



آموزش مبانی دستگاه یوشیمی

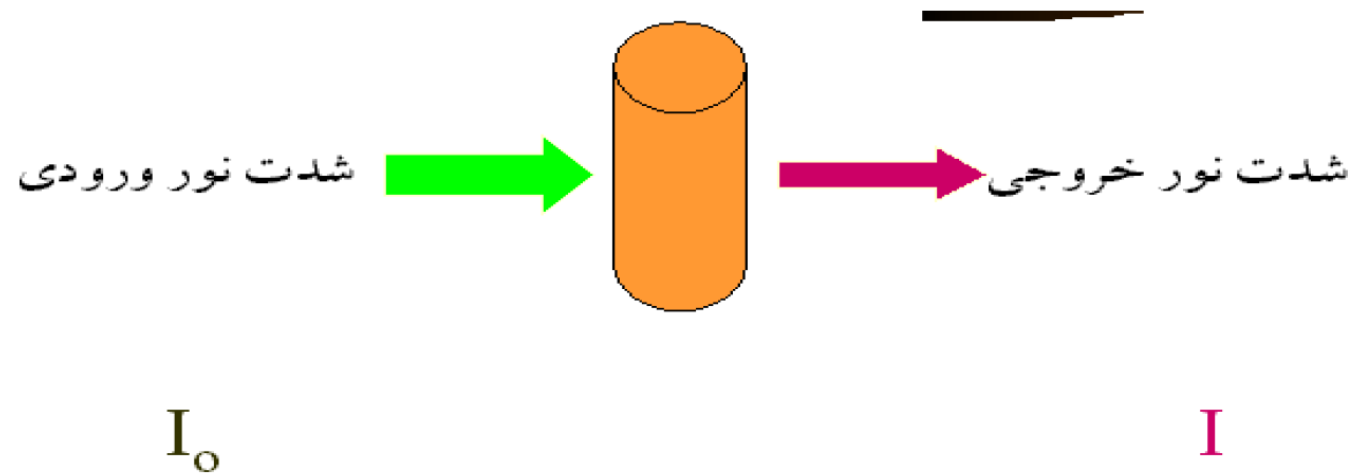
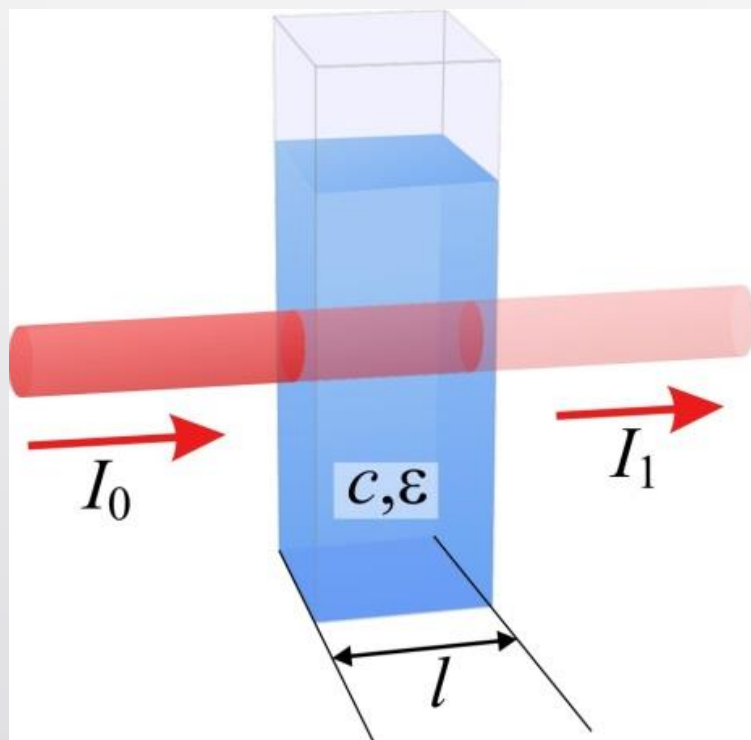
آشنایی با اصول طیف سنجی

