+1.02	+1.07	-0.05	0.003
5	40	+1.57	+1.64	-0.07	0.005
6	50	+2.59	+2.49	+0.10	0.010
7	60	+3.36	+3.16	+0.20	0.040
8	80	+4.39	+4.38	+0.01	0.000
n=8				$T_1 = +0.13$	$T_2 = 0.060$

Tablo.4.5 Kalibrasyon eğrisinin tekrarlanabilirliği

$$m = 0.016, S = 0.09, t = 0.502, 0.9 > P > 0.5$$

4.4 KALİBRASYON EĞRİLERİNİN DOĞRUSALLIĞI

Kanda karboksihemoglobin miktar belirlemesi için çalışılan iki yöntem içinde kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı kanıtlandı.

Türev spektrofotometre yönteminin kalibrasyon eğrisi şekil.4.10,4.20, Tablo.4.1,4.2 ve Tietz yönteminin kalibrasyon eğrisi şekil.4.22, Tablo.4.4 görülmektedir.

Türev spektrofotometre yöntemi ile karboksihemoglobin düzeyi % 80'nin üzerine çıktığı durumlarda 2. türev spektrumunda hemoglobinin spektrumu B'nin ölçümü yapılamadığından çalışmaların % 0-80 arası karboksihemoglobin düzeyleri arasında uygulanması gerektiği ve bu sınırlar içinde yöntemin doğrusallığı koruduğu görüldü.

Tietz spektrofotometre yönteminde % 0-100 arasında karboksihemoglobin kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı saptandı.

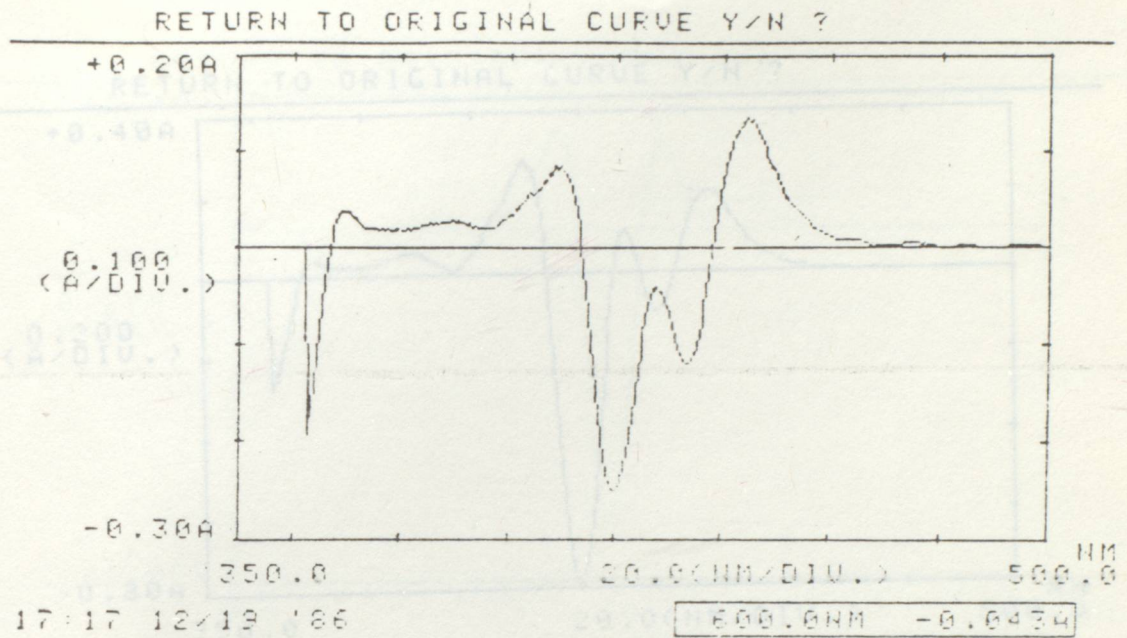
(Tablo.4.7)

4.5 KAN ÖRNEKLERİNDE KARBOKSİHEMOGLOBİN DAYANIKLILIĞI

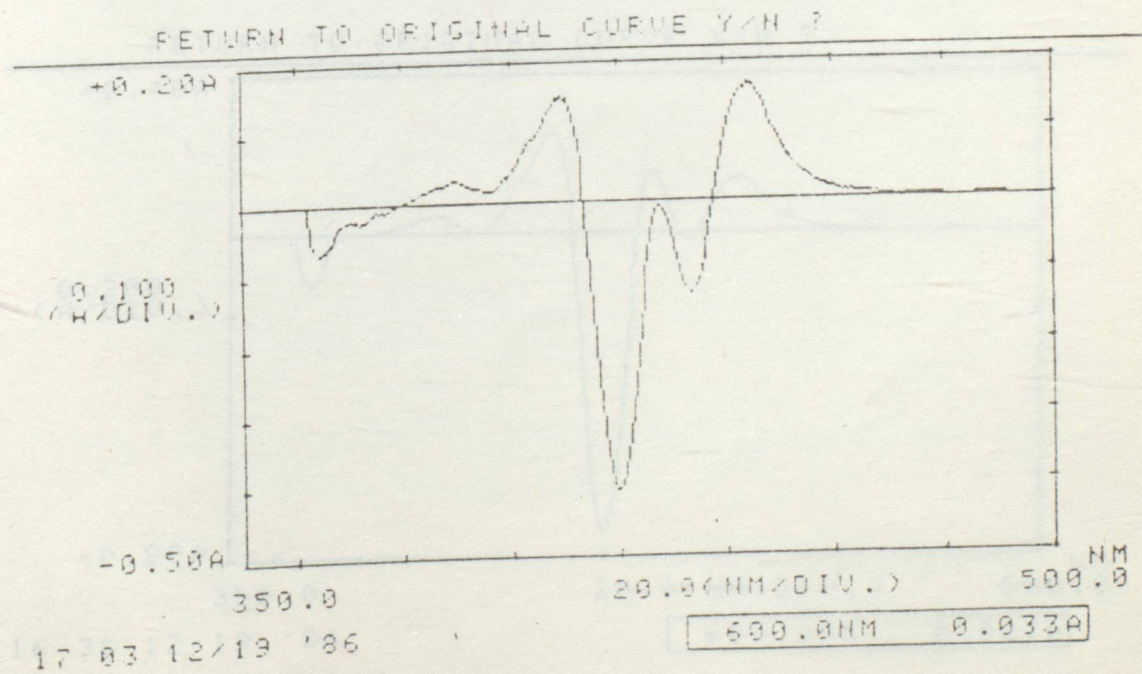
Karboksihemoglobin miktar belirlemesi için hazırlanan standart karboksihemoglobin örneklerini 0-4°C arasında 7 gün bekletildikten sonra gerek türev gerekse Tietz spektrofotometre yöntemleri ile yeniden incelenmiştir. Bu inceleme ile karboksihemoglobinin dayanıklılığı araştırıldı.

4.5.1 TÜREV SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ İLE Hb-CO'NUN DAYANIKLILIGININ İNCELENMESİ

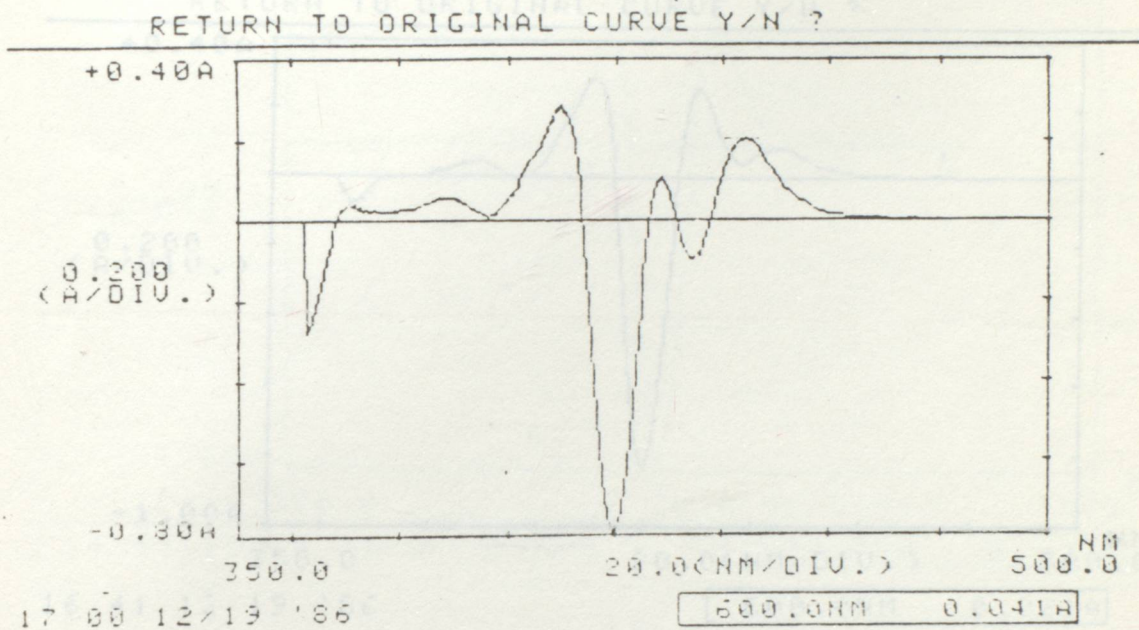
Standart karboksihemoglobin çözeltilerinin yukarıda belirtilen süre sonunda 2. derece türev spektrumları alındı. (Şekil.4.23-28) Bu spektrumlarda A ve B değerleri ölçülerek ln A/B oranları hesaplandı. (Tablo.4.6) Bekleme öncesi ve sonrası ln A/B değerleri arasında yapılan t-testi uygulandı. $0.05 > P > 0.02$ $r = 0.993$ (Tablo.4.7)



