

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 845**

51 Int. Cl.:

G01N 21/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2012 PCT/EP2012/063864**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13010970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2012 E 12762538 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2710348**

54 Título: **Procedimiento y sistema para la determinación de la concentración de sustancias en fluidos corporales**

30 Prioridad:

18.07.2011 EP 11174320

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.03.2017

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**SASS, KARL;
GREIS, DIRK;
NOAH, MICHAEL y
UECKERMANN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 605 845 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema para la determinación de la concentración de sustancias en fluidos corporales

5 La presente invención hace referencia a un procedimiento y a un sistema para la determinación de la concentración de sustancias en fluidos corporales, en particular de impurezas como bilirrubina, hemoglobina y lípidos en muestras de suero sanguíneo y plasma sanguíneo.

Numerosos procedimientos de detección y análisis para la determinación de parámetros fisiológicos en muestras de fluidos corporales se basan en principios de medición fotométricos. Los procedimientos fotométricos posibilitan la detección cualitativa y cuantitativa de los analitos en las muestras líquidas.

10 La determinación de parámetros clínicamente relevantes, como por ejemplo de la concentración o de la actividad de un analito se lleva a cabo a menudo mezclando el alícuota de un fluido corporal de un paciente con uno o varios reactivos de ensayo in vitro, con lo que se pone en marcha una reacción bioquímica que origina una modificación medible de una propiedad óptica del ensayo. La fotometría investiga y emplea la atenuación de una corriente de luz a su paso a través de un medio absorbente y/o dispersor. En función del tipo de reacción bioquímica o biofísica
15 provocada se emplean diferentes procedimientos de medición fotométricos que posibilitan la medición en un ensayo de un líquido turbio.

Para esto se pueden utilizar procedimientos turbidimétricos, en los que se mide la turbidez o la densidad óptica de una disolución o suspensión en base a la atenuación luminosa o absorbancia de un haz de luz que atraviese directamente la suspensión.

20 La intensidad del haz de luz se reduce al pasar a través de una célula de medición o cubeta, que contiene una muestra líquida. Las pérdidas pueden estar influidas por las interacciones del haz de luz con la muestra presente en la célula de medición, por ejemplo, mediante efectos de absorción, difracción, dispersión y/o reflexión. En general los efectos de difracción, dispersión y reflexión pueden ser ignorados o compensarse mediante mediciones de referencia, de forma que principalmente la absorción contribuya a la atenuación del haz de luz.

25 Las determinaciones de concentración fotométricas se basan, por tanto, en una auténtica función de la absorbancia o absorción en la concentración de las sustancias disueltas y en la profundidad de la capa a medir por la célula de medición a una determinada longitud de onda de la luz irradiada. Este contexto describe la ley de Lambert-Beersche:

$$E(\lambda) = -\log(I/I_0) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1)$$

30 donde $E(\lambda)$ es la absorbancia en función de la longitud de onda λ del haz de luz, I es la intensidad luminosa tras pasar a través de la muestra, I_0 es la intensidad luminosa antes del paso a través de la muestra, $\varepsilon(\lambda)$ el coeficiente de extinción molar en función de la longitud de onda de una sustancia irradiada, c la concentración molar de la sustancia irradiada y de la profundidad de la capa irradiada por un haz de luz, por ejemplo, de la célula de medición.

35 En base a la absorbancia $E(\lambda)$ de una muestra se puede determinar la concentración de una sustancia en una disolución. A tal efecto, es necesario que anteriormente se haya determinado la absorbancia de al menos una solución estándar de concentración conocida. Como la absorbancia se comporta de manera proporcional a la concentración, la concentración de una sustancia disuelta puede determinarse por medio de calibración mediante mediciones de absorbancia de diversas soluciones estándar de concentraciones conocidas.

40 La absorbancia de una muestra depende, sin embargo, no sólo de la concentración de la propia sustancia a determinar, sino también del tipo de matriz de muestras. La absorbancia de diferentes sustancias se comporta en una mezcla de forma aditiva, siempre que las sustancias no interactúen entre ellas. Los fluidos corporales, como por ejemplo plasma sanguíneo o suero sanguíneo son, en cada caso, mezclas complejas y contienen, además del analito a determinar, un gran número de otras sustancias que afectan a la absorción total de la muestra.

45 Sin embargo, las muestras de fluidos corporales pueden contener, en casos individuales, concentraciones anormalmente altas de una o varias sustancias intrínsecas, es decir, sustancias corporales que pueden resultar perjudiciales en los procedimientos de detección fotométricos si superan una concentración tolerable y pueden producir un error sistemático.

50 Se conocen problemas que producen muestras de suero o plasma hemolíticas, ictéricas y/o lipémicas que presentan concentraciones anormalmente altas de hemoglobina, bilirrubina y/o lípidos. Las concentraciones anormalmente altas de estas sustancias que podrían interferir se pueden originar por un estado patológico del paciente o, por otro lado, por una extracción o almacenamiento incorrectos de la muestra. Si estas muestras se someten a un procedimiento fotométrico que sirva para la determinación de un parámetro analítico, diagnósticamente relevante,

existe el peligro de una determinación errónea, lo que puede tener como consecuencia en su caso un diagnóstico erróneo, y en el peor de los casos un tratamiento erróneo del paciente. La identificación pre-analítica de muestras hemolíticas, ictericas, así como lipémicas es, por consiguiente, de especial importancia para la prevención de resultados de análisis defectuosos.

5 Existe por tanto una necesidad de procedimientos para la determinación de las repercusiones espectrométricas de las sustancias nocivas en las muestras de fluidos corporales.

10 En las patentes EP-A1-1059522, US 4,263,512, US 2009/0009750 A1 y US 2010/0174491 A1 se describen diversos procedimientos para la determinación de bilirrubina, hemoglobina y lípidos en las muestras de suero o plasma. En la EPA1-1059522 se consigue una aproximación localmente lineal de la absorbancia remanente tras la deducción de la absorbancia para hemoglobina y bilirrubina, que contiene también, en particular, la absorbancia producida por los lípidos.

También el último procedimiento citado tiene sin embargo el inconveniente de que precisamente una concentración comparativamente alta de lípidos puede afectar a la determinación de bilirrubina y hemoglobina en la misma muestra, y por consiguiente alterar los valores medidos.