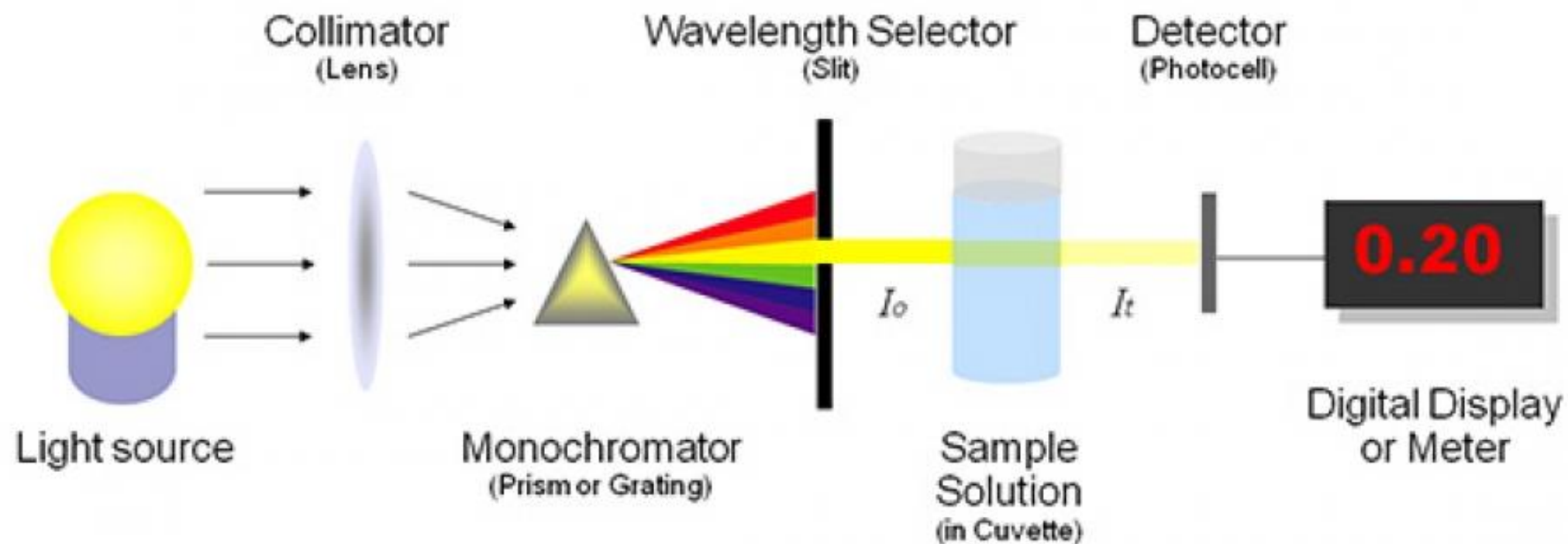
- طیف سنجی: به شاخه ای از علوم برمی گردد که در آن نور، به طول موج های تشکیل دهنده خود جهت تولید طیف تجزیه می شود. ابزار قوی برای بررسیهای کمی و کیفی است. محدوده طول موج ۷۵۰-۳۸۰ نانومتر مرئی می باشد.
- محلول نیمه شفاف: فقط قسمتی از اشعه نورانی توسط محلول جذب گردیده و شدت نور خروجی از نور ورودی کمتر می باشد. $I < I_0$
- قانون بیر و لامبرت: (Beer & Lambert)
- قانون بیر : هنگامیکه نور تک رنگی از داخل محلول عبور نماید، میزان نور جذب شده متناسب با غلظت ملکولهای بیست که در مسیر اشعه نورانی قرار گرفته و نور را جذب می کنند.
- قانون لامبرت : طبق این قانون، تحت شرایط مساوی، شدت نور خارج شده با افزایش طول مسیری که نور از محلول عبور می کند کاهش میابد.

