

Jan DANA

MOŻLIWOŚCI FOTOMETRYCZNEGO POMIARU PODSTAWOWYCH PARAMETRÓW KRWI

Streszczenie. W artykule omówiono możliwości fotometrycznego pomiaru takich parametrów krwi jak: hemoglobina, stopień natlenowania, stopień hemolizy oraz zliczanie ciałek krwi. Podano długości fal elektromagnetycznych, przy których można dokonywać pomiaru oraz zależności matematyczne jakie winien realizować układ.

Fotometria odgrywa ważną rolę w wielu dziedzinach nowoczesnej fizjologii, biochemii i biofizyki. Stosowanie specjalnej aparatury fotometrycznej pozwala na otrzymanie z układów biologicznych informacji, których nie można byłoby uzyskać żadną inną metodą.

W układach biologicznych występuje wiele substancji podobnych do siebie, których rozdzielenie metodami chemicznymi jest bardzo trudne, łatwo natomiast dokonać ich analizy metodami fotometrycznymi. Fotometria znajduje istotne zastosowanie, zarówno przy badaniu związków o charakterystycznych widmach absorpcyjnych jak i takich, które reagując z innymi tworzą związki barwne o określonej absorpcji. Ogólnie biorąc z badania różnych pasm widma otrzymuje się rozmaite informacje i tak np. określenie ekstynkcji próbki krwi przy odpowiednich długościach fal pozwala na wyznaczenie takich parametrów krwi jak: zawartość hemoglobiny, stopień hemolizy, stopień natlenowania.

Pomiar ilości hemoglobiny (Hb) we krwi jest jednym z najczęściej wykonywanych badań hematologicznych. Wynika to z roli jaką hemoglobina spełnia w organizmie (transport tlenu z płuc do tkanek oraz dwutlenku węgla z tkanek do płuc).

Właściwą metodą oznaczania poziomu Hb jest międzynarodowa metoda cyjanohemiglobinowa, tzw. metoda Drabkina. Metoda ta, obecnie szeroko stosowana i polecana, posiada niezaprzeczalne zalety wpływające z prostoty jej wykonania i dokładności otrzymywanych wyników. Metoda Drabkina polega na wstępnym przekształceniu hemoglobiny w jej pochodną - cyjanohemiglobinę, która jest jedyną trwałą pochodną hemoglobiny i oznaczeniu intensywności jej za barwienia za pomocą fotometru (1).

Dalszymi zaletami tej metody są:

- Maksimum ekstynkcji cyjanohemiglobiny w pobliżu 540 nm cechuje płaski kształt. Wyodrębnienie promieniowania światła monochromatycznego nie jest więc konieczne.

- Prawo Bouguera-Lamberta-Beera jest spełnione w szerokim zakresie stężeń.
- Wszystkie pochodne hemoglobiny przechodzą ilościowo w cyjanohemoglobinę (oxyhemoglobina, hemoglobina tlenowęglowa, hemoglobina oraz w większości sulfohemoglobina).

Przy fotometrycznym oznaczaniu Hb metodą Drabkina korzysta się z prawa Bouguera-Lamberta-Beera, które mówi, że ekstynkcja próbki dla światła monochromatycznego jest wprost proporcjonalna do stężenia oraz grubości warstwy. Prawo to wyraża się następującą zależnością:

$$E = \xi \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

gdzie:

- E - ekstynkcja próbki,
- ξ - ekstynkcja właściwa badanego związku przy określonej długości fali,
- c - stężenie,
- l - grubość warstwy.

Istnieją dwa sposoby oznaczania stężenia hemoglobiny metodą Drabkina:

a) za pomocą wzorca (1)

$$\text{gHb}/100 \text{ ml} = \frac{E_p}{E_w} c_w k_1, \quad (2)$$

gdzie:

- E_p - ekstynkcja próbki badanej,
- E_w - ekstynkcja wzorca,
- c_w - stężenie wzorca,
- k_1 - współczynnik proporcjonalności.

b) za pomocą współczynnika ekstynkcji (1)

$$\text{gHb}/100 \text{ ml} = \frac{E_p G}{\xi} k_2, \quad (3)$$

gdzie:

- E_p - ekstynkcja próbki,
- G - ciężar cząsteczkowy hemoglobiny,
- ξ - ekstynkcja właściwa Hb,

G, ξ , k_2 są wielkościami stałymi można więc zapisać

$$\text{gHb}/100 \text{ ml} = E_p k_3$$

Znając stężenie wzorca lub ekstynkcję właściwą Hb można skonstruować przyrząd mierzący stężenie hemoglobiny według powyższej metody.

