

Гемоглобин: особенности определения концентрации на различных фотометрах.

Захаров К.А., Ованесов Е.Н., Сецко И.В.

НПП “Техномедика”, Москва

Среди лабораторных исследований одним из наиболее массовых является исследование концентрации гемоглобина крови. Известно, что суточная вариация этого параметра может достигать у человека 2%. И именно такая точность предъявляется к лабораторному исследованию [1]. Одним из наиболее точных методов определения концентрации общего гемоглобина является гемиглобинцианидный метод Драбкина, который рекомендован Международным комитетом по стандартизации в гематологии еще в 1967 г. и введен в России в 1974 году, как унифицированный метод. Сущность метода проста – гемоглобин цельной крови с помощью трансформирующего раствора Драбкина переводится в гемиглобинцианид, а затем раствор уже гемиглобинцианида фотометрируется и по известному оптическому коэффициенту молярной экстинкции определяется концентрация гемоглобина [2]:

$$Hg \text{ (Г/л)} = (A^{540}_{\text{HiCN}} \times 64500 \times K_p) / 44.0 \times d \times 1000 \quad (1)$$

где A^{540}_{HiCN} - поглощение раствора гемиглобинцианида на длине волны 540 нм; 64500 – молекулярный вес гемоглобина, K_p – коэффициент разведения, $K_p = 251$, если 20 мкл крови растворяется в 5 мл реагента; 44.0 - миллимолярный коэффициент экстинкции; оптическая толщина раствора в см; 1000 - коэффициент перевода из мГ в Г.

Раствор HiCN стабилен в течение нескольких лет и это позволяет приготавливать из него калибровочные растворы для сравнительных исследований.

Точность такого метода составляет 2%. В настоящее время этот метод является самым распространенным – им пользуются 90% лабораторий России, причем в подавляющем большинстве лабораторий исследование проводится ручным способом на фотоколориметрах и специализированных фотометрах - гемоглобинометрах. Несмотря на многолетний опыт его использования, значительное число лабораторий не достигают требуемой точности исследований. Так, по данным Центра внешнего контроля качества лабораторных исследований МЗ РФ коэффициент межлабораторной вариации определения гемоглобина достигает 10%. [3].

Поэтому важно и необходимо знать источники появления ошибок. В общем случае ошибки можно разделить на ошибки дозирования крови и трансформирующего раствора и ошибки фотометрирования, то есть приборные ошибки. Мы не будем останавливаться на ошибках дозирования – они легко преодолеваются калибровкой дозаторов. Выявить их и исправить можно с помощью контрольных растворов гемоглобина с известной концентрацией. Такие растворы выпускает, например, НПО “РЕНАМ”.

Остановимся на особенностях фотометрирования.

Преобразуем выражение (1) к следующему виду:

$$C = F \times D^{540} \quad (2)$$

где C – концентрация гемоглобина в Г/л; F – коэффициент факторизации, $F = 367.94$ при $K_p = 251$; D^{540} – оптическая плотность раствора, измеренная в монохроматическом свете на длине волны 540 нм.

Таким образом, чтобы определить концентрацию гемоглобина нужно измерить оптическую плотность раствора.

На рисунке 1 приведена примерная функциональная схема простейшего фотоэлектроколориметра (аналог - ФЭК) для фотометрирования раствора.

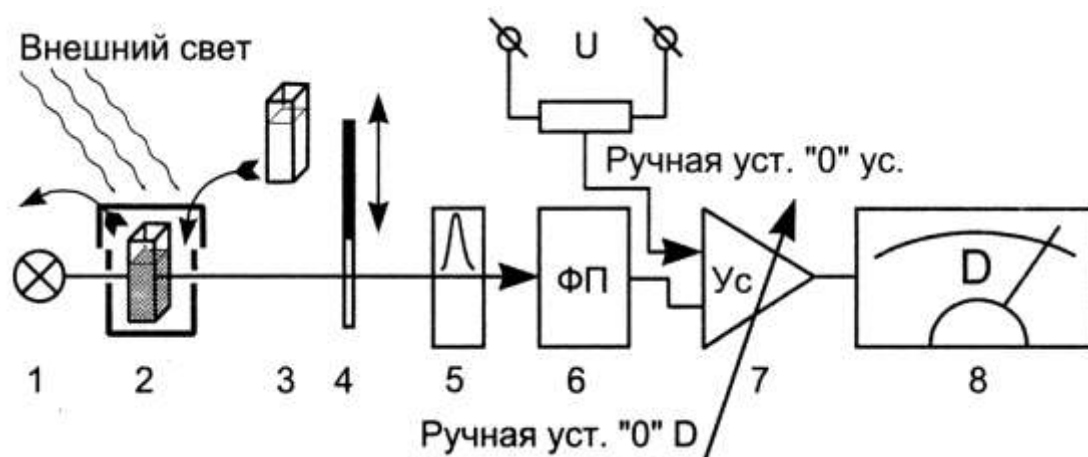


Рисунок 1. Функциональная схема простейшего одноканального фотоэлектроколориметра.

