



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264 878

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/15 //
G 01 N 33/72

(22) Přihlášeno 07 05 87

(21) PV 3253-87.B

(40) Zveřejněno 15 12 88

(45) Vydáno 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

MOŽÍŠEK MAXMILIÁN RNDr. CSc., MOŽÍŠKOVÁ JARMILA, BRNO

(54) Hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítací krevních částic

(57) Řešení se týká složení hemolyzačního a konverzního roztoku pro velkokapacitní automatické počítací krevních částic a fotokolorimetrické stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu. Osmoticky vyvážený roztok obsahuje v jednom litru 0,1 až 0,8 g alkalického kyanidu, 0,05 až 0,6 g alkalického dusitanu, dusičnanu, chlorečnanu a/nebo bromičnanu, 5 až 20 g C₁₀ až C₁₈ alkyltrimethylamoniumbromidu, například tetradecyl- nebo hexadecyltrimethylamoniumbromidu, a 2 až 16 g oxyetylovaného C₈ až C₁₅ alkylfenolu, například oxyetylovaného nonyl- nebo decylfenolu, obsahujícího 50 až 60 % hmot. etylenoxidu. Optimální hodnota pH a stabilita vlastností roztoku je zajištěna přítomností 7 až 9 g chloridu sodného p. a., 0,3 až 1,0 g chloridu draselného p. a., 0,45 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 4,90 g hydrogenfosforečnanu dvojsodného v jednom litru roztoku.

Předmětem vynálezu je hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic a fotokolorimetrické stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu, obsahující alkalický kyanid, anorganické oxidační činidlo, hemolyzační činidlo ze skupiny halogenidů alkyltrimetylamonia a dále solubilizační a emulgační přísadu v osmoticky vyváženém tlumivém roztoku.

Měření počtu krevních částic spočívá nejčastěji na principu indikace změn vodivosti elektrolytu protékajícího kalibrovaným otvorem. V okamžiku průchodu částic, například erytrocytů nebo leukocytů, nastává zmenšení průřezu kalibrovaného otvoru, které je indikováno jako elektrický impuls. Tyto impulsy jsou po zesílení elektronicky sečítány za celou dobu průtoku konstantního objemu zředěné krve. Amplituda elektrických impulsů je přitom úměrná průřezu případně velikosti částice, takže tímto způsobem lze stanovit distribuci velikostí erytrocytů a leukocytů. Po hemolýze erytrocytů a kvantitativní konverzi hemoglobinu na hemiglobinkyanid (kyanmethemoglobin) se fotokolorimetricky nebo spektrofotometricky (v souladu s doporučením International Committee on the Standardization for Hematology) stanovuje také koncentrace hemoglobinu.

Komerční velkokapacitní plnoautomatické přístroje jsou řešeny tím způsobem, že samostatně zpracují odebrané vzorky krve. Například Coulter Counter Model S měří automaticky celkem 7 hodnot významných z hlediska hematologického vyšetření pacienta. Pro jedno takové měření je zapotřebí 1 ml krve, ze které přístroj odpipetuje objem pro následující automatické ředění krve ve dvou stupních isotonickým roztokem; po promíchání se v prvním modulu přístroje stanovují počty leukocytů a koncentrace hemoglobinu, druhý ve více naředěném vzorku krve stanoví počty erytrocytů a jejich střední objem. Každý z obou modulů je vybaven blokem tří spojených počítačích trubic s kalibrovaným otvorem. Soubor údajů je přiváděn do vyhodnocovacího bloku, kde se dále vypočítají hodnoty HCT, MCH a MCHC. Všechny sedm charakteristických údajů se poté vytiskne na identifikační kartu pacienta. Srovnatelné velkokapacitní počítače krevních částic s automatizovaným provozem vyráběné jinými firmami vycházejí ze stejného principu funkce. Technické možnosti dané rozsahem zkoušek hematologických charakteristik pacientů a jejich kapacita však mohou být do jisté míry rozdílné.

