

T.C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPARİN ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR /

DOKTORA TEZİ

Ecz. A.HADİ BİLAÇ

ESKİŞEHİR - 1988

Bu çalışmanın yürütülmesinde beni yönlendiren ve çalışmalarım süresince maddi ve manevi olarak büyük desteklerini esirgemeyen Sayın Dekan Prof.Dr.ihsan SARIKARDAŞOĞLU'na, saygı değer hocalarım Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr.Erden GÜLER'e ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Kasım Cemal GÜVEN'e ve çalışmalarımda yardımlarından dolayı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr.Orhan N.ULUTİN'e, Anadolu Üniversitesi Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi Müdürü Prof.Dr.Kemal Hüsnü Can BAŞER'e, Kim.Müh.Mine KÖRKÇÜOĞLU'na, Yard.Doç.Dr.Bora GÜVENER'e, Öğr.Görv.Yıldız ÖZSOY'a, Yard.Doç.Dr.Yasemin YAZAN'a, Yard.Doç.Dr.S.Zeki USKAN'a ve eşim Eczacı Semra BİLAÇ'a şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sahife No.

GİRİŞ VE AMAÇ	1
1. KURAMSAL KISIM	2
1.1. Heparin	2
1.1.1. Elde Edilişi	2
1.1.2. Fiziksel Özellikleri	4
1.1.3. Kimyasal Özellikleri	4
1.1.3.1. Yapısı	4
1.1.3.1.1. Yapısı Üzerinde Tayinler	6
1.1.3.2. Tanınması	8
1.1.3.2.1. UV Spektrumu	8
1.1.3.2.2. IR Spektrumu	9
1.1.3.2.3. Kağıt Kromatografisi	9
1.1.3.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi	9
1.1.3.3. Miktar Tayini	11
1.1.3.3.1. Metakromatik Tayin	11
1.1.3.3.2. Protamin ile Titrasyon	15
1.1.3.3.3. Antikoagülan Aktiviteye Dayanan Tayinler	15
1.1.3.3.3.1. Tam Kan Yöntemi	16
1.1.3.3.3.2. Trombin Yöntemleri	17
1.1.3.3.3.3. Rekalsifikasyon Zamanı Tayini	17
1.1.3.3.3.4. Plazma Yöntemi	18
1.1.3.3.3.5. Anti X _a Yöntemi	18
1.1.3.3.4. Türbidimetrik Tayin	19
1.1.3.3.5. Polarografik Tayin	19
1.1.3.3.6. Spektrofotometrik ve Biyolojik Metodlar Arasındaki Korrelasyon	19
1.1.3.4. Fraksiyonlandırılması	20
1.1.3.4.1. Fraksiyonlu Çöktürme	20
1.1.3.4.2. İnce Tabaka Kromatografisi	21
1.1.3.4.3. Jel Kromatografisi	22
1.1.4. Farmakolojisi	24
1.1.4.1. Antikoagülan Aktivitesi	24
1.1.4.2. Lipolitik Aktivitesi	27
1.1.5. Stabilitesi	28

2. DENEYSEL KISIM	31
2.A. Kullanılan Maddeler	31
2.B. Kullanılan Aletler	31
2.1. Fraksiyonlandırma Deneyleri	32
2.1.1. Heparin Sigma (grade I) Üzerinde Çalışmalar	32
2.1.1.1. Sephadex G 15 ile Fraksiyonlandırma	32
2.1.1.2. Sephadex G 50 (süper fine) ile Fraksiyonlandırma ..	32
2.1.2. Heparin Roth Üzerinde Çalışmalar	33
2.2. Metakromatik Deneyler	33
2.2.1. Kullanılan Maddeler	33
2.2.2. Yöntem	34
2.3. Rekalsifikasyon Deneyleri	35
2.3.1. Kullanılan Maddeler	35
2.3.2. Yöntem	35
2.4. Anti X_a Deneyleri	35
2.4.1. Kullanılan Maddeler	35
2.4.2. Yöntem	36
2.5. Metakromatik ve Biyolojik Yöntemler Arasındaki Korrelasyon.....	36
3. BULGULAR	37
3.1. Fraksiyonlandırma Deneylerinin Bulguları	37
3.1.1. Heparin Sigma (grade I) Üzerindeki Bulgular	37
3.1.1.1. Sephadex G 15 ile Fraksiyonlandırma	37
3.1.1.2. Sephadex G 50 (süper fine) ile Fraksiyonlandırma ..	38
3.1.2. Heparin Roth Üzerindeki Bulgular	42
3.2. Metakromazi Deneylerinin Bulguları	46
3.3. Rekalsifikasyon Deneylerinin Bulguları	75
3.4. Anti X_a Deneylerinin Bulguları	80
3.5. Metakromatik ve Biyolojik Yöntemler Arasındaki Korrelasyon	83
3.5.1. Metakromatik Aktivite Sonuçları ile Rekalsifikasyon Zamanı Sonuçları Arasındaki Korrelasyon	83
3.5.1.1. Azur A ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	83

3.5.1.1.1. Heparin Sigma grade I	83
3.5.1.1.2. Heparin Roth	83
3.5.1.1.3. Heparin Sigma grade II	83
3.5.1.1.4. Liquemine Roche	83
3.5.1.1.5. Heparin Novo lente	83
3.5.1.2. Azur I ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	84
3.5.1.2.1. Heparin Sigma grade I	84
3.5.1.2.2. Heparin Roth	84
3.5.1.2.3. Heparin Sigma grade II	84
3.5.1.2.4. Liquemine Roche	84
3.5.1.2.5. Heparin Novo lente	84
3.5.1.3. Azur II ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	85
3.5.1.3.1. Heparin Sigma grade I	85
3.5.1.3.2. Heparin Roth	85
3.5.1.3.3. Heparin Sigma grade II	85
3.5.1.3.4. Liquemine Roche	85
3.5.1.3.5. Heparin Novo lente	85
3.5.1.4. Metilen Mavisini ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon.....	86
3.5.1.4.1. Heparin Sigma grade I	86
3.5.1.4.2. Heparin Roth	86
3.5.1.4.3. Heparin Sigma grade II	86
3.5.1.4.4. Liquemine Roche	86
3.5.1.4.5. Heparin Novo lente	87
3.5.2. Metakromatik Aktivite Sonuçları ile Anti X _a Zamanı Sonuçları Arasındaki Korrelasyon	87
3.5.2.1. Azur A ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	87
3.5.2.1.1. Heparin Sigma grade I	87
3.5.2.1.2. Heparin Roth	87
3.5.2.2. Azur I ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon.....	87
3.5.2.2.1. Heparin Sigma grade I	87
3.5.2.2.2. Heparin Roth	87

3.5.2.3. Azur II ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	88
3.5.2.3.1. Heparin Sigma grade I	88
3.5.2.3.2. Heparin Roth	88
3.5.2.4. Metilen Mavisi ile Yapılan Metakromazi Deneylerinin Sonuçlarına göre Korrelasyon	88
3.5.2.4.1. Heparin Sigma grade I	88
3.5.2.4.2. Heparin Roth	88
3.5.3. Anti X_a Zamanı Sonuçları ile Rekalsifikasyon Zamanı Sonuçları Arasındaki Korrelasyon	89
3.5.3.1. Heparin Sigma grade I	89
3.5.3.2. Heparin Roth	89
TARTIŞMA VE SONUÇ	90
ÖZET	93
SUMMARY	94
KAYNAKLAR	95

GİRİŞ VE AMAC

Tedavide koagülasyona etkisi dolayısıyla uzun süredir kullanılan heparin 1916 yılında Mac Lean tarafından izole edilmiştir (1). Yapısının aydınlatılamaması değişik yorumlara uğramış ve etki mekanizması da farklı görüşlere yol açmıştır.

Heparin, molekül ağırlığı 1000-50.000 dalton arasında değişen bir mukopolisakkarittir (2). Molekül ağırlığı değiştikçe heparin aktivitesinin, IU/mg değerleri değişir (3). Heparin farklı metodlar ile fraksiyonlandırılmış ve deneylerin yöntemine bağımlı olarak değişik sayıda fraksiyonlar elde edilmiştir.

Heparinin miktar tayini içinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kimyasal (4-7), bazıları da biyolojiktir(8-10).

Bu çalışmamızda, değişik Sephadex tipleri denenerek heparin fraksiyonlandırılmış ve elde edilen fraksiyonlar ile heparinin fraksiyonlandırılmamış şeklinin aktivitesi mukayese edilmiştir. Ayrıca, biyolojik miktar tayininin zor ve zaman alıcı olması, kimyasal tayininin daha pratik olması nedeni ile kimyasal tayinden biyolojik tayine geçiş için değişik heparin preparatları üzerinde metakromazi, rekalsifikasyon ve anti X_a deneyleri yapılarak mukayese edilmiş ve korrelasyonları incelenmiştir.

1. KURAMSAL KISIM

1.1. HEPARİN

1.1.1. ELDE EDİLİŞİ

Heparin, ilk defa karaciğerden izole edildikten (11) sonra, değişik doku ve sıvılardan da elde edilmiştir (12). Bugün heparinin mast hücrelerinde bulunduğu görüşü kabul edilmektedir. Mukopolisakkarit yapısında olan heparin heksozamin içerir. Heparin normal şartlarda organimizde serbest olarak bulunmayıp bir proteine bağlıdır. Bu nedenle elde edilmesinde proteinden ayırmak için değişik teknikler kullanılmıştır. İlk olarak kurutulup, ufalanmış köpek karaciğeri metanolle kaynatılmış, sonra serum fizyolojikle ekstre edilip aseton ile çöktürülmüştür. Ortamdaki glikojenler, takadiastas ile yapılan dijestiyonla, protein ise kadmiyum klorür ile bertaraf edilmiştir (11). Daha sonra heparin elde edilmesinde, proteinin uzaklaştırılması için asetik asit içindeki Lloyd reaktifi (alüminyum silikat) (13), ısı ve tripsin ile dijestiyon tavsiye edilmiştir (14).

Heparinin saflaştırılması için baryum klorür (13), brusin(15), benzidin hidroklorür (16), piperidin n-pentilamin, izopentilamin(17), dodesilamin (18), dekametilendiamin (19), dimetiltionin (20) kullanılmıştır. Benzidin tuzu yönteminde, ham heparin benzidin ile tuz haline getirilerek çöktürülür, süzülür, çökelti metanolle yıkanır, sonra su ile çalkalanarak süspansiyon haline getirilir. Üzerine amonyumhidroksit ilave edilip heparin serbest hale geçirilir veya baryum asetat ile muamele edilip heparin baryum tuzuna geçilir ve daha sonra heparin baryum tuzundan heparin sodyum tuzuna geçilerek saflaştırma yapılır (16).

Heparinin saflaştırılması için kromatografik yol da denenmiştir. Bunun için dietilaminoetilselüloz (aniyon değiştirici) ile yapılan sütun kromatografisi çalışmasında, önce 0.5 M sodyum klorür sonra 1.2 M sodyum klorürle yapılan elüsyon ile ele geçen elüata etanol ilavesi ile heparin çöktürülerek ayrılır ve böylece başlangıçta 110 IU/mg olan heparinin aktivitesi 165 IU/mg'a yükseltilir (21).

Heparinin endüstride elde edilmesinde sığır karaciğeri veya akciğeri kullanılır. Parçalanmış bu organlar doğrudan doğruya veya 24 saat otolize bırakıldıktan sonra ekstre edilir. Ekstraksiyon için amonyum sülfat ile doyurulmuş N sodyum hidroksit çözeltisi kullanılır. Karışım 50°C de dikkatle bir saat ısıtılır. Bu sıcaklıkta koagülasyon olmaz ve heparin dokudan ekstre edilir. Bu karışım daha sonra 70°C ye ısıtılır ve denatüre olan protein çöker. Karışım sıcakken süzülür, süzütünün pH'sı 2-2.5 olacak şekilde derişik sülfürik asit ilave edilir. Çöken kısmın büyük miktarı heparindir. Bu bakiye etanolde (%95) 20 saat süspansiyon halinde tutulur. Bu şekilde yağlı kısımlar etanole geçer. Alkol aktarılarak ayrılır ve kalan kısım santrifüje edilerek çökelti alınır, suda çözündürülür ve pH'sı 8'e ayarlanır. Üzerine tripsinin sudaki çözeltisi ile az miktarda ksilen ilave edilir. 36°C de 36 saat enkübasyona bırakılır. Bu esnada her 12 saatte bir pH yeniden 8'e ayarlanır. Dijestiyondan sonra karışıma etanol ilave edilir ve vasat turnosola karşı hafif asit reaksiyon gösterene kadar hidroklorik asit ile ayarlanır. Bu çözelti 24 saat bekletildikten sonra süzülür, çökelti alınır, 0.5 N sodyum hidroksitte çözündürülür ve 75°C de ısıtılarak tripsin tahrip edilir. Çözelti soğutulduktan sonra santrifüje edilir. Üstteki sıvı kısım alınır, üzerine iki misli aseton ilavesi ile heparin çöktürülür. Saflaştırılması için elde edilen ham heparin,

baryum klorür ile pH 4.5 ta muamele edilir. Meydana gelen baryum heparinat ayrılır, sonra buradan sodyum karbonat ile sodyum heparinata geçilir. Bu işlemin bir çok kere tekrarı ile mg daki aktif heparin miktarı arttırılır.

Bugün, heparin sığır akciğeri ve karaciğerinden başka domuzun barsak mukozasından da elde edilmektedir.

1.1.2. FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

Beyaz veya hafif krem renğinde, kokusuz, higroskopik, amorf bir tozdur. %1 lik çözeltisinin pH'sı 5.0-7.5 arasındadır (8). Parşömen membrandan dializ olmaz ancak kollodyon membrandan çok yavaş dializ olur (22).

20 k suda, alkol, aseton ve glasiyal asetik asitte çözünür. Heparin uzun zaman aktivitesini kaybetmeden saklanabilir (22).

Akciğerlerden elde edilenin aktivitesi 120 IU/mg diğer dokulardan elde edilenin aktivitesi ise 140 IU/mg dan az olmamalıdır. Bu potens, etiketinde belirtilenin %110'undan fazla %90'ından az olamaz. Kurutma kaybı vakum altında 60°C da 3 saatte %5'i geçmemelidir. Yakma sonucu bakiye %28-41 arasındadır. Kuru baz üzerinden hesaplanan azot miktarı %1.3-2.5 olmalıdır. Ağır metal miktarı %0.003 ten fazla olmamalıdır (8).

1.1.3. KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

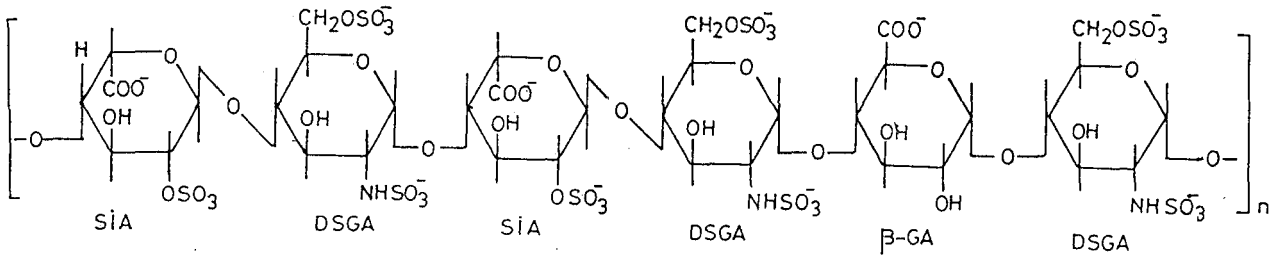
1.1.3.1. YAPISI

Heparin, ekimoleküler miktarlarda glikozamin ve glukuronik asidin münavebeli olarak dizelenmesi ve α -1,4 glikozidik bağlarla bağlanarak meydana gelmiş uzun zincirli bir mukopolisakkarittir (23).

Heparinin α ve β olmak üzere iki formu vardır. β heparin sığıraciğerinden heparin ekstraksiyonu esnasında yan ürün olarak elde edilir. Yapısı β -D- glikozidik bağla bağlanmış ekimoleküler miktarlarda uronik asit ve 2-asetamido-2-deoksi-D-galaktoz (N-asetilkondrozamin) dur. Molekül ağırlığı yaklaşık 15.000 dalton civarındadır. Ayrıca her tetrasakkarit ünitesinde iki sülfat ester grubu içerir.

Bugün kullanılan heparin α heparindir. Molekül ağırlığı yaklaşık 15.000-20.000 dalton civarındadır. Yapısında % olarak 22.9 C, 3.4 H, 1.9 N, 12.9 S içerir. $[\alpha]_D^{23} + 47.6$ dır.

Heparinin yapısal formülü aşağıdaki şekilde verilmiştir (24).



Heparin

SIA:2-Sülfoiduronik asit DSGA: 2,6 disulfoglukozamin β -GA: β -glukuronik asit

Şekilde görüldüğü gibi heparinin yapısı glikozamin ve glukuronik asittir. Bunlarda, amino ve hidroksil gruplarına sülfat grupları (esterleşmiş ya da asitleşmiş iyonize sülfürik asit) bağlıdır. Sülfat grubunun glikozaminin amino grubuna bağlı olması (N-sülfat) haline sülfamik asit denir. Hidroksil gruplarına sülfat grubunun bağlı olması O-sülfat şeklinde gösterilir. Bu bağlanma ester şeklindedir. O-sülfat ve N-sülfat grupları moleküle asit karakter kazandırır, bu nedenle heparin güçlü aniyonik bir maddedir ve vücutta oluşan en asidik madde

olarak nitelendirilir (24).

Yapısal farklılıklar, zincir uzunluğunun yanı sıra, sülfatlanma derecesine, sülfat gruplarının yerlerine, ester sülfat veya amin sülfat şeklinde bulunmasına, asetil grubunun mevcut olup olmamasına göre ortaya çıkar (2).

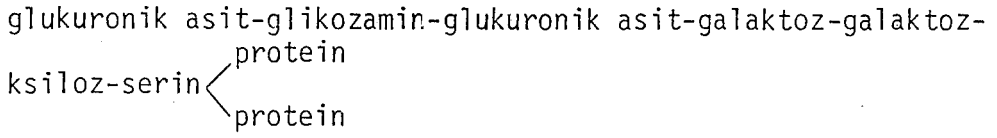
1.1.3.1.1. YAPISI ÜZERİNDE TAYINLER

Polisakkaridlerdeki uronik asidin tayini, asit hidroliz esnasında stabil olmamasından dolayı güçtür. Bu nedenle hidrolizden önce heparin asetillenir sonra sülfat grupları giderilir ve bunu takibinde redüklenir ve daha sonra hidrolize edilir. Bunu takiben, kağıt kromatografisi ile glikoz ve glukuronikasit tesbit edilmiştir (25). Diğer bir çalışmada heparin önce asetillenir, sonra alkali vasatta metillendirilir ve daha sonra hidrolize edilirse, kağıt kromatografisi ile analizinde 3-0-metil-D-glikoz, 2,3-di-0-metil-D-glikoz, 3-0-metil-D-Glikozamin, glikozamin ve 3,6-di-0-metil glikozamin teşhis edilir. Bu arada heparinde sülfatlanma derecesinin aynı olmadığı ve zincirin değişik kısımlarında farklı olduğu ve heparindeki glikozaminin 6 no lu karbonunda sülfat grubunun ester şeklinde bulunduğu belirtilmiştir (26).

Elektroforez yöntemi ile yapılan bir çalışmada fazla hareketli olan fraksiyonun biyolojik aktivitenin %75'ine sahip olduğu ve %9.3 kükürt içerdiği, az hareketli fraksiyonun ise %7.3 kükürt içerdiği ve birden fazla madde taşıdığı belirtilmiştir (27). Ticari heparinin saflaştırılması esnasında alkol, dioksan veya aseton kullanılmasına bağlı olarak metakromatik ve biyolojik aktivitede farklılıklar görülmüştür.

Yapılan bu tayinler heparinin ana yapısı üzerindedir. Bunların yanında heparinin kompleks bir madde olduğu ve bünyesinde 3 tip şeker

taşıdığı ifade edilmiştir (28). Ayrıca heparinin tasfiye edilmesine rağmen protein taşıdığı ve bu proteinin bir bağla heparine bağlı olduğu bildirilmiştir (29,30). Bir mukopolisakkarit olan kondroitin sülfat'a bir proteinin bağlı olduğunun tesbit edilmesi ile (31) heparine bir proteinin bağlı olabileceği düşünülmüş ve yapılan araştırmalar bunun doğru olduğunu göstermiştir (30). Daha sonra bu bağın yapısı üzerinde çalışılmış ve bunun:



şeklinde olduğu tesbit edilmiştir (32).

Heparinin zayıf asit bir ortamda hidrolizi ile karbonhidrat-serin bileşiğinin ksiloil-serin (0- β -D-ksilo pronosil-L-serin), galaktosil ksiloil-serin (4-0- β -D-galakto pronosil-0- β -D-ksilo pronosil-L-serin) şeklinde olduğu tesbit edilmiştir. Setilpiridinyum klorür ile heparinin çöktürülerek saflaştırılması sonunda, yapı içinde yüzde olarak heksozamin 28.5, uronik asit 41.2, azot 2, kükürt 13.1 bulunmuş ve sülfat/heksozamin oranının 2.57/100 olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca amino asit olarak gramda 32.7 mol serin olduğu belirtilmiştir. Galaktozaminin ise total heksozaminin %0.3'ü miktarında olduğu belirtilmiştir. Amino asit analizi (M hidroklorik asit ile 100°C de 3 saat hidrolizi müteakip) kağıt kromatografisi yöntemi ile yapılmıştır. Monosakkarit tesbiti M hidroklorik asit ile 3 saat ısıtmayı takiben, çözelti deiyonizasyona tabi tutulmuş ve kağıt kromatografisi ile (kağıt:Whatman I, solvan: Etil asetat-asetik asit-su (3-1-1), reaktif: şekerler için anilin-ftalik asit, heksozamin için ninhidrin) incelenmiştir. Şeker-serin bağı ise 4 M hidroklorik asit ile 100°C de 14 saat ısıtıldıktan sonra fazla hidroklorik asit rotoevaporatorda uçurulmuş, bunu

takiben heparin nitroz asit ile parçalandıktan sonra jel filtrasyon ile fraksiyone edilmiştir. Fraksiyonlar Dowex 50 den geçirildikten sonra elektroforez metodu ile karbonhidrat serin bileşiği karakterize edilmiştir. Bu işlemler sonunda* :

IdUA - GlcNac - GlcUA - Gal - Xyl - Ser

GlcUA - GlcNac - GlcUA - Gal - Xyl - Ser

(UA - GlcNac)₂ - GlcUA - Gal - Xyl - Ser

(UA - GlcNac)₃ - GlcUA - Gal - Xyl - Ser

şeklinde olduğu bulunmuştur (33).

1.1.3.2. TANINMASI

1.1.3.2.1. UV SPEKTRUMU

Heparinin UV spektrumu bir çok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen bunların verdiği UV değerleri birbirlerini tutmamaktadır. Bunların bir kısmına göre saf heparin 230-300 nm de absorpsiyon göstermez. Diğer bir kısmının belirttiğine göre de 265-292 nm arasında maksimum ve 240-260 nm de ise minimum absorpsiyon gösterir (34). Bulguların böyle çelişkili olması heparinin gayri safiyetine bağlanmış ve saf heparinin bu bölgede absorpsiyon göstermediği belirtilmiştir (35). Daha sonraki çalışmalarda heparinin 205 nm de uronik asidin karboksil gruplarından dolayı maksimum verebileceği düşünülmüştür (36). Diğer bir müellif de heparinin UV spektrumu için 190 nm lere kadar inilmesi gerektiğini belirtmiştir (37). Daha önceleri alınan

* IdUA - Iduronik asit
GlcUA - Glukuronik asit
Xyl - Ksiloz
UA - Uronik asit
GlcNac - Asetil glikozamin
Gal - Galaktoz
Ser - Serin

UV spektrumlarının, ticari heparinlerde yüksek ekstinksiyon göstermesinin sebebi içerdiği fenol muhtevasından dolayı olduğu, kuru heparin sodyumdan hazırlanan sulu çözeltilerde bunun mevcut olmadığı tesbit edilmiştir (38).

1.1.3.2.2. IR SPEKTRUMU

Heparinin IR spektrumu incelenmiş, fakat bu çalışmanın interpretasyonu kaydedilmemiştir (39). Diğer bir çalışmada ticari heparinin IR spektrumunun 1600-1500 cm^{-1} arasında yine bir mukopolisakkarit olan kondroitin sülfat ile mukayesesi yapılmıştır (40).

1.1.3.2.3. KAĞIT KROMATOĞRAFİSİ

Heparin, kağıt kromatografisi ile (kağıt: S & S 2045 a, solvan: n-propanol-su (40:60), reaktif: toluidin mavisi (%0.15 g/su) mavi zeminde pembe renkte (Rf: 0.57) teşhis edilmiştir (41). Ayrıca n-propanol-su (bu solvanda heparin tek leke yerir) (42), 0.04 N amonyum formiyat-isopropanol (60:40)(43), propanol-formik asit-su (30:10:40)(44), amonyum formiyat-metanol(45:55) (45), sürükleyici karışımları kullanılmıştır. Kromatogramda lekelerin teşhisi Azur A ve toluidin mavisi (%0.05 toluidin blue+%0.5 fenol) reaktifleri ile yapılmıştır. Diğer bir çalışmada mukopolisakkaritlerin ayrışması için amonyum formiyat (tamponlu) -isopropanol (65:35) karışımı kullanılmış ve iki komponentin ayrılması sağlanmıştır. Heparini kondroitin sülfat'tan ayırmak için etanol -fosfat tamponu kullanılmış, n-propanol-fosfat tamponunda ise heparin ve kondroitin sülfatın fronta yakın olarak sürüklendiği tesbit edilmiştir.

1.1.3.2.4. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ

Selüloz ve Sephadex adsorbanlarında mukopolisakkaritlerin ay-

rılması yapılmıştır.

Selülozda solvan sistemi olarak n-propanol-isopropanol-absolu etanol-0.037 M sitrik asit (pH 3.1'e sodyum hidroksit ile getirilmiştir.) kullanılmıştır.

Selüloz adsorbanında heparin ve heparitin Rf değerleri 0.77'nin ve 0.54'ün altında olmak üzere iki leke verdiği 0.54'ün altındaki lekenin uzayan şekil gösterdiği, heparinin polidispers moleküller gibi sürüklendiği tesbit edilmiştir.

Selüloz MN 300 ile yapılan bir başka çalışmada solvan sistemi olarak: 1) amonyak %25-piridin-su (60:35:5) ve 2) butanol-asetik asit-su (3:1:1) kullanılmış, soğuk hava akımında kurutulan plak üzerine: 1) diazolandırılmış p-nitro anilin reaktifi, 2) ninhidrin'in asetondaki %1 lik çözeltisi, 3) Azur A reaktifi, 4) p-dimetilamino benzaldehit reaktifi, 5) bakır sülfat'ın sudaki %10'luk çözeltisi + %2'lik amonyak çözeltisi, 6) Eriochrome black T'nin sudaki %0.125 lik çözeltisi, 7) Water Blue'nun sudaki %0.065 lik çözeltisi püskürtülmüştür. Püskürtmeden sonra kromatogramlar üzerinde 1,2 veya 3 nokta belirmiştir. Elde edilen bu noktaların Rf değerleri ve renkleri bir tablo halinde verilmiştir (46). Bu reaktiflerden 1 ve 4'ün heparinin serbest amino gruplarından 2'nin heparinin protein muhtevassından, 5'in ise amid bağlarınınin mevcudiyetinden, 3'ün ise metakromaziden dolayı renk verdiği belirtilmektedir.

Polietilen imino selüloz (PEI sellulosa) adsorbanı veya selüloz MN 300 ile yapılan diğer bir çalışmada, 0.04 M amonyum formiyat (pH 4.3) -isopropanol (50:50), aseton-su-asetik asit (2:2:1), 0.01 M hidroklorik asit solvanları denenmiştir. Bu çalışmada PEI selüloz için Morgan-Elsen reaktifi kullanılmış ve uzayan lekeler şeklinde he-

parin tesbit edilmiştir. Selüloz (E.Merck) ile 0.04 M amonyum formiyat (pH 4.3) - isopropanol (50:50) solvanında heparin startta kalan bariz bir leke ve Rf değeri 0.6 civarında görünen hafif bir leke tesbit edilmiştir. (47).

Selüloz MN 300 adsorbanı ile yapılan başka bir çalışmada solvent sistemi olarak: 1) amonyak-piridin-su (60:35:5), 2) su, 3) butanol-asetik asit-su (3:1:1) kullanılmış ve reaktif olarak: 1) 10 mg Acridine Orange'ın 10 ml sudaki çözeltisi, 2) 10 mg bromkrezol yeşili'nin 10 ml sudaki çözeltisi, 3) 5 mg azokarmin G'nin 10 ml sudaki çözeltisi püskürtülmüştür. Neticede reaktif 1 ile 1 leke, reaktif 2 ile 2 leke ve reaktif 3 ile 3 leke elde edilmiştir. Bu lekelerin renkleri ve Rf değerleri bir tablo halinde verilmiştir (48).

Sephadex jelinde, n-propanol-isopropanol-absolu etanol-0.037 M sitrat tamponu (pH 3.1) (1:4:2:13) karışımı ile çalışılmış ve tankın 3 saat doyurulması tavsiye edilmiştir. Reaktif olarak toluidin mavisi (20 mg toluidin mavisi, 40 ml aseton, 180 ml metanol, 5 ml %2 asetik asit) kullanılmıştır.

Sephadex jelinde, heparinin starttan itibaren plağın yarısına kadar devam eden uzun bir leke halinde sürüklendiği tesbit edilmiştir (49).

1.1.3.3. MİKTAR TAYİNİ

1.1.3.3.1. METAKROMATİK TAYİN

Heparinin bazı boyalarla metakromazi gösterdiğini ilk defa JORPES belirtmiştir (50). Metakromazi kelimesi ilk defa ERLICH tarafından kullanılmıştır. Kelime, anlam olarak yer değiştirmek demektir. Metakromazi, absorpsiyon maksimumunun daha alçak dalga boylarına kay-

ması, absorpsiyonun alçalması şeklinde ilk olarak LISON (51) tarafından tanımlanmıştır. Metakromazi gösteren maddelere kromotrop maddeler denir. Kromotropik maddeler genel olarak biyolojik menşeli, yüksek moleküllü polianyonlardır. Metakromazinin tersi olan olaya batokromazi adı verilir, absorpsiyon maksimumunun daha yüksek dalga boylarına kayması demektir.

Mukopolisakkaritler serbest amino grubu taşıyan boya çözeltisinin absorpsiyon spektrumunu daha küçük dalga boyuna değiştirirler (4).

Metakromazi gösteren maddeler arasında heparin, kondroitin sülfat, hiyaluronat, nükleik asit, agar ve aljinat gibi organik maddelerin yanında inorganik ve sentetik kromotroplardan silikat, polifosfat, kitin sülfat, karboksi metil sellüloz, aljinat sülfat ve poliakrilatlar sayılabilir. Ayrıca sabunlar, anyonik deterjanlar, miristat yüzey aktif ajanlar (Duponal) ve fosfolipitler gibi düşük molekül ağırlığına sahip maddelerinde kromotropik özellik gösterdikleri bildirilmiştir (52,53). Bazı antibiyotiklerde metakromazi gösterirler (54). Metakromazi üzerinde C vitamininin azaltıcı etkisi yanında (55), ortamın pH'sının da etkili olduğu, pH'nın artmasıyla metakromatik indeksin (500-550 ile 600-640 arası absorpsiyonun oranı) arttığı belirtilmiştir (56). Metakromazi gösteren boyalar Beer kanununa uymazlar. Metakromazide makromoleküllerin mevcut olması veya olmaması değil yalnız boya-boya intramoleküler birleşmesi bahis konusudur. Normal metakromatik boyalar (metilen mavisi, toluidin mavisi), fibrin, jelatin, doku ve hücre ile karıştırılırsa ortakromatik renk görülür (54). Buna ilayeten bağlayıcı ajanların mevcut olmaması halinde agregat teşkil etmeyen akrilan, atebirin, proflavin 9-amino akridin ve diğer bazı akridinler, nükleik asit ile yüksek dalga boyuna kayma gösterirler (batokromazi). Bu, boya-

polimer interaksyonu neticesidir (57). Metakromaziye dayanan tayin için diazin serisi boyalar kullanılır. Akridin sınıfı boyalar mukopolisakkaritler ile kırmızı fluoresans verirler. Bunlar hyaluronidaz ile parçalanırlar (58). Yalnız, metakromazinin değişik maddeler ile ortaya çıkması, bu tayinin heparin için spesifik olmadığını gösterir. Bu tayinde, belli oranda sodyum klorür ve metanol ilave edilmesi metakromaziye bozmaz. Fakat %5 sodyum klorür, %20 alkol ilave edilmesi veya ısı artması metakromaziye bozar. Metakromaziye dayanan ölçme pH 9 dan aşağıda sodyum klorürlü vasatta yapılır. Dokuda yapılan tayinde ayrıca meydana gelen renk kırmızı ve erguvani arasında değişir. Buna α , β , γ tip metakromazi denir. Boyanın cinsine göre renk değişimleri aşağıdaki şekilde meydana gelir.

