



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>: G 01 N 33/96  
G 01 N 33/86



**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

**622 101**

<p>⑳ Gesuchsnummer: 16842/75</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 29.12.1975</p> <p>㉓ Priorität(en): 31.12.1974 DE 2461969</p> <p>㉔ Patent erteilt: 13.03.1981</p> <p>㉕ Patentschrift veröffentlicht: 13.03.1981</p>	<p>㉗ Inhaber: Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn (DE)</p> <p>㉘ Erfinder: Dr. Norbert Heimburger, Marburg/Lahn (DE) Dr. Axel Sieber, Marburg/Lahn (DE) Dr. Horst Schwinn, Marburg-Michelbach (DE)</p> <p>㉙ Vertreter: Brühwiler &amp; Co., Zürich</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

⑤④ **Lyophilisiertes, nicht für therapeutische Zwecke bestimmtes, Blutplasma.**

⑤⑦ Als Vergleichsplasma für Gerinnungsuntersuchungen in der Diagnostik verwendbares lyophilisiertes Blutplasma, das sich durch eine sehr gute Stabilität auszeichnet, wird unter einer Schutzgasatmosphäre, die mindestens 5% Kohlendioxid enthält, aufbewahrt und zur Verwendung bereit gestellt.

Dieses Blutplasma enthält in der Regel ein Antikoagulans sowie gegebenenfalls noch kolloid-stabilisierende Zusätze.

### PATENTANSPRÜCHE

1. Lyophilisiertes, nicht für therapeutische Zwecke bestimmtes, Blutplasma unter einem Schutzgas, dadurch gekennzeichnet, dass das Schutzgas mindestens 5% Kohlendioxid enthält.

2. Lyophilisiertes Blutplasma nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es Antikoagulans und kolloid-stabilisierende Zusätze enthält.

3. Verfahren zur Herstellung eines lyophilisierten Blutplasmas nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man 10 lyophilisiertes Blutplasma mit einem mindestens 5% Kohlendioxid enthaltenden Schutzgas in einem Gefäss einschliesst.

4. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein durch kolloid-stabilisierende Zusätze stabilisiertes Blutplasma verwendet.

5. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man frisch gewonnenes Blut zu einer vorgelegten Menge eines Antikoagulans gibt, das Blut zentrifugiert, das Plasma gewinnt, gegebenenfalls mit kolloid-stabilisierenden Zusätzen versetzt, in ein nicht benetzbares Gefäss einfüllt, unter Ausbildung einer grossen Oberfläche einfriert, lyophilisiert, das Gefäss evakuiert, ein mindestens 5% Kohlendioxid enthaltendes Schutzgas einbringt und das Gefäss unter diesem Schutzgas verschliesst.

6. Verwendung des lyophilisierten Blutplasmas nach Patentanspruch 1 als Vergleichsplasma bei Gerinnungsuntersuchungen.

Die Erfindung betrifft ein lyophilisiertes Blutplasma, das hinsichtlich seiner Gerinnungseigenschaften in für Gerinnungsuntersuchungen geeigneten Testsystemen ein weitgehend unverändertes Verhalten zeigt und demzufolge als Standardplasma für Gerinnungsuntersuchungen geeignet ist, ein Verfahren zu dessen Herstellung und seine Verwendung als Vergleichsplasma bei Gerinnungsuntersuchungen in der Diagnostik.

Eine auffallende Eigenschaft des Blutes nach dessen Austritt aus Gefässen ist seine Gerinnung. Es zeigt sich jedoch auch, dass die Gerinnungszeiten von Patienten mit bestimmten Erkrankungen von denen gesunder Normalpersonen abweichen. Diese Abweichungen können auch durch bestimmte Pharmaka gezielt herbeigeführt werden. Dazu ist bekannt, dass die Blutgerinnung aus dem Zusammenwirken verschiedener aktivierender und inhibierender Faktoren resultiert. Die Gerinnungsfaktoren sind mehr oder weniger empfindlich und ihre Lagerung ohne Aktivitätsverlust ist mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Insbesondere zeigt es sich, dass gelagerte Blutplasmen hinsichtlich ihrer Gerinnungsparameter sehr bald Veränderungen erfahren. Bei der diagnostischen Überwachung des Gerinnungsstatus ist es erforderlich, die in den einzelnen Blutgerinnungstests erhaltenen Werte mit bestimmten Normalwerten in Beziehung zu setzen. Als Bezugssystem eignet sich beispielsweise ein Mischplasma von mehreren gesunden Blutspendern, das jeweils möglichst gleichzeitig mit dem Plasma des Probanden gewonnen wird. Ein solches Vorgehen ist in diagnostischen Laboratorien nicht immer praktikabel.

