

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D417/06

C07D413/06

C07D401/06 G01N 33/48

G01N 33/50

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96122614.5

[45] 授权公告日 2002 年 5 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1083839C

[22] 申请日 1996.10.4 [24] 颁证日 2002.5.1

[21] 申请号 96122614.5

[30] 优先权

[32] 1995.10.6 [33] JP [31] 260346/95

[73] 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本神户市

[72] 发明人 赤井保正 坂田孝 宫崎公德

[56] 参考文献

US4386146 1983. 5.31 G03G5/09

US4937198 1990. 6.26 G01N33/80

审查员 田 欣

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

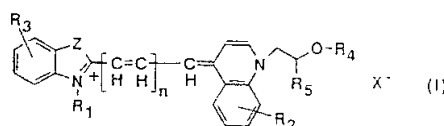
代理人 段承恩

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 12 页

[54] 发明名称 新化合物及其用途

[57] 摘要

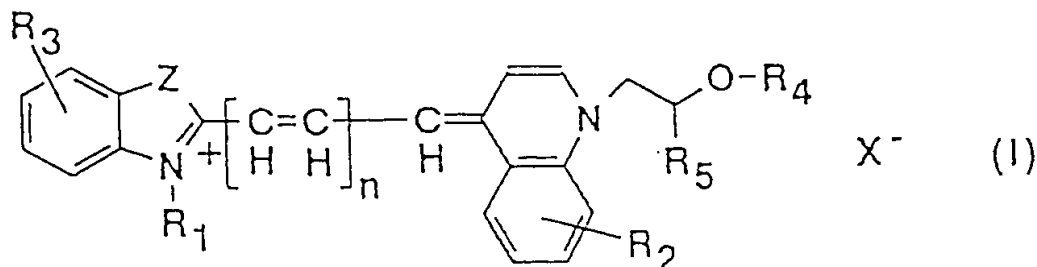
以通式(I)表示的化合物, (式中, R₁ 为氢原子或低级烷基; R₂ 及 R₃ 为氢原子、低级烷基或低级 烷氧基; R₄ 为氢原子、酰基或低级烷基; R₅ 为氢原子、也可以被取代的低级烷基; Z 为硫原子、氧原子或低级烷基取代的碳原子; n 为 1 或 2; X⁻ 为阴离子)。利用含有该化合物的试剂可以实现网织红细胞测定 技术的低价格化即装置的低价格化, 可以使用小型红色半导体激光器作为光源, 同时可以使用红色波长高精度地测定网织红细胞。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 以通式 (I) 表示的化合物



式中, R_1 为低级烷基; R_2 及 R_3 为氢原子; R_4 为氢原子、酰基; R_5 为氢原子、羟基低级烷基; Z 为硫原子、氧原子; n 为 1 或 2; X^- 为卤素离子或卤化硼离子。

2. 权利要求 1 中记载的化合物, 在通式 (I) 表示的化合物中, R_1 为甲基, R_2 及 R_3 为氢原子, R_4 及 R_5 为氢原子, $n = 1$, Z 为硫原子; 或 R_1 为甲基, R_2 及 R_3 为氢原子, R_4 为氢原子, R_5 为羟甲基, $n = 1$, Z 为硫原子;

或 R_1 为甲基, R_2 及 R_3 为氢原子, R_4 为 COCH_3 基, R_5 为氢原子, $n = 1$, Z 为硫原子;

或 R_1 为甲基, R_2 及 R_3 为氢原子, R_4 及 R_5 为氢原子, $n = 2$, Z 为硫原子。

3. 网织红细胞染色用试剂, 含有权利要求 1 中记载的化合物。

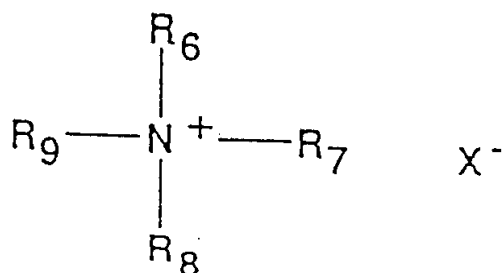
4. 权利要求 3 中记载的网织红细胞染色用试剂, 其中进一步含有为了抑制红细胞非特异染色的多价阴离子及缓冲剂。

5. 权利要求 4 中记载的试剂, 其中的多价阴离子是从硫酸离子、磷酸离子、多价羧酸离子中选择的至少一种。

6. 权利要求 3-5 中记载的试剂, 试剂的 pH 为 6.0-11.0。

7. 权利要求 3 中记载的试剂, 其中含有作为染色促进剂的阳离子性表面活性剂。

8. 权利要求 7 中记载的试剂, 其中的阳离子性表面活性剂为



式中， R_6 为碳原子数 8-12 的烷基， R_7 、 R_8 及 R_9 为低级烷基， X 为从卤素中选择的至少一种。

9. 权利要求 7 中记载的试剂，其中的阳离子性表面活性剂是月桂基三甲基氯化铵、癸基三甲基溴化铵、辛基三甲基溴化铵中的至少一种。

10. 网织红细胞测定方法，其特征在于使用含有权利要求 1 中记载的化合物的试剂。

11. 权利要求 10 中记载的网织红细胞测定方法，包括以下各工序：

(i) 混合由通式 (I) 表示的化合物及、为抑制红细胞的非特异染色的多价阴离子及、缓冲剂组成的网织红细胞染色用试剂及血液试样，调制成测定试样；

(ii) 将上述测定用试样导入具有红色波长的光源的流体检测仪的流体系中；

(iii) 在鞘流 (シースフロー) 中流动的血液试样的细胞上照射红色波长的光；

(iv) 测定由细胞发出的散射光与荧光；

(v) 利用散射光强度或散射光强度与荧光强度辨别血小板与红细胞系细胞；

(vii) 对血小板、红细胞、网织红细胞及白细胞分类计数，算出细胞数及细胞比率。

12. 权利要求 11 中记载的网织红细胞测定方法，其中红色波长的光源为 He-Ne 激光器或红色半导体激光器。

新化合物及其用途

本发明涉及一种新的化合物及其用途。更详细地是指在临床检查领域中为测定网织红细胞及网织红细胞成熟指数的可作为荧光色素使用的新化合物、含有该化合物的试剂及网织红细胞的测定方法。