Bismark kahverengisi ile portakal rengi \longrightarrow sarıya

Azur A ile mavi \longrightarrow kırmızıya

Parlak krezil mavisini ile mavi \longrightarrow erguvani renge

Brom krezol mavisini ile mavi \longrightarrow erguvani renge

Krezil viole ile mavi \longrightarrow erguvani renge

Nil mavisini sülfat ile yeşil mavi \longrightarrow kırmızı maviye

Nötral kırmızı (pH 6-7) ile kırmızı \longrightarrow portakal rengine

dönüşür. Bazik fuksin, kırmızı renkte değişme gösterir. Pyronin, akri-
flavin ise fluoresansını kaybeder (59).

Heparin çözeltileri, azo, tiazin, oksazin, azin, trifenilmetan ve akridin boyalar ile metakromazi gösterirler (4). Tionin, Azur C (mono metiltionin), Azur B (trimetiltionin) ve metilen mavisini (tetra-
metiltionin) ile heparin metakromazi göstermez. Buna karşılık heparin Azur A (asimetrik dimetiltionin) ile bariz bir metakromazi gösterir.

Ayrıca Azur A heparinin antikoagulan aktivitesini nötra-

lize eder. Azure A ile metakromazi spektrofotometrede incelenirse maksimum 610 nm den 510 nm e değişir. Boya ile heparin arasındaki stoşio-
metrik oranda heparin miktarı arttıkça λ maksimum 510 nm e düşer, bu-
nun aksine miktar azaldıkça λ maksimum 610 nm e yükselir. Reaksiyon
ısıya karşı hassastır. Absorbsiyon 0°C de, 20°C de ve 37°C dekinden
daha yüksektir. Reaksiyonun yürüyüşü bazik boya ile heparinin asit gu-
rupları arasında olur. Bu reaksiyonda boya konsantrasyonu az olmalıdır.
Aynı şekilde heparin miktarının fazlalığıda metakromaziyi önler. Orta-
ma alkol ve aseton ilave edilmesi renk değişimini engeller. Meydana
gelen renk heparin ve boya oranına şiddetle bağımlıdır. Çok düşük kon-
santrasyondaki mukopolisakkarit, bir çok boya moleküllerinin sekonder
bağlar (hidrojen bağları) ile birbirine bağlanmasına imkan verir. Böy-
lece polimer teşekkül eder ve yeni renk meydana gelir. Alkol ve aseton
sekonder bağları kaldırır ve yüksek değerli anorganik iyonlar başlan-
gıç bileşiminin teşekkülüne sebep olan primer değerli bağlar ile inter-
fere olur (59). Dializ ile alkol kaldırılırsa metakromazi tekrar orta-
ya çıkar. Boya-heparin bileşigi suda güç, eter ve kloroformda ise ko-
lay çözünür. Suda iyonize olur ve mevcut diğer katyon ve aniyonlarla
denge halinde bulunur (60). 80°C - 90°C da ısıtma metakromatik rengi
tahrip eder. Heparin için metakromaziye dayanan titrimetrik ve spektro-
fotometrik miktar tayinine ait değişik yöntemler verilmiştir (4,61).
Metakromatik tayin ilk olarak MacIntosh tarafından toluidin mavisi ile
yapılmıştır (62).

Spektrofotometrik olarak yapılan metakromazi deneylerinde hepa-
rin muhtelif boyalarla incelenmiştir. Bu boyalar arasında metilen mavi-
si (63), gece mavisi (61), Azur A, Azur I ve Azur II (64) sayılabilir.

Jaques ve ark.nın yöntemi modifiye edilerek daha küçük hacimlerde ve daha düşük heparin konsantrasyonlarında metakromazi deneyleri, dolayısı ile heparin miktar tayinleri yapılabilmıştır.

1.1.3.3.2. PROTAMİN İLE TİTRASYON

Plazmadaki heparin titrasyonunun, bir heparin antagonisti olan protamin ile yapılması için bir çok teknik önerilmiştir (65-68).

Bu yöntemde, 0.5 ml plazmaya, 1 mg protamin sülfat'ın 1 ml %0.9 luk sodyum klorür içindeki çözeltisi ve 1 mg trombinin 1 ml % 0.9 luk sodyum klorür içindeki çözeltisinden 0.2 ml ilave edilir. Koagülasyon meydana gelinceye kadar bir baget ile tübün kenarına sürtülür ve koagülasyon süresi tayin edilir. Önce değişik protamin miktarları ile yapılan tayinde standart eğri çizilir. Buna göre bilinmeyen heparin numunesindeki miktar bulunur (68).

1.1.3.3.3. ANTIKOAGÜLAN AKTİVİTEYE DAYANAN TAYİNLER

Antikoagülan etkinin tayini yöntemleri çok güçtür. Bu tayinde değişik faktörler rol oynar. Bu heparinin sülfatlanma derecesine bağlıdır (69,70). Burada kalsiyum miktarının düşüklüğü, toluidin mavisi ve protamin mevcudiyeti inhibitör rol oynarlar. Ayrıca asit ortam (%11 asetik asit) heparinin antikoagülan aktivitesini azaltır (71). Muhtelif farmakopelerde heparin miktarı antikoagülan aktiviteye dayanarak ünite/mg veya ml olarak verilmiştir. Bir heparin ünitesi 0°C de 1 ml kedi kanının pıhtılaşmasını önleyen heparin miktarıdır. USP üniteyi 1 ml sitratlanmış koyun plazmasını %1 lik kalsiyum klorür çözeltisi katılmasından sonra bir saat boyunca pıhtılaşmaktan alakoyan miktar olarak tanımlar (g). Antikoagülan aktiviteye dayanarak yapılan miktar tayinlerinde değişik yöntemler kullanılır.

1.3.3.3.3.1. TAM KAN YÖNTEMİ (72)

Koagülasyon zamanı tayini, parafinlenmiş pyrex tüp içinde havasız ortamda yapılır. Her tüp 0.2 ml dilüe heparin çözeltisi, cam boncuk içerir. 5 tüpe standart heparin diğer 5 tüpe ise miktar tayini yapılacak heparin konur. Seyreltilmiş heparin çözeltisi birincide 10, ikincide 5 mg madde taşır. Kan alınır ve tüplere konur. Okuma 2, 4, 8 ve 24'üncü saatlerde yapılır. Cam boncukların çökme hızının azalması koagülasyonun başladığını gösterir. Koagülasyonun başlangıcı ve sonu zaman olarak tesbit edilir.

Sülfatlanmış tam kan yöntemi antikoagülan aktivite tayini için kullanılmıştır (73). Bu yöntemde heparinin sudaki çözeltisi tam kanı dilüe etmede kullanılır. Böylece kan yüksek konsantrasyonda tuz ile koagüle olmaz şekle getirilir. Taze alınmış öküz kanı hacminin 1/2 si oranında %7 anhidr sodyum sülfat içeren çözelti ile karıştırılır. Bu karışım 4°C de 3-4 hafta saklanabilir. Koagülasyon zamanının kısaltılması için asetonda kurutulmuş öküz beyni ilave edilir. Deney oda temperaturünde yapılır.

Deney: Standart preparatın 1.28, 1.6, 2 IU/ml olmak üzere sudaki üç çözeltisi hazırlanır. Her çözeltiden 1 ml alınıp, 6 test tübüne konur, üzerine 0.2 ml trombokinaz ilave edilir. Daha sonra bu karışıma 1 ml sülfatlanmış kan ilave edilir ve dikkatle alt üst edilir (bu karıştırmada hava kabarcığının karışmamasına dikkat edilmelidir). Her tüpte bu ilayeden 15 saniye sonra ilk pıhtı teşekkülüne kadar geçen süre ölçülür. Bu yöntemin çok basit olduğu ve kısa sürede tayine imkan verdiği belirtilmiştir.

1.1.3.3.2. TROMBIN YÖNTEMLERİ

Bu yöntem, ilk olarak taze alınmış veya oksalatlı öküz tam kanı üzerinde denenmiştir (74). Daha sonra Kjems ve Wagner oksalatlı plazma üzerinde çalışmışlar, bunun için değişik miktarda heparine (2.5 IU/ml içeren çözeltiliden 0.04-0.1 ml) 1 ml oksalatlı öküz plazması ve belli miktar trombin ilave etmişler ve koagülasyon zamanını 20 saniyeden 60 saniyeye kadar tayin etmişlerdir (75).

Trombin yönteminin geliştirilmiş şekli sitratlı öküz plazması ile yapılmıştır. Bu yöntemin tatbik edilişi aşağıdaki şekildedir (76).

Öküz kanı sitrat ilave edilmiş tübe alınır, santrifüje edilir, plazma ayrılır. Üzerine seyreltilmiş trombin ilave edilir. Sonra 0.2 zamanı tayini için trombin, heparin üzerine damlatılır ve plazma ilavesinden sonra platin iğne daldırılır, hareket ettirilir ve pıhtı görüldüğü an tesbit edilir. (0) noktası 20 saniye olmalıdır. Bu şekilde elde edilen kurbun yalnız çıkan kısmı kullanılır. Plazma trombin yöntemi için bir çok tenkitler yapılmış ve neticenin %20 civarında fazla çıktığı bildirilmiştir (68).

Trombin yönteminde son zamanlardaki deneylerde insan kanı plazması kullanılmıştır (77,78).

1.1.3.3.3. REKALSİFİKASYON ZAMANI TAYİNİ

Heparinin antikoagülan aktivitesinin hesaplanabilmesi için kullanılan bir diğer yöntemde rekalsifikasyon zamanının tayinidir. Bu yöntemde 37°C lik su banyosunda, silikonlanmış tüplere heparin çözeltisi, %0.9 luk sodyum klorür ve koyun plazması konur, üzerine 1/40 M kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilerek anında kronometre ile zaman tesbit edilir, kısa aralıklarla bir telle hafif karıştırılarak ilk pıhtı teşekkül ettiği an tayin edilir (79).

1.1.3.3.3.4. PLAZMA YÖNTEMİ (8)

Sodyum sitrat (%8) içeren bir kaba koyun kanı alınır, hafif karıştırılıp, santrifüje edilir, plazma ayrılır. Bunun üzerine kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilip, dondurulur. Gerektiği zaman 37⁰C de su banyosunda eritilerek kullanılır.

Referans heparin %0.9 sodyum klorür çözeltisinde çözündürülür, üzerine yukarıda belirtilen plazma ilave edilir. Burada heparin miktarı 1-1.5 USP üniteye tekabül edecek şekilde ayarlanır. Bu referansın %5 artan şekilde aritmetik bir dizisi tüpler içinde hazırlanır. Bunların üzerine %1 kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilip derhal zaman kaydedilir, tüpler kapatılıp üç defa yavaşça alt üst edilir. Aynı işlem ml de 1 mg heparin içeren çözeltinin standart preparata uygun şekilde seyreltilmesini takiben yapılır. Kalsiyum klorür ilavesinden sonra bir saatlik süre içinde her tüpteki pıhtılaşma derecesi tayin edilir. Burada 0.25, 0.50 ve 0.75 olmak üzere üç derece alınır ve tam pıhtılaşma (1) olarak derecelendirilir. Bunu takiben verilen formüle göre (M) değeri hesaplanır. USP heparin ünitesinde mg da sodyum heparin potensisi $P = \text{Antilog } M$ dir.

USP yönteminde kullanılan sitratlı plazmaya diatome silikat reaktifi ilave edilerek antikoagülan aktiviteye dayanan başka bir miktar tayini yöntemi de önerilmiştir (9).

1.1.3.3.3.5. ANTI X_a YÖNTEMİ

Heparinin tek başına antikoagülan özelliği çok düşüktür ancak heparinin ko-Faktör I adı verilen antitrombin III ile antikoagülan aktivitesi son derece artar ve aktif pıhtılaşma faktörü Faktör X_a 'yı ve trombinin inhibe eder. Bu inhibisyon çok düşük heparin dozlarında bile

meydana gelir. Faktör X_a 'nın inhibisyonu zamana bağılı olarak ortamdaki heparin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bundan istifade ederek Faktör X_a 'ya bağılı Heptest adı verilen miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.

Bu yöntemde, heparin miktarı tayin edilecek plazmaya eşit hacimde Faktör X_a ilave edilerek 120 saniye 37°C su banyosunda enkübe edilir, sonra bu karışıma domuz plazması fraksiyonu içinde çözündürülmüş optimum miktarlarda kalsiyum klorür ve beyin sefalini içeren bir karışım reaktif olan RECALMIXTM ilave edilerek rekalsifiye edilir ve pıhtılaşma zamanı saniye olarak tesbit edilir. Elde edilen bu pıhtılaşma zamanı daha önceden standart heparinle elde edilmiş standart eğriye tatbik edilerek plazma içindeki heparin IU/ml cinsinden hesaplanır.

1.1.3.3.4. TÜRBİDİMETRİK TAYİN

Heparin, streptomisin veya dihidrostreptomisin ile bir kompleks meydana getirir. Bu karışım 10 dakika bekletildikten sonra ekstinksiyonu spektrofotometrede 480 nm de okunur (80). Ayrıca heparinin protamin bileşiğinin ışık absorpsiyonuna dayanan ayrı bir yöntem de önerilmiştir (81).

1.1.3.3.5. POLAROGRAFİK TAYİN

Heparin miktar tayininin polarografik yöntemle de yapılabileceği bildirilmiştir (82).

1.1.3.3.6. SPEKTROFOTOMETRİK VE BİYOLOJİK METODLAR ARASINDAKİ KORRELASYON

Biyolojik tayinlerin uzun ve pahalı olması, spektrofotometrik tayinlerin ise daha kısa sürede netice vermesi ve ekonomik olması nedeni

ile bu yöntemler arasında bir korrelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Bir kısım araştırmacılar bu konunun lehinde diğer bir kısmı ise aleyhinde görüş belirtmişlerdir. Fakat böyle bir korrelasyonun mevcut olduğu ilk defa Güyen ve ark.ları tarafından bildirilmiştir (79). Bu korrelasyon metakromatik aktivite ile rekalsifikasyon zamanı arasında verilmiştir.

1.1.3.4. FRAKSİYONLANDIRILMASI

1.1.3.1. bölümünde belirtildiği gibi heparin bir mukopolisakarittir ve molekül ağırlığı 1 000-50 000 dalton arasında değişir. Bu nedenle heparinin farklı molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlandırılabilceği düşünülmüş ve bu gaye için çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

1.1.3.4.1. FRAKSİYONLU ÇÖKTÜRME

Çöktürme ile heparini fraksiyonlandırmak için değişik yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan biri etanol ve dioksanla çöktürmedir (83).

Bu yöntemde etanol ve dioksan kullanılır. Etanolle yapılan çöktürmede 15 g heparin 450 g distile suda çözündürülür ve 4⁰ C'ye soğutulur, bu çözeltiye ilk çökme meydana gelinceye kadar aynı sıcaklıktaki mutlak alkol ilave edilir. Bu çökelti yavaşça karıştırılır ve bütün gece bekletilir, daha sonra üstteki sıvı aktarılarak ayrılır. Yapılan hesaplamalarda ilk çökmenin %30 v/v etanolle meydana geldiği bulunmuştur. Daha sonra alkol miktarı %5 lik basamaklar halinde arttırılarak diğer fraksiyonlarda ayrı ayrı çöktürülmüş ve liyofilize edilmişlerdir. Bu yöntemle 8 fraksiyon elde edilmiş, bunların molekül ağırlıkları, ana heparine göre % oranları, azot, kükürt yüzdeleri ve antikoagülan aktiviteleri tayin edilmiştir.

Aynı yöntemle dioksan kullanılarak da çalışılmış ve ilk çökmenin %46 dioksanla meydana geldiği bulunmuştur. Dioksan miktarı %5 artırılarak diğer fraksiyonlarda çöktürülmüştür. Bu yöntemle de 6 fraksiyon elde edilmiş ve bu fraksiyonlarda da yukarıda belirtilen analizler aynen yapılmıştır.

Bir diğer araştırmacı etanolle yapılan çöktürmede 12 fraksiyon elde etmiştir (84).

Çöktürme yöntemi ile yapılan fraksiyonlandırmada kullanılan bir diğer maddede setil piridinyum klorür'dür.(CPC). Setil piridinyum klorür asit polisakkaritlerle, dolayısı ile heparinle suda çözünmeyen kompleks teşkil eder. Ortamdaki elektrolit mevcudiyeti bu kompleksin çözünmesini sağlar. Bu kompleks N magnezyum klorür çözeltisinde çözünmez, fakat 2.5 N magnezyum klorür çözeltisinde tamamen çözünür. Heparin-CPC kompleksi bu iki normalite arasında muhtelif normalitelerdeki magnezyum klorür çözeltilerinde çözündürülüp fraksiyonlandırılır. Bu şekilde 1.0, 1.8, 2.0, 2.1 N çözeltiler ilavesi ile 4 ayrı fraksiyon elde edilmiştir (85).

1.1.3.4.2. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ

Heparinin ince tabaka ile fraksiyonlandırılması 20x20 selüloz MN 300 plak kullanılarak yapılmıştır. Heparin (145 IU/mg) plağa tatbik edilmiş ve amonyak %25-piridin-su (60:35:5) sistemi sürükleyici solvan olarak kullanılmıştır. Ninhidrin reaktifi ile 3 fraksiyon elde edilmiş bunlara tekabül eden bantlar kazınıp alınarak su ile elüe edilmiş her biri liyofilize edilerek kurutulmuştur. Yapılan analizlerde Fraksiyon 1 ve 2'nin proteinik yapıda olduğu, antikoagülan ve lipolitik aktivitelerinin bulunmadığı Fraksiyon 3'ün ise heparine benzer yapıda olduğu saptanmıştır (86).

1.1.3.4.3. JEL KROMATOGRAFİSİ

Heparinin ağırlıkları farklı moleküllerin bir karışımı olması, jel filtrasyonunda molekül ağırlıkları farklılığına göre ayırım yapabilmesi, heparinin jel kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılabilceğini düşündürmüştür. Bu düşünceyle muhtelif adsorbanlar kullanılarak fraksiyonlandırma yapılmıştır.

Heparinin jel kromatografisi ile fraksiyonlandırılmasında en çok 1,6- α -D-glikozido - glikoz polimeri olan dekstran'ın modifiye edilmiş şekli olan Sephadex kullanılmıştır. Sephadex'ler fraksiyonlandırabildikleri molekül ağırlıklarına göre numaralandırılırlar:50, 75, 100, 200 gibi (200'ün fraksiyonlandırabildiği molekül ağırlıkları 200 000 daltonun altında olanlardır).

Sephadex 200 kullanılarak yapılan bir çalışmada, domuz mukoza-sından elde edilen heparin 50 mg/ml olacak şekilde 45x2.5 cm kolona tat-bik edilmiş ve 9 k 0.12 M sodyum klorür + 1 k %0.05 sodyum azid içeren 0.12 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile akış hacmi 11.55 ml/saat ola-cak şekilde 5 er ml'lik porsiyonlar halinde toplanmıştır (87).

Başka bir çalışmada sepharoz-antitrombin III kompleksi kullanıla-rak aktif heparin (450 IU/mg) izole edilmiş, daha sonra bu aktif hepa-rin Sephadex G 200 sütununda fraksiyonlandırılarak 5 fraksiyon elde e-dilmiştir (88).

Bu çalışmanın tersi Sephadex G 100 sütunu kullanılarak yapılmış, heparin bu sütuna tatbik edilerek 5 fraksiyon elde edilmiştir. Daha sonra, elde edilen bu fraksiyonlar sepharoz-antitrombin III sütununa uygulanmış ve küçük moleküllü heparinlerin büyük bir kısmının adsorbe olmadan geçtiği, molekül ağırlıkları büyük olan fraksiyonların ise da-ha fazla tutulduğu görülmüştür (89).

Sephadex G 100 ile yapılan bir diğ er ç alışmada 3 g heparinin 10 ml 0.2 M sodyum klorürdeki ç özeltisi 90x5 cm lik kolona tatbik edilmiş ve 0.2 M sodyum klorür ile elüsyon hız ı 60 ml/saat olacak şekilde 15'er ml lik porsiyonlar halinde elü e edilmiştir. Neticede 10 fraksiyon elde edilmiştir. (90).

Sephadex G 200 ve Sephadex G 100 ile paralel yapılan ç alışmada elü an olarak 70 μ M, 0.7 mM, 7 mM, 70 mM ve 210 mM fosfat tamponu (pH 6.8) kullanılmış , elde edilen neticelerden filtrasyonun elü anın iyonik kuvvetine bağı lı olduğu tesbit edilmiştir (91).

Sephadex G 75 kullanılarak yapılan bir ç alışmada ise elü an olarak 3 N ve 1.5 N sodyum klorür kullanılmış ve 4 fraksiyon elde edilmiştir (92).

Sephadex G 50 medium grade kullanılan bir diğ er ç alışmada ise 45x2.5 cm kolon kullanılmış ve distile su ile 36 ml/saat hız la elü e edilmiştir. Elü atlar 1'er ml olarak toplanmış ve her elü attan 50 μ l alınıp 3 ml %0.0025 toluidin blue ç özeltisi ile karıştırılarak 500 nm de transmittansı ölçülerek W.H.O.'nun heparin için verdiğ i International Standart ile karşılaştırılmış tır. Bu değ erlendirme sonucu 4 fraksiyon elde edilmiştir (93).

Fraksiyonlandırma da kullanılan bir diğ er materyelde ECTEOLA'dır (84,85,94). Heparin, Ringer ve Reichart yönteminin (95) modifiye edilmiş şek li ile ECTEOLA sütununa tatbik edildikten sonra elü an olarak 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 M sodyum klorür kullanılmış tır. Elde edilen elü atlara devamlı olarak, karbonhidratlar için spesifik olan orcinol testi uygulanmış ve bu testlerde sabit bir renge veya devamlı ç ok düşük değ erlere ulaşıldığ ı zaman bir üst molariteye geç ilerek elüsyona devam edilmiştir. Elüsyon hız ı dakikada 1.5 ml dir ve her fraksiyonda

20 ml elüat toplanmıştır. Daha sonra, elde edilen fraksiyonlarla sodyum klorür'ün ayrıştırılması Sephadex G 25 kolonda yapılmıştır (84).

ECTEOLA ile yapılan bir diğer çalışmada 20x2 cm kolon kullanılmış ve sütuna heparin tatbik edilmeden önce sütun N sodyum hidroksit, N hidroklorik asit, alkol, eter ve distile su ile iyice yıkanmıştır. Elüsyon yine artan molaritede sodyum klorür ile yapılmıştır (85).

Başka bir araştırmada Laurent elüan olarak 0.6, 1.4 ve 2 M sodyum klorür kullanarak ECTEOLA-selüloz sütununda heparini fraksiyonlandırmıştır (94). Sodyum klorürün heparinden uzaklaştırılması yine Sephadex G 25 sütununda yapılmıştır.

Johnson ve Mulloy'un heparinin fraksiyonlandırılmasında kullandığı bir başka materyelde agaroz/poliakrilamid (Ultrojel AcA 44) jeli-dir (3). Heparinin fraksiyonlandırılması için 109x2.8 cm kolon kullanılmış ve elüan olarak %0.01 sodyum azid içeren 0.3 M sodyum klorür çözeltisi elüsyon hızı 48 ml/saat olacak şekilde tatbik edilmiştir. Fraksiyonların molekül ağırlıklarını tesbit etmek içinde 58x0.75 cm Ultrojel AcA 44 sütunu kullanılmış, aynı elüanla 4-6 ml/saat olacak şekilde elüe edilmiştir.

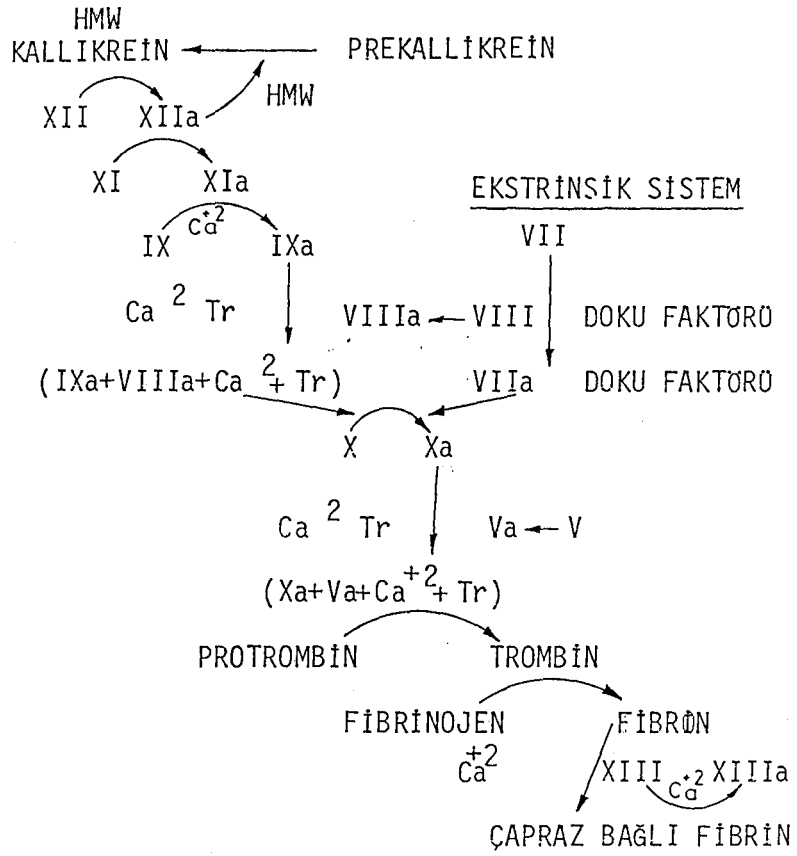
1.1.4. FARMAKOLOJİSİ

Heparinin kullanılışı önemli iki özelliğinden dolayıdır. Bunlar antikoagulan ve lipolitik aktiviteleridir.

1.1.4.1. ANTIKOAGÜLAN AKTİVİTESİ

Koagülasyon mekanizmasının kademeleri Şekil'A da verilmiştir (96).

İNTRİNSİK SİSTEM

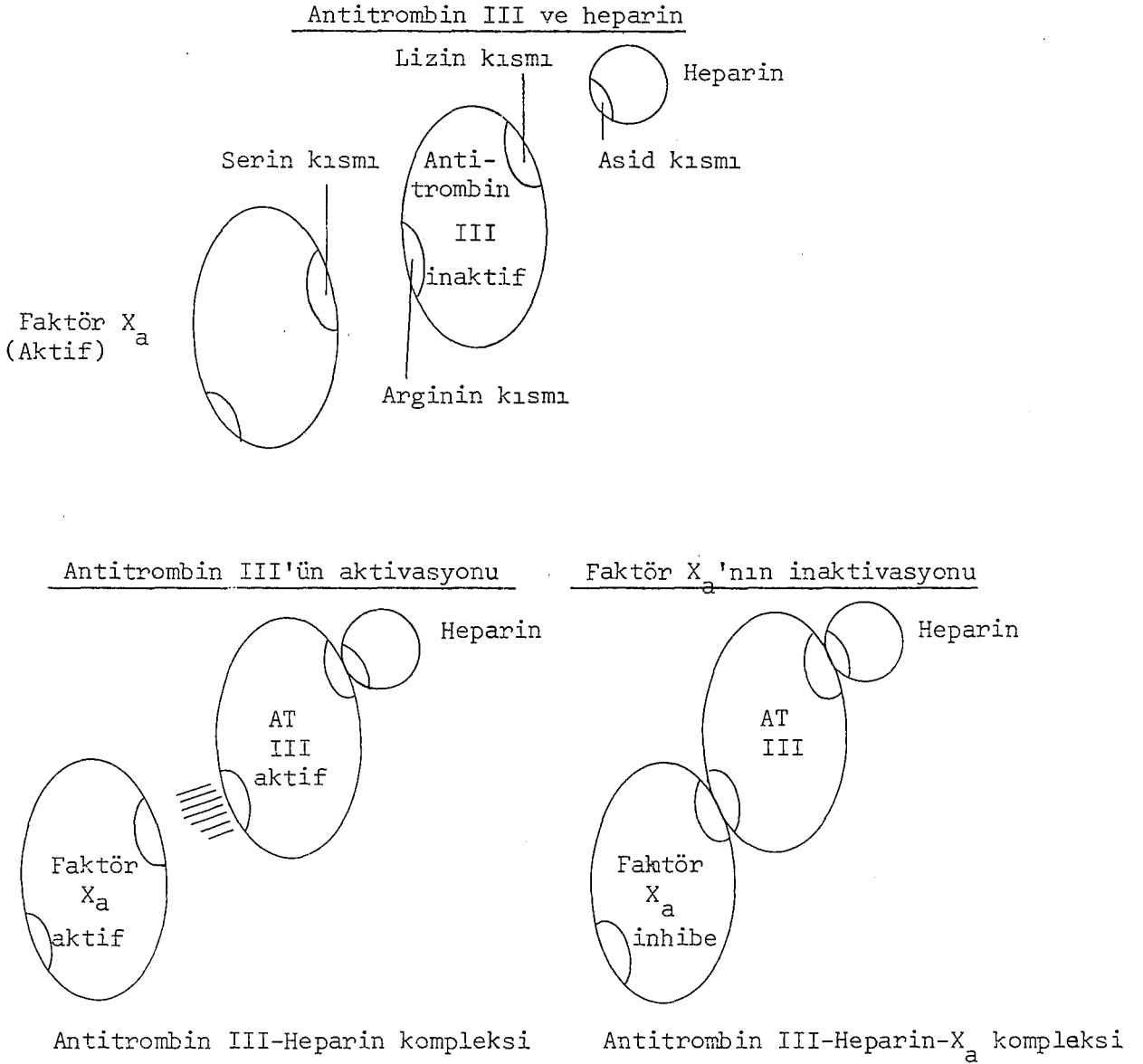


Şekil A. Koagülasyon mekanizması

Bu diagram kompleks bir serin proteaz, zimojenler, aktivatörler inhibitörler ve kofaktörler ağı şeklindedir. Bir çok dönüşüm ve yükseltgeme işlemleri bu diagramı düzenler. Heparin ve komponentleri bu proteaz ağını çeşitli bölgelerde modüle ederek Faktör X_a ve II_a nın inhibisyonuna sebep olurlar. X_a ve II_a nın dışında heparinin Faktör XII, Faktör XI ve Faktör IX aktivasyonunu etkilediği, kallikrein'in etkisini azalttığı tesbit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda heparinin tek başına antikoagülan etkisinin az olduğu fakat antitrombin III gibi bir endojen koagülasyon enzimi inhibitörü ile kompleks halinde kullanıldığında X_a faktörünü inhibe etme gücünün çok arttığı tesbit edilmiştir. Bu, Şekil'B de şematik

olarak gösterilmiştir (95).



Şekil B. Heparin-Antitrombin III-Faktör X_a etkileşmesi

Son zamanlarda heparinin endotelial hücre cidarlarından fibrinolitik prosesleri arttıran doku plasminogen aktivatörünü açığa çıkardığı bulunmuştur. Ayrıca plazmada antitrombin III'ten başka heparin ko-faktör II adı verilen başka bir heparin ko-faktör'ü olduğuna ve bunun da antitrombin III'ten ayrı olarak trombinin inhibisyonunda rol oynadığına inanılmaktadır (96).

1.1.4.2. LİPOLİTİK AKTİVİTESİ

Heparin yemekten sonra görülen hiperlipemi sonucu plazmada meydana gelen bulanıklığı azaltır. Bu etkiye lipemiyi berraklaştırıcı etki (lipemia clearing factor) denir. Heparin in vitro olarak plazmaya ilave edilirse berraklaştırma yapmaz. Fakat lipemik plazma, heparin enjekte edilmiş bir hayvandan alınan plazmaya ilave edilirse berraklaşma görülür. Gerçekte berraklaştırma trigliseridlerin hidrolizini yapan ve heparin tarafından serbest hale geçirilen bir lipaz'a (lipoprotein lipaz) aittir.

Plazma trigliseridleri proteinler ile birleşik halde bulunur. Enzim tarafından tedricen ayrılan yağ plazmada görülür. Muhtemelen yüksek moleküllü ve düşük dansiteli β -lipoproteinler alçak molekül ağırlıklı ve yüksek dansiteli α -lipoproteinlere dönüşür. Heparin, berraklaştırıcı faktörü serbest hale geçirir. Heparinin burada etken enzim ile substrat arasında bir köprü rolü oynadığı belirtilmiştir. Bu etki için gerekli heparin miktarı çok düşüktür. Sıçanlarda 1 mg/kg tavşanlarda 2 mg/kg dan küçüktür. Yalnız, büyük dozda yüksek aktivite görüldürsede artan miktar ile etki artışı orantılı değildir.