Es stellt sich deshalb die Aufgabe, ein lagerfähiges Blutplasma herzustellen, das hinsichtlich der für den Gerinnungsstatus wichtigen Faktoren eine gute Stabilität aufweist. Wichtige Gerinnungsparameter sind hierbei die Einphasengerinnungszeit nach Quick, die partielle Thromboplastinzeit, die Plasmathrombinzeit, die Gerinnungsfaktoren II, V, X und XIII und schliesslich Fibrinogen.

Es ist bekannt, dass frisch gewonnenes Plasma von gesun-

den Spendern im Hinblick auf die Gerinnungseigenschaften die Kriterien für ein Bezugssystem bei Gerinnungsuntersuchungen ausreichend erfüllt. Es ist gleichfalls bekannt, dass ein Plasma durch Lyophilisation auch in Bezug auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren stabilisiert werden kann. Doch hat es sich auch bei den lyophilisierten Plasmen gezeigt, dass sich ihre Gerinnungsparameter im Laufe der Zeit in unterschiedlicher Weise verändern. Dies hat dazu geführt, dass lyophilisierte Plasmen, die als Bezugsgrössen bei Gerinnungsuntersuchungen Verwendung finden können, nicht für alle der oben angeführten Gerinnungsparameter einzusetzen sind. Insbesondere hat es sich erwiesen, dass die Plasmathrombingerinnungszeit der wieder aufgelösten lyophilisierten Plasmen bereits zu einer Zeit nicht mehr mit den von Normalplasma zu erhaltenden Werten übereinstimmt, wenn die übrigen Gerinnungsfaktoren noch ein relativ gute Übereinstimmung mit Normalwerten zeigen.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass ein lyophilisiertes Blutplasma, das unter einem Schutzgas gelagert wird, mindestens in Bezug auf die folgenden zu nennenden Gerinnungsparameter stabil bleibt, wenn das Schutzgas mindestens 5%, vorzugsweise 10 bis 50%, Kohlendioxid enthält. Die in Frage kommenden Gerinnungsparameter sind insbesondere Quickzeit, partielle Thromboplastinzeit, Plasmathrombingerinnungszeit, die Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), V (Akzellerin), X (Stuart-Prower-Faktor), XIII (fibrinstabilisierender Faktor) und Fibrinogen.

Gegenstand der Erfindung ist demnach ein lyophilisiertes, nicht für therapeutische Zwecke bestimmtes, Blutplasma unter einem Schutzgas, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Schutzgas mindestens 5%, vorzugsweise 10 bis 50%, Kohlendioxid enthält.

Als weitere Bestandteile, die das Schutzgas neben Kohlendioxid enthalten kann, kommen die für diesen Zweck bekannten Gase in Frage. Dies sind ganz allgemein inerte Stoffe, die bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in gasförmiger Phase vorliegen. Zu diesen Gasen gehört in erster Linie Stickstoff, aber auch andere inerte Gase, z. B. Edelgase, wie Helium, Neon oder Argon. Daneben enthält das Blutplasma in der Regel noch ein Antikoagulans zur Verhinderung der Gerinnung des Blutes, z. B. Oxalat- oder Citrationen. Diese Ionen werden allgemein in einer bei der Plasmage-

winnung üblicherweise angewandten Konzentration eingesetzt, und zwar wird bevorzugt etwa 1 Teil Antikoagulans auf 9 Teile Blut verwendet. Daneben können gegebenenfalls noch kolloid-stabilisierende Zusätze hinzugefügt werden. Geeignete kolloid-stabilisierende Zusätze sind z. B. niedermolekulare Kohlehydrate, die in der Regel in einer Konzentration von 1 bis 5% eingesetzt werden.

