

Gjelder:	Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato:	02.02.2009
Fag:	Kjemi 2		Side:	Side 1 av 8
Ansvarlig:	Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther			

INNLEDNING:

Serumjern (S-jern) er en analyse som blir utført av bioingeniører hovedsakelig i medisinske laboratorier.

TEORI:

Jern:

Normale voksne har ca. 50-70 mmol (3-4g) jern i kroppen. Av dette er ca 60-70 % bundet til hemoglobinet i de røde blodlegemene, 20-30% er lagret jern (inkorporert i ferritin, et stort protein), 3-5 % er i myoglobin, 0-2 % i ulike enzymer. Bare 0,1 % av kroppens jern befinner seg i plasma, der det er bundet til transferrin (transportproteinet for jern).

Jernet i plasma blir skiftet ut ca. 10 ganger pr. døgn. I første rekke er det beinmargen som får tilført jern, og lever og milt som avgir jern til plasma (nedbryting av gamle røde blodlegemer skjer i lever og milt). S-jern er først og fremst et uttrykk for balansen mellom produksjon og destruksjon av røde blodlegemer, og viser derfor en betydelig døgnvariasjon. Om lag 1-2 mg blir daglig absorbert fra maten og omtrent like mye tapes via avføring og hud. For lite inntak eller økt tap kan føre til jernmangel, som igjen kan gi jernmangelanemi. Kroppen har ingen aktiv mekanisme for utskilleling av jern, og ved økt absorpsjon vil jernet akkumuleres i kroppen med 0,5-1g pr. år. Når jern akkumuleres i kroppen, blir det toksisk og skader cellene i lever og andre viktige organer.

Indikasjon for analyse av serumjern er mistanke om tilstander med jernoverskudd eller jernmangel.

REFERANSEOMRÅDE:

≥ 18 år: 9-34 µmol/L

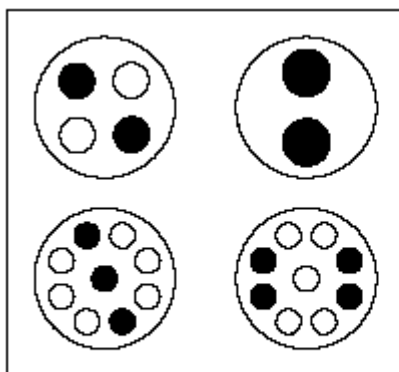
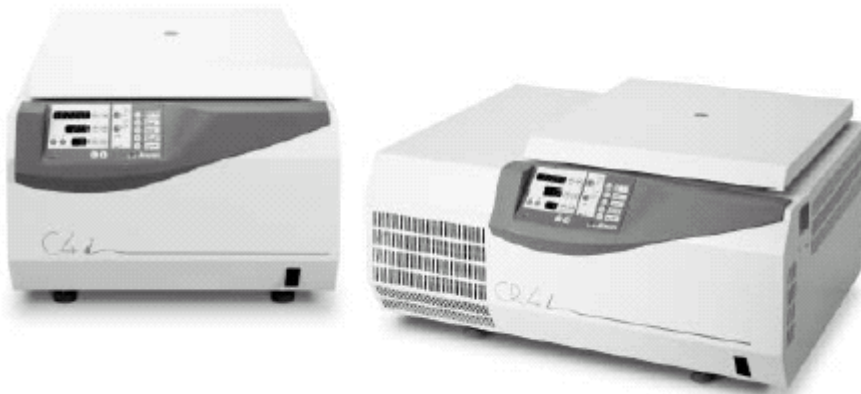
Gjelder: Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato: 02.02.2009
Fag: Kjemi 2		Side: Side 2 av 8
Ansvarlig: Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther		

ANALYSEPRINSIPP:

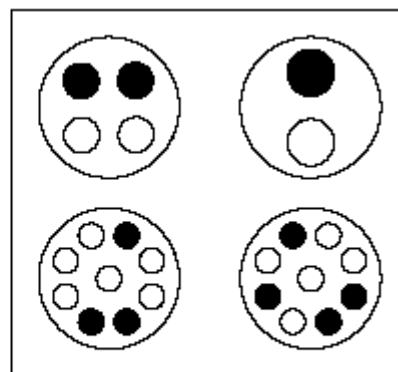
- Jernet (Fe^{3+}) spaltes fra transferrin med HCl.
- Protein (inkludert fritt hemoglobin) felles med trikloreddiksyre (TCA).
- Etter sentrifugeringen bringes supernatanten til en pH $4,5 \pm 0,5$ med ammoniumacetat. Ferriionene reduseres til ferroioner ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) med hydroxylammoniumklorid.
- Farge fremkalles ved at Fe^{2+} reagerer med kromogenet (TPTZ).
- Fargekomplekset avleses spektrofotometrisk ved 593nm.