15 La presente invención se basa, en consecuencia, en el objeto de facilitar un procedimiento para la determinación espectrofotométrica de varias sustancias en una muestra de fluido corporal que también posibilite una eficaz determinación de otras sustancias, como por ejemplo hemoglobina y bilirrubina, en muestras de fluidos corporales con altas concentraciones de lípidos.

Este objeto se resuelve mediante el procedimiento conforme a la invención.

20 Un modo de realización de la presente invención consiste en un procedimiento para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal, con los pasos de la irradiación de una muestra de fluido corporal que contiene lípidos y una segunda, y en cada caso una tercera, sustancia con un haz de luz a un gran número de longitudes de onda de la luz, y de la obtención de una pluralidad de valores medidos de la absorbancia de la muestra de fluido corporal al gran número de longitudes de onda, del cálculo de una curva de aproximación funcional de potencia de la forma

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q}$$

30 para la absorbancia de los lípidos (L) en base a un primer valor medido mediante determinación del factor p para un exponente q predeterminado a una primera longitud de onda, a la que la absorbancia no originada por los lípidos es poco significativa, y de la determinación de un primer valor de aproximación de la concentración de la segunda sustancia en base a un segundo valor medido y valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda.

35 De acuerdo con un modo de realización favorable, el procedimiento comprende además los pasos de cálculo de un valor de absorbancia a una tercera longitud de onda en base al primer valor de aproximación y a valores de la curva de aproximación, de obtención de una desviación del valor de absorbancia calculado en base a un tercer valor medido a la tercera longitud de onda, de la corrección de la curva de aproximación en base a la desviación determinada, y de la corrección del primer valor de aproximación en base al segundo valor medido y a los valores de la curva de aproximación corregida.

40 De acuerdo con otro modo de realización ventajoso, la muestra de fluido corporal puede contener además una tercera sustancia, y se pueden realizar además los pasos de cálculo de un segundo valor de aproximación de la concentración de una tercera sustancia en base al segundo valor medido y a valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda, así como de un cuarto valor medido y valores de la curva de aproximación a una cuarta longitud de onda, y de la corrección del segundo valor de aproximación en base al segundo valor medido, al cuarto valor medido y a los valores de la curva de aproximación corregida, donde el valor de absorbancia se calcula adicionalmente en base al segundo valor de aproximación.

45 En un modo de realización preferido se pueden repetir los pasos del cálculo del valor de absorbancia, de la obtención de la desviación y de la corrección de la curva de aproximación, del primer valor de aproximación y del segundo valor de aproximación, hasta que la desviación sea inferior a un valor umbral predeterminado.

Más favorablemente, la muestra de fluido corporal puede incluir suero sanguíneo o plasma sanguíneo. Además, es ventajoso, pero no necesario, que la segunda sustancia comprenda hemoglobina y la tercera sustancia bilirrubina.

De acuerdo con un modo de realización preferido, la primera longitud de onda se encuentra en un rango entre 610 nm y 650 nm, la segunda longitud de onda en un rango entre 410 nm y 420 nm, la tercera longitud de onda en un rango entre 360 nm y 370 nm y la cuarta longitud de onda en un rango entre 465 nm y 475 nm.

De acuerdo con un modo de realización favorable, el valor umbral predeterminado asciende a 0,01 E.

- 5 Más favorablemente puede realizarse la corrección de la curva de aproximación de tal manera que el primer valor medido se encuentre por encima de la curva de aproximación.

De acuerdo con un modo de realización favorable, la irradiación de la muestra de fluido corporal puede realizarse con la ayuda de diodos láser o emisores de luz, y la captura de la pluralidad de valores medidos con la ayuda de un sensor fotométrico.

- 10 La presente invención desarrolla en otro modo de realización un sistema, por ejemplo un aparato de análisis, para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal, con un dispositivo de medición, que se diseña para irradiar muestras de fluido corporal que contienen lípidos, y segundas sustancias con un haz de luz a una pluralidad de longitudes de onda de la luz, y para capturar una pluralidad de valores medidos de la absorbancia de la muestra de fluido corporal a una pluralidad de longitudes de onda, y un dispositivo de cálculo
15 que se diseña para calcular una curva de aproximación funcional de potencia en la forma

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q}$$

- para la absorbancia de los lípidos (L) en base a un primer valor medido mediante determinación del factor p a exponente q predeterminado a una primera longitud de onda, a la que la absorbancia no originada por los lípidos es poco significativa, determinar un primer valor de aproximación de la concentración de la segunda sustancia en base
20 a un segundo valor medido y valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda, y calcular un valor de absorbancia a una tercera longitud de onda en base al primer valor de aproximación y valores de la curva de aproximación.

- Más favorablemente el dispositivo de cálculo está diseñado, además, para determinar una desviación del valor de absorbancia calculado a partir de un tercer valor medido a la tercera longitud de onda, corregir la curva de aproximación en base a la desviación determinada y corregir el primer valor de aproximación en base al segundo
25 valor medido y a valores de la curva de aproximación corregida.

Más favorablemente, el dispositivo de medida puede tener diodos láser o emisores de luz y un dispositivo sensor fotométrico.

- 30 En un modo de realización preferido, el dispositivo de cálculo puede diseñarse además para determinar un segundo valor de aproximación de la concentración de una tercera sustancia, en base al segundo valor medido y a valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda, así como a un cuarto valor medido y a valores de la curva de aproximación a una cuarta longitud de onda, y corregir el segundo valor de aproximación en base al segundo valor medido y a valores de la curva de aproximación corregida, donde el valor de absorbancia se calcula adicionalmente en base al segundo valor de aproximación.

- 35 Otras modificaciones y variaciones se obtienen como resultado de las características de las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de las Figuras

Diversas formas de ejecución y realizaciones de la presente invención se describen ahora en mayor detalle con respecto a los dibujos adjuntos.

- 40 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de lípidos según un modo de realización de la invención;

La Fig. 2 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de muestras de fluido corporal según otro modo de realización de la invención;

- 45 La Fig. 3 muestra una representación esquemática de un procedimiento para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal según otro modo de realización de la invención;

La Fig. 4 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de muestras de fluido corporal según otro modo de realización de la invención;

La Fig. 5 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de muestras de fluido corporal según otro modo de realización de la invención; y

5 La Fig. 6 muestra una representación esquemática de un sistema para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal según otro modo de realización de la invención.