Свет от лампы (1) проходит через кювету с пробой гемиглобинцианида (2) или с холостой пробой (3), которые размещаются в кюветном отделении с светонепроницаемой крышкой. Далее свет через адсорбционный селективный светофильтр (5) со спектральной полосой пропускания примерно 200 нм попадает на фотоприемник (6). Сигнал фотоприемника усиливается усилителем (7) и подается на гальванометр (8), шкалы которого проградуированы в единицах плотности и пропускания.

Оптическая плотность раствора определяется соотношением:

$$D = D_{\text{проб}} - D_{\text{хол}} \quad (3)$$

где $D_{\text{проб}}$ и $D_{\text{хол}}$ – оптические плотности пробы гемиглобинцианида и холостой пробы соответственно. Обратим внимание, что плотность контрольной пробы $D_{\text{проб}}$ и плотность холостой пробы $D_{\text{хол}}$ измеряются не одновременно, а в разные моменты времени t_1 и t_2 , между которыми фотоэлектрические параметры фотометра могут измениться.

Оптические плотности выражаются через сигнал на выходе фотопреобразователя следующими выражениями

$$D_{\text{проб}} |_{t_1} = -\log I_{\text{проб}} |_{t_1} = -\log(I_{\text{пар}} |_{t_1} + T_k^{540} \times T_{\text{проб}}^{540} \times E^{540} |_{t_1} \times K_{\text{yc}} |_{t_1}) \quad (4)$$

и

$$D_{\text{хол}|t2} = -\log I_{\text{хол}|t2} = -\log(I_{\text{пар}|t2} + T_{\text{к}}^{540} \times T_{\text{хол}}^{540} \times E^{540}|_{t2} \times K_{\text{ус}}|_{t2}) \quad (5)$$

где $I_{\text{проб}}$ – выходной сигнал фотоприемника для кюветы с раствором гемиглобинцианида; $I_{\text{хол}}$ – выходной сигнал канала для кюветы с холостой пробой; $I_{\text{пар}} = I_{\text{см}} + I_{\text{св}}$ – паразитный сигнал $I_{\text{см}}$, вызванный электрическим смещением нуля усилителя (7) и возможной внешней подсветкой $I_{\text{св}}$; E^{540} – монохроматическая яркость источника света; $T_{\text{к}}^{540}$ – спектральный коэффициент светопропускания кюветы; $T_{\text{проб}}^{540}$ – спектральный коэффициент светопропускания раствора гемиглобинцианида; $T_{\text{хол}}^{540}$ – спектральный коэффициент светопропускания холостой пробы; $K_{\text{ус}}$ – коэффициент усиления усилителя (7).

Из (3), (4) и (5) получим:

$$D = -\log(I_{\text{проб}|t1}/I_{\text{хол}|t2}) \quad (6)$$

Если параметры прибора не изменялись, то есть $E^{540}|_{t1} \times K_{\text{ус}}|_{t1} = E^{540}|_{t2} \times K_{\text{ус}}|_{t2}$, кюветы были неизменно чистыми и, кроме того, $I_{\text{пар}}|_{t1} = I_{\text{пар}}|_{t2} = 0$, то оптическая плотность определяется просто:

$$D = -\log(T_{\text{проб}}^{540}/T_{\text{хол}}^{540}) \quad (7)$$

Уделим некоторое внимание условию о неизменности параметров прибора. Чистота оптической кюветы – параметр, который зависит исключительно от аккуратности лабораторного персонала. Незначительные загрязнения, даже почти невидимые глазом следы пальцев, могут дать ошибку в несколько единиц концентрации гемоглобина. Поэтому к чистоте кювет следует относиться особенно внимательно. Остальные параметры характеризуются длительностью времени стабильности. Особо следует сказать об источнике света. Яркость излучения лампы E и напряжение питания U связаны соотношением:

$$E \sim U^8.$$

То есть, при изменении напряжения на 1% яркость лампы изменится примерно на 8%. Реально же в электрических сетях напряжение меняется в пределах 40%, не говоря уже о кратковременных “бросках” напряжения. В таких случаях показания прибора “плывут и пляшут” на глазах. Поэтому, в фотометрах должна быть обязательная стабилизация напряжения питания. Конечно, добиться полной стабилизации не удастся, поэтому в одноканальных фотометрах, необходима регулировка коэффициента усиления $K_{\text{ус}}$ (установка “0” D), которая одновременно компенсирует медленные изменения яркости лампы и коэффициента усиления усилителя. Кроме этой регулировки необходимо устранить $I_{\text{пар}}$. В фотометрах имеется ручка ручной установки “нуля”, поворотом которой можно установить $I_{\text{см}} = 0$ при закрытой заслонке (4). Но, паразитный сигнал зависит как от электрического смещения $I_{\text{см}}$ (достаточно медленно изменяющегося во времени), так и от внешней подсветки,

которая может измениться во время измерений (например, из-за солнечных бликов). Поэтому в фотометрах кюветное отделение тщательно экранируют от постороннего света. Полезно проверять степень экранировки, поднося к закрытому кюветному отделению, скажем, включенную настольную лампу. Таким образом одноканальный фотометр требует обязательной регулировки. Частота регулировки зависит от стабильности работы электрической схемы прибора, но перед началом серии измерений регулировка необходима. Однако, кратковременные изменения параметров фотометров при этом не устраняются, что влияет на стабильность результатов. Точность такого фотометра составляет примерно 3% или 4,5 Г/л при нормальных концентрациях гемоглобина, причем большую долю ошибки привносит неточность отсчета величины плотности на шкале гальванометра.