POMIAR STOPNIA HEMOLIZY

Przez stopień hemolizy rozumie się zawartość hemoglobiny w osoczu krwi. Oznaczenie stopnia hemolizy polega na pomiarze rozpuszczonej w osoczu hemoglobiny, która pochodzi z rozpadłych krwinek czerwonych. Wartość stopnia hemolizy zależy od dziennych wysiłków i stresów organizmu. Na hemolizę krwinek czerwonych mają poza tym wpływ schorzenia toksyczne lub septyczne, jak węży i pszczoł, stany immunologiczne czynne powodujące niszczenie krwinek, narażenie krwinek na urazy mechaniczne (np. podczas krążenia pozaustrojowego) [8].

Oznaczenie stopnia hemolizy jest potrzebą podyktowaną głównie przez chirurgów, wynikłą z konieczności obserwacji procesów hemolitycznych w czasie długotrwałych zabiegów chirurgicznych, szczególnie przy zastosowaniu krążenia pozaustrojowego [8]. Prostą metodą oznaczania stopnia hemolizy we krwi jest fotometryczna metoda cjanohemoglobinowa, która polega na rozcieńczeniu pewnej objętości osocza określoną objętością odczynnika Drabkina, co powoduje przejście pochodnych hemoglobiny, zawartych w osoczu krwi w cjanohemoglobinę. Mierząc ekstynkcję tak przygotowanej próbki przy długości fali 540 nm można określić Hb osocza. W niektórych oznaczeniach, obok określenia ekstynkcji przy 540 nm, określa się ekstynkcję przy 680 nm traktując ten pomiar jako "ślepy" [1].

W przypadku pomiaru stopnia hemolizy mamy do czynienia z oznaczeniem pojedynczego składnika w mieszaninie z innym związkiem absorbującym promieniowanie elektromagnetyczne w analizowanym przedziale widma. Ten absorbujący a nie oznaczany związek nosi nazwę podłoża (2). Gdy ekstynkcja "podłoża" zmienia się w sposób liniowy w funkcji długości fali, ilość oznaczonego związku wyznacza się na podstawie wzoru (2):

$$c = \frac{(n-1) E_1 + E_2 - n E_3}{[(n-1) \epsilon_1 + \epsilon_2 - n \epsilon_3] \cdot l} \quad (5)$$

gdzie:

$\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$ - współczynniki ekstynkcji badanego związku przy długościach fal odpowiednio $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$,

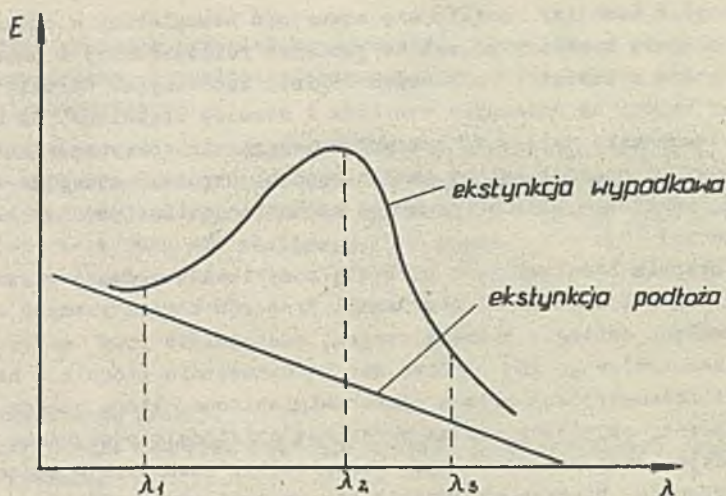
E_1, E_2, E_3 - wartości ekstynkcji przy długościach fal $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$,

l - grubość warstwy badanego związku

$$n = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_3}$$

W przypadku pomiaru stopnia hemolizy ekstynkcja podłoża jest w przybliżeniu wielkością stałą w funkcji długości fali dla pomiarowego zakresu widma, a więc powyższy wzór upraszcza się do następującej postaci:

$$\text{mgHb}_{\text{os}}/100\text{ml} = \frac{(E_{540} - E_{680}) G}{t} \quad (6)$$



Rys. 1

gdzie:

- G - ciężar cząsteczkowy,
- ε - ekstynkcja właściwa,
- k - współczynnik proporcjonalności.

Wielkości G, ε, k są stałe, wobec tego:

$$\text{mgHb}_{\text{os}}/100\text{ml} = (E_{540} - E_{680})k_1 \quad (7)$$

Metoda ta nadaje się do pomiaru stopnia hemolizy w osoczu w przypadkach fizjologicznie nieprawidłowych. Nie jest jednak na tyle czuła aby stosować ją do pomiaru Hb osocza fizjologicznego. Istnieje możliwość zwiększenia czułości metody przez pomiar ekstynkcji przy długości fali 417 nm zamiast ekstynkcji przy 540 nm [a w celu zmniejszenia wpływu osocza można dokonywać pomiaru ekstynkcji dodatkowo przy 480 nm [8].