10 Las realizaciones y los perfeccionamientos descritos se pueden combinar, si fuera conveniente, de cualquier manera. Otras posibles realizaciones, perfeccionamientos e implementaciones de la invención incluyen también combinaciones no explícitamente citadas de indicaciones de la invención descritas anteriormente o en lo sucesivo con respecto a los ejemplos de ejecución.

15 Los dibujos adjuntos pretenden proporcionar una mejor comprensión de las formas de ejecución de la invención. También ilustran formas de realización y se utilizan en relación a la descripción para aclarar los principios y conceptos de la invención. Otras formas de ejecución y muchas de las ventajas indicadas resultarán obvias en referencia a los dibujos. Los elementos de los dibujos no se muestran necesariamente a escala real unos con respecto a otros. Los mismos símbolos de referencia designan además los mismos componentes o componentes de efecto similar.

20 Muestras de fluido corporal, en el sentido de la presente invención, pueden ser todas las muestras de origen biológico que tengan consistencia líquida y un gran número de sustancias biológicamente activas en diferentes concentraciones. Por ejemplo, las muestras de fluido corporal pueden incluir suero sanguíneo, plasma sanguíneo, sangre, orina, líquido linfático, bilis o fluidos similares.

25 Valores medidos fotométricos, en el sentido de la presente invención, pueden ser valores medidos que puedan registrarse con dispositivos de medición fotométricos y las correspondientes fuentes luminosas, particularmente láseres, diodos láser, diodos emisores de luz o similares. Los dispositivos de medición incluyen, por ejemplo, sensores CCD, sensores CMOS, fotosensores o dispositivos similares que sean apropiados para registrar, en función de la longitud de onda, la intensidad de un haz de luz.

Lípidos, en el sentido de la presente solicitud, pueden ser todos los compuestos orgánicos esencialmente hidrófobos, en particular los compuestos que existan en un organismo humano o animal. Los lípidos, en el sentido de la invención, incluyen en particular grasas y/o triglicéridos y/o triacilglicerinas que puedan encontrarse en el cuerpo humano.

30 Las curvas de absorbancia y los valores de absorbancia, en el sentido de la presente invención, pueden ser variables adimensionales que indiquen una medida en función de la longitud de onda para la opacidad de muestras de fluido corporal frente al paso de haces de luz en el rango de longitudes de onda visible, infrarrojo y/o ultravioleta. Puede ser igualmente también posible que se indiquen valores de absorbancia en referencia a una profundidad unitaria para una célula de medición o cubeta, en la que se mantienen muestras de fluido corporal durante el paso de haces de luz para la detección de valores de intensidad medidos. En este caso, los valores de absorbancia pueden tener una dimensión de [1/cm]. En cada caso, los valores de absorbancia indicados de las siguientes formas de ejecución tienen únicamente carácter ejemplar y dependen del aparato de medición, de la consistencia de la muestra y de la composición de la muestra. Los valores de absorbancia se equiparan en lo sucesivo, en cada caso, con valores de absorción, aunque queda claro para el experto que en esta consideración la difracción, dispersión y reflexión contribuyen en realidad a los valores de absorbancia, aunque en comparación con la absorción en el rango de longitudes de onda observado son esencialmente poco significativos.

Las muestras de fluido corporal pueden contener frecuentemente hemoglobina, bilirrubina y lípidos, particularmente triacilglicerinas (triglicéridos). Para la determinación de las concentraciones de hemoglobina y bilirrubina por medio de métodos de análisis fotoespectrométricos es importante determinar la proporción de lípidos.

45 La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de lípidos en un rango de longitudes de onda entre aproximadamente 340 nm y 620 nm. Las curvas de absorbancia L1, L2 y L3 forman, en cada caso, emulsiones de lípidos artificialmente preparadas (Intralipid, Lipovenös®) en las concentraciones de lípidos 60 mg/dl, 180 mg/dl y/o 300 mg/dl. Primero se puede identificar que los valores de absorbancia crecen en conjunto con la concentración de lípidos. Además, se puede identificar que en el rango espectral visible rojo de alrededor de 600 nm a 620 nm la absorbancia para todas las concentraciones de lípidos es menor que la absorbancia en el rango espectral visible azul y/o el ultravioleta. Las curvas de lípidos L1, L2 y L3 se aproximan en la Fig. 1, en cada caso, mediante una función de potencia,

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q} \quad (2)$$

de forma que las curvas de aproximación P1, P2 y P3 se producen en cada caso con parámetros de aproximación p y q adaptados. Los parámetros de aproximación p y q se calculan directamente a partir de las absorbancias medidas y producen por consiguiente valores de experiencia para órdenes de magnitud típicos de los parámetros p y q, que se pueden emplear en el procedimiento descrito en lo sucesivo.

Para la curva de lípidos L1 de menor concentración la curva de potencia P1 coincide bien con el desarrollo real de la absorbancia. Para mayores concentraciones sin embargo las curvas de aproximación P2 y P3 pueden reproducir los respectivos desarrollos de la absorbancia L2 y/o L3 únicamente de una forma menos adecuada, en particular en el rango de longitudes de onda azul entre aproximadamente 340 nm y 470 nm. Los desarrollos de la absorbancia L2 y L3 forman en este rango una cierta meseta de absorbancia, lo que se origina por dispersión múltiple. La dispersión múltiple aparece, sin embargo, sólo en los lípidos artificiales representados en la Fig. 1. En el caso de aplicación surgen, sin embargo, sólo lípidos naturales en los que no se producen tales dispersiones múltiples. Por tanto, una aproximación funcional de potencia, a pesar de las desviaciones representadas en la Fig. 1 en el caso real de aplicación, permite obtener buenos resultados, especialmente en comparación, por ejemplo, con las aproximaciones locales lineales.

La Fig. 2 muestra una representación esquemática de un diagrama con curvas de absorbancia de muestras de fluido corporal, particularmente de suero sanguíneo o plasma sanguíneo, en un rango de longitudes de onda entre 340 nm y 660 nm. El suero sanguíneo o el plasma sanguíneo pueden incluir como sustancias emulsionadas hemoglobina (H), bilirrubina (I) y lípidos (L). Una determinación de la concentración de estas sustancias en la muestra de fluido corporal se designa, por tanto, frecuentemente también como prueba HIL.