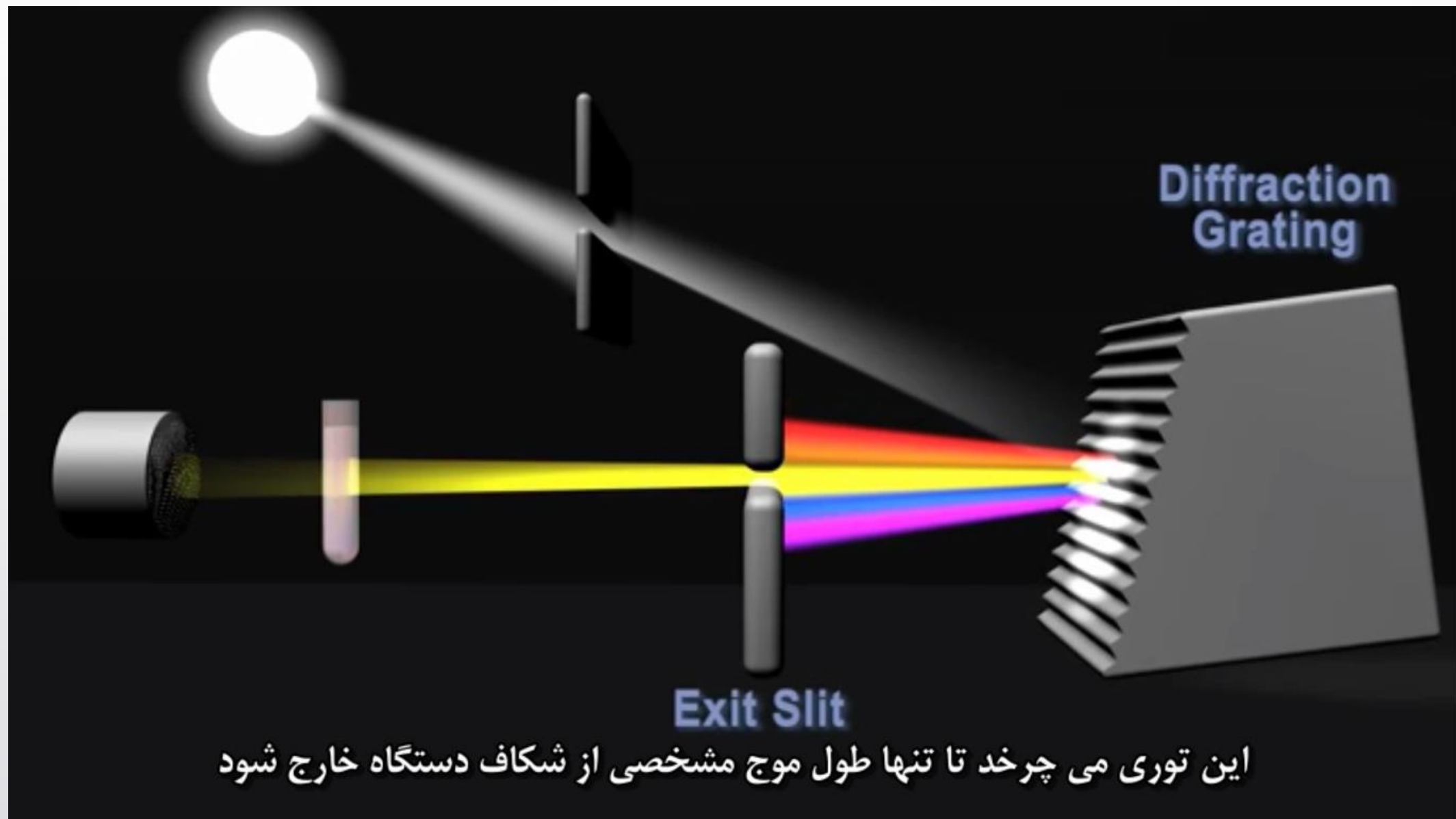
مذب نوری

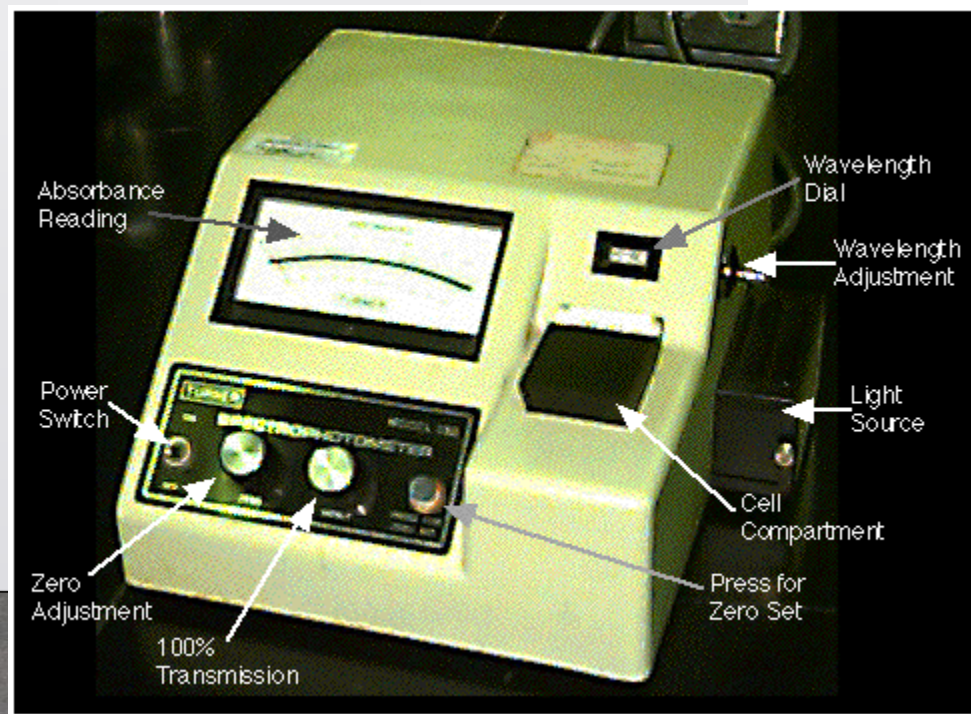
- مقدار نوری که جذب محلول رنگی می شود جذب نوری و یا Absorbance گفته می شود. که اگر مسیر عبور نور برابر با یک سانتیمتر باشد در این صورت به آن دانسیته اپتیک و یا Optical Density گفته می شود. که مخفف آن OD می باشد.
- جهت اندازه گیری OD از دستگاه اسپکترو فتومتر و یا فتومتر استفاده می شود.
- بعد از آن توسط استانداردهای مخصوص هر تست OD خوانده شده را می توان به غلظت تست مورد نظر تبدیل کرد. برای خوانش OD از یکی از متد های بیوشیمی که در ادامه توضیح داده خواهد شد استفاده می شود.

طریقه خوانش در دستگاه های فتومتر











بیوشیمی پایه

متمدهای بیوشیمی:

1-end point

2-fixed time

3-kinetick

اساس رنگ سنجی توسط یکی از متمدهای بالا با کالیبراسیون متفاوت

End point

- نقطه پایانی، پس از گذشت زمان انکوباسیون به یک رنگ ثابت می رسیم.
- زمان در آن مهم نیست و معمولا رنگ ایجاد شده نیم الی یک ساعت پایدار است.
- عموما کیت‌های رنگی هستند و نیاز به گرفتن بلانک ریجنت می باشد.مانند
GLU,CHO,TG,ALB,CA,PHO,TP,U.A ,...
