

VOLÜMETRİK ARAÇLAR VE KALİBRASYONLARI, SANTRİFÜJLER

Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK

ADÜTF Biyokimya AD

2004

Volümetrik araçlar 1

Hacim ölçüm araçları, sıvı ölçümlerinde kullanılırlar.

Ölçü birimi litredir (L).

Litre (L)	10^0
Mililitre (mL) =cc	10^{-3}
Mikrolitre (μ L)	10^{-6}
Nanolitre (nL)	10^{-9}
Pikolitre (pL)	10^{-12}
Femtolitre (fL)	10^{-15}

Volümetrik araçlar 2

-Pipetler

-Büretler

-Mezürler (dereceli silindirler)

-Balon jojeler

Volümetrik araçlarla sıvı ölçümünde dikkat edilecek hususlar:

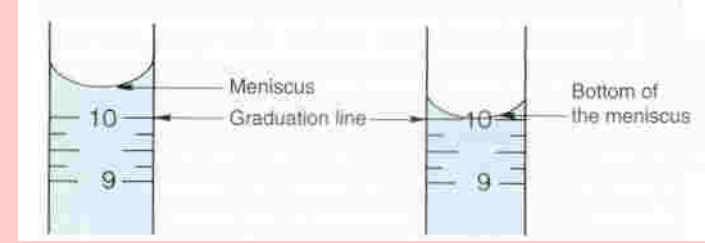
-Damla oluşumu önlenmelidir

-Menisküs çizgisine dikkat edilmelidir

*Berrak solüsyonların seviyeleri menisküs çizgisinin altından okunur

*Civa ölçümünde menisküs çizgisinin üst kısmından okuma yapılmalıdır

*Ölçümü yapılan sıvının ısı kalibrasyonda kullanılan sıvıların ısıyla aynı olmalıdır.



Pipetler 1

Pipetler, Bir solüsyondan belli hacimde sıvı almaya yarayan özel araçlardır.

En çok kullanılan pipet çeşitleri:

-Cam pipetler: Büllü pipet, Mohr (dereceli pipetler), Sulandırma pipetleri, Serolojik pipetler

-Mikropipetler

-Semi otomatik pipetler

-Dispenserler



Pipetler 2

Büllü pipetlerin ortalarında bül denilen şişkin bir kısım bulunur. Uç kısımları ince ve uzundur.

Bülün üzerindeki sayı, ince kısımlardan biri üzerindeki çizgiye kadar alınabilecek sıvı hacmini gösterir.

Büllü pipetler, büyük bir hassasiyetle çalışma gerektiğinde kullanılır.



Pipetler 3

Büllü pipetlerin 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL hacimli olanları çok kullanılır.

Renk Kodu	Tolerans	Hacim	Sertifika
mavi	± 0.007 ml	1 ml	Class "AS" Sertifikasız
oranj	± 0.010 ml	2 ml	Class "AS" Sertifikasız
siyah	± 0.010 ml	3 ml	Class "AS" Sertifikasız
2 x kırmızı	± 0.015 ml	4 ml	Class "AS" Sertifikasız
beyaz	± 0.015 ml	5 ml	Class "AS" Sertifikasız
kırmızı	± 0.020 ml	10 ml	Class "AS" Sertifikasız
yeşil	± 0.020 ml	15 ml	Class "AS" Sertifikasız
sarı	± 0.030 ml	20 ml	Class "AS" Sertifikasız
mavi	± 0.030 ml	25 ml	Class "AS" Sertifikasız
kırmızı	± 0.050 ml	50 ml	Class "AS" Sertifikasız

Renk Kodu	Tolerans	Hacim	Sertifika
mavi	± 0.007 ml	1 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
oranj	± 0.010 ml	2 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
siyah	± 0.010 ml	3 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
2 x kırmızı	± 0.015 ml	4 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
beyaz	± 0.015 ml	5 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
kırmızı	± 0.020 ml	10 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
yeşil	± 0.020 ml	15 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
sarı	± 0.030 ml	20 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
mavi	± 0.030 ml	25 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
kırmızı	± 0.050 ml	50 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı

Pipetler 4

Dereceli (taksimatl) pipetlerin düz ve dar bir boşlukları vardır. Dereceli pipetlerin taksimatlari suya göre yapilir.

Dereceli bir pipetin total hacmi üst ucunda yazilidir. Üst uçta “0” rakamı olan bazı pipetlerin total hacmi alt uçtaki en son taksimattan anlaşılır.

Dereceli pipetler, büyük bir hassasiyet gerektirmeyen hallerde kullanılırlar.



Pipetler 5

Dereceli (taksimatl) pipetlerin 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL hacminde olanları çok kullanılır.

