

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 151919 B



(21) Patentansøgning nr.: 2747/79

(22) Indleveringsdag: 28 jun 1979

(41) Alm. tilgængelig: 03 jun 1980

(44) Fremlagt: 11 jan 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *RADIOMETER A/S; Emdrupvej 72; 2400 København NV, DK

(72) Opfinder: Torben Falch *Christiansen; DK

(51) Int.Cl.⁴ G 01 N 27/56
// G 01 N 27/30
// G 01 N 33/50

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) **Fremgangsmåde, referencevæske og referencevæskesystem til samtidig kalibrering og/eller kvalitetskontrol af calciumfølsomme elektroder og pH-elektroder**

(56) Fremdragne publikationer

Andre Publikationer : Analytical Biochemistry 89 (1978)
side 521-528 og Analytical Chemistry
50 (1978) side 1922-1924

(57) Sammendrag:

SAMMENDRAG

2747-79

Referencevæske til kalibrering eller kvalitetskontrol af instrumenter, der bestemmer ioniseret calcium og pH-værdi. Referencevæsken indeholder både en bestemt calciumionaktivitet og en pH-puffer og kan derfor anvendes til kalibrering af både den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden i instrumenterne. pH-Pufferen er en nitrogenholdig organisk sulfonsyre og denne syres salt, idet syren har en pK-værdi i området 6,6 - 7,6. Referencevæsken har en ionstyrke på 0,15 - 0,17, en pufferkapacitet β i området 0,04 - 0,10 og er emballeret i glasampuller. Fremgangsmåde til kalibrering eller kvalitetskontrol af de ovennævnte instrumenter foretages ved anvendelse af referencevæsken med to forskellige niveauer for henholdsvis calciumionaktivitet og pH-værdi.

DK 151919 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde, en referencevæske og et referencevæskesystem til kalibrering og/eller kvalitetskontrol af instrumenter, der er beregnet til bestemmelse af indholdet af calciumioner i væskeprøver. Opfindelsen angår også en fremgangs-

5 måde til kalibrering og/eller kvalitetskontrol af sådanne instrumenter, ved hvilken fremgangsmåde en sådan referencevæske anvendes.

I nærværende beskrivelse og krav betegner "kvalitetskontrol" overvågningen af analysemetoders præcision og nøjagtighed.

Det er kendt, at aktiviteten eller koncentrationen af calciumioner i biologiske væsker er af kritisk betydning for mange vigtige biologiske processer. Indholdet af calciumioner i serum eller plasma er af særlig interesse, da det spiller en vigtig rolle i den samlede calciummetabolisme. I de senere år er der fremkommet calciumfølsomme elektroder, som muliggør en nøjagtig og relativt simpel bestemmelse af calcium-

10 ioner.

15

Det er kendt, at indholdet af calciumioner i serum er pH-afhængigt, hvilket især skyldes, at calciums binding til serumproteiner er pH-afhængig. Det er derfor af betydning at bestemme en serumprøves pH-værdi sammen med dens calciumionaktivitet, enten for at opgive det målte sæt af calciumionaktivitet og pH-værdi eller for at foretage en omregning af calciumionaktiviteten til den calciumionaktivitet, der ville findes i prøven ved en forudbestemt "normal" pH-værdi, f.eks. pH 7,40. Relationen mellem calciumioner og pH er f.eks. behandlet af Moore i "The Journal of Clinical Investigation", volume 19, 1970, side

20 318 - 334, og i USA patentskrift 3.941.565. De mest hensigtsmæssige instrumenter til bestemmelse af calciumioner i biologiske væsker er derfor sådanne, som på den væskeprøve, hvis indhold af calciumioner skal bestemmes, måler både med en calciumfølsom elektrode og en pH-elektrode.