Das erfindungsgemässe lyophilisierte Blutplasma wird mit Hilfe des in Patentanspruch 3 definierten Verfahrens hergestellt. Besonders bevorzugt ist dabei die in Patentanspruch 5 definierte Ausführungsform.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens geht man zweckmässigerweise so vor, dass man frisch gewonnenes Blut zu einer vorgelegten Menge eines Antikoagulans gibt, wobei im Falle der Verwendung von Citrat beispielsweise 1 Volumenteil einer 0,1-molaren Natriumcitratlösung von pH 7,0 mit 9 Volumenteilen des frisch gewonnenen Blutes vermischt wird. Das Blut wird zentrifugiert, beispielsweise bei  $7500 \pm 500 \text{ g}$  20 bis 40 min, vorzugsweise 30 min, und das über den Blutkörperchen stehende Plasma abgossen und gegebenenfalls mit stabilisierenden Substanzen versetzt. Das Plasma wird danach in nicht benetzbare, vorteilhaft in silikonisierte, Glasgefässe oder entsprechende Kunststoffgefässe gefüllt, wobei darauf geachtet wird, dass die eingefüllte Plasmamenge nur etwa  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{10}$  des Gesamtvolumens des Gefässes füllt. Das Plasma wird in den Gefässen mit möglichst grosser Oberfläche eingefroren – dies kann vorteilhaft durch rotierendes Einfrieren erreicht werden – und schliesslich getrocknet. Die das

getrocknete Plasma enthaltenden Gefässe werden evakuiert, wobei es sich als vorteilhaft erweisen hat, ein Vakuum von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  Torr anzulegen und die Plasmen 2 bis 5 Stunden, vorzugsweise 3 bis 4 Stunden, im Vakuum zu belassen, anschliessend den luftleeren Raum mit einem Kohlendioxid enthaltenen Schutzgas zu füllen und schliesslich die Gefässe luftdicht abzuschliessen.

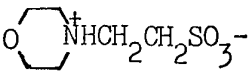
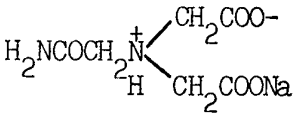
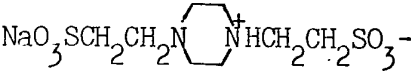
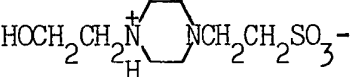
Bekanntlich ist der Gerinnungsmechanismus bei allen Wirbeltieren grundsätzlich ähnlich, so dass kein Hinderungsgrund besteht, entsprechend dem beabsichtigten Verwendungszweck jedes Blutplasma von Wirbeltieren in der beschriebenen Form hinsichtlich der Gerinnungsparameter zu stabilisieren. In der klinischen Diagnostik besteht jedoch ein Bedarf an menschlichen Plasmen mit standardisierten Gerinnungsparametern, so dass als Ausgangsmaterial für das lyophilisierte Plasma gemäss der vorliegenden Erfindung vorzugsweise menschliche Blutplasmen verwendet werden. Insbesondere werden von gesunden Spendern erhaltene Blutplasmen vermischt und erfindungsgemäss stabilisiert. Es besteht jedoch kein Hinderungsgrund, Plasmen von Probanden mit definierten Gerinnungsstörungen in der gleichen Weise aufzuarbeiten, um als ein stabiles Bezugssystem für die Bestimmung bzw. den Nachweis von entsprechender Gerinnungsstörung verwendet werden zu können.

Es wurden schon bisher den Blutplasmen bzw. Seren stabilisierende Substanzen zugesetzt, insbesondere zur Stabilisierung

der Blutplasmaproteine, vorzugsweise in Form von niedrigmolekularen Kohlenhydraten.