Všechny přístroje pro hodnocení hematologických údajů využívající změn vodivosti elektrolytu vyžadují k provozu speciální roztoky, jejichž vlastnosti, zvláště rychlost hemolýzy erytrocytů a rychlost konverze hemoglobinu na hemiglobinkyanid jsou přizpůsobeny časovému sledu jednotlivých fází pracovního cyklu. Hemolyzační a konverzní roztok přitom nesmí ovlivňovat objem leukocytů po hemolýze a musí zamezit agregaci stromat erytrocytů, popřípadě srážení proteinů krevní plazmy.

Souhrnně je možno požadavky vlastností hemolyzačního a konverzního roztoku pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic a stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu formulovat takto: rychlá hemolýza erytrocytů, osmotická vyváženost, vyloučení cizích suspendovaných částic, rychlá přeměna hemoglobinu na hemiglobinkyanid a stabilita vlastností v době skladování.

Průběh přeměny hemoglobinu na hemiglobinkyanid lze sledovat velmi dobře spektrofotometricky s využitím rychlého záznamu ve vymezeném rozsahu spektra. Nárůst koncentrace hemiglobinkyanidu účinkem hemolyzačního a konverzního roztoku hodnotíme podle absorpance při vlnové délce 540 nm.

Rychlost hemolýzy erytrocytů je závislá na volbě hemolyzující složky roztoku, kterou je obvykle některá z kvartérních amoniových solí, nejčastěji tetradecyltrimetylamoniumbromid, hexadecyltrimetylamoniumbromid, etylhexadecyldimetylamoniumbromid, popřípadě jejich směsi. Rychlost hemolýzy narůstá s koncentrací uvedených účinných látek v roztoku. Podle praktických zkušeností lze rychlost hemolýzy v požadovaném rozsahu regulovat volbou druhu a koncentrace kvartérních amoniových solí.

Velikost a stabilita rozměrů leukocytů po hemolýze erytrocytů účinkem hemolyzačního a

konverzního roztoku je závislá především na osmotických poměrech. Nezměněná velikost leukocytů je za předpokladu isotoničnosti zředěné krve podmíněna v zásadě hodnotou osmolality hemolyzačního a konverzního roztoku, která má být na úrovni 330 ± 10 mOsmol/l. Přílišné odchylky od stanovené osmolality roztoku se korigují obsahem osmoticky aktivních neutrálně reagujících anorganických solí, například chloridu sodného nebo chloridu draselného.

Reakce roztoku se má pohybovat v mírně alkalické oblasti s rozsahem hodnot pH mezi 7,5 až 9,0. Mírná alkalita hemolyzačního a konverzního roztoku je potřebná nejen z hlediska zajištění požadované reaktivity účinných složek, ale také proto, aby bylo zabráněno hydrolyze alkalických kyanidů spojené s únikem toxického HCN. Optimální hodnoty pH a současně stability vlastností hemolyzačního a konverzního roztoku pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic dosáhneme tím, že pro rozpouštění účinných látek zvolíme tlumivý roztok na bázi hydrogenfosforečnanu sodného.

Jestliže chceme získat počty leukocytů, které odpovídají skutečnosti, pak v naředěném roztoku krve a také použitím hemolyzačního a konverzního činidla nesmí být přítomny suspendované částice v takové míře, která by mohla ovlivnit naměřené hodnoty. Druh a také původ cizích částic může přitom být v zásadě dvojitý. Měření leukocytů v naředěném vzorku může nepříznivě ovlivnit agregace částic vznikajících rozpadem obalů erytrocytů (stromat). Jestliže použijeme vhodný tenzid jako solubilizátor, působí tento proti agregaci stromat a naopak účinně podporuje jejich další rozpad (stromatolýza). Jiným, mnohdy vydatným zdrojem suspendovaných částic v roztoku jsou nečistoty přítomné v použitých chemikáliích. Částice suspendované v samotném hemolyzačním a konverzním roztoku se odstraňují tlakovou ultrafiltrací přes membránové ultrafiltry s póry velikosti 0,2 až 0,6 μm . Ultrafiltrace připraveného roztoku je zařazena na závěr technologického postupu jeho výroby.