Для получения стабильных и точных результатов используют двухлучевые спектрофотометры. Пример такого спектрофотометра фирмы Beckman приведен на рисунке 2.

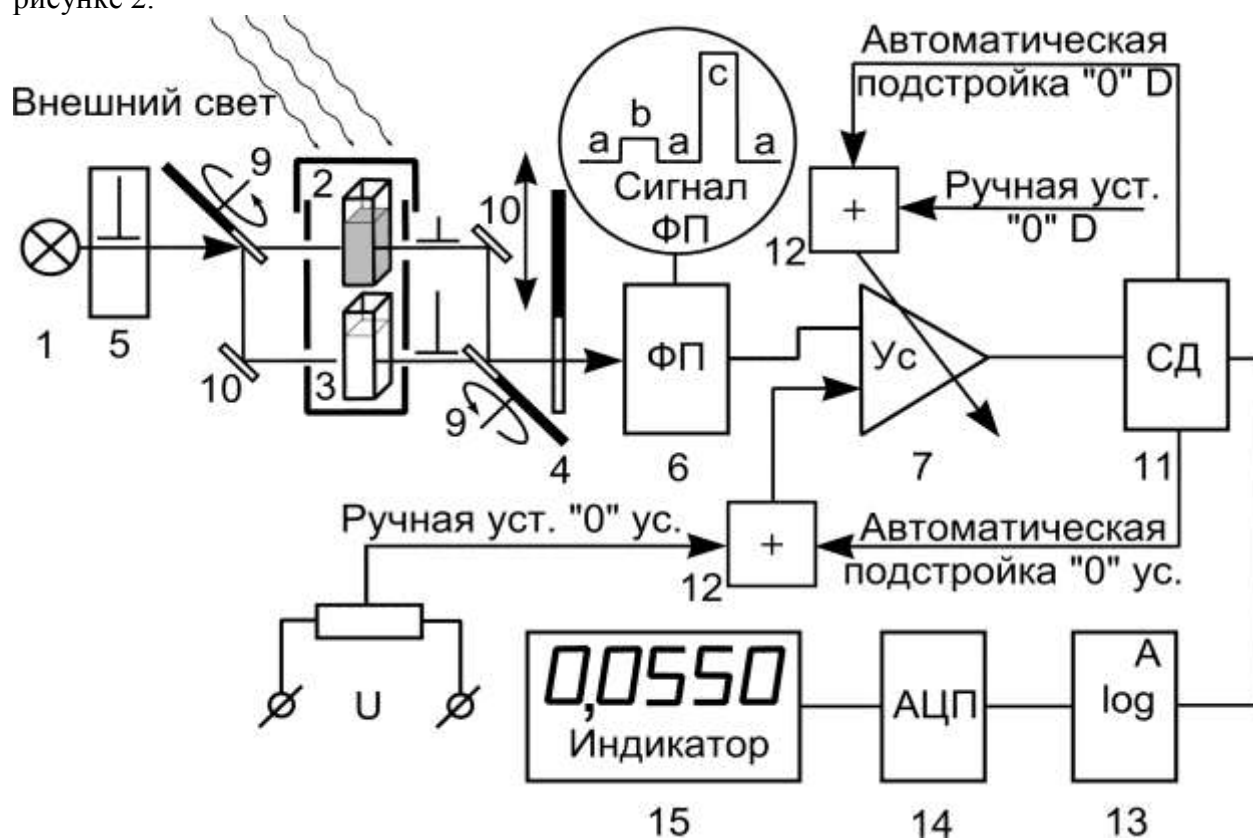


Рисунок 2. Функциональная схема двух лучевого спектрофотометра фирмы Beckman.

Монохроматор (5) вырезает из широкого спектра излучения лампы (1) монохроматический пучок света со спектральной полосой примерно 1 нм, который посредством двух синхронно вращающихся дисков с отверстиями и зеркалами (9) и двух неподвижных зеркал (10) попеременно направляется через кювету с пробой гемиглобинцианида (2) или с холостой пробой (3). Обе кюветы находятся одновременно в двухместном кюветном отделении спектрофотометра и защищены от

