임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 3. Analytical Instrument

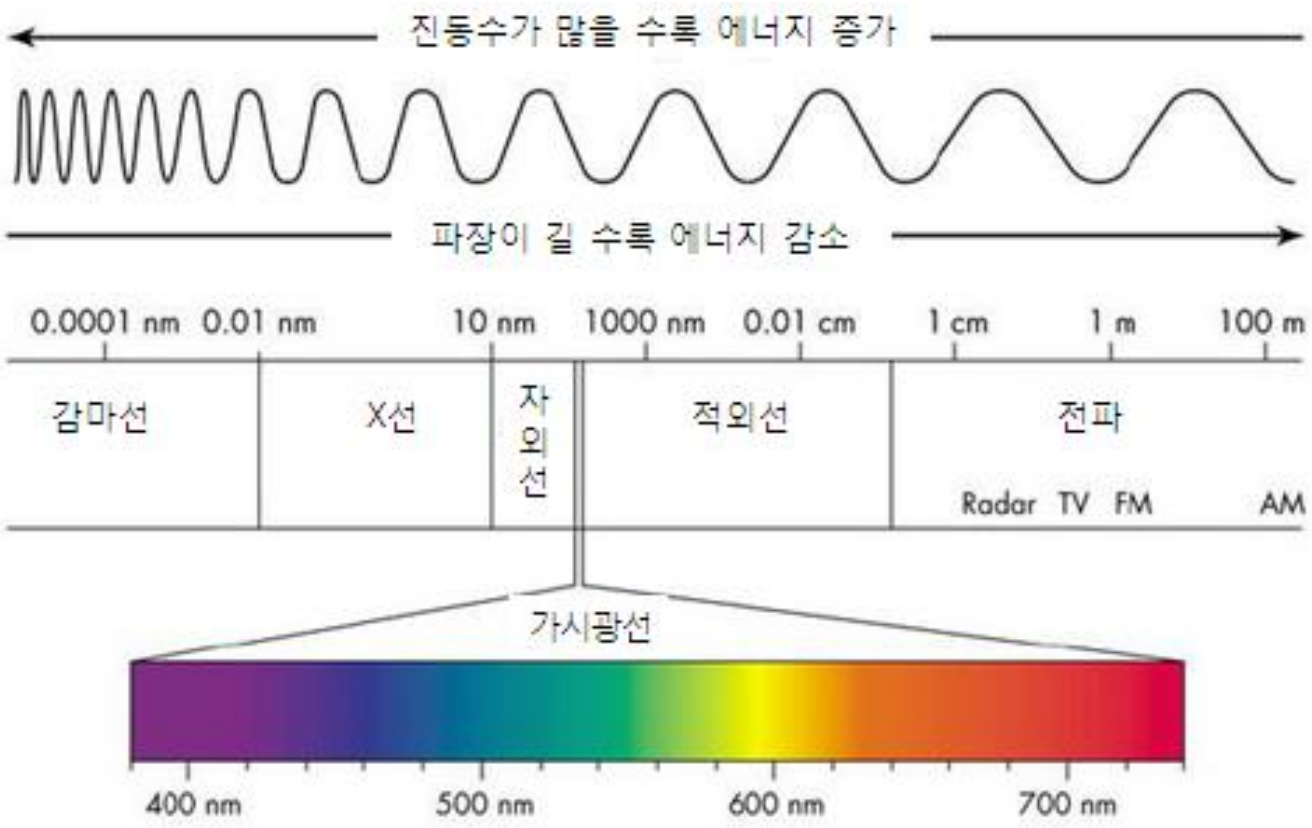
Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

■ 임상화학 분석의 주요 대상과 분석 방법

분석법 선택	혈청 중 농도(mol/L)	주요 대상 성분*
분광광도 분석법	2.0×10^{-3} 이상	글루코스, 요소질소, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 인지질, 칼슘
	1.0×10^{-4}~2.0×10^{-3}	총 단백, 알부민, 요산, 트라이글리세라이드, HDL-콜레스테롤, 유리 지방산, 무기인, 마그네슘
	1.0×10^{-5}~1.0×10^{-4}	크레아티닌, 암모니아질소, 철, 구리
	1.0×10^{-6}~1.0×10^{-5}	총 빌리루빈, 직접 빌리루빈
	1.0×10^{-8} 이하	효소(AST, ALT, LD, ALP, CK, AMY, ChE, γ-GT)
이온선택 전극법	2.0×10^{-3} 이상	소듐, Cl, 포타슘, 중탄산, 칼슘
효소 전극법**		글루코스
불꽃 광도법**		소듐, 포타슘
전량 적정법**		염화물
원자흡수 분광광도법**		마그네슘, 철, 구리
면역화학 분석법	1.0×10^{-8} 이하	호르몬, 약제, 미량 단백질
전기영동법		단백 분획, 리포단백분획, 효소의 아이소자임 분석
크로마토그래피법		글리코헤모글로빈

* 혈청 중 농도(mol/L)는 기준 범위의 대략적인 중앙치로 분류하였다.
** 현재 일상 검사에서는 거의 사용되지 않는다.

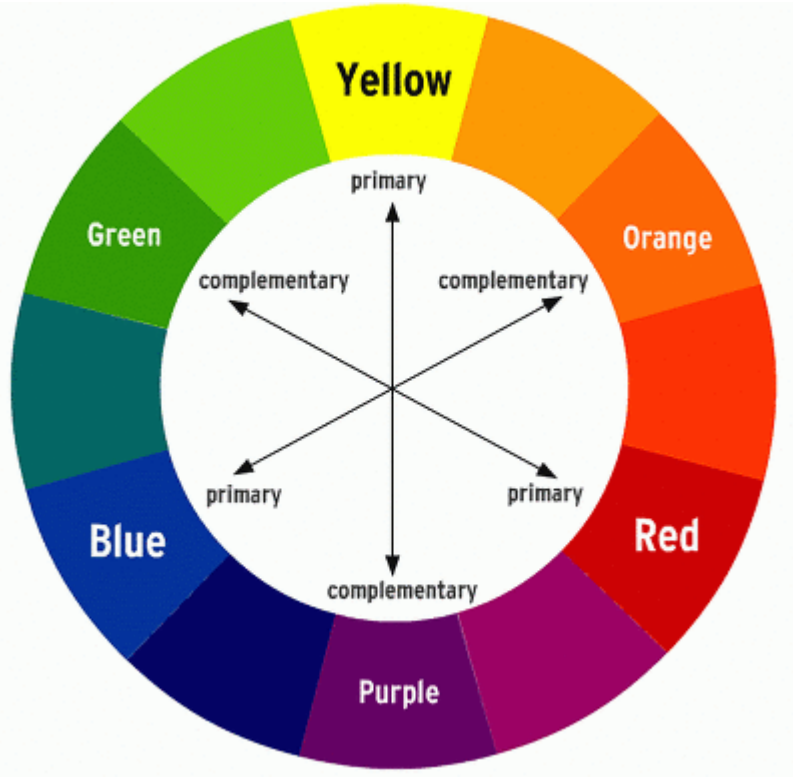
■ 분광광도 분석법



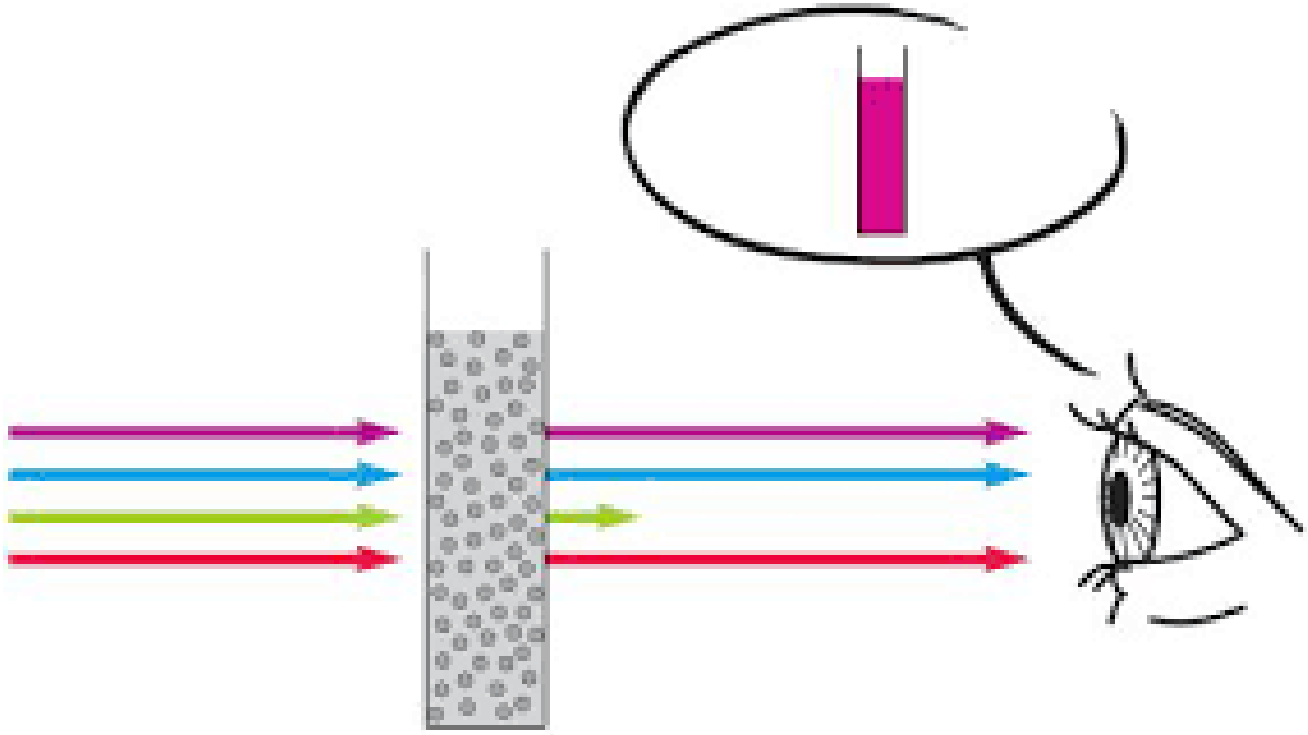
UV (Ultra Violet : 자외선)	400㎚ 이하
Visible (가시광선)	400㎚ ~ 800㎚
IR (Infrared : 적외선)	800㎚ ~ 0.04㎝

■ 분광광도 분석법

용액의 색	용액색의 파장	측정파장
Violet	400~424	575~585 (Yellow)
Blue	424~491	585~647 (Orange)
Green	491~575	647~700 (Red)
Yellow	575~585	400~424 (Violet)
Orange	585~647	424~491 (Blue)
Red	647~700	491~575 (Green)