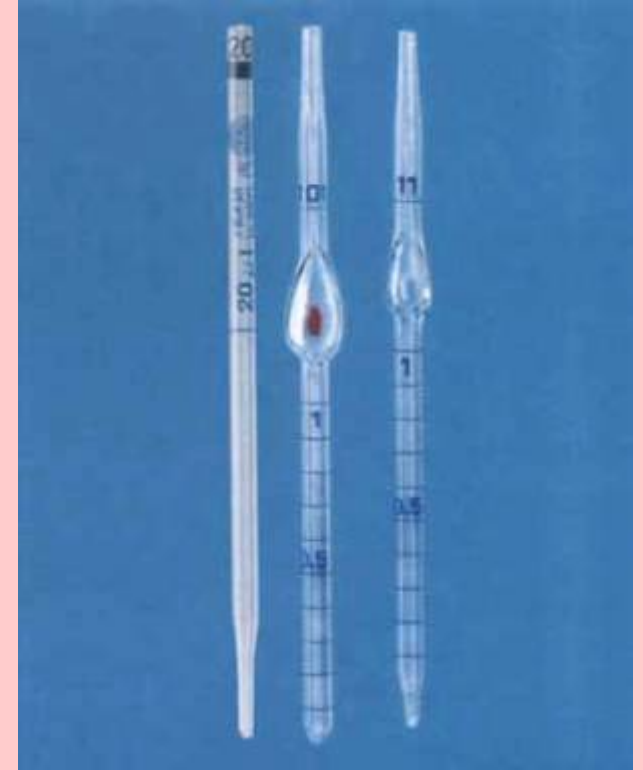
Renk Kodu	Bölmeler	Tolerans	Hacim	Sertifika
sarı	0.010 ml	± 0.006 ml	1 ml	Class "AS" Sertifikasız
siyah	0.020 ml	± 0.010 ml	2 ml	Class "AS" Sertifikasız
kırmızı	0.050 ml	± 0.030 ml	5 ml	Class "AS" Sertifikasız
oranj	0.100 ml	± 0.050 ml	10 ml	Class "AS" Sertifikasız
2 x sarı	0.100 ml	± 0.100 ml	20 ml	Class "AS" Sertifikasız
beyaz	0.100 ml	± 0.100 ml	25 ml	Class "AS" Sertifikasız
2 x oranj	0.100 ml	± 0.200 ml	50 ml	Class "AS" Sertifikasız
yok	0.001 ml	± 0.004 ml	0.1 ml	Class "AS" Sertifikasız
yok	0.001 ml	± 0.004 ml	0.2 ml	Class "AS" Sertifikasız
yok	0.010 ml	± 0.005 ml	0.5 ml	Class "AS" Sertifikasız

Renk Kodu	Bölmeler	Tolerans	Hacim	Sertifika
sarı	0.010 ml	± 0.006 ml	1 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
siyah	0.020 ml	± 0.010 ml	2 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
kırmızı	0.050 ml	± 0.030 ml	5 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
oranj	0.100 ml	± 0.050 ml	10 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
2 x sarı	0.100 ml	± 0.100 ml	20 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
beyaz	0.100 ml	± 0.100 ml	25 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
2 x oranj	0.100 ml	± 0.200 ml	50 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
yok	0.001 ml	± 0.004 ml	0.1 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
yok	0.001 ml	± 0.004 ml	0.2 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı
yok	0.010 ml	± 0.005 ml	0.5 ml	Class "AS" Grup Sertifikalı

Pipetler 6

Sulandırma pipetlerinin ucunda, 0,1 'den 1 'e kadar derecelenmiş bir kapiller boru ile, bu borunun açıldığı geniş bir boşluk bulunur.

Sulandırma pipetleri, eritrosit ve lökosit sayımında kullanılırlar. Şişkin kısımda bulunan cam boncuk, sulandırma çözeltileri ile kanın karışmasını sağlar.



Pipetler 7

Mikropipetler, 10-500 μL arasındaki küçük hacimler içindirler. Çoğu, pipetleme işleminden sonra pipetin iç duvarını kaplayan sıvı miktarını içerecek (to contain-TC) şekilde kalibre edilirler. Uygun kullanım, pipetin en ince noktasına kadar son solüsyon ile çalkalanmasını gerektirir.

Pipetler 8

Semiotomatik pipetler 1 mL'den 20 mL'ye kadar hacimler içindirler. Volümü dijital olarak gösteren modeller de vardır.