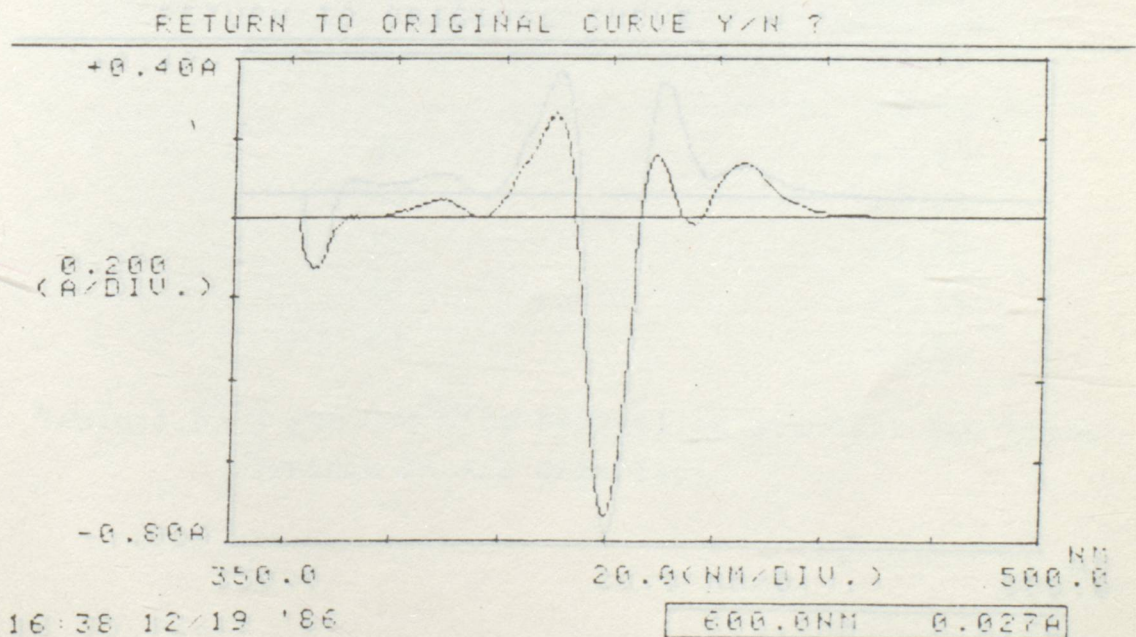
Şekil.4.23 % 10 Hb-CO. $A=4.05$, $B=3.30$, $\ln A/B=0.20$



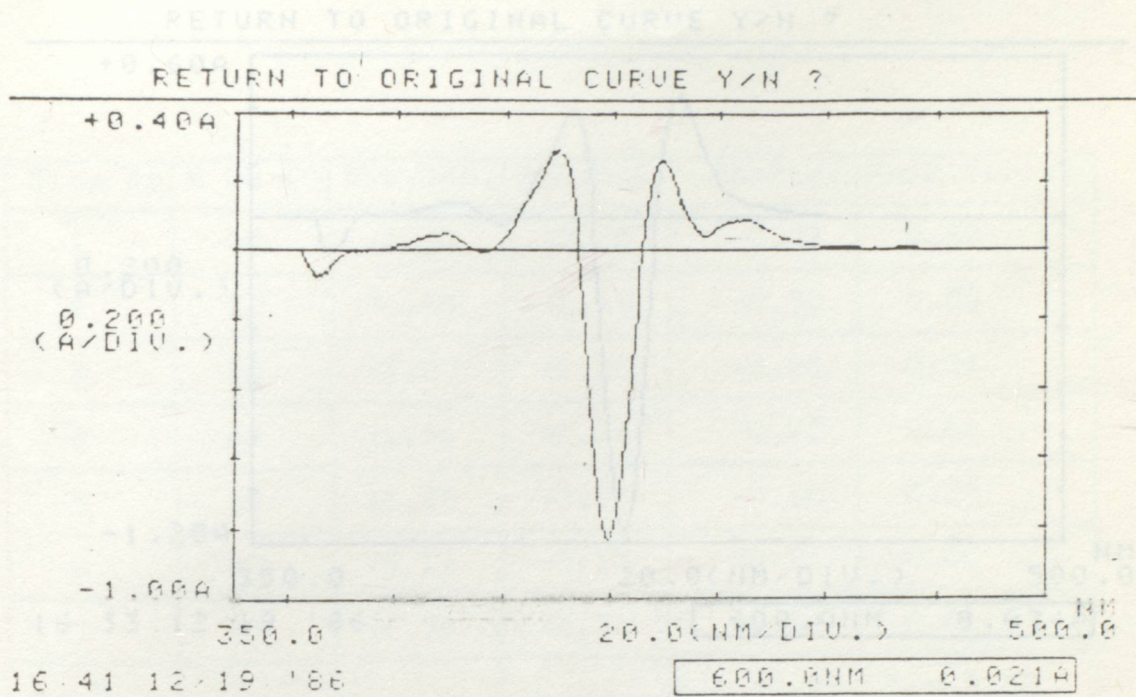
Şekil.4.24 % 20 Hb-CO. $A=5.10$, $B=2.65$, $\ln A/B=0.65$



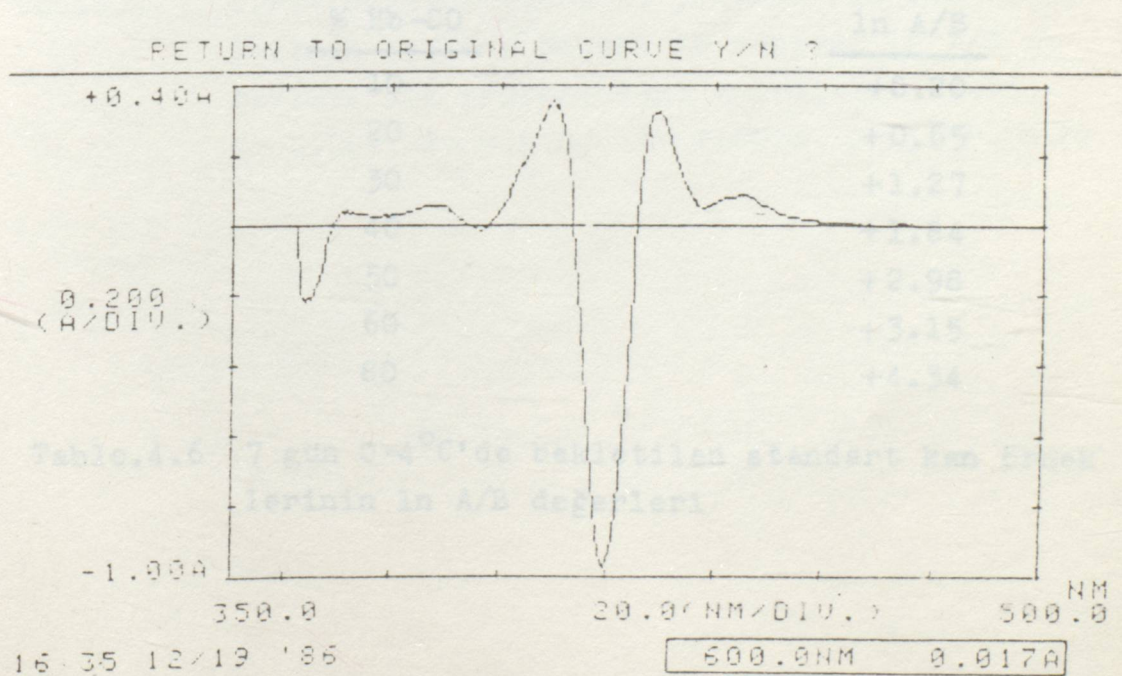
Şekil.4.25 % 30 Hb-CO. $A=5.50$, $B=1.55$, $\ln A/B=1.27$