网织红细胞是在骨髓中从造血干细胞分化成熟的原红细胞系细胞经脱核后从骨髓释放到血液中后的幼红细胞，作为细胞分化成熟的残余物，在该网织红细胞中残存有少量的 RNA、核糖体或线粒体等细胞内小器官，而这些细胞内小器官在成熟的红细胞中是不含有的。

在临床检查领域中，对网织红细胞的分类计数是掌握患者骨髓中的造血状态的非常重要的检查。例如，正常人的网织红细胞占总红细胞的 0.5 - 2.0 %，而该比例在骨髓造血被抑制的状态下减少，在骨髓造血亢进的状态下增加。具体为，在再生不良性贫血及恶性肿瘤的化学治疗时网织红细胞减少，在发生溶血性贫血时增加。

一般在临床检查领域中为测定网织红细胞，采用的是通过将含有新亚甲蓝（NMB）、亮甲苯蓝（BCB）等碱性色素的染色液及血液试样混合，使网织红细胞中含有的上述残存物质呈网状析出，用显微镜观察每个细胞，辨别成熟红细胞与网织红细胞，再进行计数的方法（用手法）。

另外，作为 Heilmeyer 分类已知有根据网状析出物的量将网织红细胞分类的方法，该方法在掌握骨髓的造血动态方面非常有用。

但上述的用手法存在以下问题：①调制试样的操作烦杂、②在辨别细胞的检查人员之间有差异、③因为细胞计测数少，所以统计学误差变大。

另外，Heilmeyer 分类因为非常烦杂，所以尽管能够获得有用的诊断信息，但目前几乎不采用。

为解决上述问题，取代上述的碱性色素，提出了用将网织红细胞中含有的 RNA 特异染色的荧光性碱性色素将网织红细胞染色，用流体测量

仪 (flow sight meter) 测定细胞的前方散射光强度及荧光强度, 主要基于荧光强度的差来辨别红细胞与网织红细胞, 分类计数网织红细胞的方法。

在该方法中, 经常使用能够实质上在 30 秒钟以内将网织红细胞染色的 (碱性) 槐黄 O (auramine) 作为碱性色素。另外, 使用槐黄 O 的网织红细胞测定用的试剂及全自动测定装置可以分别采用东亚医用电子株式会社的レットサーチ (RETSEACH)、R 系列 (R - 1000、R - 2000、R - 3000), 这些试剂及装置已有市售。通过使用这种测定装置, 从调制试样到数据输出的全部工序可以实现自动化, 简便而且没有由于测定者的不同而产生的偏差, 也可以降低上述统计学上的误差, 实现高精度的测定。

另外, 网织红细胞的荧光强度与网织红细胞中残存的 RNA 量成正比例, 即与网织红细胞的成熟程度成反比例, 可以利用荧光强度算出 RMI (Reticulocyte Maturation Index: 网织红细胞成熟指数)。例如, 在图 10 中表示用上述的 R 系列的测定装置测定网织红细胞时的散射图 (scatter gram)。图 10 中, 从网织红细胞中荧光强度低的即 RNA 少、成熟程度高的之中分成 LFR、MFR、HFR 三个级分。这样, 通过测定 RMI 可以获得与 Heilmeyer 分类类似的诊断信息, 特别是最不成熟的网织红细胞 (HFR) 的比例, 作为敏锐地显示骨髓移植后或化学疗法后的骨髓造血机能恢复的指标非常有用。

上述的流体测量仪法尽管是非常有用的方法, 但还存在以下问题, 作为为激发荧光色素的荧光的光源, 因为必须要使用价格非常昂贵的氩激光器, 所以装置的价格很高, 而且装置变得很大。

另外, 作为在流体测量仪中可以使用的荧光色素, 除了槐黄 O 以外, 还有噻唑橙、溴化 3, 8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶鎓等, 但这些色素为将网织红细胞染色必须要有 5 分钟以上的染色时间。特别是噻唑橙, 在 Lee L.G. et al: Cytometry; 7:508-517 (1986) 中报告必须要有 60 分钟的染色时间。因此要达到试样调制的自动化是非常困难的, 结果不得不依靠人工来调制试样, 不但从省力化的观点考虑存在问题, 而且由于手工技术或操作者的不同, 测定数据也会出现偏差。用多台装

置测定同一试样时，也产生装置间的测定数据不一致的问题。特别是 Davis B. H. 等人在 AmJ Pathol Vol. 102, (4), 468-477 中报告了网织红细胞的成熟指数 (RMI) 在各装置间存在较大的偏差。

另一方面，在美国专利第 5360739 号中记载了使用 He - Ne 激光器作为比较廉价的光源，使用噁嗪 750 作为色素，通过测定散射光强度与吸光度或荧光强度进行网织红细胞测定的流体测量仪法。另外，与该方法不同，在 WO94/27146 号公报中记载了将红细胞用 NMB 染色后，将血细胞溶血，主要利用散射光强度辨别网状物 (レチカラム) 析出的网织红细胞及红细胞的方法。