Pipetler 9

Kesinlik	Tolerans	Test Hacmi	Hacim	Kanal
$\pm 2.00\%$	$\pm 2.50\%$	2.5 μl	0.1 - 2.5 μl	1
$\pm 0.80\%$	$\pm 1.00\%$	10 μl	0.5 - 10 μl	1
$\pm 0.40\%$	$\pm 0.90\%$	20 μl	2 - 20 μl	1
$\pm 0.30\%$	$\pm 0.60\%$	50 μl	5 - 50 μl	1
$\pm 0.15\%$	$\pm 0.80\%$	100 μl	10 - 100 μl	1
$\pm 0.15\%$	$\pm 0.60\%$	200 μl	20 - 200 μl	1
$\pm 0.20\%$	$\pm 0.60\%$	1000 μl	100 - 1000 μl	1
$\pm 0.15\%$	$\pm 0.50\%$	5000 μl	1000 - 5000 μl	1
$\pm 0.50\%$	$\pm 1.00\%$	50 μl	5 - 50 μl	4
$\pm 0.25\%$	$\pm 0.70\%$	250 μl	50 - 250 μl	4
$\pm 1.50\%$	$\pm 1.50\%$	10 μl	0.5 - 10 μl	8
$\pm 0.50\%$	$\pm 1.00\%$	50 μl	5 - 50 μl	8
$\pm 0.25\%$	$\pm 0.70\%$	300 μl	50 - 300 μl	8

Ayarlanabilir hacimli
mekanik semiotomatik
pipetler

Kesinlik	Tolerans	Test Hacmi	Hacim	Kanal
$\pm 1.2\%$	$\pm 1.3\%$	5 μl	5 μl	1
$\pm 0.8\%$	$\pm 0.8\%$	10 μl	10 μl	1
$\pm 0.5\%$	$\pm 0.6\%$	20 μl	20 μl	1
$\pm 0.3\%$	$\pm 0.5\%$	25 μl	25 μl	1
$\pm 0.3\%$	$\pm 0.5\%$	50 μl	50 μl	1
$\pm 0.3\%$	$\pm 0.5\%$	100 μl	100 μl	1
$\pm 0.2\%$	$\pm 0.4\%$	200 μl	200 μl	1
$\pm 0.2\%$	$\pm 0.4\%$	250 μl	250 μl	1
$\pm 0.2\%$	$\pm 0.3\%$	500 μl	500 μl	1
$\pm 0.2\%$	$\pm 0.3\%$	1000 μl	1000 μl	1
$\pm 0.15\%$	$\pm 0.3\%$	2000 μl	2000 μl	1
$\pm 0.15\%$	$\pm 0.3\%$	5000 μl	5000 μl	1

Sabit hacimli mekanik
semiotomatik pipetler

Pipetler 10

Semiotomatik pipetlerin numuneyi içine çeken kısım (uçlar), genellikle iç yüzeyinde camdan daha az miktarda sıvı tutmaya meyilli olan dispozıbl (tek kullanımlık) plastik bir maddeden yapılır.

Ambalaj	Renk	Hacim
1000	beyaz	20 ul
1000	sarı	200 ul
1000	mavi	1000 ul
250	beyaz	5000 ul



Pipetler 11

Dispenserler de 1 mL'den 20 mL'ye kadar hacimler içindirler. Volümü dijital olarak gösteren modeller de vardır.



Pipetler 12

Cam pipetlerin kalibrasyonunun kontrolü için pipetle belli sıcaklıkta ve belli hacimde su alınarak tartılır. Diğer taraftan alınan hacimdeki su için teorik ağırlık ve bunun aynı zamanda $\pm 0,005$ standart sapmaya göre alt-üst değerleri hesaplanır.

Pipetle alınan belli hacimdeki suyun tartarak saptanan ağırlığı hesaplanan değerlerin alt-üst sınırları arasında kalıyorsa pipetin hassasiyeti yeterlidir; bu sınırlar dışında kalıyorsa pipetin hassasiyeti bozulmuştur.

Mikropipetlerin kalibrasyonunu kontrol etmekte klasik yöntem, mikropipetle ölçülen cıvanın gravimetrik ölçümüdür.