30 Ligesom andre elektrokemiske måleelektroder skal calcium- og pH-elektroden i sådanne instrumenter til bestemmelse af calciumionaktivitet med jævne mellemrum kalibreres mod referencevæsker, der udviser kendte nøjagtige værdier for den størrelse, der skal bestemmes med

den pågældende elektrode. Ved den praktiske anvendelse af de pågældende instrumenter vil man til denne kalibrering foretrække at anvende kommercielle referencevæsker, der er således fremstillet og emballeret, at de er langtidsstabile under bibeholdelse af deres fra

5 fabrikanten deklarerede data, og som er emballeret i hensigtsmæssige enhedsdosispakninger, fra hvilke de let kan overføres til det instrument, der skal kalibreres. Til kalibrering af pH-elektroder har det i mange år været kendt at anvende fosfatpufferopløsninger emballeret i glasampuller. Fosfatpuffere er imidlertid ubrugelige til anvendelse i instrumenter indeholdende calciumfølsomme elektroder, da

10 en forurening af en calciumfølsom elektrode med fosfat ville forstyrre elektrodens funktion. Til kalibrering af calciumfølsomme elektroder kendes f.eks. kommercielle referenceopløsninger, som indeholder 150 mmol NaCl/liter og henholdsvis 1,00 og 2,00 mmol CaCl_2 /liter.

15 Da en kalibrering af en elektrode sædvanligvis involverer udmåling af elektroden mod to forskellige referencevæsker med hver sit niveau for den størrelse, der skal måles, omfatter kalibreringen af de ovennævnte instrumenter til bestemmelse af calciumionaktivitet og pH anvendelsen af fire forskellige referencevæsker, to for calcium og to for pH.

20 Det vil være en stor betjeningsmæssig fordel at kunne kalibrere den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden samtidigt på samme referenceopløsning, så at kalibreringen af instrumentets to elektroder kunne foretages på én og samme type referencevæske med to forskellige niveauer for calciumaktivitet og pH-værdi. En sådan kombineret

25 referencevæske til samtidig kalibrering af calciumelektroder og pH-elektroder skal imidlertid opfylde en lang række krav, der til dels måtte forekomme indbyrdes uforenelige:

For at kunne anvendes til kalibrering af pH-elektroden skal den calciumionholdige referencevæske indeholde et pH-puffersystem, men

30 dette pH-puffersystem må ikke interferere med calciummålingen. pH-puffersystemets bestanddele må således ikke være opløseligt i de calciumfølsomme elektrodens calciummembran, det må ikke fælde calciumioner, og dets binding af calciumioner skal være stabil under de i praksis forekommende opbevarings- og anvendelsesbetingelser. Endvidere er det af betydning, at liquid junction-potentialet mellem

35

pH-puffersystemet og en stærk KCl-opløsning, der anvendes som elektrolyt i referenceelektrodesystemet, er reproducerbart og helst det samme som i serum. De pH-puffere, der kendes til anvendelse i kommercielle langtidsstabile referencevæsker, opfylder ikke disse krav. pH-pufferen bør endvidere kunne tåle autoklavering (opvarmning til 121°C).

Når referencevæsken skal anvendes til at bestemme pH-værdi i fysiologiske væsker såsom serum/plasma, skal dens pH-værdi ved 37°C optimalt ligge ved ca. 7,4, hvilket er den normale pH-værdi i serum/plasma, og ved ca. 6,8, jfr. næste afsnit, og pH-puffersystemet må vælges under hensyntagen hertil.

(Den fra 7,4 forskellige pH-værdi kunne vælges høj, f.eks. pH-værdi 8, men dette ville ikke være i overensstemmelse med de eksisterende pH-standarder til måling af pH-værdi i serum/plasma, og samtidig ville en sådan referencevæske have en for stor affinitet til CO₂, hvilket ville føre til dannelse af carbonationer, med hvilke calciumioner kan fældes som calciumcarbonat, hvilket naturligvis er uønsket i en referencevæske til bestemmelse af calcium).

Endelig skal pH-pufferen i referencevæsken have tilstrækkelig stor pufferkapacitet.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at en bestemt type pH-puffere, nemlig puffere, der består af en alkansulfonsyre med 2 - 3 carbonatomer i alkandelen og med en nitrogenholdig basisk gruppe knyttet til alkandelen via et nitrogenatom i gruppen og denne syres salt, hvor en pK-værdi for syren ligger i området 6,6 - 7,6 ved 37°C, glimrende opfylder samtlige de ovennævnte betingelser, og at calciumionholdige referencevæsker med bestemt pufferkapacitet og ionstyrke indeholdende disse puffere derfor udviser særdeles fordelagtige egenskaber.