- عموما تک ریجنت می باشند و در مواردی دو ریجنت هستند که به آنها endpoint two point می
sample blank گفته می شود.
- مانند BIT,BID,HDL,LDL,FE,TRANS,...

نمونه بروشور کیت point میزان حجم سمپل و ریجنت طول موج خوانش زمان خوانش و انکوباسیون میزان و خطی بودن و ...



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NO Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at

Liquid Reagent – ready to use

ALBUMIN

BCG

Single Reagent

Diagnostic Reagent for quantitative in vitro determination of Albumin in human serum or plasma on photometric systems.

REF	Kit Size	Configuration
D95557B	1 x 10 L	Single Reagent
D97202B	1 x 1000 mL	Single Reagent
D09550	4 x 250 mL	Single Reagent
D97203	5 x 100 mL	Single Reagent
D00204	5 x 50 mL	Single Reagent
D00205	5 x 25 mL	Single Reagent
D00206	5 x 10 mL	Single Reagent
D51911	10 x 50 mL	Single Reagent
D0401917	9 x 65 mL	Single Reagent
DA0801	5 x 50 mL	Single Reagent
DT1001	4 x 50 mL	Single Reagent
DK0701	5 x 50 mL	Single Reagent
DB0901	2 x 150 mL	Single Reagent

Additionally offered:

D95555	1 x 3 mL	Albumin Standard	
D98485	5 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98485SV	1 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98481	12 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D14481	5 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98481SV	1 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98482	12 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D14482	5 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D98482SV	1 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P

TEST PARAMETERS

Method:	Colorimetric, Endpoint, Increasing Reaction, BCG
Wavelength:	Hg 546 nm, 540 – 600 nm
Temperature:	20 – 25 °C / 37 °C
Sample:	Serum, heparin or EDTA plasma
Linearity:	up to 6 g/dL
Sensitivity:	The lower limit of detection is 0.2 g/dL

REAGENT COMPOSITION

STANDARD

(not included in the kit; has to be ordered separately)

Concentration	5 g/dL (50 g/L)
Storage:	2 – 8 °C
Stability:	up to the indicated expiration date

CLOSE IMMEDIATELY AFTER USE!

INTERFERING SUBSTANCES

no interference up to:

Ascorbic acid	30 mg/dL
Bilirubin	40 mg/dL
Hemoglobin	400 mg/dL
Triglycerides	500 mg/dL

For further information on interfering substances refer to Young DS [5].

MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.

Pipette into test tubes	Blank	Std./Cal.	Sample
Reagent	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Sample	-	-	10 µL
Std./Cal.	-	10 µL	-
Dist. water	10 µL	-	-

Mix, incubate for approx. 10 min. at 20 – 25 °C / 37 °C and read absorbance against reagent blank within 60 min.

CALCULATION

$$\text{Albumin (g/dL)} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std./Cal.}} \times \text{Conc. of Std./Cal (g/dL)}$$

UNIT CONVERSION

$$\text{g/dL} \times 10 = \text{g/L}$$

$$\text{g/dL} \times 144.9 = \mu\text{mol/L}$$

REFERENCE RANGE [4] *

	g/dL	g/L	µmol/L
Adults:	3.5 - 5.2	35 - 52	507 - 756

* Each laboratory should check if the reference ranges are transferable to its own patient population and determine own reference ranges if necessary.

DIAGNOSTIC IMPLICATION [1,2]

Measurement of albumin in serum is used for diagnosis and monitoring of liver diseases, e.g. liver cirrhosis. Furthermore, albumin levels indicate the health and nutritional status of an individual and, therefore, are used for detecting malnutrition and for prognosis in elderly hospitalized patients.

End point نمودار تست
Abs بر حسب زمان

Y-VALUES



Fixed time

رنگ واکنش به مقدار ثابت نمی رسد، و پس از گذشت زمان انکوباسیون با یک شیب ثابت در حال افزایش است که جهت اندازه گیری جذب نوری در این تستها نیاز به اندازه گیری دو نقطه جذب نوری در زمان های مختلف می باشد. عموماً دوریجنت می باشند که در این صورت می توان دو ریجنت را به صورت مخلوط شده استفاده نمود.

تسهای URE, CRE

نمودار جذب نوری بر حسب زمان

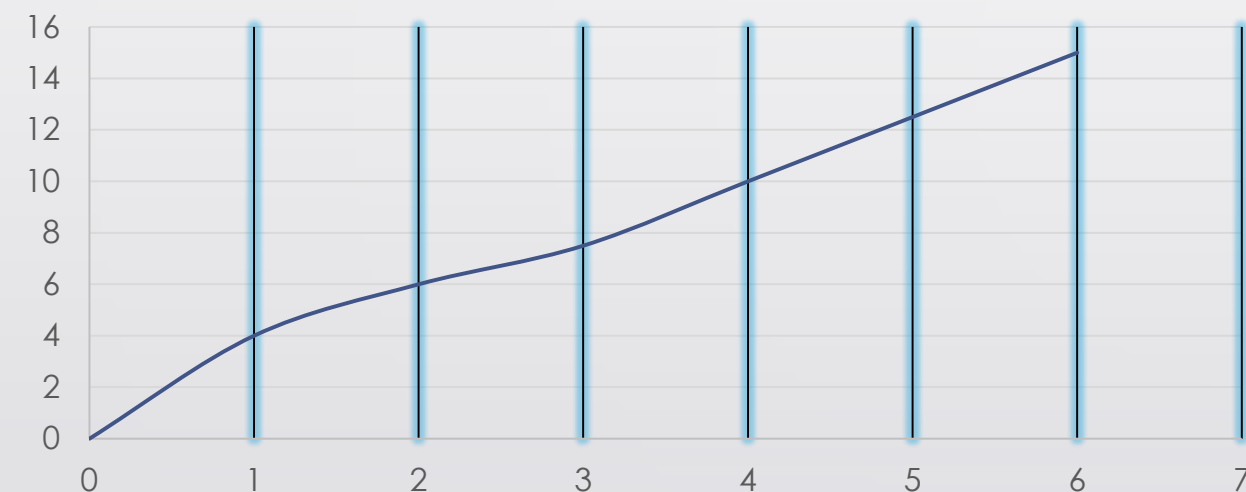
- زمان انکوباسیون از مبدا تا لحظه خطی شدن نمودار یعنی زمان ۰ تا ۳