■ **분광광도 분석법**

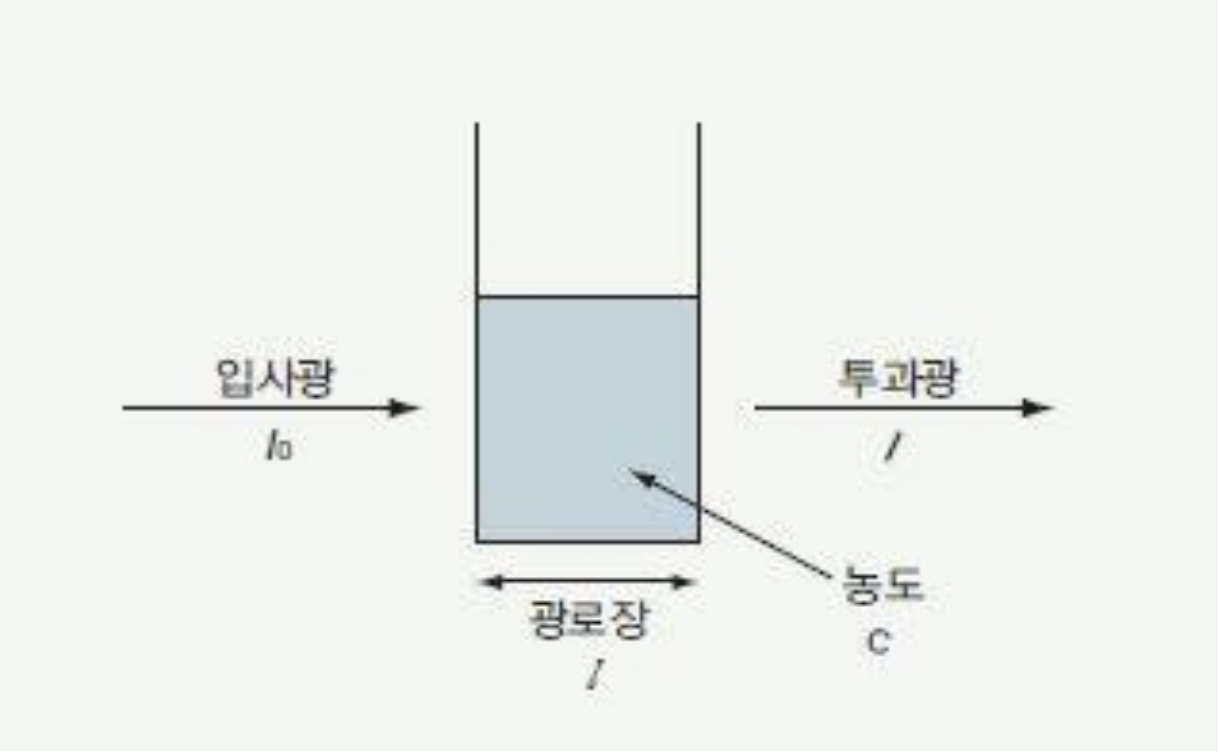


■ 분광광도 분석법

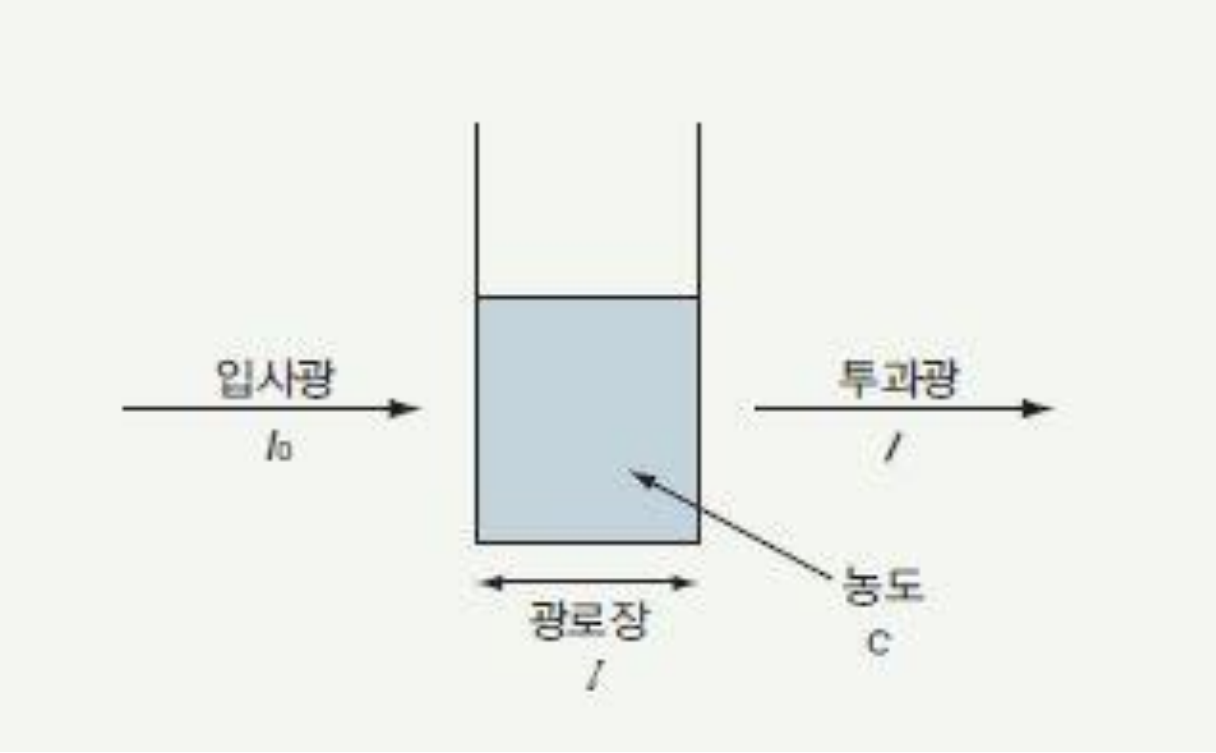
1)Beer's 법칙
- Cuvett (Cell)의 두께가 일정할 때 용액의 흡광도는 용액의 농도와 비례한다

2)Lambert's 법칙
- 용액의 농도가 일정할 때 흡광도는 Cell의 두께에 비례한다

3)Beer's - Lambert's 법칙
- 흡광도는 용액의 농도와 Cell의 두께에 비례한다



■ 분광광도 분석법

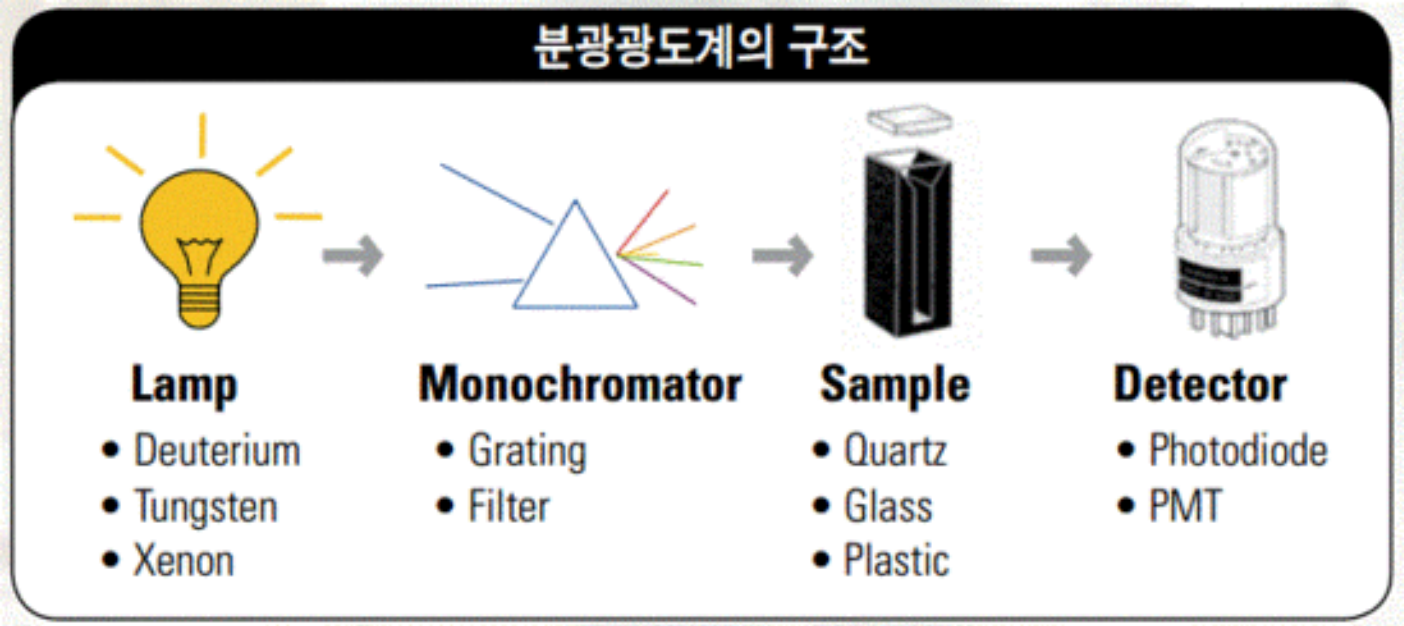


$$I = I_0 * 10^{-\varepsilon cl}$$

$$A(\text{Absorbance}) = \log I_0/I = \varepsilon cl$$

$$= \log 100/\%T = 2 - \log \%T$$

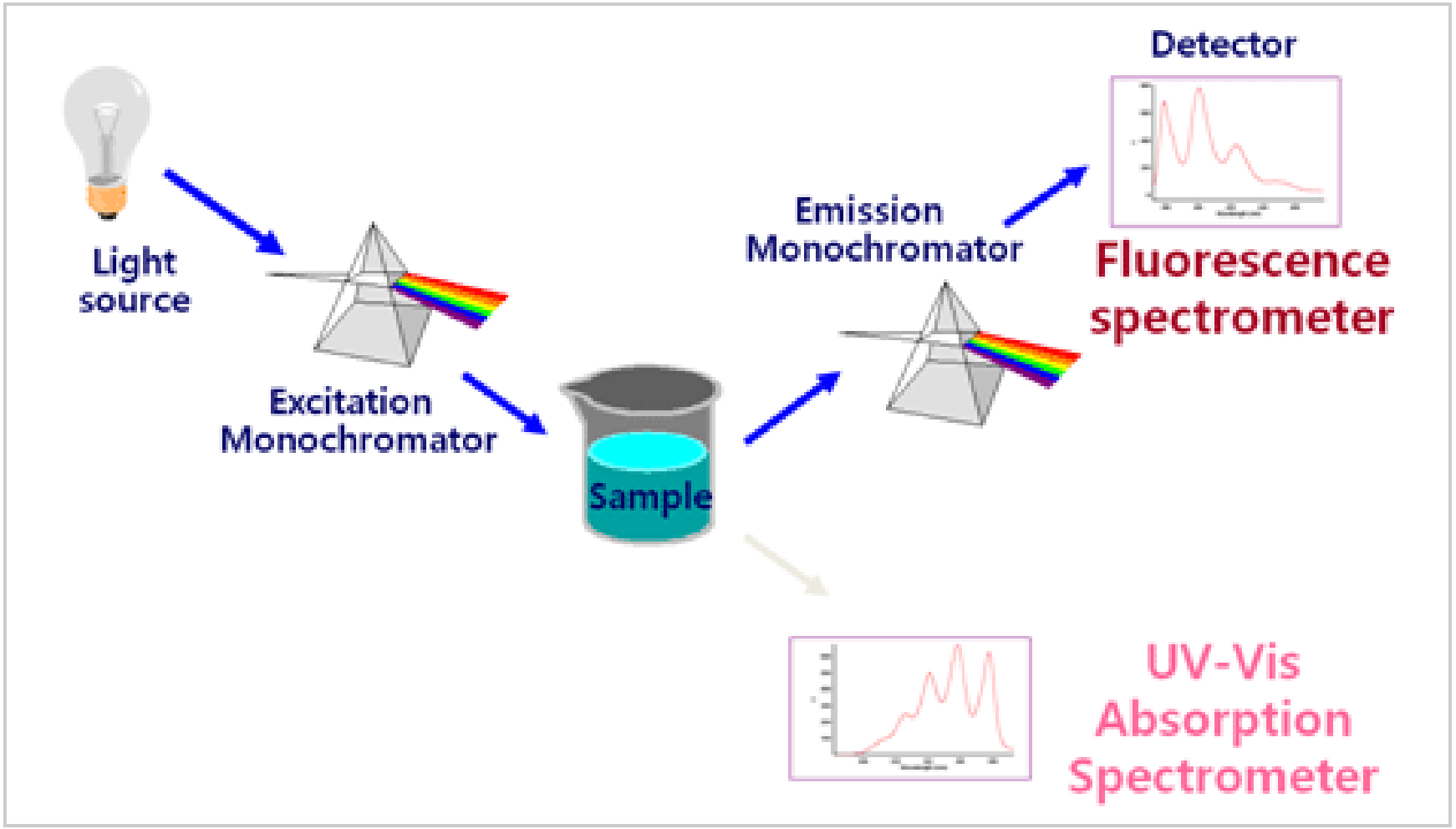
■ 광도계 구조



광원부	분광부	시료부	수광부	판독부
- Deuterium - Tungsten - Xenon - Hg - Hollow Cathode	- Prism - Filter - Grating	- Quartz(자외선) - Glass - Plastic	- Photo Multiplier Tube (광전자증배관) - Diode	- Galvanometer - Digital

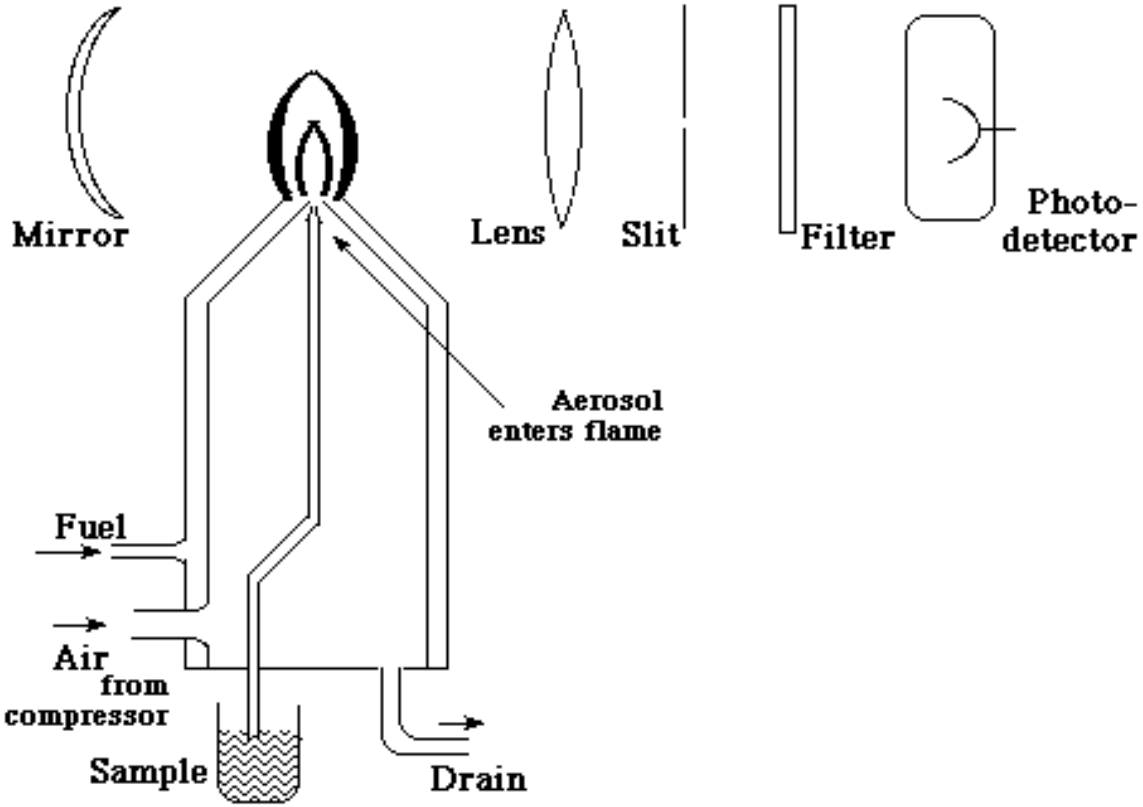
■ 광도계 종류

- **분광 광도계(Spectrophotometer), 형광 광도계(Fluorescence)**, 염광 광도계(Flame phorometer), 원자 흡광 광도계(AAS:Atomic Absorption Spe.), nephelometer



