

A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü

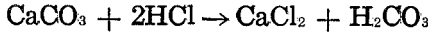
**CLARK COLLIP KALSİYUM TAYİN METODU VE KALSİYUM
STANDARTLARININ HAZIRLANMASINA
AIT ÇALIŞMA**

Dr. Cemil Rota *

Dr. Ç. Kaya Öncül **

Dr. Zuhal Yurtaslan ***

Clark Collip metodu serumda kalsiyum tayininde kullanılan standart metodlardan biridir (4). Bu metodda standart reaktif suda çözünmeyen CaCO_3 la hazırlanır. Bunun için bir miktar CaCO_3 , HCl ile muamele edilerek suda çözünen CaCl_2 meydana getirilir:



Kalsiyum klorürden kalsiyum, amonyum okzalat ile çöktürülür. Bundan sonra okzalik aside çevrilerek potasyum permanganatla titre edilir. Standart reaktifteki veya serumdaki kalsiyum hesapla bulunur.

Ancak literatürde standart kalsiyum reaktifinin hazırlanması için kullanılan HCl miktarları değişik olarak verilmektedir (1, 3).

HCl miktarının kalsiyum miktar tayini üzerinde etkisinin ne olacağı ve en uygun HCl miktarının tesbiti çalışmamıza esas konu olmuştur. Ayrıca kalsiyum okzalatın suda çözünmediğini düşünerek yıkama işlemini NH_3 lı su yerine bidistile su ile yaparak neticede bir fark olup olmadığını inceledik. Literatürde değişik bekletme süreleri tavsiye edilmektedir (2). Bu sebeple bekletme sürelerinin sonuç üzerindeki tesirlerini araştırdık.

MATERYEL VE METOD

Kullanılan analiz metodu Clark Collip'dir. Standart kalsiyum reaktiflerinin hazırlanmasında Annino ve Simmonds (1, 3) esas alındı. A ve B olmak üzere iki standart seri hazırlandı.

* A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Profesörü.

** Aynı Kürsü Uzman Asistanı.

*** Aynı Kürsü Uzman Asistanı.

Seri A — Bu seride 250 mg. CaCO_3 N HCl de çözülerek hacim distile su ile litreye tamamlandı. Çalışmamızda altı değişik standart reaktif hazırlandı. Bu standartların herbirinde 250 mg. CaCO_3 kullandık. Ancak N HCl miktarlarını aşağıdaki şekilde değiştirdik:

Standart A_1 reaktifinde 10 ml., A_2 de 20 ml., A_3 de 80 ml., A_4 de 160 ml., A_5 de 320 ml. ve A_6 da 720 ml. N HCl aldık ve herbirini distile su ile 1000 ml. e tamamladık. Bu standart reaktiflerin normaliteleri sırayla 0,01 N., 0,02 N., 0,08 N., 0,16 N., 0,32 N ve 0,72 N dir.

Seri B — Bu seride stok standardın hazırlanması için 5 gm. CaCO_3 100 ml. N HCl de çözülerek hacim distile su ile 500 ml. e getirilir. Deneyde kullanılan reaktif için stok standartdan 5 ml. alınarak distile su ile 200 ml. e tamamlanır. Bu reaktif 0,005 N dir.

Biz aynı miktarda CaCO_3 100 ml., 200 ml. ve 400 ml. N HCl de çözdükten sonra distile su ile 500 ml. e tamamlayarak 3 ayrı stok standart reaktif hazırlandı. Deneyler için bu stoklardan 5 er ml. alarak distile su ile 200 ml. e tamamladık. Bunların normaliteleri sırası ile 0,005 N., 0,01 N ve 0,02 N dir.

Deneylerin yapılışı: Konik santrifüj tüpüne 2 ml. standart reaktif, 2 ml. distile su, seri A da 2 ml. % 4 ammonyum okzalate, seri B de 1 ml. % 4 ammonyum okzalate kondu. Tüp çalkalandıktan sonra 60 dakika oda hararetinde bırakıldı. 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak sıvı döküldü, tüp ters çevrilerek drene edildi. 5 ml. % 2 NH_3 lı su kondu. Tüp santrifüj edildi ve tekrar drene edildi. Tüpe 2 ml. N H_2SO_4 ilâve edilerek gökelek çözüldü. Su banyosunda 65 - 70°C arasında çözünme tamamlandı ve N/100 potasyum permanganatla titre edildi. Sonuçlar formülden % mg. Ca olarak hesaplandı.

HCl ve % 4 ammonyum okzalatin etkilerinin tetkiki:

Deneylerimizde % 10 mg. lık kalsiyum standartları ile alınan neticelerle % 4 ammonyum okzalate ilâvesinden sonra okunan pH lar tablo 1 de gösterildi.