- زمان خوانش شروع از لحظه خطی شدن تا زمان اعلام شده توسط بروشور

- یعنی بین زمان ۳ و ۴، پس اندازه گیری دو نقطه برای یافتن شیب خط اجباریست

- فرمول محاسبه $(Abs3 - Abs6) / (T3 - T6)$

Y-Values



CREATININE

mod. Jaffe
2 Reagents

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of creatinine in human serum, plasma or urine on photometric systems

REF	Kit Size	Content
D96596B	1 x 12.5 L	1 x 10 L R1 + 1 x 2.5 L R2
D03111B	1 x 1.25 mL	1 x 1 L R1 + 1 x 250 mL R2
D95595	5 x 100 mL	4 x 100 mL R1 + 1 x 100 mL R2
D00616	5 x 50 mL	4 x 50 mL R1 + 1 x 50 mL R2
D00617	5 x 25 mL	4 x 25 mL R1 + 1 x 25 mL R2
D00618	5 x 10 mL	4 x 10 mL R1 + 1 x 10 mL R2
D66911	10 x 50 mL	10 x 40 mL R1 + 4 x 25 mL R2
D0422917	5 x 62.5 mL	4 x 62.5mL R1 + 1 x 62.5mL R2
DA0823	5 x 50 mL	5 x 40 mL R1 + 5 x 10 mL R2
DB0922	2 x 150 mL	2 x 120 mL R1 + 2 x 30 mL R2
DK0722	5 x 50 mL	4 x 50 mL R1 + 1 x 50 mL R2
DT1023	4 x 62.5 mL	4 x 50 mL R1 + 4 x 12.5mL R2

Additionally offered:

D94592	1 x 3 mL	Creatinine Standard	
D98485	5 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98485SV	1 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98481	12 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D14481	5 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98481SV	1 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98482	12 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D14482	5 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D98482SV	1 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D08581	12 x 5 mL	Urine Ctrl. normal	Diacon Urine Level 1
D08581SV	1 x 5 mL	Urine Ctrl. normal	Diacon Urine Level 1
D08582	12 x 5 mL	Urine Ctrl. abnormal	Diacon Urine Level 2
D08582SV	1 x 5 mL	Urine Ctrl. abnormal	Diacon Urine Level 2

TEST PARAMETERS

Method:	Colorimetric, 2 Point Kinetic, "mod. Jaffe", Increasing reaction
Wavelength:	Hg 492 nm (490 nm - 510 nm)
Temperature:	20°C-25°C / 37°C
Sample:	Serum, heparin plasma, urine
Linearity:	up to 15 mg/dL (1330 µmol/L)
Sensitivity:	Lower limit of detection: 0.2 mg/dL (17.7 µmol/L)

SUMMARY [1,2]

Creatinine is a waste product excreted by the kidneys mainly by glomerular filtration. The concentration of creatinine in plasma of a healthy individual is fairly constant, independent from water intake, exercise and rate of urine production. Therefore, increased plasma creatinine values always indicate decreased excretion, i.e. impaired kidney function. The creatinine clearance enables a quite good estimation of the glomerular filtration rate (GFR) which allows better detection of kidney diseases and monitoring of renal function. For this purpose creatinine is measured simultaneously in

SAMPLE PREPARATION

Urine: Dilute urine 1 + 49 with dist. water. Multiply result by 50. (The urine controls Diacon Urine must be prediluted n the same way as patient samples.)