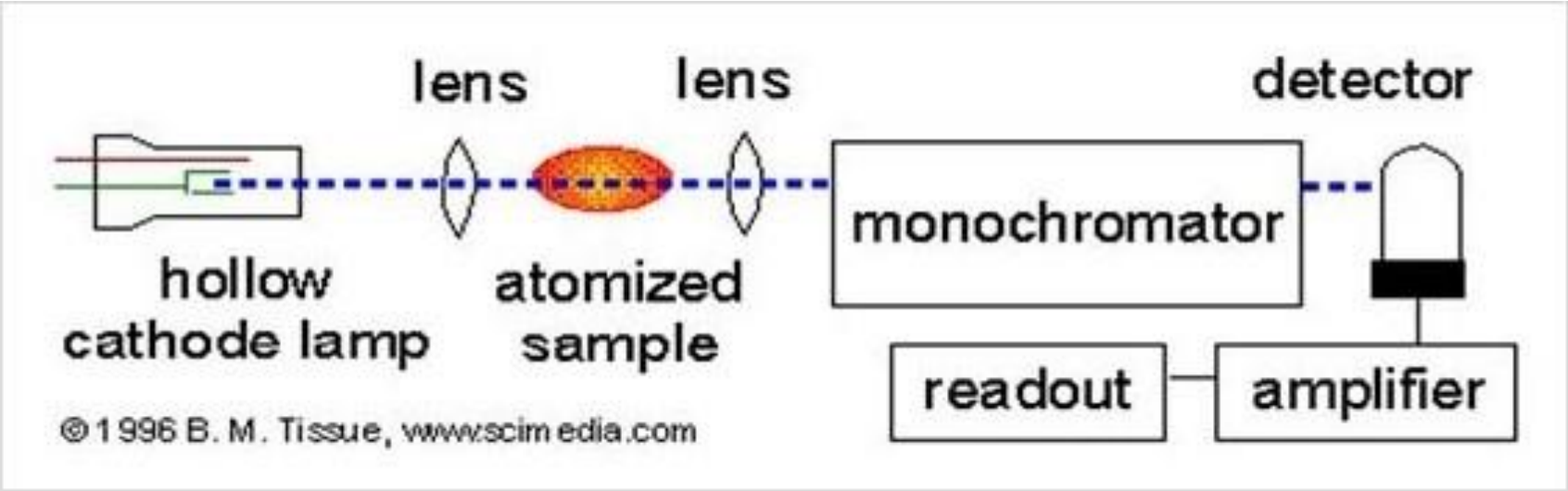
■ 광도계 종류

- 분광 광도계(Spectrophotometer), 형광 광도계(Fluorescence), **염광 광도계(Flame phorometer),** 원자 흡광 광도계(AAS:Atomic Absorption Spe.), nephelometer



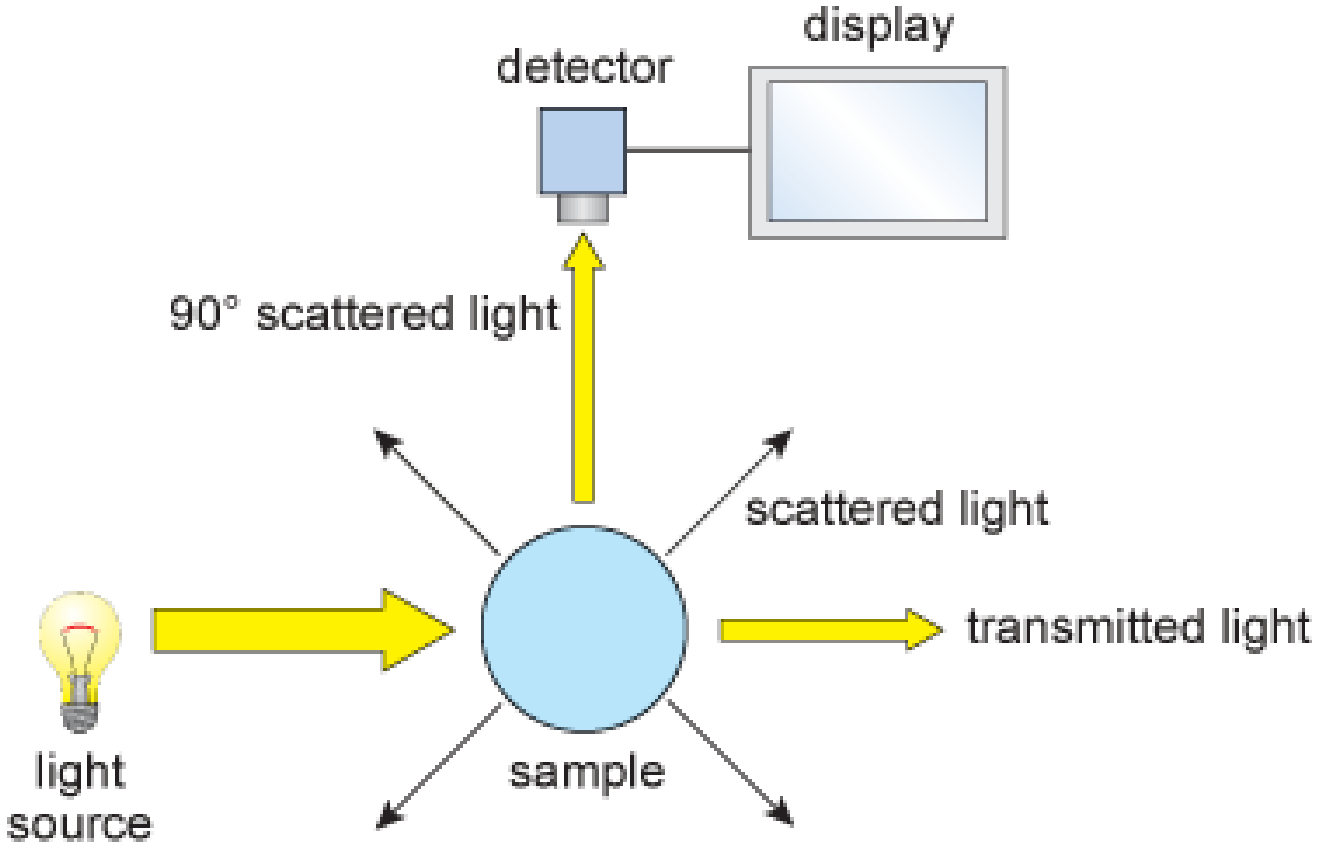
■ 광도계 종류

- 분광 광도계(Spectrophotometer), 형광 광도계(Fluorescence), 염광 광도계(Flame phorometer), **원자 흡광 광도계(AAS:Atomic Absorption Spe.),** nephelometer



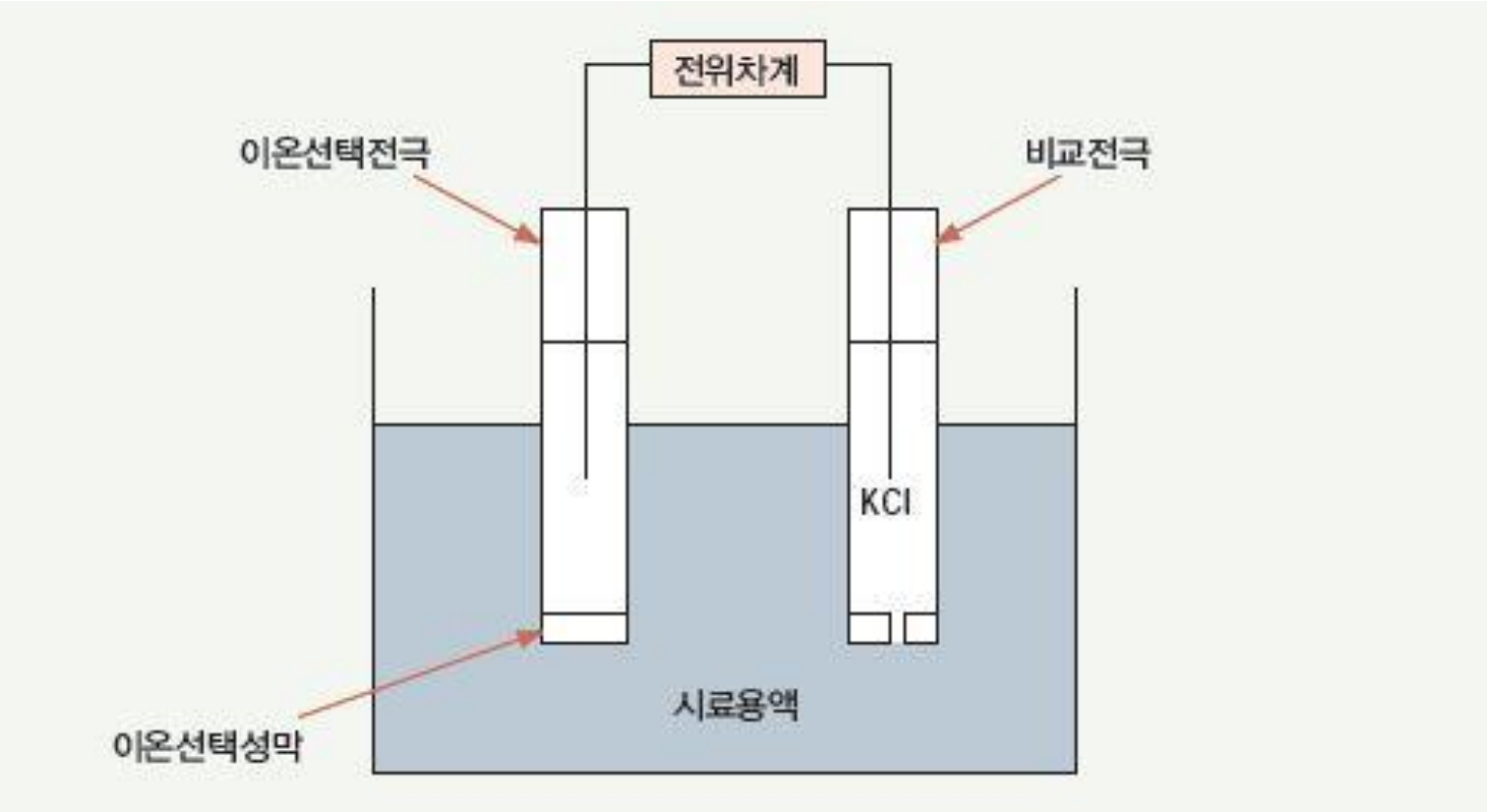
■ 광도계 종류

- 분광 광도계(Spectrophotometer), 형광 광도계(Fluorescence), 염광 광도계(Flame phorometer), 원자 흡광 광도계(AAS:Atomic Absorption Spe.), **nephelometer**



■ 이온선택 전극법 (ISE:Ion Selective Electrode)

- 특정 이온에 대해 선택적으로 응답하는 전극을 이용해 시료 중의 목적 이온 농도를 정량하는 분석 방법
- H^+, Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, 혈액가스 P_{CO2}, P_{O2} 분석에 이용



■ 이온선택 전극법 (ISE:Ion Selective Electrode)

목적 이온	전극
H^+	**유리**
Na^+	**유리(규산염)**, 크라운에테르
K^+	**Valinomycin막**, 크라운에테르
Cl^-	**Ag전극**, 용매중합막(제4급 암모늄염)

- 전량적정법(Chloridometer)

