



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224403

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 13 08 81

(21) (PV 6062-81)

(40) Zveřejněno 25 03 83

(45) Vydáno 01 12 85

(51) Int. Cl.³

G 01 N 15/07

(G 01 N 15/07,
33/50)

(75)

Autor vynálezu

MOŽÍŠKOVÁ JARMILA, MOŽÍŠEK MAXMILIAN RNDr. CSc.,
OLOMOUC

(54) **Koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok pro stanovení leukocytů automatickými počítači a hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu**

Vynález se týká koncentrovaného hemolyzačního a transformačního roztoku určeného pro stanovení leukocytů automatickými počítači a pro fotokolorimetrické měření hemoglobinu ve formě kyanmethemoglobinu v naředěném vzorku krve.

K detekci krevních částic a měření jejich objemů se u samočinných počítačů využívá impulsů, vznikajících změnou elektrické vodivosti sloupce krve zředěné isotonickým roztokem chloridu sodného a proudící kapilárou v okamžiku průchodu částice kalibrováním otvorem. Odlišný a méně častý princip funkce vychází z fotoelektrické registrace světelných impulsů v důsledku odstínění nebo odrazu koherentního záření laseru na procházejících částicích zředěné krve. Metodický postup stanovení počtu krevních částic, včetně doporučení vhodných činidel, je předepsán výrobcí samočinných počítačů.

Obsah hemoglobinu se měří fotokolorimetricky nejlépe v tomtéž naředěném vzorku krve, po konverzi hemoglobinu na kyanmethemoglobin. Rozhodnutím International Committee of Standardization in Haematology byla kyanmethemoglobinová metoda doporučena pro stanovení hemoglobinu v mezinárodním měřítku.

Kyanmethemoglobin (hemiglobinkyanid) je stabilní charakteristicky zabarvená sloučenina, poskytující široké absorpční spektrum s vrcholem při

vlnové délce 540 nm, která je vhodná pro fotokolorimetrii. Dlouhodobá stabilita extinkce připravených roztoků kyanmethemoglobinu umožňuje porovnání výsledků různých pracovišť a zhotovení normálů pro standardizaci.

Stanovení erythrocytů a leukocytů s využitím samočinných počítačů a hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu ve zbylém objemu naředěného vzorku krve má vzhledem k vysoké efektivnosti přednost před ostatními postupy. Tato racionální metodika však vyžaduje hemolyzační a transformační roztok o vysoké účinnosti, dlouhodobé skladovatelnosti a stabilitě. Mezi hlavními požadavky je třeba uvést minimální dávkování činidla do vzorku krve předepsaného zředění, neměřitelnou absorpci činidla v oblasti vlnové délky 540 nm, nepřítomnost pevných suspendovaných částic větších než 2 nm, rychlou hemolýzu erythrocytů před měřením leukocytů samočinnými počítači a zachování původního objemu leukocytů. Roztok činidla musí dále zabezpečit transformaci na kyanmethemoglobin do dvou minut s rezervou pro případy zvýšeného obsahu hemoglobinu v krvi pacientů, zabránit koagulaci proteinů krevní plasmy a srážení lipidů, vyloučit agregaci stromat erythrocytů a vznik opalescence i po dlouhé době skladování fotokolorimetricky proměřených vzorků kyanmethemoglobinu.

Hemolyzační a transformační koncentrované roztoky pro uvedené účely jsou dodávány výrobcí samočinných počítaců krevních částic. Jak bylo zjištěno, dochází často skladováním komerčních roztoků ke žloutnutí, které je zřejmě způsobeno oxidací alkalických kyanidů na dikyan. Tyto změny mají za následek pokles reaktivity a zvýšení extinkce v oblasti vlnové délky 540 nm, tedy v místě absorpčního maxima, příslušejícího kyanmethemoglobinu po přidání činidla, a tím systematickou odchylku naměřených hodnot. Za běžných teplot prostředí byla rovněž v řadě případů pozorována tvorba krystalů v nasyceném roztoku činidla s nepříznivými důsledky pro jeho funkci. Hemolyzačně-transformační koncentrované roztoky výrobců samočinných počítaců činí jejich využití závislým na zahraničních dodávkách a vysoká cena nepříznivě ovlivňuje ekonomiku provozu hematologických laboratorí.

Zmíněné nevýhody odstraňuje koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok pro stanovení leukocytů automatickými počítacími a hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu, jehož podstata spočívá podle vynálezu v tom, že v redestilované vodě obsahuje 5 až 80 g/l hemolyzačních a současně oxidačních činidel ze skupiny alkytrimethylamoniumhalogenidů, například dodecyltrimethylamoniumbromid, tetradecyltrimethylamoniumbromid a/nebo hexadecyltrimethylamoniumbromid; 5 až 80 g/l neionogenního tensidu jako solubilizátoru hemolyzačního činidla, proteinů a lipidů krevní plazmy, například oxyethylované nasycené alifatické alkoholy s počtem C od 10 do 20 a/nebo oxyethylované estery nasycených alifatických monokarboxylových kyselin s počtem C od 10 do 20; 0,6 až 10 g/l alkalického kyanidu, přeměňujícího hemoglobin na hemiglobinkyanid.

S výhodou může roztok podle vynálezu obsahovat 5 až 50 g/l alifatického alkoholu, například izopropylalkoholu nebo izobutylalkoholu, jako odpěňovací přísadu.