Opfindelsen angår således en referencevæske til kalibrering og/eller kvalitetskontrol af både den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden i instrumenter, der er beregnet til bestemmelse af indholdet af

calciumioner og pH i biologiske væsker, hvilken referencevæske ved en bestemt temperatur har en nærmere bestemt calciumionaktivitet og en nærmere bestemt pH-værdi, og denne referencevæske er ejendommeligt ved, at dens nærmere bestemte pH-værdier er tilvejebragt med
5 en pH-puffer, der består af en alkansulfonsyre med 2 - 3 carbonatomer i alkandelen og med en nitrogenholdig basisk gruppe knyttet til alkandelen via et nitrogenatom i gruppen og denne syres salt, idet syren har en pK-værdi i området 6,6 - 7,6 ved 37°C, og at referencevæskens pufferkapacitet ligger i området 0,04 - 0,10, fortrinsvis i
10 området 0,05 - 0,08, og at referencevæsken har en ionstyrke på 0,15 - 0,17.

pH-Puffersystemer bestående af en nitrogenholdig organisk sulfonsyre og denne syres salt er en kendt klasse af puffersystemer, der er beskrevet f.eks. i *Biochem.*, 5, (1966), 467 og *Analytical Chemistry*,
15 50, (1978) 1922. Velegnede eksempler på sådanne syrer, der er alkansulfonsyrer med nitrogenholdige basiske grupper knyttet til alkandelen, som specielt er ethan eller propan (med andre ord, alkandelen indeholder især 2 - 3 carbonatomer), via et nitrogenatom i de nitrogenholdige basiske grupper, er 3-(N-morpholino)propansulfonsyre
20 (MOPS), pK-værdi 7,18 ved 25°C, piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsyre) (PIPES), pK-værdi 6,8 ved 20°C, N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonsyre (ACES), pK-værdi 6,9 ved 20°C, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsyre (BES), pK-værdi 7,15 ved 20°C, N-TRIS-(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsyre (TES), pK-værdi 7,5
25 ved 20°C, og N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsyre (HEPES), pK-værdi 7,55 ved 20°C.

Referencevæsken ifølge opfindelsen sammensættes normalt til optimal anvendelse ved den temperatur, der er den normale arbejdstemperatur for de instrumenter til bestemmelse af calciumionaktivitet, der skal
30 kalibreres eller underkastes kvalitetskontrol under anvendelse af referencevæsken, dvs. den temperatur, til hvilken instrumentet termostaterer de i instrumentet indførte prøver, f.eks. 37°C eller 25°C, og referencevæskens ionstyrke svarer til ionstyrken af en isotonisk saltopløsning, dvs. 0,15 - 0,17. Ved 37°C og en ionstyrke

på 0,15 falder de ovennævnte pK-værdier med 0,25 - 0,35. Som eksempler kan nævnes, at BES, som ved 37°C og en ionstyrke på 0,15 har en pK-værdi på 6,9, er velegnet til at fremstille en pH-puffer med pH-værdi 6,8 (HBES:BES = 1,25:1), TES, som ved 37°C og ionstyrke 0,15 har en pK-værdi på 7,22, er velegnet til at fremstille en pH-puffer med pH-værdi 7,4 (HTES:TES = 1:1,5), og HEPES, som ved 37°C og en ionstyrke på 0,15 har en pK-værdi på 7,34, er velegnet til at fremstille en pH-puffer med pH-værdi 7,4 (HHEPES:HEPES = 1:1,15).

- 10 En hensigtsmæssig angivelse af de koncentrationer af puffer, der anvendes i referencevæsken ifølge opfindelsen, er en angivelse af den pufferkapacitet, der skal tilstræbes i systemet. Denne ligger ifølge opfindelsen i området 0,05 - 0,08. Således er pufferkapaciteten β for TES/HTES i en anionkoncentration på 0,05 mol/liter, svarende til en total pufferkoncentration på 0,125 mol/liter, 0,0695, for BES/HBES med en pufferanionkoncentration på 0,05 mol/liter, svarende til en puffertotalkoncentration på 0,1125 mol/liter, 0,0695, og for HEPES/HHEPES i en pufferanionkoncentration på 0,05 mol/liter, svarende til en puffertotalkoncentration på 0,1075 mol/liter, 0,0617. Den tilsvarende kation er fortrinsvis natriumionen.