Pipetler 13

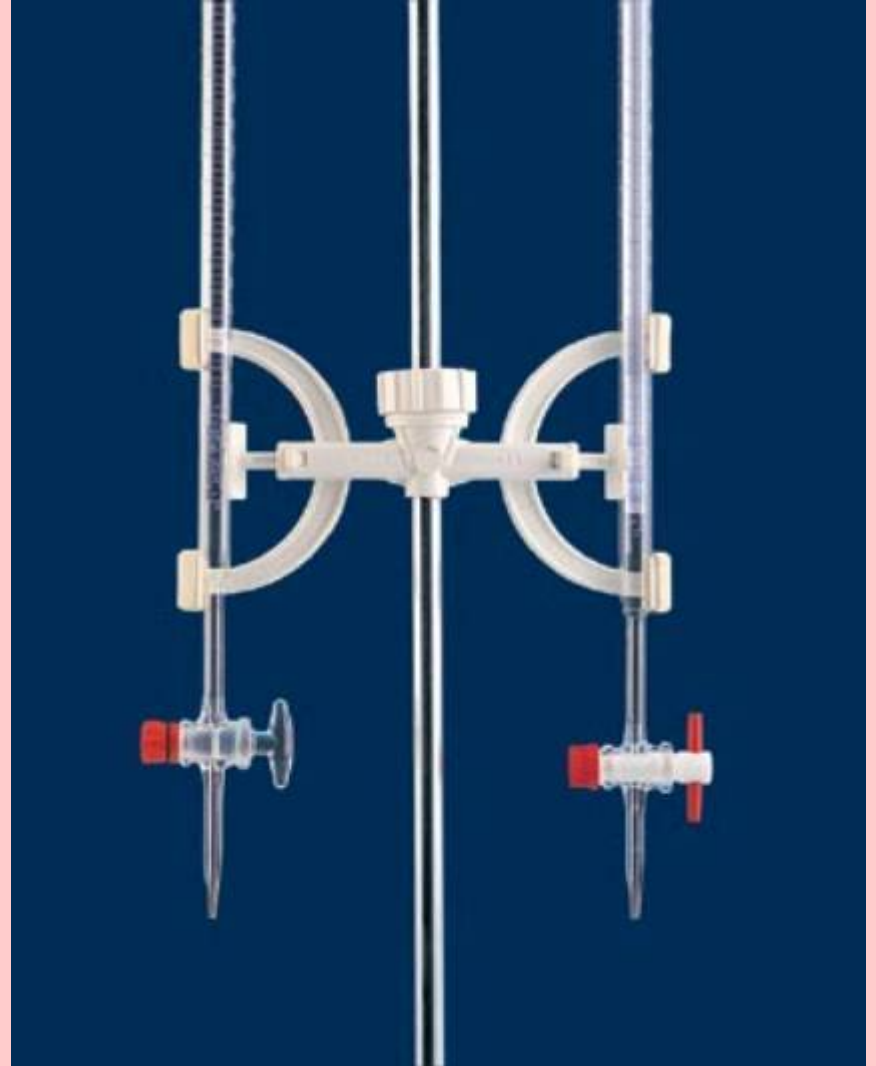
Değişik sıcaklıklarda 1 mL suyun ve civanın ağırlıkları		
Sıcaklık (°C)	Su (g)	Civa (g)
23	0,9966	13,541
24	0,9964	13,539
25	0,9961	13,537
26	0,9959	13,534
27	0,9956	13,532

24°C’de 10 mL su için hesaplanan ağırlık $9,964 \pm 0,04982$ g olduğuna göre; tartımla bulunan ağırlık 9,91418 g ile 10,01382 g arasında ise pipetin hassasiyeti yeterlidir.

Büretler 1

Bir çeşit pipettirler.
Boşaltma ucunda sıvının
akışını kontrol edebilmek
için bir kapama musluğu
vardır.

Büretler, titrasyon için
kullanılırlar.



Büretler 2

Büretlerin kapasitesi 2 mL veya daha az olanlarına mikrobüret denir; bunların taksimatları 0,01 mL veya daha küçüktür.

Büretlerin otomatik ve dijital göstergeli olanları da vardır.



Ölçü silindirleri (mezürler) 1

Silindir biçiminde, çeşitli çap ve boyda, üzerleri taksimatlı cam veya propilen kaplardır. Bunlar, büyük bir hassasiyetle çalışmayı gerektirmeyen ölçüm işlerinde kullanılırlar.



Ölçü silindirleri (mezürler) 2

Gövde Ø	Yükseklik	Bölmeler	Tolerans	Hacim
21.3 mm	100 mm	0.5 ml	± 0.5 ml	10ml
26.0 mm	125 mm	1.0 ml	± 1.0 ml	25 ml
31.3 mm	150 mm	1.0 ml	± 1.0 ml	50 ml
41.0 mm	170 mm	2.0 ml	± 2.0 ml	100 ml
53.2 mm	235 mm	5.0 ml	± 5.0 ml	250 ml
67.0 mm	280 mm	10.0 ml	± 10.0 ml	500 ml
83.5 mm	340 mm	20.0 ml	± 20.0 ml	1000 ml