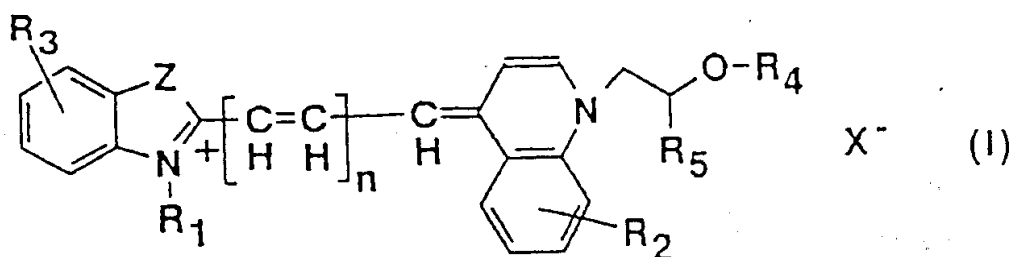
但这些方法在调制试样时需要很多时间，特别是 WO94/27146 号公报中试样调制要分 2 步进行，非常烦杂，所以不适用于自动化装置，而且并不是特异地检出网织红细胞的 RNA，存在易受到细胞的散射光的影响等各种问题。另外，在这些方法中完全没有有关网织红细胞成熟指数的记载。

另外，在特公昭 63 - 61622 号公报、美国专利第 4957870 号中记载有与作为赋予网织红细胞特征的物质 RNA 特异地结合，增加荧光强度的色素。但这些公报中只记载了用先前的氩激光器作为光源的采用流体测量仪测定的方法，完全没有记载使用红色领域的波长的光源作为激发光源的网织红细胞计数方法、网织红细胞成熟指数测定方法及试剂。

另外，在美国专利第 5360739 号中明确记载了，RNA 与色素的结合常数、色素的渗透速度等由于色素的不同而不同，不可能预测在何种条件下可以测定网织红细胞。

综上所述，目前还没有一种具备可以通过使用廉价的小型光源、迅速且准确地测定网织红细胞及其成熟指数等全部优点的网织红细胞测定用试剂及其测定方法。因此本发明的目的在于提供一种新的化合物及作为其用途的网织红细胞测定用试剂及其测定方法，可以实现网织红细胞测定技术的低价格化，即装置的低价格化，可以使用小型红色半导体激光器作为光源，采用红色波长高精度地测定网织红细胞。

本发明提供以下述通式 (I) 表示的新化合物，



(式中, R_1 为氢原子或低级烷基; R_2 及 R_3 为氢原子, 低级烷基或低级烷氧基; R_4 为氢原子、酰基或低级烷基; R_5 氢原子、也可以被取代的低级烷基; Z 为硫原子、氧原子或低级烷基取代的碳原子; n 为 1 或 2; X^- 为阴离子)

另外, 本发明还提供由上述通式 (I) 表示的化合物及、为抑制红细胞的非特异染色的多价阴离子及、缓冲剂组成的网织红细胞染色用试剂。

另外, 本发明还提供一种网织红细胞的测定方法, 包括以下各工序:
 (i) 混合上述网织红细胞染色用试剂与血液试样, 调制测定用试样;
 (ii) 将上述测定用试样导入具有红色波长的光源的流体检测仪的流体系中; (iii) 在鞘流 (シ-スフロ-) 中流动的血液试样的细胞上照射红色波长的光; (iv) 测定由细胞发出的散射光与荧光; (v) 利用散射光强度或散射光强度与荧光强度辨别血小板与红细胞系细胞; (vi) 利用荧光强度或荧光强度与散射光强度辨别红细胞、网织红细胞及白细胞; (vii) 对血小板、红细胞、网织红细胞及白细胞分类计数, 算出细胞数及细胞比率。

本发明的新化合物是可以将网织红细胞染色并可以用红色波长的光激发的化合物, 可以作为荧光色素使用。

通式 (I) 中 R_1 代表的低级烷基是指碳原子数 1 - 6 的直链或支链的烷基, 例如甲基、乙基、丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、其中优选甲基、乙基。

R_2 及 R_3 中的低级烷基与上述相同, 低级烷氧基是指碳原子数 1 - 6 的烷氧基, 例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等, 其中优选甲氧基、乙氧基。

另外, R_2 及 R_3 更优选为氢原子。

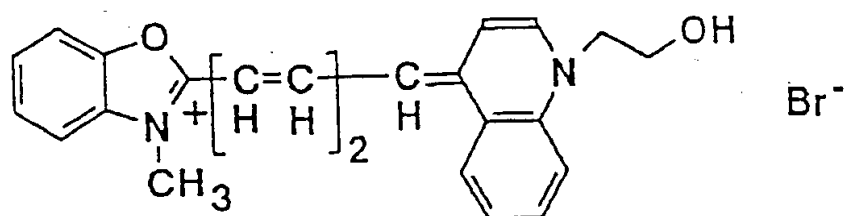
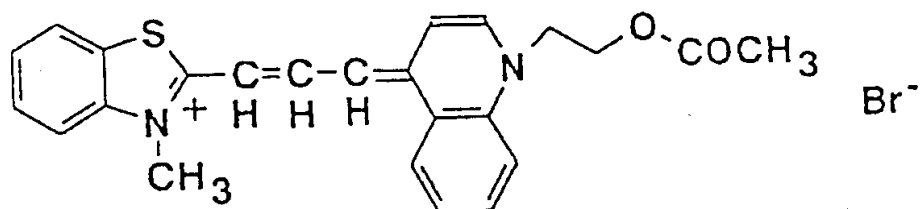
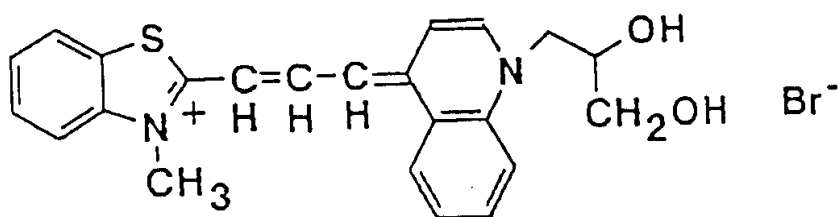
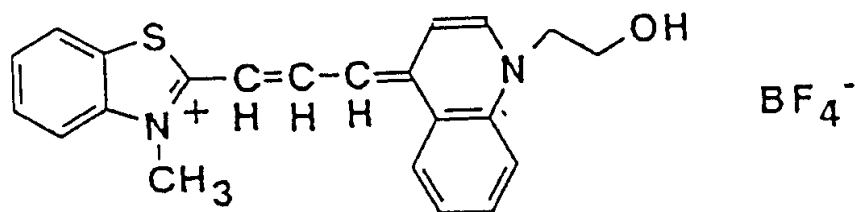
R_4 中的酰基优选由脂肪族羧酸衍生的酰基, 例如乙酰基、丙酰基等, 其中优选乙酰基。另外, 低级烷基与上述相同。