внешнего света. Прошедшие через каждую кювету монохроматические потоки попадают на один фотоприемник в разные, но очень близкие моменты времени. Сигнал фотоприемника содержит в себе фазу (с), соответствующую контрольному раствору, фазу (b), соответствующую холостой пробе и фазу (а), соответствующую перекрытому для света каналу (аналогично задвижке (4) в предыдущей схеме). На усилитель (7) подается этот сигнал, а также сигналы автоматической подстройки коэффициента усиления (“0” D) и автоматической подстройки смещения усилителя, которые вырабатываются так называемым синхронным детектором (11). Автоматические подстройки регулируют параметры в небольших пределах, а грубая настройка производится перед измерениями с помощью регулировок “Ручная установка “0” усилителя” и “Ручная установка “0” D”. В синхронном детекторе вырабатывается сигнал отношения $I_{\text{проб}}/I_{\text{хол}}$, попадающий затем на аналоговое устройство (13), которое производит операцию логарифмирования амплитуды полученного сигнала. Аналоговым оно называется потому, что логарифмирование в нем производится с помощью полупроводниковых элементов – диодов или транзисторов в аналоговой форме. После логарифмирования и оцифровки в аналого-цифровом преобразователе (14) плотность индицируется на цифровом индикаторе:

$$D = -\log(T_k^{540} \times T_{\text{проб}}^{540} / T_k^{540} \times T_{\text{хол}}^{540})$$

$$D = -\log(T_{\text{проб}}^{540} / T_{\text{хол}}^{540}) \quad (7)$$

Мы видим, что в двухлучевом спектрофотометре результат не зависит от яркости источника света но, также как и в фотоэлектроколориметре, зависит от качества кювет. Зависит он также и от внешней подсветки. Поэтому перед работой нужно проверить светозащищенность кюветного отделения. Для этого нужно измерить плотность какого-либо раствора гемиглобинцианида, затем развести этот раствор ровно в два раза и снова измерить плотность. Если отношение двух измеренных таким образом плотностей равно двум, то линейность спектрофотометра хорошая и внешний свет не влияет на измерения. Поскольку в двухлучевом спектрофотометре сигналы двух каналов попадают в один и тот же каскад фотопреобразования, усиления и обработки и интервалы между фазами измерения очень малы, точность результатов достигается высокая - до 0,03 Г/л при нормальных концентрациях гемоглобина.

Описанный спектрофотометр представляет собой громоздкий и дорогостоящий прибор. Он предназначен, скорее, для научных исследований или референтных измерений. Производить на нем рутинные серийные определения гемоглобина и дорого и непроизводительно.

На рисунке 3 представлена функциональная схема аналогового специализированного фотометра (прототип – гемоглобинометр МФ 1020). Этот фотометр также содержит два канала. Разделение на два канала конструктивно выполнены без сложных вращающихся дисков и поворотных зеркал. В один - измерительный канал - помещается кювета с пробой, а второй “опорный” канал свободен. Измерительный канал не имеет светозащитного экрана из соображений

удобства при серийных измерениях, а опорный канал закрыт от внешнего света. Каждый из каналов имеет свои узкополосные интерференционные светофильтры (5) с полосой пропускания примерно 35 нм и свои каскады аналоговой обработки сигнала (6, 7, 13).