Mezi výhody navrhovaného řešení patří nepřítomnost měřitelného zbarvení roztoku v oblasti vlnové délky 540 nm i po dlouhodobém skladování, vysoká reaktivita, a tím rychlá oxidace hemoglobinu a přeměna na hemiglobinkyanid za 1 až 2 min., při dávkování 0,5 %, tj. 3 kapky na 10 ml vzorku krve ředěného pro samočinný počítáč Coulter Counter DN nebo FN a s dostatečnou rezervou pro zvýšený obsah hemoglobinu v krvi. Pro počítáč Coulter Counter typu S je předepsáno jiné dávkování.

Další předností roztoku podle vynálezu je skutečnost, že jeho komponenty nezpůsobují oxidaci alkalického kyanidu na dikyan, a tím zbarvování do žluta ani po dlouhé době.

Tím je vyloučen pokles reaktivity a chybné čtení extinkcí ve fotokolorimetrickém stanovení hemoglobinu. Vzhledem k přítomnosti solubilizátoru nedochází ani dlouhodobým skladováním při různých teplotách prostředí ke vzniku zákalu vysrážením rozpuštěných substancí. Solubilizační přísada

má rovněž antiflokulační účinek pro stromata erythrocytů.

Roztok podle předloženého popisu lze připravit za podstatně výhodnějších cenových relací než srovnatelné zahraniční výrobky. Tím se také dosáhne zlepšení provozní ekonomiky hematologických pracovišť vybavených samočinnými počítacími.

V průběhu vývoje a pro účely ověření funkce hemolyzačního a transformačního roztoku podle vynálezu v provozu hematologické laboratoře bylo ke stanovení počtu leukocytů využíváno počítaců Coulter Counter typů DN a FN; rozsáhlý soubor hodnot byl statisticky vyhodnocen a prokázány výhodné užitné vlastnosti roztoku podle vynálezu. Kinetika oxidace hemoglobinu a transformační reakce na hemiglobinkyanid byla studována spektrofotometricky přístrojem UNICAM SP.800 za různých koncentrací hemolyzačně-transformačního roztoku. Laboratorní stanovení hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu bylo odzkoušeno s dobrými výsledky na fotokolorimetrech Linson Junior, Linson LK 540 a Hemoglobinometer Coulter. Bylo zjištěno, že v průběhu jednoletého skladování se užitné vlastnosti roztoku nemění, stárnutím se jeho funkce naopak stabilizuje.

Příprava koncentrovaného hemolyzačního a transformačního roztoku pro stanovení leukocytů automatickými počítacími a pro stanovení hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu vysvítá z dále uvedených příkladů.

Příklad 1

Koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok se připraví postupným rozpouštěním 30 g oxyethylovaného vyššího mastného alkoholu s obsahem 75 % ethylénoxidu, 30 g hexadecyltrimethylamoniumbromidu a 3 g kyanidu draselného v 800 ml redestilované vody o teplotě 35 až 40 °C za stálého míchání. Po ochlazení na teplotu asi 20 °C se roztok doplní na objem 1000 ml a přefiltruje membránovým filtrem hustoty 2 až 4 nm. Podle výsledků kontrolních měření se upraví jeho hodnota pH, osmolalita a opakuje filtrace. Koncentrovaný hemolyzačně-transformační roztok se plní do zásobních kapacit lahvíček z plastické hmoty a přechovává při teplotě místnosti. Osvětlení rozptýleným umělým či denním světlem není na závadu. Lahvičky je třeba po odměření potřebného objemu těsně uzavřít.

Příklad 2

Koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok se získá rozpouštěním 30 g oxyethylovaného vyššího mastného alkoholu s obsahem 75 % ethylénoxidu, 10 g dodecyltrimethylamoniumbromidu, 20 g hexadecyltrimethylamoniumbromidu a 3 g kyanidu draselného v redestilované vodě o teplotě 35 až 40 °C. Po ochlazení na teplotu 20 °C se objem roztoku doplní na 1000 ml a přefiltruje

membránovým filtrem hustoty 2 až 4 nm. Po ověření vlastností, úpravě hodnoty pH, osmolality

a opakované filtrací se plní do zásobních lahviček s dobře těsnícím uzávěrem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok pro stanovení leukocytů automatickými počítacími a hemoglobinu fotokolorimetricky ve formě kyanmethemoglobinu v naředěném vzorku krve, vyznačený tím, že v redestilované vodě obsahuje 5 až 80 g/l hemolyzačních a současně oxidačních činidel ze skupiny alkyltrimethylamoniumhalogenidů, například dodacyltrimethylamoniumbromid, tetradecyltrimethylamoniumbromid a/nebo hexadecyltrimethylamoniumbromid, 5 až 80 g/l neionogenního tensidu jako solubilisátoru

hemolyzačního činidla, proteinů a/nebo lipidů krevní plasmy, například oxyethylované nasycené alifatické alkoholy o počtu C od 10 do 20, a/nebo oxyethylované estery nasycených alifatických monokarboxylových kyselin s počtem C od 10 do 20, 0,6 až 10 g/l alkalického kyanidu.

2. Koncentrovaný hemolyzační a transformační roztok podle bodu 1, vyznačený tím, že jako přísadu potlačení vzniku vzduchových bublinek obsahuje 5 až 50 g/l alifatického alkoholu, například izopropylalkoholu nebo izobutylalkoholu.