Sentrifuge:

Til å separere blodlegemer fra serum/plasma brukes en sentrifuge. I denne øvelsen skal vi bruke JOUAN CR 4i-sentrifuge, som er en utsvingssentrifuge. Prøverørene settes i kopper som svinges ut i et horisontalt plan når rotoren går rundt, og som går gradvis tilbake til vertikal stilling når sentrifugen bremses opp og stopper.

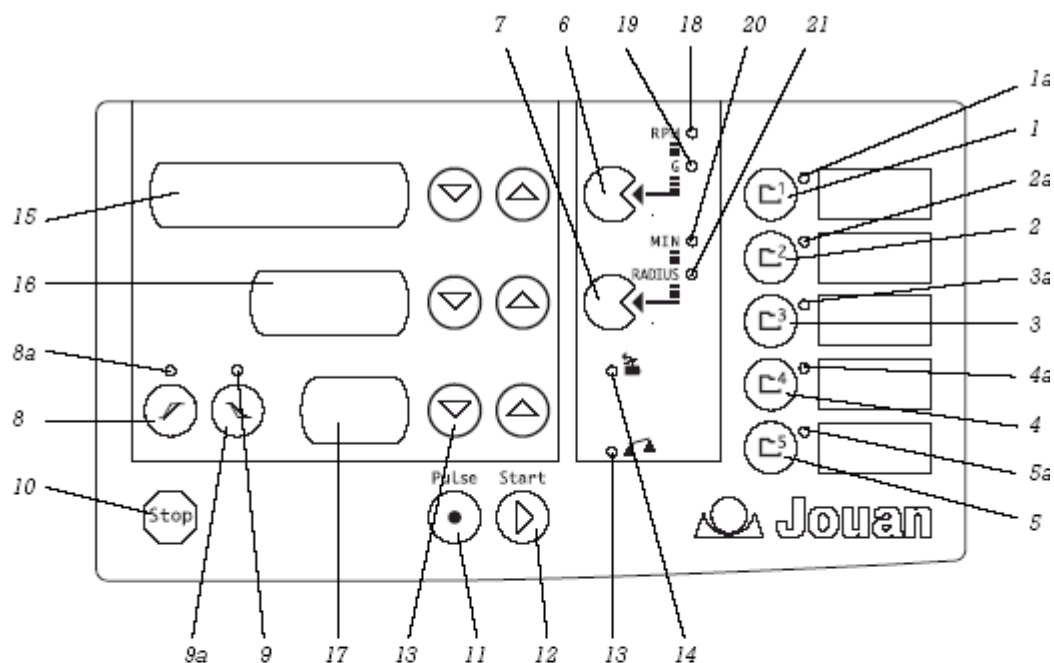


DYNAMIC BALANCING : CORRECT



 INCORRECT

Gjelder: Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato: 02.02.2009
Fag: Kjemi 2		Side: Side 3 av 8
Ansvarlig: Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther		



Buttons

- 1 - 5 Program Keys
- 6 Speed/RCF Toggle
- 7 Time/Radius Toggle
- 8 Acceleration rate set
- 9 Deceleration rate set
- 10 Stop Run
- 11 Pulse Run
- 12 Start Run
- 13 Temperature set (CR4i only)

Display Screens

- 15 Upper Screen
- 16 Middle Screen
- 17 Lower Screen

LED Lights

- 1a Program 1 Indicator
- 2a Program 2 Indicator
- 3a Program 3 Indicator
- 4a Program 4 Indicator
- 5a Program 5 Indicator
- 8a Acceleration Indicator
- 9a Deceleration Indicator
- 13 Imbalance Indicator
- 14 Lid Opening allowed Indicator
- 18 Speed Indicator
- 19 RCF Indicator
- 20 Time Indicator
- 21 Radius Input Indicator

Gjelder: Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato: 02.02.2009
Fag: Kjemi 2		Side: Side 4 av 8
Ansvarlig: Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther		