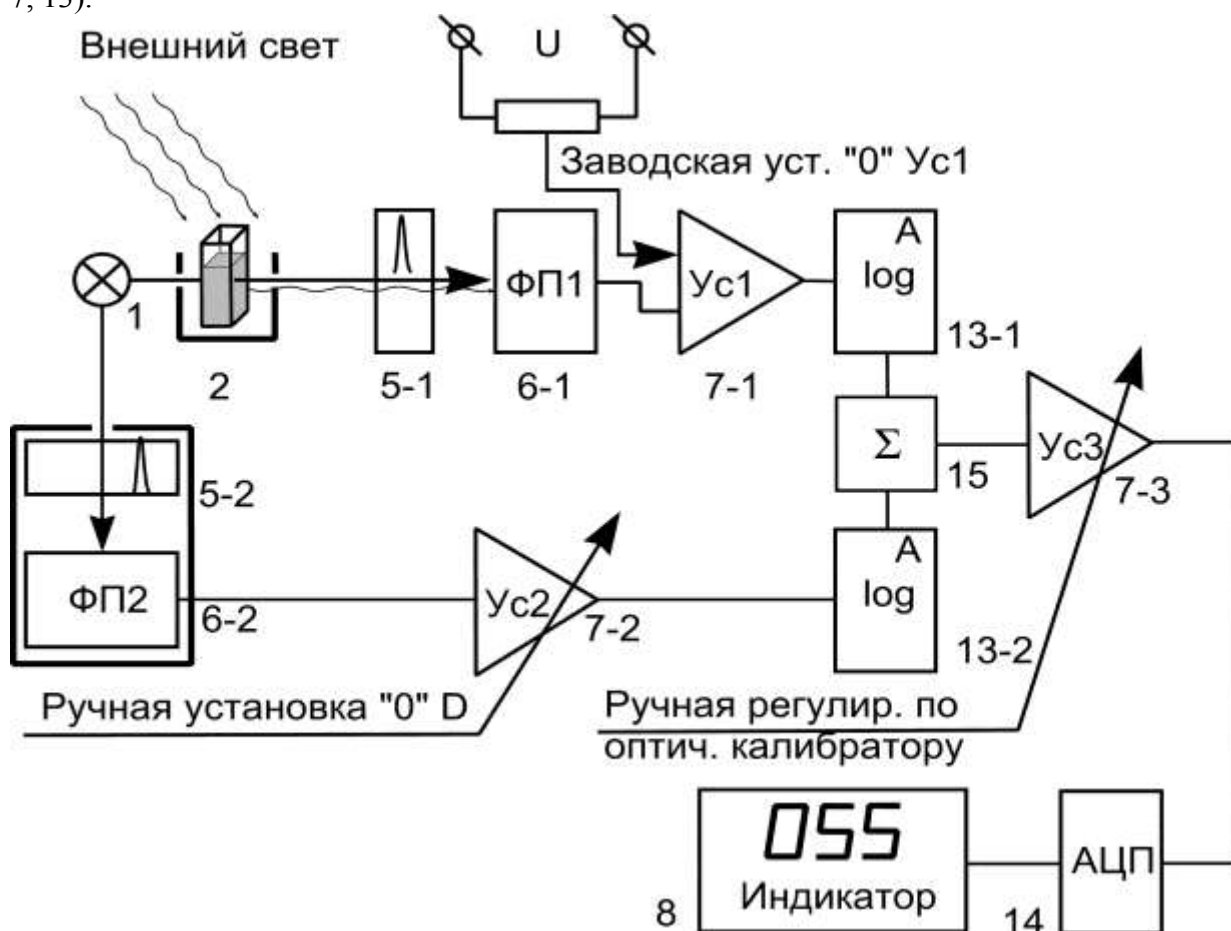


Рисунок 3. Функциональная схема двух лучевого гемоглобинометра.

Фотоэлектрические параметры аналоговых каскадов, вообще говоря, различны и их баланс может нарушаться со временем. Для его восстановления служат операции “Ручная установка “0” D” и “Ручная регулировка по оптическому калибратору”. Калибратор представляет собой нейтральное стекло с известной оптической плотностью. Оптическая плотность в такой схеме определяется как разность логарифма отношения сигналов этих каналов и логарифма сигнала $I_{\text{смещ}}$:

$$D = -\log(I_{\text{проб}}/I_{\text{своб}}) - \log I_{\text{смещ}},$$

причем $I_{\text{смещ}}$ задается электрически таким образом, чтобы $-\log I_{\text{смещ}}$ был равен плотности кюветы с пробой (заводская установка “0” усилителя 7-1).

Результирующий сигнал переводится в цифровую форму и выводится на дисплей с размерностью концентрации гемоглобина г/л.

Величина “0” D и оптическая плотность калибратора являются паспортными значением фотометра и контролируются при эксплуатации.

Описанный двухканальный гемоглобинометр также устойчив к флуктуациям яркости лампы. Но, на его показания влияют изменения внешней освещенности. Кроме того, несмотря на наличие регулировок, существует вероятность того, что стеклянный калибратор или кювета могут быть загрязнены и это приведет к ошибкам калибровки и измерений. Объективного же контроля их чистоты в этом случае нет. Предельная точность гемоглобинометра определяется разрядностью цифрового индикатора и составляет 1 г/л.

Рассмотрим теперь схему еще одного фотометра – портативного микропроцессорного гемоглобинометра МиниГЕМ (рисунок 4).