Pufferkapaciteten β er i denne sammenhæng beregnet ud fra formlen

$$\beta = 2,303 \times c \times (K_a \times 10^{-\text{pH}}) : (K_a + 10^{-\text{pH}})^2,$$

hvor c = puffersystemets totalkoncentration, og K_a = puffersystemets syredissociationskonstant.

- 25 Referencevæsken ifølge opfindelsen kan med hensyn til sit calciumindhold hensigtsmæssigt være en overvejende opløsning af frie calciumioner, f.eks. tilvejebragt ved tilsætning af et opløseligt calciumsalt såsom CaCl_2 . En anden mulighed er at anvende en calcium-puffer. Hvis der anvendes en calcium-puffer, skal ligandens egenskaber være veldokumenterede og opfylde de samme betingelser som er nævnt ovenfor for pH-puffere. Den konditionelle bindingskonstant for calciumioner skal ligge i området $10^2 - 10^4 \text{ mol}^{-1} \times \text{liter}$ ved pH-værdi 7, og f.eks. opfylder nitrilotrieddikesyre (NTA) og citrat disse betingelser.

Et hensigtsmæssigt referencevæskesystem ifølge opfindelsen består f.eks. af en referencevæske, der er 2,5 mmolær med hensyn til calciumioner og har en pH-værdi på ca. 6,8, og en referencevæske, der er ca. 1,25 mmolær med hensyn til calciumioner, og som har en pH-værdi på ca. 7,4. Ionstyrken for de to referencevæsker i systemet bør være den samme og er hensigtsmæssigt enten 0,150 ved 25°C eller 0,160 ved 25°C. I litteraturen (f.eks. J. H. Ladenson and G. N. Bowen, Clin. Chem., 19, (1973), 565 og B. Seamonds et. al., Clin. Chem., 18, (1972), 155) har ionstyrken for de standarder, der har været anvendt i forbindelse med måling af calciumioner, ligget omkring 0,150, men i dag er der tendenser til, at standarder til elektrokemisk måling af elektrolyter i serum skal baseres på en ionstyrke på 0,160 (jvf. f.eks. M. S. Mohan and R. G. Bates, NBS Special Publication July 1975, p. 293 og H. D. Schwartz, Clin. Chem. Acta, 64, (1975), 227). Siggaard-Andersen (The Acid-Base Status of the Blood, Munksgaard, Copenhagen 1974, p. 37) angiver ionstyrken i serum til 0,17. Den ønskede ionstyrke i referencevæsken ifølge opfindelsen tilvejebringes hensigtsmæssigt ved tilsætning af NaCl.

De primære standarder, mod hvilke referencevæsken ifølge opfindelsen udmåles i fabrikationsleddet, er standarder for henholdsvis calcium og pH, der er fastlagt med henblik på opnåelsen af den størst mulige nøjagtighed og reproducerbarhed. Hensigtsmæssige primære calciumstandarder kan baseres på calciumcarbonat som referencemateriale, da calciumcarbonat kan fås som et meget rent stof og konventionelt er primært referencemateriale for bestemmelser af totalt calcium i serum, og de primære calciumstandarder fremstilles herudfra ved vejning eller deraf direkte afledte metoder, jfv. den eksperimentelle del. Hensigtsmæssige primære calciumstandarder er f.eks. en standard, som er 1,25 mmolær med hensyn til CaCl_2 og 146,25 mmolær med hensyn til NaCl, hvilken standard ved 25°C har en ionstyrke på 0,150, og en standard, som er 2,50 mmolær med hensyn til CaCl_2 og 142,50 mmolær med hensyn til NaCl, hvilken standard ved 25°C har en ionstyrke på 0,150. (Ved 37°C vil den molære koncentration og ionstyrken være 0,4% lavere.)