Kraften som virker på rørene i en sentrifuge kalles relativ sentrifugalkraft, R.C.F (relative centrifugal force), og kan kalkuleres slik;

$$R.C.F = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

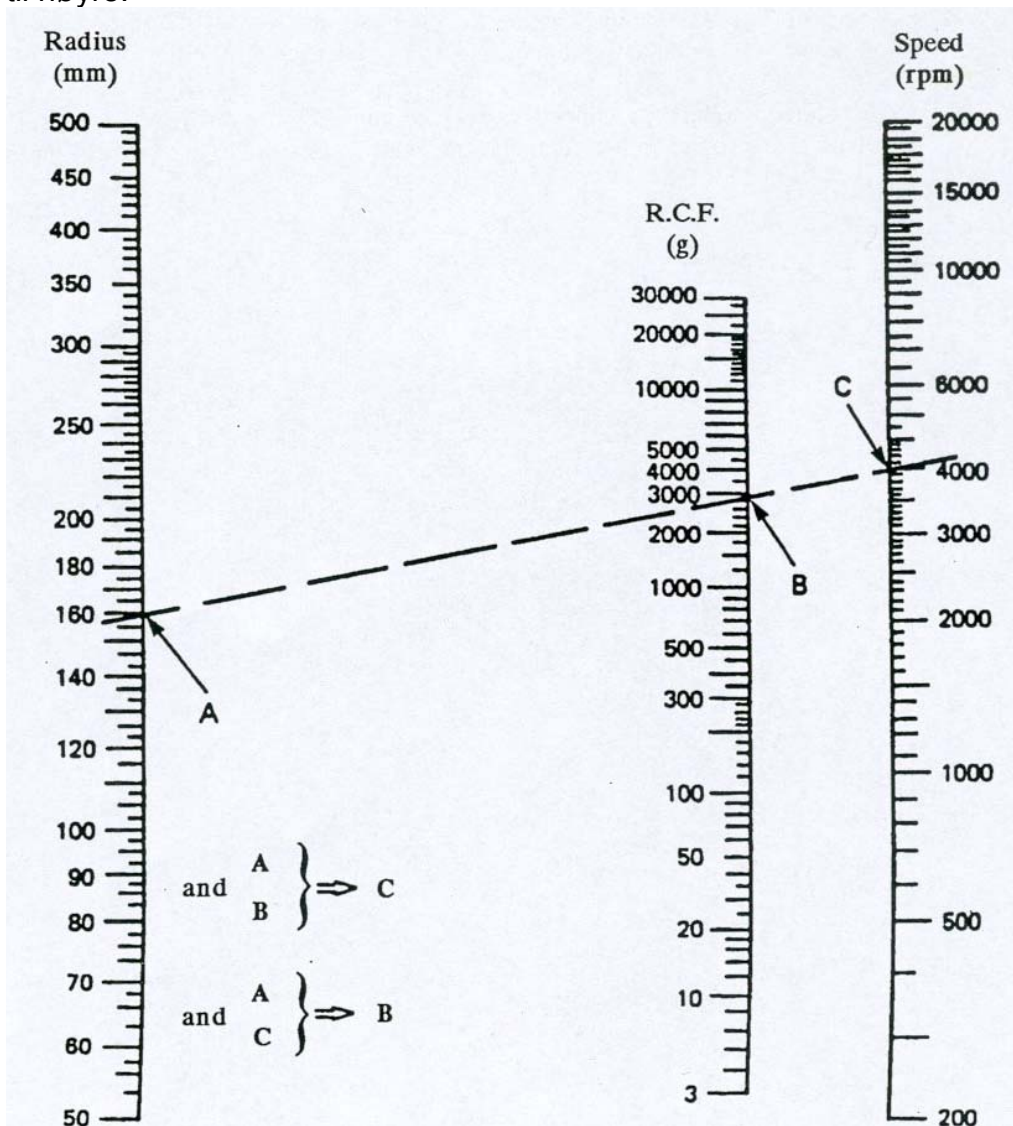
Der $1,118 \times 10^{-5}$ er en empirisk faktor,

r = radius i cm fra rotasjonscenteret (sentrifugens akse) til bunnen av røret med rørholderen i horisontal stilling.

n = antall omdreininger pr minutt av rotoren (rpm = rotations pr minute)

RCF angis gjerne som "antall ganger større enn gravitasjonskraften (g)" (f.eks 1000×g)

Hvor mange rpm en oppgitt R.C.F. er, kan kalkuleres ved hjelp av et såkalt nomogram. Dette finnes ved sentrifugen. Mål aktuell radius i sentrifugen. Legg deretter en linjal for aktuell radius på skalaen til venstre gjennom ønsket R.C.F, og les av hvor mange RPM dette tilsvarer på skalaen til høyre.