Yukarıda belirtildiği gibi heparinin lipolitik aktivitesi dolaylı olarak meydana gelir. Bu lipoprotein lipaz adı verilen bir enzimin deşarjı (97) yanında ayrıca değişik enzimlerin plazmaya geçtiği bildirilmiştir(98-103) Diğer bir çalışmada heparinin alçak dozda enjeksiyonundan sonra heterojen ve kompleks enzimlerin lipolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Lipolitik aktivitede bir veya bir çok enzimin rol oynadığı kabul edilir. Buna göre insan post heparin plazması lipolitik aktiviteye sahiptir ve aynı yağ asitlerinin mono ve trigliseridlerine karşı değişik özellikler gösterirler. Monogliserid li-

polizi, trigliserid lipolizinden 6 defa daha hızlıdır, ayrıca bu protamin sülfat veya N sodyum klorür inhibisyonuna daha az hassastır.

Heparinle kalp h mojenati fraksiyonlarının in vitro şartlarda enkubasyonunda lipoprotein lipaz'ın arttığı tesbit edilmiştir(104). Bununla beraber plazmanın esterolitik aktivitesini lipolitik aktiviteden ayrı olarak düşünmek gerekir. Lipolitik aktivite tayini hayvanlar üzerinde yapılır. Bunun için tavşan veya fareler kullanılır. Heparin enjeksiyonundan sonra sitrat tamponu içeren bir t be alınan kan santrifüje edilir, plazma ayrılır. Plazma  zerine fosfat tamponu ve %1 konsantrasyonunda substrat (bir yağ emülsiyonu) ilave edilir.ve hemen numune alınarak 1 saat 37^oC de enkubasyona bırakılır. Tekrar numune alınır. Bu, önce ve sonra alınan numunelerde serbest yağ asitleri miktarı tayin edilir. Bu serbest yağ asitlerinin miktarı, titrimetrik yöntemlerle (105, 106), optik dansiteye dayanan yöntemlerle (107) ve kolorimetrik yöntemlerle (108-111) tayin edilebilir.

1.1.5. STABİLİTESİ

Heparin stabilitesine ait literatürlerde değişik kayıtlar vardır. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

Heparin asit ve alkaliden etkilenir. Asit ortamda parçalanması alkali ortama nazaran daha s ratlıdır (112) Heparin asit  zeltide 5^oC de 18 ayda antikoagülan aktivitesinin %50'sini kaybeder (4) Asit ortamda çok labil olan antikoagülan aktivitesine nazaran lipolitik aktivitesi daha az labildir. %40 asetik asit içerisinde 37^oC de 24 saatte antikoagülan aktivitesinin tamamını kaybeder. Buna karşılık lipolitik aktivitesinde bir değişiklik olmaz.(113)

Heparin sıcakta dilüe asit özeltisi içinde aktivitesini kaybe-

der (15,17,71). %2 lik baryum asit tuzu çözeltisi, %11 asetik asit içinde 68⁰C de 48 saatte aktivitesini tamamen kaybeder (71). Fakat inaktif maddenin, optik çevirmesi değişmez. Karakteristik olarak bu grup maddelerin toluidin mavisi ile verdiği rengi verir (50), sulu çözeltiden aşırı asetik asit ve etanol ile çöker. Bunlar, molekülde bir değişme olmadığını gösterir. İnaktivasyonla amino grubu serbest hale geçer ve sülfat grubu az miktar azalır (S % 12.9 → 11.8). Ayrıca inaktivasyonla heparindeki sülfamik köprüsünde bir değişme tesbit edilememiştir.

Heparin dilüe nitrit asidi ile pH 4 te inaktive olur (16).

Değişik bekletme temperaturünde mekanik olarak çalkalanan heparinin stabilitesi incelenmiştir. 20⁰-40⁰C de haftada üç defa sekizer saat çalkalama makinasında çalkalanan heparinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik bir değişme tesbit edilememiştir(114).

Heparin çözeltisi 20⁰-100⁰C de 15-60 dakika ısıtma veya 4⁰-40⁰C de 40 ay bekletme esnasında pek az kayba uğrar. Isıtmada kayıp %2, 20⁰C de 14 ay bekletmede %5, 4⁰C de bekletmede ise %2 dir (115). Diğer taraftan aktivite kaybının kükürt miktarındaki değişikliğe bağlı olduğu kesin olarak belirtilememiştir.

Heparinin Flavo Bacterium Heparinum etkisi ile parçalanmasından yapısının tayininde istifade edilmiştir (116).

Heparin preparatı sodyum heparinin %0.15 klorkrezol içeren pH 7-8 deki sudaki çözeltisi, saklama temperaturü 4⁰C, 18⁰C, 37⁰C de 3-15 yıl bekletilerek ayrıca 100⁰C de su banyosunda ve 115⁰C otoklavda ısıtılarak denenmiştir. 4⁰C de potens kaybı 2 şişeden birinde %10.7 diğerinde %3.8 olduğu tesbit edilmiştir. Buna mukabil diğer iki şişeden birinde %7.4 diğerinde %3.1 kadar artış görülmüştür. Oda temperaturün-

de (18⁰C) bekletilenlerden 4 tanesinde az bir aktivite artışı, 2 tanesinde ise biraz azalışı, 37⁰C de bekletilenlerde ise 1 tanesinde tesir kaybı, 1 tanesinde ise artışı görülmüştür. Böylece denenen 29 preparattan 12 tanesinde belirli derecede değişiklik tesbit edilmiştir. Bunun 7 tanesinde aktivite artışı 5 tanesinde ise azalması ifade edilmiştir(117).

Heparinin yukarıda belirtilen asit ve alkaliler dışındaki farmasötik preparatların pH çerçevesinde de (pH 5.5-8.5) belirli bir değişmeye uğramadığı belirtilmiştir. pH 5'in altında veya 8.5'un üstünde ise aktivite kaybı belirlenmiştir. Buna göre heparinin 4⁰C de 15 sene dayanıklı olduğu bildirilmiştir, oda derecesinde 7 yıl, 37⁰C de 6-8 yıl dayanıklı olabileceği de belirtilmiştir(117).

Heparin-dekstroz karışımı (pH 3.5-6) otoklavda sterilize edilirse aktivite kaybının %50 olduğu tesbit edilmiştir(117). Buna göre dekstroz çözeltisi heparinle hazırlanacak olursa enjeksiyon için kullanılmadan önce steril çözeltilerin karıştırılması ile hazırlanması tavsiye edilmektedir. Heparinin stabl çözeltisi için ortama %0.15 klorkrezol, % 0.15 sodyum piro-sülfid ilavesi tavsiye edilmiştir. Burada 1 sene bekletmede aktivite kaybının %7, azot akımında çalışıldığı takdirde % 3, üç senede ise %4 olduğu tesbit edilmiştir(118)

Heparin çözeltilerinin renklenmesini sodyum hidrosülfid, sodyum metasülfid, sodyum bisülfid, sodyum sülfid önler. Bunların ilavesi ise aktivite üzerine bir etki yapmaz. Bu maddeler %0.05-0.1 konsantrasyonunda kullanılabilir (119). Renksiz heparin çözeltisi için oksidatif beyazlatma tavsiye edilmiştir. Bunun için hidrojen peroksit, alkali hipokloritler, ozon kullanılması ve bunun 0⁰-5⁰C de pH 4-6 arasında yapılması halinde aktivite kaybının yok denecek kadar az olduğu bildirilmiştir. Burada hidrojen peroksit ve sodyum hipobromid için pH'nın 6-8 ozon için ise pH'nın 7.5 olması tavsiye edilmiştir.(120).

2. DENEYSEL KISIM

2.A. KULLANILAN MADDELER

Heparin	Sigma grade I (178 IU/mg)
Heparin	Roth (155 IU/mg)
Heparin	Sigma grade II (167 IU/mg)
Heparin	Novo lente (25.000 IU/ml)
Liquemine	Roche (25.000 IU/5 ml)
Azur A	Gurr
Azur I	Gurr
Azur II	Sigma
Metilen mavisi	Merck
Barbiton	Merck
Kalsiyum klorür	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sheep plasma for heparin analyse	Kraeber Co.
Sephadex G 15	Pharmacia
Sephadex G 50 Super fine	Pharmacia
Heptest	Haemachem, Inc.

2.B. KULLANILAN ALETLER

Spektrofotometre (IR)	Shimadzu IR 435
Spektrofotometre (UV)	Shimadzu UV 240 Graphicord
Spektrofotometre kaydedicisi	Shimadzu Graphic Printer Rp-1
Liyofilizatör	Leybold Heraeus LYOVAC GT 2
Termostatlı karıştırıcı	Euromex, Ex-003
pH metre	Consört P 114

Kronometre	Europa
Enjektör 0.025, 0.100, 0.250 µl	Hamilton
Kromatografi kolonu	(40 x 2.5 cm) (70 x 2.5 cm)

2.1. FRAKSİYONLANDIRMA DENEYLERİ

2.1.1. HEPARİN SİGMA (GRADE I) ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

2.1.1.1. SEPHADEX G 15 İLE FRAKSİYONLANDIRMA

Uzunluğu 40 x 2.5 cm olan kolona 55 g Sephadex G 15 distile su ile şişirildikten sonra dolduruldu. Böylece 30 cm yüksekliğinde Sephadex G 15 sütunu elde edildi. Dekstran Blue 2000 ile V_0 hacmi tayin edildi ve 60 ml bulundu.

50 mg Heparin Sigma grade I 5 ml distile suda çözündürülüp kolona tatbik edildi. Distile su ile hızı 40 ml/saat olacak şekilde elüe edildi. Elüatlar 5'er ml olacak şekilde ayrı tüplere toplandı. UV spektrofotometresinde 200 nm (λ max. heparin) de absorbanları okundu ve elde edilen absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği hazırlandı.

2.1.1.2. SEPHADEX G 50 (SUPER FINE) İLE FRAKSİYONLANDIRMA

70 x 2.5 cm uzunluğundaki kolona 36 g Sephadex G 50 super fine distile suda şişirilerek dolduruldu ve 59 cm yüksekliğinde Sephadex G 50 süper fine sütunu hazırlandı. Dekstran Blue 2000 ile V_0 tayin edildi ve 110 ml bulundu.

100 mg heparin Sigma grade I, 2 ml suda çözündürülerek kolona tatbik edildi. Distile su ile 40 ml/saat olacak şekilde elüe edilerek 5'er ml lik elüatlar toplandı. Elüatların absorbanları UV spektrofotometresinde 200 nm de okundu ve bu değerlerin elüat miktarlarına karşı

grafiği hazırlandı.

Elde edilen fraksiyonlar liyofilize edildi ve daha sonra fraksiyonların ve hareket maddesi heparin Sigma grade I'in 300-190 nm arasında UV spektrumları ve 4000-400 cm^{-1} arasında da IR spektrumları alındı.

2.1.2. HEPARİN ROTH ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

2.1.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan 59 cm lik Sephadex G 50 süper fine sütununa heparin Roth 2 ml suda çözündürülerek tatbik edildi. Distile su ile hızı 36 ml/saat olacak şekilde elüe edilerek, tüplere 5'er ml elüatlar toplandı. Toplanan elüatların UV spektrofotometresinde heparin Roth'un λ maksimumu olan 198 nm de absorpsanları okundu ve elüat miktarlarına karşı grafiği hazırlandı.

Elde edilen fraksiyonlar liyofilize edildi ve daha sonra fraksiyonların ve hareket meddesi heparin Roth'un 300-190 nm arasında UV spektrumları ve 4000-400 cm^{-1} arasında da IR spektrumları alındı.

Diğer heparinlerle miktarları yeterli olmadığı için fraksiyonlandırma çalışmaları yapılamamıştır.

2.2. METAKROMATİK DENEYLER

2.2.1. KULLANILAN MADDELER

Metakromazi deneyleri, Azur A, Azur I, Azur II ve metilen mavisi boya ları kullanılarak heparin Sigma grade I (A), heparin Sigma Grade I'in fraksiyonları (A_1, A_2, A_3), heparin Roth (B), heparin Roth'un fraksiyonları (B_1, B_2, B_3), heparin Sigma grade II (C), Lique mine Roche (D), ve heparin Novo lente (E) üzerinde yapılmıştır.

Heparin ve fraksiyonlarının çözeltisi : 50 U/ml olarak hazırlandı. (Heparin Sigma grade I ve fraksiyonları için bu miktar 0.28 mg/ml, heparin Roth ve fraksiyonları için ise 0.322 mg/ml tartılarak hazırlandı)

Boya çözeltisi : Azur A, Azur II ve metilen mavisinin 25 mg/100 ml ve Azur I'in 100 mg/100 ml stok çözeltileri kullanılacakları zaman taze olarak hazırlandı.

Tampon çözeltisi : 100 ml barbiton tampon çözeltisi (pH 8.61) taze olarak hazırlandı. Barbiton tampon çözeltisini hazırlamak için 1.105 g barbiton tartıldı, üzerine 10 ml 0.5 M sodyum hidroksit 10 ml distile su ilave edildi, çözündürüldükten sonra distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

2.2.2. YÖNTEM

Deney tüplerine heparin stok çözeltilerinden 0.30 U, 0.40 U, 0.50 U, 0.60 U, 0.70 U'e tekabül eden 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12 µl, 14 µl çözeltiler Hamilton enjektörlerle konuldu. Yine Hamilton enjektörlerle bu miktarlar distile su ile 100 µl'ye tamamlandı. Daha sonra bütün tüplere 1 ml distile su ilave edildi ve Hamilton enjektörlerle 50 µl barbiton tampon çözeltisi ve 50 µl boya çözeltisi konularak total çözelti 1.2 ml olacak şekilde hazırlandı.

Bu arada boyaların ve boya-heparin karışımlarının UV spektrofotometresinde λ maksimumları ölçüldü. Hazırlanan 1.2 ml'lik çözeltilerin UV spektrofotometresinde kullanılan boya çözeltisinin λ maksimumuna göre absorbanları okundu.

Bu metakromazi deneyleri 5 değişik heparin ve elde edilen 6 fraksiyon ile 4 farklı boya kullanılarak yukarıda belirtilen 5 konsantrasyonda yapıldı. Her bir işlem 13 kez tekrarlandı.

2.3. REKALSİFİKASYON DENEYLERİ

2.3.1. KULLANILAN MADDELER

Rekalsifikasyon deneyleri 5 adet heparin çözeltisi (A, B, C, D, E) ile yapılmıştır. Deneylerde koyun plazması (Kraeber Co.), serum fizyolojik ve M/40 kalsiyum klorür çözeltileri kullanılmıştır.

2.3.2. YÖNTEM

Deney, içinde termostatlı ısıtıcı ve karıştırıcı bulunan su banyosunda 37°C de yapıldı. Deney tüplerine, 10 U/ml olacak şekilde hazırlanmış heparin stok çözeltilerinden 0.15 U, 0.20 U, 0.25 U, 0.30 U ve 0.35 U'ye tekabül eden 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl ve 35 µl çözeltilen konuldu. Üzerine 0.18 ml plazma ilave edildikten sonra serum fizyolojik ile 1 ml'ye tamamlandı. Sonra bu çözeltiler üzerine 0.2 ml M/40 kalsiyum klorür çözeltisi ilave edildi ve hemen kronometre ile saniye ölçüldü. Her 30 saniyede bir, ucu kıvrık bakır bir tel çözeltiye batırılıp pıhtılaşmanın oluşumu gözlemlendi ve ilk pıhtı teşekkülünde kronometre durdurularak pıhtılaşma zamanı ölçüldü.

2.4. ANTI X_a DENEYLERİ

2.4.1. KULLANILAN MADDELER

Anti X_a deneyleri heparin Sigma grade I (A) ve üç fraksiyonu (A_1 , A_2 , A_3), heparin Roth (B) ve üç fraksiyonu (B_1 , B_2 , B_3) üzerinde yapıldı. Deneylerde (A) 12.5 mg/ml, (A_1) 1.25 mg/ml, (A_2) 1.875 mg/ml, (A_3) 8.125 mg/ml, (B) 12.5 mg/ml, (B_1) 1 mg/ml, (B_2) 2.25 mg/ml, (B_3) 7.75 mg/ml stok çözeltileri kullanıldı.

2.4.2. YÖNTEM

Heparin Sigma grade I ve heparin Roth'un distile su ile 1000 U/ml olacak şekilde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden dilüsyonla normal insan plazmasındaki 0.015 U/ml, 0.031 U/ml, 0.062 U/ml 0.125 U/ml, 0.250 U/ml, 0.500 U/ml ve 1 U/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinden 0.1 ml alınıp 37°C de su banyosundaki test tüplerine konuldu. Her birine 0.1 ml faktör X_a ilave edilip anında kronometreye basıldı ve 120 saniye sonra 0.1 ml recalmix ilave edildi ve ikinci kronometreye basılarak pıhtılaşma zamanı tayin edildi. Elde edilen değerlerden standart eğri çizildi. Bu eğriden faydalanılarak aynı şekilde fraksiyonların pıhtılaşma zamanından anti X_a aktiviteleri tayin edildi. Bunun için Fraksiyon 1 stok çözeltisinden önce 0.1 ml alınıp serum fizyolojik ile 1 ml ye tamamlandı, sonra bundan 0.02 ml alınarak plazma ile 1 ml ye tamamlandı ve teste tabi tutuldu. Aynı işlemler Fraksiyon 2 ve Fraksiyon 3'ler içinde yapıldı. Pıhtılaşma zamanları tayin edilerek üniteye geçildi. Her deney üçer kere tekrar edildi.

2.5. METAKROMATİK VE BİYOLOJİK YÖNTEMLER ARASINDAKİ KORRELASYON

Metakromatik ve biyolojik yöntemlerle yapılan deneylerde elde edilen sonuçlara göre çizilen eğrilerin denklemleri bulundu ve ünite eşitliğinden giderek korrelasyonu sağlandı.

Bu korrelasyon denklemleri, metakromatik aktivite ile rekalsifikasyon zamanı, metakromatik aktivite ile anti X_a zamanı ve anti X_a zamanı ile rekalsifikasyon zamanı arasında verildi.

3. BULGULAR

Bu bölümde, fraksiyonlandırma, metakromazi, rekalsifikasyon ve anti X_a deneylerinin bulguları verilmiştir.

3.1. FRAKSİYONLANDIRMA DENEYLERİNİN BULGULARI

3.1.1. HEPARİN SİGMA (GRADE I) ÜZERİNDEKİ BULGULAR

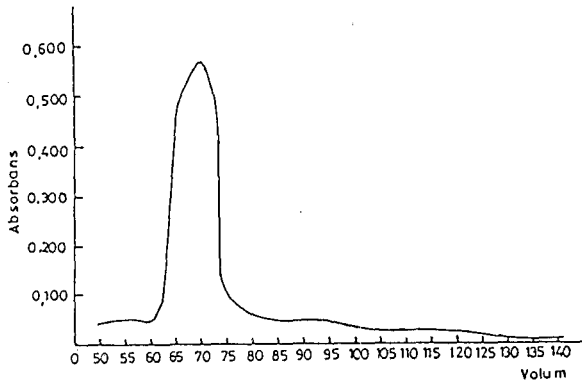
3.1.1.1. SEPHADEX G 15 İLE FRAKSİYONLANDIRMA

Sephadex G 15 sütununda yapılan fraksiyonlandırmada elde edilen elüatların 200 nm'deki absorbanları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Heparin Sigma (Grade I) 'in Sephadex G 15 teki elüatlarının absorbanları

V. ml	Abs.	V. ml	Abs.	V. ml	Abs.	V. ml	Abs.
50	0.058	75	0.104	100	0.025	125	0.010
55	0.060	80	0.055	105	0.020	130	0.007
60	0.055	85	0.042	110	0.020	135	0.010
65	0.450	90	0.036	115	0.018	140	0.007
70	0.570	95	0.029	120	0.012	145	0.003

Elde edilen absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Heparin Sigma grade I'in Sephadex G 15 ile yapılan fraksiyonlandırma eğrisi

Grafikte görüldüğü üzere heparin fraksiyonlanmadan kolondan geçmiştir.

3.1.1.2. SEPHADEX G 50 SUPER FINE İLE FRAKSİYONLANDIRMA

Sephadex G 50 super fine sütununda yapılan fraksiyonlandırmada elde edilen elüatların 200 nm deki absorbanları Tablo 2'de verilmiştir.

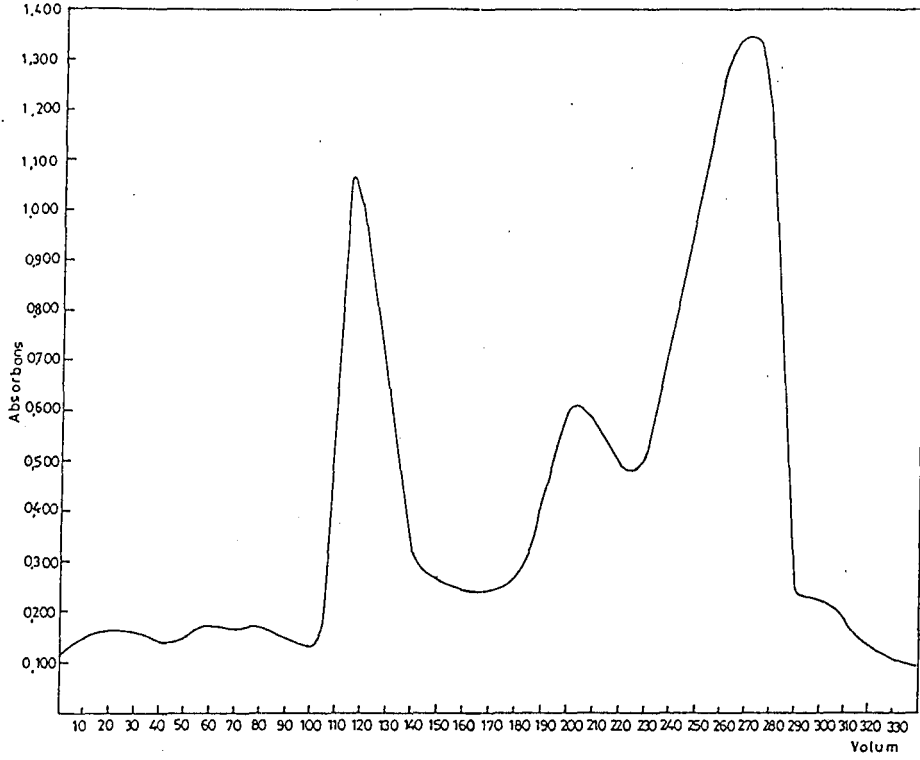
Tablo 2. Heparin Sigma (Grade 1)'in Sephadex G 50 super fine kolondaki elüatlarının absorbanları

V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.
5	0.121	70	0.165	135	0.283	200	0.601	265	1.288
10	0.150	75	0.189	140	0.301	205	0.643	270	1.319
15	0.106	80	0.174	145	0.275	210	0.598	275	1.401
20	0.159	85	0.171	150	0.267	215	0.540	280	1.078
25	0.146	90	0.145	155	0.280	220	0.486	285	0.975
30	0.159	95	0.134	160	0.242	225	0.470	290	0.225
35	0.121	100	0.137	165	0.242	230	0.501	295	0.243
40	0.140	105	0.234	170	0.248	235	0.606	300	0.233
45	0.151	110	0.723	175	0.256	240	0.697	305	0.195
50	0.155	115	1.124	180	0.257	245	0.806	310	0.185
55	0.144	120	0.940	185	0.294	250	0.993	315	0.150
60	0.181	125	0.471	190	0.414	255	1.176	320	0.140
65	0.154	130	0.322	195	0.538	260	1.257	325	0.132

Bu absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 2'de gösterilmiştir.

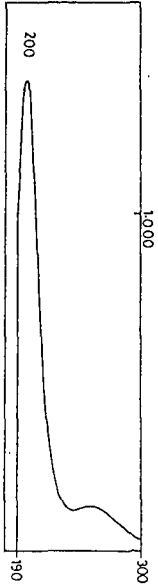
Grafikten görüleceği üzere 100-160 ml, 170-220 ml ve 230-290 ml'ler arasında olmak üzere üç fraksiyon elde edilmiştir.

Sütuna tatbik edilen heparin miktarına göre Fraksiyon 1 %10, Fraksiyon 2 %15, Fraksiyon 3 ise %65 oranında elde edilmiştir.

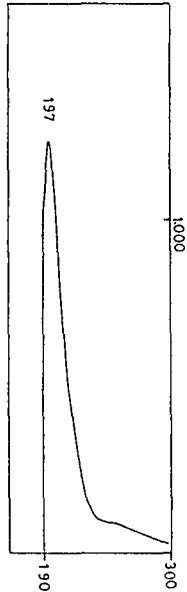


Şekil 2. Heparin Sigma grade I'in Sephadex G 50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi

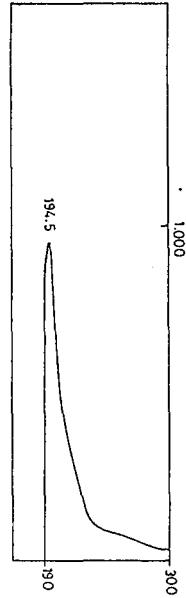
Heparin Sigma grade I ve elde edilen 3 fraksiyonunun 2.1.1.2. de belirtilen UV spektrumları sırası ile Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir.



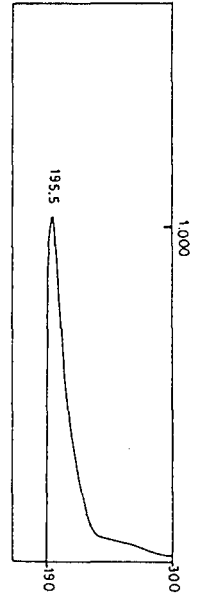
Şekil 3. Heparin Sigma grade I UV spektrumu



Şekil 4. Heparin Sigma grade I Fr. I UV spektrumu

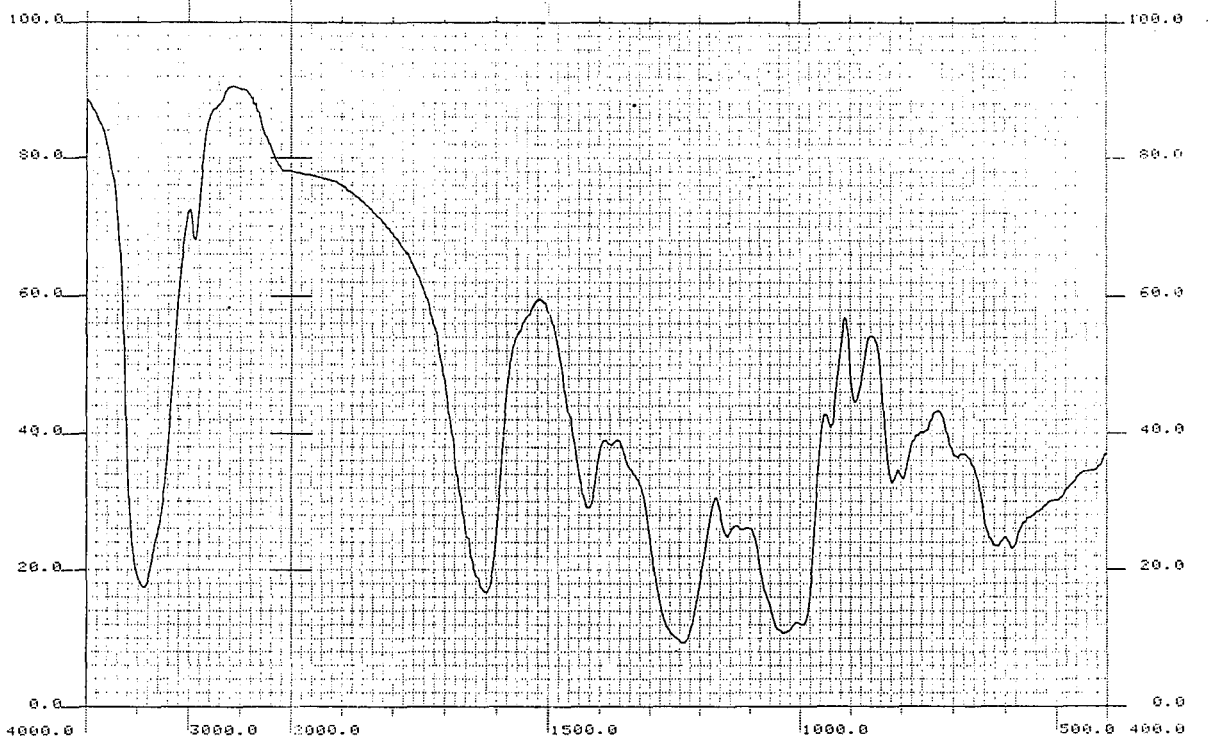


Şekil 5. Heparin Sigma grade I Fr. 2 UV spektrumu

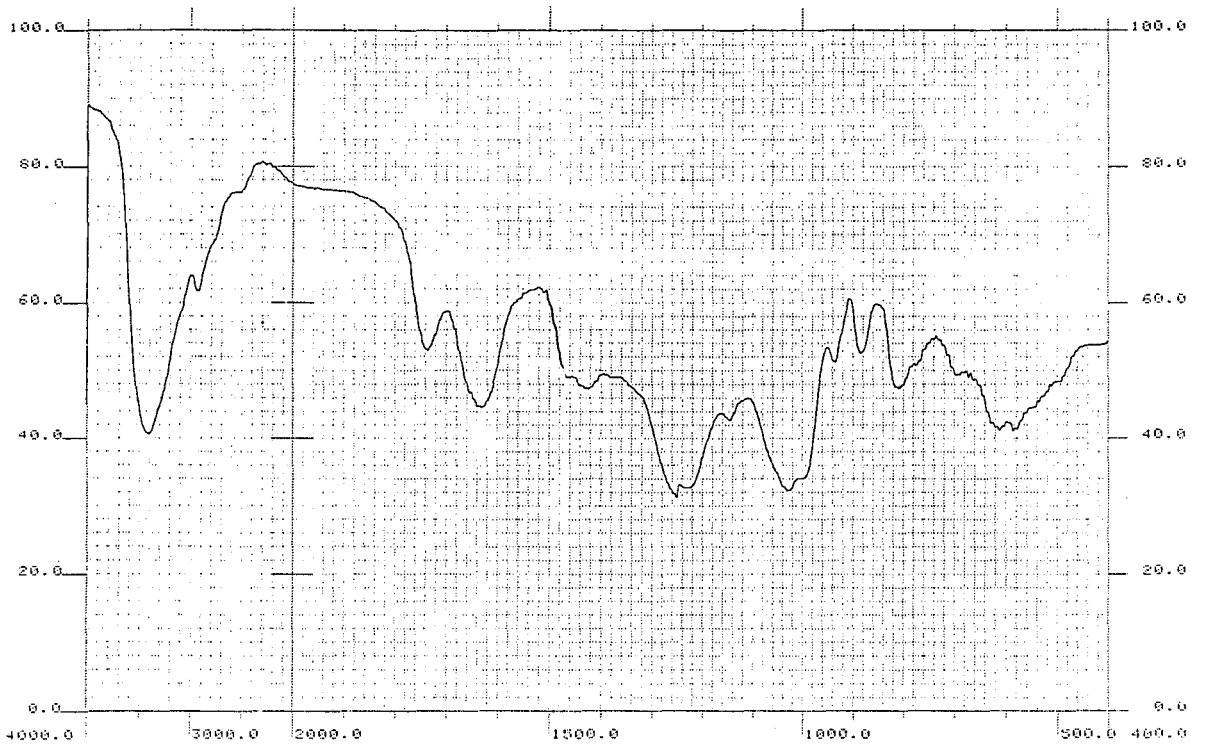


Şekil 6. Heparin Sigma grade I Fr. 3 UV spektrumu

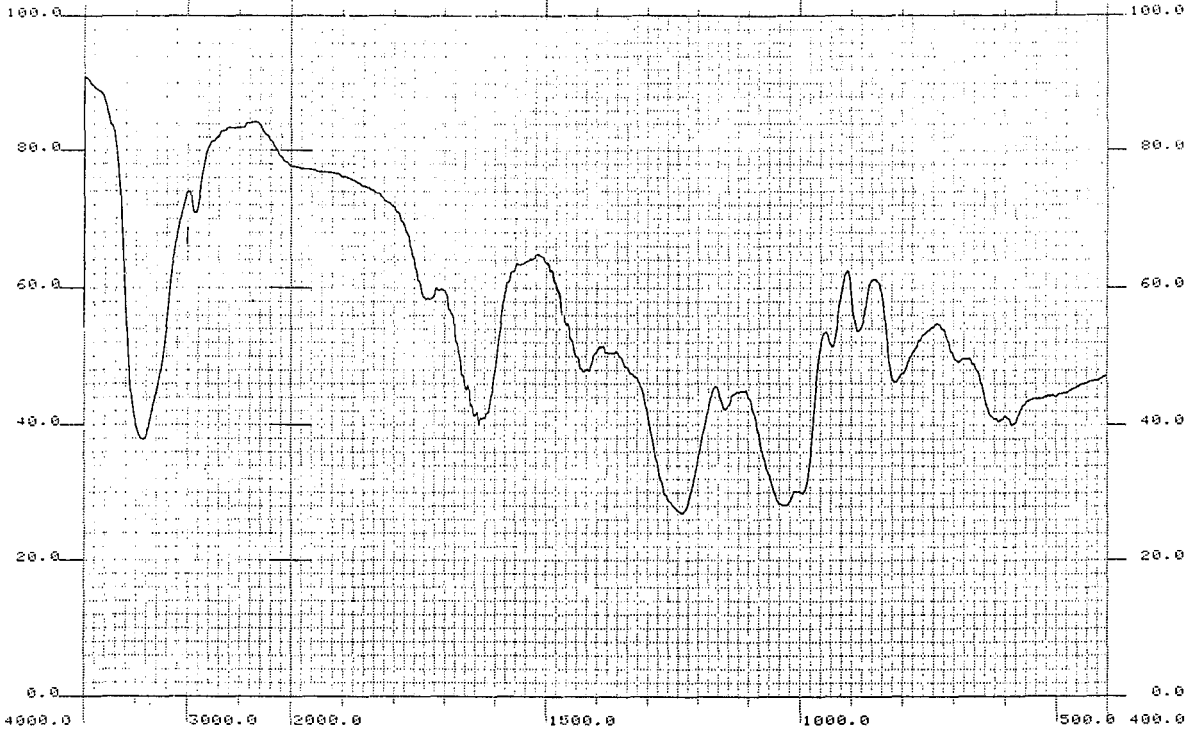
Heparin Sigma grade I ve elde edilen 3 fraksiyonunun 2.1.1.2. de belirtilen IR spektrumları sırasıyla Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10'da verilmiştir.