→ Cl^-이온은 Ag^+이온과 반응하여 염화은(AgCl) 침전을 형성

→ $Ag \text{ ---> } Ag^+ + e^-$

$Ag^+ + Cl^- \text{ ---> } AgCl$

→ Cl^- 가 모두 소비되어 AgCl 침전 형성이 종료되면 Ag^+ 증가를 검지하여 전해 종료

- 효소전극법

→ 효소와 전극의 특징을 조합하여 목적 성분을 정량

→ ß-D-glucose + O_2 + H_2O $\xrightarrow[\text{Glucose oxidase}]{}$ gluconate acid + H_2O_2

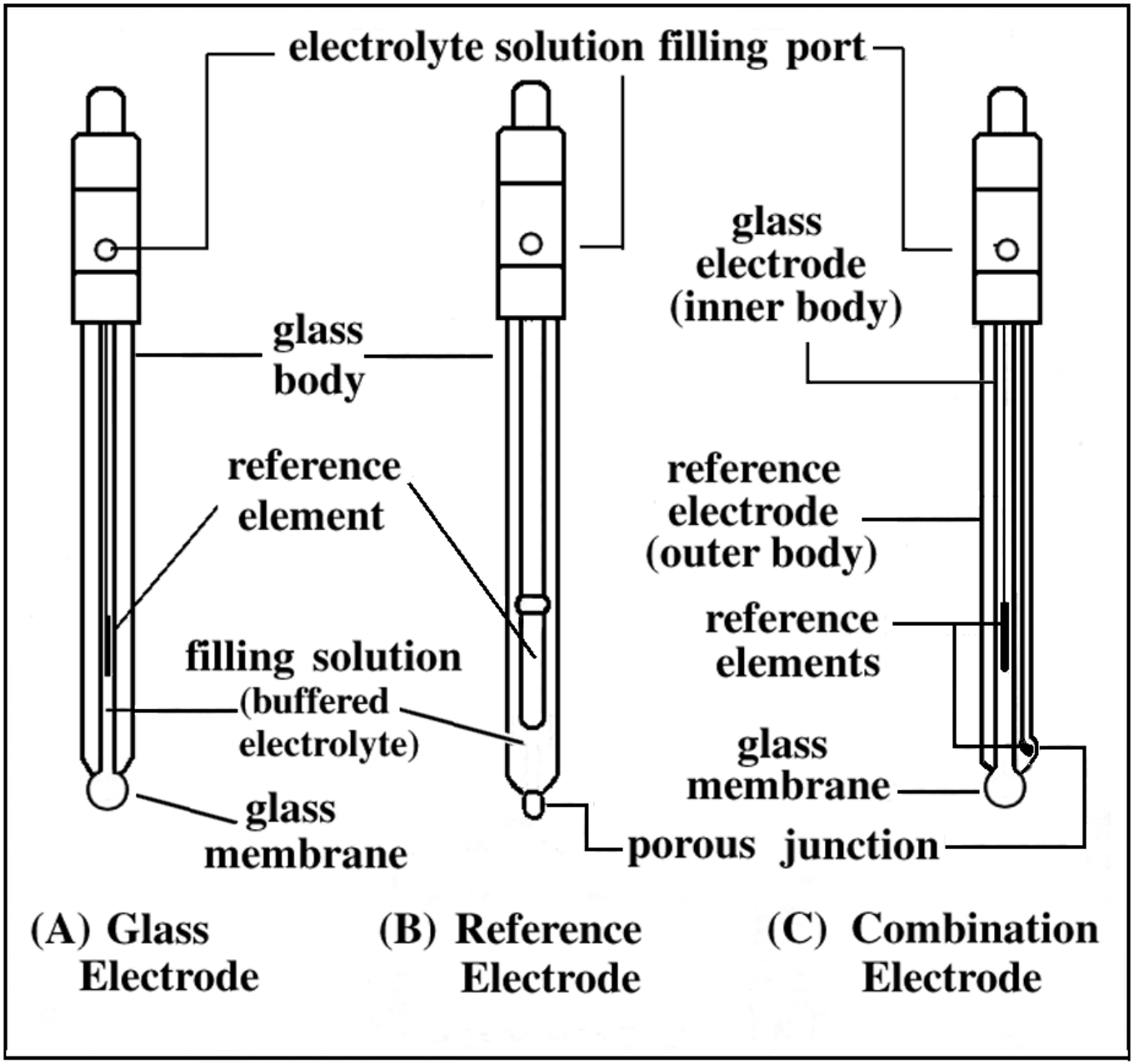
■ pH meter

- H+에 대해 선택성이 있는 지시전극과 기준전극을 시료에 담갔을 때 생기는 전극 간의 전위차를 측정하는 전위차법에 의해 수소이온 농도 측정
- 혈액의 pH : 7.35 ~ 7.45



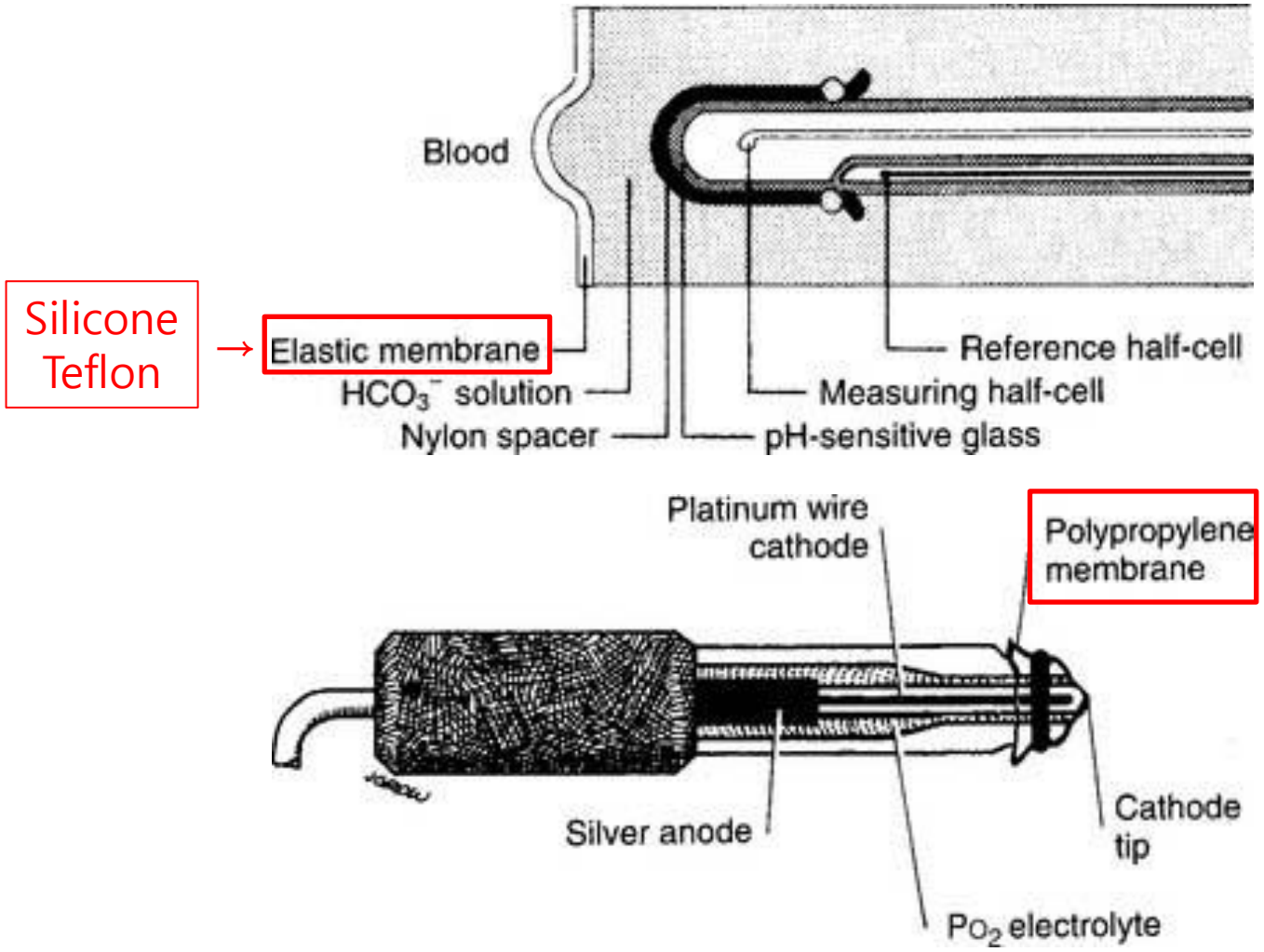


■ **pH meter**


electrolyte solution filling port
glass body
reference element
filling solution (buffered electrolyte)
glass membrane
glass electrode (inner body)
reference electrode (outer body)
reference elements
glass membrane
porous junction
(A) Glass Electrode
(B) Reference Electrode
(C) Combination Electrode

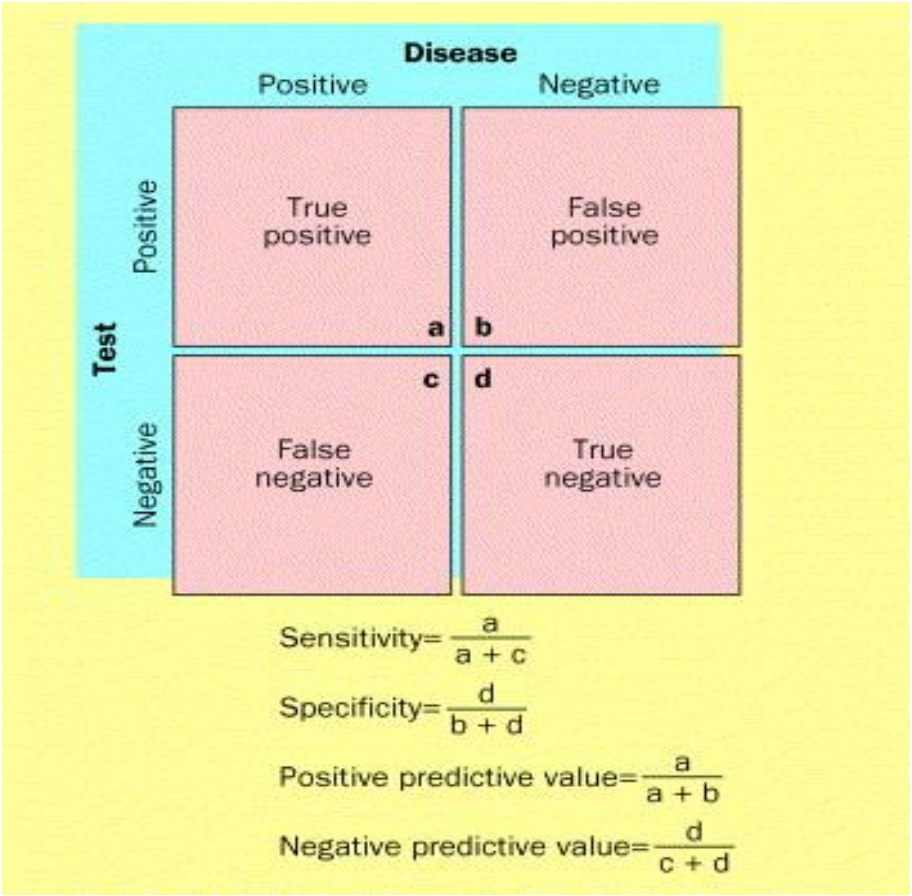
■ ABGA (Arterial Blood Gas Analysis)

- 대사성 애시도시스 (Metabolic Acidosis) / 호흡성 애시도시스 (Respiratory Acidosis)
- 대사성 알카로시스 (Metabolic Alkalosis) / 호흡성 알카로시스 (Respiratory Alkalosis)