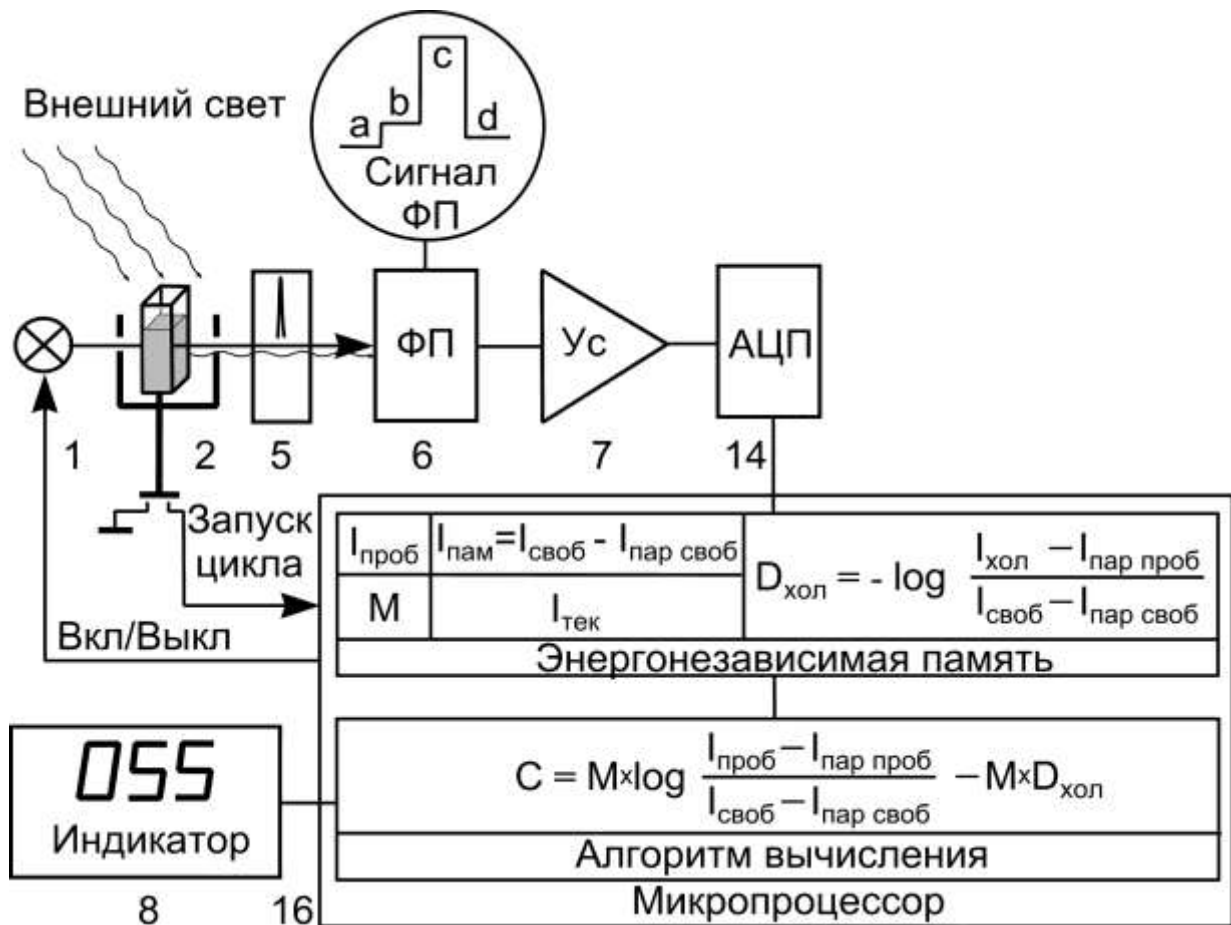


Рисунок 4. Функциональная схема одно лучевого микропроцессорного гемоглобинометра.

Этот фотометр имеет один узкополосный интерференционный светофильтр с полосой пропускания примерно 15 нм, открытое одностороннее кюветное отделение и, соответственно, только один канал обработки сигнала. Схема гемоглобинометра выполнена на микропроцессоре (16) и вся обработка сигнала производится в цифровой форме.

В отличие от описанных выше фотометров, в которых источник света – лампа – включен постоянно, в МиниГЕМе используется светодиод, который включается только

во время измерения. Измерение начинается, когда кювета опускается в кюветное отделение и в микропроцессор поступает сигнал “Запуск цикла”. Фазы сигнала фотоприемника в измерительном цикле похожи на фазы сигнала спектрофотометра Beckman. Фаза “а” соответствует фазе с отключенным светодиодом при опущенной кювете. В это время измеряется и запоминается сигнал $I_{\text{пар проб}}$. Во второй фазе “b” светодиод включается и измеряется $I_{\text{проб}}$. Третья фаза “с” начинается после того, как кювета извлекается из кюветного отделения. В это время измеряется сигнал $I_{\text{своб}}$. И, наконец, в четвертой фазе “d” светодиод выключается и измеряется $I_{\text{пар своб}}$. Таким образом определяется оптическая плотность кюветы с пробой относительно плотности свободного канала (“0” D):

$$D_{\text{проб}} = -\log(I_{\text{проб}} - I_{\text{пар проб}}) + \log(I_{\text{своб}} - I_{\text{пар своб}}).$$

Точно также измеряется плотность кюветы с холостой пробой:

$$D_{\text{хол}} = -\log(I_{\text{хол}} - I_{\text{пар хол}}) + \log(I_{\text{своб}} - I_{\text{пар своб}}).$$

Последняя процедура выполняется в заводских условиях с чистой кюветой и измеренная величина $D_{\text{хол}}$ вносится в энергонезависимую память прибора и хранится там вне зависимости от того включен гемоглобинометр или нет.

Конечный результат выводится на цифровой дисплей в единицах концентрации гемоглобина:

$$C = M \times (D_{\text{проб}} - D_{\text{хол}}).$$

Заметим, что величина $I_{\text{своб}} - I_{\text{пар своб}}$ не зависит от внешней подсветки $I_{\text{вс}}$ и уровня электрического смещения $I_{\text{см}}$ и определяется произведением $E^{540} \times K_{\text{ус}}$, где E^{540} – монохроматическая яркость светодиода, а $K_{\text{ус}}$ – коэффициент усиления усилителя. Разность $I_{\text{своб}} - I_{\text{пар своб}} = I_{\text{пам}}$ хранится в памяти прибора и используется при определении плотности. Поскольку E^{540} и $K_{\text{ус}}$ могут изменяться одновременно, текущее значение $I_{\text{своб}} - I_{\text{пар своб}}$ сравнивается с $I_{\text{пам}}$. Если они не равны, то текущее значение записывается в память с индексом $I_{\text{пам}}$ и используется для последующих определений плотности. Одновременно прибор сигнализирует звуковым сигналом о том, что произведена замена параметра (автоматическая регулировка или калибровка) и измерение необходимо повторить для уточнения. Изменения фотоэлектрических параметров в микропроцессорном приборе в основном происходят из-за температурной зависимости яркости излучателя – светодиода. Поскольку температура в помещениях изменяется плавно, автоматическая калибровка происходит редко.