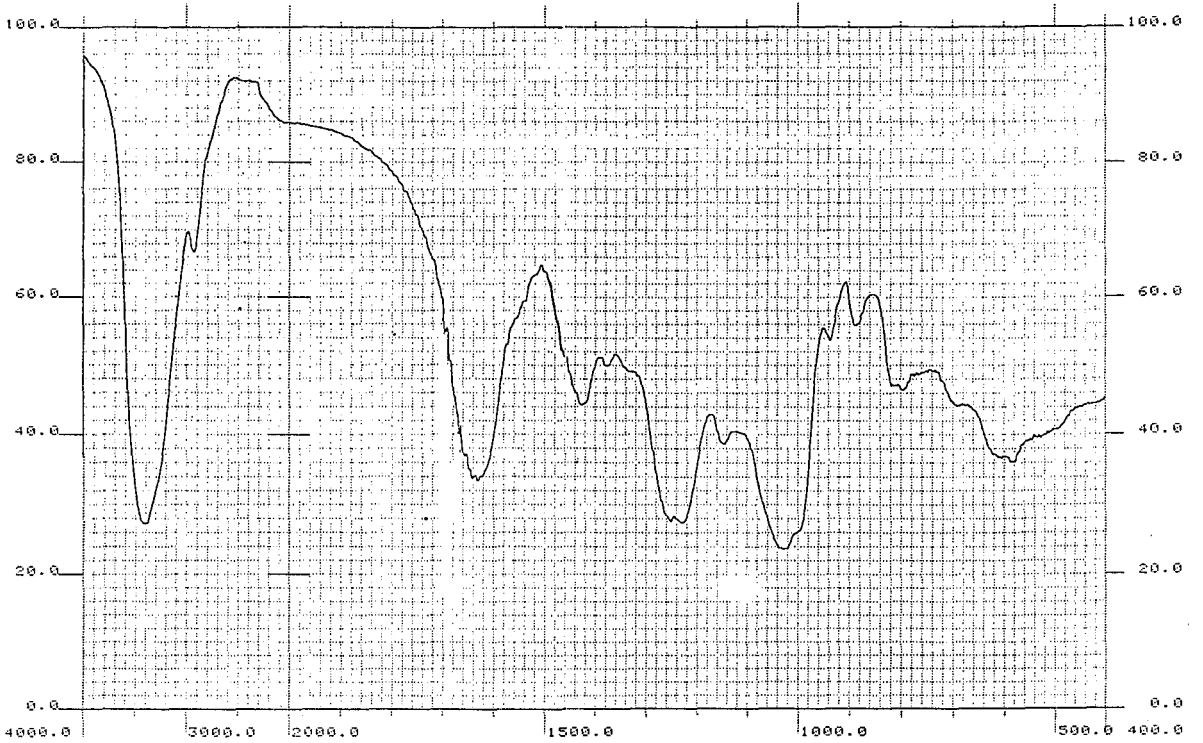
Şekil 7. Heparin Sigma grade I'in IR spektrumu



Şekil 8. Heparin Sigma grade I fraksiyon 1'in IR spektrumu



Şekil 9. Heparin Sigma grade I fraksiyon 2'nin IR spektrumu



Şekil 10. Heparin Sigma grade I fraksiyon 3'ün IR spektrumu

3.1.2. HEPARİN RQTH ÜZERİNDEKİ BULGULAR

Heparin Roth'un Sephadex G 50 super fine sütunu ile fraksiyonlandırılmasında elde edilen elüatların 198 nm deki absorbanları Tablo 3'de verilmiştir.

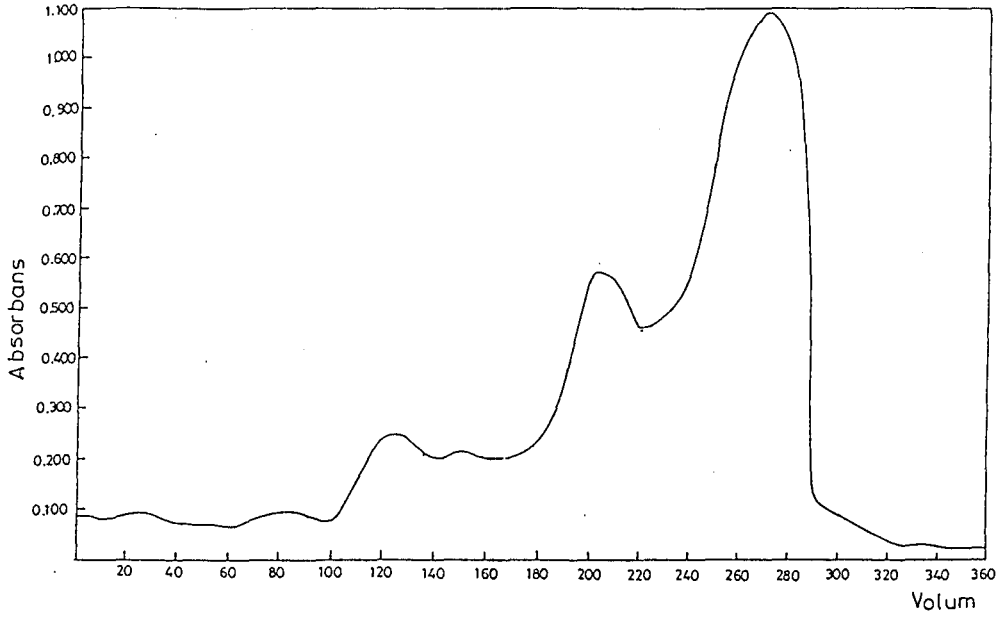
Tablo 3. Heparin Roth'un Sephadex G 50 super fine sütunundaki elüatlarının absorbanları

V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.	V ml	Abs.
5	0.116	85	0.104	165	0.210	245	0.719
10	0.085	90	0.096	170	0.214	250	0.869
15	0.081	95	0.063	175	0.218	255	0.960
20	0.088	100	0.047	180	0.229	260	1.019
25	0.077	105	0.041	185	0.238	265	1.062
30	0.090	110	0.148	190	0.350	270	1.086
35	0.061	115	0.255	195	0.441	275	1.094
40	0.059	120	0.239	200	0.544	280	1.027
45	0.072	125	0.218	205	0.543	285	0.389
50	0.066	130	0.210	210	0.516	290	0.134
55	0.055	135	0.203	215	0.484	295	0.100
60	0.056	140	0.197	220	0.469	300	0.103
65	0.055	145	0.204	225	0.485	305	0.082
70	0.074	150	0.206	230	0.495	310	0.061
75	0.074	155	0.202	235	0.556	315	0.052
80	0.090	160	0.197	240	0.570	320	0.039

Bu absorban değerlerinin elüat miktarlarına karşı grafiği Şekil 11'de gösterilmiştir.

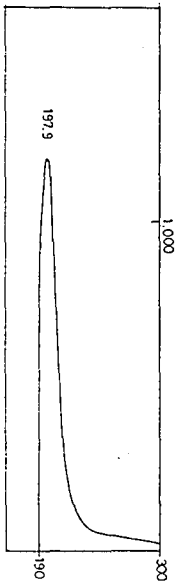
Grafikten görüleceği gibi 100-140 ml, 180-220 ml, 220-320 ml ler arasında olmak üzere üç fraksiyon elde edilmiştir.

Sütuna tatbik edilen heparin miktarına göre Fraksiyon 1 %8 Fraksiyon 2 %18 ve Fraksiyon 3 ise %62 oranında elde edilmiştir.

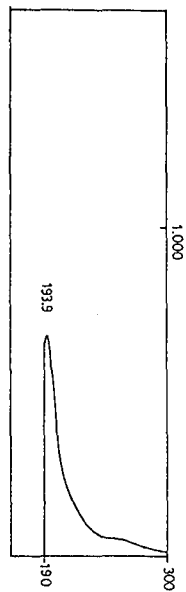


Şekil 11. Heparin Roth'un Sephadex G 50 süper fine sütunundaki fraksiyonlandırma eğrisi

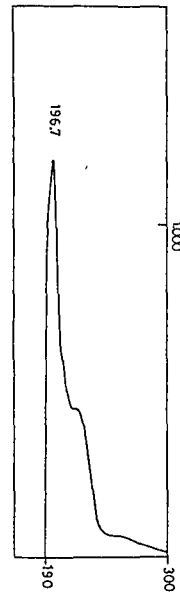
Heparin Roth ye elde edilen 3 fraksiyonunun 2.1.2. de belirtilen UV spektrumları sırası ile Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'de verilmiştir.



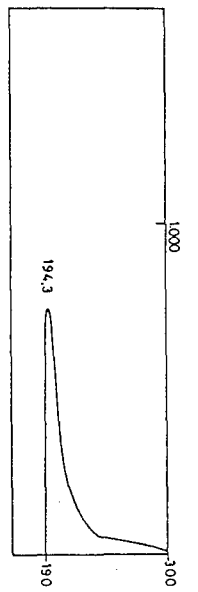
Şekil 12. Heparin Roth UV spektrumu



Şekil 13. Heparin Roth Fr. I UV spektrumu

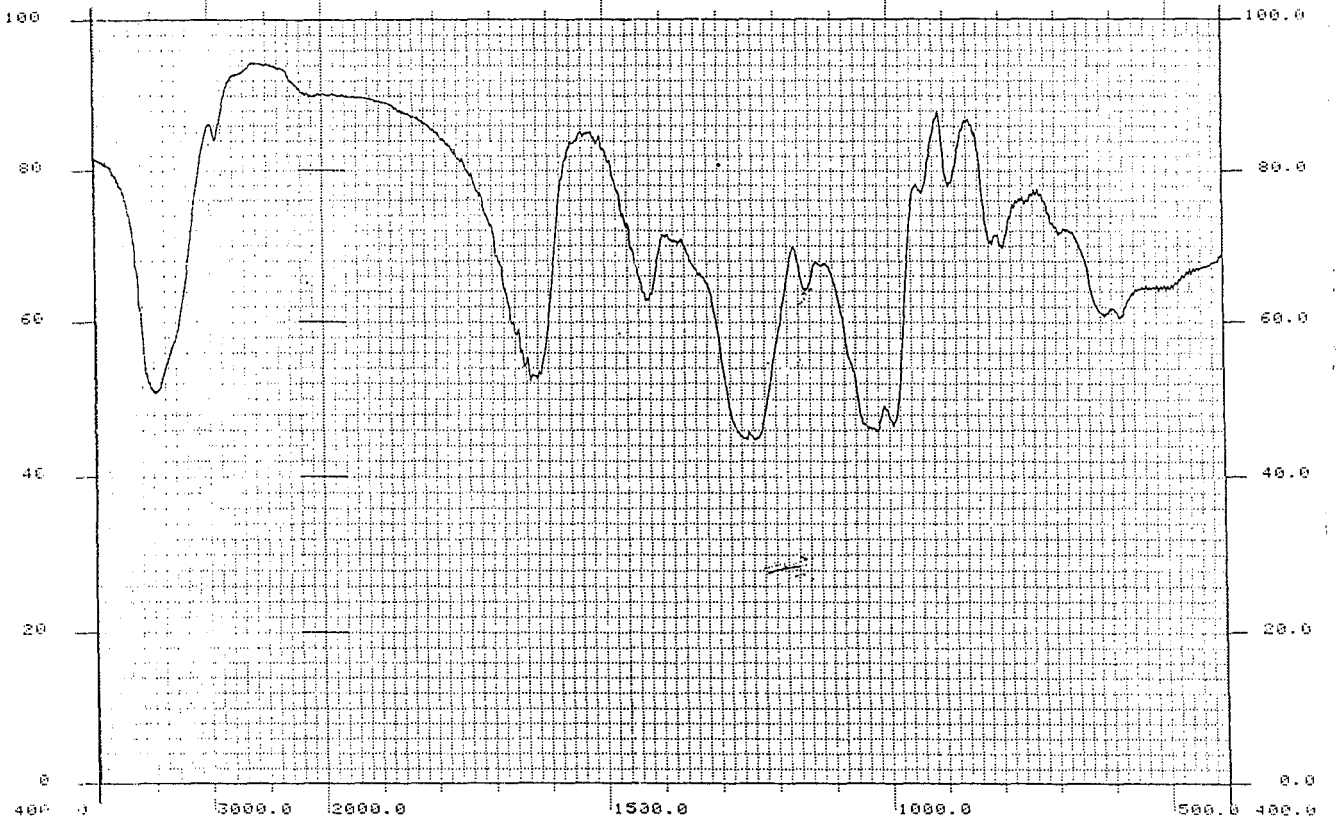


Şekil 14. Heparin Roth Fr. 2 UV spektrumu

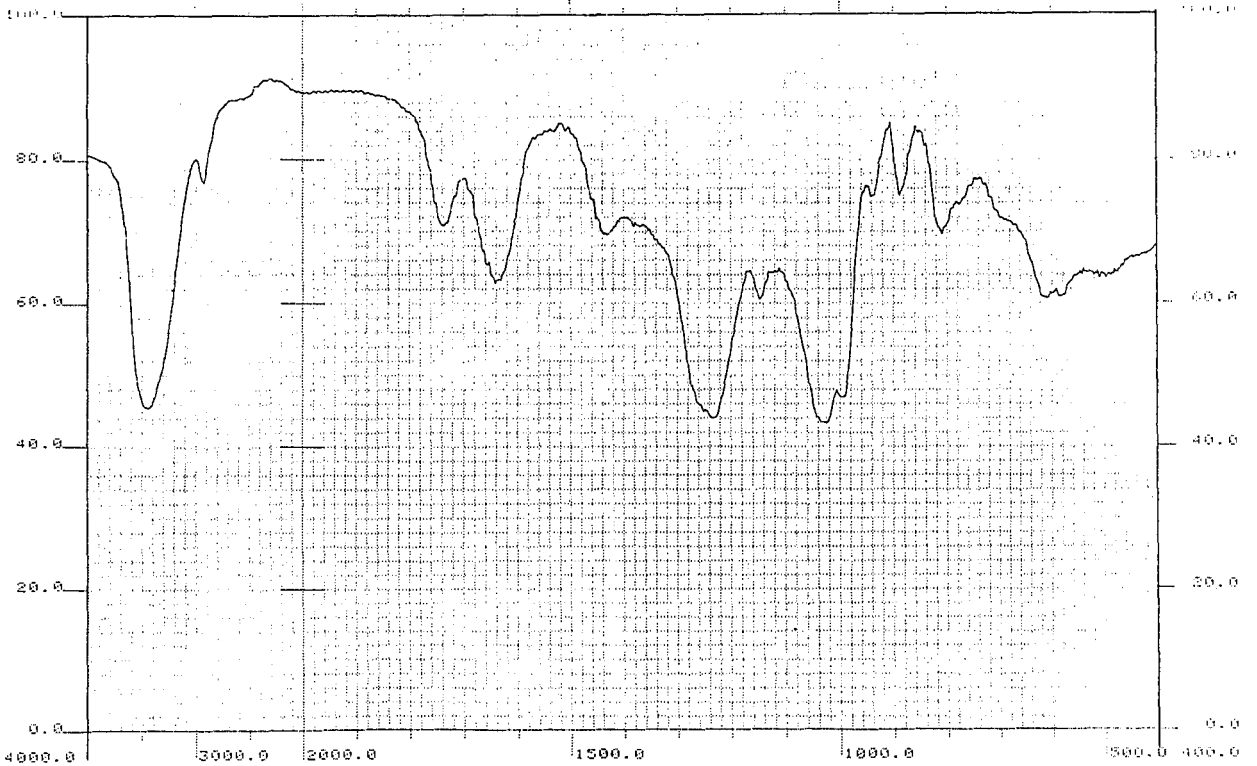


Şekil 15. Heparin Roth Fr. 3 UV spektrumu

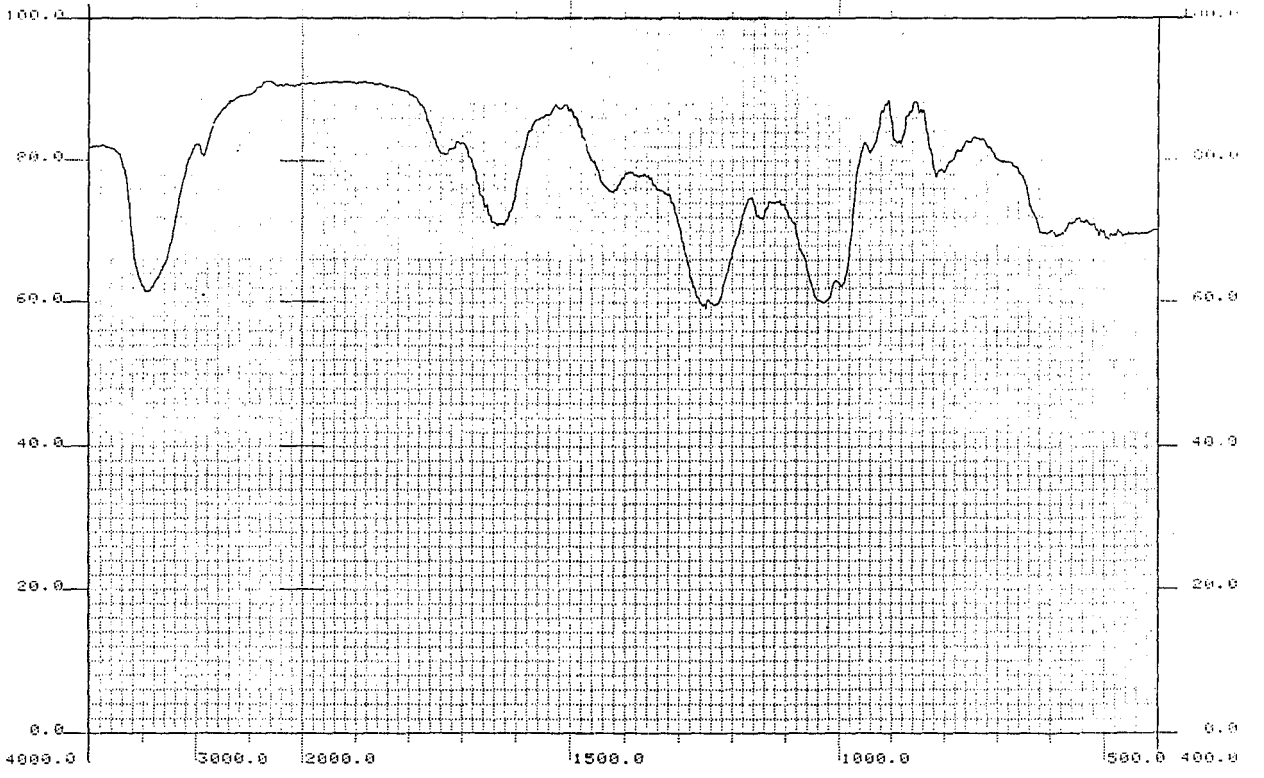
Heparin Roth'ye elde edilen 3 fraksiyonunun 2.1.2.de belirtilen IR spektrumları sırasıyla Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19'da verilmiştir.



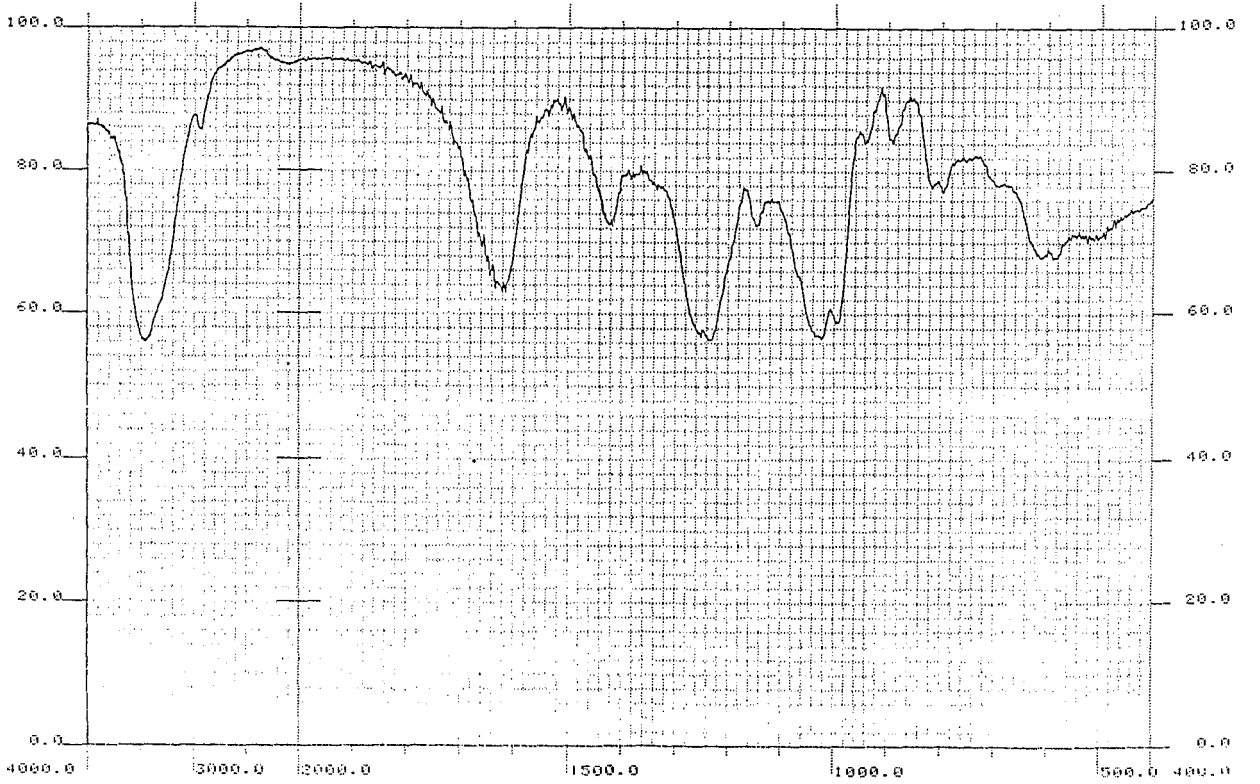
Şekil 16. Heparin Roth'un IR spektrumu



Şekil 17. Heparin Roth fraksiyon 1'in IR spektrumu



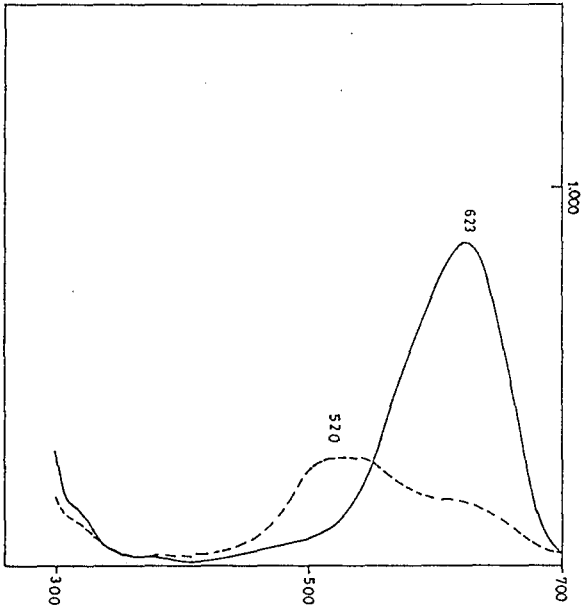
Şekil 18. Heparin Roth fraksiyon 2'nin IR spektrumu



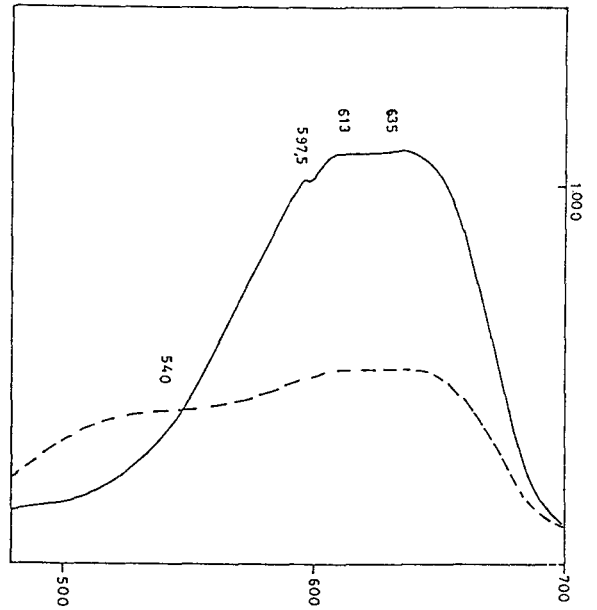
Şekil 19. Heparin Roth fraksiyon 3'ün IR spektrumu

3.2. METAKROMAZİ DENEYLERİNİN BULGULARI

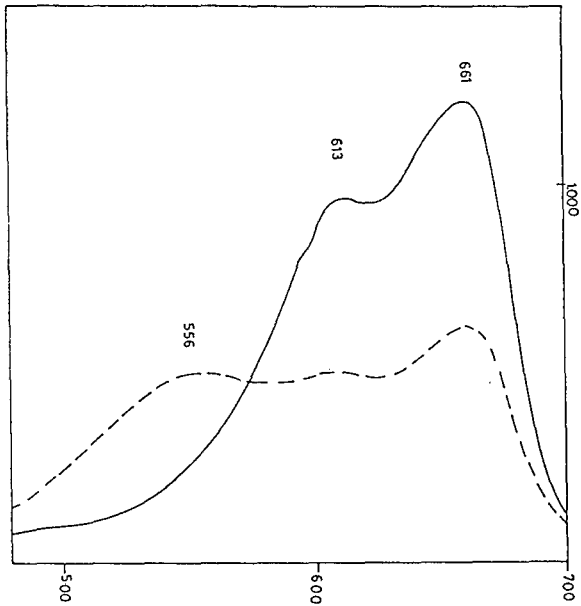
Bölüm 2.2.2. de anlatıldığı üzere kullanılan boyaların ve heparin - boya çözeltilerinin maksimum dalga boylarını gösteren UV spektrumları Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22 ve Şekil 23'te verilmiştir. Boya - heparin çözeltileri kesik çizgi ile gösterilmiştir.



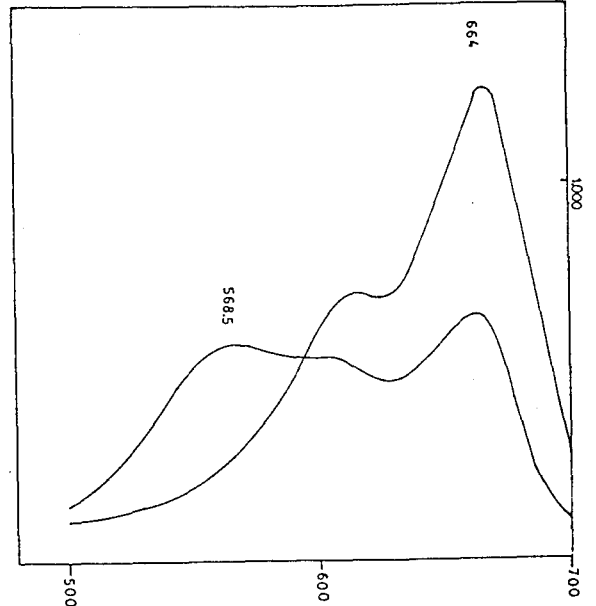
Şekil 20. Azur A ve Azur A - Heparinin UV spektrumu



Şekil 21. Azur I ve Azur I - Heparinin UV spektrumu

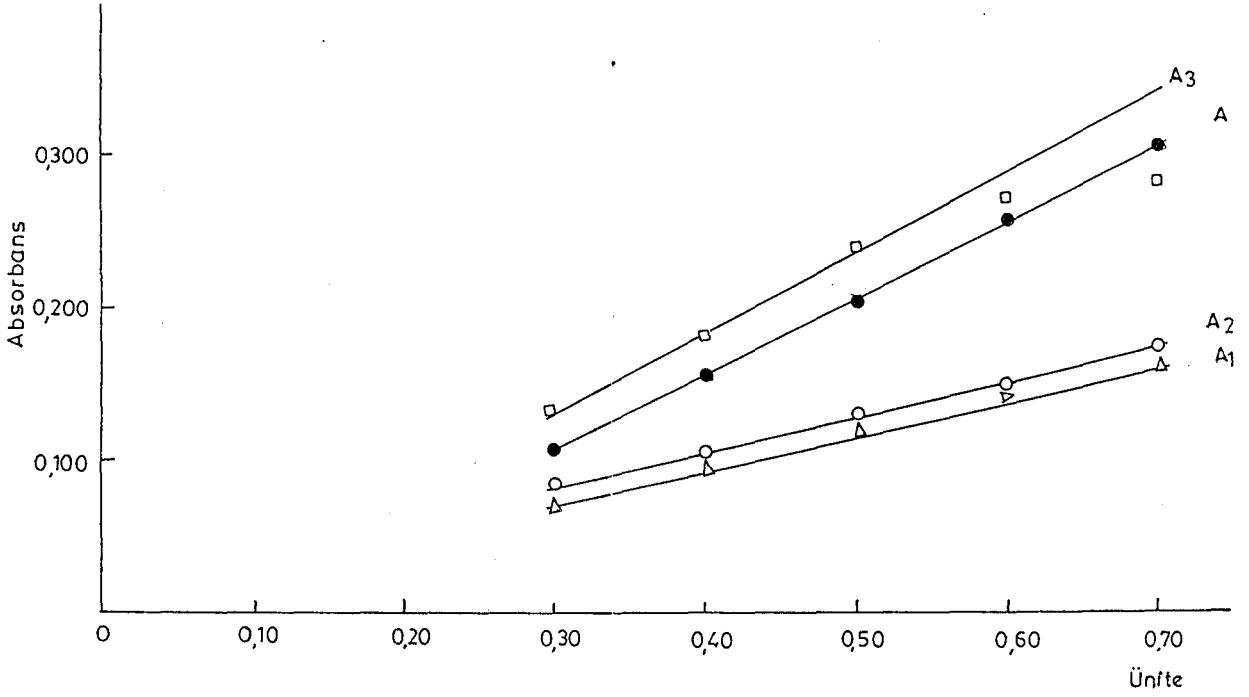


Şekil 22. Azur II ve Azur II - Heparinin UV spektrumu



Şekil 23. Metilen mavisi ve Metilen mavisi - Heparinin UV spektrumu

Tablo 4'te verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği
Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının Azur A ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

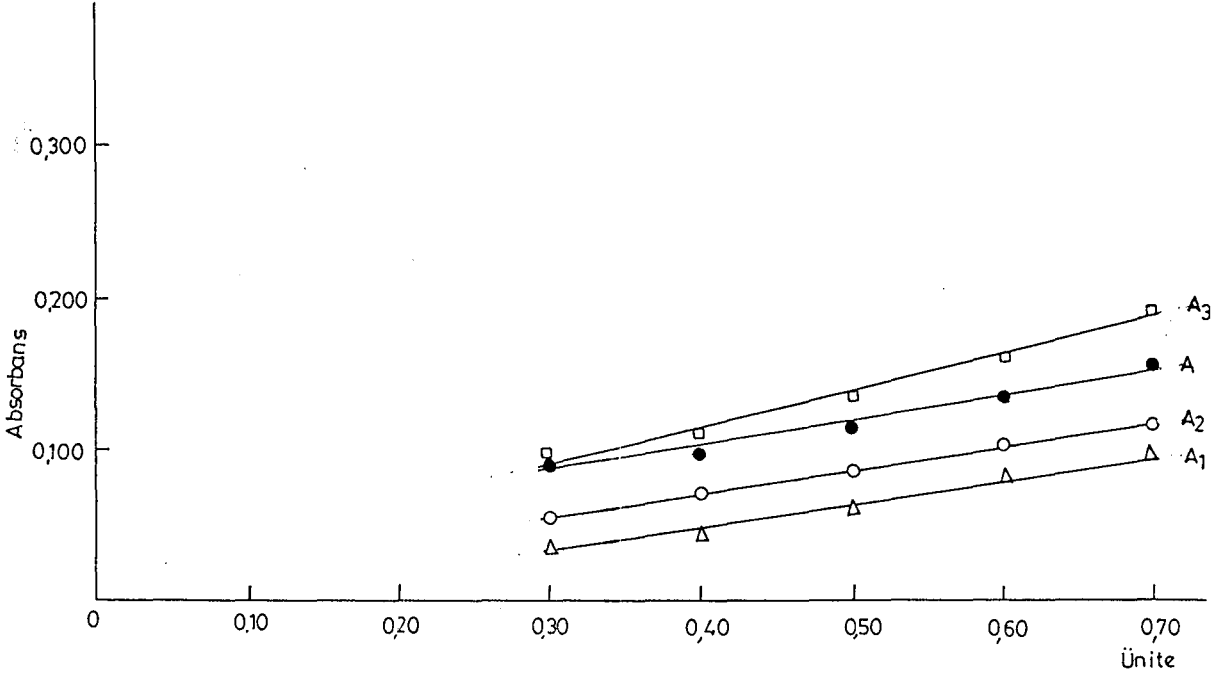
A	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.513 U - 0.0491$
A ₁	$r^2 = 0.9992$	$A = 0.233 U + 0.0001$
A ₂	$r^2 = 0.9995$	$A = 0.229 U + 0.0137$
A ₃	$r^2 = 0.9723$	$A = 0.384 U + 0.0292$

Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinin absorbans değerleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Heparin Sigma grade I ve üç fraksiyonunun Azur I ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃
Absorbans	0.078	0.035	0.055	0.082	0.096	0.047	0.069	0.108	0.115	0.062	0.086	0.132	0.135	0.078	0.101	0.157	0.155	0.094	0.116	0.189
	0.079	0.033	0.053	0.084	0.095	0.045	0.071	0.110	0.113	0.063	0.084	0.133	0.135	0.077	0.100	0.159	0.153	0.092	0.117	0.188
	0.076	0.034	0.055	0.081	0.097	0.044	0.069	0.107	0.115	0.061	0.085	0.133	0.138	0.077	0.100	0.159	0.156	0.093	0.114	0.190
	0.078	0.032	0.054	0.083	0.095	0.045	0.070	0.109	0.117	0.063	0.087	0.131	0.136	0.080	0.099	0.160	0.154	0.093	0.115	0.192
	0.080	0.034	0.054	0.083	0.098	0.046	0.070	0.109	0.116	0.063	0.085	0.134	0.133	0.080	0.102	0.158	0.156	0.093	0.115	0.188
	0.079	0.032	0.056	0.081	0.095	0.043	0.068	0.108	0.114	0.061	0.084	0.132	0.136	0.079	0.101	0.158	0.155	0.091	0.116	0.188
	0.078	0.033	0.053	0.084	0.094	0.044	0.071	0.111	0.115	0.061	0.084	0.134	0.137	0.077	0.100	0.161	0.158	0.094	0.118	0.189
	0.076	0.032	0.054	0.082	0.097	0.046	0.069	0.109	0.117	0.064	0.086	0.131	0.134	0.078	0.102	0.159	0.155	0.092	0.116	0.191
	0.078	0.034	0.053	0.082	0.095	0.046	0.070	0.108	0.113	0.061	0.085	0.133	0.134	0.078	0.100	0.159	0.153	0.094	0.114	0.187
	0.080	0.033	0.054	0.084	0.096	0.045	0.068	0.108	0.115	0.062	0.083	0.132	0.136	0.080	0.103	0.160	0.156	0.093	0.115	0.188
\bar{X}	0.078	0.033	0.054	0.083	0.096	0.045	0.069	0.109	0.115	0.062	0.085	0.132	0.135	0.078	0.101	0.159	0.155	0.093	0.116	0.189
SE \bar{X}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002

Tablo 5'te verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği
Şekil 25'te gösterilmiştir.