Calciumaktiviteten i standarder baseret på en ionstyrke på 0,150 vil være 1,2 - 1,5% højere end en standard baseret på en ionstyrke på 0,160, når standarderne tænkes udmålt mod hinanden med en mættet calomelreferenceelektrode. Uoverensstemmelsen mellem standarderne
5 med forskellig ionstyrke kommer imidlertid kun til syne, fordi ioniseret calcium i serum konventionelt angives i koncentrationsenheder i stedet for at benytte en aktivitetsskala, hvor resultatet vil være uafhængigt af den benyttede standards ionstyrke.

Ved anvendelse af de ovennævnte standarder med en ionstyrke på
10 0,150 er der etableret en ny aktivitetsskala, der er proportional med den sande aktivitet med en proportionalitetsfaktor på ca. 3,4.

Til udmåling af referencevæskens pH anvendes som primær standard til anvendelse i fabrikationsleddet hensigtsmæssigt konventionelle
15 fosfatpræcisionspuffere med pH-værdi henholdsvis 6,8 og 7,4, f.eks. "S1500" (sammensætning 3,402 g KH_2PO_4 , 4,450 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,000 kg vand, pH-værdi 6,881 ved 20°C) og "S1510" (sammensætning 1,816 g KH_2PO_4 , 9,501 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,000 kg vand, pH-værdi 7,426 ved 20°C) fra Radiometer A/S, København.

Ved anvendelsen af referencevæskesystemet ifølge opfindelsen til
20 kalibrering af instrumenter til måling af calciumioner går man hensigtsmæssigt frem på den måde, at man indfører først den ene og derefter den anden af referencevæskerne i instrumentets indførings-system for prøve og indstiller udlæsningen eller visningen for henholdsvis calciumelektroden og pH-elektroden på de værdier, der er
25 deklareret på de respektive referencevæsker.

I Analytical Biochemistry 89, 521 - 528 (1978) beskrives anvendelsen af en calciumholdig opløsning, som er 0,1 molær med hensyn til KCl og 20 mmolær med hensyn til HEPES, i forbindelse med kalibreringen af en calciumfølsom elektrode. I den pågældende sammenhæng anvendes HEPES imidlertid blot til stabilisering af pH-værdien ved calcium-
30 målingen, og der er ingen beskrivelse eller antydning af, at den pågældende væske ville kunne anvendes til samtidig kalibrering af

calciumelektroden og en pH-elektrode, og den pågældende væske har da heller ikke en pufferkonstant β , der ligger i det ønskede område til dette formål, idet den efter den ovenfor angivne form beregnede pufferkonstant β for den pågældende væske er 0,0115, ligesom væsken
5 heller ikke har en ionstyrke, der ligger i det praktiske område 0,15 - 0,17, men derimod en meget lavere ionstyrke (0,12).

I M. S. Mohan and R. G. Bates, NBS Special Publication July 1975, 293, beskrives anvendelsen af en standard, som er en blandingstandard for Na, K, Ca, Cl og pH, hvor det benyttede pH-system er
10 TRIS HCl/TRIS. Et sådant puffer-system ville ikke være hensigtsmæssigt til den foreliggende opfindelses formål. For det første har puffer-systemet en pK-værdi på 7,85 ved 37°C, hvilket medfører, at pufferen skulle være meget skævt sammensat for at opnå en pH-værdi omkring 7,4 (TRIS HCl: TRIS = 3:1), hvilket ville medføre, at pufferkapaciteten ville blive lav i forhold til den anvendte totalkoncentration af puffer, idet det erindres, at kravet til en ionstyrke i det ovenfor angivne område sætter en grænse på ca. 0,15M TRIS HCl. Det ville være uheldigt at lade TRIS HCl/TRIS dominere opløsningen, da dette ville medføre en stor liquid junction/potential forskel (af
15 størrelsesordenen 2,5 mvolt) i forhold til de primære phosphat-pH-standarder (R. A. Durst and R. G. Bates, NBS Special Publication July 1975, 293). Endvidere er der konstateret uoverensstemmelser mellem TRIS-pufferen og phosphat-pufferen, når disse udmåles over for hinanden på forskelligt pH-blodgasudstyr (J. H. Ladenson et al.,
20 Clin. Chem., 20, (1974), 1337). Endelig ville det ikke være muligt at benytte en TRIS-puffer med pH 6,8 som pH-standard på grund af den endnu meget lavere pufferkapacitet ved denne pH-værdi (TRIS HCl: TRIS = 10:1).