SAMPLE STABILITY AND STORAGE [5]

serum/heparin plasma:	at 4 – 25 °C	7 days
	at -20 °C	at least 3 months
urine:	at 20 – 25 °C	2 days
	at 4 – 8 °C	6 days
	at -20 °C	6 months

Freeze only once. Discard contaminated specimens.

STANDARD

(has to be ordered separately)
Concentration: 2 mg/dL (177 µmol/L)
Storage: 2 – 25 °C
Stability: up to the expiration date
Close immediately after use!

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

NaCl solution (9 g/L)
General laboratory equipment

MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.

Substrate Start

Pipette into test tubes	Blank	Std./Cal.	Sample
Reagent 1	1000 µl	1000 µL	1000 µL
Sample	-	-	50 µL
Std./Cal.	-	50 µL	-
Mix. Incubate 0 - 5 min., then add:			
Reagent 2	250 µL	250 µL	250 µL
Mix. Incubate 1 min. and read A1 against reagent blank. Incubate for exactly 2 min. and read A2 against reagent blank. Calculate: ΔA = (A2 - A1) sample or standard			

Sample Start

Pipette into test tubes	Blank	Std./Cal.	Sample
Working Reagent	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Sample	-	-	50 µL
Std./Cal.	-	50 µL	-
Mix. Incubate 1 min. and read A1 against reagent blank. Incubate for exactly 2 min. and read A2 against reagent blank. Calculate: ΔA = (A2 - A1) sample or standard			

CALCULATION

Serum/Plasma:

$$\text{Creatinine [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std/Cal}} \times \text{Conc. Std/Cal [mg/dL]}$$

Urine:

$$\text{Creatinine [mg/dL]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Std/Cal}} \times \text{Conc. Std/Cal [mg/dl]} \times 50$$

Creatinine Clearance [7]

$$[\text{mL/min}/1.73 \text{ m}^2] = \frac{\text{mg Creatinine}/100 \text{ ml Urine} \times \text{ml Urine (24 h)}}{\text{mg Creatinine}/100 \text{ ml Serum} \times 1440}$$

The calculated creatinine clearance refers to the average body surface

بروشور تست FixedTime

kinetic

- تستهای آنزیمی به این روش محاسبه می شوند که Abs بعد از زمان انکوباسیون به صورت صعودی و یا نزولی و غیر خطی حول محور یک خط تغییر می کند.
- محاسبه فاکتور در این تستها پیچیده می باشد به همین خاطر در بروشور تست فاکتور مشخص می شود. برای محاسبه Abs نیاز به اندازه گیری بیش از سه نقطه می باشد. به صورت که اختلاف Abs از نقطه قبل را با یکدیگر جمع و بر تعداد آن تقسیم می کنیم و عدد حاصله را در فاکتور داده شده در بروشور ضرب می کنیم. این تستها معمولا دو ریجنت می باشند و دارای استاندارد نیستند.
- نمودار آنها مشابه نمودار تست های fixedtime می باشند.
- مانند تستهای: GOT, GPT, ALP, CPK, CKMB, LDH, AMY, LIP, GGT, ALD

Liquid Reagents – ready to use

ALKALINE PHOSPHATASE

opt. DGKC

2 Reagents

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of alkaline phosphatase (ALP) in human serum or plasma on photometric systems

Ref.No.	Kit Size	Content
D96566B	1 x 12.5 L	1 x 10 L R1 + 1 x 2.5 L R2
D03102B	1 x 1.25 mL	1 x 1 L R1 + 1 x 250 mL R2
D95560	5 x 100 mL	4 x 100 mL R1 + 1 x 100 mL R2
D95561	5 x 50 mL	4 x 50 mL R1 + 1 x 50 mL R2
D00568	5 x 25 mL	4 x 25 mL R1 + 1 x 25 mL R2
D00569	5 x 10 mL	4 x 10 mL R1 + 1 x 10 mL R2
D53911	10 x 50 mL	10 x 40 mL R1 + 4 x 25 mL R2
D0403917	5 x 62.5 mL	4 x 62.5mL R1 + 1 x 62.5mL R2
DA0802	5 x 50 mL	5 x 40 mL R1 + 5 x 10 mL R2
DT1002	4 x 62.5 mL	4 x 50 mL R1 + 4 x 12.5mL R2
DK0702	5 x 50 mL	4 x 50 mL R1 + 1 x 50 mL R2
DB0902	2 x 150 mL	2 x 120 mL R1 + 2 x 30 mL R2