Şekil 25. Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

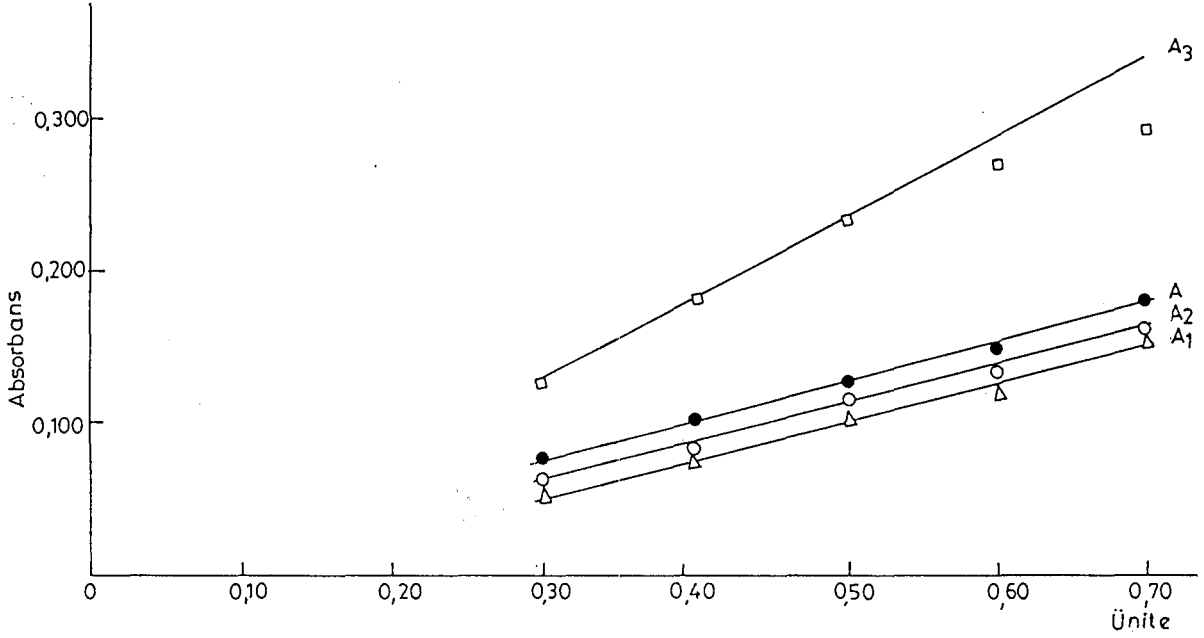
A	$r^2 = 0.9997$	$A = 0.193 U + 0.0193$
A ₁	$r^2 = 0.9987$	$A = 0.153 U - 0.0143$
A ₂	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.1555 U + 0.00735$
A ₃	$r^2 = 0.9990$	$A = 0.262 U + 0.0035$

Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinin absorbans değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Heparin Sigma grade I ve üç fraksiyonunun Azur II ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃
Absorbans	0.075	0.052	0.063	0.125	0.103	0.075	0.082	0.182	0.127	0.103	0.111	0.228	0.150	0.122	0.135	0.269	0.182	0.153	0.163	0.292
	0.076	0.051	0.064	0.126	0.100	0.077	0.082	0.181	0.129	0.105	0.112	0.229	0.151	0.123	0.136	0.268	0.183	0.154	0.161	0.291
	0.077	0.051	0.065	0.123	0.101	0.072	0.083	0.180	0.127	0.100	0.112	0.232	0.151	0.120	0.132	0.269	0.183	0.153	0.162	0.292
	0.079	0.049	0.061	0.124	0.102	0.076	0.084	0.183	0.123	0.100	0.113	0.227	0.152	0.122	0.137	0.268	0.182	0.154	0.162	0.288
	0.078	0.050	0.061	0.127	0.103	0.076	0.081	0.180	0.130	0.101	0.114	0.230	0.151	0.120	0.135	0.266	0.182	0.151	0.161	0.290
	0.075	0.050	0.063	0.125	0.102	0.075	0.085	0.184	0.129	0.102	0.110	0.231	0.150	0.124	0.134	0.270	0.179	0.152	0.160	0.291
	0.076	0.052	0.062	0.123	0.103	0.073	0.083	0.181	0.128	0.100	0.112	0.232	0.151	0.121	0.136	0.269	0.180	0.150	0.163	0.290
	0.074	0.049	0.126	0.103	0.103	0.077	0.081	0.180	0.124	0.104	0.114	0.229	0.152	0.122	0.135	0.267	0.184	0.154	0.160	0.289
	0.076	0.051	0.061	0.123	0.100	0.073	0.084	0.182	0.130	0.102	0.111	0.227	0.150	0.121	0.137	0.270	0.183	0.151	0.162	0.292
	0.075	0.050	0.064	0.127	0.102	0.075	0.082	0.179	0.129	0.101	0.113	0.231	0.151	0.124	0.135	0.268	0.183	0.152	0.161	0.289
\bar{X}	0.076	0.050	0.063	0.125	0.102	0.075	0.083	0.181	0.128	0.102	0.112	0.230	0.151	0.122	0.135	0.268	0.182	0.152	0.161	0.290
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 6'da verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

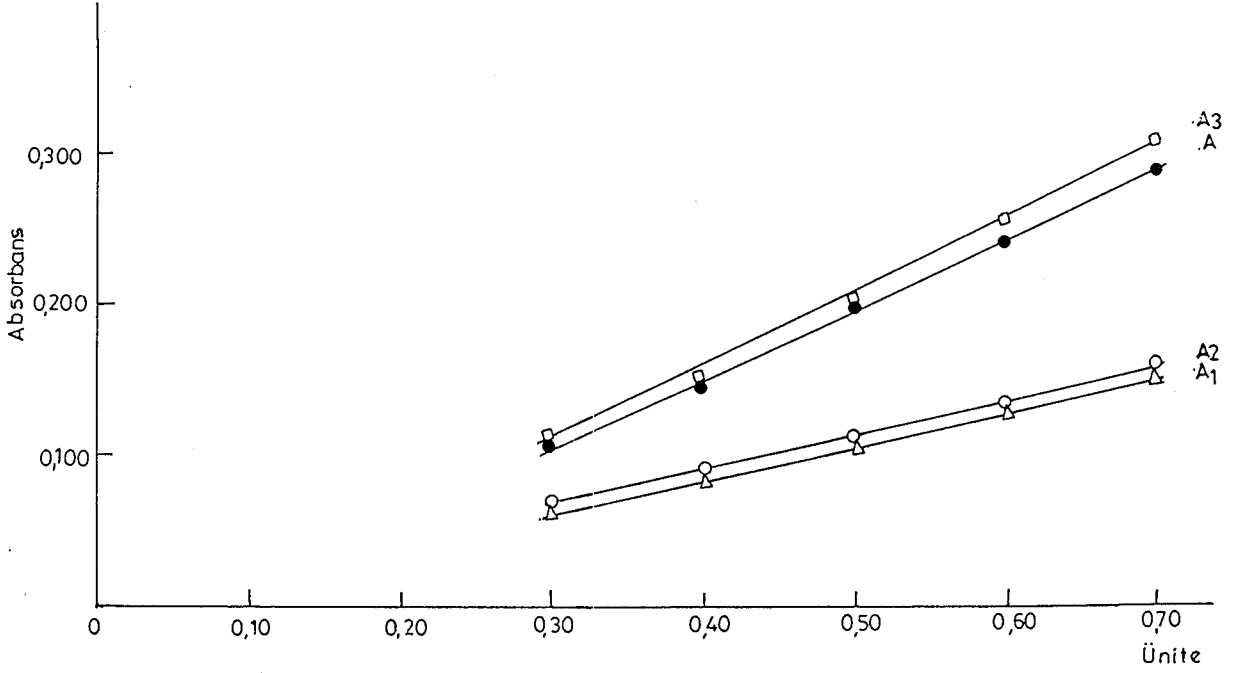
A	$r^2 = 0.9990$	$A = 0.261 U - 0.0027$
A ₁	$r^2 = 0.9986$	$A = 0.251 U - 0.0253$
A ₂	$r^2 = 0.9987$	$A = 0.249 U - 0.0136$
A ₃	$r^2 = 0.9871$	$A = 0.417 U + 0.0103$

Heparin Sigma grade I ve fraksiyonlarının metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinin absorbans değerleri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Heparin Sigma grade I ve üç fraksiyonunun metilen mavisi ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃	A	A ₁	A ₂	A ₃
Absorbans	0.108	0.060	0.068	0.107	0.137	0.082	0.087	0.145	0.197	0.103	0.111	0.198	0.242	0.123	0.134	0.255	0.294	0.151	0.156	0.305
	0.113	0.058	0.066	0.109	0.147	0.077	0.090	0.148	0.203	0.105	0.113	0.203	0.242	0.125	0.132	0.257	0.289	0.148	0.154	0.306
	0.095	0.063	0.064	0.106	0.142	0.079	0.092	0.147	0.206	0.099	0.109	0.205	0.244	0.127	0.135	0.259	0.287	0.153	0.157	0.308
	0.105	0.057	0.067	0.108	0.140	0.078	0.088	0.149	0.215	0.101	0.112	0.201	0.242	0.125	0.136	0.255	0.285	0.155	0.155	0.305
	0.100	0.061	0.066	0.105	0.151	0.082	0.090	0.146	0.198	0.104	0.112	0.203	0.237	0.121	0.132	0.258	0.295	0.149	0.155	0.307
	0.113	0.060	0.068	0.107	0.141	0.083	0.090	0.147	0.197	0.100	0.114	0.202	0.245	0.126	0.133	0.255	0.293	0.152	0.153	0.308
	0.100	0.063	0.065	0.107	0.139	0.080	0.093	0.150	0.206	0.103	0.109	0.200	0.242	0.127	0.133	0.257	0.281	0.148	0.158	0.306
	0.102	0.060	0.067	0.109	0.148	0.081	0.088	0.148	0.186	0.101	0.113	0.203	0.250	0.123	0.136	0.260	0.280	0.150	0.156	0.305
	0.102	0.059	0.064	0.105	0.147	0.078	0.091	0.147	0.193	0.101	0.112	0.201	0.241	0.124	0.131	0.257	0.286	0.151	0.157	0.307
	0.104	0.058	0.067	0.106	0.145	0.079	0.087	0.148	0.192	0.105	0.113	0.202	0.239	0.126	0.133	0.258	0.284	0.149	0.155	0.305
\bar{x}	0.104	0.060	0.066	0.107	0.144	0.080	0.090	0.147	0.199	0.102	0.112	0.202	0.242	0.125	0.133	0.257	0.287	0.151	0.156	0.306
SE \bar{x}	0.006	0.002	0.001	0.001	0.005	0.002	0.002	0.001	0.008	0.002	0.002	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.001

Tablo 7'de verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 27'de verilmiştir.



Şekil 27. Heparin Sigma grade I ve üç fraksiyonunun metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

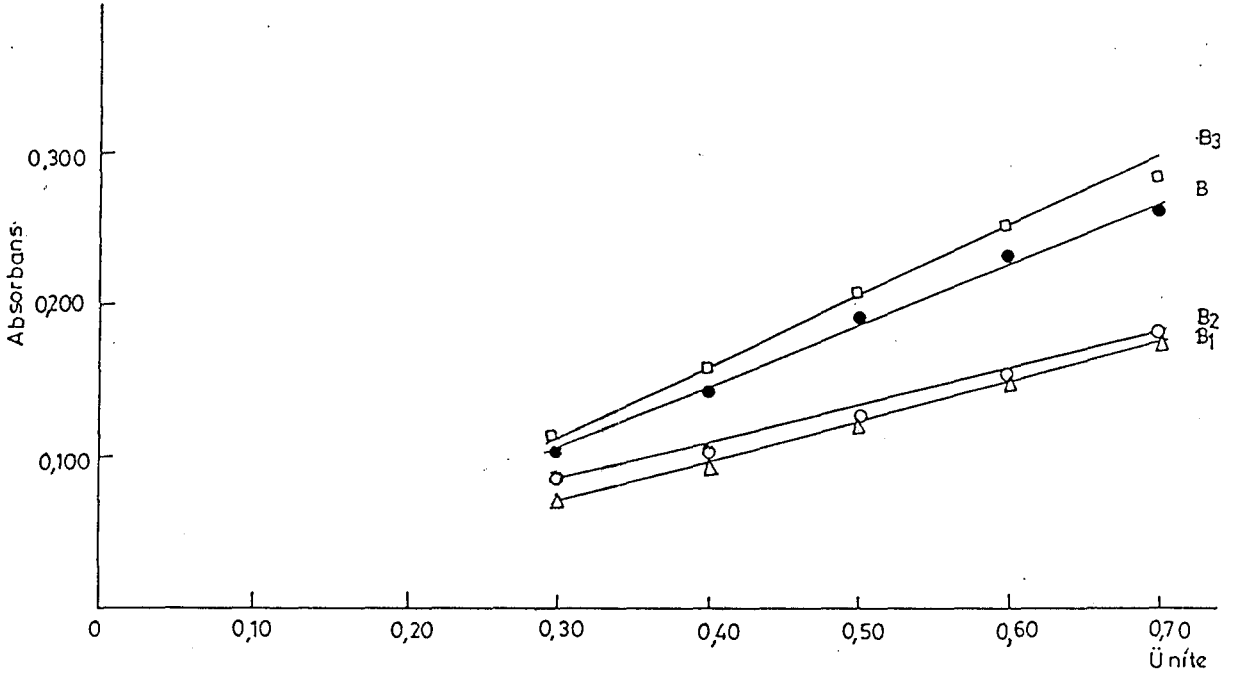
A	$r^2 = 0.9990$	$A = 0.464 U - 0.0368$
A ₁	$r^2 = 0.9988$	$A = 0.227 U - 0.0099$
A ₂	$r^2 = 0.9998$	$A = 0.2235 U - 0.00025$
A ₃	$r^2 = 0.9987$	$A = 0.5075 U - 0.04985$

Heparin Roth ve fraksiyonlarının Azur A ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun Azur A ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃
Absorbans	0.103	0.072	0.084	0.112	0.145	0.096	0.103	0.157	0.193	0.123	0.130	0.205	0.235	0.149	0.153	0.251	0.264	0.178	0.185	0.281
	0.104	0.074	0.086	0.114	0.147	0.099	0.105	0.155	0.191	0.125	0.128	0.208	0.233	0.151	0.155	0.249	0.263	0.176	0.183	0.279
	0.101	0.071	0.083	0.111	0.144	0.097	0.104	0.159	0.191	0.124	0.127	0.206	0.234	0.150	0.155	0.252	0.264	0.177	0.183	0.282
	0.102	0.072	0.085	0.111	0.145	0.098	0.107	0.157	0.194	0.126	0.129	0.206	0.231	0.150	0.157	0.252	0.262	0.177	0.184	0.280
	0.103	0.073	0.085	0.113	0.144	0.096	0.106	0.157	0.192	0.123	0.127	0.204	0.235	0.150	0.154	0.254	0.261	0.175	0.182	0.280
	0.102	0.071	0.087	0.114	0.147	0.096	0.104	0.155	0.190	0.123	0.127	0.204	0.232	0.152	0.157	0.253	0.264	0.178	0.185	0.278
	0.105	0.073	0.086	0.112	0.145	0.098	0.104	0.156	0.192	0.125	0.130	0.207	0.232	0.149	0.153	0.251	0.262	0.177	0.183	0.282
	0.104	0.073	0.083	0.112	0.146	0.099	0.105	0.158	0.191	0.125	0.129	0.205	0.234	0.152	0.155	0.254	0.264	0.179	0.183	0.281
	0.102	0.072	0.085	0.110	0.148	0.097	0.107	0.158	0.193	0.124	0.127	0.205	0.231	0.151	0.155	0.252	0.261	0.176	0.181	0.281
	0.102	0.071	0.084	0.113	0.145	0.097	0.103	0.155	0.190	0.122	0.128	0.204	0.233	0.151	0.156	0.252	0.263	0.175	0.184	0.280
X	0.103	0.072	0.085	0.112	0.146	0.097	0.105	0.157	0.192	0.124	0.128	0.205	0.233	0.150	0.155	0.252	0.263	0.177	0.183	0.280
SE±	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 8'de verilen absorbands değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 28'de verilmiştir.



Şekil 28. Heparin Roth ve üç fraksiyonununun Azur A ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

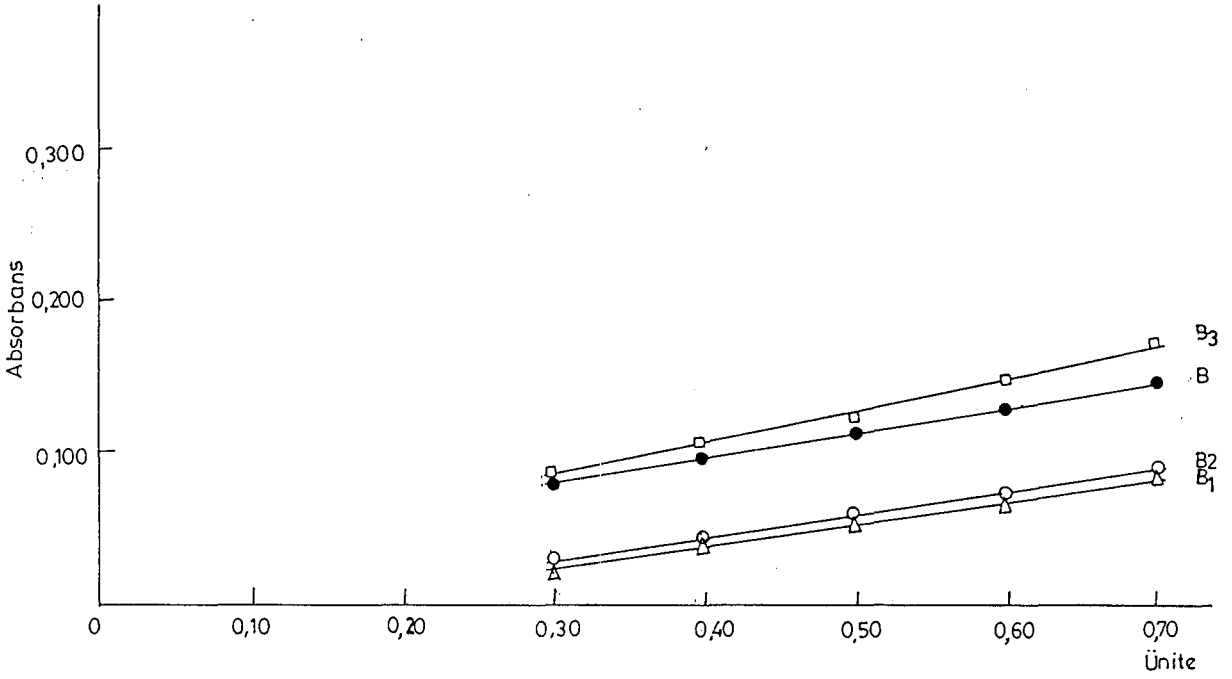
B	$r^2 = 0.9973$	$A = 0.407 U - 0.0161$
B ₁	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.263 U - 0.0075$
B ₂	$r^2 = 0.9975$	$A = 0.246 U + 0.0082$
B ₃	$r^2 = 0.9962$	$A = 0.431 U - 0.0143$

Heparin Roth ve fraksiyonlarınınunun Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun Azur I ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃
Absorbans	0.076	0.024	0.025	0.077	0.096	0.039	0.040	0.104	0.110	0.048	0.055	0.125	0.125	0.067	0.069	0.148	0.143	0.080	0.085	0.169
	0.077	0.022	0.028	0.079	0.094	0.035	0.042	0.102	0.111	0.050	0.056	0.123	0.128	0.063	0.067	0.146	0.144	0.082	0.087	0.170
	0.079	0.021	0.026	0.080	0.094	0.038	0.041	0.101	0.112	0.051	0.054	0.121	0.126	0.063	0.067	0.147	0.144	0.083	0.083	0.170
	0.076	0.023	0.027	0.077	0.096	0.036	0.042	0.102	0.113	0.050	0.053	0.121	0.127	0.065	0.071	0.145	0.141	0.081	0.083	0.168
	0.078	0.022	0.028	0.079	0.095	0.036	0.039	0.102	0.110	0.052	0.056	0.121	0.126	0.064	0.069	0.145	0.143	0.081	0.085	0.171
	0.077	0.022	0.028	0.078	0.093	0.037	0.042	0.100	0.110	0.049	0.052	0.124	0.124	0.067	0.069	0.147	0.145	0.084	0.086	0.169
	0.077	0.024	0.027	0.081	0.095	0.037	0.040	0.103	0.111	0.052	0.054	0.123	0.127	0.065	0.067	0.148	0.144	0.082	0.084	0.172
	0.079	0.021	0.025	0.080	0.095	0.038	0.040	0.102	0.109	0.052	0.055	0.122	0.125	0.064	0.071	0.146	0.142	0.082	0.083	0.168
	0.076	0.023	0.028	0.077	0.094	0.037	0.042	0.104	0.112	0.050	0.053	0.122	0.126	0.063	0.070	0.144	0.145	0.083	0.087	0.168
	0.076	0.023	0.027	0.078	0.093	0.037	0.039	0.101	0.110	0.050	0.054	0.125	0.124	0.065	0.068	0.145	0.143	0.083	0.084	0.171
X	0.077	0.022	0.027	0.079	0.094	0.037	0.041	0.102	0.111	0.050	0.054	0.123	0.126	0.065	0.069	0.146	0.143	0.082	0.085	0.170
SE 7	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001

Tablo 9'da verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 29'da verilmiştir.



Şekil 29. Heparin Roth ve üç fraksiyonununun Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

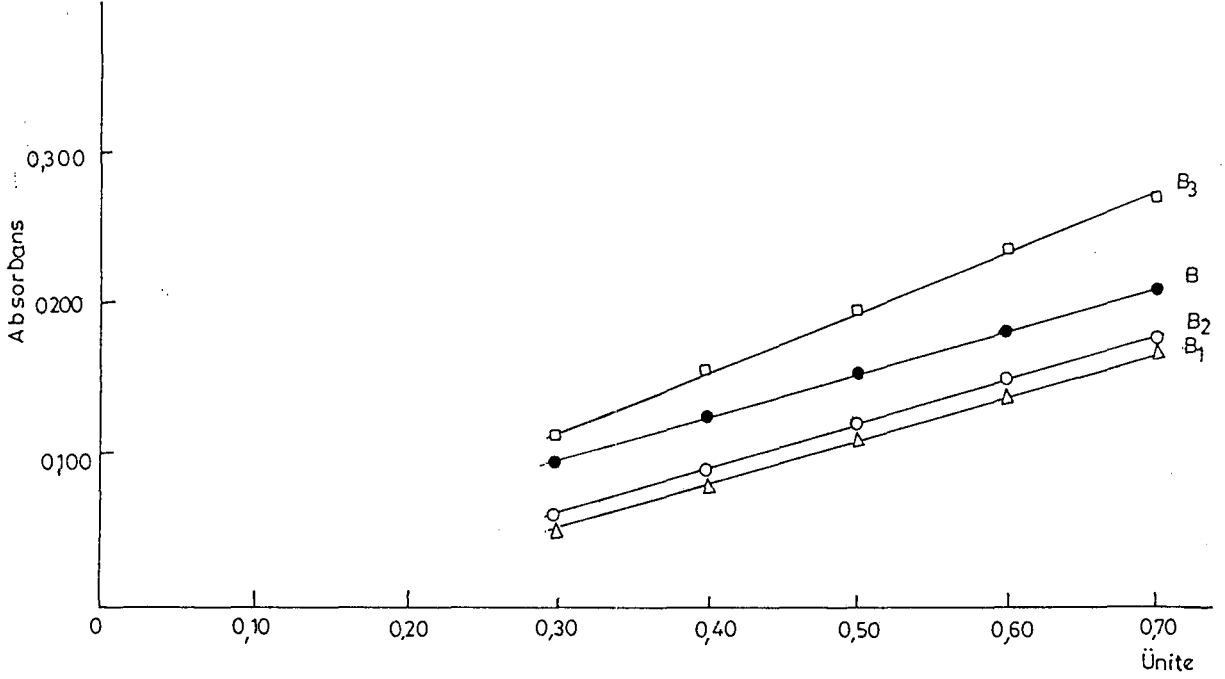
B	$r^2 = 0.9997$	$A = 0.1635 U + 0.02855$
B ₁	$r^2 = 0.9988$	$A = 0.147 U - 0.0222$
B ₂	$r^2 = 0.9992$	$A = 0.144 U - 0.0168$
B ₃	$r^2 = 0.9997$	$A = 0.226 U + 0.011$

Heparin Roth ve fraksiyonlarınınun Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun Azur II ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃
Absorbans	0.092	0.053	0.057	0.110	0.125	0.078	0.089	0.155	0.152	0.109	0.118	0.197	0.185	0.138	0.148	0.234	0.211	0.169	0.178	0.272
	0.093	0.051	0.058	0.115	0.128	0.080	0.091	0.155	0.153	0.112	0.121	0.196	0.179	0.140	0.152	0.230	0.212	0.173	0.180	0.274
	0.095	0.049	0.058	0.113	0.129	0.082	0.090	0.154	0.151	0.110	0.120	0.195	0.181	0.141	0.149	0.232	0.212	0.173	0.182	0.275
	0.099	0.050	0.057	0.113	0.126	0.081	0.088	0.156	0.152	0.110	0.120	0.193	0.183	0.141	0.149	0.235	0.209	0.170	0.182	0.275
	0.096	0.052	0.060	0.114	0.125	0.082	0.092	0.151	0.155	0.109	0.119	0.192	0.187	0.142	0.152	0.233	0.210	0.172	0.180	0.273
	0.097	0.049	0.058	0.114	0.124	0.082	0.090	0.153	0.155	0.111	0.119	0.195	0.184	0.140	0.150	0.231	0.209	0.172	0.178	0.273
	0.094	0.052	0.060	0.111	0.127	0.079	0.090	0.153	0.153	0.112	0.122	0.193	0.181	0.140	0.150	0.233	0.211	0.169	0.181	0.275
	0.095	0.050	0.059	0.110	0.126	0.078	0.088	0.155	0.154	0.111	0.120	0.193	0.183	0.138	0.150	0.235	0.212	0.171	0.181	0.272
	0.100	0.050	0.060	0.112	0.127	0.081	0.088	0.152	0.151	0.113	0.122	0.194	0.183	0.139	0.151	0.233	0.213	0.171	0.179	0.271
	0.097	0.049	0.059	0.113	0.125	0.081	0.091	0.151	0.152	0.114	0.118	0.194	0.182	0.141	0.151	0.232	0.210	0.171	0.179	0.271
\bar{X}	0.096	0.050	0.059	0.112	0.126	0.080	0.090	0.153	0.153	0.111	0.120	0.194	0.183	0.140	0.150	0.233	0.211	0.171	0.180	0.273
SE \pm	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002

Tablo 10'da verilen absorbands değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun Azur II ile yapılan meta-kromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

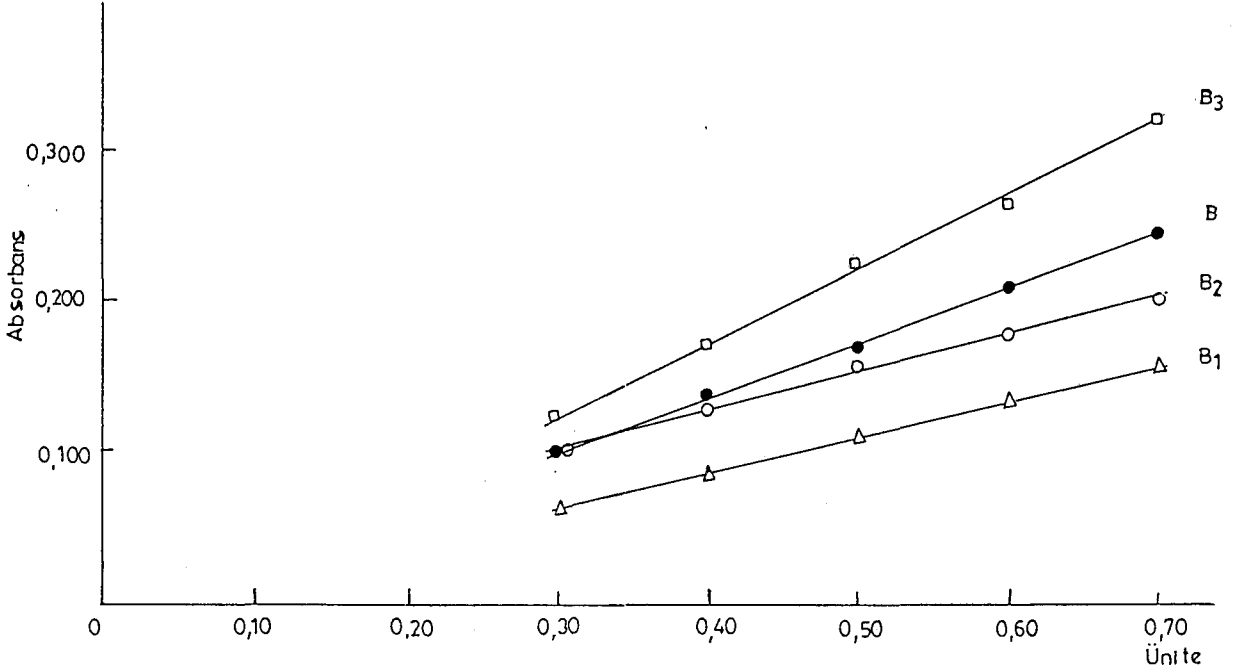
B	$r^2 = 0.9998$	$A = 0.287 U + 0.0103$
B ₁	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.301 U - 0.04$
B ₂	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.302 U - 0.0312$
B ₃	$r^2 = 0.9999$	$A = 0.4005 U - 0.00705$

Heparin Roth ve fraksiyonlarının metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun metilen mavisi ile metakromazisi

U	0.30				0.40				0.50				0.60				0.70			
Kod	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃	B	B ₁	B ₂	B ₃
Absorbans	0.099	0.061	0.100	0.120	0.135	0.086	0.123	0.168	0.169	0.109	0.151	0.221	0.208	0.133	0.176	0.261	0.244	0.158	0.200	0.324
	0.100	0.063	0.098	0.124	0.136	0.084	0.126	0.172	0.170	0.112	0.151	0.225	0.208	0.135	0.179	0.265	0.245	0.160	0.203	0.328
	0.102	0.059	0.099	0.122	0.135	0.087	0.124	0.171	0.170	0.110	0.155	0.224	0.207	0.131	0.180	0.262	0.241	0.157	0.201	0.322
	0.100	0.063	0.102	0.119	0.135	0.084	0.124	0.171	0.171	0.110	0.153	0.222	0.210	0.132	0.177	0.264	0.244	0.157	0.201	0.325
	0.100	0.061	0.098	0.123	0.136	0.084	0.126	0.174	0.172	0.112	0.154	0.225	0.209	0.134	0.181	0.262	0.245	0.161	0.204	0.321
	0.099	0.061	0.101	0.123	0.133	0.087	0.122	0.169	0.171	0.109	0.153	0.223	0.208	0.131	0.177	0.265	0.246	0.160	0.199	0.327
	0.100	0.064	0.103	0.121	0.134	0.085	0.121	0.170	0.170	0.111	0.150	0.221	0.209	0.133	0.179	0.261	0.243	0.157	0.203	0.326
	0.099	0.062	0.099	0.125	0.132	0.083	0.121	0.173	0.172	0.113	0.153	0.224	0.211	0.133	0.179	0.261	0.244	0.159	0.204	0.324
	0.100	0.062	0.098	0.121	0.133	0.086	0.125	0.170	0.171	0.108	0.155	0.221	0.210	0.135	0.181	0.264	0.243	0.159	0.199	0.322
	0.099	0.064	0.098	0.124	0.133	0.086	0.125	0.171	0.173	0.111	0.155	0.224	0.206	0.131	0.178	0.260	0.244	0.157	0.200	0.325
\bar{X}	0.100	0.062	0.100	0.122	0.134	0.085	0.124	0.171	0.171	0.110	0.153	0.223	0.209	0.133	0.179	0.262	0.244	0.158	0.201	0.324
SE \bar{x}	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002

Tablo 11'de verilen absorbans değerlerinin mukayeseli grafiği Şekil 31'de verilmiştir.