Gövde Ø	Yükseklik	Bölmeler	Tolerans	Hacim
13.5 mm	140 mm	0.2 ml	± 0.2 ml	10ml
18.0 mm	195 mm	0.5 ml	± 0.5 ml	25 ml
25.5 mm	200 mm	1.0 ml	± 1.0 ml	50 ml
30.5 mm	250 mm	1.0 ml	± 1.0 ml	100 ml
41.5 mm	315 mm	2.0 ml	± 2.0 ml	250 ml
55.0 mm	360 mm	5.0 ml	± 5.0 ml	500 ml
66.0 mm	440 mm	10.0 ml	± 10.0 ml	1000 ml

Kısa form mezürler



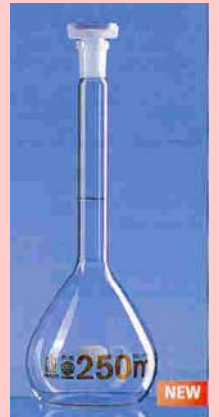
Uzun form mezürler



Balon jojeler 1

Belli hacimde, alt kısımları yuvarlak ve şişkin, üst kısımları silindirik, ince uzun boyunlu kapaklı cam veya propilen kaplardır. Boyun kısmında bir kalibrasyon çizgisi bulunur. Bu çizgiye kadar aldıkları sıvı miktarı üzerlerinde yazılıdır.

Balon jojeler, hassas solüsyonlar ve ayıraç hazırlanmasında, bir maddeyi belli bir oranda seyreltmek gibi işlemlerde kullanılırlar.



Balon jojeler 2

Balon jojeler, çeşitli hacimlerde bulunurlar.

Boyun	Yükseklik	Tolerans	Hacim	Sertifika
23 mm	70 mm	±0.025 ml	5 ml	Class "A" Sertifikasız
23 mm	70 mm	±0.025 ml	5 ml	Class "A" Sertifikasız
28 mm	90 mm	±0.025 ml	10 ml	Class "A" Sertifikasız
28 mm	90 mm	±0.025 ml	10 ml	Class "A" Sertifikasız
36 mm	110 mm	±0.040 ml	20 ml	Class "A" Sertifikasız
38 mm	110 mm	±0.040 ml	25 ml	Class "A" Sertifikasız
49 mm	140 mm	±0.060 ml	50 ml	Class "A" Sertifikasız
49 mm	140 mm	±0.060 ml	50 ml	Class "A" Sertifikasız
61 mm	170 mm	±0.100 ml	100 ml	Class "A" Sertifikasız
61 mm	170 mm	±0.100 ml	100 ml	Class "A" Sertifikasız
76 mm	210 mm	±0.150 ml	200 ml	Class "A" Sertifikasız
81 mm	220 mm	±0.150 ml	250 ml	Class "A" Sertifikasız
101 mm	260 mm	±0.250 ml	500 ml	Class "A" Sertifikasız
127 mm	300 mm	±0.400 ml	1000 ml	Class "A" Sertifikasız
161 mm	370 mm	±0.600 ml	2000 ml	Class "A" Sertifikasız
215 mm	475 mm	±1.200 ml	5000 ml	Class "A" Sertifikasız