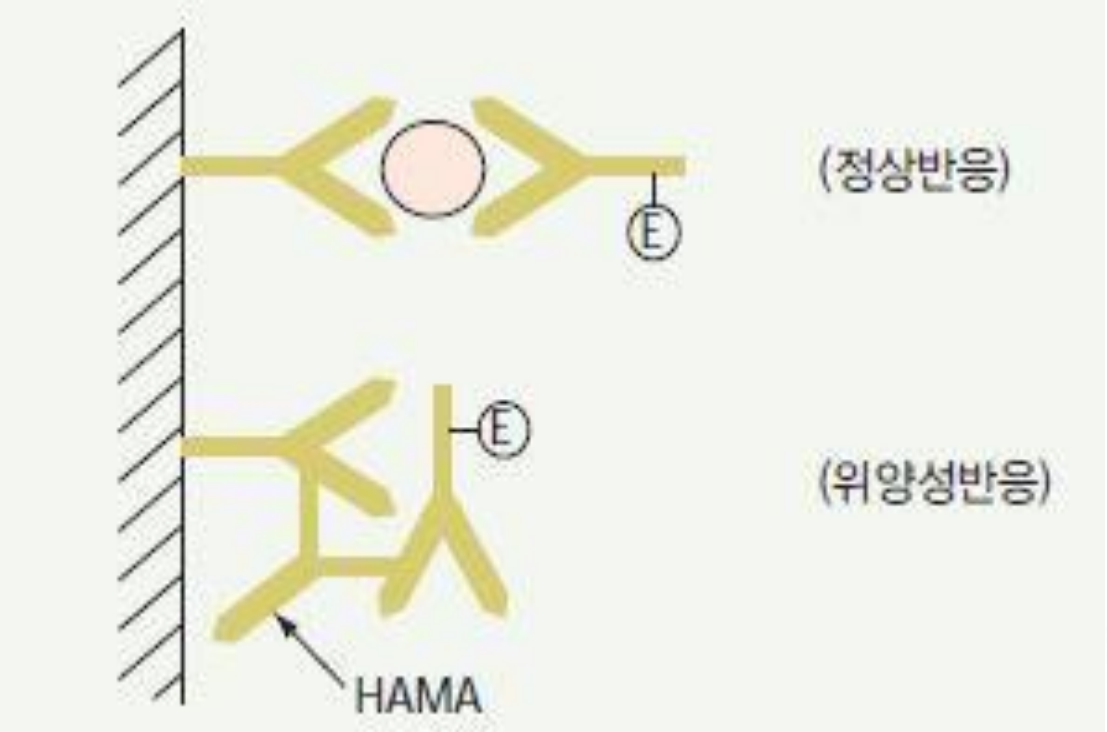
■ 면역화학 분석법

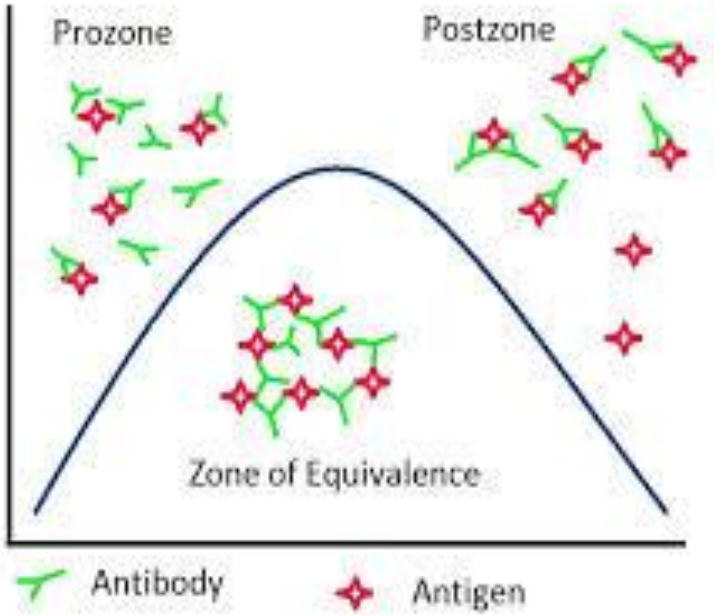
- 현재 생체 성분 정량 분석의 모든 분야에 면역학적 분석법이 널리 사용
- 감도(Sensitivity)와 특이도(Specificity)가 뛰어나다
- RIA(동위원소), EIA(Enzyme), FLIA(Fluorescent), CLIA(Chemiluminescence)



■ 면역화학 분석법

- False positive : carry over(잔효현상), HAMA(human anti-mouse antibody) 영향
- False negative : Prozone, Postzone 현상





■ 전기영동 (Electrophoresis)

- 용액 중에 있는 콜로이드 입자에 전기장이 주어진 경우 이동하는 현상을 분석
- 입자의 특성에 따라 이동도가 결정되고 그 차이를 이용하여 분리 분석
- 단백전기영동 (**Protein Electrophoresis)**

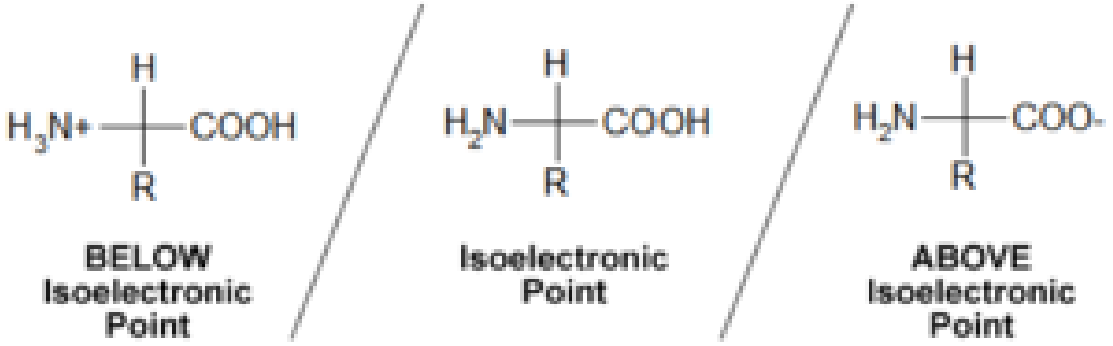
→ Protein은 Amino acid로 구성 : NH_2 Group, COOH Group

→ Buffer의 pH에 따라 (+) 또는 (-), Zwittzer Ion = Amphoteric molecule

→ 등전점 (Isoelectric Point : PI)

(+)극과 (-)극이 평형을 이뤄 전기적으로 중성, 이동하지 않는다.

Albumin : 4.9, α-globulin : 4.9~5.4, β-globulin : 5.9, γ-globulin : 5.7~7.3



Lecture 3. Analytical Instrument

■ 전기영동 (Electrophoresis)

- 전기영동에 영향을 주는 인자

1)Sample의 성질 : 하전량(Charge), **크기(Size), 분자량(MW),** 모양(Shape)

2)전기장 (Electric Field) : 전압(Voltage), 전류(Ampere), **저항(Ω)**

3)Buffer : Buffer 종류 (Barbital Buffer=Veronal Buffer [pH 8.6]), **이온강도**

4)지지체 (Supporting Media)의 종류

① Cellulose Acetate (CA)

② Agarose Gel

③ SDS-PAGE (Polyacrylamide gel)

- 단백분획의 염색

1) Cellulose acetate : 혈청단백 (**Ponceau S, Ponceau 3R**)

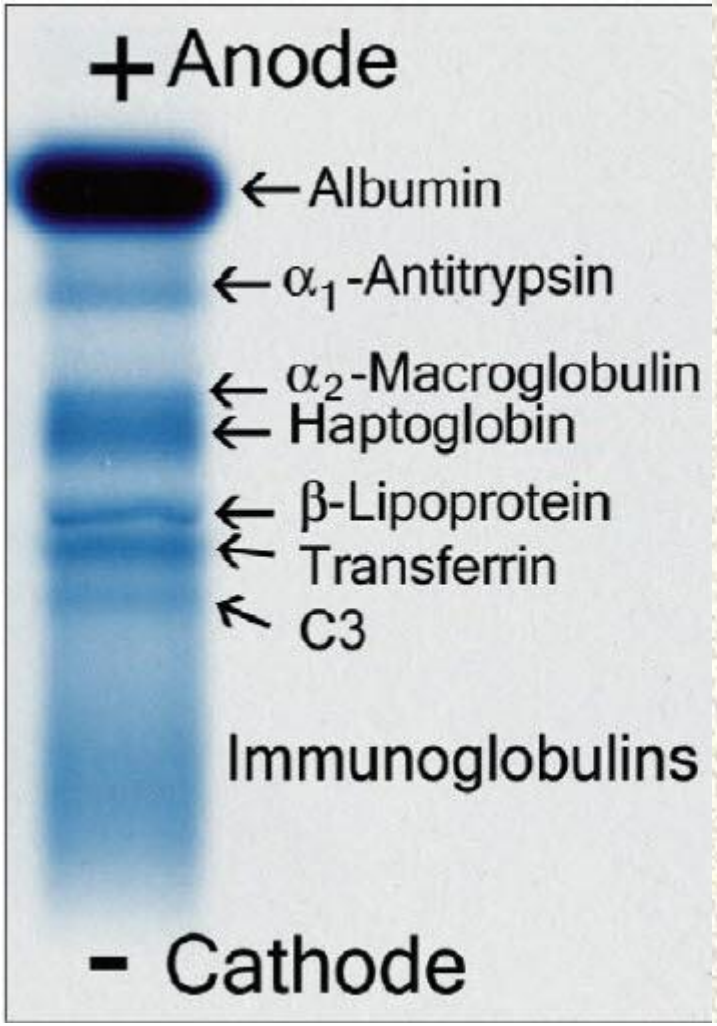
2) agarose gel : 혈청단백 (**Amido black 10B**)

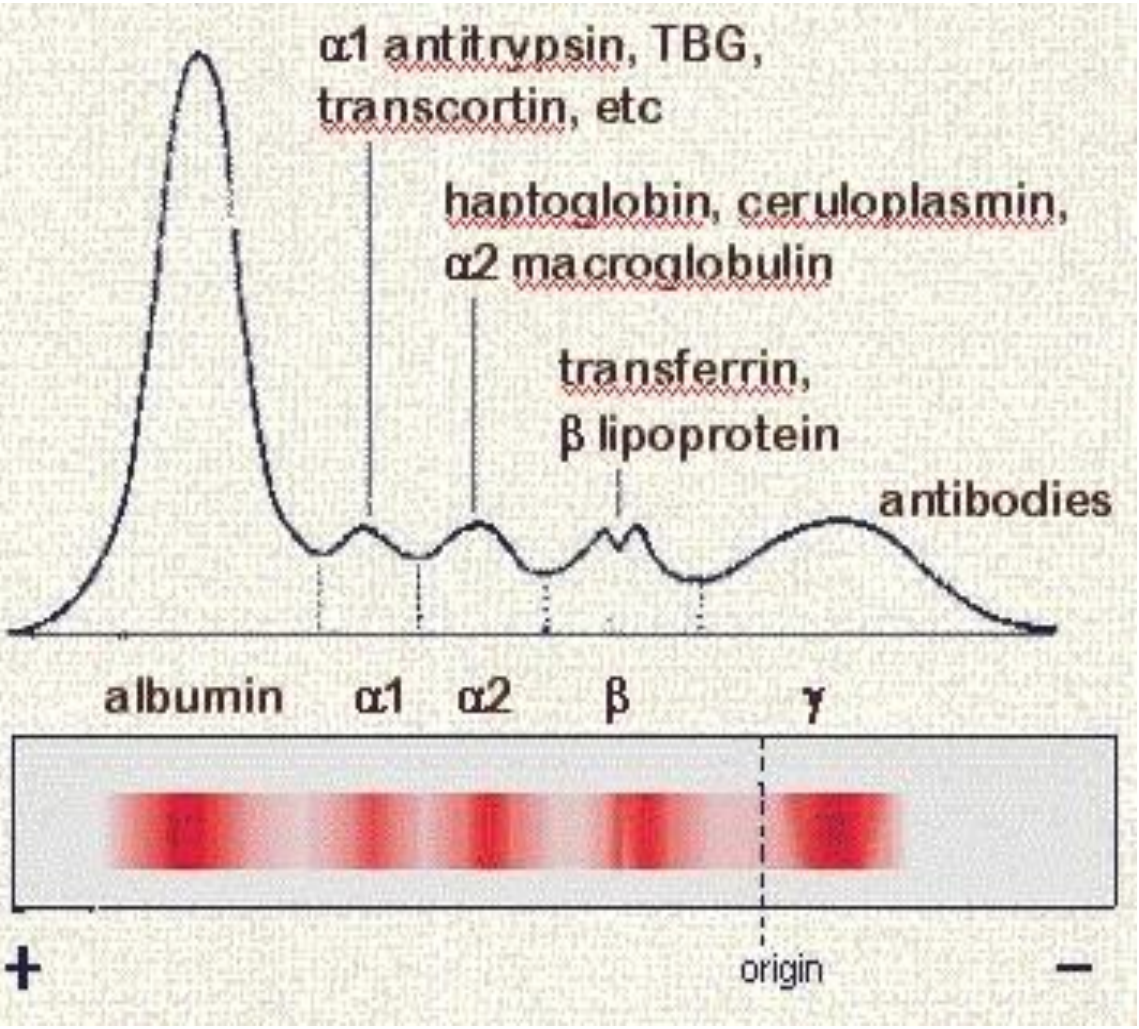
lipoprotein (**Fat Red 7B**)

LD-isoenzyme (**NBTC : Nitro Blue Tetrazolium Chloride**)

3) PAGE : 혈청단백 (**Coomassie brilliant blue G250**)