R_5 中的低级烷基与上述相同, 也可以被取代的低级烷基是指也可以被 1 - 3 个羟基、卤素原子 (例如氟、氯、溴、碘) 等取代的低级烷基, 其中优选被 1 个羟基取代的甲基、乙基。

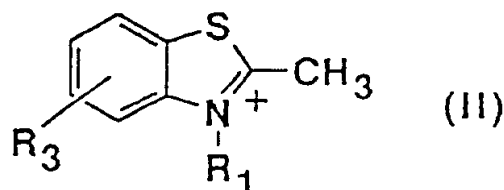
Z 中的低级烷基与上述相同, 作为 Z 优选硫原子。

X 中的阴离子为卤离子 (氟、氯、溴或碘)、卤化硼离子 (BF_4^- 、 BCl_4^- 、 BBr_4^- 等)、磷化合物离子、卤氧酸离子、氟代硫酸离子、甲基硫酸离子、在芳香环上以卤素或带有卤素的烷基作为取代基的四苯基硼化合物离子等。其中优选溴离子或 BF_4^- 。

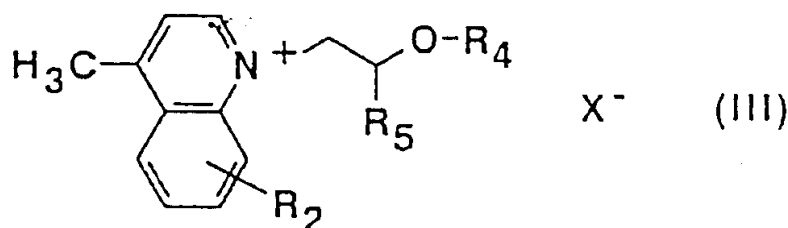
通式 (I) 表示的具体化合物如下所示。



通式 (I) 的化合物中, $n = 1$ 的化合物例如可通过将通式 (II)



表示的化合物与 N, N - 二取代甲脒反应, 将其生成物与式 (III)



表示的喹啉衍生物反应, 然后再用硼氟化钠处理得到。

另外, 通式 (I) 的化合物中, $n = 2$ 的化合物可以利用上述反应, 用丙醛酸二 (苯基亚胺) 盐替代 N, N - 二取代甲脒进行反应而得到。

上述通式 (I) 的化合物中, 可通过在其分子内导入羟基、羟乙基、乙酰基等极性官能团而使化合物的极性增加。结果对于极性低的红细胞细胞膜脂质双层或血红蛋白的疏水区域的结合能力下降, 由此可以抑制红细胞的非特异染色。

本发明的试剂中的上述色素的量对于将网织红细胞染色是足够的, 可以通过色素种类、试剂组合进行适当调整。例如为 0.1 - 100mg/L 左右, 更优选 0.3 - 30mg/L。在色素浓度超过 100mg/L 时, 虽然由于色素的不同而不同, 但一般情况是红细胞的非特异荧光增加, 难以辨别红细胞与网织红细胞, 故不优选。另外, 在色素浓度低于 0.1mg/L 时, 虽然不是不能使用, 但容易发生色素吸附在容器壁上或分解等, 色素浓度减少, 故不优选。

本发明的网织红细胞测定用试剂中除含有上述化合物 (色素) 之外, 还含有为抑制红细胞的非特异染色的多价阴离子的盐类及为维持 PH 的缓冲剂, 并调节至生理学渗透压 (例如 150 - 600mOsm/kg 左右)。

本发明人在研究染色液组成的过程中发现, 一般使用的染色液中的渗透压补偿剂的主成分为 NaCl (特别是 Cl^-) 的情况下, 红细胞的非

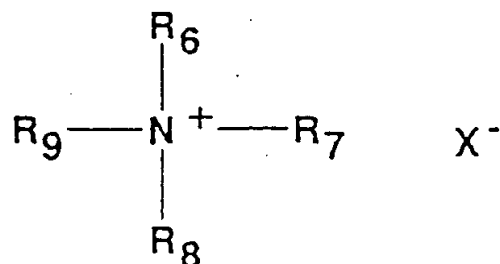
特异荧光很强而且网织红细胞的特异荧光很弱，结果红细胞与网织红细胞的辨别变得很困难。另一方面，还发现在染色液中的 Cl^- 被多价阴离子取代的情况下，红细胞的非特异染色被显著抑制，辨别红细胞与网织红细胞变得容易。因此在本发明的试剂中含有多价阴离子的盐类。作为用于该目的的多价阴离子特别优选柠檬酸及 EDTA 等多价羧酸离子、磷酸及硫酸离子、碳酸离子等，多价阴离子的含量为占试剂中总阴离子成分的 50 % 以上，优选 70 % 以上。虽然作用机理尚不清楚，但在上述范围内具有增加特异荧光的作用。另外，作为多价阴离子的平衡离子没有特别限定，但优选碱金属离子。