Gjelder:	Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato:	02.02.2009
Fag:	Kjemi 2		Side:	Side 5 av 8
Ansvarlig:	Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther			

Sentrifugering av blodprøver:

Gelrør til serumprøver:

Etter prøvetaking bør røret stå i opprett stilling i minimum 30 minutter for å koagulere. Kontroller alltid at prøven er helt koagulert før røret settes i sentrifugen. Prøven bør sentrifugeres så snart som mulig etter at blodet er koagulert, senest innen to timer etter prøvetaking.

Blodprøver tatt på antikoagulant kan sentrifugeres straks.

Sentrifugering skjer vanligvis ved 20-22°C. Sentrifuger produserer varme, og temperaturen i sentrifugekammeret kan øke med så mye som 5°C i løpet av 15 minutters sentrifugetid. Prøver som er følsomme for en slik temperaturøkning bør derfor sentrifugeres i kjølesentrifuge, der temperaturen er stabil på for eksempel 4°C.

Blodprøver sentrifugeres vanligvis ved 1000-1200g i 10-15 minutter.
Koagulasjonsprøver sentrifugeres ved 2000-2500g i 15 minutter.

Generelt bør prøverør ikke sentrifugeres på nytt etter fjerning av serum eller plasma fordi det endrede forholdet mellom plasma og blodlegemer kan virke inn på analyttkonsentrasjonen. Særlig viktig er det å merke seg at gelrør **ALDRI** bør sentrifugeres på nytt.

Etter sentrifugering bør rørene inspiseres visuelt for å kontrollere at serum/plasma er skikkelig separert fra blodlegemene, og serum/plasma skal ikke være blodblandet. Ved blodtilblanding må serum/plasma overføres til et nytt rør, sentrifugeres og deretter pipetteres over i et nytt rør igjen.

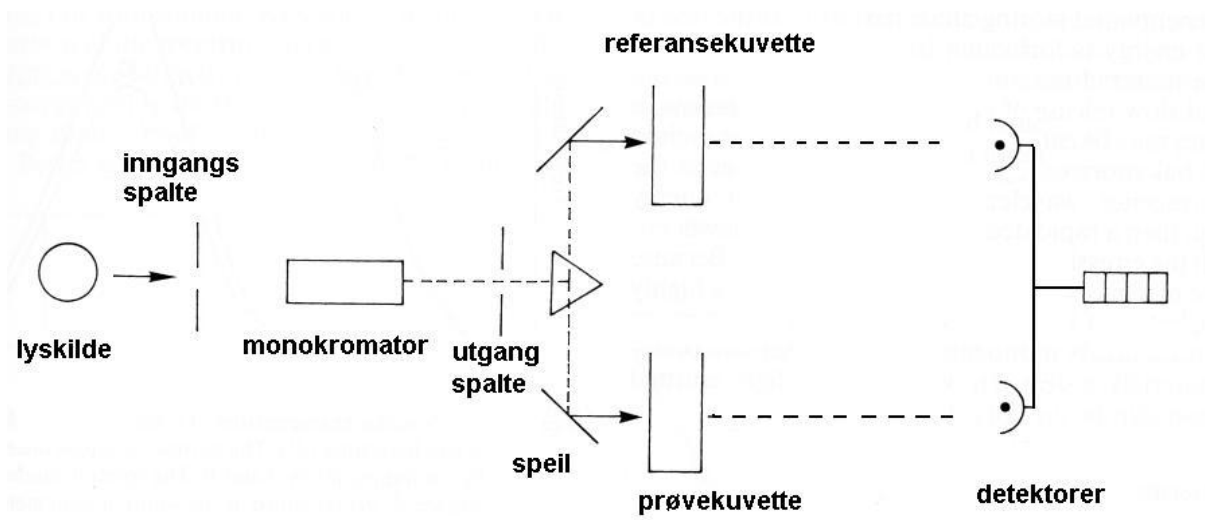
Andre feilkilder:

- * Lipemi (hvitt, melkeaktig serum/plasma pga økt mengde lipoproteiner)
- * Hemolyse (rosa til rødlig serum/plasma pga hemolyserte erytrocytter)
- * Icterus (sterk gulfarging av serum/plasma pga økt mengde bilirubin, et nedbrytningsprodukt av hem som normalt skilles ut via lever)

Skal prøven analyseres innen 48 timer kan blodet oppbevares i gelglasset. Ved lenger henstand på serum pipetteres over i et plastglass.