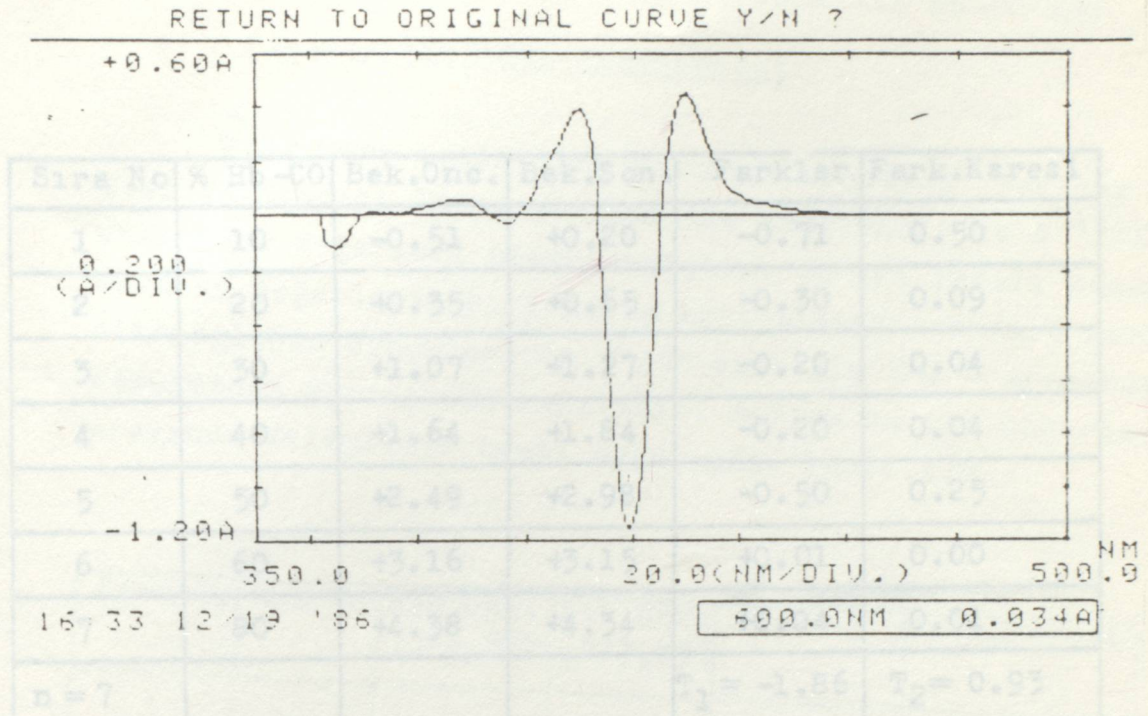
Şekil.4.26 %40Hb-CO. $A=5.20$, $B=0.82$, $\ln A/B=1.84$



Şekil.4.27 % 50 Hb-CO. $A=5.00$, $B=0.25$, $\ln A/B=2.98$



Şekil.4.28 % 60 Hb-CO. $A=5.80$, $B=0.25$, $\ln A/B=3.15$



Şekil.4.29 % 80 Hb-CO. A=5.40, B=0.07, $\ln A/B = 4.34$

Tablo.4.7 Türev yöntemiyle fotometre yöntemiyle kan örnekleri için beklenen ve ölçülen $\ln A/B$ değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

% Hb-CO	$\ln A/B$
10	+0.20
20	+0.65
30	+1.27
40	+1.84
50	+2.98
60	+3.15
80	+4.34

$m = 0.26$, $s = 0.270$, $r = 2.602B$, > 0.02

Tablo.4.6 7 gün 0-4°C'de bekletilen standart kan örneklerinin $\ln A/B$ değerleri

4.5.2. TİETZ SPECTROFOTOMETRE YÖNTEMİ İLE Hb-CO'NUN
DAYANIKLILIĞININ İNCELENMESİ

Sıra No	% Hb-CO	Bek.Onc.	Bek.Son.	Farklar	Fark.Karesi
1	10	-0.51	+0.20	-0.71	0.50
2	20	+0.35	+0.65	-0.30	0.09
3	30	+1.07	+1.27	-0.20	0.04
4	40	+1.64	+1.84	-0.20	0.04
5	50	+2.49	+2.98	-0.50	0.25
6	60	+3.16	+3.15	+0.01	0.00
7	80	+4.38	+4.34	+0.04	0.01
n=7				$T_1 = -1.86$	$T_2 = 0.93$

Tablo.4.7 Türev spektrofotometre yöntemi ile kan örnek-
lerinin bekleme öncesi ve sonrası ln A/B de-
ğerleri ile aralarındaki anlamlılık testi.
 $m = 0.265$, $S = 0.270$, $t = 2.6028$, $0.05 > P > 0.02$

Tablo.4.8 Tietz yöntemine göre Hb-CO'nun dayanıklılığı-
nın incelenmesi, $n = 0.005$, $S = 0.00$, $t = 0.00$

4.5.2 TİETZ SPEKTROFOTOMETRE YÖNTEMİ İLE Hb-CO'NUN

DAYANIKLILIĞININ İNCELENMESİ

Daha önce belirtilen standart örnekler bekleme öncesi ve sonrası Tietz yöntemi ile incelenmiş ve A^{541}/A^{555} absorbans değerleri hesaplanmıştır. Bu iki farklı zamanda bulunan değerlerin biri hariç eşit olması standart karboksihemoglobin örneklerinin 7 gün süre ile $0-4^{\circ}\text{C}$ arasında bozulmadan durduğunun kanıtıdır. Ayrıca bu iki değerler arasında anlamlılık testi uygulandı. Tablo.4.8

Sıra No	%Hb-CO	Bek.Önc. A^{541}/A^{555}	Bek.Son. A^{541}/A^{555}	Farklar	Fark.Karesi
1	20	0.92	0.92	0.00	0.00
2	40	0.99	0.99	0.00	0.00
3	60	1.05	1.05	0.00	0.00
4	80	1.10	1.12	-0.02	0.00
n = 4				$T_1 = 0.02$	$T_2 = 0.00$

Tablo.4.8 Tietz yöntemine göre Hb-CO'nun dayanıklılığının incelenmesi. $m = 0.005$, $S = 0.00$, $t = 0.00$
 $P > 0.9$

4.6 SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KİŞİLERDE KARBOKSİHEMOGLOBİN DÜZEYLERİ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarına değişik şikayetle baş vuran 44 kişiden farklı zamanlarda E.D.T.A.'li olarak kanlar alındı. Alınan her kan örneğine aynı gün içinde türev ve Tietz yöntemi ile karboksihemoglobin tayin edildi. Her iki yöntemle göre Hb-CO düzeyleri tablo.4.9'da görülmektedir.

Sigara içen ve içmeyen kişilerde Hb-CO düzeyleri genellikle % 2-10 arasında bulunmaktadır. Bu sonuçlar türev spektrofotometresi ve Tietz spektrofotometresi yöntemleri ile belirlenmiştir. İki yöntemle yapılan analiz sonuçlarında sigara içenler arasında anlamlı fark bulunmadı. $P < 0.001$ Tablo.4.10

Sigara içmeyenlerin Hb-CO düzeyleri 0 veya 0'a yakın olması yöntemlerin arasındaki farkın anlamsız çıkmasına neden olur.

Türev ve Tietz yöntemine göre kişilerin Hb-CO düzeyleri şekil 4.30'da şematik olarak görülmektedir. Bu şekilde görüldüğü gibi türev spektrofotometre yönteminde sigara içenle içmeyen kişileri ayıracak kadar düşük değerlerde hassasiyet mevcuttur. Oysa Tietz yönteminde bu hassasiyetlik bulunamadı. Bu durum Tietz yönteminin düşük karboksihemoglobin düzeylerini belirlemede türev yöntemi kadar hassas olmadığını gösterir.

* Sigara içenler

Tablo.4.9 Sigara içen ve içmeyen kişilerde türev ve Tietz yöntemine göre Hb-CO düzeyleri.

