# الجلسة العملية 2

## رسم منحنى المعايرة + معايرة الغلوكوز باستخدام منحنى المعايرة

د. سامر حاج قدور

# طريقة حساب تركيز مادة مجهولة :

1. استخدام المحلول العياري : نستخدمه في أغلب المعايرات الكيميائية
2. استخدام قانون بيير لامبرت مباشرة : نستخدمه في الأنزيمات
3. رسم منحنى المعايرة : نستخدمه في المعايرات التي تحتاج دقة كبيرة

# حالات رسم منحنى المعايرة

تستخدم هذه الطريقة في المعايرات التي تحتاج لدقة كبيرة :

1- معايرة الغلوبولينات المناعية IgM , IgA , IgG

2- معايرة عوامل المتممة C3 , C4

3- معايرة العامل الرثياني RF

وأي معايرة يتطلب إجراؤها دقة كبيرة .....

# طريقة رسم منحنى المعايرة

1- يتم قياس امتصاصية سلسلة من **المحاليل العيارية** معلومة التركيز وباستخدام ورقة ميليمترية :

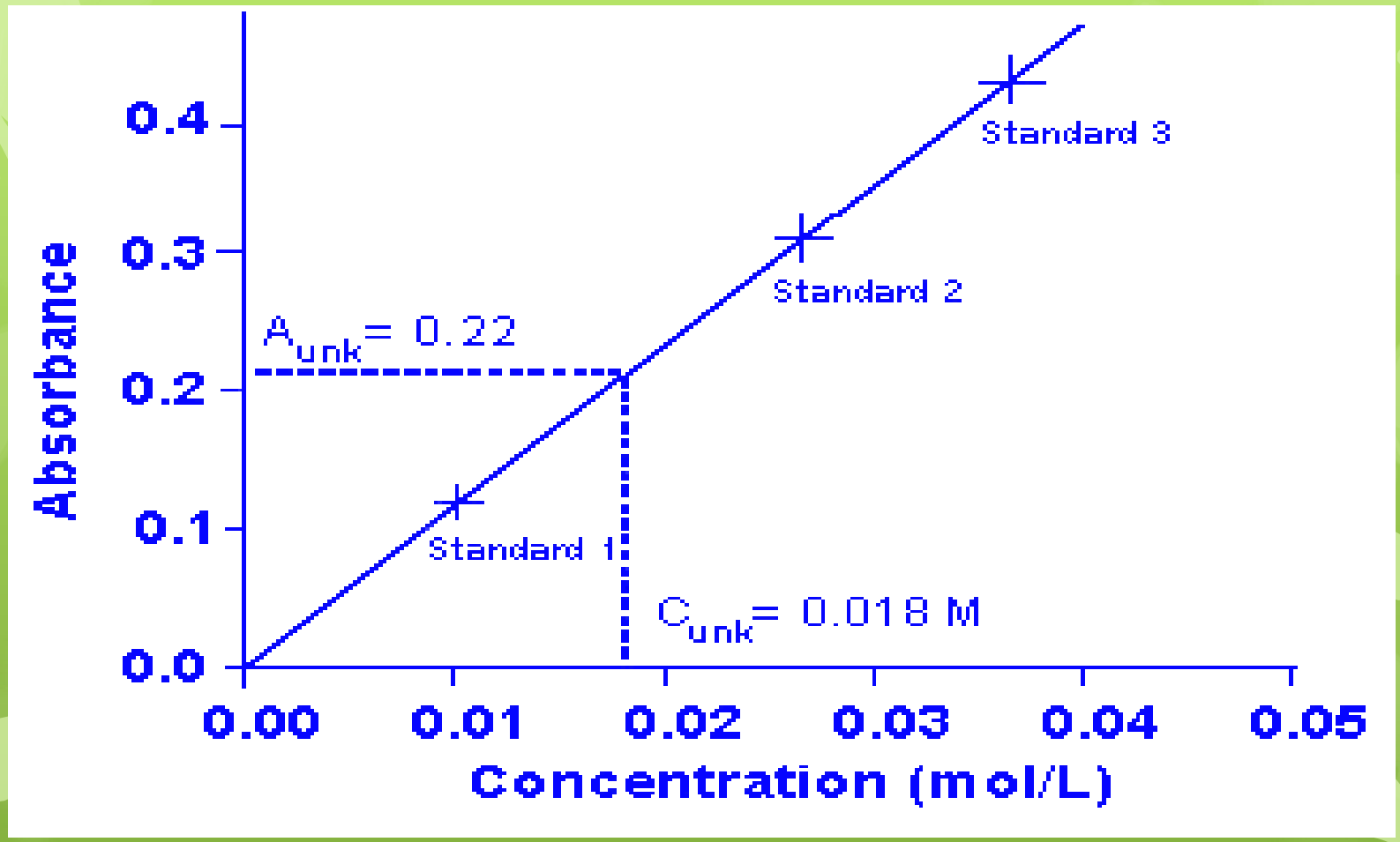
2- نمثل التراكيز على محور السينات و الامتصاصيات على محور العينات