Z hlediska časového programu velkokapacitních automatických počítačů krevních částic a současně hemoglobinometrů je velmi důležitá rychlost oxidace hemoglobinu na hemiglobin, která musí odpovídat pracovnímu programu přístroje. Úplné konverze na hemiglobinkyanid musí být dosaženo v době před zahájením fotokolorimetrického měření jeho koncentrace. Oxidace hemoglobinu na hemiglobin probíhá již účinkem kvartérních amoniových solí, přičemž rychlost oxidace je pro jednotlivé typy odlišná. Proces oxidace je však třeba v zájmu zvýšení celkové rychlosti konverze zintenzívnit. Z těchto důvodů byl experimentálně sledován vliv přísady oxidačních činidel na rychlost konverze hemoglobinu na hemiglobin. Oxidovadla pro účely průzkumu byla vybrána tak, aby nedocházelo k ovlivnění ostatních popsanych funkcí hemolyzačního a konverzního roztoku a případnému poklesu jeho stability. Těmto požadavkům vyhověly zejména alkalické dusitany, dusičnany, chlorečnany a bromičnany, přidávané v množství 0,05 až 0,8 g/l roztoku. Příliš vysoký obsah oxidačních činidel může způsobit snížení stability hemolyzačního a konverzního roztoku a tím zkrácení doby jeho použitelnosti. Jako nejúčinnější se ukázala zejména přísada dusičnanu draselného nebo bromičnanu draselného v množství 0,1 až 0,3 g/l.

Reakcí s alkalickými kyanidy se hemiglobin dále převádí na hemiglobinkyanid (kyanmethemoglobin). Rychlost této reakce je úměrná především koncentraci přítomného alkalického kyanidu v roztoku. Z hlediska zachování příznivých hygienických pracovních podmínek v hematologických laboratořích je žádoucí obsah alkalických kyanidů v hemolyzačním a konverzním roztoku udržovat na co nejnížší úrovni, přípustné dosahovanou reaktivitou.

K uspokojení dané potřeby při respektování shora zmíněných požadavků směřuje hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic a fotokolorimetrické stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu, obsahující alkalický kyanid, anorganické oxidační činidlo, hemolyzační činidlo ze skupiny halogenidů alkyltrimetylamonia a dále solubilizační a emulgační přísadu v osmoticky vyváženém tlumivém roztoku, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že jeden litr hemolyzačního a konverzního roztoku obsahuje 0,1 až 0,8 g alkalického kyanidu, 0,05 až 0,6 g alkalického dusitanu, dusičnanu, chlorečnanu a/nebo bromičnanu, 5 až 20 g C_{10} až C_{18} alkyltrimetylamoniobromidu, například tetradecyl- nebo hexadecyltrimetylamoniobromidu a

2 až 16 g oxyetylovaného C_8 až C_{15} alkylfenolu, například oxyetylovaného nonyl- nebo decylfenolu, obsahujícího 50 až 60 % hmot. etylenoxidu.

Hemolyzační a konverzní roztok obsahuje dále v jednom litru

7 až 9 g chloridu sodného p. a.,
0,3 až 1,0 g chloridu draselného p. a.,
0,45 g dihydrogenfosforečnanu sodného a
4,90 g hydrogenfosforečnanu dvojsodného.

Tím je zaručeno jeho osmotické vyvážení, optimální hodnota pH a stabilita.