Gjelder: Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato: 02.02.2009
Fag: Kjemi 2		Side: Side 6 av 8
Ansvarlig: Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther		

SHIMADZU UV-1700 Dobbelstrålespektrofotometer



En reagenskuvette med reagensblank settes i både referanseposisjon og prøveposisjon og instrumentet nullstilles. Deretter lar en kuvetten med reagensblank stå i referanseposisjon, mens standard, kontroll og prøve leses av. Dermed vil instrumentet automatisk korrigere for reagensenes egenabsorpsjon osv., slik at verdien vi leser av på skjermen kun skyldes absorpsjon pga stoffer i prøven.

Gjelder: Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato: 02.02.2009
Fag: Kjemi 2		Side: Side 7 av 8
Ansvarlig: Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther		

UTSTYR OG REAGENSER:

- JOUAN CR4i Sentrifuge
- SHIMADZU UV 1700 Spektrofotometer med kuvetter
- Automatpipetter og spisser (200-1000 µl)
- Engangs reagensrør
- 2 M HCl
- 20% Trikloreddiksyre (100g TCA, dest.vann ad 500 ml)
- 0,004 M TPTZ (løs 128,4 mg 2,4,6-tripirydyl-s-triazine i 1 ml HCl og fortynn til 100 ml dest.vann. Oppbevares på mørk flaske).
- 10% hydroxylammoniumklorid (10g hydroxylammoniumklorid, dest.vann ad 100 ml. Oppbevares på mørk flaske)
- 50 % ammoniumacetat (50g NH₄Ac pa; dest.vann ad 100 ml)
- Bufret kromogenoppløsning (6 deler 50% ammoniumacetat-oppløsning, 3 deler 10% hydroxylammoniumklorid og 1 del TPTZ-oppløsning blandes. Nylages daglig!!)
- Standard: Seronorm
- 1 glass med serum

EKSPERIMENTELT:

- 1 Merk rør til blank, standard, kontroll og prøve
- 2 Pipetter 1 ml destillert vann i blank-rørene.
- 3 Pipetter 1 ml serum av standard, kontroll og prøve i sine respektive rør
- 4 Tilsett 0,5 ml 2M HCl til alle rør.
- 5 Kork glassene, ryst kraftig og la stå i 10 min.
- 6 Tilsett 0,5ml 20 % trikloreddiksyre til alle rør.
- 7 Ryst kraftig i minst 30 sekunder (rørene kan nå stå til neste dag)
- 8 Sentrifuger i 15 minutter ved 2500g. Ta av korker før sentrifugering.
- 9 Pipetter 1 ml supernatant over i nye merkede rør.
- 10 Tilsett 1 ml bufret kromogenoppløsning til alle rør.
- 11 Kork og bland. Rørene må nå stå i minst 10 minutter.
- 12 Avles rørene på SHIMADZU UV 1700 spektrofotometer ved 593 nm mot blank.

BEREGNING:

$$\frac{\text{Konsentrasjon av standard } (\mu\text{mol/l}) \times \text{Abs. Prøve}}{\text{Abs. Standard}} = \text{jernkonsentrasjonen i prøven i } \mu\text{mol/l}$$

Gjelder:	Laboratorieuka 2009	SPEKTROFOTOMETRISK BESTEMMELSE AV SERUMJERN	Dato:	02.02.2009
Fag:	Kjemi 2		Side:	Side 8 av 8
Ansvarlig:	Bente Alm Ragnhild Nilsen Willy Sæther			

KOMMENTAR:

Pasienten må være fastende
 Pasienten må ikke ha tatt jern siste døgn før prøvetaking
 Serum må være hemolysefritt
 Jern er en meget vanlig forurensing, evt glassutstyr må derfor være spesialvasket.

JOURNALFØRING:

Resultatdelen skal inneholde avlest absorbans for både standard, prøver og kontroller, samt oppgitt konsentrasjon for standard og beregnet konsentrasjon for kontroll og prøve.