Şekil 31. Heparin Roth ve üç fraksiyonunun metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinin mukayeseli eğrileri

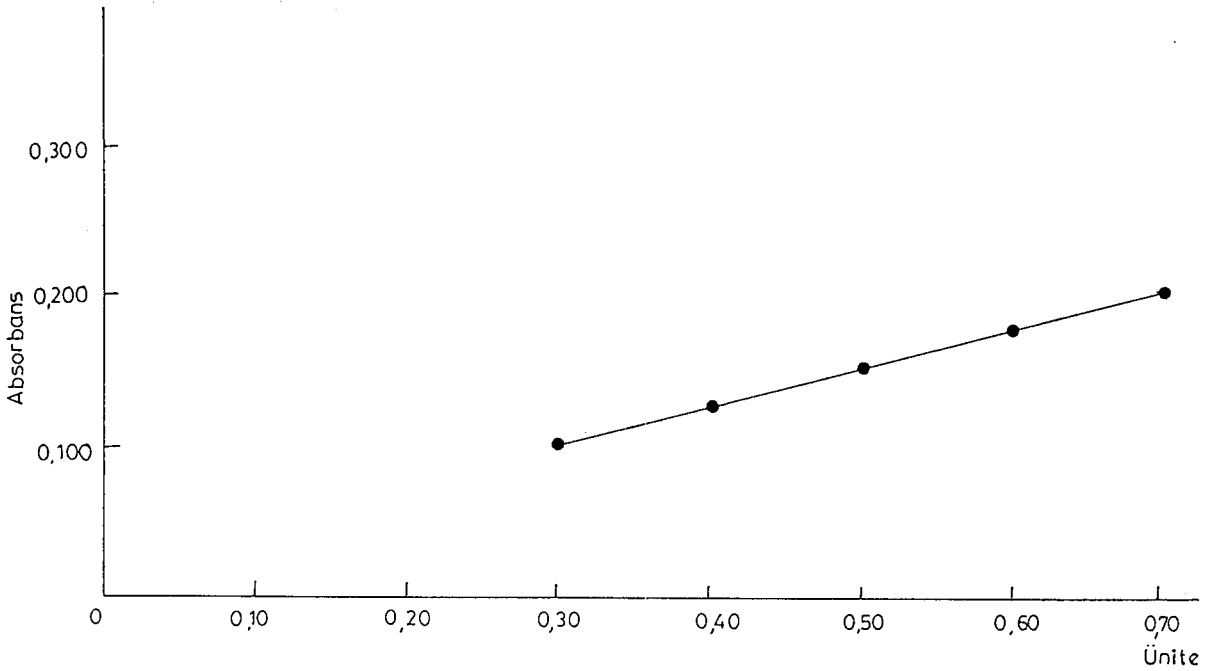
B	$r^2 = 0.9998$	$A = 0.363 U - 0.0099$
B ₁	$r^2 = 0.9998$	$A = 0.241 U - 0.0108$
B ₂	$r^2 = 0.9990$	$A = 0.257 U + 0.0229$
B ₃	$r^2 = 0.9983$	$A = 0.4955 U - 0.02725$

Heparin Sigma grade II'nin azur A ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Heparin Sigma grade II'nin Azur A ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.100	0.119	0.147	0.179	0.199
	0.102	0.122	0.152	0.172	0.202
	0.102	0.123	0.150	0.178	0.203
	0.099	0.127	0.151	0.173	0.201
	0.105	0.125	0.154	0.175	0.204
	0.100	0.122	0.150	0.177	0.205
	0.099	0.122	0.152	0.177	0.200
	0.099	0.124	0.153	0.175	0.205
	0.104	0.125	0.151	0.175	0.201
	0.099	0.126	0.151	0.174	0.200
\bar{X}	0.101	0.124	0.151	0.176	0.202
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 12'de verilen absorbans değerlerinin grafiği Şekil 32'de verilmiştir.



Şekil 32. Heparin Sigma grade II'nin Azur A ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9997$$

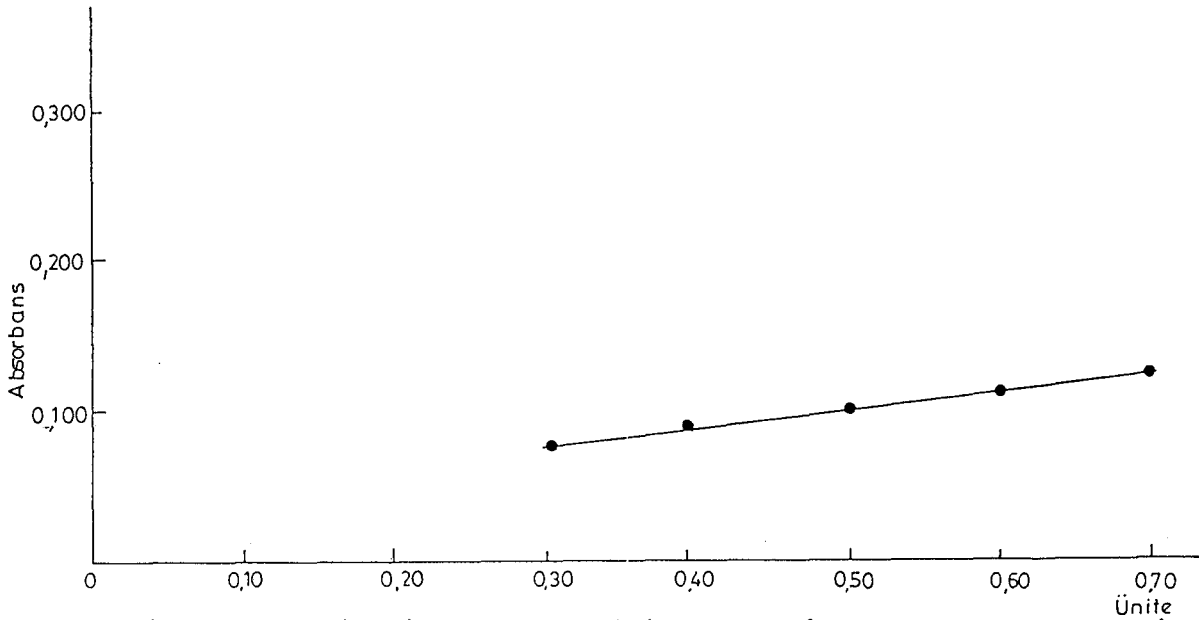
$$A = 0.254 U + 0.0238$$

Heparin Sigma grade II'nin Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13. Heparin Sigma grade II'nin Azur I ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.076	0.088	0.099	0.110	0.120
	0.077	0.087	0.100	0.113	0.118
	0.074	0.090	0.101	0.109	0.119
	0.075	0.086	0.100	0.109	0.119
	0.077	0.087	0.097	0.111	0.122
	0.076	0.087	0.098	0.110	0.121
	0.076	0.089	0.099	0.109	0.120
	0.074	0.090	0.098	0.108	0.121
	0.077	0.087	0.101	0.110	0.118
	0.076	0.088	0.100	0.111	0.121
\bar{x}	0.076	0.088	0.099	0.110	0.120
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 13'te verilen absorbans değerlerinin grafiği Şekil 33'te gösterilmiştir.



Şekil 33. Heparin Sigma grade II'nin Azur I ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9995$$

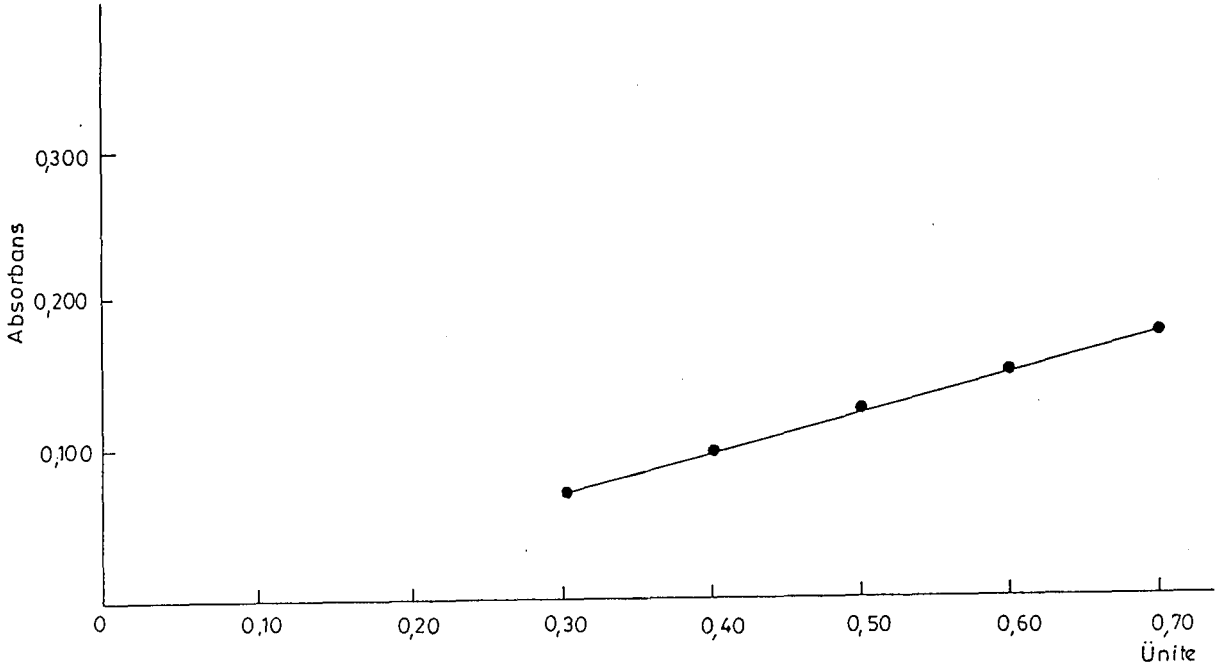
$$A = 0.11 U + 0.0436$$

Heparin Sigma grade II'nin Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Heparin Sigma grade II'nin Azur II ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.073	0.100	0.125	0.147	0.170
	0.072	0.099	0.124	0.149	0.171
	0.073	0.100	0.126	0.151	0.175
	0.072	0.101	0.125	0.150	0.175
	0.071	0.102	0.124	0.153	0.173
	0.072	0.101	0.125	0.152	0.172
	0.070	0.100	0.127	0.154	0.173
	0.074	0.102	0.123	0.149	0.175
	0.071	0.098	0.126	0.151	0.174
	0.072	0.100	0.125	0.152	0.173
\bar{X}	0.072	0.100	0.125	0.151	0.173
SE \bar{X}	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002

Tablo 14'de verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 34'de verilmiştir.



Şekil 34. Heparin Sigma grade II'nin Azur II ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

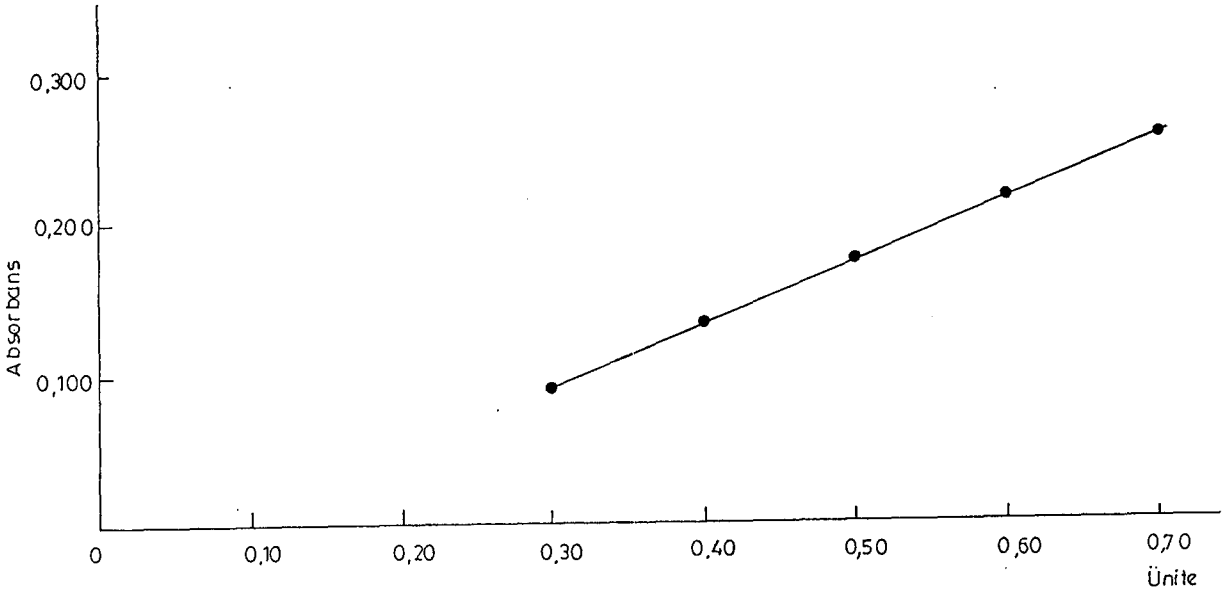
$r^2 = 0.9992$ $A = 0.253 U - 0.0023$

Heparin Sigma grade II'nin metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Heparin Sigma grade II'nin metilen mavisi ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.090	0.133	0.175	0.213	0.253
	0.091	0.134	0.176	0.212	0.254
	0.092	0.135	0.176	0.213	0.256
	0.091	0.133	0.175	0.213	0.257
	0.092	0.134	0.174	0.214	0.254
	0.093	0.133	0.173	0.217	0.255
	0.093	0.132	0.174	0.216	0.256
	0.091	0.134	0.176	0.214	0.255
	0.093	0.135	0.175	0.214	0.258
	0.090	0.135	0.176	0.215	0.257
X	0.092	0.134	0.175	0.214	0.255
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.0015	0.0015

Tablo 15'de verilen absorbans değerlerinin grafiği Şekil 35'de gösterilmiştir.



Şekil 35. Heparin Sigma grade II'nin metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9999$$

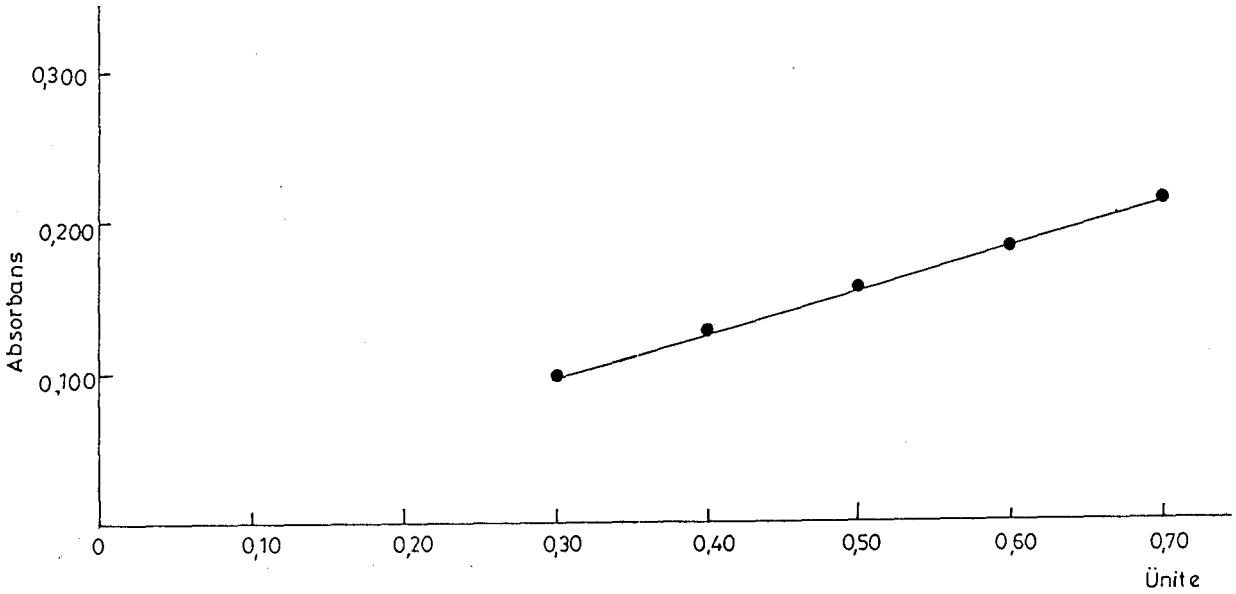
$$A = 0.406 U - 0.029$$

Liquemine Roche'un Azur A ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Liquemine Roche'un Azur A ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.093	0.130	0.157	0.184	0.214
	0.100	0.128	0.157	0.189	0.214
	0.103	0.127	0.158	0.188	0.216
	0.101	0.129	0.161	0.183	0.217
	0.101	0.126	0.160	0.186	0.215
	0.100	0.129	0.156	0.188	0.214
	0.102	0.125	0.157	0.186	0.216
	0.105	0.128	0.157	0.188	0.220
	0.103	0.129	0.158	0.185	0.215
	0.104	0.129	0.165	0.185	0.213
\bar{X}	0.101	0.128	0.159	0.186	0.215
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 16'da verilen absorbands değerlerinin grafiği şekil 36'da gösterilmiştir.



şekil 36. Liquemine Roche'un Azur A ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9998$$

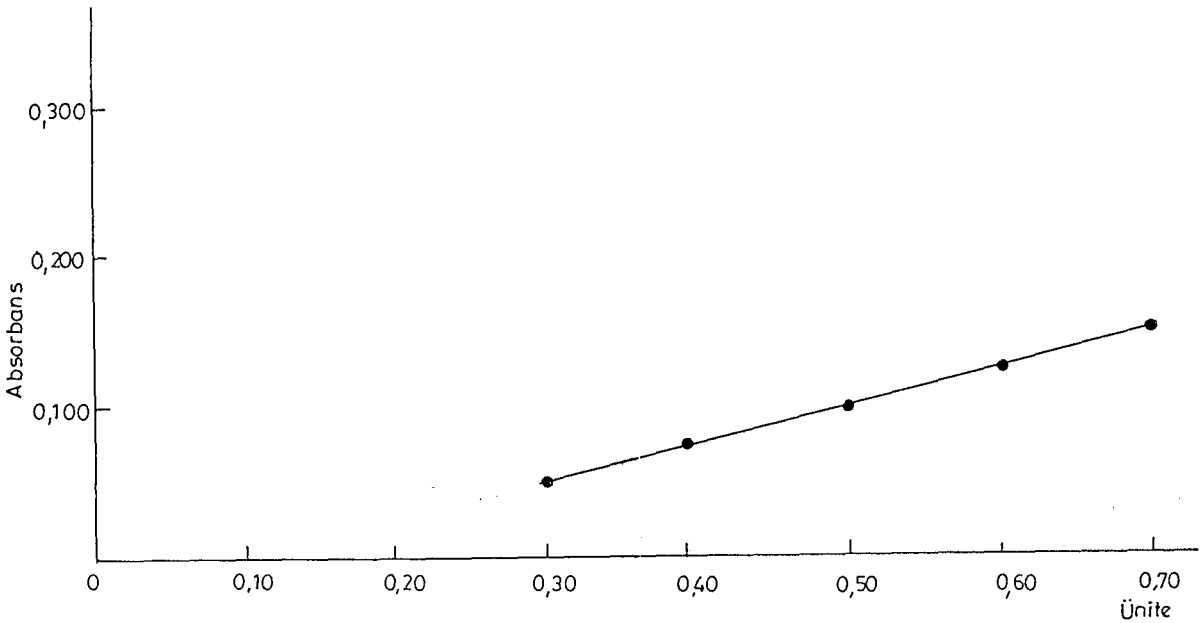
$$A = 0.286 U + 0.0148$$

Liquemine Roche'un Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Liquemine Roche'un Azur I ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.048	0.075	0.097	0.125	0.151
	0.050	0.073	0.099	0.122	0.149
	0.051	0.074	0.100	0.123	0.150
	0.049	0.074	0.099	0.121	0.151
	0.050	0.076	0.098	0.124	0.148
	0.052	0.073	0.100	0.122	0.148
	0.049	0.075	0.097	0.123	0.152
	0.049	0.073	0.099	0.123	0.150
	0.048	0.074	0.101	0.121	0.149
	0.051	0.073	0.100	0.125	0.149
\bar{X}	0.050	0.074	0.099	0.123	0.150
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 17'de verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 37'de gösterilmiştir.



Şekil 37. Liquemine Roche'un Azur I ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9997$$

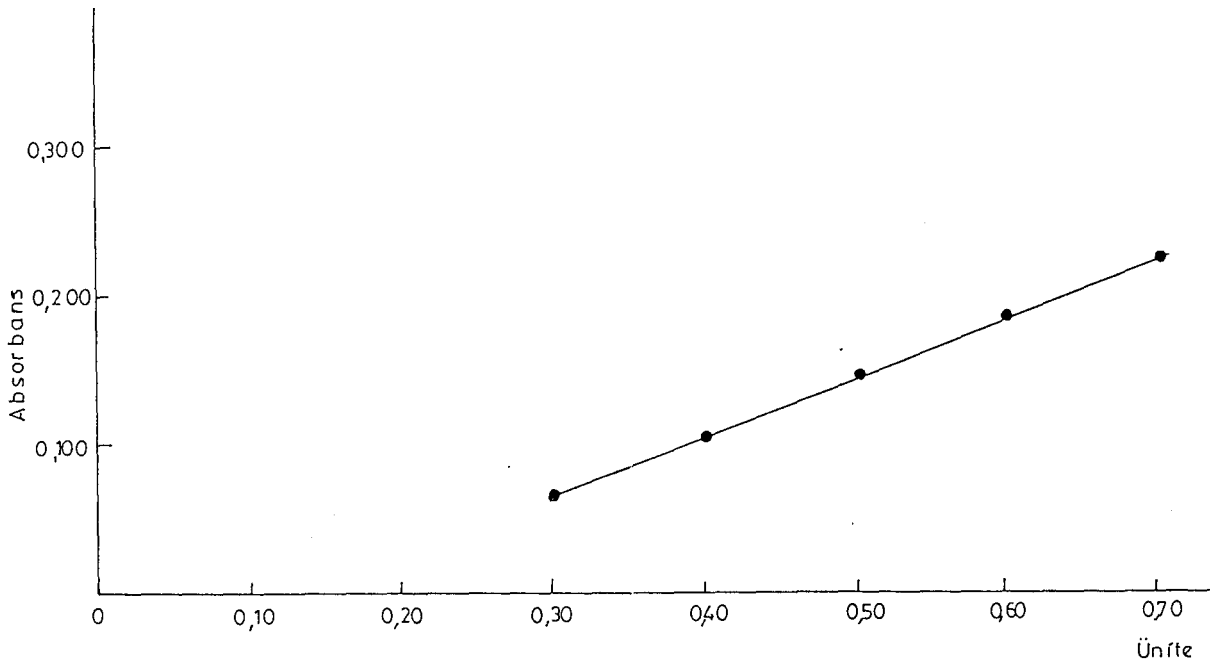
$$A = 0.249 U - 0.0253$$

Liquemine Roche'un Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Liquemine Roche'un Azur II ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.062	0.103	0.145	0.186	0.226
	0.064	0.105	0.144	0.185	0.224
	0.063	0.103	0.145	0.185	0.225
	0.067	0.105	0.143	0.186	0.223
	0.067	0.102	0.142	0.184	0.222
	0.063	0.105	0.144	0.186	0.226
	0.067	0.105	0.144	0.185	0.225
	0.066	0.104	0.144	0.184	0.223
	0.066	0.104	0.143	0.183	0.226
	0.064	0.105	0.145	0.186	0.225
\bar{X}	0.065	0.104	0.144	0.185	0.225
SE \bar{X}	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 18'de verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 38'de gösterilmiştir.



Şekil 38. Liquemine Roche'un Azur II ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9999$$

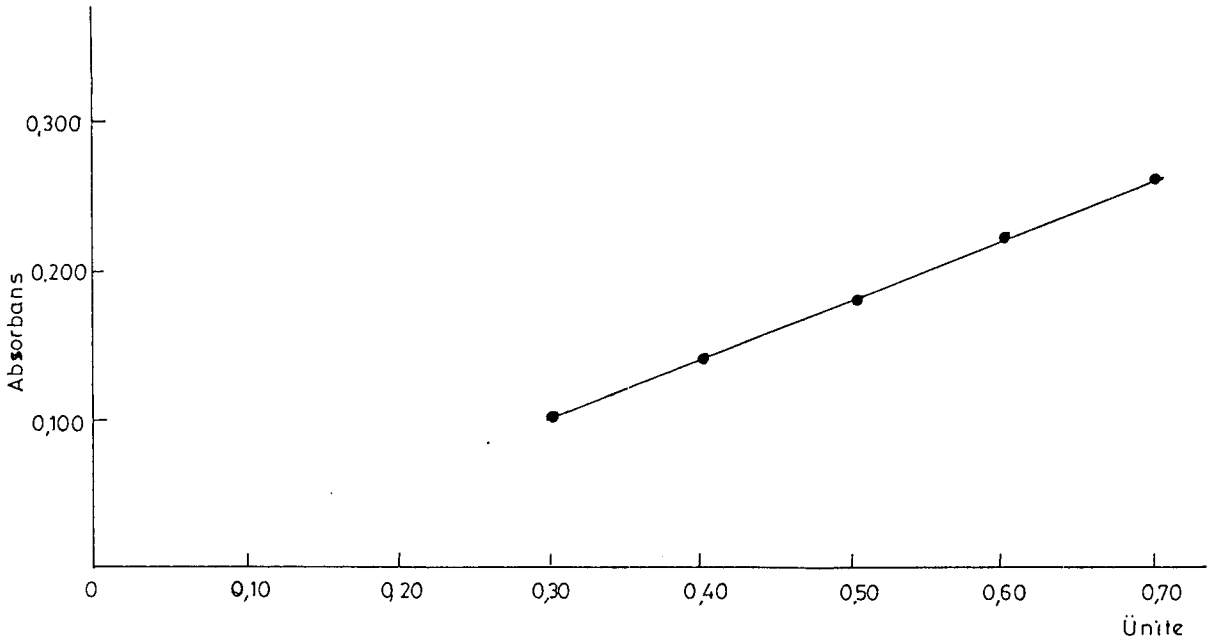
$$A = 0.401 U - 0.0559$$

Liquemine Roche'un metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Liquemine Roche'un metilen mavisi ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.099	0.137	0.177	0.222	0.258
	0.100	0.136	0.179	0.225	0.259
	0.104	0.137	0.180	0.223	0.258
	0.100	0.136	0.179	0.224	0.263
	0.099	0.137	0.180	0.218	0.259
	0.101	0.138	0.178	0.225	0.262
	0.102	0.139	0.177	0.224	0.263
	0.102	0.136	0.179	0.222	0.262
	0.103	0.140	0.180	0.223	0.261
	0.105	0.138	0.177	0.223	0.261
\bar{X}	0.101	0.137	0.179	0.223	0.261
SE \bar{X}	0.002	0.001	0.001	0.002	0.002

Tablo 19'da verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 39'da gösterilmiştir.



Şekil 39. Liquemine Roche'un metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9994$$

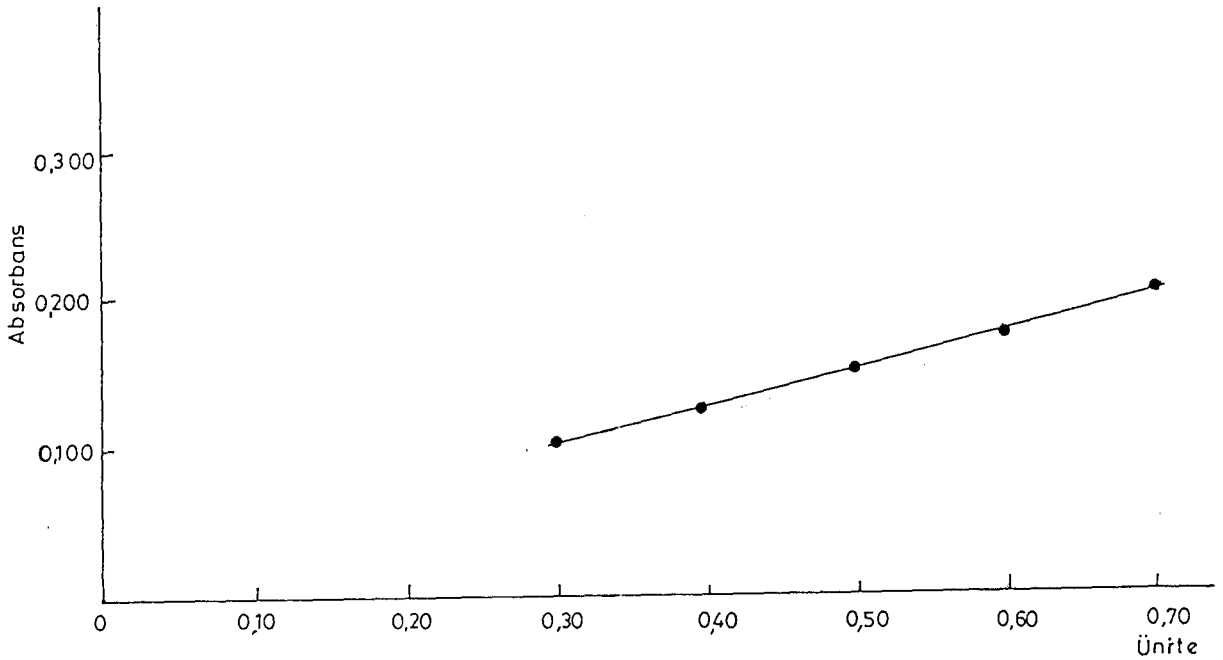
$$A = 0.406 U - 0.0228$$

Heparin Novo lente'nin Azur A ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbans değerleri Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Heparin Novo lente'nin Azur A ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.099	0.124	0.152	0.177	0.206
	0.104	0.125	0.155	0.178	0.205
	0.100	0.128	0.152	0.178	0.204
	0.102	0.127	0.153	0.177	0.208
	0.103	0.127	0.151	0.174	0.206
	0.106	0.123	0.151	0.180	0.201
	0.104	0.129	0.153	0.175	0.205
	0.101	0.126	0.153	0.174	0.202
	0.102	0.127	0.153	0.179	0.207
	0.105	0.128	0.154	0.178	0.204
\bar{X}	0.103	0.126	0.153	0.177	0.205
SE \bar{X}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 20'de verilen absorbans değerlerinin grafiği Şekil 40'da gösterilmiştir.