POMIAR STOPNIA NATLENOWANIA KRWI

Pomiar stopnia natlenowania krwi interesuje lekarzy różnych specjalności. W czasie prowadzenia zabiegów chirurgicznych, przy kontrolowanym oddychaniu a szczególnie w okresie pooperacyjnym, stała kontrola natlenowania krwi jest wskazana. Poza tym pomiar stopnia natlenowania jest istotny przy określaniu równowagi kwasowo-zasadowej [8].

Spośród wszystkich metod stosowanych do pomiaru stopnia natlenowania krwi najwygodniejszą jest metoda fotometryczna, gdyż pozwala na dokonywanie pomiaru na krwi pełnej [3], [4].

Stopień natlenowania krwi określa się jako stosunek zawartości oxyhemoglobiny do hemoglobiny całkowitej i wyraża się w procentach. Pomiaru stopnia natlenowania można dokonywać za pomocą światła przechodzącego przez próbkę lub odbitego od próbki. Metoda fotometryczna za pomocą światła przechodzącego przez próbkę polega na wykorzystaniu różnicy ekstynkcji w widmach absorpcyjnych hemoglobiny i hemoglobiny natlenowanej (oxyhemoglobiny) a metoda wykorzystująca światło odbite od próbki polega na tym, że światło o określonej długości fali jest silniej odbijane od oxyhemoglobiny niż od zredukowanej hemoglobiny. Jedną z metod nie wymagającą dodatkowych czynności z próbką badaną jest metoda fotometryczna, wykorzystująca światło przechodzące. W tej metodzie mamy do czynienia z oznaczeniem dwóch składników mieszaniny. Przy takim oznaczaniu bardzo istotnym jest dobór odpowiednich długości fal światła, przy których dokonuje się analizy. W takim przypadku wybiera się najczęściej dwie analityczne długości fali w ten sposób, żeby współczynniki ekstynkcji obu związków spełniały warunek tzw. rozbieżności (2):

$$\frac{\epsilon_1 \lambda_1}{\epsilon_2 \lambda_1} = \max \quad \frac{\epsilon_1 \lambda_2}{\epsilon_2 \lambda_2} = \min, \quad (8)$$

gdzie:

$\epsilon_{1\lambda_1}$ - współczynnik ekstynkcji związku 1 przy długości fali λ_1

$\epsilon_{1\lambda_2}$ - współczynnik ekstynkcji związku 1 przy długości fali λ_2

$\epsilon_{2\lambda_1}$ - współczynnik ekstynkcji związku 2 przy długości fali λ_1

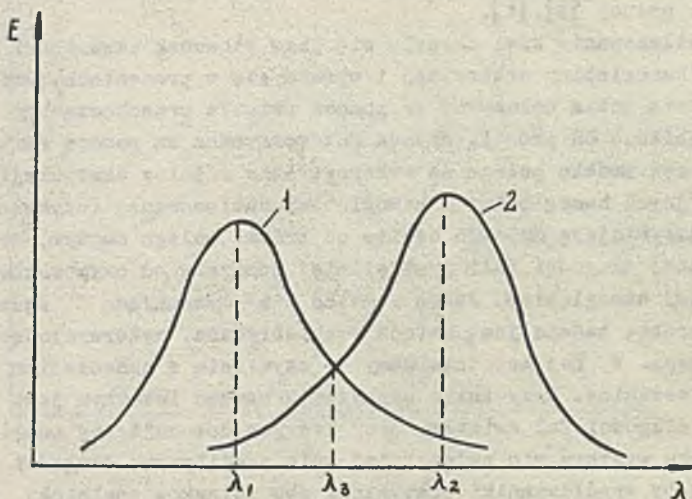
$\epsilon_{2\lambda_2}$ - współczynnik ekstynkcji związku 2 przy długości fali λ_2 .

W ogólnym przypadku stężenia badanych składników wyznacza się na podstawie pomiarów wartości ekstynkcji przy dwóch długościach λ_1, λ_2 , wykorzystując prawo Bouguera-Lamberta-Beera i prawo addytywności ekstynkcji z następującego układu równań:

$$E_{\lambda_1} = (\epsilon_{1\lambda_1} \cdot c_1 + \epsilon_{2\lambda_1} \cdot c_2)l \quad (9)$$

$$E_{\lambda_2} = (\epsilon_{1\lambda_2} \cdot c_1 + \epsilon_{2\lambda_2} \cdot c_2)l$$

Rozwiązując powyższy układ równań można obliczyć stężenia c_1 i c_2 dwóch składników mieszaniny.