TABLO 1

Seri A	2 ml. % 4 ammonyum okzalate konunca		Seri B	1 ml. % 4 ammonyum okzalate konunca	
	% mg. Ca	pH		% mg. Ca	pH
A_1	9,8	6,15	B_1	9,7	6,67
A_2	9,8	5,50	B_2	9,6	5,45
A_3	9,7	4,45	B_3	9,7	4,90
A_4	9,9	3,85			
A_5	9,2	2,35			
A_6	0,4	1,75			

Bekletme süresinin tetkiki:

Bir grup deneyimizde ammonyum okzalât ilâvesinden sonra bekletme sürelerini 5, 10, 15, 30 ve 60 dakika olarak aldık. Bu grup deneylerde standart reaktif A_1 kullanıldı, neticeler tablo 2 dedir.

TABLO 2

Bekletme süresi	5 dakika % mg. Ca	10 dakika % mg. Ca	15 dakika % mg. Ca	30 dakika % mg. Ca	60 dakika % mg. Ca
Standart reaktif					
A_1	10,1	9,8	10,0	9,7	9,9

Bekletme işlemini tüpleri buz dolabında tutarak tekrarladık. Oda ısısı ile buz dolabında bekletme arasında bir fark tesbit etmedik.

Yıkama çözeltisinin tetkiki:

Orijinal metoddâ kalsiyum okzalât çökeleği 5 ml. % 2 NH_3 lı su ile yıkanmaktadır. Kalsiyum okzalât suda çözünmediğinden yıkama işlemi için 5 ml. bidistile su kullandık. Bu deneyleri standart A_1 , B_1 reaktifleri ve serumda yaptık. A_1 ve B_1 standart reaktifleri ile elde edilen ortalama değerler tablo 3 de gösterildi.

TABLO 3

Yıkama solüsyonu	Standart A_1 % mg. Ca	Standart B_1 % mg. Ca
% 2 ammonyum hidroksit	9,8	9,7
Bidistile su	9,9	9,7

Ayrıca su ile yıkama esnasında tüplere bidistile su ilâve edildikten sonra bir gece oda hararetinde bırakarak analize devam ettik. Sonuçların % 2 lik NH_3 lı su ile yıkamadakinden farklı olmadığını tesbit ettik.

MÜNAKAŞA

Tecrübelerimizde, farklı miktarda asit ihtiva eden % 10 mg. lık kalsiyum standartları kullandık. Hazırlanış şeklini evvelce verdiğimiz reaktiflerden A_1 , A_2 , A_3 , A_4 ve seri B ile uygun neticeler elde ettik. Kalsiyumun hesapla bulunan çökelme pH sı 4,96 dir. Bununla beraber tablo 1 de görüldüğü gibi pH 6,67 ile pH 3,85 arasında çöken kalsiyum okzalâtın miktarları arasında pratikçe bir fark yok-

tur. Elde edilen bu neticeler dikkate alınarak kalsiyum reaktifleri hazırlanırken 0,005 N; 0,01 N; 0,02 N; 0,04 N; 0,08 N ve 0.16 N HCl çözeltilerinden herhangibiri kullanılabilir.

Kalsiyum tayininde kullanılan potasyum permanganatın tam ayarlanması oldukça uğraştırıcı bir ameliyedir ve yapılan ayarlama da çabuk değişir. Bu sebeple serumda kalsiyum tayini, potasyum permanganatla titrasyon kullanan metodla yapılırsa kalsiyum standartlarından birinin deneye sokulması ile daha doğru neticeler alınacağını düşündük. Buna bağlı olarak da klasik hesap formülünü değiştirdik (formül 2).

Deneylerimizin neticelerine göre kalsiyum standart reaktifinin hazırlanması takip eden şekilde olmalıdır: 250 mg. saf CaCO_3 alınır, 5 ml.; 10 ml.; 20 ml.; 80 ml. veya 160 ml N HCl miktarlarından herhangi birini kullanarak çözülür. Çözünme tamamlandıncı hacim distile su ile 1000 ml. e getirilmelidir. Elde edilen % 10 mg. lık standarttan aynen serum miktarı kadar alınarak analize tabi tutulur.

Kalsiyumun, ammonyum okzalatta, kalsiyum okzalat halinde tam olarak çökmesi için literatürde 45 dakika veya 2 saat gibi çesitli süreler tavsiye edilmekte isede (2) tablo 2 de görüldüğü üzere 5 dakikalık bekletme çökmenin pratikçe tamamlanması için yeterlidir. Bekletme safhası oda hararetinde ve buz dolabında saklanarak tekrarlandı, neticede bir değişme olmadığını gördük.