Additionally offered:

D98485	5 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98485SV	1 x 3 mL	Calibrator	Diacal Auto
D98481	12 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D14481	5 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98481SV	1 x 5 mL	Control normal	Diacon N
D98482	12 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D14482	5 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P
D98481SV	1 x 5 mL	Control abnormal	Diacon P

TEST PARAMETERS

Method:	Colorimetric, kinetic, increasing reaction, optimized DGKC
Wavelength:	405 nm (400 – 420 nm)
Temperature:	37°C
Sample:	Serum, heparin plasma
Linearity:	up to 800 U/L (manual test procedure) up to 4500 U/L (automatic test procedure)
Sensitivity:	The lower limit of detection is 3 U/L

SUMMARY [1,2]

Alkaline Phosphatase (ALP), a hydrolytic enzyme acting optimally at alkaline pH, exists in blood in numerous distinct forms which originate mainly from bone and liver, but also from other tissues as kidney, placenta, testes, thymus, lung and tumours. Physiological increases are found during bone growth in childhood and in pregnancy, while pathological increases are largely associated with hepatobiliary and bone diseases. In hepatobiliary disease they indicate obstruction of the bile ducts as in cholestasis caused by gall stones, tumours or inflammation. Elevated activities are also observed in infectious hepatitis. In bone diseases elevated ALP activities originate from increased osteoblastic activity as in Paget's disease, osteomalacia (rickets), bone metastases and hyperparathyroidism.

TEST PRINCIPLE

p-Nitrophenylphosphate + H₂O $\xrightarrow{\text{ALP}}$ p-Nitrophenol + Phosphate

Under alkaline condition, colorless p-nitrophenol is converted to

REAGENT PREPARATION

Substrate Start:

The reagents are ready to use.

Sample Start:

Mix 4 parts of Reagent 1 with 1 part of Reagent 2
(= Working Reagent)

REAGENT STABILITY AND STORAGE

Conditions:	Protect from light. Close immediately after use. Avoid contamination. Do not freeze the reagents!
-------------	--

Substrate Start:

Storage:	at 2 – 8 °C
Stability:	up to the expiration date indicated on labels
Sample Start (Working Reagent):	
Stability:	at 2 – 8 °C 4 weeks at 15 – 25 °C 5 days

The working reagent must be protected from light!

SAMPLE STABILITY AND STORAGE

Stability [4]:	at 20 – 25 °C 7 days at 4 – 8 °C 7 days at - 20 °C 2 months
----------------	---

Discard contaminated specimens!

Freeze only once!

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

NaCl solution (9 g/L)

General laboratory equipment

MANUAL TEST PROCEDURE

Bring reagents and samples to room temperature.

Substrate Start

Pipette into test tubes	37°C
Reagent 1	1000 µL
Sample	20 µL
Mix. Incubate for approximately 1 minute. Then add:	
Reagent 2	250 µL
Mix. Read initial absorbance against air after 1 minute and start a stopwatch. Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 min. Determine ΔA/min. during the linear part of the assay.	

Sample Start

Pipette into test tubes	37°C
Working Reagent	1000 µL
Sample	20 µL
Mix. Read initial absorbance against air after 1 minute and start a stopwatch. Read absorbance again after exactly 1, 2 and 3 min. Determine ΔA/min. during the linear part of the assay.	

CALCULATION

With factor: (light path 1 cm)

Alkaline Phosphatase [U/L] = ΔA/min x Factor

Factors (405 nm, 37°C):	Substrate Start: 3433 Sample Start: 2757
-------------------------	---

With calibrator:

$$\text{ALP [U/L]} = \frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Calibrator}} \times \text{Conc. Calibrator [U/L]}$$

UNIT CONVERSION

kinetic ,rate *نمونه پرورشور تست*



• تهیه و نگارش : محمد رشیدی