Высокая стабильность прибора, обусловленная цифровой обработкой измеряемых сигналов позволяет обойтись без ручной регулировки прибора в процессе его эксплуатации. В то же время контроль правильности работы прибора обеспечивает контрольная мера из цветного стекла. Значение плотности этой меры паспортно в единицах концентрации гемоглобина. Если контрольное значение не соответствует паспортному, то этому может быть две причины – или стекло меры загрязнено или неисправен прибор. В первом случае расхождение устраняется приведением меры в соответствующий порядок, во втором – прибор передается специалисту для

исправления неисправности. Таким образом, медицинский персонал не участвует в регулировке прибора, поскольку эта операция выполняется в исправном приборе автоматически. В приборе также осуществляется объективный контроль чистоты кюветы, так как ее плотность также паспортизована и должна проверяться перед работой. Описанный алгоритм микропроцессорного гемоглобинометра обеспечивает высокую точность и стабильность фотометрирования.

Мы рассмотрели особенности монохроматического фотометрирования растворов гемиглобинцианида в различных фотометрах. Однако, во всех них, кроме спектрофотометра, используются не монохроматоры, обеспечивающие высокую монохромность светового потока, а светофильтры с определенной спектральной полосой пропускания. На рисунке 5 приведены спектральные кривые растворов гемоглобина с концентрацией 50, 100, 150 и 200 г/л. На этом же рисунке изображены области светопропускания светофильтров с полосой пропускания на уровне 50% - 200 нм (1), 35 нм (2) и 15 нм (3), а также горизонтальные прямые C1, C2, C3, C4, проведенные по уровням A^{540} монохроматического поглощения растворов гемиглобинцианида соответствующей концентрации. Чем больше кривая поглощения в области светопропускания отклоняется от уровня A^{540} , тем к большей нелинейности это приводит, особенно на длинах волн больше 540 нм.

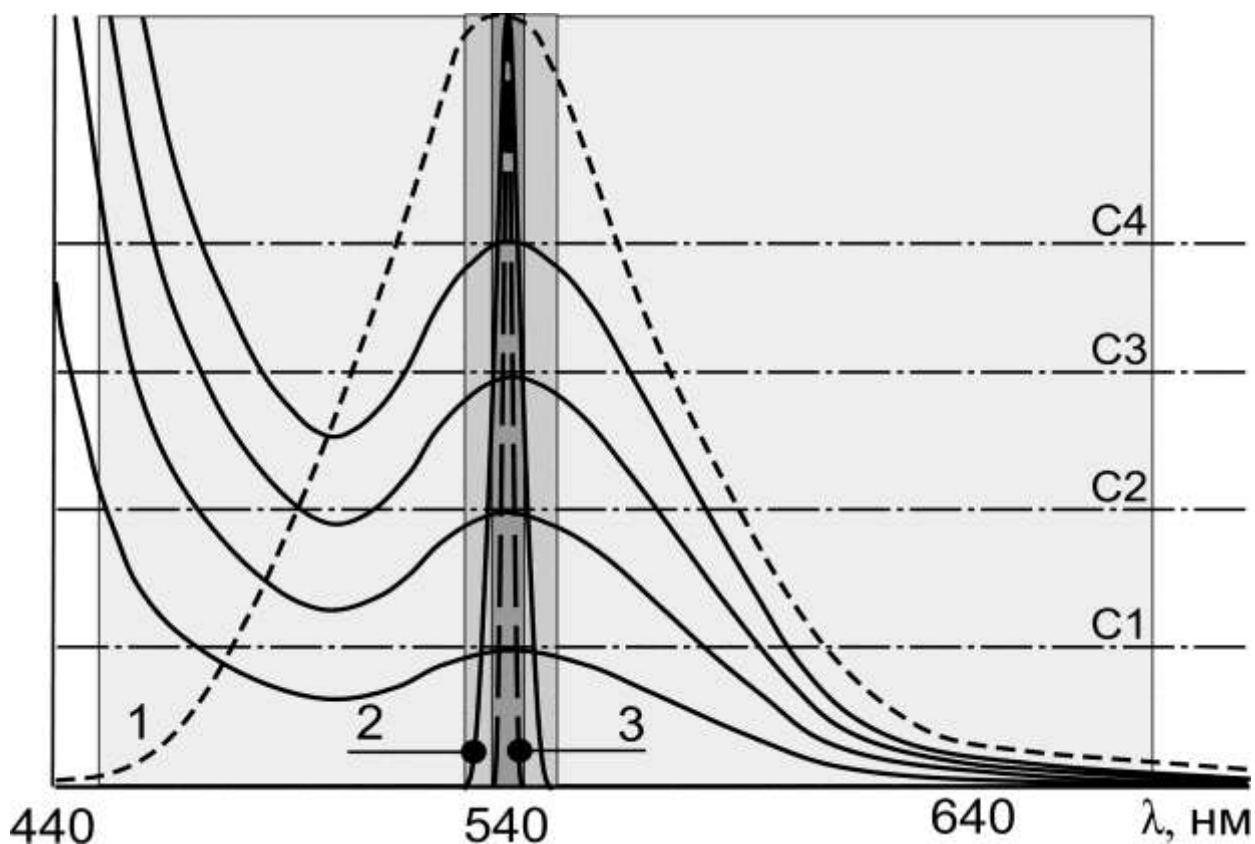


Рисунок 5. Спектры поглощения растворов гемиглобинцианида.