Referencevæsken ifølge den foreliggende opfindelse med dennes ene-
30 stående egenskaber og overraskende stabilitetsforhold, som dokumenteres nærmere i den eksperimentelle del, er således ikke nærliggende på baggrund af de ovennævnte litteratursteder.

Eksperimentel Del.

Opfindelsen belyses nærmere ved følgende eksempler, hvor der anvendes følgende materialer og procedurer:

5	Calciumcarbonat:	Calciumcarbonat zur Analyze, Urtitersubstanz, Merck nr. 2060.
	Natriumchlorid:	Natriumchlorid, Suprapur, Merck nr. 6406, calciumindhold: $\max 1 \times 10^{-5}\%$.
10	Saltsyre:	Salzsäure min. 30% Suprapur, Merck nr. 318, calciumindhold: $\max 5 \times 10^{-6}\%$.
15	TRIS:	TRIS(hydroxymethyl)aminomethan, TRIZMA BASE, Sigma nr. T1503 Reagent Grade, Crystalline, Approx. 99,9%.
	Deioniseret vand:	carbondioxidfrit, lednings-evne: $< 1\mu\text{S}$.
20	TES:	Sigma nr. T1375, vandfri molvægt 229,2.
	BES:	Sigma nr. B9879, vandfri molvægt 213,3.
25	1M Natriumhydroxidopløsning:	Fremstilles som beskrevet af I. M. K. Kolthoff og E. B. Sandell i "Textbook of Quantitative Inorganic Analyses", The Macmillan Company, New York, 1964, side 526 ff.
30		

Ved fremstilling af calciumstandarder og referencevæsker påses det, at der kun anvendes apparatur, der ikke afgiver calcium eller nogen anden forbindelse, der ville påvirke en calciumionbestemmelse, til den fremstillede væske. Der kan til fremstillingen hensigtsmæssigt anvendes specielt rengjort glasapparatur af Duran® eller Pyrex®, der ikke indeholder calcium i glasset. Apparatet renses først med 10%'s saltsyre i 24 timer og skylles derefter grundigt med deioniseret vand. Til anvendelse i den primære calciumstandard fremstilles som stamopløsning en 0,1M calciumchloridopløsning ved at opløse calciumcarbonat i deioniseret, carbondioxidfrit vand og et overskud af 30%'s ren saltsyre og afkoge carbondioxidet.

De anvendte primære standarder betegnet "1,25 mM Ca" og "2,50 mM Ca", fremstilles som følger:

a) "1,25 mM Ca":

12,50 ml 0,1000 M calciumchloridopløsning, 8,488 g natriumchlorid, 0,1211 g TRIS og ca. 950 ml deioniseret vand omrøres, indtil alt fast stof er opløst, pH-værdien indstilles til 7,38 med saltsyre, og der opfyldes med deioniseret vand til et totalvolumen på 1 liter. Opløsningen fyldes på klare Fiolax-glasampuller, der lukkes og autoklaveres.

Den færdige opløsning har følgende sammensætning:

1,250 mM Ca⁺⁺
145,25 mM NaCl
1,00 mM TRIS
pH = 7,40
I = 0,150 M

b) "2,50 mM Ca":

25,00 ml 0,1000 M calciumchloridopløsning, 8,269 g natriumchlorid, 0,1211 g TRIS og ca. 950 ml deioniseret vand blandes og omrøres, indtil alt fast stof er opløst, pH-værdien indstilles til 6,84 med salt-

syre, og der tilsættes deioniseret vand til et totalvolumen på 1 liter. Opløsningen fyldes på klare Fiolax-glasampuller, som lukkes og auto-klaveres.