Çöken kalsiyum okzalata NH_3 lı su yerine bidistile su ile yıkadık. Tablo 3 de görüldüğü üzere her iki usulde de nitcelerde fark tesbit etmedik. Bidistile su kullanma, analizdeki reaktif adedini azalttığından metodu daha pratik hale getirecektir.

Serum kalsiyum tayinlerinde ayarı tam N/100 olan potasyum permanganat kullanıldığındaki formül:

$$(\text{serum için ml.} - \text{kör için ml.}) \times 10 = \% \text{ mg. Ca} \quad (1)$$

Yukarıda verdiğimiz standart reaktiflerden biri deneye konduğunda aşağıdaki formülü kullanmamız gerekir :

$$\left(\frac{\text{serum için ml.} - \text{kör için ml.}}{\text{standart için ml.} - \text{kör için ml.}} \right) \times 10 = \% \text{ mg. Ca.} \quad (2)$$

Serumda kalsiyum tayini esnasında deney serisine standart reaktif ilâvesi ve formül (2) nin kullanılması potasyum permanganatın standardizasyonundan doğacak hataları önleyecektir.

ÖZET

Tablo 1 de kalsiyum okzalatın hesapla bulunan çökelme pH sı 4,96 ya en yakın pH nın, 4,90, B₃ ile alındığı görülmüyor. Bu bulgu bize standart reaktifin normalitesinin 0,02 N olması, ayrıca kalsiyumun çöktürülmesinde 2 ml. distile su, 2 ml. standart reaktif ve 1 ml. ammonyum okzalat nisbetlerinin kullanılmasının gerekli olduğunu gösteriyor.

Tavsiye ettiğimiz standart kalsiyum reaktifinin hazırlanması için 250 mg. saf CaCO₃ 20 ml. N HCl de çözülür hacim distile su ile 1000 ml. e getirilir.

Tavsiye ettiğimiz teknikte ise metod kısmında verdiğimiz esaslar kalmak şartı ile 3 santrifüj tüpü alınır. Bunlar kör, standart ve seruma aittir. Birinci tüp kör deneydir 4 ml. distile su konur. İkinci tüp standarttır buna 2 ml. distile su ve 2 ml. tavsiye ettiğimiz standart reaktiften konur. Üçüncü tüp kana aittir 2 ml. distile su ve 2 ml. serum konur. Her tüpe 1 ml. ammonyum okzalat ilâve edilir. Tüpler çalkalanır, 5 dakika oda hararetinde bırakılır ve metod kısmında anlatıldığı şekilde analize devam edilir. Ancak gökelek NH₃ lı su yerine 5 ml. bidistile su ile yıkanır. Permanganatla titrasyondan sonra formül (2) ye göre % mg. kalsiyum hesaplanır.

SUMMARY

Studies on Clark Collip calcium estimation method and the preparation of calcium standart

...The table 1 shows that the pH 4,90 which is the nearest to the precipitation pH 4,96 of calcium oxalate is obtained by our experiments B₃. This finding proves that the normality of the standart solution must be 0,02 N.

In order to prepare a suitable calcium standart solution 250 mg. CaCO₃ must be dissolved in 20 ml. N HCl and the volume made up to 1000 ml. with distilled water.

To estimate calcium in serum 2 ml. distilled water, 2 ml. serum and 1 ml. ammonium oxalate are put in a centrifuge tube and mixed. The serum, blank and standart are left in room temperature for 5 minutes which is enough to precipitate calcium, there is no need to keep for longer period in room temperature or in a refrigerator. Our experiments proves that 5 ml. of distilled water can be used instead of ammonia water to wash the calcium oxalate.

We suggest the use of the following formula after titration with potassium permanganate:

$$\left(\frac{\text{Serum titer} - \text{blank titer}}{\text{Standart titer} - \text{blank titer}} \right) \times 10 = \% \text{ mg. Ca.}$$

LİTERATÜR

- 1 — ANNINO, J.: Clinical chemistry, Little, Brown and Company 3 ed., 198, 1964.
- 2 — LYNCH, M. J.; RAPHAEL, S. S.; MELLOR, L. D.; SPARE, P. D.; HILLS, P.; INWOOD, M. J.: Medical laboratory technology, W. B. Saunders Company 127, 1963.
- 3 — SIMMONDS, J. S.; GENTZKOW, C. J.: Medical and public health laboratory methods, Lea-Febiger 410, 1955.
- 4 — WHITE, W. L.; FRANKEL, S.: Seiverd's chemistry for medical technologists C. V. Mosby Company 2 ed., 217, 1965.