Tablo.4.10

ÖRNEK		% Hb-CO		ÖRNEK		% Hb-CO	
Sıra no	Türspe.yön	Tietzspe.yön.	Sıra no	Türspe.yön	Tietzspe.yön.	Sıra no	Türspe.yön
1*	3.50	0.00	23*	2.20	0.00		
2*	7.25	0.75	24*	6.00	3.66		
3*	6.75	3.66	25*	8.00	4.00		
4	0.40	0.00	26	0.00	0.00		
5*	5.00	0.75	27	0.00	0.00		
6*	3.50	0.00	28*	3.25	3.66		
7*	2.75	0.00	29	0.00	0.00		
8*	2.00	2.66	30	0.00	0.00		
9	0.00	0.00	31*	0.00	3.20		
10	0.00	0.00	32	0.00	0.00		
11	0.00	0.00	33	0.00	0.00		
12*	3.25	0.00	34*	1.25	0.00		
13*	0.00	0.00	35*	3.00	0.20		
14	0.00	0.00	36*	3.30	2.00		
15*	3.25	3.50	37*	5.25	2.10		
16	0.25	0.00	38*	2.10	2.00		
17*	7.00	0.00	39*	10.75	5.25		
18*	4.25	0.00	40*	10.25	5.25		
19*	6.50	3.50	41*	2.60	0.00		
20	0.00	0.00	42*	5.15	0.00		
21	0.30	0.00	43*	3.40	0.00		
22*	2.20	2.10	44*	3.30	0.00		

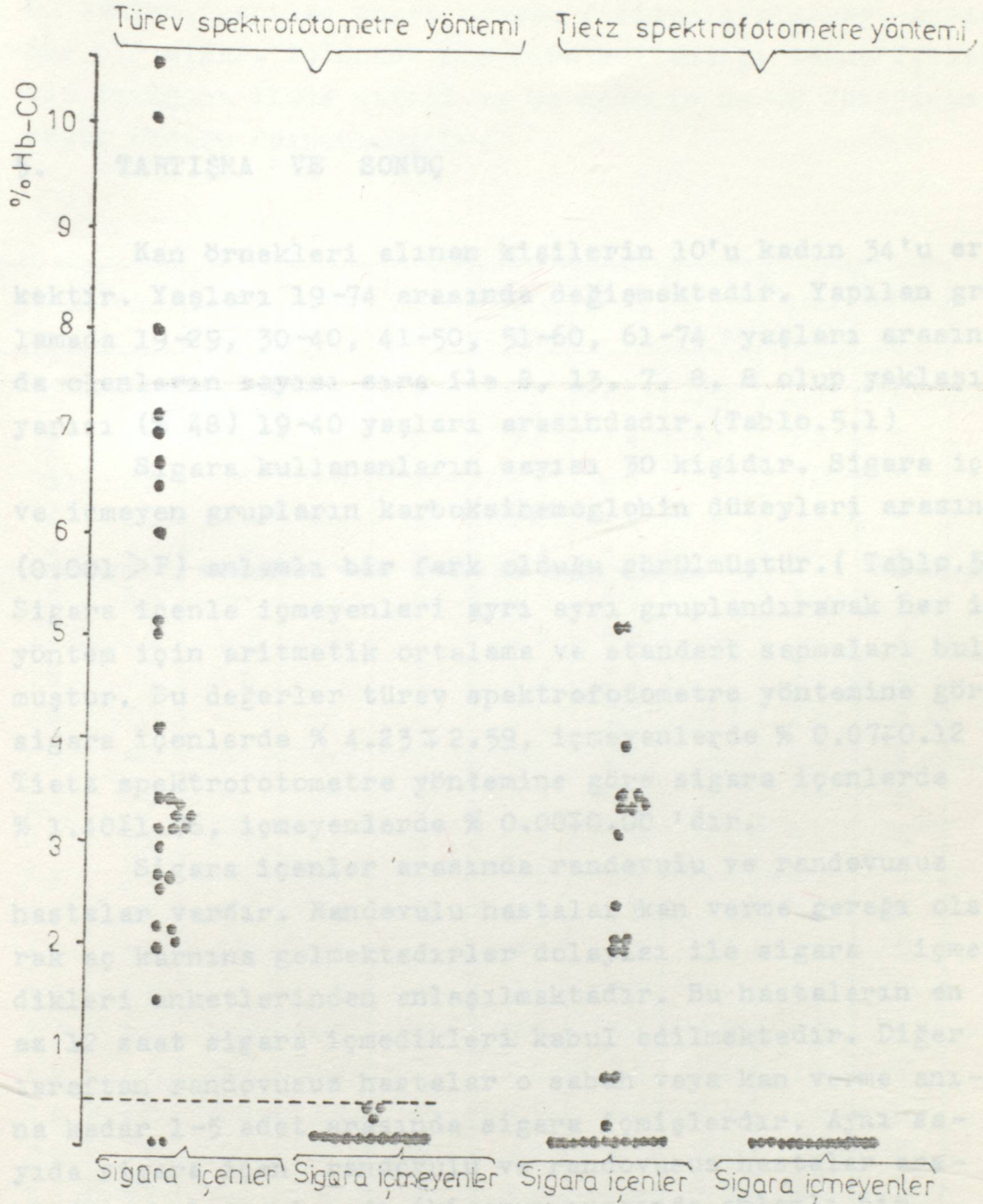
* Sigara içenler

Tablo.4.9 Sigara içen ve içmeyen kişilerde türev ve Tietz yöntemine göre Hb-CO düzeyleri.

Tablo.4.10

Örnek No	% Hb-CO		Farklar	Farkların Karesi
	Türev Yöntemi	Tietz Yöntemi		
1	3.50	0.00	3.50	12.25
2	7.25	0.75	6.50	42.25
3	6.75	3.66	3.09	9.55
4	5.00	0.75	4.25	18.06
5	3.50	0.00	3.50	12.25
6	2.75	0.00	2.75	7.56
7	2.00	0.00	2.00	4.00
8	3.25	0.00	3.25	10.56
9	0.00	0.00	0.00	0.00
10	3.25	0.00	3.25	10.56
11	7.00	0.00	7.00	49.00
12	4.25	0.00	4.25	18.06
13	6.50	3.50	3.00	9.00
14	2.20	2.10	0.10	0.01
15	2.20	0.00	2.20	4.84
16	6.00	3.66	2.34	5.48
17	8.00	4.00	4.00	16.00
18	3.25	3.66	-0.41	0.17
19	0.00	3.20	-3.24	10.24
20	1.25	0.00	1.25	1.56
21	3.00	0.20	2.80	7.84
22	3.30	2.00	1.30	1.69
23	5.25	2.10	3.15	9.92
24	2.10	2.00	0.10	0.01
25	10.75	5.25	5.50	30.25
26	10.25	5.25	5.00	25.00
27	2.60	0.00	2.60	6.76
28	5.15	0.00	5.15	26.52
29	3.40	0.00	3.40	11.56
30	3.30	0.00	3.30	10.89
n=30	S.D. 29		$T_1 = 82.92$	$T_2 = 371.27$

$$m = 2.764, S = 2.213, t = 6.841 \quad P < 0.001$$



Şekil.4.30 Türev ve Tietz spektrofotometre yöntemine göre sigara içenle içmeyenlerin Hb-CO düzeylerinin şematik olarak gösterilmesi.

Bu şahsın, yapılan anket sonucu filtrelili sigarayı ayrıca her bir sigara içiminde bir kere kullandığı taksitli filtre ile içtiğini ifade ettiği ve bu nedenle Hb-CO düzeyinin düşük olduğu düşünülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kan örnekleri alınan kişilerin 10'u kadın 34'u erkektir. Yaşları 19-74 arasında değişmektedir. Yapılan gruplamada 19-29, 30-40, 41-50, 51-60, 61-74 yaşları arasında olanların sayısı sıra ile 8, 13, 7, 8, 8 olup yaklaşık yarısı (% 48) 19-40 yaşları arasındadır. (Tablo.5.1)

Sigara kullananların sayısı 30 kişidir. Sigara içen ve içmeyen grupların karboksihemoglobün düzeyleri arasında ($0.001 > P$) anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. (Tablo.5.2) Sigara içenle içmeyenleri ayrı ayrı gruplandırarak her iki yöntem için aritmetik ortalama ve standart sapmaları bulunmuştur. Bu değerler türev spektrofotometre yöntemine göre sigara içenlerde % 4.23 ± 2.59 , içmeyenlerde % 0.07 ± 0.12 ve Tietz spektrofotometre yöntemine göre sigara içenlerde % 1.40 ± 1.76 , içmeyenlerde % 0.00 ± 0.00 'dır.