K přípravě hemolyzačního a konverzního roztoku podle vynálezu se používá uzavřené aparatury zhotovené z chemického skla, které má dostatečnou odolnost proti agresivním sloučeninám. Složky roztoku se rozpouštějí za stálého míchání v destilované nebo demineralizované vodě teploty 20 až 30 °C v pořadí uvedeném v jednotlivých příkladech provedení. Další chemikálie se přidává vždy až po úplném rozpuštění předchozí. Po zamíchání roztoku a 24hodinovém stání se provádí kontrolní měření hodnoty pH ($8,5 \pm 0,5$) a osmolality (330 ± 10 mOsmol/l). Odchytky od stanovených hodnot se korigují přísadou NaCl, KCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , případně destilované nebo demineralizované vody. Jako závěrečná operace je zařazena tlaková ultrafiltrace připraveného roztoku, jejíž výsledek se kontroluje měřením obsahu částic využitím automatických počítačů téhož principu a provedení, pro které je hemolyzační a konverzní roztok určen.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic a stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu se připraví postupným rozpouštěním níže uvedených substancí v destilované vodě:

NaCl p. a.	7,84 g
KCl p. a.	0,60 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,45 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	4,90 g
cetyltrimetylamoniumbromid č.	12,00 g
KNO_3	0,28 g
oxyetylovaný nonylfenol obsahující 50 % EO	10,00 g
KCN p. a.	0,33 g
destilovaná voda do	1 000,00 g

Po kontrole pH a osmolality a případně úpravě těchto hodnot se roztok zbaví suspendovaných částic dvojnásobnou tlakovou filtrací přes membránový filtr 0,45 μ m.

P ř í k l a d 2

Hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítače krevních částic a stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu se získá rozpouštěním jednotlivých chemikálií v uvedeném pořadí v destilované vodě:

NaCl p. a.	7,92 g
KCl p. a.	0,44 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,45 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	4,90 g
tetradecyltrimetylamoniumbromid č.	12,00 g
$NaNO_2$	0,25 g
oxyetylovaný decylfenol obsahující 50 % EO	10,00 g
KCN p. a.	0,33 g
destilovaná voda do	1 000,00 g

Po kontrole hodnot pH a osmolality se roztok zbaví suspendovaných částic dvojnásobnou tlakovou ultrafiltrací membránovým filtrem 0,45 μ m.

P ř í k l a d 3

Hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítáče krevních částic a stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu se získá postupným rozpouštěním níže uvedených chemikálií v destilované vodě:

NaCl p. a.	7,92 g
KCl p. a.	0,44 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,45 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	4,90 g
dodecyltrimetylamoniumbromid č.	12,00 g
KBrO ₃	0,25 g
oxyetylovaný nonylfenol obsahující 50 % EO	10,00 g
KCN p. a.	0,33 g
destilovaná voda	1 000,00 g

Připravený roztok se dále podrobí dvojnásobné tlakové ultrafiltraci membránovými filtry o velikosti pórů 0,45 μm .

Destilovanou vodu je možno ve všech uvedených příkladech provedení vynálezu nahradit vodou demineralizovanou.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Hemolyzační a konverzní roztok pro velkokapacitní automatické počítáče krevních částic a fotokolorimetrické stanovení hemoglobinu ve formě hemiglobinkyanidu, obsahující alkalický kyanid, anorganické oxidační činidlo, hemolyzační činidlo ze skupiny halogenidů alkyltrimetylamonia a dále solubilizační a emulgační přísadu v osmoticky vyváženém tlumivém roztoku, vyznačený tím, že jeden litr hemolyzačního a konverzního roztoku obsahuje

- 0,1 až 0,8 g alkalického kyanidu,
- 0,05 až 0,6 g alkalického dusitanu, dusičnanu, chlorečnanu a/nebo bromičnanu,
- 5 až 20 g C_{10} až C_{18} alkyltrimetylamoniumbromidu, například tetradecyl- nebo hexadecyltrimetylamoniumbromidu a
- 2 až 16 g oxyetylovaného C_8 až C_{15} alkylfenolu, například oxyetylovaného nonyl- nebo decylfenolu, obsahujícího 50 až 60 % hmot. etylenoxidu.

2. Hemolyzační a konverzní roztok podle bodu 1, vyznačený tím, že osmoticky vyvážený tlumivý roztok obsahuje v jednom litru

- 7 až 9 g chloridu sodného p. a.
- 0,3 až 1,0 g chloridu draselného p. a.
- 0,45 g dihydrogenfosforečnanu sodného a
- 4,90 g hydrogenfosforečnanu dvojsodného.