3- نرسم نقطة بين كل تركيز والامتصاصية التي نتجت عنه

4- نرسم **خط** يمر بمركز الاحداثيات وبأكبر عدد ممكن من النقط

فنكون قد حصلنا على منحنى المعايرة

# Standard Curve




عند الحاجة لمعرفة تركيز مادة مجهولة نقيس امتصاصيتها ونسقطها على المحور فنحصل على التركيز

## سؤال

لنفترض أننا استخدمنا 11 عياري لرسم منحنى المعايرة وقمنا برسم الخط المار بمركز الإحداثيات

---

هل تتوقع أن يمر الخط من كل النقاط (11 نقطة)

لماذا؟؟؟؟؟؟

ماذا تفعل؟؟؟؟؟؟

# لماذا يتم رسم منحنى المعايرة من اجل المعايرات التي يتطلب إجراؤها دقة كبيرة ؟

لا يمكن للإنسان أن يقوم بعمل دقيق دون ارتكاب خطأ ما قد يكون صغيراً أو كبيراً

ومن أجل أن يصبح العمل أدق ما يمكن يُعمد في المعايرات التي تتطلب دقة كبيرة إلى عدم الاعتماد على محلول عياري واحد وإنما يتم استخدام عدة محاليل عيارية ذات تراكيز مختلفة ومعلومة بدقة.

# المطلوب من الجلسة العملية

-رسم منحنى معايرة للغلوكوز على ورقة ميليمترية حيث توجد لدينا المحاليل العيارية التالية:

St(1) : C1= 50 mg/dl  A(1) = 0.100-

St(2) : C2= 98 mg/dl  A(2) = 0.200-

St(3) : C3=125mg/dl  A(3) = 0.255-

St(4) : C4=170mg/dl  A(4) = 0.350-

St(5) : C5=200mg/dl  A(5) = 0.400-

-- معايرة الغلوكوز في المصل مجهول التركيزثم إسقاط الامتصاصية على محور الامتصاصية والحصول على التركيز من خلال المنحنى

# مبدأ المعايرة

يؤكسد الغلوكوز بواسطة إنزيم GOD (غلكوزأوكسيداز) ليعطي الماء الأوكسجيني

يتفاعل الماءالأكسجيني مع مادة منتجة للون بشكلها المرجع لينتج الغلوكونات والماءالاكسيجيني وذلك بواسطة إنزيم البيروكسيدازفتنتج المادة الملونة ذو **اللون الوردي**

$$2H_2O_2 + 4\text{-aminoantipyrine} + \text{phenol} \xrightarrow{POD} \textbf{quinoneimine} + 4H_2O$$

| | أنبوب البلانك | أنبوب العينة |
|---|---|---|
| الكاشف | 1مل | 1مل |
| المصل | | 10 ميكرون |