为获得稳定的网织红细胞染色结果，本发明试剂中的缓冲剂是能够保持 PH 为一定的物质，通常使用的浓度为数 mM - 100mM。作为缓冲剂的种类，如果是常用的物质则无特殊限制，例如可以根据合适的 PH 适当选择羧酸类、磷酸、古德 (good) 缓冲剂、牛磺酸、三乙醇胺等。合适的 PH 因色素的不同而不同，但通常为 6.0 - 11.0，更优选 7.0 - 10.0，最优选 8.0 - 9.5。PH 比 6.0 更低或比 11.0 更高的情况下，红细胞容易溶血，变得不能正确测定，因此不优选。另外，PH 过高的情况下，红细胞细胞膜上的阴离子解离，变得与阳离子性的色素容易结合，因此红细胞的非特异荧光增加，有难以辨别红细胞和网织红细胞的倾向，故不优选。另外，上述多价阴离子在能够将试剂中的 PH 调整至适当范围的情况下，兼有缓冲剂的作用。

另外，本发明的试剂为防止红细胞的低张溶血，优选将渗透压调整至生理学渗透压。为防止红细胞的低张溶血，渗透压通常为 150mOsm/kg 以上。如果渗透压过高，虽然没有特殊的危险，但通常是调整至 600mOsm/kg 左右。为将渗透压调至上述范围，可以含有渗透压补偿剂。作为渗透压补偿剂，例如可使用丙酸等有机酸的碱金属盐、葡萄糖、甘露糖等糖类。另外，如果在试剂中的总阴离子成分中所占的比例小于 50 %，则也可以使用氯化钠等碱金属卤化物或碱土金属卤化物。另外，在上述的多价阴离子可以将试剂中的渗透压调整至适当的范围的情况下，则没有再含有渗透压补偿剂的必要。

本发明的试剂中可以进一步含有作为染色促进剂的阳离子性表面活

性剂。作为阳离子性表面活性剂例如有以下结构的化合物：



（式中， R_6 为碳原子数8 - 12的烷基， R_7 、 R_8 、 R_9 为低级烷基， X 为从卤素中选择的至少一种）

R_6 中的碳原子数为8 - 12的烷基包括直链或支链的烷基，例如辛基、癸基，月桂基等。其中优选辛基、癸基等。

R_7 、 R_8 及 R_9 中的低级烷基例如为碳原子数1 - 6的直链或支链的烷基，其中优选甲基、乙基、丙基。作为卤素原子有氟、氯、溴、碘。

阳离子性表面活性剂的具体例有辛基三甲基溴化铵（OTAB）、癸基三甲基溴化铵（DTAB）及月桂基三甲基氯化铵（LTAC）。

作为染色促进剂的阳离子性表面活性剂的使用量例如为，OTAB 3000 - 20000mg/L、DTAB 500 - 3000mg/L、LTAC 50 - 250mg/L，随着总碳原子数的增加，使用少量即有效。如果大量使用染色促进剂，则因为红细胞溶血，所以不优选。虽然阳离子性表面活性剂的作用机理尚不清楚，但一般认为是增加了红细胞细胞膜的色素透过性。另外，因为阳离子性表面活性剂将红细胞球状化，所以具有收束红细胞集团的前方散射光强度分布的作用。结果很容易辨别血小板与红细胞系细胞。另外，没有预料到的是例如可以辨别作为缺铁性贫血等小红细胞症的治疗结果出现的正球形（normocytic）红细胞与引起疾病的小红细胞。

另外，如图21及22所示，还可以检测出少量出现的椭圆红细胞。这样，通过收束前方散射光强度分布，在测定网织红细胞的同时可以检测出小红细胞或椭圆红细胞等形态异常的红细胞。

本发明的试剂除上述构成要素之外，还可以含有例如2 - 吡啶基硫代 - 1 - 氧化钠、 β - 苯乙醇等防腐剂。

另外，本发明的化合物在水溶液中不稳定的情况下，可以溶解在乙醇、二甲亚砜、乙二醇等溶剂中保存，使用时可以与含有其他成分的水

溶液混合使用。

使用本发明的试剂用流体测量仪测定网织红细胞时，首先在工序（i）中将上述网织红细胞测定试剂与血液试样混合，调制成测定用试样。这里所说的血液试样包括全部含有作为测定对象的血液成分的试样，例如经过抗凝剂处理的末梢血液或骨髓液等。在调制测定试样时，优选将网织红细胞测定试剂与血液试样按 100:1 - 1000:1 的混合比混合后使之反应。此时的反应温度优选 25 - 50℃，更优选 35 - 45℃。另外，反应时间因试剂中含有的色素的不同而有差异，优选 10 秒 - 5 分钟，更优选 20 秒 - 2 分钟，最优选 20 秒 - 60 秒。

然后，在工序（ii）中将上述得到的测定用试样导入具有红色波长的光源的流体测量仪的流体系内。作为本发明中可以使用的红色波长的光源，如果可以发出所用的色素的激发波长附近的红色波长的光例如 600 - 680nm 左右的光，则没有特殊的限制，例如可以使用 He - Ne 激光器、红色区域的半导体激光器等。这些具有红色波长光源的流体测量仪的光学部分如图 9 所示。在半导体激光器的前方与流体池（flow-cell）之间配置聚光透镜系统，在流体池的前方与前方散射光用受光透镜和光电二极管之间配置光线限制器（beam-stopper）。另外，在流体池的侧方依次配置侧方荧光用的受光透镜、带通滤波器及光电倍增管。另外，流体部，数据处理部等其他的装置构成部可以将公知的结构例如 R2000 等改良后使用。