Sigara içenler arasında randevulu ve randevusuz hastalar vardır. Randevulu hastalar kan verme gereği olarak aç karnına gelmektedirler dolayısı ile sigara içmedikleri anketlerinden anlaşılmaktadır. Bu hastaların en az 12 saat sigara içmedikleri kabul edilmektedir. Diğer taraftan randevusuz hastalar o sabah veya kan verme anına kadar 1-5 adet arasında sigara içmişlerdir. Aynı sayıda sigara içen randevulu ve randevusuz hastalar arasında yapılan eşlemede iki grup arasında anlamlı bir fark vardır. $0.01 > P > 0.001$ (Tablo.5.3)

Günde 60 adet sigara içen bir kişinin sigarayı bıraktığı andan itibaren bir ay sonra kanında Hb-CO'ya raslanmamıştır. (4. örnek) Mesleğinin gereği (şöför) bulunduğu ortamdaki ve günde 40 adet sigara içmesine rağmen Hb-CO düzeyi sadece % 1.25 'dir.

Bu şahsın, yapılan anket sonucu filitreli sigarayı ayrıca her bir sigara içiminde bir kere kullandığı takma filitre ile içtiğini ifade ettiği ve bu nedenle Hb-CO düzeyinin düşük olduğu düşünülmüştür.

1 Sıra no	2 Yaş	3 İçme süresi	4 İçme mikta.	5 Cinsi-yeti	1 Sıra no	2 Yaş	3 İçme süresi	4 İçme mikta.	5 Cinsi-yeti
1	41	20	10	E	23	45	20	20	E
2	60	25	20	K	24	74	50	20	E
3	22	4	20	E	25	45	30	20	E
4	55	—	—	K	26	62	—	—	E
5	25	5	20	K	27	21	—	—	E
6	60	—	—	E	28	65	20	30	K
7	32	10	20	E	29	52	—	—	K
8	36	16	4	E	30	23	—	—	E
9	63	—	—	E	31	29	25	25	E
10	47	—	—	E	32	28	—	—	E
11	70	—	—	E	33	40	—	—	K
12	32	10	10	K	34	55	40	40	E
13	26	10	20	E	35	58	40	40	E
14	62	—	—	K	36	45	18	10	K
15	30	15	20	E	37	35	20	20	E
16	38	1	10	K	38	38	21	15	E
17	66	40	40	E	39	56	32	20	E
18	46	20	30	E	40	29	15	15	E
19	40	20	20	E	41	40	20	20	E
20	19	—	—	E	42	47	25	15	E
21	66	—	—	E	43	54	35	40	E
22	34	7	20	E	44	32	7	10	E

2-Yıl 3-Yıl 4-Tek sigara sayısı 5-Erkek(E), Kadın(K)

Tablo.5.1 Kan veren kişilerin özellikleri

Örnek No	Sigara İçen	Sigara İçmeyen	Farklar	Farkların Karesi
1	3.50	0.40	3.10	9.61
2	2.00	0.00	2.00	4.00
3	2.75	0.25	2.50	6.25
4	0.00	0.00	0.00	0.00
5	2.20	0.30	1.90	3.61
6	2.20	0.00	2.20	4.84
7	2.10	0.00	2.10	4.41
8	0.00	0.00	0.00	0.00
9	2.60	0.00	2.60	6.76
10	1.25	0.00	1.25	1.56
11	3.30	0.00	3.30	10.89
12	3.25	0.00	3.25	10.56
13	3.00	0.00	3.00	9.00
14	3.30	0.00	3.30	10.89
n=14			$T_1 = 30.50$	$T_2 = 82.38$

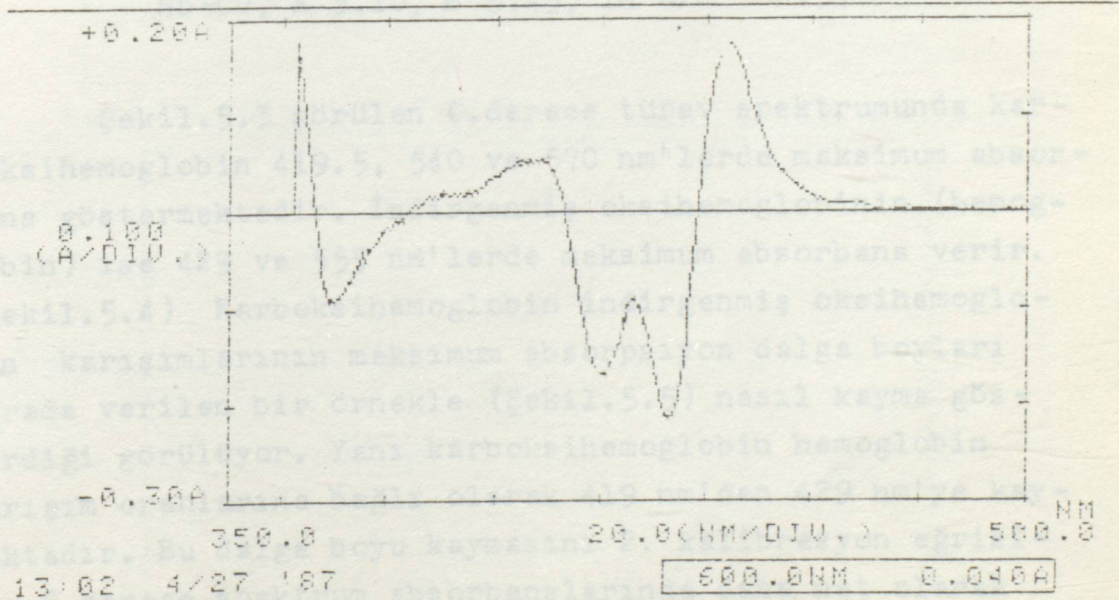
Tablo.5.2 Türev yöntemine göre sigara içenle içmeyen arasında aynı gün alınan örneklerin eşlenmesi yapılmıştır. $m=2.18$, $S=1.107$, $t=7.365$
 $S.D.=13$, $0.001 > P$

Sıra No	Si.Ad.	Randovulu	Randovusuz	Farklar	Fark.Kar.
1	10	3.30	3.50	-0.20	0.04
2	20	3.25	7.25	-4.00	16.00
3	20	6.50	10.75	4.25	18.06
4	20	2.20	5.75	3.05	9.30
5	20	6.50	10.25	3.75	14.06
6	20	6.00	7.00	1.00	1.00
7	20	2.60	8.00	5.40	29.16
8	20	2.60	2.75	0.15	0.02
9	40	1.25	3.00	1.75	3.06
10	40	3.40	3.00	0.40	0.16
n=10	S.D.=9			$T_1 = 23.95$	$T_2 = 90.86$

Tablo.5.3 $m=2.395$, $S=1.92$, $t=3.801$, $0.01 > P > 0.001$

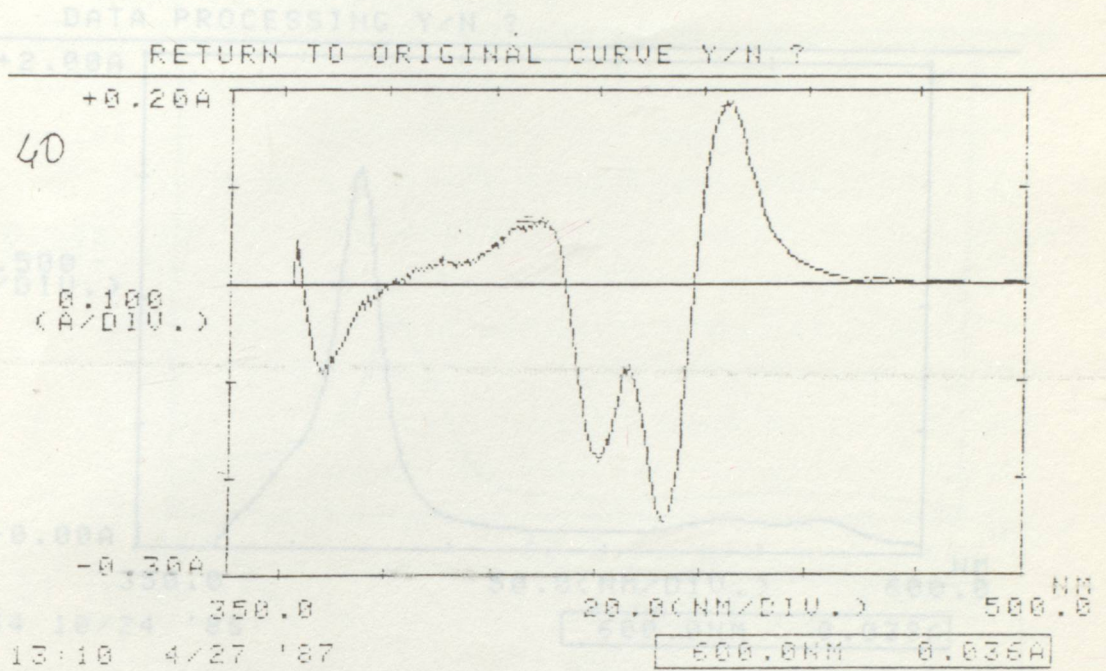
Sigara içenlerde karboksihemoglobin düzeyleri bazı yayınlarda genellikle en çok % 6.50 olarak verilmektedir. Oysa bulguları sunulan bu çalışmada sigara içme anı ile kan alımı anına bağlı olarak genelde % 10 kadar yükseldiği gözlenmiştir. Bu durum türev spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiştir. Hb-CO düzeyi % 10 civarında olan iki örneğin 2. derece türev spektrumları (Şekil.5.1-2) ile hazırlanan % 10 Hb-CO standartın 2. derece türev spektrumlarının (Şekil.4.2,12-B) karşılaştırılmasından açıkça görülecektir. Karboksihemoglobinin bu derece yüksek bulunması günlük fazla sigara içmelerin yanında kan vermeden çok kısa süre önce 1-5 arasında sigara içmeleri neden olmuştur. Hb-CO düzeyi sigara içme anında maksimum değere ulaşır. İçme aralığının uzaması ile oksijenin akciğerlerdeki doygunluğu yüzünden azalmaktadır.