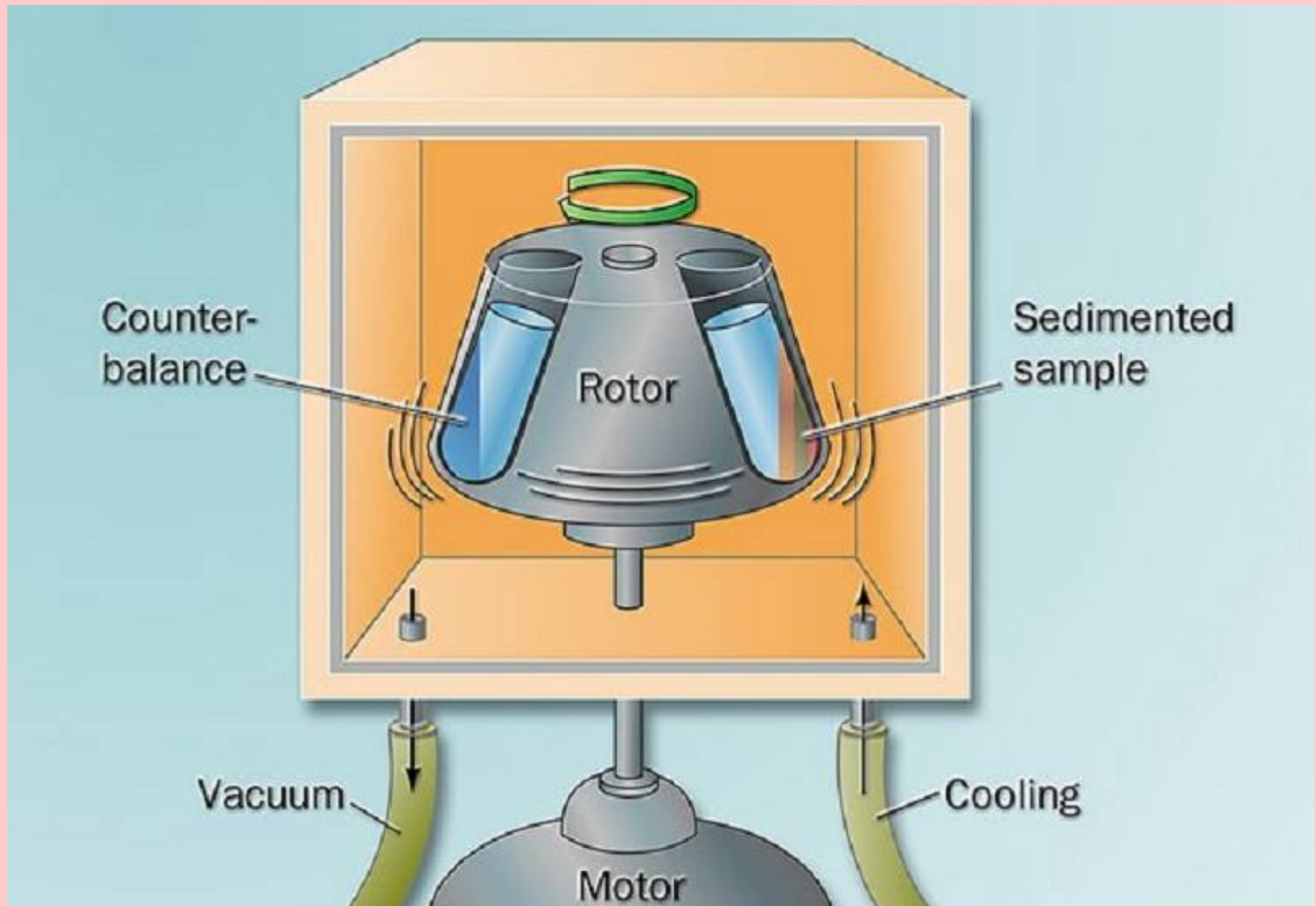
Boyun	Yükseklik	Tolerans	Hacim	Sertifika
23 mm	70 mm	±0.025 ml	5 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
23 mm	70 mm	±0.025 ml	5 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
28 mm	90 mm	±0.025 ml	10 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
28 mm	90 mm	±0.025 ml	10 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
36 mm	110 mm	±0.040 ml	20 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
38 mm	110 mm	±0.040 ml	25 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
49 mm	140 mm	±0.060 ml	50 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
49 mm	140 mm	±0.060 ml	50 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
61 mm	170 mm	±0.100 ml	100 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
61 mm	170 mm	±0.100 ml	100 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
76 mm	210 mm	±0.150 ml	200 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
81 mm	220 mm	±0.150 ml	250 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
101 mm	260 mm	±0.250 ml	500 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
127 mm	300 mm	±0.400 ml	1000 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
161 mm	370 mm	±0.600 ml	2000 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı
215 mm	475 mm	±1.200 ml	5000 ml	Class "A" + "H" Grup Sertifikalı

Santrifüjler 1

Santrifüj, yoğunlukları farklı olan maddelerin yer çekimine bağlı olarak ayırımını hızlandıran bir araçtır.

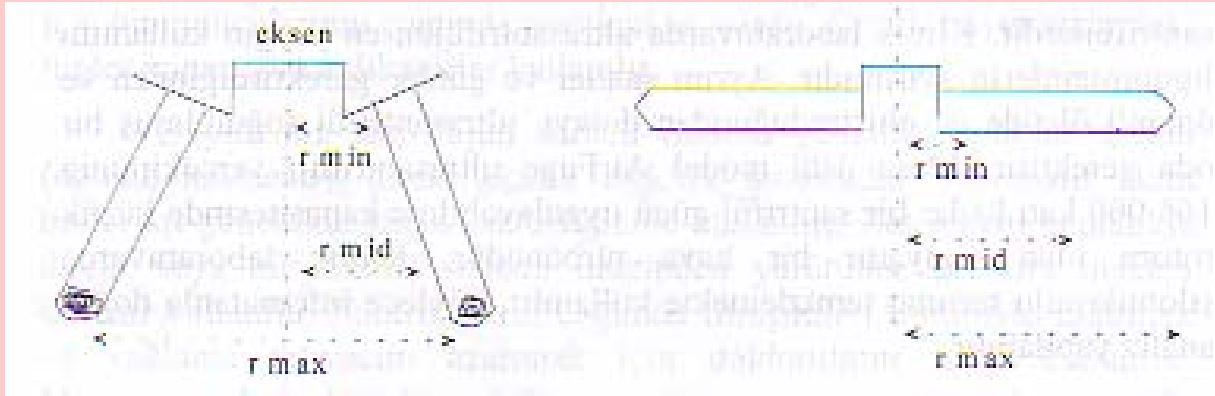
Tüm santrifüjler bir rotor veya santrifüj kafesi, çevirme mili (şaft) ve motordan oluşur. Rotor, bir kapak ve mandalla hazırlanan bir odada bulunur.

