

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

O P I S P A T E N T O W Y P A T E N T U T Y M C Z A S O W E G O

97913

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 13.03.76 (P. 187944)

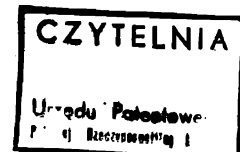
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 14.03.77

Opis patentowy opublikowano: 31.08.1978

MKP G01n 33/16

Int. Cl². G01N 33/16



Twórcy wynalazku: Witold Holiczer, Krystyna Piskurek

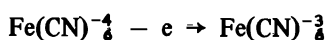
Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Śląska im. Wincentego Pstrowskiego,
Gliwice (Polska)

Sposób i urządzenie do oznaczania hemoglobiny we krwi metodą fotometryczną

Przedmiotem wynalazku jest sposób i urządzenie do pomiaru stężenia hemoglobiny we krwi metodą fotometryczną i przeznaczony jest do stosowania w laboratoriach analitycznych posiadających w swoim wyposażeniu spektrofotometri lub do stosowania w rozwiązaniach urządzeń do pomiarów stężenia hemoglobiny we krwi.

Dotychczas pomiaru stężenia hemoglobiny we krwi metodą cyjanohemiglobinową dokonuje się poprzez pomiar ekstynkcji próbki krwi, przy długości fali 540 nm, rozcieńczonej odczynnikiem Drabkina w stosunku 1:251. Stężenie hemoglobiny określa się zgodnie z prawem Bouguera-Lamberta-Beera. Roztwór Drabkina posiada w swoim składzie cyjanek potasowy w ilości 50 mg/l roztworu, żelazicyjanek potasowy w ilości 200 mg/l roztworu oraz dwuwęglan sodowy w ilości 1 g/l roztworu. Na skutek działania cyjanku oraz żelazicyjanku potasowego wszystkie pochodne hemoglobiny, takie jak oksyhemoglobina, hemoglobina zredukowana, hemiglobina itp. przechodzą w jedną: cyjanohemoglobinę. Ponieważ reakcja ta przebiega powoli, stąd pomiaru ekstynkcji próbki można dokonywać po 20 minutach od chwili jej rozcieńczenia. (Roland Richterich, *Chemia kliniczna* 1971, str. 106-119, str. 336-338).

Zasadniczą wadą pomiaru stężenia hemoglobiny metodą cyjanhemiglobinową przy użyciu odczynnika Drabkina lub jego modyfikacji jest długi, dwudziestominutowy czas zachodzenia procesów fizycznych i reakcji chemicznych. Na czas ten składają się trzy procesy zachodzące w roztworze: hemoliza krwinek czerwonych, tworzenie się kompleksu $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ na skutek działania cyjanku potasu i tworzenie się kompleksu $\text{Fe}(\text{CN})_5^{3-}$ na skutek działania żelazicyjanku potasowego. Czas tworzenia się kompleksu $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ jest, w porównaniu z czasem hemolizy i czasem tworzenia się kompleksu $\text{Fe}(\text{CN})_5^{3-}$, pomijalnie mały. Zatem głównymi przyczynami, które powodują wydłużenie czasu od momentu rozcieńczenia do momentu pomiaru ekstynkcji jest hemoliza krwinek czerwonych oraz powolne zachodzenie reakcji:



Proponowany sposób umożliwia pomiar ekstynkcji próbki natychmiast po jej przygotowaniu, to jest rozcieńczeniu i wymieszaniu.

Celem wynalazku jest skrócenie czasu od momentu przygotowania próbki, do momentu pomiaru ekstynkcji tej próbki przy pomocy spektrofotometru lub urządzenia co tego celu przeznaczonego.

Sposób według wynalazku polega na tym, że próbkę krwi rozcieńcza się odczynnikiem Drabkina zawierającym dodatek saponiny w ilości nie mniejszej niż 1 mg na 100 ml odczynnika, korzystnie 5–10 mg a oznaczenia dokonuje się przy długości fali promieniowania świetlnego, odpowiadającej punktowi izobestycznemu cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

Urządzenie według wynalazku posiada filtr optyczny, którego maksimum transmisji odpowiada długości fali punktu izobestycznego cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