Es hat sich auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung als zweckmässig erwiesen, derartige Verbindungen zuzusetzen. Es muss jedoch dabei darauf geachtet werden, dass die verwendeten Stoffe das Gerinnungssystem nicht beeinflussen. Unter diesem Gesichtspunkt sind als stabilisierende Substanzen vorteilhaft neutrale Kohlenhydrate in einer Konzentration bis zu 5 Gew.-% den zu lyophilisierenden Plasmen zuzusetzen. Besonders geeignet sind beispielsweise Saccharose und Lactose, die einzeln oder zusammen 1-2% im Plasma vorhanden sein können. Zudem hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Plasma Puffersubstanzen zuzusetzen, die das flüssige Plasma auf einen pH-Wert zwischen etwa 7,1 und 7,2 einzustellen vermögen, wobei auch hier darauf zu achten ist, dass Puffersubstanzen gewählt werden, die in der erforderlichen Menge das Gerinnungssystem im vorliegenden Plasma nicht beeinflussen, keine Komplexbildung eingehen und  $pK_a$ -Werte von etwa 6 bis 8,5 besitzen. Von den diesbezüglichen von N. E. Good et al. 1966 (Biochemistry 5, 467-477) vorgeschlagenen Puffern, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind und die in biochemischen Systemen ein weitgehend indifferentes Verhalten zeigen, hat sich beispielsweise der N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthansulfonsäure-(Hepes)-Puffer in einer Konzentration bis zu 0,01 M als günstig erwiesen.

Tabelle

Chemische Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Formel
2-(N-Morpholino)-äthansulfonsäure	MES	
N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure	ADA	
Piperazin-N,N'-Bis(2-äthansulfonsäure)	PIPES	
N-(2-Acetamido)-2-aminoäthansulfonsäure	ACES	$H_2NCOCH_2N^+H_2CH_2CH_2SO_3^-$
(2-Aminoäthyl)trimethylammoniumchlorid-Cholaminchlorid hydrochlorid		$(CH_3)_3N^+-CH_2CH_2NH_2Cl^-$
N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)-2-aminoäthansulfonsäure	BES	$(HOCH_2CH_2)_2N^+HCH_2CH_2SO_3^-$
N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoäthansulfonsäure	TES	$(HOCH_2)_3N^+HCH_2CH_2SO_3^-$
N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure	HEPES	

Chemische Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Formel
N-(2-Acetamido)glycin	Acetamidoglycin	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin	Tricin	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
Glycinamid-hydrochlorid	Glycinamid	$\text{H}_2\text{NCOH}_2\text{NH}_2$
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
N,N-Bis(hydroxyäthyl)glycin	Bicin	$(\text{HOCH}_2)_2\text{N}^+\text{HCH}_2\text{COO}^-$
Glycylglycin	Glycylglycin	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$

Die Schwierigkeit bei Puffersätzen ist u. a. auch dadurch gegeben, dass der Pufferzusatz in fester Form eine lokale Verschiebung des pH-Wertes im Plasma mit der Folge der Störung des Gerinnungssystems bewirkt, wohingegen der Zusatz des Puffers in gelöster Form eine unzulässige Verdünnung des Plasmas verursacht.

Das unter einem Kohlendioxid enthaltende Schutzgas aufbewahrte Blutplasma wird wegen seiner Stabilität als Vergleichsplasma bei Gerinnungsuntersuchungen verwendet, insbesondere zur Bestimmung des Quickwertes der partiellen Thromboplastinzeit, der Plasmathrombingerinnungszeit, der Gerinnungsfaktoren II, V, XIII und des Fibrinogens. Die Bestimmungsmethoden werden beispielsweise nach folgenden Verfahren vorgenommen:

#### 1. Quickwert:

1 Teil einer Natriumzitratlösung von 0,1 M pro Liter und einem pH-Wert von 4,5-7 wird mit 9 Teilen Venenblut des Probanden sorgfältig unter Vermeidung von Schaumbildung vermischt und 10 min bei etwa 3000 UpM entsprechend 1500 x g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wird abgegossen und bis zur Durchführung des Testes bei 4 °C aufbewahrt. Zu 0,1 ml des auf 37 °C vorgewärmten Plasmas werden 0,2 ml einer ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten Calciumthromboplastinlösung zugegeben und mit Hilfe von bekannten Verfahren zur Bestimmung der Zeit bis zum Eintreten der Gerinnung beobachtet, beispielsweise nach der Häkchen-Methode, Kugel-Methode, Kipp-Methode oder mit automatischen Koagulometern. Die gefundene Gerinnungszeit wird anhand einer vorher zu erstellenden Standardkurve unter Verwendung des erfindungsgemäss aufbewahrten oder eines frisch gewonnene Blutplasmas in Beziehung gesetzt. Die Norm des Quickwertes liegt bei Normalplasmen, die entweder frisch gewonnen werden oder erfindungsgemäss aufbewahrt werden, bei 12-16 Sekunden für unverdünnt eingesetztes Plasma.