La curva de absorbancia HIL expresa un ejemplo de desarrollo esquemático para la absorbancia en función de la longitud de onda de muestras de fluido corporal con concentraciones típicas de hemoglobina, bilirrubina y lípidos. La curva de absorbancia puede además dividirse en una proporción de hemoglobina H y una proporción combinada de lípido/bilirrubina IL, cuyas curvas de absorbancia estimadas se representan como curvas de líneas discontinuas en la Fig. 2. La proporción de lípido puro L se representa asimismo como curva discontinua. Las respectivas absorbancias se superponen aditivamente.

En un rango de longitudes de onda del rojo entre aproximadamente 610 nm y 650 nm, la absorbancia producida por hemoglobina y bilirrubina es poco significativa. La absorbancia se origina por consiguiente aquí considerablemente mediante los lípidos. Por tanto, puede determinarse con una primera medición a una primera longitud de onda entre 610 nm y 650 nm, por ejemplo, a 620 nm o 645 nm un primer valor medido E4, con el que puede determinarse a través de la función de la ley de Lambert-Beerschen la concentración molar de lípidos C_L [L/(mol*cm)] en una primera aproximación:

$$c_L = E4 / \epsilon_{L4} \cdot d \quad (3)$$

donde ϵ_{L4} es el coeficiente de extinción molar de triacilglicerinas a la primera longitud de onda.

Preferentemente puede determinarse la concentración también con ayuda de un coeficiente de extinción específico del peso. A tal efecto se equipara en la Fórmula de Lambert-Beerschen (Fórmula 1) la longitud del trayecto d con 1 mm, y a partir del producto del coeficiente molar de absorbancia ϵ_{mol} y la profundidad de la capa a medir por la célula de medición d se determina el coeficiente de extinción específico del peso. Esto posibilita una determinación de la concentración de la sustancia en [mg/dL].

En otras mediciones se pueden registrar valores medidos E2 y E3, que se hallan en rangos de longitud de onda, en los que se encuentran los máximos de absorbancia de hemoglobina o bilirrubina. Por ejemplo, puede registrarse el valor medido E2 en un rango de longitudes de onda entre 410 nm y 420 nm, el máximo de la absorbancia de hemoglobina, particularmente a aproximadamente 415 nm. El valor medido E3 puede registrarse por ejemplo en un rango de longitudes de onda entre 465 nm y 475 nm, el máximo de la absorbancia de bilirrubina, particularmente a aproximadamente 470 nm. El valor medido E2 consta de proporciones de absorbancia, que pueden atribuirse a hemoglobina (E_{H2}), bilirrubina (E_{I2}) y lípidos (E_{L2}):

$$E2 = E_{H2} + E_{I2} + E_{L2} \cdot d \quad (4)$$

De la misma manera, el valor medido E3 se compone de proporciones de absorbancia, que pueden atribuirse a hemoglobina (E_{H3}), bilirrubina (E_{I3}) y lípidos (E_{L3}):

$$E3 = E_{H3} + E_{I3} + E_{L3} \cdot \quad (5)$$

Finalmente, puede registrarse un valor medido E1 en un rango de longitudes de onda, que puede servir como rango de control, por ejemplo, en un rango entre 360 nm y 370 nm, particularmente a aproximadamente 365 nm. El valor medido E1 se compone de proporciones de absorbancia, que pueden atribuirse a hemoglobina (E_{H1}), bilirrubina (E_{I1}) y lípidos (E_{L1}):

$$E1 = E_{H1} + E_{I1} + E_{L1} \cdot \quad (6)$$

La Fig. 3 muestra ahora una representación esquemática de un procedimiento 30 para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal, particularmente de hemoglobina, bilirrubina y lípidos en una muestra de suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

En un primer paso 31 se pueden registrar valores medidos E1, E2, E3 y E4, tal y como se aclara en relación con la Fig. 2. En un segundo paso 32 se pueden determinar primeros parámetros de aproximación p_0 y q_0 para una primera curva de aproximación L_0 la absorbancia causada por lípidos con ayuda de un análisis de regresión. Esta puede, tal y como se aclara en relación con la Fig.2, análogamente a la ecuación (2), tener la forma

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q}$$

El único valor medido E4 puede servir claramente en el paso 32 aún para una determinación de ambas variables p y q. Por tanto, el exponente q_0 puede formarse en base a un cálculo basado en los valores de referencia representados en la Fig. 1. El exponente q_0 puede en consecuencia esto predeterminarse en base a valores de experiencia. Dado que como se describe en relación con la Fig. 2 a la primera longitud de onda en el rango de 610 a 650 nm puede pasarse por alto la absorbancia por otras sustancias salvo lípidos, puede entonces determinarse para el exponente dado q_0 según las ecuaciones (1), (2) y (3) el coeficiente p_0 a través del valor medido E4 a la primera longitud de onda. La curva de aproximación así determinada con los parámetros p_0 y q_0 puede expresar una primera aproximación para el desarrollo de la absorbancia de la absorbancia de lípidos en la muestra. Para esto puede calcularse para todas las longitudes de onda, en las que en el paso 31 se han registrado otros valores medidos, en el paso 33a la correspondiente proporción de absorbancia E_{L1} , E_{L2} , E_{L3} y $E_{L4}(= E4)$, de los lípidos.

Tal y como puede identificarse en la Fig. 4, se origina de este modo una primera curva de aproximación L_0 , que ofrece ya una buena aproximación a la absorbancia de lípidos real. Conforme a la Fig. 1 la curva de aproximación L_0 puede transcurrir, especialmente en el rango espectral azul y/o ultravioleta, más plana que el desarrollo real de la absorbancia para lípidos.

En los pasos 34 y 35 se pueden determinar entonces primeros valores de aproximación para las concentraciones de hemoglobina (c_H) y bilirrubina (c_I) en base a los valores medidos E2 y E3, por ejemplo, a las longitudes de onda 415 nm y 470 nm:

$$c_I = \frac{E3 - c_H \cdot \epsilon_{H3} - E_{L3}}{\epsilon_{I3}} \quad (7)$$

$$c_H = \frac{E2 - c_I \cdot \epsilon_{I2} - E_{L2}}{\epsilon_{H2}} \quad (8)$$

donde ϵ_{H2} , ϵ_{H3} , ϵ_{I2} y ϵ_{I3} son los respectivos coeficientes de absorbancia de hemoglobina (H) y bilirrubina (I) a las longitudes de onda de los valores medidos E2 y E3. Los coeficientes de absorbancia se pueden determinar además de antemano mediante mediciones de referencia, o cargarse para los cálculos de una memoria, en que se almacenan los valores de referencia.