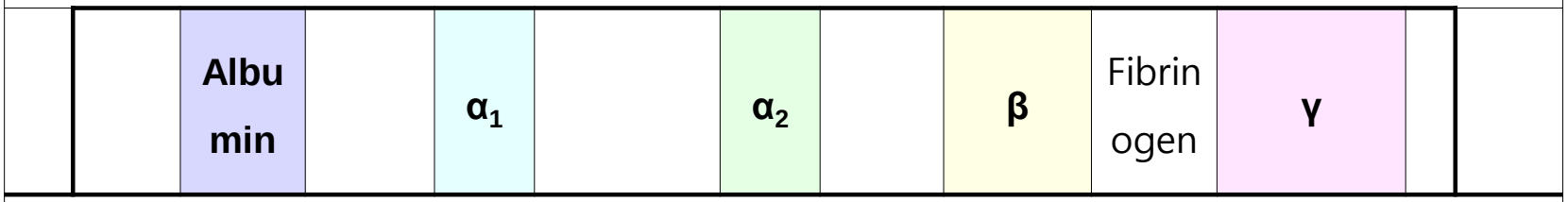
■ 혈청단백 전기영동


+ Anode
← Albumin
← α1-Antitrypsin
← α2-Macroglobulin
← Haptoglobin
← β-Lipoprotein
← Transferrin
← C3
Immunoglobulins
- Cathode

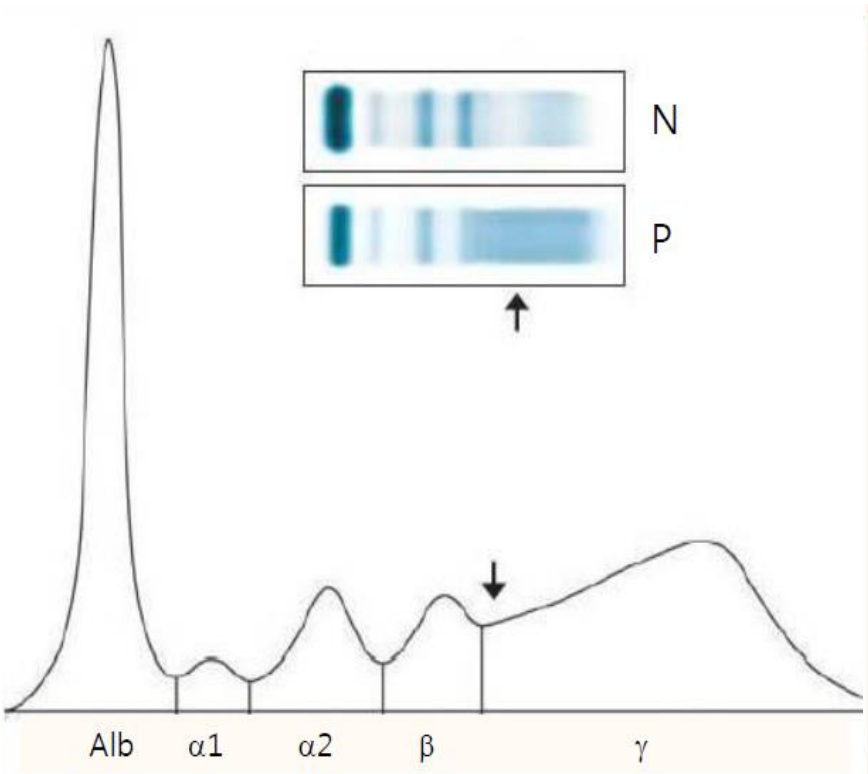

α1 antitrypsin, TBG,
transcortin, etc
haptoglobin, ceruloplasmin,
α2 macroglobulin
transferrin,
β lipoprotein
antibodies
albumin
α1
α2
β
γ
+
origin
-

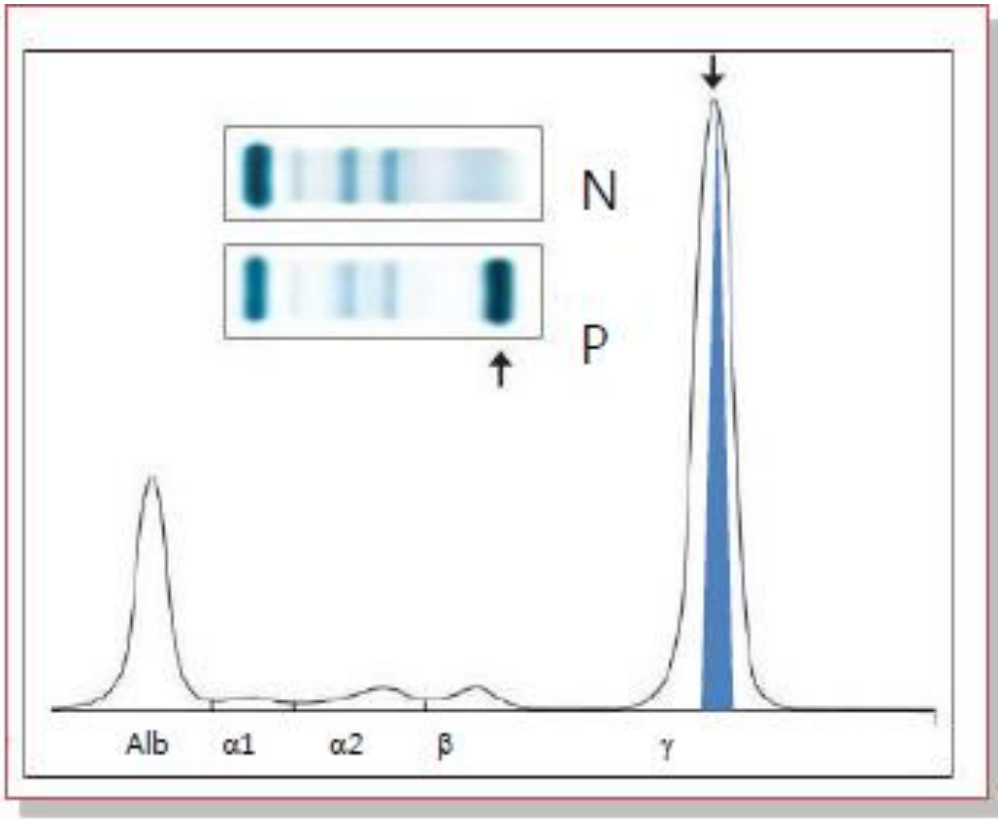
Lecture 3. Analytical Instrument

■ 혈청단백 전기영동

전기영동시 Supporting Media (지지체)					
단백질 분획	Albumin	α_1-Globulin	α_2-Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
정 상 치	50~65%	2~6%	4~8%	8~15%	12~20%
구 체 적 성 분	Pre-Albumin Albumin	α_1-Acid glycoprotein α_1-Antitrypsin α_1-Lipoprotein (HDL) α_1-Fetoprotein Mucoprotein	α_2-Macroglobulin Haptoglobin Ceruloplasmin Glycoprotein Prothrombin	β-Lipoprotein (LDL) Preβ-Lipoprotein (VLDL) Transferrin Hemoglobin (Hemopexin) C_3 Complement C_4 Complement CRP	IgG IgM IgA IgD IgE

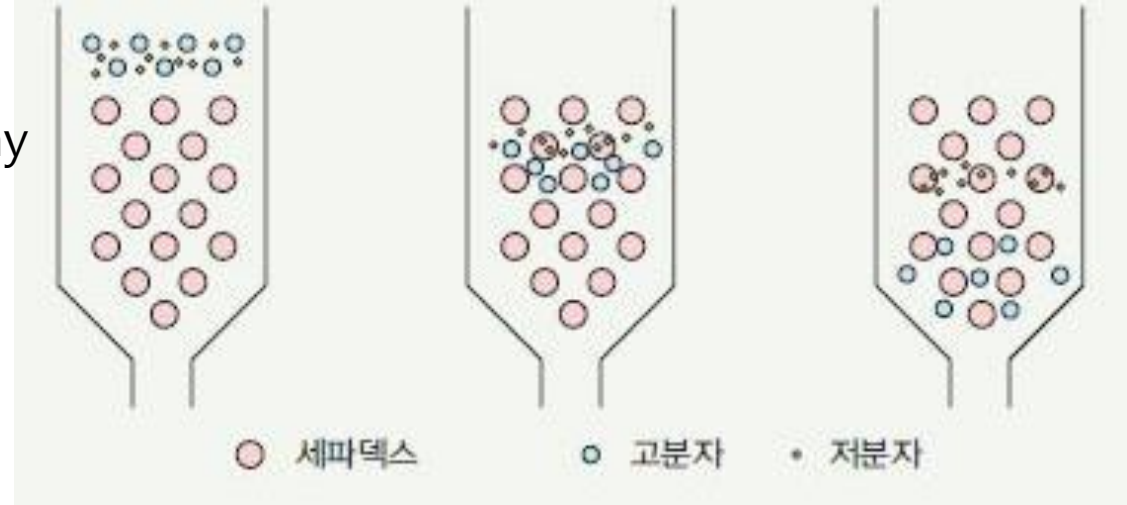
■ 혈청단백 전기영동





■ 크로마토그래피(Chromatography)

- 혼합물에서 특정 물질을 추출하는 분리 분석법의 총칭
- 고정상에 따른 분류
  - ① 관 크로마토그래피 (Column)
  - ② 여과지 크로마토그래피 (Paper)
  - ③ 박층 크로마토그래피 (Thin Layer)
- 이동상에 따른 분류
  - ① 가스 크로마토그래피 (GC)
  - ② 액체 크로마토그래피 (LC)
    - → HPLC
    - → Gel filtration chromatography



■ 기타 기초기술

- 초원심법 (Ultracentrifuge)

- 삼투압측정(Osmometry)

c 반투막을 경계로 서로 다른 농도를 가진 두 용액 사이에 농도가 낮은 쪽에서 높은 쪽으로 용매가 이동하는 현상을 삼투현상이라 하며 이 현상으로 생기는 압력을 삼투압이라고 한다.

→ 용액의 총괄성 : 삼투압, 끓는점, 어는점, 증기압

→ 1 Osm/kg, 통상적으로 mOsm/kg

- 굴절률 측정 (Refractometry)

→ 다른 매질의 계면에서 빛의 진행 속도차이 때문에 굴절하는 정도를 측정

→ 굴절률은 매질의 조성, 용질의 농도에 의존, 혈청에서는 혈청 총 단백의 농도

- 제단백 (Deproteinization)

→ 목적 생체 분자의 측정에 단백질이 영향을 미치는 경우, 단백 제거가 필요

→ 변성에 의한 제거(열, 산, 유기용매), 분자량 차이(투석, 여과), 염석

→ 중금속을 이용한 제거

Folin-Wu법 : 황산산성 하에서 텅스텐산 나트륨을 이용한 제거

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \rightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$ // H_2WO_4 + Protein → 침전

Somogyi-nelson법 : 약알카리성으로 황산아연수용액을 이용한 제거

$Ba(OH)_2 + ZnSO_4 \rightarrow BaSO_4 + Zn(OH)_2$ // $Zn(OH)_2$ + Protein → 침전

■ 기타 기초기술

- 염석법 (Salting out)

→ 고분자 전해질의 수용액에 고농도의 염을 가하면 용해도가 저하되어 고분자가 석출 침전하는 현상을 염석이라 한다.

- 추출법 (Extraction)

→ 특정 용매와 목적분자의 친화성을 이용하여 분리하는 것을 용매추출이라고 한다.

- 투석 (Dialysis), 농축법 (Concentration)

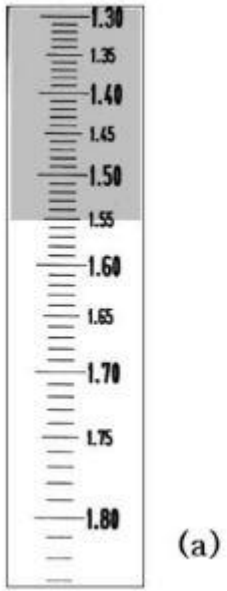
→ 투석 : 반투막을 이용하여 용액에 포함된 저분자를 제거하거나 용매 치환을 한다.