Die Bestimmung des Quickwertes ist ein Suchtest für Mangelzustände der am exogenen Gerinnungssystem beteiligten Faktoren VII, X, V, II und I.

#### 2. Partielle Thromboplastinzeit:

Bei der Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit wird das Plasma in der gleichen Weise wie für die Quickzeit gewonnen und gleiche Teile (0,2 ml) des Plasmas und 0,2 ml einer Suspension von gewaschenen Humanthrombozyten mit einem Zusatz von Kaolin werden 2 min bei 37 °C inkubiert. Zu 0,2 ml des Inkubationsgemisches wird eine 0,025 molare Calciumchloridlösung hinzugefügt und der Zeitpunkt des Gerinnungseintritts wie in der bei der Quickzeit beschriebenen

Weise ermittelt. Die partielle Thromboplastinzeit zeigt Normalwerte zwischen 40 und 60 Sekunden. Gerinnungszeiten, die 55 Sekunden überschreiten, deuten auf Gerinnungsstörungen hin und erfordern detaillierte Untersuchungen insbesondere der Faktoren VIII und IX.

#### 3. Plasmathrombingerinnungszeit:

Zur Bestimmung der Plasmathrombingerinnungszeit wird Zitratplasma wie bei der Bestimmung der Quickzeit beschrieben mit dem gleichen Volumen einer Lösung, die 6 Einheiten Thrombin pro ml enthält, inkubiert und die Gerinnungszeit in gewohnter Weise bestimmt. Die Normalwerte für die Plasmathrombingerinnungszeit liegen zwischen 17 und 24 Sekunden. Die Plasmathrombingerinnungszeit dient vor allem der Überwachung einer Streptokinase- oder Heparin-Therapie. Bei einer Streptokinase-Therapie werden Gerinnungszeiten in diesem Testsystem zwischen 34 und 96 Sekunden registriert, während eine Heparin-Therapie die Gerinnungszeit von 34 bis 110 Sekunden verlängert.

#### 4. Gerinnungsfaktoren II und V:

Die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren II und V kann in der Regel zusammen erfolgen. Dazu wird das zu testende Plasma in der gleichen Weise wie bei der Quickwert-Bestimmung gewonnen und das Plasma mit dem gleichen Volumen (0,1 ml) eines Faktor-II- bzw. Faktor-V-Mangelplasmas inkubiert. Wie bei der Quickwert-Bestimmung wird zu beiden Mischungen jeweils 0,2 ml Calciumthromboplastinlösung zugegeben und die Gerinnungszeit anschliessend in gewohnter Weise bestimmt. Die gemessene Gerinnungszeit ist den Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren II und V proportional. Der Gehalt der Gerinnungsfaktoren wird an einer Bezugskurve abgelesen, die mit frischem oder erfindungsgemäss aufbewahrt Normalplasma erstellt worden ist. Die Bestimmung der Konzentration des Gerinnungsfaktors II dient der detaillierten Erfassung von Prothrombin-Mangelzuständen, während die des Faktors V beim Verdacht auf Parahämophilie angezeigt ist.

#### 5. Gerinnungsfaktor X:

Die Bestimmung des Gerinnungsfaktors X erfolgt gleichfalls mit dem auch bei der Bestimmung der Quickzeit verwendeten Zitratplasma, welches in einer Verdünnung von 1:20 mit dem gleichen Volumen (0,1 ml) eines Faktor-X-Mangelplasmas und einer Lösung von Schlangengift-Thromboplastin 30 Sekunden bei 37 °C inkubiert, danach 0,1 ml einer 0,025 molaren Calciumchloridlösung zugegeben und die Gerinnungszeit in gewohnter Weise bestimmt wird. Die resultierende Gerin-

nungszeit ist der Faktor-X-Konzentration des zu prüfenden Plasmas proportional. Der Faktor-X-Gehalt wird an einer Bezugskurve abgelesen, die mit Hilfe eines frisch gewonnenen Mischplasmas von Normalpersonen oder eines erfindungsgemäss aufbewahrten Plasmas erhalten wurde.