نمزج جيدا ⇐ نحضن 10 دقائق بحرارة 37

نقرأ إمتصاصية العينة

نسقط على منحنى المعايرة فنحصل على التركيز

# Glucose

**Freeze Dried**
**Enzymatic & colorimetric method GOD/POD**
**Store at 2-8 ºC**

---

## PRINCIPLE

Glucose is oxidized by glucose oxydase (GOD) to gluconate and hydrogene peroxide according to the following equation:

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + 4\ \text{aminoantipyrine} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{quinoneimine} + 4H_2O$$

## REFERENCE VALUES

| | | |
|---|---|---|
| Serum or plasma | 65 -110 | mg/dl |
| Spinal fluid | 50 – 70 | mg/dl |

These ranges are given for orientation only. Each laboratory should establish its own normal ranges.

## SAMPLES

Serum. Plasma collected on heparin fluoride or heparin iodoacetate . Spinal fluid.

## REAGENTS

The concentration in the test (**$R_1$+$R_2$**) :

| | |
|---|---|
| Phosphate buffer pH 7.0 | 100 mmol/L |
| GOD | |
| POD | 1000 U/L |
| 4 aminoantipyrine | 0.4 mmol/L |
| Phenol | 11 mmol/L |

**$R_3$** : Standard 100 mg/dL.

## PREPARATION OF WORKING REAGENT

Dissolve $R_2$ with one bottle buffer $R_1$ stable for 3 months at 2 – 8 ºC

## PROCEDURE

| | |
|---|---|
| Wavelength | 505 nm (492-550nm) |
| Temperature | 25 ºC/30ºC/37ºC |
| Cuvette | 1 cm light path |
| Method | Endpoint – increasing |

If the absorbance of the working reagent is higher than 0.1 the reagent can not be used.

| | Blank | Standard | Sample |
|---|---|---|---|
| Standard | - | 10 µL | - |
| Sample | - | - | 10 µL |
| Working reagent | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Mix well, incubate at 25ºC for 30 minutes, or at 37º for 10 minutes, then read the optical density (O.D) against the blank, the color is stable for 1 hour.

## CALCULATION

$$\frac{\text{O.D Sample}}{\text{O.D Standard}} \times \text{Standard concentration}$$

## LINEARITY

Up to 500 mg/dL.

## SENSITIVITY

It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used. Under manual conditions however, a change of 0.001 abs units/min is equivalent to 0.022mmol/l glucose concentration at 492nm.

## SPECIFICATION

Bilirubin 0.5g/l, lipid 10g/l and ascorbic acid 0.5g/l do not interfere with the assay up to the given levels

## NOTES

- With this assay the determination of glucose concentration in urine is not acceptable, because ascorbic acid influences the measurement.
-These reagents may be used in several automatic analyzers, instruction for many of them are available on request.
-Incubation time may be reduced in many analyzers

## PRESENTATION

| | | |
|---|---|---|
| 1 X 125 ml | Cat No 0601 | 125 tests |
| 2 X 125 ml | Cat No 0602 | 250 tests |
| 4 X 250 ml | Cat No 0603 | 1000 tests |

## BIBLIOGRAPHY


- Richmond W., Clin. Chem.19, 1350(1973)
- Roeschlau P.,Bernt E. et Gruber W.,J. Clin.Chem.Clin.Biochem.12, 403 (1974).
- Trinder P.,Ann. Clin .Biochem .6,24(1969).
- Clin.Chem. 20,470 (1974).


## The following symbols are used on labels

| | |
|---|---|
| IVD | **For in vitro diagnostic use** |
|  | **Use day (last day of the month)** |
|  | **Temperature limitation** |
| LOT | **Batch code** |
| REF | **Code** |



# THANK YOU FOR YOUR ATTENTION