Çoğu santrifüjlerde açma düğmesi, zaman göstergesi, hız kontrolü, takometre ve fren vardır. Bazı santrifüjler, odadaki ısıyı ayarlamak için soğutucu ile donatılmışlardır.



Santrifüjler 2

Santrifüjlerin rotorları, sabit açılı başlık ve horizontal başlık olmak üzere iki tiptir.



Sabit açılı bir rotorun biçimi, genellikle küçük partiküllerin sedimentasyonunun horizontal başlıklı rotordan daha hızlı olmasını sağlar.

Santrifüjler 3



Horizontal başlıklı rotorun tipik olarak serbestçe sallanan dört adet kovası vardır. Çeşitli büyüklükteki tüpler için uygun aplikatörler kullanılır.

Santrifüje tüplerin yerleşimi karşı tarafın ağırlığı ile eşit ve simetrik olmalıdır. Rotorun dengesizliği titreşime neden olur, bu da cam tüplerin kırılmasına ve cihazın aşınmasına neden olur.

Santrifüjler 4

Santrifüj çalıştırıldığında tüpte bulunan partiküller, uygulanan santrifüj alanına (merkezkaç kuvvet), partikülün şekline, yoğunluğuna ve ortamın yoğunluğuna bağlı olarak değişen hızlarda çökerler.

Bir santrifüjde iki fazın ayrılması için gerekli güç, rölatif santrifüj kuvveti (RCF) olarak tanımlanır. RCF, yerçekiminin katı olarak 3000xg, 5000xg, 10000xg gibi ifade edilir.

Santrifüjler 5

Bir santrifüjün maksimum rölatif santrifüj gücü (RCF) şöyle hesaplanır:

$$\mathbf{RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times n^2}$$

RCF → yerçekiminin (g) katı olarak maksimum rölatif santrifüj gücü

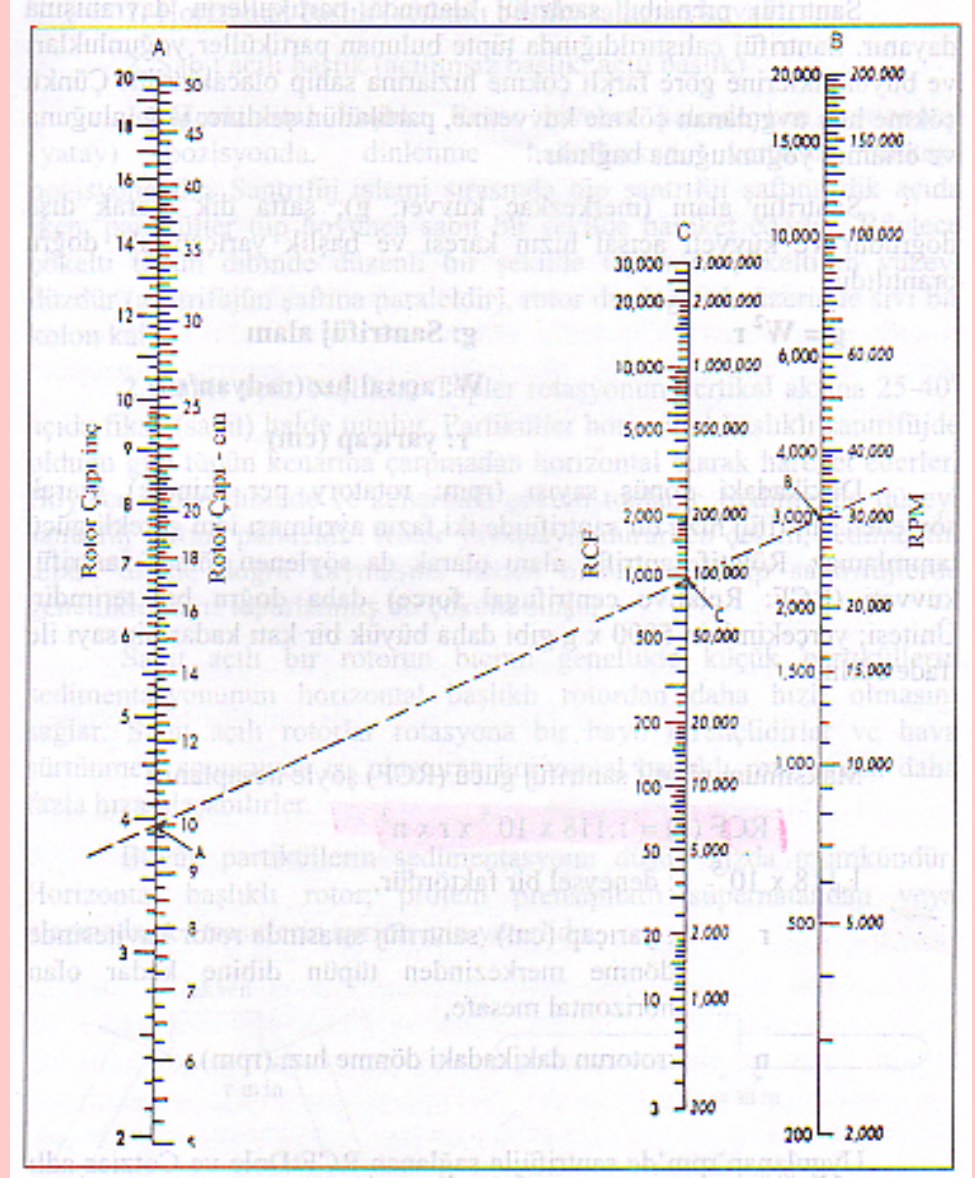
$1,118 \times 10^{-5}$ → deneysel bir faktör