→ 농축 : 분석에 앞서 시료 중 목적분자의 농도를 높이는 방법

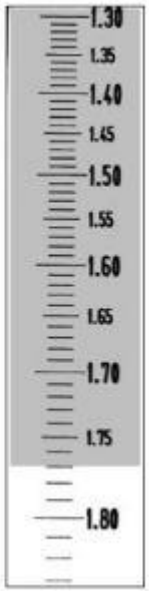
■ 기타 기초기술

- 굴절계 (Refractometer)



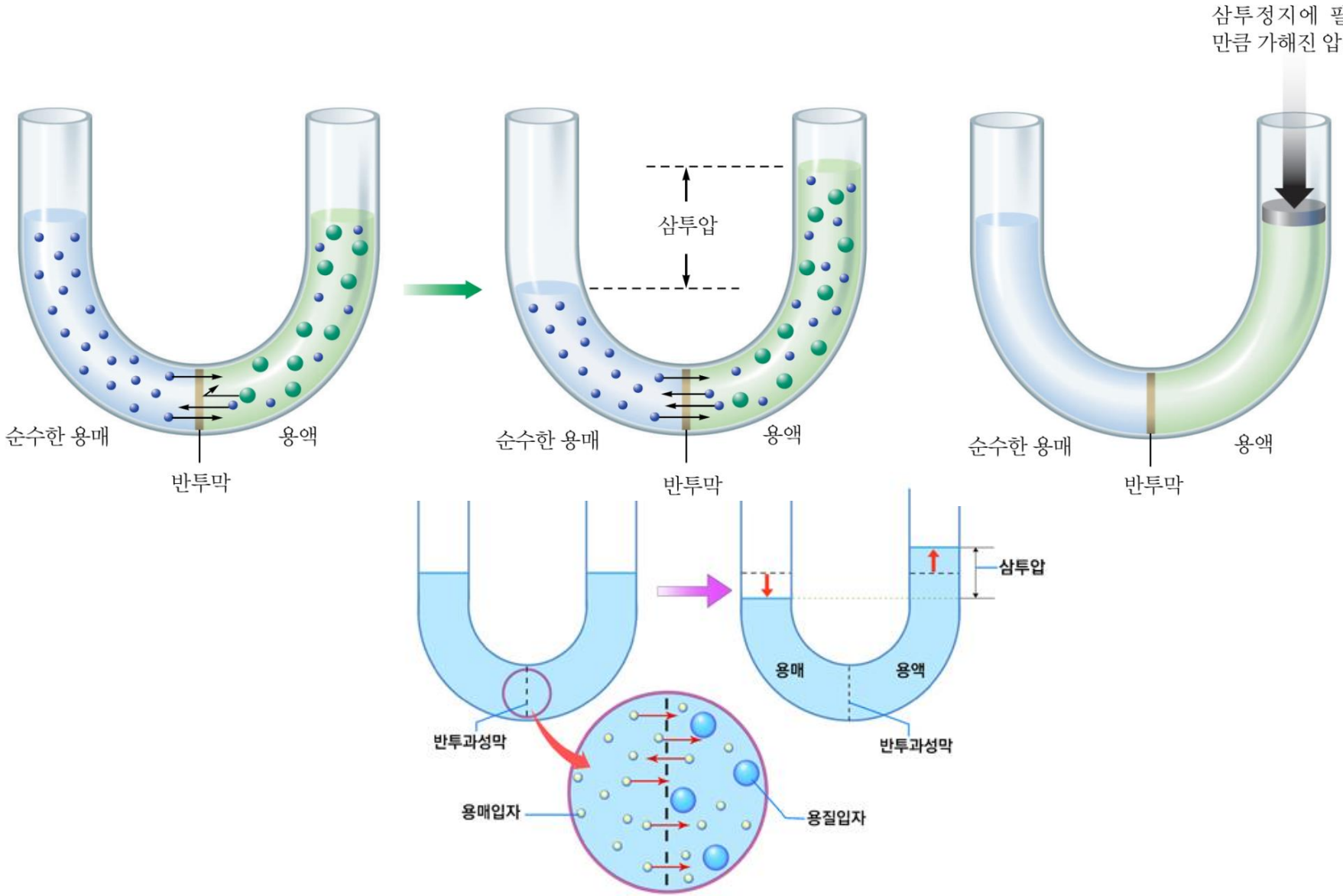


(a)

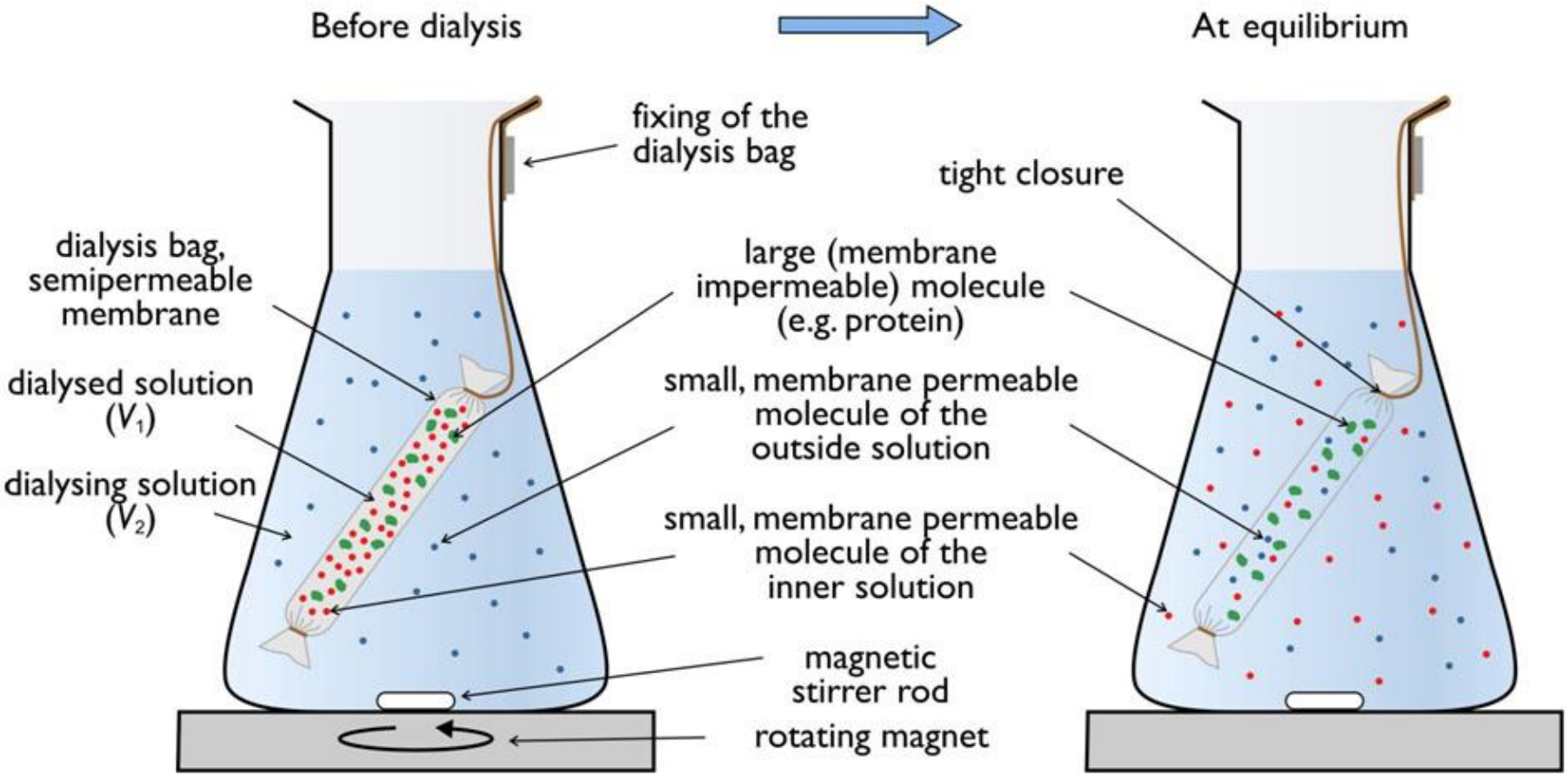


(b)

■ 기타 기초기술


삼투정지에 필요한
만큼 가해진 압력
삼투압
순수한 용매
용액
반투막
순수한 용매
용액
반투막
순수한 용매
용액
반투막
삼투압
용매
용액
반투과성막
반투과성막
용매입자
용질입자

■ 기타 기초기술


Before dialysis
At equilibrium
fixing of the dialysis bag
tight closure
dialysis bag, semipermeable membrane
large (membrane impermeable) molecule (e.g. protein)
dialysed solution (V_1)
small, membrane permeable molecule of the outside solution
dialysing solution (V_2)
small, membrane permeable molecule of the inner solution
magnetic stirrer rod
rotating magnet

Lecture 3. Analytical Instrument

■ 자동분석기 (Autoanalyzer)

- 초기모델은 Continuous flow analyzer

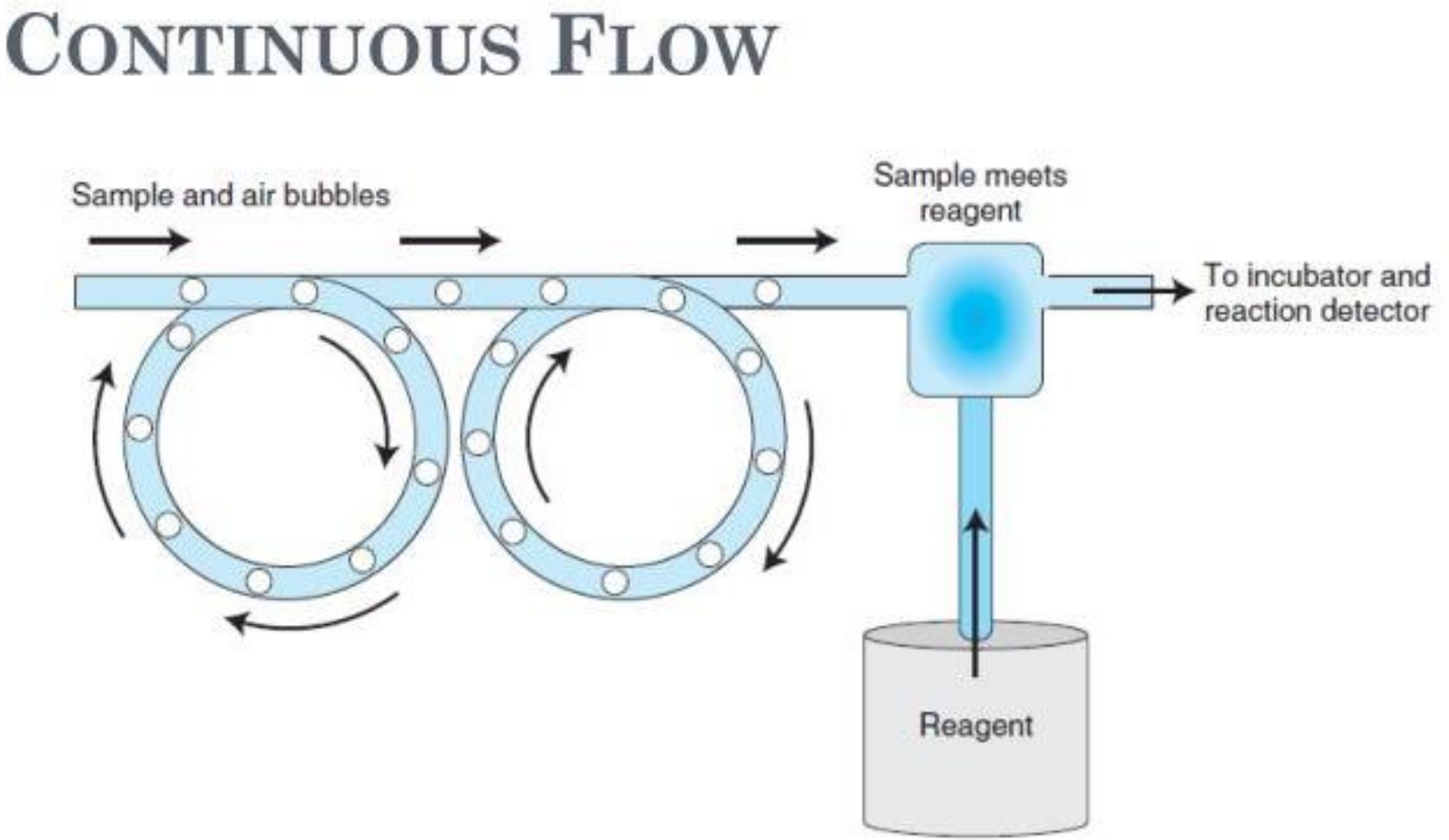
  -> 지름이 일정한 합성 고무관을 일정한 속더로 롤러가 훑어서 기포, 시료, 시약을 흡입 운반하여 일정한 온도에서 반응이 일어나 용액을 flow-cell에서 비색 분석