#### 6. Gerinnungsfaktor XIII:

Bei der Bestimmung des Faktors XIII wird die Gewinnung des Zitratplasmas in Gegenwart eines polyvalenten Proteinaseinhibitors von 2,5 Antiplasmin-Einheiten pro ml Blut vorgenommen. Für die Durchführung der Bestimmung werden benötigt ein Antifaktor-XIII-Serum, das in einer Reihenverdünnung angesetzt mit Plasma 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wird. Sodann wird zu jeder Inkubationsmischung Antiserum mit Plasma, Thrombin und Calciumchlorid zugesetzt und das Gerinnselbildung bleiben die Ansätze etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen. Durch Zusatz einer 1%igen Monochloressigsäurelösung zu jeder Inkubationsmischung wird diejenige Plasmaverdünnung ermittelt, bei der sich das Gerinnsel in der Monochloressigsäure gerade noch gelöst hat. Die Menge des Faktors XIII in dem zu bestimmenden Plasma wird mit der Menge in Beziehung gesetzt, die sich bei der Bestimmung des Faktors XIII in Normalplasmen ergibt, die frisch gewonnen oder erfindungsgemäss gelagert werden können.

#### 7. Fibrinogen:

Die Bestimmung des Fibrinogens erfolgt gleichfalls unter Verwendung von Zitratplasma, das mit Thrombin zum Gerinnen gebracht wird. Das dabei entstehende Gerinnsel wird durch Zentrifugation bei 45 000 UpM als Sediment gewonnen. Der Überstand wird abdekantiert, das Sediment mehrfach mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und schliesslich im Vakuum getrocknet. über eine Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl wird auf den Eiweissgehalt des Gerinnsels in mg umgerechnet, der als Fibrinogen angegeben wird. Auch hierbei dient der Fibrinogengehalt des erfindungsgemäss gelagerten Normalplasmas als Bezugssystem.

Die Erfindung soll am nachstehenden Beispiel näher erläutert werden.

Beispiel:

Zu 50 ml einer Zitratpufferlösung mit einem Gehalt von 0,1 M/l Natriumzitrat und einem pH-Wert von 7,0, die steril und frei von Konservierungsmitteln ist, lässt man 450 ml Venenblut eines gesunden Spenders vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung zulaufen und mischt die beiden Bestandteile sorgfältig. Das Zitratblut wird bei 8000 g 30 min lang zentrifugiert und das Plasma abgehebert. Das Plasma wird mit dem auf die gleiche Weise gewonnenen Zitratplasma von 9 weiteren Spendern vermischt, so dass ein Pool von insgesamt 10 gesunden Blutspendern resultiert. Zu der Plasmamischung wird Lactose und Saccharose jeweils bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. Ferner wird mit einem Zusatz von 4 g N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthansulfonsäure (HEPES) pro Liter Plasma, der pH-Wert des Plasmas auf 7,1 eingestellt. Die Plasmamischung wird danach in 1,0 ml Portionen in Gefässen mit einem Gesamtinhalt von 6,5 ml abgefüllt und im Block eingefroren. Das eingefrorene Plasma wird in einer Lyophilisationsanlage getrocknet. Anschliessend wird ein Vakuum von  $5 \times 10^{-4}$  Torr erzeugt. Die lyophilisierten Plasmen verbleiben in diesem Vakuum 3 Stunden. Danach lässt man in den evakuierten Raum Kohlendioxidgas bis zum Ausgleich auf Atmosphärendruck einströmen. Die Gefässe werden schliesslich luftdicht verschlossen.

Eine Qualitätsprüfung von 5 willkürlich herausgegriffenen Mustern ergab im Durchschnitt für die Quickzeit 12,0 Sekunden, die partielle Thromboplastinzeit 41,8 Sekunden und für die Plasmathrombingerinnungszeit 19,4 Sekunden. Es hat sich gezeigt, dass diese Werte nach einigen Monaten Lagerung selbst bei 37 °C kaum verändert sind und bei einer Lagerung bei 4 °C über mehr als 3 Jahre nur unwesentliche Abweichungen erwarten lassen.

In den evakuierten Raum kann statt Kohlendioxid eine Mischung von 50% Kohlendioxid mit 50% Stickstoff (v:v) oder eine Mischung von 5% Kohlendioxid und 95% Stickstoff eingefüllt werden, wobei beispielsweise der Stickstoff durch ein internes stabiles Edelgas wie Helium, Neon oder Argon mit dem Kohlendioxid gemischt, ersetzt werden kann.