Şekil.5.2 40. kişinin 2. derece türev spektrumu. % 10.25



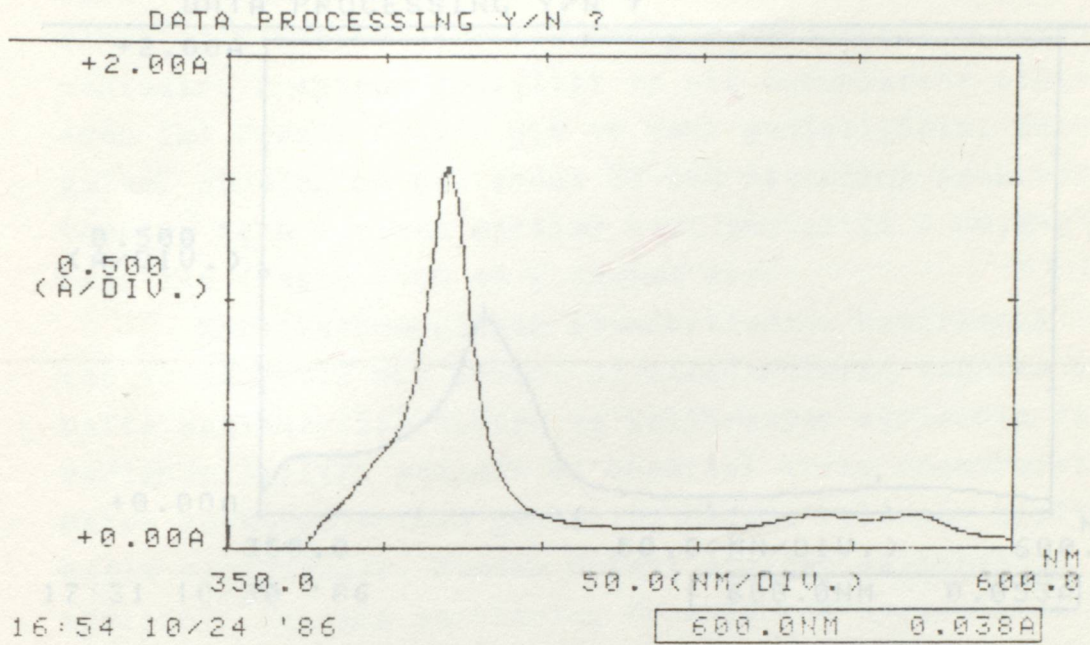
Şekil.5.1 39. kişinin 2. derece türev spektrumu. % 10.75

Hb-CO, A=2.80, B=4.82, $\ln A/B = -0.54$



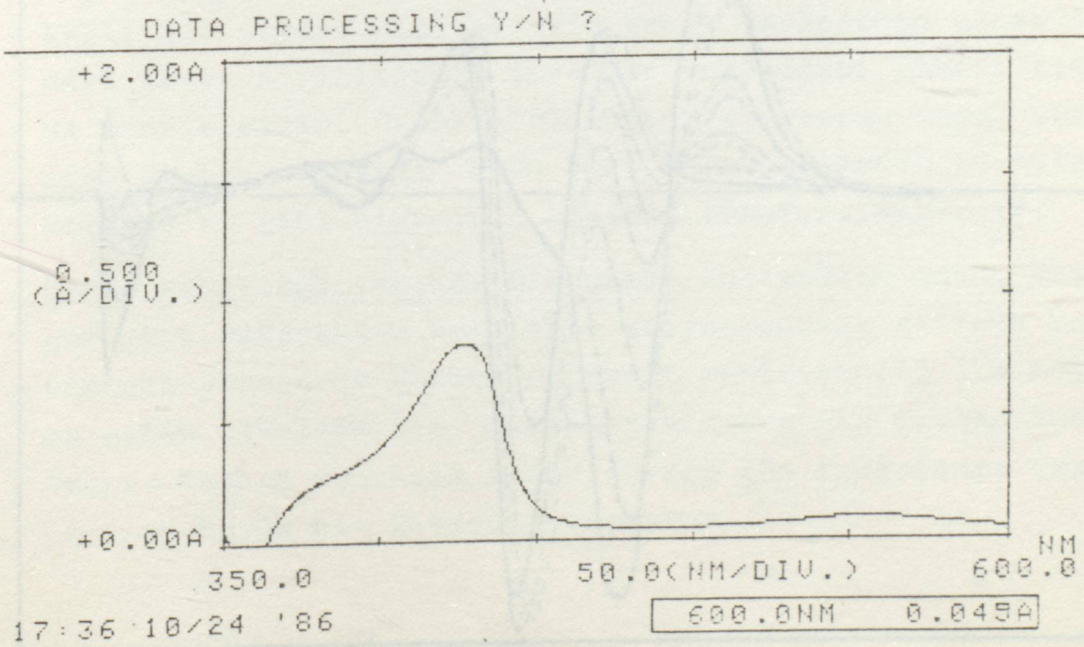
Şekil.5.2 40. örneğin 2. derece türev spektrumu. % 10.25
Hb-CO, A 3.10, B 5.45, ln A/B -0.57

Şekil.5.3 görülen 0.derece türev spektrumunda karboksihemoglobin 419.5, 540 ve 570 nm'lerde maksimum absorptans göstermektedir. İndirgenmiş oksihemoglobinin (hemoglobin) ise 429 ve 555 nm'lerde maksimum absorptans verir. (Şekil.5.4) Karboksihemoglobin indirgenmiş oksihemoglobinin karışımlarının maksimum absorpsiyon dalga boyları burada verilen bir örnekle (Şekil.5.5) nasıl kayma gösterdiği görülüyor. Yani karboksihemoglobin hemoglobinin karışım oranlarına bağlı olarak 419 nm'den 429 nm'ye kaymaktadır. Bu dalga boyu kaymasını 2. kalibrasyon eğrisinin 0.derece spektrum absorptanslarında daha net olarak görülmektedir. (Şekil.4.11-A,19-A) 0. derece spektrumunda maksimum absorptans noktalarının kaymasına paralel olarak 2.derece türev spektrumunda nasıl bir değişme olduğunu kolayca görülebilmesi için % 0-100 arası Hb-CO türev spektrumları üst üste çizilmiştir. (Şekil.5.6)



Şekil.5.3 % 100 Hb-CO'nun 0. derece spektrumu

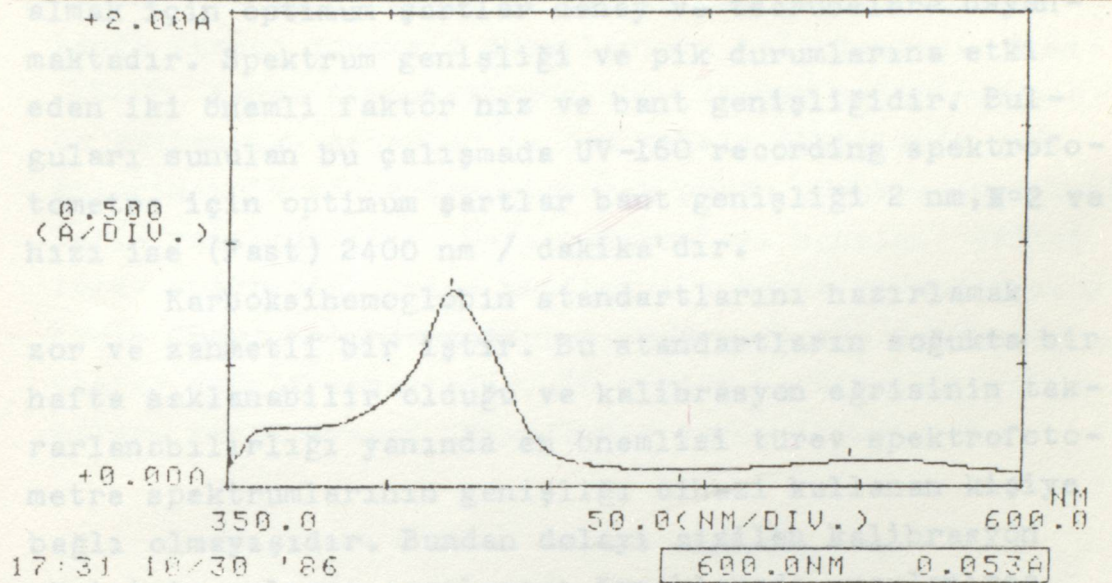
$$\lambda_{\text{mak.}} = 419.5 - 540 - 570 \text{ nm}$$