Rys. 2

W konstrukcji wyspecjalizowanych fotometrów korzystny jest (ze względu na uproszczenie układu) wybór dwóch długości fal światła spełniających warunk:

$$\frac{\varepsilon_{1\lambda_1}}{\varepsilon_{2\lambda_1}} = \max \quad \frac{\varepsilon_{1\lambda_3}}{\varepsilon_{2\lambda_3}} = 1 \quad (10)$$

Warunek $\frac{\varepsilon_{1\lambda_3}}{\varepsilon_{2\lambda_3}} = 1$ jest spełniony w punkcie izobestycznym tzn. w punkcie, w którym ekstynkcje właściwe są jednakowe (punkt przecięcia się widm absorpcyjnych obu składników). Pomiaru stopnia natlenowania dokonuje się najczęściej przy długościach fal:

- 805 nm - punkt izobestyczny, w którym absorpcja światła przez natlenowaną i zredukowaną Hb jest jednakowa,
- 650 nm - długość fali, przy której absorpcja światła przez obydwie hemoglobiny wykazuje znaczne różnice.

Dla tak wybranych długości fal światła stopień natlenowania można wyznaczyć z zależności:

$$\text{HbO}_2 \% = \frac{k_1 E_{805} - E_{650}}{k_2 E_{805} - k_3 E_{650}} \cdot 100\%, \quad (11)$$

gdzie: k_1, k_2, k_3 - stałe współczynniki wyrażające się zależnościami:

$$k_1 = \frac{\epsilon_{\text{Hb650}}}{\epsilon_{805}}$$

$$k_2 = \frac{\epsilon_{\text{Hb650}}}{\epsilon_{805}} - \frac{\epsilon_{\text{HbO}_2,650}}{\epsilon_{805}}$$

$$k_3 = \frac{\epsilon_{\text{Hb650}} - \epsilon_{\text{HbO}_2,805}}{\epsilon_{\text{Hb650}}} + \frac{\epsilon_{\text{HbO}_2,650}}{\epsilon_{\text{Hb650}}} - 1$$

ϵ_{Hb650} - ekstynkcja właściwa hemoglobiny zredukowanej dla 650 nm,

$\epsilon_{\text{HbO}_2,650}$ - ekstynkcja właściwa hemoglobiny natlenowanej dla 650 nm,

ϵ_{805} - ekstynkcja właściwa punktu izobestycznego,

E_{805} - ekstynkcja próbki badanej dla 805 nm,

E_{650} - ekstynkcja próbki badanej dla 650 nm.

Pomiaru można dokonywać również przy innych kombinacjach długości fal np. 505 nm i 600 nm [5].

Metodami fotometrycznymi można również określić ilość krwinek czerwonych i białych [6], [7].

Przy tych pomiarach wykorzystuje się zjawisko rozproszenia światła, które może zachodzić jedynie w ośrodkach optycznie niejednorodnych, co jest spełnione w przypadku zawiesiny krwinek we krwi.

Ze względu na dużą koncentrację krwinek we krwi, konieczne jest rozcieńczenie próbki w odpowiednim stosunku.

LITERATURA

- [1] Richterich R.: Chemia kliniczna, Warszawa 1971, PZWL.
- [2] Brzeski W., Kaniuga Z.: Practicum z biochemii Warszawa 1968, PWRiL.
- [3] Prospekt firmy NYCOTRON 1972.
- [4] Prospekt firmy MEDICOR.
- [5] The Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation 1962.
- [6] Opracowanie firmy Technicon Corporation pt. "Automation in the Clinical laboratory", New York 1967.
- [7] Opracowanie firmy Dr Bruno Lange GmbH pt. "Photometrische Analysen Medizin", 1972.
- [8] Opracowanie Instytutu Aparatury i Automatyki Medycznej Politechniki Śląskiej przy współpracy z Wojewódzką Stacją Krwiodawstwa w Katowicach.

ВОЗМОЖНОСТИ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ИЗМЕРЕНИЯ
ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ

Р е з ю м е

В статье рассматриваются возможности измерения таких параметров крови как количество гемоглобина, степень насыщения кислородом, степень гемолиза, количество кровяных шариков. Определяются длины электромагнитных волн, для которых можно производить измерение, а также математические зависимости какие должна реализовать схема.

POSSIBILITIES OF PHOTOMETRICAL MEASUREMENTS
OF THE PRINCIPAL BLOOD PARAMETERS

S u m m a r y

In the article there are shown possibilities of photometrical measurements of blood parameters haemoglobin, the degree of oxydation, haemolysis and the counting of blood cells.

The lengths of electromagnetic waves are given in which the measurements can be taken, and mathematical relations have been derived which are to be realized by the circuit.