Para la determinación de ambas concentraciones C_I y C_H puede resolverse el sistema de ecuaciones lineal de ambas ecuaciones (7) y (8), de forma que para la concentración de hemoglobina (H) dé como resultado la Fórmula

$$c_H = \frac{E_3 - E_{L3} - \frac{(E_2 - E_{L2}) \cdot \epsilon_{I3}}{\epsilon_{I2}}}{\epsilon_{H3} - \frac{\epsilon_{H2} \cdot \epsilon_{I3}}{\epsilon_{I2}}} \quad (9)$$

5 En este contexto se pueden determinar los valores de absorbancia para los lípidos E_{L2} y E_{L3} conforme a la ecuación (2) con la curva de aproximación L_0 . Por consiguiente, se origina un primer valor de aproximación para la concentración C_H de hemoglobina. Este primer valor de aproximación para la concentración C_H puede usarse entonces para la determinación del primer valor de aproximación para la concentración C_I de bilirrubina en la ecuación (7). De este modo resultan ya primeros buenos valores de aproximación C_H , C_I y C_L para las concentraciones de hemoglobina, bilirrubina y lípidos, determinados en base a la función de potencia según la ecuación (2) y el sistema de ecuaciones antes descrito con los primeros valores de aproximación para los parámetros p_0 y q_0 .

10 Los valores de aproximación se pueden mejorar ahora aún más sin embargo iterativamente, tal y como se describe en lo sucesivo. En un paso 36 puede determinarse un valor de absorbancia E_{HIL} , que corresponde a un valor de aproximación para la absorbancia total a una longitud de onda entre 360 nm y 370 nm, por ejemplo, a 365 nm, es decir en un rango, en que puede esperarse una mayor desviación de la absorbancia real de los lípidos de la curva de aproximación:

$$15 \quad E_{HIL} = c_H \cdot \epsilon_{H1} + c_I \cdot \epsilon_{I1} + E_{L1} \quad (10)$$

Las concentraciones C_H y C_I se determinaron arriba, el valor E_L se origina de nuevo a partir de la ecuación (2) con los parámetros p_0 y q_0 .

En un paso 37 puede entonces realizarse una comparación entre el valor E_{HIL} y el valor medido $E1$ real a esta longitud de onda, para obtener una desviación.

$$20 \quad \Delta E = E1 - E_{HIL} \quad (11)$$

25 Cuando la desviación ΔE sea mayor que un valor umbral predeterminado, por ejemplo 10 mE, puede determinarse que la curva de aproximación L_0 calculada para las concentraciones de lípidos no se ha determinado lo suficientemente exacta. En este caso puede realizarse en un paso 38 una corrección de la curva de aproximación L_0 . Para esto puede corregirse el valor de absorbancia E_{L1} calculado, que describe la proporción de absorbancia de los lípidos a la longitud de onda de 365 nm, en torno a una proporción porcentual de la desviación ΔE . Por ejemplo, puede añadirse al valor de absorbancia E_{L1} la mitad del valor de la desviación ΔE . En base al valor de absorbancia corregido E_{L1} puede determinarse entonces una curva de aproximación corregida L_k con los parámetros p_k y q_k :

$$q_k = \frac{\ln E4 - \ln(E_{L1} + \Delta E/2)}{\ln \lambda(E4) - \ln \lambda(E1)} \quad (12)$$

$$p_k = \frac{E4}{\lambda(E4)^{-q_k}} \quad (13)$$

30 Las ecuaciones (12) y (13) resultan además mediante aplicación de los valores de $E4$ y el valor corregido $E1 + \Delta E/2$ en la ecuación (2). Esto significa, que la curva de aproximación L_0 puede corregirse de tal manera que el valor medido $E4$, por ejemplo, a la longitud de onda de 645 nm, se encuentra además sobre la curva de aproximación corregida L_k , es decir, el valor medido $E4$ se emplea como punto de anclaje para la curva de aproximación.

35 La Fig. 5 muestra una representación esquemática del diagrama de la Fig. 4, en que, además de la primera curva de aproximación L_0 , se representa una curva de aproximación L_k corregida. La curva de aproximación corregida L_k tiene particularmente en el rango de longitudes de onda azul y/o ultravioleta un desarrollo más empinado que la primera curva de aproximación L_0 y es por consiguiente más apropiada para reproducir la proporción real de absorbancia de los lípidos presentes en la muestra.

5 En el paso 33b se pueden calcular entonces, análogamente a los cálculos del paso 33a, las respectivas proporciones de absorbanza E_{L1} , E_{L2} , E_{L3} y $E_{L4}(= E4)$, de los lípidos en base a la curva de aproximación corregida L_k . El procedimiento puede reiterarse con los pasos 34, 35, 36, 37, 38 y 33b, hasta que en el paso 37 se determine que la desviación queda por debajo de un valor umbral predeterminado. En este caso se pueden dar en el paso 39 los valores de aproximación corregidos para las concentraciones de las sustancias en la muestra de fluido corporal.

En la Fig. 5 se representa para ello ejemplarmente una curva de aproximación L_{k+1} corregida en un posterior paso de iteración, que representa frente a la curva de aproximación corregida L_k una mejor aproximación a la proporción real de absorbanza de los lípidos presentes en la muestra.

10 La Fig. 6 muestra una representación esquemática de un sistema 1 para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal, particularmente para llevar a cabo el procedimiento 30 mostrado en la Fig. 3. El sistema 1 comprende un dispositivo de medida 2, un dispositivo de cálculo 3, una memoria 4 y un dispositivo de salida 5.

15 El dispositivo de medida 2 puede diseñarse para irradiar una muestra de fluido corporal conteniendo una primera y segunda sustancias con un haz de luz a un gran número de longitudes de onda de la luz, y registrar un gran número de valores medidos de la absorbanza de la muestra de fluido corporal al gran número de longitudes de onda. A tal efecto, el dispositivo de medida 2 puede tener por ejemplo diodos emisores de luz o láser y los correspondientes dispositivos sensores fotométricos.