Şekil.5.4 % 100 Hb-O₂'nin 0. derece spektrumu

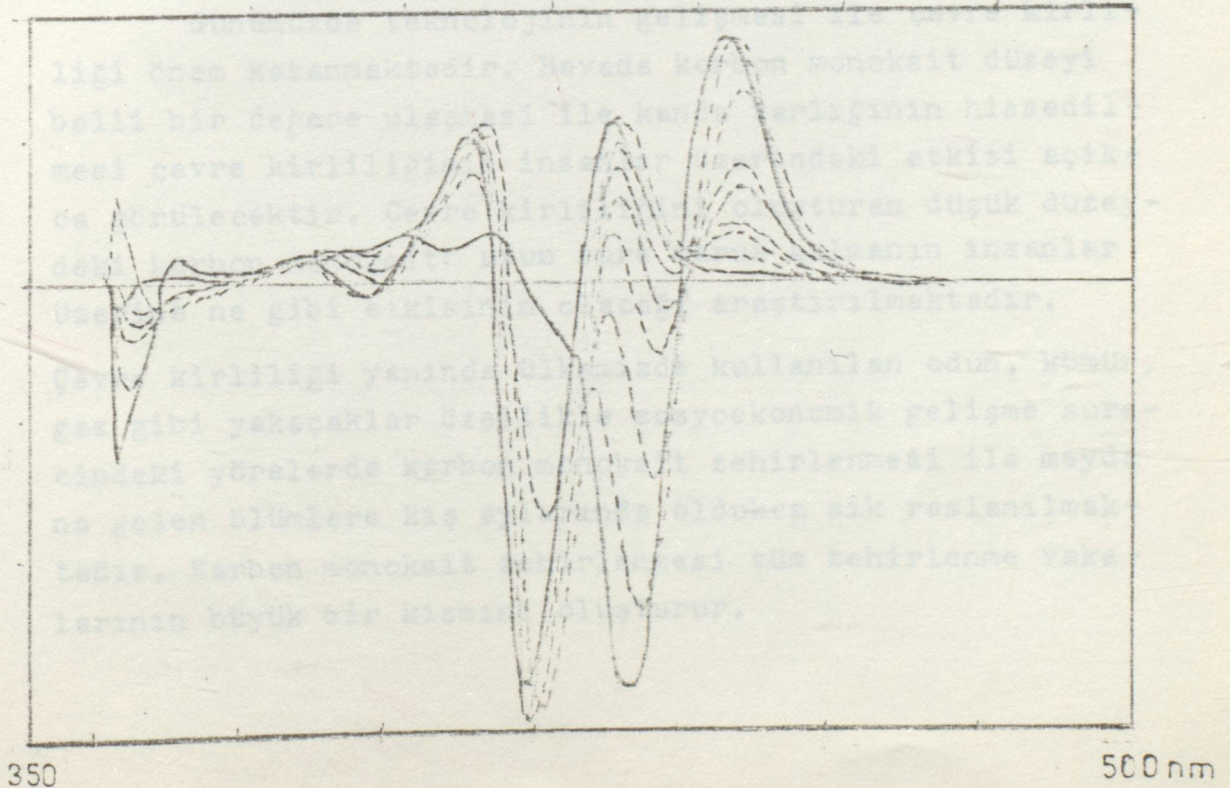
$$\lambda_{\text{mak.}} = 430 - 555 \text{ nm}$$

DATA PROCESSING Y/N ?



Şekil.5.5 % 30 Hb-CO'nun 0. derece spektrumu

$$\lambda_{\text{mEK.}} = 420 \text{ nm}$$



Şekil.5.6 % 0-100 arası Hb-CO'nun 2. derece türev spektrumlarının birarada görünümü

UV-160 Recording spektrofotometre diğer eşdeğer spektrofotometrelerde olduğu gibi türev spektrumlarını almak için optimum şartlar deney ve tecrübelerine dayanmaktadır. Spektrum genişliği ve pik durumlarına etki eden iki önemli faktör hız ve bant genişliğidir. Bulguları sunulan bu çalışmada UV-160 recording spektrofotometre için optimum şartlar bant genişliği 2 nm, $N=2$ ve hızı ise (Fast) 2400 nm / dakika'dır.

Karboksihemoglobin standartlarını hazırlamak zor ve zahmetli bir iştir. Bu standartların soğukta bir hafta saklanabilir olduğu ve kalibrasyon eğrisinin tekrarlanabilirliği yanında en önemlisi türev spektrofotometre spektrumlarının genişliği cihazı kullanan kişiye bağlı olmayışıdır. Bundan dolayı çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışma şartlarını örneklerde uygulanırsa kalibrasyon eğrisinin uzun bir süre kullanılabilmesi, bu yöntemin çok daha kullanışlı ve kolay olduğuna kanıttır.

Günümüzde teknolojinin gelişmesi ile çevre kirliliği önem kazanmaktadır. Havada karbon monoksit düzeyi belli bir değere ulaşması ile kanda varlığının hissedilmesi çevre kirliliğinin insanlar üzerindeki etkisi açıkça görülecektir. Çevre kirliliğini oluşturan düşük düzeydeki karbon monoksit uzun süre maruz kalmanın insanlar üzerine ne gibi etkisinin olacağı araştırılmaktadır.

Çevre kirliliği yanında ülkemizde kullanılan odun, kömür, gaz gibi yakacaklar özellikle sosyoekonomik gelişme sürecindeki yörelerde karbon monoksit zehirlenmesi ile meydana gelen ölümlere kış aylarında oldukça sık raslanılmaktadır. Karbon monoksit zehirlenmesi tüm zehirlenme vakalarının büyük bir kısmını oluşturur.

Çevre kirliliği açısından ve ölümle sonuçlanabilen karbon monoksit zehirlenme vakalarının fazlalığı nedeni ile toksikoloji ve klinik laboratuvarlarında kanda karbon monoksit düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Kanda karboksihemoglobin miktar belirlenmesinde kullanılan metodlar ya çok pahalı cihazlarla ya da kolorimetrik yöntemler gibi pek güven duyulmayan tekniklerle yapılmaktadır. Oysa çalışmaları sunulan ikinci türev spektrofotometre yöntemi ile kanda karboksihemoglobin düzey belirlemesi ucuz, doğru, hızlı ve hassas olarak yapılabilmektedir. Bu yöntem bu alandaki çalışmaları karşılayacak düzeyde bir sonuç alınmıştır.