Отсутствие монохромности при измерении может привести к дополнительным ошибкам измерения. Это связано с тем, в области спектральной чувствительности прибора, которая определяется полосой пропускания светофильтра, оптическая плотность неодинакова для различных длин волн. Это значит, что зависимость сигнала фотопреобразователя от концентрации раствора (то есть от плотности) имеет нелинейный характер.

На рисунке 6 приведены графики нелинейности для различных фильтров.

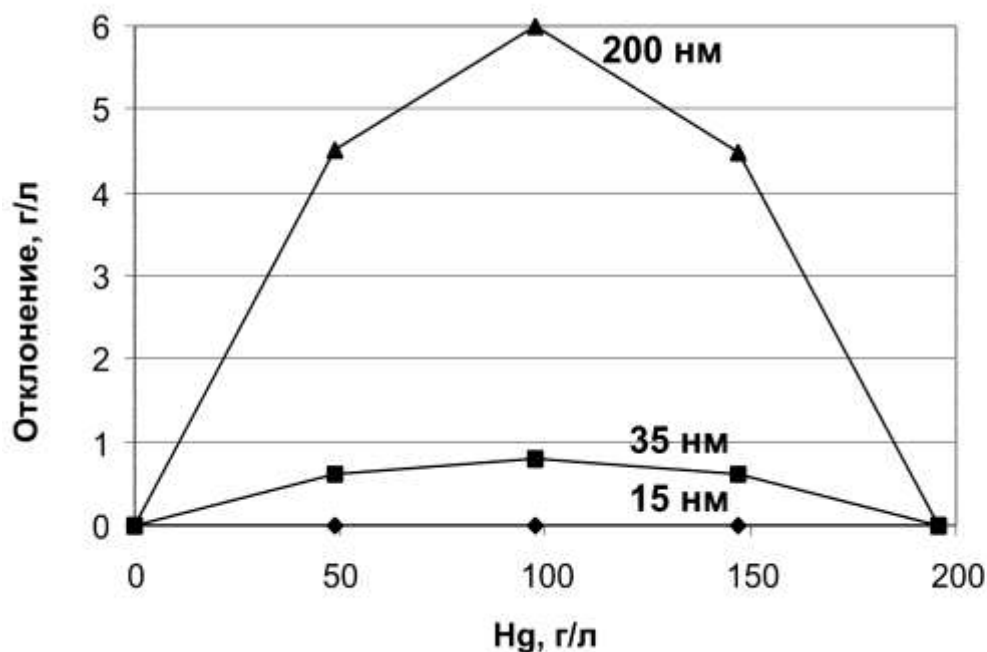


Рисунок 6. Нелинейность измерений для различных фильтров.

Поскольку наклон светосигнальной характеристики может выбираться разным, то на рисунке представлен случай, когда ошибка за счет нелинейности равна нулю при концентрации 0 г/л и 200 г/л. При этом ошибка максимальна в середине этого диапазона и составляет 6% для широкополосного фильтра, 0.8% для фильтра 30 нм, 0.003% для фильтра 10 нм и 0% для спектрофотометра. Ошибка в 6% для широкополосного фильтра в несколько раз превышает допустимый предел. Избежать ошибки можно только путем калибровки фотоколориметра при помощи калибровочных растворов гемиглобинцианида различной плотности. Для спектрофотометра и гемоглобинометров ошибка, связанная с нелинейной зависимостью сигнала от плотности, пренебрежимо мала и калибровать их подобным образом не нужно.

В заключение приводим сравнительную таблицу, обобщающую рассмотренные выше особенности фотометров.

| Параметры и функции | Фотометры | | | |
|--|-----------|---------|---------|-----------|
| | ФЭК | Beckman | МФ 1020 | МиниГЕМ |
| Источник света | лампа | лампа | лампа | светодиод |
| Количество измерительных каналов | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Полоса пропускания фильтра, нм | 200 | 1 | 35 | 15 |
| Предельная точность, г/л | 4,5 | 0,03 | 1 | 1 |
| Нелинейность (рисунок 5) | 6% | 0% | 0.8% | 0.003% |
| Возможность измерений без калибровки растворами гемиглобинцианида | нет | да | да | да |
| Автоматическая установка “нулевого” уровня | нет | нет | нет | да |
| Автоматическая установка коэффициента усиления | нет | нет | нет | да |
| Наличие защиты от изменений внешней подсветки | да | да | нет | да |
| Наличие объективного контроля чистоты оптических поверхностей кюветы и стеклянной меры | нет | нет | нет | да |

Литература.

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник под редакцией В.В.Меньшикова. – М.:Медицина, 1987, стр. 15.
2. J.V. Dacie, S.M. Lewis. Estimation of haemoglobin concentration (Hb). In book Practical Haematology. Churchill Livingstone, 1995, page. 50-54.