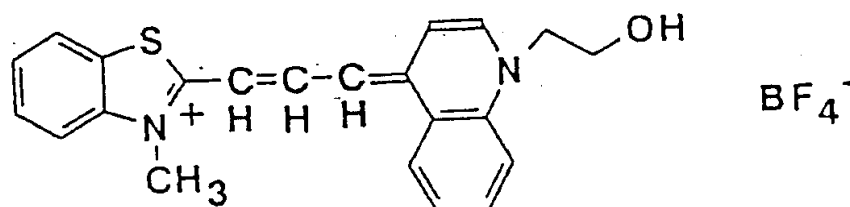
在工序（iii）中，用上述的红色波长光源在鞘流（シースフロー）中流动的细胞上照射红色波长的光，在工序（iv）中测定由细胞发出的散射光及荧光。此时的散射光即可以是前方散射光也可以是侧方散射光，前方散射光即可以是前方高角散射光（6 - 20°）也可以是前方低角散射光（1 - 5°）。此时散射光成为反映细胞的大小信息的参数。另外，作为测定细胞大小信息的测定方法，例如有电阻信号，也可根据需要组合测定该电阻信号的方法。

在工序（v）中，利用散射光强度或散射光强度与荧光强度辨别血小板与红细胞系细胞；在工序（vi）中，利用荧光强度或荧光强度与散射光强度辨别红细胞、网织红细胞及白细胞；在工序（vii）中，将各细

胞分类计数, 算出细胞数及细胞比率.

实施例

(实施例 1: 色素化合物 A 的制备)



将 2, 3 - 二甲基苯并噻唑鎓甲磺酸盐 (2, 3 - Dimethyl benzo thiazolium methanesulfate) 6.0g (1 当量) 与 N, N - 二苯基甲脒 (N, N - Diphenyl for mamidine) 12.8g (3 当量) 在 120ml 醋酸中, 于 90 ℃ 油浴上加热搅拌 1.5 小时. 将反应液倒入 1.8L 己烷中, 再将红色油状物用 1.5L 己烷悬浊洗涤, 除去醋酸. 将粗精制物用乙酸乙酯 - 己烷重结晶. 得到 4.0g (48 %). 向其中加入 1 - (2 - 羟基) 乙基溴化对甲基吡啶 3.1g (1 当量) 及吡啶 80ml, 在 90 ℃ 的油浴上加热搅拌 1.5 小时. 在反应液中加入硼氟化钠 1.27g (1.1 当量) 溶于 DMF 9ml 中得到的溶液, 再加热搅拌 15 分钟后, 将反应液倒入 2 L 乙酸乙酯中, 滤取生成的沉淀. 得到 5.0g (100 %) 的浓暗紫色粉末.

TLC (硅胶, 乙醇 - 二氯甲烷)

$R_f = 0.2$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO - d_6) : δ ppm (TMS)

3.73 (s, 3H), 3.82 (t, 2H), 4.64 (t, 2H), 5.10 (s, 1H), 6.45 (d, 1H), 7.10 (d, 1H),
7.31 (t, 1H), 7.50 - 8.51 (m, 10H)

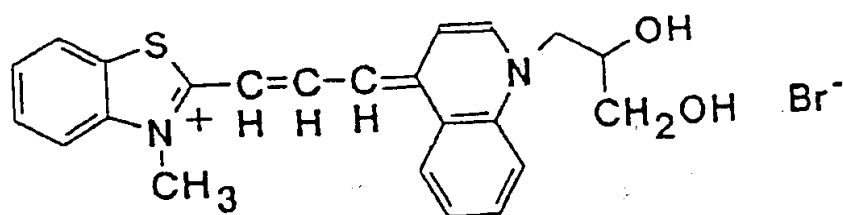
IR (cm^{-1}) : 1625, 1560, 1520, 1490, 1450, 1400, 1320, 1260, 1220, 1150, 760

MASS (FAB positive) : $m/z = 361$

HPLC 95.9% (MeOH - 35% SDSaq. soln. = 80:20)

吸收极大: 627nm (甲醇)

(实施例 2: 色素化合物 B 的制备)



将 3 - 甲基 - 2 - 甲基苯并噻唑鎓甲磺酸盐 (3 - Methyl - 2 - methyl benzo thia zolium methanesulfate) 6.0g (1 当量) 与 N, N - 二苯基甲脒 (N, N - Diphenyl for mamidine) 12.8g (3 当量) 在醋酸中, 于 90 ℃ 油浴上加热搅拌 1.5 小时。将反应液倒入己烷中, 再将红色油状物用 1.5L 己烷悬浊洗涤, 除去醋酸。将粗精制物用乙酸乙酯 - 己烷重结晶。收率 48 %。向其中加入 1 - (2, 3 - 二羟基) 丙基溴化对甲基吡啶 3.1g (1 当量) 及吡啶 80ml, 在 90 ℃ 的油浴上加热搅拌 1.5 小时。在反应液中加入硼氟化钠 1.27g (1.1 当量) 溶于 DMF 9ml 中得到的溶液, 再加热搅拌 15 分钟后, 将反应液倒入 2 L 乙酸乙酯中, 滤取生成的沉淀。得到 180mg (31 %) 的浓暗紫色粉末。

TLC (硅胶, 甲醇 - 二氯甲烷)

R_f = 0.15

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ ppm (TMS)

3.73 (s, 3H), 3.88 (m, 2H), 4.80 (m, 1H), 5.36 (d, 2H), 6.45 (d, 1H), 7.10 (d, 1H),