- 4- Fiets, R.W. *Textbook of Clinical Chemistry*, 1955-1961 1699-1703, London 1966
- 5- Stryer, L. *Biochemistry*, 47-94, San Francisco 1975
- 6- Yenson, N. *İnsan Biyokimyası*, 480-491, İstanbul 1981
- 7- Bekarada, B. Mustafaoglu, A.U., Ulutin, O. *Kan Hastalıkları*, 13-17, İstanbul 1981
- 8- Zijlstra, W.G., Suijrens, A., Kwant, G., Geerburg, B. Zwart, A. Carboxyhemoglobin Determination and Significance in oxygen transport. *EXP. MAB. BIOL.* 191, 1985
- 9- White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.P. *Principles of Biochemistry*, 946-983, Tokyo 1978
- 10- Jack, L., Lambert, R.P., Paschorn, and Basian, P.A. Determination of Carbon Monoxide in Blood. *ANAL. CHEM.* 44 9 1529-30 1972
- 11- Goldstein, M. and Klendshof, N.C. Determination of Volatile Substance by Microdiffusion Analysis. *J. FORENSIC SCI.* 2 39 1957
- 12- Matell, J.C., Farlow, C.H. and Saughey, W.S. The Utility I.S. Spectroscopy as a Probe of Infant Death, Determination of Carbon Monoxide and Heme Proteins in Blood and Heart Muscle. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM.* 61 230-35 1974

- 24 - Rawler, A. Jr., Jettlow, P. and Seligson, D. New Method for
- 13- Verner, A. A Sensitive Rapid I.R. Method for Analyzing CO in Blood, S.CLIN.LAB.INVEST. 36 203-205 1976
- 14- Coburn, R.F. Danielson, G.K. Balcemore, W.S. and Forster, R.E. CO in Blood Analytic Method and Sources of Error, J.APPL.PHYSIOL 19 510-519 1964
- 15- Mc Credie, R.M. Joje, A.D. Analysis of Blood Carbon monoxide and Oxygen by Gas Chromatography, CLIN.CHEM. 14 167-171 1968
- 16- Collison, H.A. Rodkey, F.L. and O'Neal, J.D. Determination of Carbon Monoxide in Blood by Gas Chromatography CLIN.CHEM. 14 162 1968
- 17- Porter, K. and Volman, D.H. Flame Ionization Detection of Carbon Monoxide for Gas Chromatographic Analysis, ANAL.CHEM. 34 748 1962
- 18- Shigezane, J. Quantitative Determination of Carboxyhemoglobin in Tissues, NIPPON HOIGAKU ZASSHI 39(1) 6-10 1985
- 19- Wooton, I.D.P. Micro Analysis in Medical Biochemistry, 1097-1098 London 1964
- 20- Maas, A.J.H. Hamelink, M.L. and De Leeuw, R.J.M. An Evaluation of the Spectrophotometric Determination of HbO₂, HbCO and Hb in Blood with the CO-Oximeter, 11 182 CLIN.CHIM.ACTA 29 303 1970
- 21- Amenta, J.S. The Spectrophotometric Determination of Carbon Monoxide in Blood, STAN.METHODS CLIN.CHEM. 4 31 1963
- 22- Rai, V.S. Minty, P.S.B. The Determination of Carboxyhemoglobin in the Presence of Sulfhemoglobin FORESIC SC.INT. 33(1) 1-6 1986
- 23- Ameno, I.H. Yamamoto, Y. Okamura, K. Shogano, N. A Simple Spectrophotometric Method for Carboxyhemoglobin (Hb-CO) Determination in Blood and its Application in Legal Medicine, HAN.ZASSHI 48 (5-6) 186-96 1982

- 24- Ramier, A. Jr. Jätlow, P. and Seligson, D. New Method for Rapid Determination of Carboxyhemoglobin by use of Double-Wavelength Spectrophotometry. CLIN.CHEM. 20/2 278-81 1974
- 25- Orimoto, C. Shinomiya, K. Shinomiya, T. A Method for the Determination of Carboxyhemoglobin Saturation in Blood by using the Ecolyzer Model 2600. NIPPON HOIGAKU ZASSKI 39 (4) 331-38 1986
- 26- İstimyeli, S. Spektrofotometre, Seminer Notları, Yıldız Üniversitesi 1986
- 27- Ewing, G.W. Instrumental Methods of Chemical Analysis. 15. Edition 48-52 New York 1985
- 28- Shibata, S. Furukawa, M. Goto, K. Dual-Wavelength Spectrophotometry Quantitative and Qualitative Analysis by Means of First Derivative Spectra. ANALYTICA CHIMICA ACTA 65 49-58 1973
- 29- Shibata, S. Furukawa, M. Goto, K. Dual-Wavelength Spectrophotometry. ANALYTICA CHIMICA ACTA 46 271-79 1969
- 30- O'Haver, T.C. Derivative and Wavelength Modulation Spectrophotometry. ANA.CHEM. 51 1 91A-100A 1979
- 31- Martin, A.E. Difference and Derivative Spectra. NATURE 4579 231-233 1957
- 32- Tsung-li, Kuo Derivative Spectroscopic Determination of Paraquat in Serum. CLIN.CHEM. 32/2 337-339 1986
- 33- Kip Amazon, M.D. Felix Soloni, P.D. and Arkadi, M. Rywlin, M.D. Separation of Bilirubin from Hemoglobin by Recording Derivative Spectrophotometry. AME.SOC.OF CLIN.PAT. 25 4 519-523 1981
- 34- Jones, K.G. and Sweeney, G.D. Quantitation of Urinary Porphyrins by use of Second-Derivative Spectroscopy. CLIN.CHEM. 25/1 71-74 1979
- 35- Fell, A.F. Jarvie, D.R. and Stewart, M.J. Analysis for Paraquat by Second-and Forth-Derivative Spectroscopy. CLIN.CHEM. 27/2 286-96 1981

- 36- O'Haver, T.C. and Green, G.L. Numerical Error Analysis of Derivative Spectrophotometry for the Quantitative Analysis of Mixtures. ANA.CHEM. 48 2 312-18 1976
- 37- Cook, T.E. Santini, R.E. and Pardue, H.L. Design and Evaluation of a Vidicon Based Derivative Spectrometer. ANAL.CHEM. 49 871-77 1977
- 38- Nagashima, K. Matsumoto, M and Suzuki, S. Determination of Nitrate and Nitrite by Using Second-Derivative Spectrophotometry. ANAL.CHEM. 57 2065-67 1985
- 39- Strojek, W.J. Yates, D. and Kuwana, T. Derivative Spectrophotometry: Application to Trace Sulfur Dioxide Analysis. ANAL.CHEM. 47 1050-54 1975
- 40- Tahboub, Y.R. and Pardue, H.L. Evaluation of Multiwavelength First- and Second-Derivative Spectra for the Quantitation of Mixtures of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. ANAL.CHEM. 57 41-45 1985
- 41- Robert, N. Hager, Jr. Derivative Spectroscopy with Emphasis on Trace Gas Analysis. ANAL.CHEM. 45 1131A-38A 1973
- 42- Shibata, S. Dual-Wavelength Spectrophotometry. ANGEW. CHEM. 15 673-79 1976
- 43- Talsky, G. Mayring, L. and Kreuzer, H. High-Resolution, Higher-Order UV/VIS Derivative Spectrophotometry. ANGEW.CHEM. 17 785-99 1978
- 44- Porto, T.J. Double-Wavelength Spectroscopy. ANAL.CHEM. 44 (4) 93A-1003A 1972
- 45- Ishizawa, F. Misawa, S. A Handy and Simple Apparatus for Quantitative Determination of COHb in Blood. HANZA. ZASSHI 52 (1) 26-32 1986
- 46- Parks, J. and Worth, H.G.J. Carboxyhemoglobin Determination by Second-Derivative Spectroscopy. CLIN.CHEM. 31/2 279-281 1985
- 47- O'Haver, T.C. Potential Clinical Applications of Derivative and Wavelength-Modulation Spectrometry, CLIN.CHEM. 25 1548-1553 1979

- 48- Gündüz, T. Kantitatif Analiz Ders Kitabı 2. Baskı 26-41
Malatya 1983
- 49- Velicangil, S. Biyoloji, Tıp ve Eczacılık Biliminde İstatistik Metodlar. 2. Baskı 167-69 İstanbul 1979

Ö Z E T İ

1955 yılında Kize'de doğdum. İlkokul (1966), ortaokul (1969) ve lise (1972) tahsilini meslektaşım olan Fatur'da tamamladım.

1974-75 öğretim yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Zooloji Bölümüne girdim. 1979 güz döneminde Biyolog olarak mezun oldum.

1983 yılında Yıldız Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Anabilim Dalına Tezli olarak girdim. 1984 yılında aynı bilim dalına Uzman olarak atandım.

1985-86 öğretim yılında Yıldız Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde Yüksek Lisans'a başladım. Aynı öğretim "Türev Spektrofotometre ile Kan'da Karboksihemoglobin miktar belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tez çalışmaları tamamladım.

Ö Z G E Ç M İ Ş

1955 yılında Rize'de doğdum. İlkokul (1966), ortaokul (1969) ve lise (1972) tahsilimi memleketim olan Pazar'da tamamladım.

1974-75 öğretim yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Zooloji bölümüne girdim. 1979 güz döneminde Biolog olarak mezun oldum.

1983 yılında Yıldız Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik anabilim dalına Teknisyeni olarak girdim. 1984 yılında aynı bilim dalına Uzman olarak atandım.

1985-86 öğretim yılında Yıldız Üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü Kimya bölümünde Yüksek Lisans'a başladım. Almış olduğum "Türev Spektrofotometre ile Kanda Karboksihemoglobin miktar belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tez çalışmalarını tamamladım.