Sposób polega na tym, że próbkę krwi rozcieńcza się odczynnikiem Drabkina zawierającym dodatek saponiny w ilości nie mniejszej niż 1 mg na 100 ml odczynnika, najkorzystniej 5–10 mg. Po rozcieńczeniu zachodzi proces hemolizy krwinek czerwonych. Po zakończeniu tego procesu, to jest czasie 0,5–1 minut w roztworze znajdują się dwie pochodne hemoglobiny; cyjanohemoglobina, której żelazo dwuwartościowe tworzy z grupą CN⁻ kompleks Fe(CN)⁻⁴ oraz cyjanohemiglobina, której żelazo trójwartościowe tworzy z grupą CN⁻ kompleks Fe(CN)⁻³. Na skutek dużej zawartości w odczynniku Drabkina kompleksu Fe(CN)⁻³ pochodzącego z żelazicyjanku potasowego następuje wolne utlenienie kompleksu Fe/CN⁻⁴, związanego z cyjanohemoglobina do postaci Fe(CN)⁻³. Zmianę ekstynkcji w czasie, spowodowaną tą reakcją obserwuje się na spektrofotometrze dla długości fal, różnych od długości fal odpowiadających punktom izobestycznym.

W punktach izobestycznych ekstynkcja nie ulega zmianom w czasie od momentu zakończenia procesu hemolizy, co umożliwia jej pomiar po upływie 0,5–1 minuty od momentu przygotowania próbki. Ponieważ spektrofotometry charakteryzują się różnymi na ogół dokładnościami ustawienia długości fali oraz różnią monochromatycznością światła, dlatego punkt izobestyczny na podziałce nastawienia długości fali może być różny dla różnych spektrofotometrów. Stąd też wynika konieczność jednorazowego znalezienia punktu izobestycznego cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny dla danego spektrofotometru oraz jego kalibracji przy pomocy wzorca cyjanohemiglobiny.

Sposób według wynalazku można także stosować w fotometrach przeznaczonych do bezpośredniego pomiaru stężenia hemoglobiny we krwi posiadających filtr optyczny, którego maksimum transmisji odpowiada długości fali punktu izobestycznego cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

Wynalazek umożliwia pomiar ekstynkcji próbki, a zatem i stężenia hemoglobiny we krwi w czasie 15–30 sekund. Umożliwia także zastosowanie fotometrów w systemach automatycznych analizatorów hematologicznych o dużej wydajności.

Sposób według wynalazku nie zmienia metody pomiarowej oraz stosowanych powszechnie odczynników.

Przykład. Odczynnik Drabkina przygotowuje się następująco: 100 ml dostępnego w handlu odczynnika Drabkina o składzie: NaHCO₃ – 1,0%, K₂CO₃ – 0,1%, KCN – 0,05%, K₂Fe(CN)₆ – 0,2% rozpuszcza się w wodzie destylowanej, dodaje się 10 mg saponiny i dokładnie miesza się. Tak przygotowany roztwór używa się w dalszych czynnościach. Nastawia się na spektrofotometrze długość fali 525 nm, następnie odmierza się 5 ml przygotowanego uprzednio odczynnika Drabkina oraz 0,02 ml krwi. W momencie wprowadzenia próbki krwi do odczynnika uruchamia się stoper, miesza się próbkę i przelewa się do kuwety spektrofotometru. Do kuwety porównawczej wlewa się odczynnik Drabkina. Po upływie dwóch minut od momentu wprowadzenia próbki krwi do odczynnika odczytuje się ekstynkcję E₅₂₅ (t = 2 min). Po odczekaniu następnych osiemnastu minut ponownie odczytuje się ekstynkcję E₅₂₅ (t = 20 min). Następnie ustawia się długość dali 540 nm i powtarza uprzednio wykonywane czynności, uzyskując w ten sposób ekstynkcje E₅₄₀ (t = 2 min) oraz E₅₄₀ (t = 20 min).

W celu prowadzenia dalszych prób niezbędne są następujące obliczenia:

$$\delta_{525} = \frac{E_{525}(t = 2 \text{ min}) - E_{525}(t = 20 \text{ min})}{E_{525}(t = 20 \text{ min})} \cdot 100$$

$$\delta_{540} = \frac{E_{540}(t = 2 \text{ min}) - E_{540}(t = 20 \text{ min})}{E_{540}(t = 20 \text{ min})} \cdot 100$$

$$\lambda_1 = \frac{525 \delta_{540} - 540 \delta_{525}}{\delta_{540} - \delta_{525}}$$