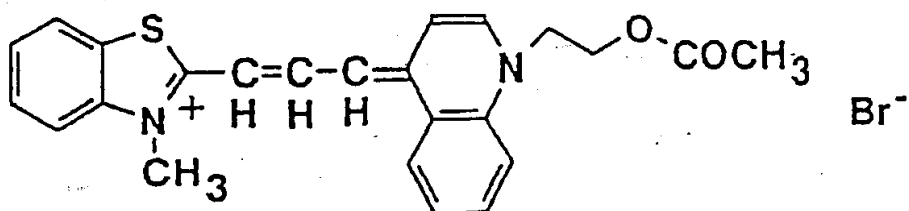
7.31 (t, 1H), 7.50~8.51 (m, 10H), 9.27 (s, 2H)

IR (cm⁻¹) : 1620, 1560, 1520, 1480, 1450, 1400, 1310, 1250, 1210, 1150, 740

MASS (FAB positive) : m/z = 391

吸收极大: 628nm (甲醇)

(实施例 3: 色素化合物 C 的制备)



将 1 - 羟乙基溴化对甲基吡啶 5g (1 当量) 与 N, N - 二苯基甲脒 (N, N - Diphenyl for mamidine) 4.6g (2 当量) 在 100ml 醋酸酐中, 于 90 ℃ 油浴上加热搅拌 1.5 小时. 浓缩反应液, 倒入 0.5L 己烷中, 除去醋酸酐. 将粗精制物用硅胶柱 (甲醇 - 二氯甲烷) 精制. 得到 8.4g (100 %). 向其中加入 2, 3 - 二甲基苯并噻唑鎓甲磺酸盐 3.4g (1 当量), 在 90 ℃ 的油浴上加热搅拌 1.5 小时. 浓缩反应液后用乙醚、己烷洗涤, 再用硅胶柱 (甲醇 - 二氯甲烷) 精制. 得到 0.5g (17 %) 的浓暗紫色粉末.

T L S (硅胶, 甲醇 - 二氯甲烷)) R f = 0.4

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ ppm (TMS)

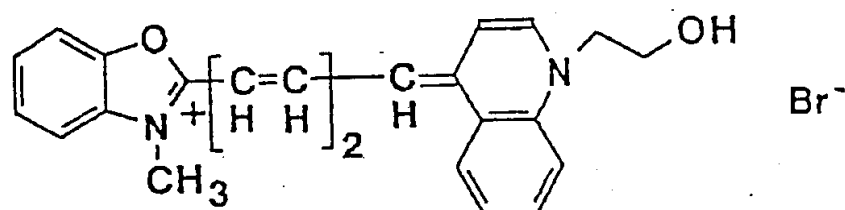
1. 93 (s, 3H), 3. 77 (s, 3H), 4. 45 (t, 2H), 4. 80 (t, 2H), 6. 55 (d, 1H), 7. 10 (d, 1H),
7. 37 (t, 1H), 7. 53~8. 47 (m, 10H)

I R (c m⁻¹) : 1740, 1620, 1560, 1520, 1480, 1450, 1400, 1310, 1250, 1200, 1150, 1080, 740

MASS (FAB positive) : m/z=403

吸收极大: 631nm (甲醇)

(实施例 4: 色素化合物 D 的制备)



将 3 - 甲基 - 2 - 甲基苯并噻唑鎓甲磺酸盐 (3 - Methyl 1-2-methyl benzooazolium methanesulfate) 250mg (1 当量) 与丙醛二 (苯基亚胺) 氯化氢 (Malonaldehyde bis (phenylimine) hydro chloride) 250mg (1 当量) 在醋酸酐中, 于 125 ℃ 的油浴上加热搅拌 0.5 小时. 反应液冷却后, 加入乙醚, 滤取生成的结晶 (收率 45 %). 向其中加入

1 - (2 - 羟基) 乙基溴化对甲基吡啶 150mg (1 当量) 及吡啶 5ml , 在 125 ℃ 的油浴上加热搅拌 0.5 小时 . 将反应液浓缩 , 用二氯甲烷萃取目的产物 (收率 20 %) . 得到浓暗紫色粉末 .

TLC (硅胶 , 10% 甲醇 - 二氯甲烷)

R f = 0 . 2 0

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ ppm (TMS)

3.73(s, 3H), 3.82(t, 2H), 4.64(t, 2H), 5.10(s, 1H), 6.45-7.31(m, 5H), 7.50 ~ 8.51(m, 10H)

IR (cm⁻¹) : 1625, 1560, 1520, 1490, 1450, 1400, 1320, 1260, 1220, 1150, 760

MASS (FAB positive) m/z = 371

吸收光谱 693 nm (甲醇)

(实施例 5)

调制如下组成的网织红细胞测定用试剂 .

化合物 A (色素)	3.0mg
麦黄酮 (缓冲剂)	1.79g
柠檬酸三钠二水和物 (多价阴离子)	29.4g
精制水	1L

(用 NaOH 调整 pH 为 9.0)

在 2ml 试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 10μl , 在 40 ℃ 下恒温放置 120 秒 , 调制成测定用试样 , 将该测定试样用装有如图 9 所示的光学部的 R2000 改造装置测定前方低角散射光强度及荧光强度 , 得到如图 1 所示的散射图 . 其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞中所占的比例为 2.90 % . 另外 , 将该血液用以前的 R2000 (东亚医用电子(株)制) 测定时 , RET % 为 2.70 % .

(实施例 6)

调制如下组成的网织红细胞测定用试剂 .