Den færdige opløsning har følgende sammensætning:

- 5 2,500 mM Ca⁺⁺
141,5 mM NaCl
1,00 mM TRIS
pH = 6,85
I = 0,150 M

10 Eksempel 1.

Til 19,07 g TES, 14,30 ml 0,1000 M calciumchloridopløsning, 50,286 ml 1M natriumhydroxidopløsning og 5,597 g natriumchlorid sættes deioniseret, carbondioxidfrit og kimfrit vand til et totalvolumen på 1000 ml, og komponenterne omrøres under argon, indtil alt fast stof er opløst.

- 15 Den færdige referencevæske opbevares under argon og kontrolmåles for pH-værdi og calciumioner som forklaret nedenfor.

Når referencevæsken er kontrolmålt og eventuelt korrigeret, fyldes den under en argonatmosfære i 3 ml's knækampuller af klart Fiolax-glas, idet ampullerne før påfyldningen er skyllet med argon. Ampullerne tilsmeltes og opvarmes til 120°C i 20 minutter, idet opvarmningen fra 100 til 120°C og afkølingen fra 120 til 100°C sker på 10 minutter.

Den fremstillede referencevæske har en fri calciumionkoncentration på 1,25 mM, en pH-værdi på 7,383 og en ionstyrke på 0,150.

25 Eksempel 2.

På lignende måde som beskrevet i eksempel 1 fremstilles ud fra 22,98 g BES, 27,51 ml 0,1000 M calciumchloridopløsning, 50,578 ml 1M

natriumhydroxidopløsning, 5,357 g natriumchlorid og deioniseret, carbondioxidfrit og kimfrit vand til et totalvolumen på 1000 ml en referencevæske, som ligeledes under en argonatmosfære på den i eksempel 1 beskrevne måde fyldes i 3 ml's knækampuller af glas.

- 5 Den fremstillede referencevæske har en fri calciumionkoncentration på 2,50 mM, en pH-værdi på 6,841 og en ionstyrke på 0,150.

De i eksempel 1 og 2 fremstillede referencevæsker kontrolmåles for pH-værdi og calciumioner ved 37°C. Målingerne udføres som sammenlignende, relative potentiometriske målinger. pH-elektroden er kalibreret på fosfatpuffere med kendte korrektioner. Calciumelektroden er kalibreret på "1,25 mM Ca"- og "2,50 mM Ca"-standardopløsningerne.

- 15 Såfremt kontrolmålingen viser, at referencevæsken afviger fra de ovennævnte værdier, foretages der en korrektion af referencevæsken på følgende måde:

Hvis indholdet af calciumioner findes at være højere end den deklarede værdi, tilsættes den beregnede mængde deioniseret, carbondioxidfrit og kimfrit vand. Såfremt calciumionindholdet er for lavt, tilsættes den beregnede mængde 0,1000 M calciumchloridopløsning. En afvigelse af pH-værdien for den ønskede værdi reguleres af tilsætning af enten den beregnede mængde natriumhydroxidopløsning eller den beregnede mængde saltsyre. Efter denne eventuelle korrektion af hovedbatchen foretages der kontrolmåling til sikring af, at den fremtidige referencevæske nu overholder de deklarerede værdier for pH og indholdet af calciumioner. De foretagne finjusteringer er i praksis så små, at eventuelle ionstyrkeændringer er betydningsløse.

Eksempel 3.

To referencevæsker fremstilles og langtidstestes til konstatering af deres langtidsstabilitet. Referencevæskerne fremstilles som følger:

"TES 1,25".

Denne fremstilles på lignende måde som beskrevet i eksempel 1 ud fra 27,958 g NaCl, 96,24 g TES, 71,50 ml 0,1000 M calciumchloridopløsning og 253,33 ml 0,9928 molær natriumhydroxidopløsning og deioniseret, carbondioxidfrit og kimfrit vand til et totalvolumen på 5 liter.

"BES 2,50".

Denne fremstilles på lignende måde som beskrevet i eksempel 1 ud fra 26,785 g NaCl, 114,79 g BES, 137,55 ml 0,1000 M CaCl_2 og 254,72 ml 0,9928 molær natriumhydroxidopløsning og deioniseret, carbondioxidfrit og kimfrit vand til et totalvolumen på 5 liter.