- 현재는 대부분 Discrete analyzer

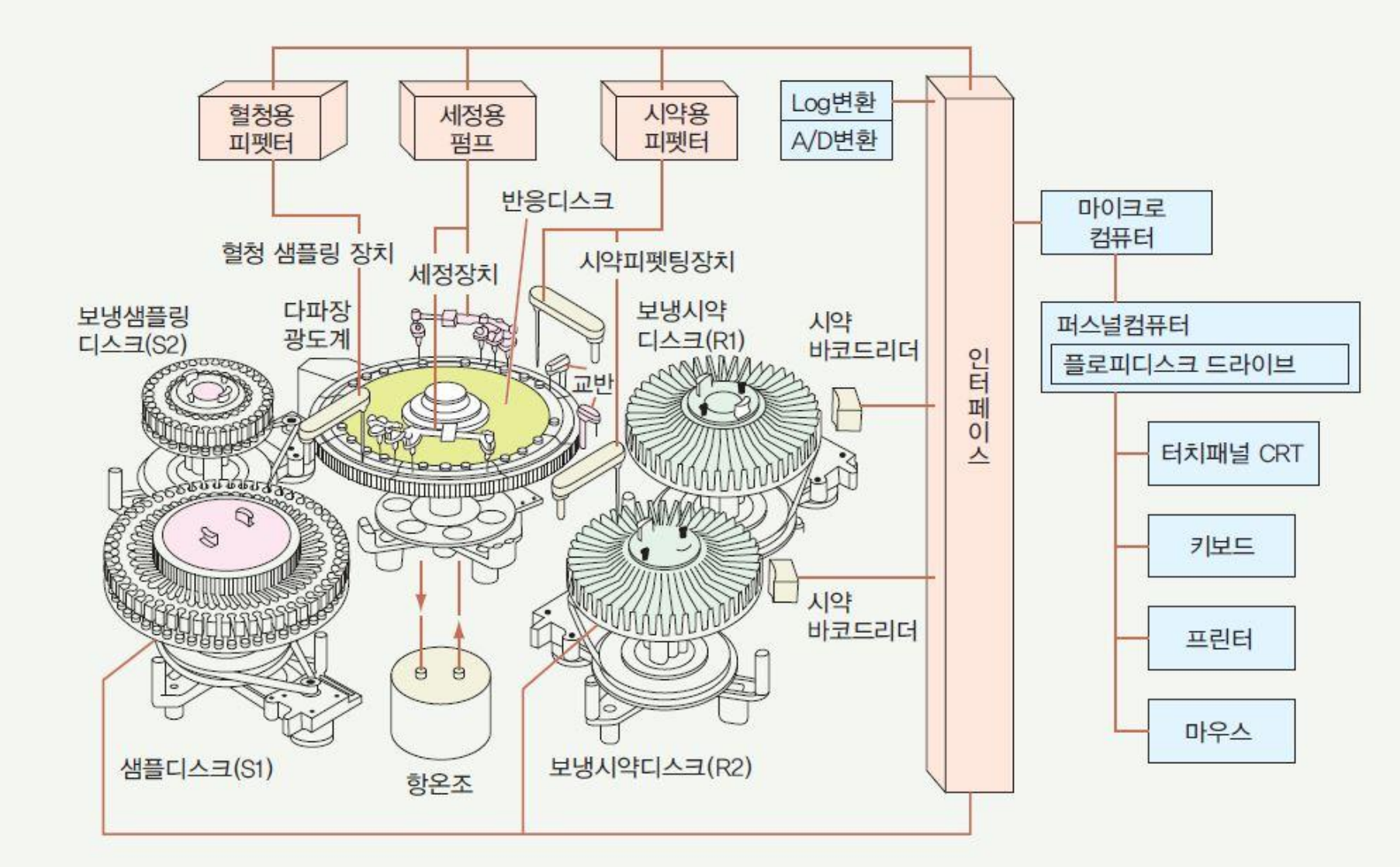
  -> 각 검체는 각각 다른 반응용기(cuvet)에 분주되고 반응시약이 첨가 된후 혼합, incubation된 후 반응 종료 후 비색 분석

① 다검체 처리
② 분석시간 단축
③ 시료나 시약의 미량화
④ 분석의 정밀도 향상
⑤ 초속도분석법을 비롯한 다양한 분석방법 가능
⑥ 검체 맹검 보정이나 광량보정이 용이
⑦ 데이터 처리의 효율화

■ **자동분석기 (Autoanalyzer) - Continuous flow analyzer**



■ 자동분석기 (Autoanalyzer) - Discrete analyzer (Hitachi 7180)

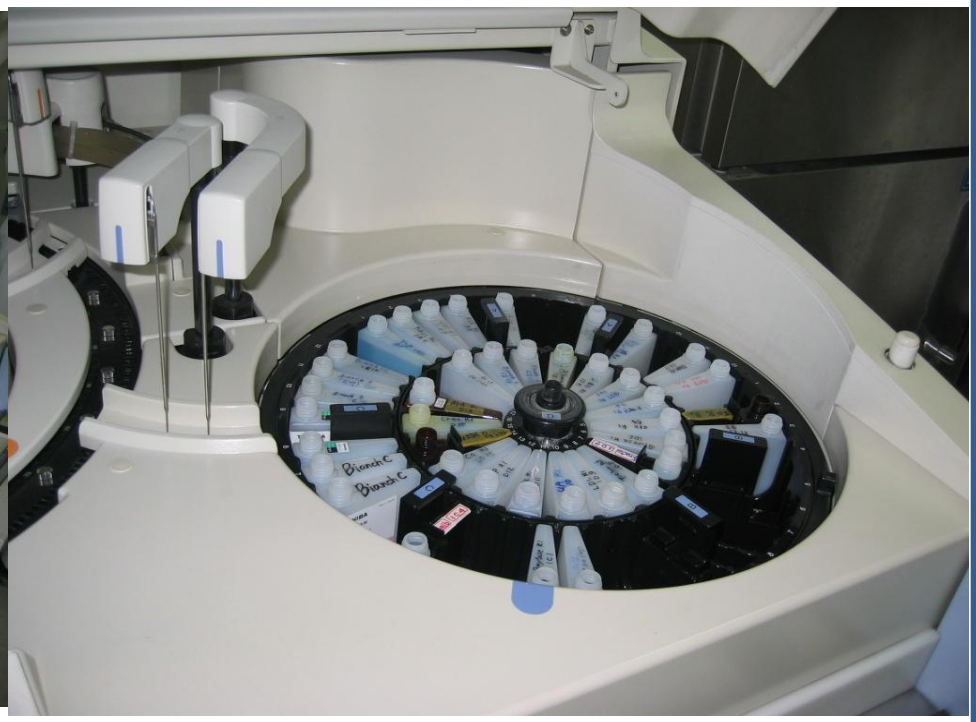


■ 자동분석기 (Autoanalyzer) - Discrete analyzer (Hitachi 7180)

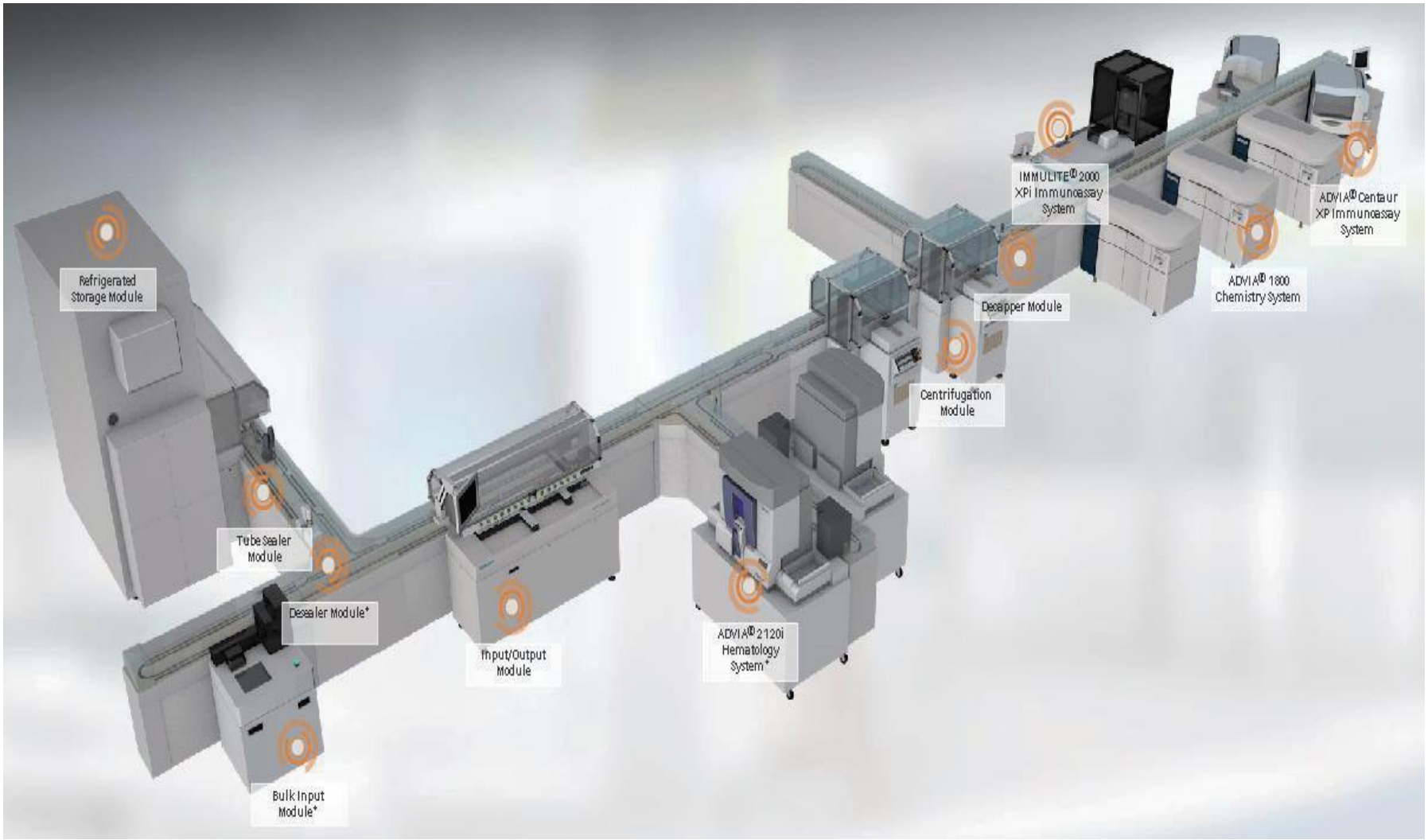


■ 자동분석기 (Autoanalyzer) - Discrete analyzer (Toshiba)



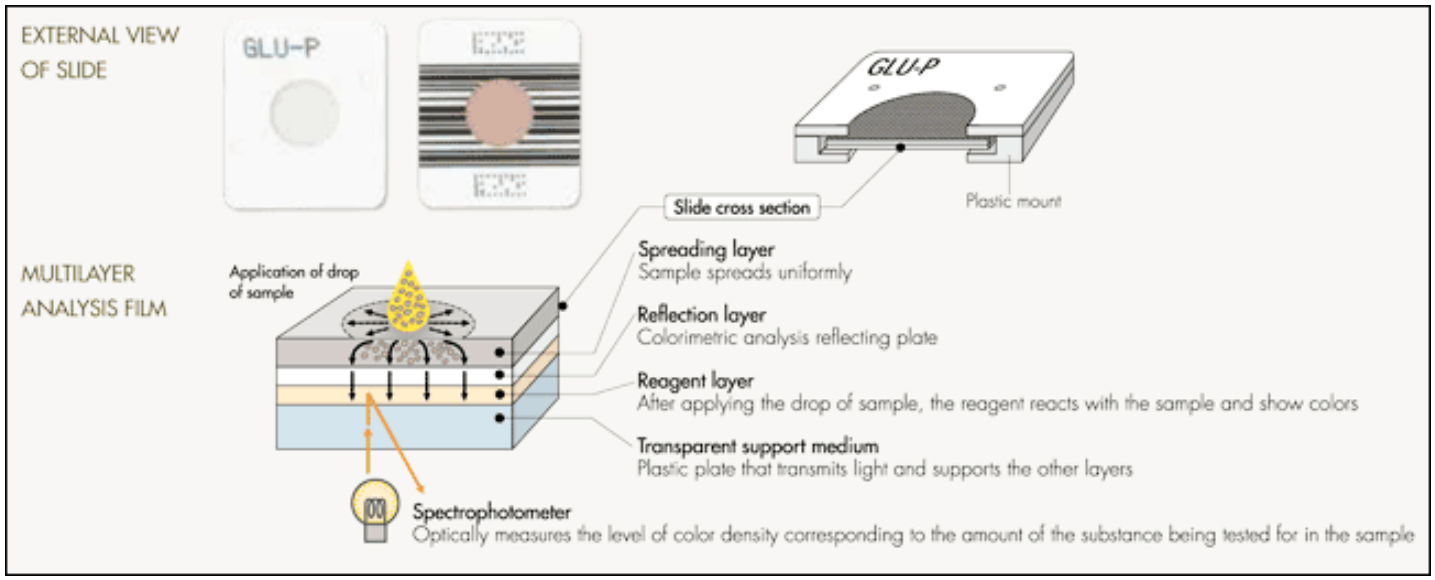


■ Total Laboratory Automation



■ Dry chemistry

- 자동분석기는 분광광도법에 의한 액상시약과 시료의 정색반응(Wet chemistry)을 자동화한 장비이다.
- Dry chemistry란 건조한 시약과 시료를 반응시켜 목적 성분을 정량하는 분석법
- 시약은 건조 상태이지만, 시료(주로 혈청)는 액상이다.
- 간편한 조작, 시약 조제가 필요 없음, 긴급간이검사에 유용
- 다층 필름 방식을 이용하는 것이 일반적이다
- 시약층에서 시료와 시약을 반응시키고 목적 성분의 농도에 의한 정색 정도에 따라 입사광과 반사광의 비율 등을 산출하여 목적 성분을 정량해 낸다.
- Lambert-Beer 법칙 성립 안한다.



■ Dry chemistry