r → cm olarak dönme merkezinden tüpün dibine kadar olan horizontal mesafe (yarıçap)

n → rotorun dakikadaki dönme hızı (rpm)

Santrifüjler 6

Uygulanan rpm'de santrifüjle sağlanan RCF, Dole ve Cotzias adlı iki araştırmacının geliştirdiği nonogramdan da saptanabilir.



Santrifüjler 7

Yoğunlukları ve büyüklükleri birbirinden farklı olan heterojen bir karışım santrifüjlendiğinde yoğunlukları ve büyüklükleri aynı olan gruplar birlikte çökerler; yoğunluk ve büyüklükleri büyük olandan küçük olana doğru bir çökme sırası izlenir.

Bir doku homojenatında sırasıyla parçalanmamış hücre, hücre zarı, çekirdek, mitokondri, lizozomlar, mikrozoamlar ve en son ribozomlar çöker.

Santrifüjler 8

Santrifüj tipleri:

-Manuel santrifüjler

-Elektrikli santrifüjler

Rutin santrifüjler

Genel amaçlı santrifüjler




Mikrosantrifüjler

Kan bankası amaçlı santrifüjler

Yüksek devirli santrifüjler




Santrifüjler 9

Rutin santrifüjlerin farklı maksimal hız ve maksimal RCF'e sahip çeşitleri vardır:

	13000 rpm	16060 x g
	5000 rpm	2600 x g
	4000 rpm	2028 x g


Santrifüjler 10

Genel amaçlı santrifüjlerin de farklı maksimal hız ve maksimal RCF'e sahip çeşitleri vardır:

	13000 rpm	16060 x g
	10000 rpm	15320 x g
	15000 rpm	21885 x g



Santrifüjler 11

Mikrosantrifüjlerin de farklı maksimal hız ve maksimal RCF'e sahip çeşitleri vardır:

	13000 rpm	16060 x g
---	-----------	-----------

Santrifüjler 12

Kan bankası amaçlı santrifüjlerin de farklı maksimal hız ve maksimal RCF'e sahip çeşitleri vardır:

	5050 rpm	8525 x g
	10000 rpm	15317 x g

Santrifüjler 13

Yüksek devirli santrifüjlerin de farklı maksimal hız ve maksimal RCF'e sahip çeşitleri vardır:

	15000 rpm	21885 x g
	17000 rpm	25040 x g
	23300 rpm	50377 x g

Santrifüjler 14

Klinik laboratuvarlarda santrifügasyonun kullanım amaçları:

-Partikülleri süspanse oldukları solüsyondan ayırma

Kandan hücreleri ayırma

Biyolojik sıvıların hücresel elemanlarını ve diğer kısımlarını konsantre etmek

Numuneden presipite edilmiş proteinleri uzaklaştırmak

İmmünokimyasal ölçümlerde serbest ligantları ayırmak

-Farklı yoğunluktaki iki likit fazı ayırmak