Şekil 40. Heparin Novo lente'nin Azur A ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9995$$

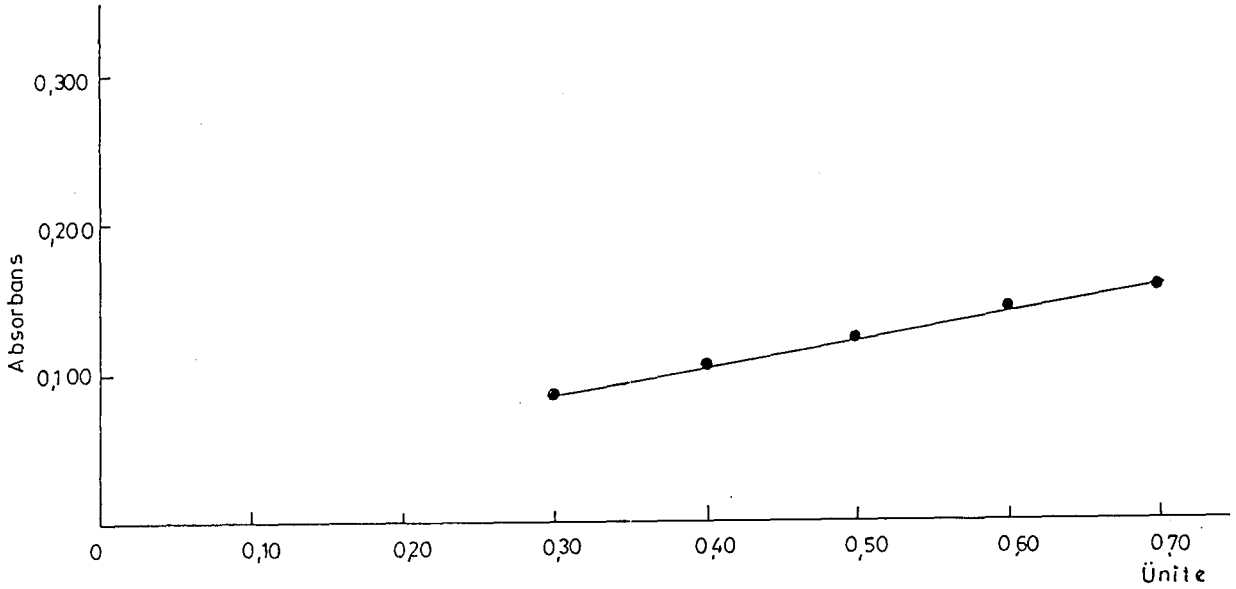
$$A = 0.255 U + 0.0253$$

Heparin Novo lente'nin Azur I ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Heparin Novo lente'nin Azur I ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.083	0.104	0.121	0.139	0.155
	0.085	0.105	0.123	0.141	0.156
	0.084	0.107	0.124	0.140	0.156
	0.086	0.103	0.125	0.140	0.157
	0.083	0.105	0.122	0.142	0.153
	0.085	0.105	0.122	0.138	0.157
	0.085	0.103	0.123	0.139	0.154
	0.087	0.106	0.125	0.142	0.153
	0.085	0.106	0.123	0.141	0.156
	0.084	0.104	0.124	0.140	0.155
\bar{X}	0.085	0.105	0.123	0.140	0.155
SE \bar{x}	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Tablo 21'de verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 41'de gösterilmiştir.



Şekil 41. Heparin Novo lente'nin Azur I ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9985$$

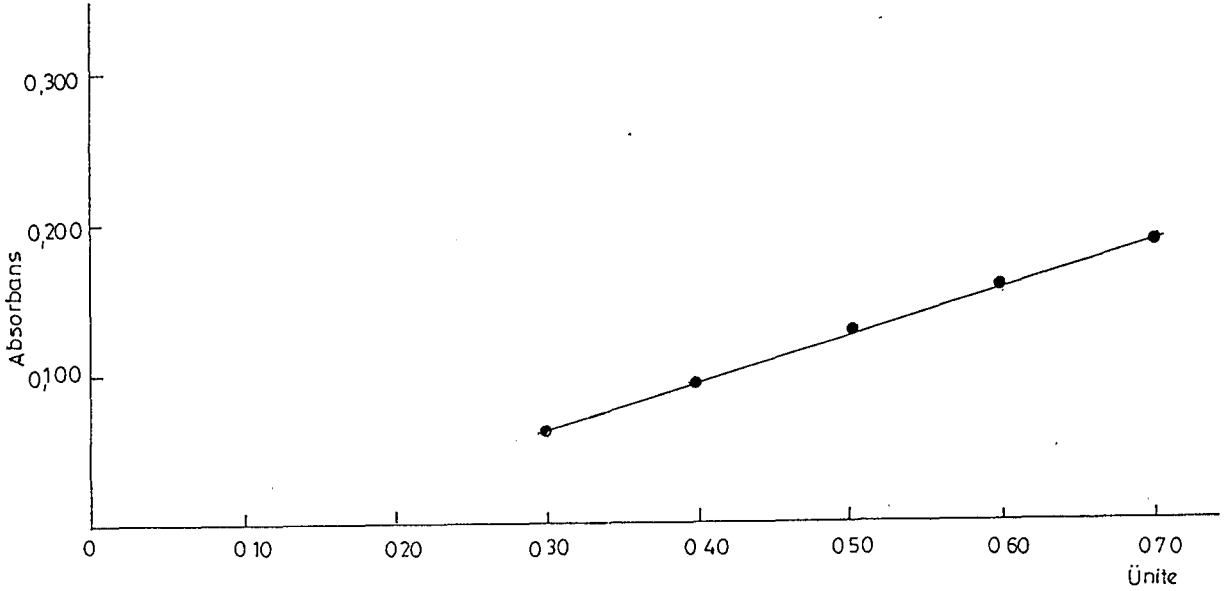
$$A = 0.175 U + 0.0341$$

Heparin Novo lente'nin Azur II ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Heparin Novo lente'nin Azur II ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.064	0.095	0.131	0.157	0.185
	0.063	0.094	0.130	0.158	0.186
	0.061	0.096	0.128	0.160	0.185
	0.065	0.097	0.129	0.161	0.186
	0.062	0.096	0.127	0.159	0.183
	0.062	0.095	0.126	0.162	0.189
	0.063	0.094	0.130	0.156	0.187
	0.065	0.097	0.129	0.158	0.185
	0.061	0.095	0.126	0.156	0.187
	0.063	0.093	0.126	0.156	0.186
\bar{X}	0.063	0.095	0.128	0.158	0.186
SE \bar{x}	0.0015	0.001	0.002	0.002	0.0015

Tablo 22'de verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 42'de gösterilmiştir.



Şekil 42. Heparin Novo lente'nin Azur II ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9994$$

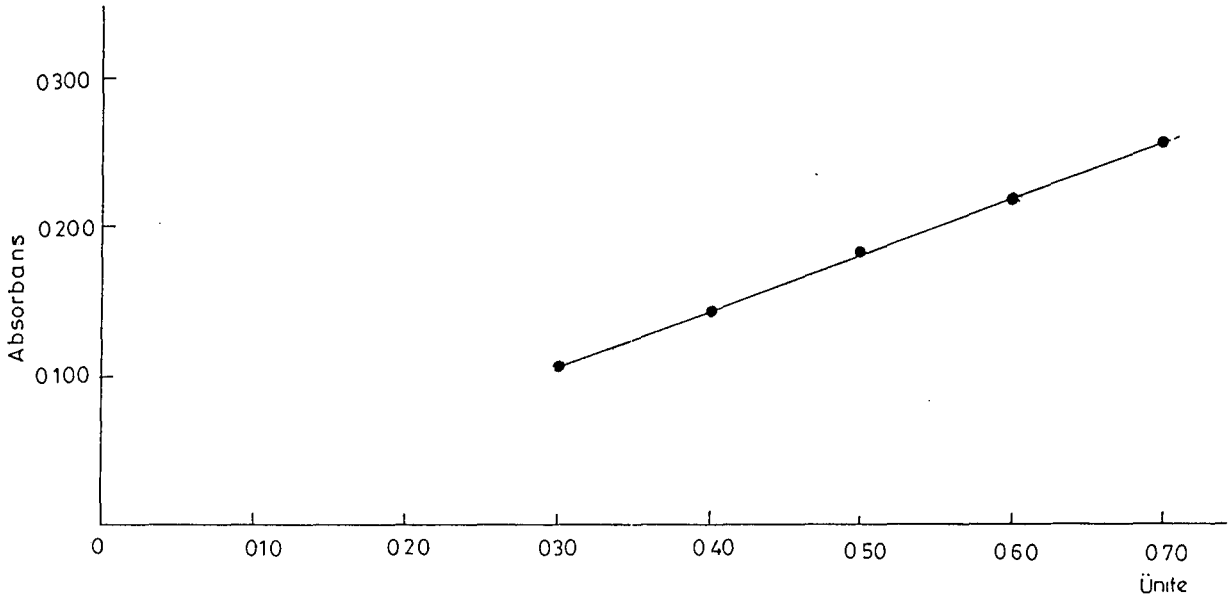
$$A = 0.309 U - 0.0285$$

Heparin Novo lente'nin metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneylerinde elde edilen absorbands değerleri Tablo 23'te verilmiştir.

Tablo 23. Heparin Novo lente'nin metilen mavisi ile metakromazisi

U	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Absorbans	0.102	0.143	0.183	0.217	0.255
	0.104	0.142	0.179	0.218	0.255
	0.103	0.139	0.181	0.214	0.256
	0.102	0.140	0.180	0.215	0.256
	0.103	0.141	0.177	0.215	0.257
	0.103	0.142	0.178	0.218	0.258
	0.101	0.140	0.179	0.219	0.256
	0.103	0.139	0.182	0.218	0.254
	0.101	0.144	0.180	0.215	0.256
	0.104	0.140	0.180	0.214	0.254
\bar{X}	0.103	0.141	0.180	0.216	0.256
SE \pm	0.001	0.002	0.002	0.002	0.001

Tablo 23'te verilen absorbands değerlerinin grafiği Şekil 43'te gösterilmiştir.



Şekil 43. Heparin Novo lente'nin metilen mavisi ile yapılan metakromazi deneyinin eğrisi

$$r^2 = 0.9999$$

$$A = 0.381 U - 0.0113$$

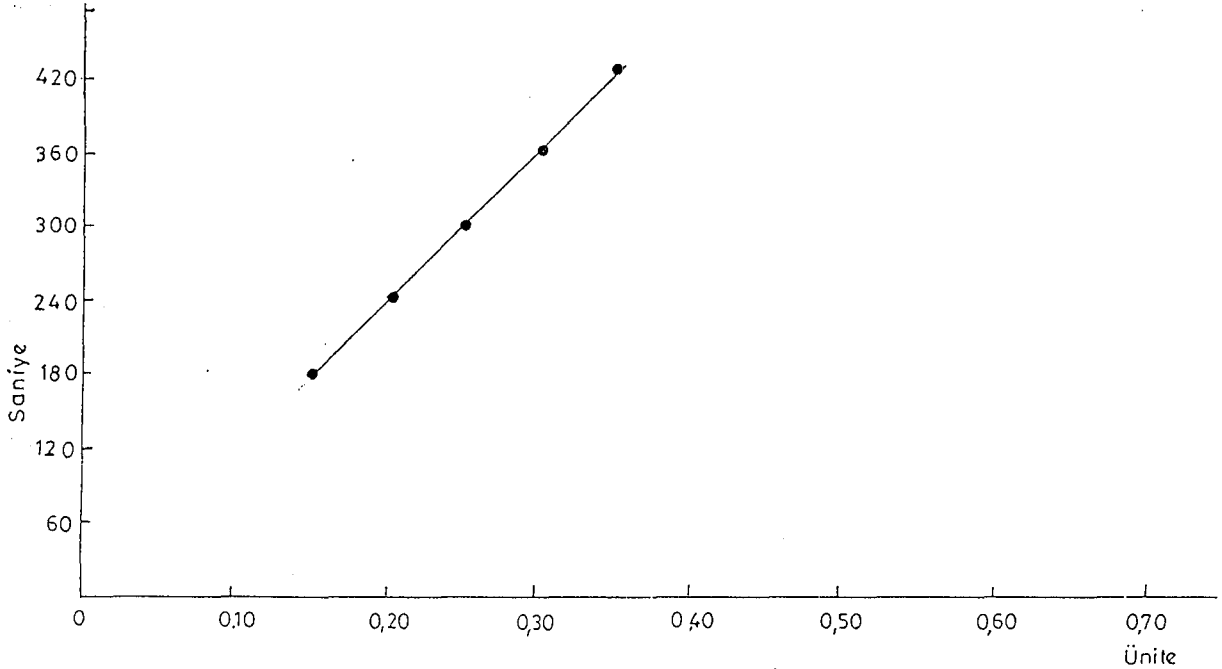
3.3. REKALSİFİKASYON DENEYLERİNİN BULGULARI

Bölüm 2.3.2. de belirtilen rekalsifikasyon deneylerinde heparin Sigma grade I ile elde edilen pıhtılaşma zamanları Tablo'24 de verilmiştir.

Tablo 24. Heparin Sigma grade I'in rekalsifikasyon zamanları

U	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	
Saniye	180	240	270	360	420	
	180	210	300	360	450	
	150	240	300	390	420	
	180	240	270	390	450	
	180	240	300	330	420	
	180	210	300	360	420	
	150	240	300	360	450	
	180	270	330	360	420	
	180	240	300	360	390	
	210	240	300	360	420	
	\bar{X}	177	237	297	363	426
	SE \bar{x}	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10

Tablo 24'de verilen rekalsifikasyon zamanlarının grafiği Şekil 44'de gösterilmiştir.



Şekil 44. Heparin Sigma grade I'in rekalsifikasyon zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9998$$

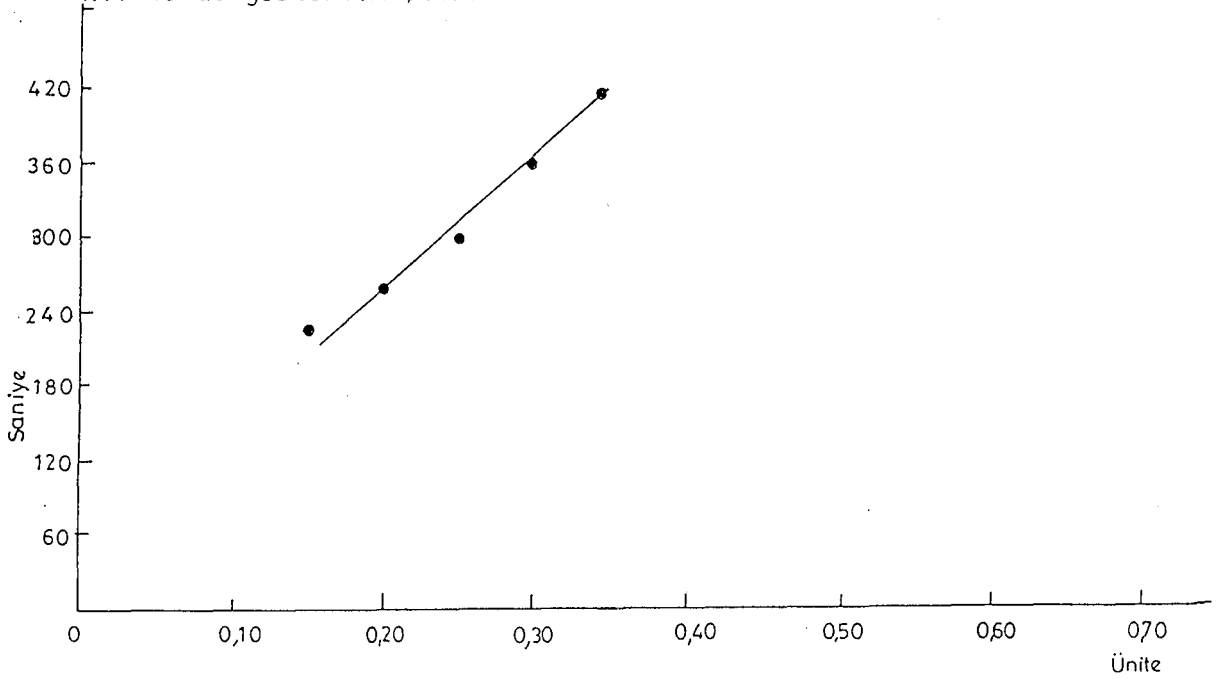
$$Re = 1248 U - 12$$

Heparin Roth ile elde edilen rekalsifikasyon zamanları Tablo 25'de verilmiştir.

Tablo 25. Heparin Roth'un rekalsifikasyon zamanları

U	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
Saniye	240	270	270	360	420
	240	270	300	360	420
	210	240	270	330	390
	240	270	300	360	420
	240	240	300	330	390
	240	270	300	360	420
	210	240	300	360	390
	180	240	330	390	420
	210	240	300	360	420
	210	240	300	360	450
\bar{X}	222	252	297	357	414
SE \bar{X}	0.10	0.08	0.09	0.09	0.10

Tablo 25'de verilen rekalsifikasyon zamanlarının grafiği Şekil 45'de gösterilmiştir.



Şekil 45. Heparin Roth'un rekalsifikasyon zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9922$$

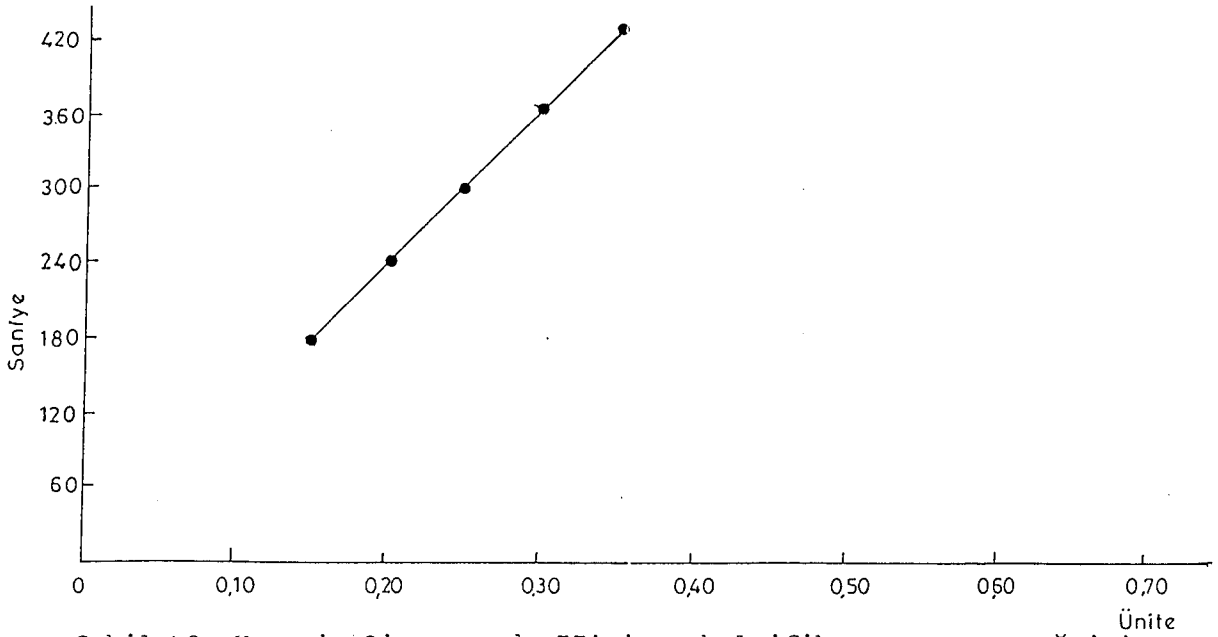
$$Re = 978 U + 63.9$$

Heparin Sigma grade II ile elde edilen rekalsifikasyon zamanları Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 26. Heparin Sigma grade II'nin rekalsifikasyon zamanları

U	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
Saniye	210	240	300	360	450
	180	240	300	360	450
	180	240	300	360	420
	180	240	300	330	420
	180	210	300	360	420
	180	240	300	360	420
	180	240	270	360	450
	180	240	300	360	390
	180	240	300	360	420
	180	240	300	360	420
\bar{X}	183	237	297	357	426
SE \bar{X}	0.05	0.05	0.05	0.05	0.10

Tablo 26'da verilen rekalsifikasyon zamanlarının grafiği Şekil 46'da gösterilmiştir.



Şekil 46. Heparin Sigma grade II'nin rekalsifikasyon zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9990$$

$$Re = 1212 U - 3$$

Liquemine Roche ile elde edilen rekalsifikasyon zamanları

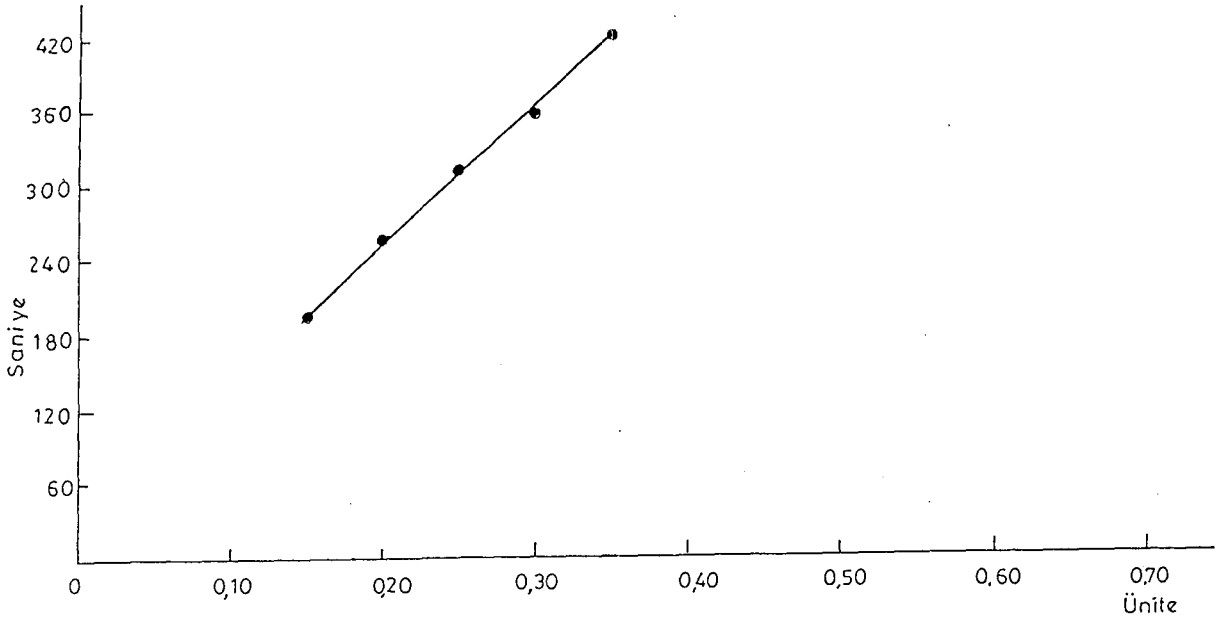
Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. Liquemin Roche'un rekalsifikasyon zamanları

U	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
	210	270	300	330	390
	180	270	330	360	420
	210	240	330	360	390
	210	270	300	330	420
	180	270	330	360	420
	210	240	300	360	420
	210	270	300	330	420
	180	240	300	360	420
	180	240	300	390	450
	180	240	300	360	420
\bar{X}	195	255	309	354	417
SE \bar{X}	0.08	0.08	0.08	0.10	0.09

Tablo 27'de verilen rekalsifikasyon zamanlarının grafiği Şekil

47'de gösterilmiştir.



Şekil 47. Liquemine Roche'un rekalsifikasyon zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9987$$

$$Re = 1086 U + 34.5$$

Heparin Novo lente ile elde edilen rekalsifikasyon zamanları

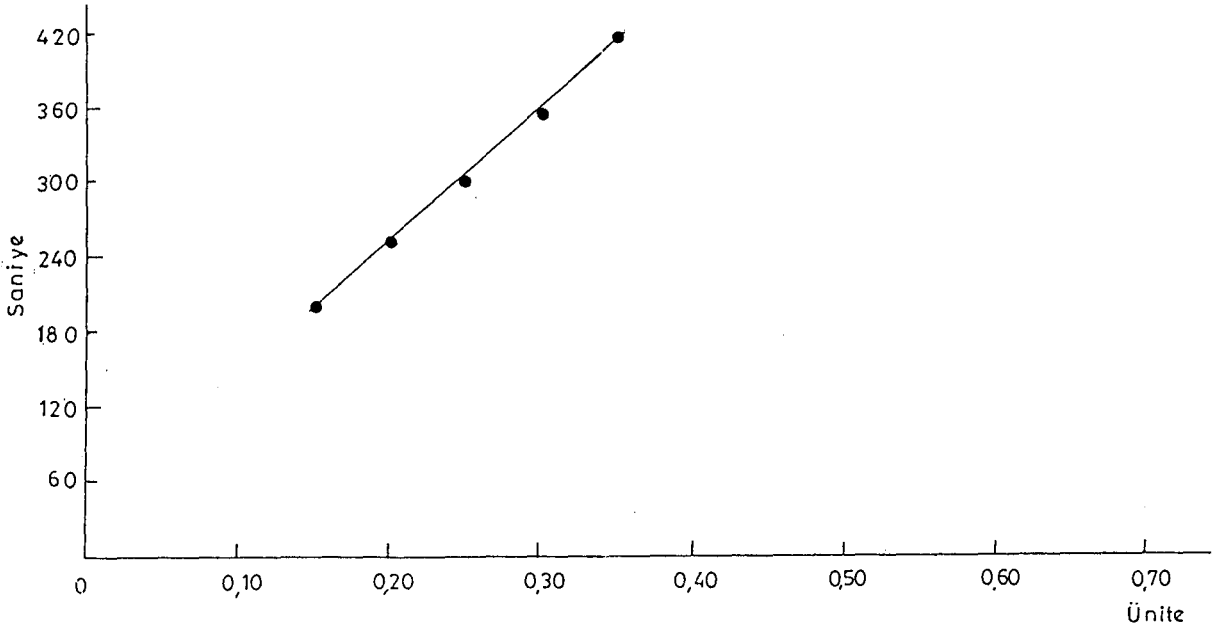
Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 28. Heparin Novo lente'nin rekalsifikasyon zamanları

U	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
Saniye	180	270	300	330	390
	210	240	270	360	420
	210	240	300	360	420
	210	240	300	360	420
	210	270	300	330	390
	180	240	300	360	390
	210	270	300	330	420
	210	270	300	390	450
	180	210	300	360	420
	180	240	300	360	450
\bar{X}	198	249	297	354	417
SE \bar{X}	0.08	0.10	0.05	0.10	0.10

Tablo 28'de verilen rekalsifikasyon zamanlarının grafiği Şekil

48'de gösterilmiştir.



Şekil 48. Heparin Novo lente'nin rekalsifikasyon zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9984$$

$$Re = 1086 U + 31.5$$

3.4. ANTI X_a DENEYLERİNİN BULGULARI

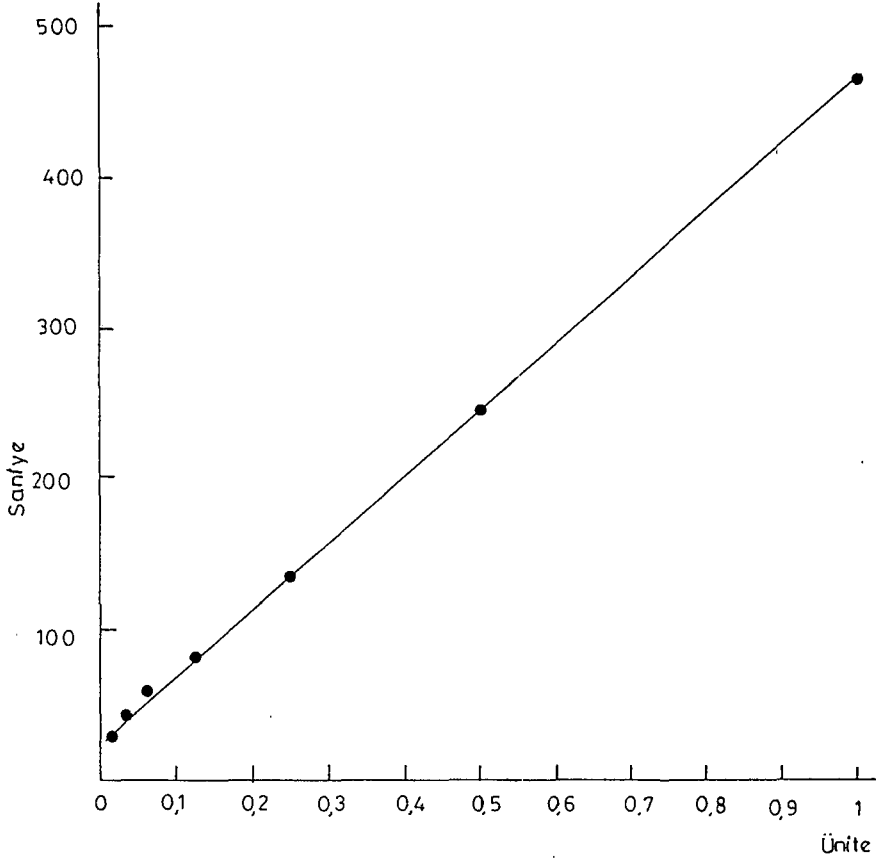
Heparin Sigma grade I ile yapılan anti X_a deneylerinde elde edilen değerler Tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 29. Heparin Sigma grade I'in anti X_a zamanları

<u>U/ml</u>	<u>Pıhtılaşma zamanı (saniye)</u>
Kontrol	19.9
0.015	30.9
0.031	44.7
0.062	58.4
0.125	81.3
0.250	135.9
0.500	245.0
1.000	464.4

(Bu değerler 3 deneyin ortalamalarıdır)

Tablo 29'da verilen anti X_a zamanlarının grafiği Şekil 49'da gösterilmiştir.



Şekil 49. Heparin Sigma grade I'in anti X_a zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9998$$

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

Heparin Sigma grade I'in üç fraksiyonunun bu standart eğri alanına girecek şekilde seyreltilmiş çözeltilerinin yapılan test sonucunda elde edilen anti X_a aktiviteleri Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. Heparin Sigma grade I'in üç fraksiyonunun anti X_a aktivitesi

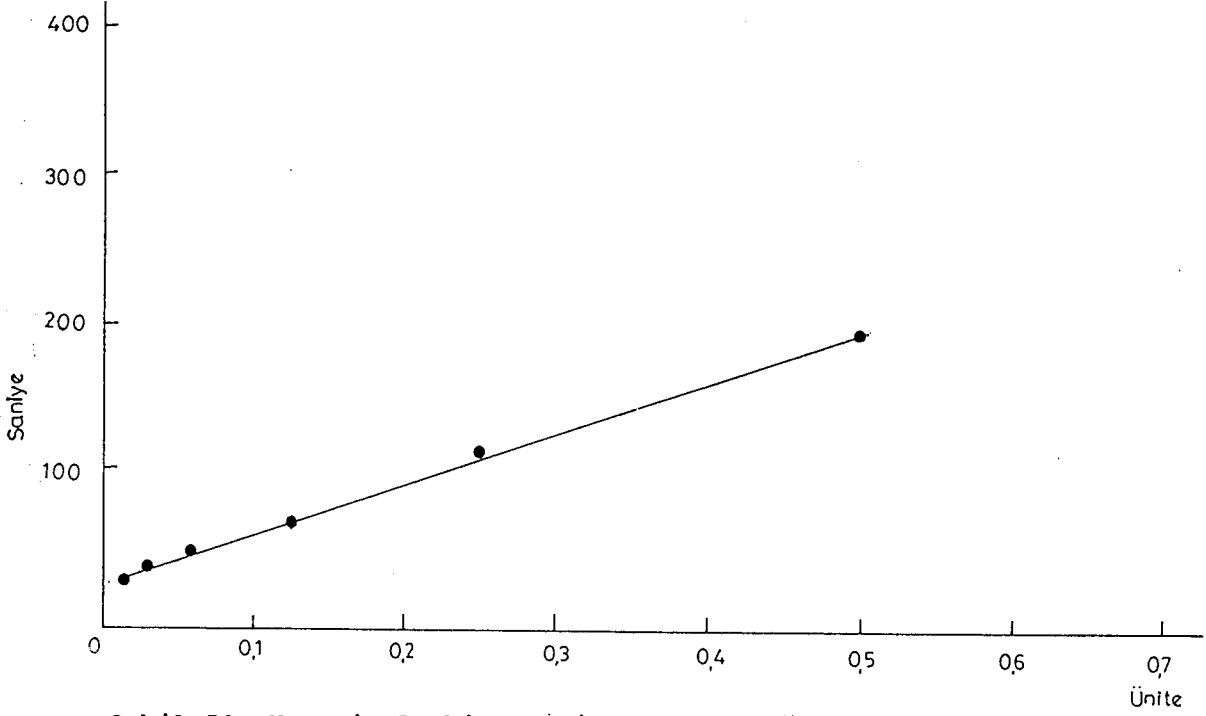
	<u>Pıh.zamanı</u> <u>(saniye)</u>	<u>U/ml</u>	<u>Stok</u> <u>seyreltmesi</u>	<u>Stok</u> <u>ünitesi</u>
Fraksiyon 1	49.0	0.047	1/500	23.50
Fraksiyon 2	152.6	0.285	1/500	142.50
Fraksiyon 3	269.0	0.552	1/500	276.00
Total	422.9	0.898	1/500	449.00

Heparin Roth ile yapılan anti X_a deneylerinde elde edilen değerler Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. Heparin Roth'un anti X_a zamanları

<u>U/ml</u>	<u>Pıhtılaşma</u> <u>zamanı (saniye)</u>
Kontrol	17.0
0.015	30.7
0.031	41.1
0.062	50.0
0.125	71.0
0.250	117.6
0.500	195.0

Tablo 31'de verilen anti X_a zamanlarının grafiği Şekil 50'de gösterilmiştir.