20 El dispositivo de cálculo 3 puede diseñarse para llevar a cabo los pasos 32, 33a, 34, 35, 36, 37, 38, 33b y 39 del procedimiento 30 de la Fig. 3. particularmente se pueden dar los valores de aproximación determinados para las concentraciones de las sustancias a través del dispositivo de salida 5 a un usuario del sistema 1.

La memoria 4 puede diseñarse para almacenar valores predeterminados para el valor umbral y/o coeficientes de absorbanza, que pueden cargarse al dispositivo de cálculo 2 en caso de necesidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de las concentraciones de lípidos (L) y de al menos otra sustancia (H) en una muestra de fluido corporal, que comprende los pasos de:

a) irradiación (31) de la muestra de fluido corporal con luz a una pluralidad de longitudes de onda y

5 b) captura de una pluralidad de valores medidos de la absorbancia de la muestra de fluido corporal a la pluralidad de longitudes de onda;

caracterizado por los pasos de:

10 c) captura de un primer valor medido (E4) a una primera longitud de onda, a la que la absorbancia no causada por lípidos sea poco significativa, y determinación de la concentración (C_L) de los lípidos (L) mediante la división del valor medido (E4) por el coeficiente de extinción específico para lípidos (L);

d) determinación (32) de una curva de aproximación funcional de potencia (L₀) de la forma

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q}$$

para la absorbancia de los lípidos (L) en base a un primer valor medido (E4) por determinación del factor p a exponente q predeterminado;

15 e) determinación (34) de un primer valor de aproximación (c_H) de la concentración de la segunda sustancia (H) en base a un segundo valor medido (E2) y valores de la curva de aproximación (L₀) a una segunda longitud de onda.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, con los pasos de:

f) determinación de un valor de absorbancia (E_{HIL}) a una tercera longitud de onda en base al primer valor de aproximación (c_H) y valores de la curva de aproximación (L₀);

20 g) determinación (36) de una desviación (ΔE) del valor de absorbancia calculado (E_{HIL}) de un tercer valor medido (E1) a la tercera longitud de onda;

h) corrección (38) de la curva de aproximación (L_k) en base a la desviación (ΔE) determinada; y

i) determinación de la concentración (c_H) de la segunda sustancia (H) mediante corrección del primer valor de aproximación (c_H) en base al segundo valor medido (E2) y valores de la curva de aproximación corregida (L_k).

25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde se determina además una tercera sustancia (I) en la muestra de fluido corporal, además con los pasos de:

j) determinación (35) de un segundo valor de aproximación (c_i) de la concentración de la tercera sustancia (I) en base al segundo valor medido (E2) y valores de la curva de aproximación (L₀) a la segunda longitud de onda, así como de un cuarto valor medido (E3) y valores de la curva de aproximación (L₀) a una cuarta longitud de onda; y

30 k) determinación de la concentración (c_i) de la tercera sustancia (I) mediante corrección del segundo valor de aproximación (C_i) en base al segundo valor medido (E2), del cuarto valor medido (E3) y valores de la curva de aproximación corregida (L_k),

donde el valor de absorbancia (E_{HIL}) se calcula adicionalmente en base al segundo valor de aproximación (c_i).

35 4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde se reiteran los pasos del cálculo del valor de absorbancia, de la determinación de la desviación y de la corrección de la curva de aproximación, del primer valor de aproximación y del segundo valor de aproximación, hasta que la desviación (ΔE) sea inferior a un valor umbral predeterminado.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde la segunda sustancia (H) comprende hemoglobina y la tercera sustancia (I) bilirrubina.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, donde la primera longitud de onda se encuentra en el rango entre 610 nm y 650 nm, la segunda longitud de onda en el rango entre 410 nm y 420 nm, la tercera longitud de onda en el rango entre 360 nm y 370 nm y la cuarta longitud de onda en el rango entre 465 nm y 475 nm.

7. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el valor umbral predeterminado asciende a 10 mE.

5 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 7, donde la corrección de la curva de aproximación se lleva a cabo de tal manera, que el primer valor medido (E_4) se encuentra sobre la curva de aproximación (L_0 ; L_k).

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, donde la irradiación de la muestra de fluido corporal se lleva a cabo con ayuda de diodos láser o emisores de luz y la captura del gran número de valores medidos (E_1 ; E_2 ; E_3 ; E_4) con ayuda de un sensor fotométrico.

10 10. Sistema (1) para la determinación de las concentraciones de sustancias en una muestra de fluido corporal, con:

i. un dispositivo de medida (2), que se diseña para irradiar una muestra de fluido corporal con haces de luz con un gran número de longitudes de onda, y capturar un gran número de valores medidos de la absorbancia de la muestra de fluido corporal al gran número de longitudes de onda; y

15 ii. un dispositivo de cálculo (3), que se diseña para calcular una curva de aproximación funcional de potencia (L_0) de la forma

$$E(\lambda) = p \cdot \lambda^{-q}$$

para la absorbancia de los lípidos (L) en base a un primer valor medido mediante determinación del factor p para un exponente predeterminado q a una primera longitud de onda, a la que la absorbancia no causada por lípidos es poco significativa, y determinar un primer valor de aproximación (c_H) de la concentración de una segunda sustancia (H) en base a un segundo valor medido y valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda.

20 11. Sistema (1) según la reivindicación 10, donde el dispositivo de cálculo (3) se diseña para calcular un valor de absorbancia (E_{HIL}) a una tercera longitud de onda en base al primer valor de aproximación (c_H) y valores de la curva de aproximación (L_0), determinar una desviación (ΔE) del valor de absorbancia calculado (E_{HIL}) de un tercer valor medido (E_1) a la tercera longitud de onda, corregir la curva de aproximación (L_k) en base a la desviación (ΔE) determinada y corregir el primer valor de aproximación (c_H) en base al segundo valor medido (E_2) y valores de la curva de aproximación corregida (L_k).

12. Sistema (1) según la reivindicación 11, donde el dispositivo de medida (2) presenta diodos láser o emisores de luz y un dispositivo sensor fotométrico.