Obliczaną wartość λ_1 ustawia się na spektrofotometrze i dokonuje się ponownie badania dynamiki zmian ekstynkcji poprzez jej pomiar w 2 i 20 minucie, uzyskując w ten sposób $E_{\lambda_1}(t = 2 \text{ min})$ oraz $E_{\lambda_1}(t = 20 \text{ min})$. Następnie dokonuje się obliczenia:

$$\delta_{\lambda_1} = \frac{E_{\lambda_1}(t = 2 \text{ min}) - E_{\lambda_1}(t = 20 \text{ min})}{E_{\lambda_1}(t = 20 \text{ min})} \cdot 100$$

Po obliczeniu δ_{λ_1} mogą zaistnieć dwa przypadki: $|\delta_{\lambda_1}| < \delta_0$, $|\delta_{\lambda_1}| > \delta_0$. W przypadku gdy moduł z δ_{λ_1} jest mniejszy od założonej dokładności δ_0 wówczas wartość λ_1 przyjmuje się za długość fali promieniowania świetlnego odpowiadającą punktowi izobestycznemu cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

W przypadku, gdy moduł δ_{λ_1} jest większy od założonej dokładności δ_0 wówczas jeżeli $\delta_{\lambda_1} > 0$ przyjmuje się do obliczeń δ_{λ_1} , λ_1 , δ_{540} , 540 jeżeli $\delta_{\lambda_1} < 0$ przyjmuje się do obliczeń δ_{λ_1} , λ_1 , δ_{525} , 525:

Oblicza się λ_2 według zależności:

$$\lambda_2 = \frac{\delta_{540} \lambda_1 - \delta_{\lambda_1} 540}{\delta_{540} - \delta_{\lambda_1}} \quad \text{jeżeli } \delta_{\lambda_1} < 0$$

$$\lambda_2 = \frac{\delta_{\lambda_1} 525 - \delta_{525} \lambda_1}{\delta_{\lambda_1} - \delta_{525}} \quad \text{jeżeli } \delta_{\lambda_1} > 0$$

Ustawia się na spektrofotometrze długość fali λ_2 i ponownie przeprowadza się pomiary dynamiki zmian ekstynkcji otrzymując $E_{\lambda_2}(t = 2 \text{ min})$, $E_{\lambda_2}(t = 20 \text{ min})$.

Powtarza się przeprowadzenie obliczeń i badań do momentu uzyskania $|\delta_{\lambda_1}| < \delta_0$. Do obliczeń kolejnych długości fali przyjmuje się błędy względne δ_{λ_1} o przeciwnych znakach i wartościach najbardziej bliskich zera. Zazwyczaj już w pierwszym lub drugim przybliżeniu uzyskuje się wartość długości fali odpowiadającą punktowi izobestycznemu. Wartość δ_0 należy przyjmować w granicach 1% do 2%, w zależności od jakości spektrofotometru. Przy poszukiwaniu punktu izobestycznego, nie jest konieczne stosowanie krwi od tego samego pacjenta. Powtarzalność rozcieńczania próbki krwi nie ma wpływu na dokładność wyznaczenia punktu izobestycznego.

Mając wyznaczony punkt izobestyczny można przystąpić do kalibracji spektrofotometru w tym punkcie. Do kuwety pomiarowej wlewa się wzorzec cyjanohemoglobiny i odczytuje się ekstynkcję wzorca.

Obliczamy współczynnik:

$$a = \frac{C_w}{E_w}$$

C_w — stężenie hemoglobiny

E_w — ekstynkcja wzorca w punkcie izobestycznym

Zależność stężenia hemoglobiny dowolnej próbki od jej ekstynkcji jest następująca:

$$c = a E$$

c — stężenie hemoglobiny we krwi w g/100 ml

E — ekstynkcja próbki we krwi rozcieńczonej w stosunku 1 : 25 odczynnikiem Drabkina z saponiną, mierzona w dowolnym momencie czasu po jej przygotowaniu w znalezionym punkcie izobestycznym cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oznaczania hemoglobiny we krwi metodą fotometryczną, z n a m i e n n y t y m, że próbkę krwi rozcieńcza się odczynnikiem Drabkina zawierającym dodatek saponiny w ilości nie mniejszej niż 1 mg na 100 ml odczynnika, korzystnie 5–10 mg a oznaczenia dokonuje się przy długości fali promieniowania świetlnego, odpowiadającej punktowi izobestycznemu cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.

2. Urządzenie do oznaczania hemoglobiny we krwi metodą fotometryczną, z n a m i e n n e t y m, że posiada filtr optyczny, którego maksimum transmisji odpowiada długości fali punktu izobestycznego cyjanohemoglobiny i cyjanohemiglobiny.