Şekil 50. Heparin Roth'un anti X_a zamanı eğrisi

$$r^2 = 0.9990 \quad X_a = 335.96 U + 29.17$$

Heparin Roth'un üç fraksiyonunun bu standart eğri alanına girecek şekilde seyreltilmiş çözeltilerinin yapılan test sonucunda elde edilen anti X_a aktiviteleri Tablo 32'de verilmiştir.

Tablo 32. Heparin Roth'un üç fraksiyonunun anti X_a aktivitesi

	<u>Pih. zamanı</u> (saniye)	<u>U/ml</u>	<u>Stok</u> <u>seyreltmesi</u>	<u>Stok</u> <u>ünitesi</u>
Fraksiyon 1	40.0	0.032	1/500	16.00
Fraksiyon 2	61.6	0.096	1/1000	96.00
Fraksiyon 3	35.1	0.0226	1/10000	226.00
Total	41.6	0.037	1/10000	370.00

3.5. METAKROMATİK VE BİYOLOJİK METODLAR ARASINDAKİ KORRELASYON

3.5.1. METAKROMATİK AKTİVİTE SONUÇLARI İLE REKALSİFİKASYON ZAMANI SONUÇLARI ARASINDAKİ KORRELASYON

3.5.1.1. AZUR A İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.1.1.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.513 U - 0.0491$$

$$Re = 1248 U - 12$$

$$A = \frac{0.513 Re - 55.114}{1248}$$

$$Re = \frac{1248 A + 55.114}{0.513}$$

3.5.1.1.2. Heparin Roth

$$A = 0.407 U - 0.0161$$

$$Re = 978 U + 63.9$$

$$A = \frac{0.407 Re - 41.74}{978}$$

$$Re = \frac{978 A + 41.74}{0.407}$$

3.5.1.1.3. Heparin Sigma grade II

$$A = 0.254 U + 0.0238$$

$$Re = 1212 U - 3$$

$$A = \frac{0.254 Re + 29.6}{1212}$$

$$Re = \frac{1212 A - 29.6}{0.254}$$

3.5.1.1.4. Liquemine Roche

$$A = 0.286 U + 0.0148$$

$$Re = 1086 U + 34.5$$

$$A = \frac{0.286 Re + 6.255}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A - 6.255}{0.286}$$

3.5.1.1.5. Heparin Novo lente

$$A = 0.255 U + 0.0253$$

$$Re = 1086 U + 31.5$$

$$A = \frac{0.255 Re + 19.44}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A - 19.44}{0.255}$$

3.5.1.2. AZUR I İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.1.2.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.193 U + 0.0193$$

$$Re = 1248 U - 12$$

$$A = \frac{0.193 Re + 26.27}{1248}$$

$$Re = \frac{1248 A - 26.27}{0.193}$$

3.5.1.2.2. Heparin Roth

$$A = 0.1635 U + 0.0285$$

$$Re = 978 U + 63.9$$

$$A = \frac{0.1635 Re + 278.09}{978}$$

$$Re = \frac{978 A - 278.09}{0.1635}$$

3.5.1.2.3. Heparin Sigma grade II

$$A = 0.11 U + 0.0436$$

$$Re = 1212 U - 3$$

$$A = \frac{0.11 Re + 53.17}{1212}$$

$$Re = \frac{1212 A - 53.17}{0.11}$$

3.5.1.2.4. Liquemine Roche

$$A = 0.249 U - 0.0253$$

$$Re = 1086 U + 34.5$$

$$A = \frac{0.249 Re - 36.06}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A + 36.06}{0.249}$$

3.5.1.2.5. Heparin Novo lente

$$A = 0.175 U + 0.0341$$

$$Re = 1086 U + 31.5$$

$$A = \frac{0.175 Re + 31.52}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A - 31.52}{0.175}$$

3.5.1.3. AZUR II İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.1.3.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.261 U - 0.0027$$

$$Re = 1248 U - 12$$

$$A = \frac{0.261 Re - 0.238}{1248}$$

$$Re = \frac{1248 A + 0.238}{0.261}$$

3.5.1.3.2. Heparin Roth

$$A = 0.287 U + 0.0103$$

$$Re = 978 U + 63.9$$

$$A = \frac{0.287 Re - 8.26}{978}$$

$$Re = \frac{978 A + 8.26}{0.287}$$

3.5.1.3.3. Heparin Sigma grade II

$$A = 0.253 U - 0.0023$$

$$Re = 1212 U - 3$$

$$A = \frac{0.253 Re - 2.02}{1212}$$

$$Re = \frac{1212 A + 2.02}{0.253}$$

3.5.1.3.4. Liquemine Roche

$$A = 0.401 U - 0.056$$

$$Re = 1086 U + 34.5$$

$$A = \frac{0.401 Re - 74.64}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A + 74.64}{0.401}$$

3.5.1.3.5. Heparin Novo lente

$$A = 0.309 U - 0.0285$$

$$Re = 1086 U + 31.5$$

$$A = \frac{0.309 Re - 40.68}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A + 40.68}{0.309}$$

3.5.1.4. METİLEN MAVİSİ İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.1.4.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.464 U - 0.0368$$

$$Re = 1248 U - 12$$

$$A = \frac{0.464 Re - 40.36}{1248}$$

$$Re = \frac{1248 A + 40.36}{0.464}$$

3.5.1.4.2. Heparin Roth

$$A = 0.363 U - 0.01$$

$$Re = 978 U + 63.9$$

$$A = \frac{0.363 Re - 32.97}{978}$$

$$Re = \frac{978 A + 32.97}{0.363}$$

3.5.1.4.3. Heparin Sigma grade II

$$A = 0.406 U - 0.029$$

$$Re = 1212 U - 3$$

$$A = \frac{0.406 Re - 33.92}{1212}$$

$$Re = \frac{1212 A + 33.92}{0.406}$$

3.5.1.4.4. Liquemine Roche

$$A = 0.406 U - 0.0228$$

$$Re = 1086 U + 34.5$$

$$A = \frac{0.406 Re - 38.76}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A + 38.76}{0.406}$$

3.5.1.4.5. Heparin Novo lente

$$A = 0.381 U - 0.0113$$

$$Re = 1086 U + 31.5$$

$$A = \frac{0.381 Re - 24.27}{1086}$$

$$Re = \frac{1086 A + 24.27}{0.381}$$

3.5.2. METAKROMATİK AKTİVİTE SONUÇLARI İLE ANTI X_a ZAMANI SONUÇLARI ARASINDAKİ KORRELASYON

3.5.2.1. AZUR A İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.2.1.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.513 U - 0.0491$$

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

$$A = \frac{0.513 X_a - 35.8}{435.64}$$

$$X_a = \frac{435.64 A + 35.8}{0.513}$$

3.5.2.1.2. Heparin Roth

$$A = 0.407 U - 0.0161$$

$$X_a = 335.96 U + 29.17$$

$$A = \frac{0.407 X_a - 17.27}{335.96}$$

$$X_a = \frac{335.96 A + 17.27}{0.407}$$

3.5.2.2. AZUR I İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.2.2.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.193 U + 0.0193$$

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

$$A = \frac{0.193 X_a + 2.98}{435.64}$$

$$X_a = \frac{435.64 A - 2.98}{0.193}$$

3.5.2.2.2. Heparin Roth

$$A = 0.1635 U + 0.0285$$

$$X_a = 335.96 U + 29.17$$

$$A = \frac{0.1635 X_a + 4.81}{335.96}$$

$$X_a = \frac{335.96 A - 4.81}{0.1635}$$

3.5.2.3. AZUR II İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.2.3.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.261 U - 0.0027$$

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

$$A = \frac{0.261 X_a - 8.5}{435.64}$$

$$X_a = \frac{435.64 A + 8.5}{0.261}$$

3.5.2.3.2. Heparin Roth

$$A = 0.287 U + 0.0103$$

$$X_a = 335.96 U + 29.17$$

$$A = \frac{0.287 X_a - 4.9}{335.96}$$

$$X_a = \frac{335.96 A + 4.9}{0.287}$$

3.5.2.4. METİLEN MAVİSİ İLE YAPILAN METAKROMAZİ DENEYLERİNİN SONUÇLARINA GÖRE KORRELASYON

3.5.2.4.1. Heparin Sigma grade I

$$A = 0.464 U - 0.0368$$

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

$$A = \frac{0.464 X_a - 29.06}{435.64}$$

$$X_a = \frac{435.64 A + 29.06}{0.464}$$

3.5.2.4.2. Heparin Roth

$$A = 0.363 U - 0.01$$

$$X_a = 335.96 U + 29.17$$

$$A = \frac{0.363 X_a - 13.95}{335.96}$$

$$X_a = \frac{335.96 A + 13.95}{0.363}$$

3.5.3. ANTI X_a ZAMANI SONUÇLARI İLE REKALSİFİKASYON ZAMANI SONUÇLARI ARASINDAKİ KORRELASYON

3.5.3.1. Heparin Sigma grade I

$$X_a = 435.64 U + 28.1$$

$$Re = 1248 U - 12$$

$$X_a = \frac{435.64 Re + 39096.5}{1248}$$

$$Re = \frac{1248 X_a - 39096.5}{435.64}$$

3.5.3.2. Heparin Roth

$$X_a = 335.96 U + 29.17$$

$$Re = 978 U + 63.9$$

$$X_a = \frac{335.96 Re + 7060.38}{978}$$

$$Re = \frac{978 X_a - 7060.38}{335.96}$$

TARTIŞMA VE SONUÇ

Heparin daha evvelki çalışmalarda değişik yöntemlerle fraksiyone edilmiştir. Laurent, setil piridinyum klorür ile 4 fraksiyon elde etmiştir (85). Liberti ve Stivala, etanolle 8, dioksanla 6 fraksiyon ayırmıştır (83). Güven ve ark., sellüloz MN 300 ile preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi ile 3 fraksiyon ayırmış ve bunlardan yalnız birinin metakromatik reaksiyon gösterdiğini tesbit etmiştir (86). Danielsson ve Björk, Sephadex G 100 ile 5 fraksiyon elde etmiştir (89). Laurent ve ark., aynı sütundan 10 fraksiyon ayırmıştır (90). Radoff ve Danishefsky, Sepharoz üzerinden geçirdiği heparinden Sephadex G 200 ile 5 fraksiyon elde etmiştir (88). Aynı sütunda Hall ve Ricketts, farklı heparinlerden birinden 4, diğerinden 2 fraksiyon ayırmıştır (87). Cifonelli, Sephadex G 75 ile 4 fraksiyon elde etmiştir (92). Lasker ve Stivala, ECTEOLA ile 6 fraksiyon ayırmıştır (84). Laurent, aynı sütundan 4 fraksiyon elde etmiştir (94).

Biz ise, bu çalışmada Sephadex G 50 super fine ile fraksiyonlamayı yaptık. Sephadex G 50 medium grade ile Graham ve Pomeroy (93) 4 fraksiyon elde etmesine karşılık biz 3 fraksiyon elde ettik. Denemelerimizde farklı menşeli heparin (Roth, Sigma grade I) kullandık. Graham ve Pomeroy ise değişik 5.000 IU/ml lik injeksiyonluk heparin çözeltilerini kullanmıştır. Heparinin menşesine göre farklı fraksiyonlar verdiği bilinmektedir. Yukarıda belirtilen iki çalışma arasındaki farkın bundan ileri geldiğini düşünüyoruz.

Elde edilen fraksiyonların her birinin anti X_a aktivitesi yönünden incelendiğinde :

	anti X_a akt. U/ml	Tot.göre % akt.
A) Heparin Sigma grade I	449.00	100.00
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 1	23.50	5.23
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 2	142.50	31.73
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 3	276.00	61.46
B) Heparin Roth	370.00	100.00
Heparin Roth Fraksiyon 1	16.00	4.32
Heparin Roth Fraksiyon 2	96.00	25.94
Heparin Roth Fraksiyon 3	226.00	61.08

olduğu tesbit edilmiştir. Bu aktivite değerlerinden anlaşılabileceği gibi heparinin menşesine göre anti X_a aktiviteleri arasında da farklılıklar vardır.

	Metakromatik aktiviteye ait deney sonuçları: U/mg	Tot.göre % akt.
A) Heparin Sigma grade I	178	100.00
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 1	107	60.10
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 2	123	69.10
Heparin Sigma grade I Fraksiyon 3	201	112.90
B) Heparin Roth	155	100.00
Heparin Roth Fraksiyon 1	108	69.60
Heparin Roth Fraksiyon 2	118	76.10
Heparin Roth Fraksiyon 3	166	107.10

şeklindedir.

Bu durumda zayıf metakromazi gösteren Fr.1 ve Fr.2'lerin anti X_a aktivitelerinde düşük olduğu, kuvvetli metakromazi gösteren Fraksiyon 3'n anti X_a aktivitesinde çok yüksek olduğu grlmştir. Böylece he-

parinin fraksiyonları arasında, metakromatik aktivite ile anti X_a aktivitesi yönünden doğru orantılı bir bağıntı olduğu saptanmıştır.

Heparinin aktivitesinin tayin metodları arasındaki korrelasyonlar üzerinde yapılan çalışmalarda biyolojik metod ile metakromatik tayin arasındaki korrelasyon için genel anlamda lehinde(62,121) ve aleyhinde (4,58,122-129) görüşler vardır. İlk defa metakromatik tayin ile rekalsifikasyon veya trombin zamanı arasındaki korrelasyon Güven ve ark. tarafından verilmiştir (79).

Biz, bu çalışmamızda ise bundan ayrı olarak metakromatik ve anti X_a metodları ile tayin arasındaki korrelasyonu saptadık. Buna ilaveten anti X_a ve rekalsifikasyon zamanı arasındaki korrelasyonu da ortaya koyduk.

Böylece metakromatik ve biyolojik metodlar arasındaki korrelasyon ile biyolojik metodların kendi aralarındaki korrelasyon ortaya kondu. Bu şekilde herhangi bir heparine ait bir tayin metodunu kullanarak diğer bir tayin metoduna geçiş denklemleri verildi. Bunun, pratikteki öneminin büyük olduğu aşikardır.

Çalışma, heparinin fraksiyonlarının aktiviteleri yönünden incelenmesi yanında, tayin metodlarının birbiri ile mukayese ve bunun sonucu korrelasyonunu vermesi açısından yenilikler taşır.

ÖZET

Bu çalışmada değişik menşeli heparinlerin (Sigma grade I, Roth) Sephadex G 50 super fine sütunundan fraksiyonlandırılması yapılmıştır. Bu şekilde, fraksiyonlandırma çalışmalarında her iki ayrı menşeli heparinden üçer fraksiyon elde edilmiştir. Elde edilen fraksiyonların metakromatik ve anti X_a aktivite tayinleri yapılmış, fraksiyon 1 ve 2 lerin metakromatik ve anti X_a aktivitelerinin düşük, fraksiyon 3'lerin ise yüksek olduğu böylece metakromatik aktivite ile anti X_a aktivitesi arasında doğru orantılı bir bağıntı olduğu saptanmıştır.

Fraksiyonlandırılmaları yapılan heparin Sigma grade I ve heparin Roth'a ilaveten heparin Sigma grade II, Liquemine Rocheve heparin Novo lente ile metakromatik aktivite ve rekalsifikasyon zamanı tayinleri yapılmıştır. Metakromatik aktivite tayinlerinde Azur A, Azur I, Azur II ve metilen mavisi boyaları kullanılmıştır.

Yapılan metakromatik aktivite tayini, rekalsifikasyon zamanı ve anti X_a aktivitesi tayinlerinde elde edilen değerler arasındaki korrelasyon incelenmiş gerek metakromatik tayin ile biyolojik tayinler arasında ve gerek ise biyolojik tayinlerin kendi aralarında korrelasyon olduğu saptanmıştır.

SUMMARY

In this study, heparin samples Sigma grade I and Roth have been fractionated through Sephadex G 50 column and three fractions were obtained from each. Metachromatic and anti X_a activity studies have been carried out for each fraction and it was found that these activities were low for Fractions 1 and 2 but high for Fraction 3. It was also found that there is a linear relationship between the two activities.

In addition to fractionation studies, the metachromatic activity and recalcification time assays have been carried out for the same heparin samples and also for heparin Sigma grade II, Liquevine Roche and heparin Novo lente.

For the assay of metachromatic activity, Azure A, Azure I, Azure II and methylene blue dyes have been used.

According to the results obtained from metachromatic activity, recalcification time and anti X_a activity assays it was observed that there is a correlation among the three methods and the correlation equations were found.

KAYNAKLAR

1. Mc Lean, J. ; Am. J. Physiol., 41, 250 (1916).
2. Coyne, E. ; Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Vol 11 No 1, 10-12 (1985).
3. Johnson, E.A., Mulloy, B. ; Carbohydrate Research, 51, 119-127 (1976).
4. Jaques, L.B., Bruce-Mitford, M., Ricker, A.G. ; Rev. Can. Biol., 6, 740 (1947).
5. Awe, W., Studemann, K.D. ; Arzneim.-Forsch., 7, 624 (1957).
6. Graumann, W., Arnold, M., Gleissner, U. ; Acta Histochem., 23, 276 (1966).
7. Jaques, L.B., Wollin, A. ; Can. J. Physiol. Pharmacol., 45, 787 (1967).
8. U.S.P. XXI p. 481.
- 9- Seip, F.W., Carski, R.T., Kramer, N.D. ; J. Pharm. Sci., 56 (10), 1304 (1967).
- 10- Pritchard, J. ; J. Pharm. Pharmacol., 45, 787 (1967).
- 11- Howell, W.H. ; Am. J. Physiol., 63, 434 (1922-23).
- 12- Wehrmacher, W.H. ; Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Vol 11 No 2, 218 (1985).
13. Howell, W.H. ; Bull. Johns Hopkins Hosp., 42, 199 (1928) ; Foster, A.B., Huggard, A.J. ; Advances in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, New York, 10, 355 (1955).
14. Charles, A.F., Scott, D.A. ; J. Biol. Chem., 102, 425 (1933).
15. Fischer, A., Schmitz, A. ; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 216, 264 (1933).
16. Charles, A.F., Scott, D.A. ; Biochem. J. (London), 30, 1927 (1936).

17. Scott, D.A., Charles, A.F., Fischer, A.M. ; Trans. Roy. Soc. Can., Vol 36, 49 (1942). Lit. 13 ref'ına göre.
18. O'Keeffe, A.E., Shannon, J.A. ; U.S. Pat 2, 552, 507, May 15 (1951). C.A., 45, 6806 (1951)
19. Lee, J., Berger, L. ; U.S. Pat. 2, 561, 384, July 24 (1951). C.A., 45, 10515 (1951).
20. Bassiouni, M. ; J. Clin. Patho., 6, 39 (1953).
21. Toccaceli, N. ; U.S. Pat.3, 099, 600 (Cl.167-74) July 30 (1963). C.A., 59, 11195 (1963)
- 22- Remington's Pharm. Sciences 16'th Ed. p.769 (1980).
23. Walton, P.L., Ricketts, C.R., Bangham, D.R. ; Brit. J. Haemat., 12, 310 (1966).
24. Kayaalp, O. ; Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2, 1255 (1985) Ulucan Matbaası Ankara.
25. Danishefsky, I., Eiber, H.B., Langholtz, E. ; J. Biol. Chem., 237, 1413 (1962).
26. Danishefsky, I., Steiner, H., Bella, A., Friedlander, A.Jr. ; J. Biol. Chem., 244, 1741 (1969).
27. Meyer, K.H., Schwartz, D.E. ; Helv. Chim. Acta, 33, 1651 (1950)
28. Jaques, L.B., Kavanagh, L.W., Mazurek, M., Perlin, A.S. ; Biochem. Biophys. Res. commun., 24/3, 447 (1966)
29. Wilander, O. ; Skand. Arch. Physiol., Suppl., 15, 89 (1939).
30. Lindahl, U., Cifonelli, A.C., Lindahl, B., Rodén, L. ; J. Biol. Chem., 240, 2817 (1965).
31. Gregory, J.D., Laurent, T.C., Rodén, L. ; J. Biol. Chem. 239, 3312 (1964).
32. Lindahl, U. ; Biochim. Biophys. Acta, 130, 361 (1966).
33. Lindahl, U. ; Biochim. Biophys. Acta, 130, 368 (1966).

34. Bell, F.K., Kantz, J.C. ; J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 39, 94 (1950).
35. Foster, A.B., Martlew, E.F. ; Lit.13 ref.ına göre.Neşredilmemiş yayın.
36. Sugisaka. N., Petracek, F.C. ; Federation Proceedings, 36, 89-92 (1977).
37. Lasker, S.E. ; Federation Proceedings, 36, 92-97 (1977).
38. Lathrop, K.A., Allen, J.G. ; Am. Pharm. Assoc. Sci.Ed., 43, 7, 442 (1954).
39. Burson, S.L., Fahrenbach, J.M.Jr., Frommhagen, L.H., Riccardi, B.A., Brown, R.A., Brockman, J.A., Lewry, H.V., Stokstad, E.L.R. ; J. Am. Chem. Soc, 78, 5874 (1956).
40. Wolfrom, M.L., Juliano, B.O. ; J. Am. Chem. Soc., 82, 2588 (1960).
41. Molho, M.D., Molho-Lacroix, L. ; Compt. Rend., 235, 522 (1952).
42. Awe, W., Studemann, K.D. ; Arzneim.-Forsch., 6, 349 (1956).
43. Picard, J. ; J. Chromatog., 7, 223 (1962).
44. Bayer, J. ; J. Chromatog., 8, 117 (1962).
45. Castor, C.W., Dorstewitz, E.L. ; J. Chromatog., 13, 157 (1964).
46. Güyen, K.C., Ertan, G. ; Eczacılık Bülteni, Vol XVIII, 61 (1976).
47. Ferrari, L., Boffi, C. ; Il Farmaco XXV, 130 (1970).
48. Güyen, K.C., Arabacıoğlu, F., Ertan, G. ; Eczacılık Bülteni, Vol XVII, 76-80 (1975).
49. Bischel, M.D., Austin, J.H., Kemeny, M.D., Hubble, C.M., Lear, R.K. ; J. Chromatog., 21, 40 (1966).
50. Jörpes, E. ; Biochem. J., 29, 1817 (1935).

51. Lison, L. ; Arch. Biol., 46, 599 (1935).
52. Michaelis, L. ; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 12, 131 (1947).
Lit.57'nin ref'ina göre.
53. Schubert, M., Hamerman, D. ; J. Histochem. Cytochem., 4, 159 (1956)
Lit.57'nin ref'ina göre.
54. Szabo, I., Kelentey, B., Valyi-Nagy, T. ; Arzneim.-Forsch., 13, 961
(1963).
55. Udupa, K.N., Dunphy, J.E. ; J. Histochem. Cytochem., 4, 448 (1956)
C.A. 50, 16906 (1956).
56. Krygier, A., Kasprzyk, K. ; Acta Med. Polona 2, 123 (1961)
C.A., 56, 5057 (1962).
57. Perrin, J.H., Hart, P.A. ; J. Pharm. Sci. 59, 436 (1970).
58. Jaques, L.B. ; Can. J. Biochem. Physiol., 39, 643 (1961).
59. Zelenin, A.V., Stepanova, N.G. ; Arkh. Anat. Cistol. Embriol.,
54 (2), 82 (1968); C.A., 69, 640 (1968).
60. Jaques, L.B. ; Biochem. J., 37, 189 (1943).
61. Güven, K.C., Ertan, G. ; Acta Pharm. Turcica Vol XXV, 38-40 (1983).
62. MacIntosh F.C. ; Biochem. J., 35, 776 (1941).
63. Güven, K.C., Ertan, G. ; Acta Pharm. Turcica, Vol XXVII, 38-41 (1985).
64. Güven, K.C., Ertan, G. ; Acta Pharm. Turcica, Vol XXVI, 20-23 (1984).
65. Kaluzhenko, R.K., Murchakova, A.F. ; Lab. Delo, 7, 392 (1966).
C.A., 65, 12549 (1966)
66. Kaller, H. ; Arch. Int. Pharmacodynamie, 99, 163 (1954). C.A., 49, 6353 (1955)
67. LeRoy, G.V., Halpern, B.N., Dolkart, R.E. ; J. Lab. Clin. Med., 35, 446
(1950). C.A., 44, 6470 (1950).
68. Refn, I., Vestergaard, L. ; Scand. J. Clin. Lab. Invest., 6, 284 (1954)
C.A., 49, 8362 (1955)

69. Blomback, B., Blomback, M., Corneliussen, E.V., Jorpes, J.E. ;
J. Pharm. Pharmacol., 5, 1031 (1953).
70. Hiyama, N., Maki, M., Miyazawa, Y. ; Hirosaki Med. J., 7, 284
(1956). C.A., 51, 1398 (1957).
71. Wolfrom, M.L., Mc Neeley, W.H. ; J. Am. Chem. Soc., 67, 748 (1945).
72. Jalling, O., Jorpes, J.E, Lindén, G. ; J. Pharm. Pharmacol., 14, 1
(1941).
73. British Pharmacopeia, p.220 (1980).
74. Jaques, L.B., Charles, A.F. ; Quart. J. Pharm. Pharmacol., 14, 1.
(1941).
75. Kjems, H. Wagner, H. ; Acta Pharmacol., 4, 155 (1948) . Lit. 68
ref'ına göre.
76. Studer, A. Winterstein, A. ; Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 9, 6
(1950).
77. Güven, K.C., Ertan, G. ; Acta Pharm. Turcica Vol XXVI, 63 (1984).
78. Güven, K.C., Ertan, G. ; Acta Pharm. Turcica Vol XXVI, 34 (1984).
79. Güler, E., Güven, K.C. ; Acta Pharmaceutica Turcica Vol XXX, 49-52
(1988).
80. Altéscu, E.J. ; J. Pharm. Pharmacolo., XV, 488 (1963).
81. Fekete, G. ; Naturwiss., 43, 279 (1956). C.A., 53, 17424 (1959).
82. Vachek, J., Eckschlager, K., Nekvasilova, M. ; Cesk. Farm. 15/5,
260 (1966). C.A., 65, 15161 (1966).
83. Liberti, P.A., Stivala, S.S. ; Arch. Biochem. Biophys., 119, 510
(1967).
84. Lasker, E.S., Stivala, S.S. ; Arch. Biochem. Biophys., 115, 360
(1966).
85. Laurent, T.C. ; Arch. Biochem. Biophys., 92, 224 (1961).

86. Güven, K.C., Arabacıoğlu, F., Aktin, E., Ulutin, S.B., Koyuncuoğlu, H.,
Die Pharmazeutische Industrie, 36, Nr 3, 205 (1974).
87. Hall, M., Ricketts, C.R. ; J. Pharm. Pharmacol., 21, 626 (1969).
88. Radoff, S., Danishefsky, I. ; Arch. Biochem. Biophys., 215, 163 (1982).
89. Danielsson, A., Björk, I. ; Biochemical Journal, 193, 427 (1981).
90. Laurent, T.C., Tengblad, A., Thunberg, L., Höök, M., Lindahl, U. ;
Biochem. J., 175, 691 (1978).
91. Skalka, M. : Journal of Chromatography, 33, 456 (1965).
92. Cifonelli, C.A. ; Carbohydrate Research, 37, 145 (1974).
93. Graham, D.T., Pomeroy, A.R. ; Thromb. Haemostas., 42, 1598 (1979).
94. Mac Gregor, I.R., Lane, D.A., Kakkar, V.V. ; Biochemical Society
Transactions, 6, 214 (1978).
95. Ringertz, N.R., Reichard, P. ; Acta Chem. Scand., 14, 303 (1960)
96. Fareed J. ; Seminars in Thrombos. Haemostas., Vol 11/1, 1 (1985).
97. Goth, A. ; Tıbbi Farmakoloji Tercüme : Kaymakçalan, Ş., Kayaalp, O.,
Kıran, K.B., Ankara Üniversitesi. Basımevi Yayını No: 251, 464 (1971).
98. Levy, S.W. ; Rev. Can. Biol., 17, 1 (1958).
99. Skorepa, J., Prochazka, J., Todorovicova, H. : Clin. Chim. Acta,
5, 296 (1960).
100. Pav, J, Wenkeova, J. ; Clin. Chim. Acta, 5, 90 (1960).
101. Shore, B., Shore V. ; Am. J. Physiol., 201, 915 (1961).
102. Vogel, W.C., Bierman, E.L. : J.Lipid. Res., 8, 46 (1967).
103. Levy, S.W. : Can. J. Biochem., 46, 289 (1968).
104. Gartnar, S.L., Vahouny, G.V. ; Am. J. Physiol. 211, 1063 (1969).
105. Dole, V.P. ; J. Clin. Invest., 35, 150 (1956).

106. Gordon, S. Jr., Cherkes, A., Gates, H. ; J.Clin. Invest., 36, 810 (1957).
107. Baker, S.P. : Circulation, 14, 96 (1956). Ibid. 15, 889 (1957).
108. Duncombe, W.G. ; Biochem. J. 83 6P (1962).
109. Itaya, K., Ui, M. ; J. Lipid Res., 6, 16 (1965).
110. Novak, M. ; J. Lipid Res., 6, 431 (1965).
111. Laurell, S., Tibbling, G. ; Clin. Chim. Acta, 16, 57 (1967).
112. Scott, D. A., Charles, A.F. ; J.Biol. Chem, 102, 437 (1933).
113. Yosizawa, Z., Kotoku, T., Yamauchi, F., Matsuno, M. ; Biochim. Biophys. Acta 141, 358 (1967).
114. Wutkiewicz, M. ; Farmaiija Polska 26, 803 (1970) : Zbl. Pharm. 111, 311 (1972).
115. Hejgard, J.J. ; Arch. Pharm. Chemi.,72 (1), 1 (1965) C.A., 63.1664 (1965).
116. Dietrich, C.P. ; Biochem. J., 108, 647 (1968).
117. Pritchard, J. : J. Pharm. Pharmacol., 16, 487 (1964).
118. Krowczyński, L., Parafinska, Z., Zaduminski, M. ; Acta Polon. Pharm., 20/3, 265 (1963). C.A., 62, 404 (1965).
119. Beck, S.H. ; U.S. Pat. 3, 039, 931, June 19 (1963). C.A., 57, 7396 (1962).
120. Homan, J.D.H., Hasenack, H.K., Matthijsen, R. ; Dutch 76, 326, Nov 15 (1954). C.A., 49, 11966 (1955).
121. Levy, S.W., Jaques, L.B. ; Thrombosis Research, 13, 429 (1978).
Lit. 79' un ref.ına göre.
122. Copley, A.L., Whitney, D.V. ; J. Lab. Clin. Med., 28, 762 (1943).
Lit. 79' un ref.ına göre

- 123- Astrup, P. ; Acta Pharmacol., 3, 165 (1947). Lit. 79'un ref.ına göre.
124. Monkhouse, F.C., Jaques, L.B. ; J. Lab. Clin. Med., 36, 782 (1950).
Lit. 79'un ref.ına göre.
125. Jaques, L.B., Napke, E., Levy, S.W. ; Circulation Research, 1, 321
(1953). Lit. 79'un ref.ına göre.
126. Bassiouni, M. ; J. Clin. Path., 7, 330 (1954). Lit. 79'un ref.ına göre.
127. Jaques, L.B., Kavanagh, L., Lavellée, A. ; Arzheim.- Forsch.(Drug Res.)
17, 744 (1967). Lit. 79'un ref.ına göre.
128. Kavanagh, L.W., Jaques, L.B. ; Arzheim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 605
(1973). Lit. 79'un ref.ına göre.
129. Maryola, M., Leppanen, M.L., Koskimies, A. ; Farm. Aikak. 83, 137
(1974). Lit. 79'un ref.ına göre.