Efter kontrolmåling som beskrevet ovenfor emballeres de to referencevæsker i 3 ml's knækampuller og autoklaveres på samme måde som beskrevet i eksempel 1. Ampullerne med referencevæske opbevares ved 25°C, og referencevæskernes data bestemmes (måletemperatur 37°C) over en længere periode. Resultaterne fremgår af nedenstående tabel, hvor de anførte værdier er middeltal og standardafvigelser baseret på 12 prøver.

TABEL

Tid efter fremstilling	TES 1,25		BES 2,50	
	pH	mM Ca^{++}	pH	mM Ca^{++}
1 uge	7,386 ± 0,002	1,245 ± 0,008	6,841 ± 0,001	2,494 ± 0,009
3 uger	7,386 ± 0,001	1,251 ± 0,006	6,840 ± 0,001	2,495 ± 0,011
3 måneder	7,386 ± 0,001	1,246 ± 0,006	6,841 ± 0,001	2,504 ± 0,008

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til kalibrering og/eller kvalitetskontrol af både den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden i instrumenter, der er beregnet til bestemmelse af calciumioner og pH-værdi i biologiske væsker, og som indeholder en calciumfølsom elektrode og en pH-elektrode, ved hvilken fremgangsmåde den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden samtidig underkastes kalibrering og/eller kvalitetskontrol under anvendelse af en referencevæske, som ved en nærmere bestemt temperatur har en nærmere bestemt calciumionaktivitet og en nærmere bestemt pH-værdi,
k e n d e t e g n e t ved,

at referencevæskens nærmere bestemte pH-værdi er tilvejebragt med en pH-puffer, der består af en alkansulfonsyre med 2 - 3 carbonatomer i alkandelen og med en nitrogenholdig basisk gruppe knyttet til alkandelen via et nitrogenatom i gruppen, og denne syres salt, idet syren har en pK-værdi i området 6,6 - 7,6 ved 37°C,

at referencevæskens pufferkapacitet ligger i området 0,04 - 0,10, fortrinsvis i området 0,05 - 0,08,

og at referencevæsken har en ionstyrke på 0,15 - 0,17.

2. Referencevæske til kalibrering og/eller kvalitetskontrol af både den calciumfølsomme elektrode og pH-elektroden i instrumenter, der er beregnet til bestemmelse af indholdet af ioniseret calcium og pH i biologiske væsker, hvilken referencevæske ved en nærmere bestemt temperatur har en nærmere bestemt calciumionaktivitet og en nærmere bestemt pH-værdi,
k e n d e t e g n e t ved, at referencevæskens nærmere bestemte pH-værdier er tilvejebragt med en pH-puffer, der består af en alkansulfonsyre med 2 - 3 carbonatomer i alkandelen og med en nitrogenholdig basisk gruppe knyttet til alkandelen via et nitrogenatom i gruppen, og denne syres salt, idet syren har en pK-værdi i området 6,6 - 7,6 ved 37°C,

at referencevæskens pufferkapacitet ligger i området 0,04 - 0,10, fortrinsvis i området 0,05 - 0,08,

og at referencevæsken har en ionstyrke på 0,15 - 0,17.

3. Referencevæske ifølge krav 2,

- 5 k e n d e t e g n e t ved, at alkansulfonsyren er valgt blandt 3-(N-morpholino)propansulfonsyre (MOPS), piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsyre) (PIPES), N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonsyre (ACES), N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsyre (BES), N-TRIS(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsyre (TES) og
- 10 N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsyre (HEPES).

4. Referencevæskesystem til topunktskalibrering eller kvalitetskontrol af instrumenter til bestemmelse af ioniseret calcium og pH i biologiske væsker omfattende to referencevæsker ifølge krav 2 eller 3,

- k e n d e t e g n e t ved, at den ene referencevæskes pH-værdi
- 15 ligger i den nedre ende af det biologiske område, fortrinsvis omkring pH 6,8, og at den anden referencevæskes pH-værdi ligger omkring normalværdien for plasma, dvs. omkring pH 7,4.