30 13. Sistema (1) según una de las reivindicaciones 11 y 12, donde el dispositivo de cálculo (3) se diseña además para determinar un segundo valor de aproximación de la concentración de una tercera sustancia (I) en base al segundo valor medido y valores de la curva de aproximación a una segunda longitud de onda, así como de un cuarto valor medido y valores de la curva de aproximación a una cuarta longitud de onda, y corregir el segundo valor de aproximación en base al segundo valor medido y valores de la curva de aproximación corregida, donde el valor de absorbancia se calcula además en base al segundo valor de aproximación.

35 14. Sistema (1) según la reivindicación 13, donde la muestra de fluido corporal comprende suero sanguíneo o plasma sanguíneo, la segunda sustancia (H) hemoglobina y la tercera sustancia (I) bilirubina.

15. Sistema (1) según una de las reivindicaciones 13 y 14, donde la primera longitud de onda se encuentra en el rango entre 610 nm y 650 nm, la segunda longitud de onda en el rango entre 410 nm y 420 nm, la tercera longitud de onda en el rango entre 360 nm y 370 nm y la cuarta longitud de onda en el rango entre 465 nm y 475 nm.

FIG 1

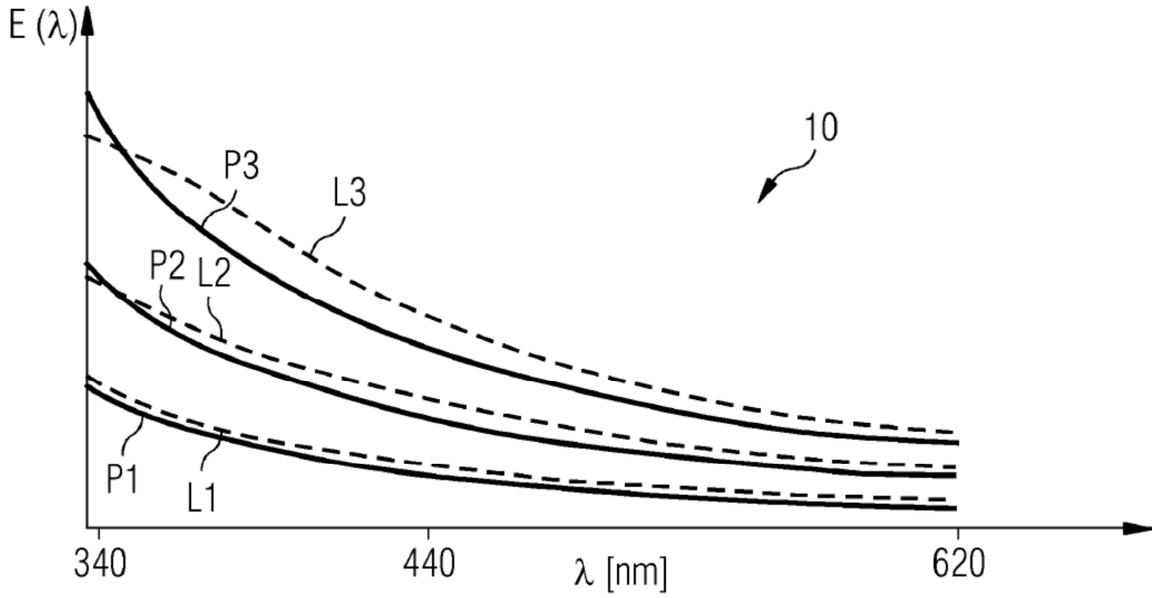


FIG 2

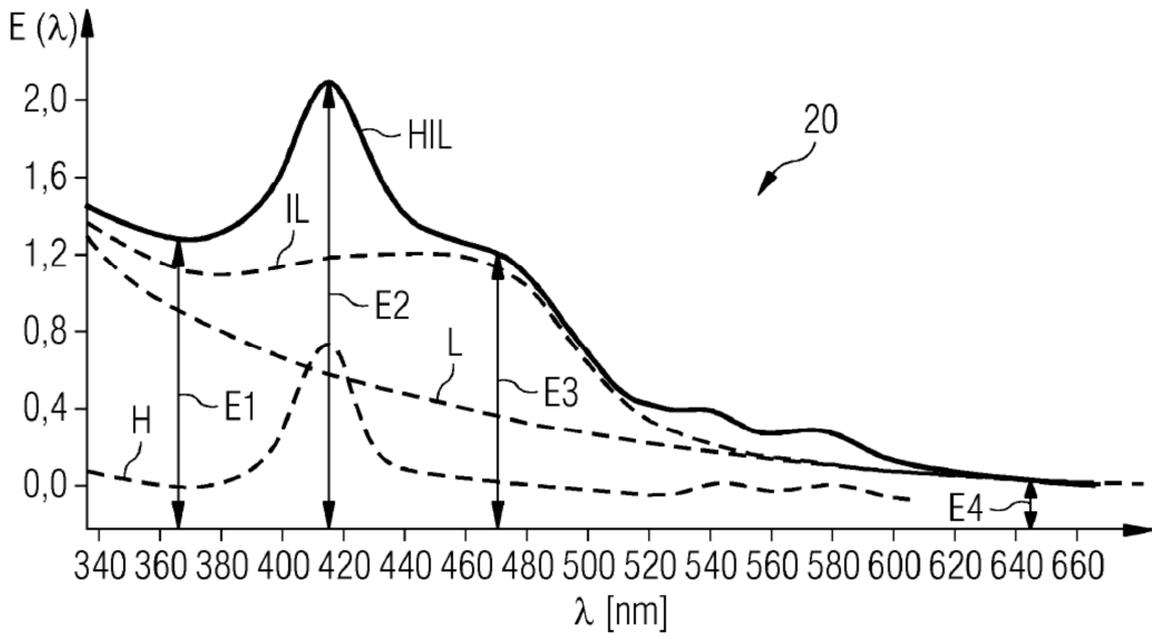


FIG 3

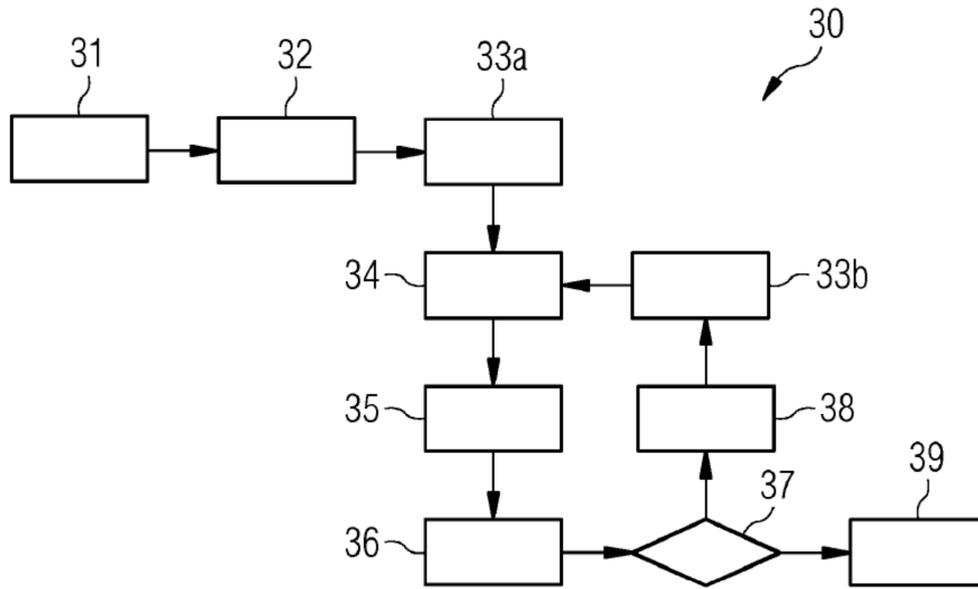


FIG 4

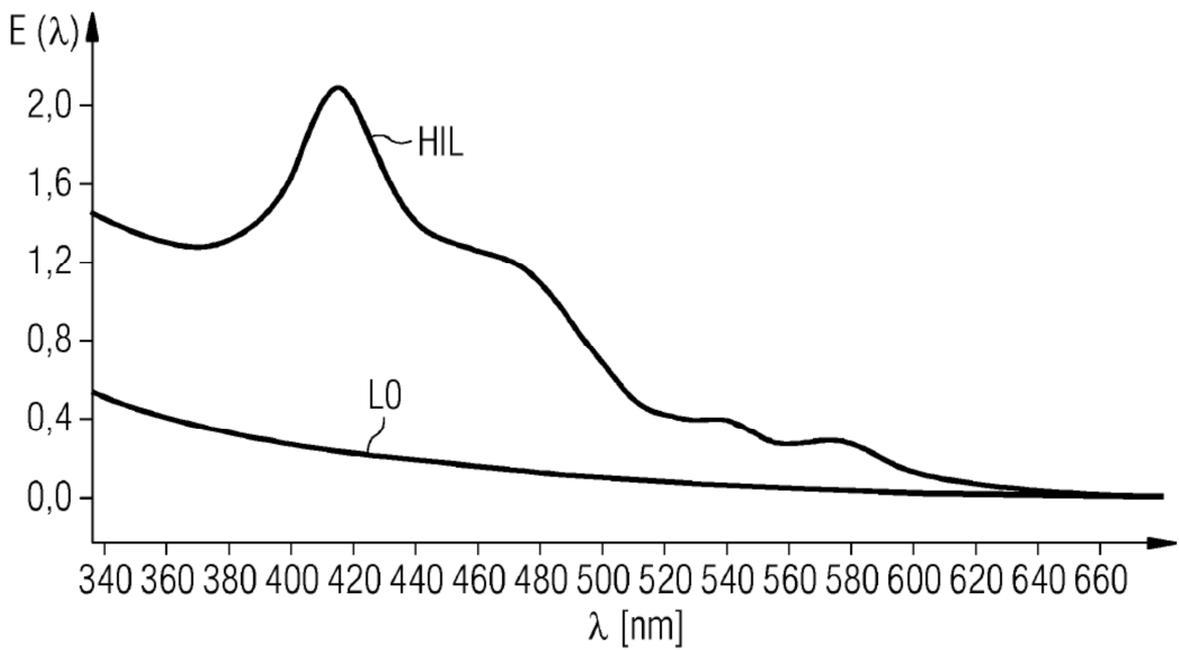


FIG 5

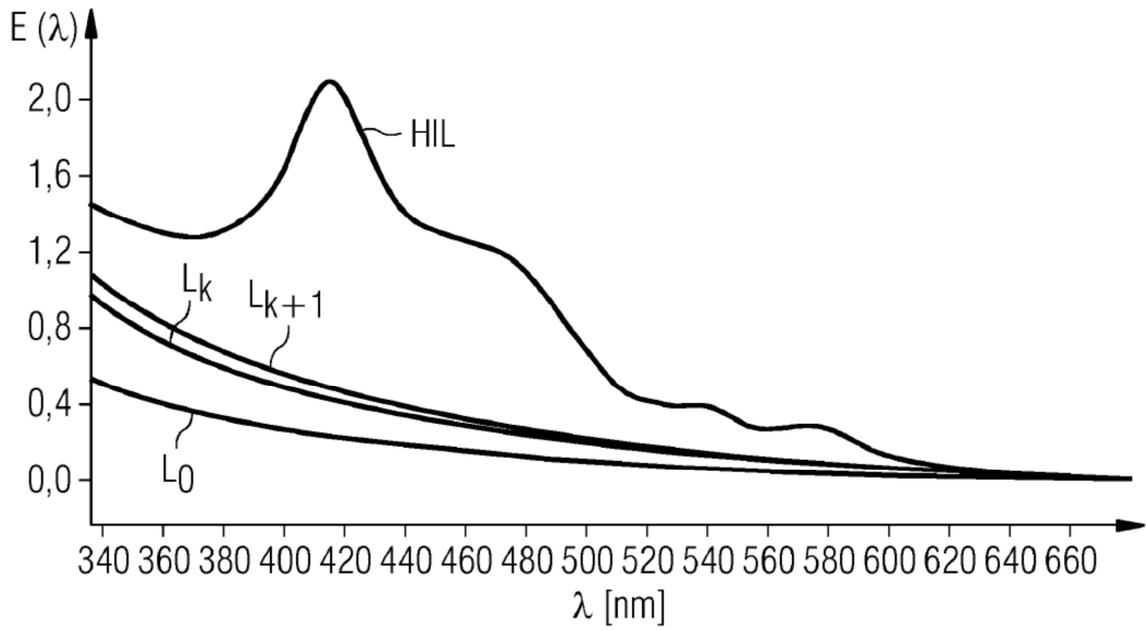


FIG 6