化合物 A (色素)	3.0mg
麦黄酮 (缓冲剂)	1.79g
柠檬酸三钠二水和物 (多价阴离子)	29.4g

LTAC (阳离子性表面活性剂, 染色促进剂)	150mg
精制水	1L

(用 NaOH 调整 pH 为 9.0)

在 2ml 试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 10 μ l, 在 40℃ 下恒温放置 40 秒后, 按与实施例 5 同样的方法测定前方低角散射光强度及荧光强度, 得到如图 2 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 在总红细胞的比例为 2.72 %。另外, 用以前的 R2000 (东亚医用电子(株)制)测定时, RET % 为 2.70 %。

本实施例与实施例 5 相比, 可以在短时间 (1/3 的时间) 内调制测定用试样, 而且由于红细胞的球状化可以使前方散射光强度分布收束, 红细胞与血小板的辨别变得容易。

(实施例 7)

调制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

化合物 B (色素)	30.0mg
牛黄酸 (缓冲剂)	1.25g
依地酸二钠 (多价阴离子)	26.9g
DTAB (阳离子性表面活性剂, 染色促进剂)	1.00g
精制水	1L

(用 NaOH 调整 pH 为 9.0)

在 2ml 试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 10 μ l, 在 40℃ 下恒温放置 40 秒后, 用与实施例 5 同样的方法测定前方低角散射光强度及荧光强度, 得到如图 3 所示的散射图。其中网织红细胞 (RET) 占总红细胞的比例为 2.82 %。另外, 用以前的 R2000 (东亚医用电子(株)制)测定该血液时, RET % 为 2.70 %。

(实施例 8)

调制如下组成的网织红细胞测定用试剂。

化合物 C (色素)	1.0mg
TAPS (缓冲剂)	2.43g
磷酸氢二钠 12 水和物 (多价阴离子)	35.8g
DTAB (阳离子性表面活性剂, 染色促进剂)	1.00g

精制水

1L

(用 NaOH 调整 pH 为 8.5)

在 2ml 试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 10 μ l, 在 40℃ 下恒温放置 40 秒后, 用与实施例 5 同样的方法测定前方低角散射光强度及荧光强度, 得到如图 2 所示的散射图. 其中网织红细胞 (RET) 占总红细胞的比例为 2.50%. 另外, 用以前的 R2000 (东亚医用电子(株)制)测定该血液时, RET % 为 2.70%.

(实施例 9)

调制如下组成的网织红细胞测定用试剂.

化合物 A (色素)	3.0mg
麦黄酮 (缓冲剂)	1.79g
柠檬酸三钠二水和物 (多价阴离子)	29.4g
DTAB (阳离子性表面活性剂, 染色促进剂)	1000mg
精制水	1L

(用 NaOH 调整 pH 为 9.0)

在 2ml 试剂中加入经过抗凝剂处理的血液 10 μ l, 在 40℃ 下恒温放置 40 秒后, 用与实施例 5 同样的方法测定前方低角散射光强度及荧光强度. 另外, 将该血液用以前的 R - 2000 (东亚医用电子(株)制)测定. 比较测定结果. 图 5 - 8 分别为 RET、LFR、MFR 及 HFR 的相关图. 根据图 5 - 8, 可知使用本发明的试剂及小型红色半导体激光器测定的网织红细胞的测定结果, 因为可以得到特别是成熟红细胞与网织红细胞之间的足够的荧光强度之差, 所以与使用以前的 R - 2000 进行测定的情况相比, 可以获得良好的相关关系. 因此可以说与以前的装置的性能相同, 可以高精度地检测出网织红细胞.

(实施例 10)

根据实施例 9, 测定经抗凝剂处理的正常人血、缺铁性贫血患者治疗中血及出现椭圆红细胞的贫血患者的血.

正常人血的测定例如图 11 - 14 所示. 图 11 及 12 为用 R - 2000 的测定结果, 图 13 及 14 为本实施例的测定结果. 图 12 及 14 为前方散射光强度分布图.

另外，缺铁性贫血患者的治疗中血的测定例如图 15 - 18 所示。图 15 及 16 为 R - 2000 的测定结果，图 17 及 18 为本实施例的测定结果。图 16 及 18 为前方散射光强度分布图。在图 17 及图 18 中，特别是图 18 中，可以清楚辨别引起疾病的低色素性的小红细胞及作为治疗结果出现的正常红细胞。图 15 及 16 所示的先前的方法不能清楚地辨别。

出现椭圆红细胞的贫血患者血的测定例如图 19 - 23 所示。图 19 及 20 为 R - 2000 的测定结果，图 21 及 22 为本实施例的测定结果。图 20 及 22 为前方散射光强度分布图。图 23 表示利用电阻抗检测法（东亚医用电子(株)、SE - 9000）得到的红细胞粒度分布图。图 21 及 22 特别是图 22 可以清楚地辨别椭圆红细胞集团。图 19 及 20 表示的以前的方法不能清楚辨别。另外，图 23 表示的利用以前的电阻抗检测法得到的红细胞粒度分布不能检测到椭圆红细胞的出现。

利用本发明可以实现网织红细胞测定技术的低价格化即装置的低价格化，还可以使用小型红色半导体激光器作为光源，同时可以使用红色波长高精度地测定网织红细胞。也就是说，可以获得与使用先前的上述 R 系列装置中的昂贵的氦激光器（以槐黄 O 作为色素）同等以上的精度。

另外，本发明的试剂中含有作为染色促进剂的阳离子性表面活性剂的情况下，与测定网织红细胞同样，可以辨别作为缺铁性贫血等小红细胞症的治疗结果出现的正球形红细胞（正常的红细胞）与引起疾病的小红细胞，还可以检测椭圆红细胞等形态异常的红细胞。

附图简单说明

图 1：使用含有本发明的色素化合物 A 的网织红细胞测定用试剂，测定血液试样的前方散射光强度及荧光强度时散射图（scatter gram）。

图 2：使用含有本发明的色素化合物 A 的网织红细胞测定用试剂，在该试剂中进一步含有阳离子性表面活性剂，测定血液试样的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 3：使用含有本发明色素的网织红细胞测定用试剂，测定血液试样的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 4：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，测定血液试样的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 5：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法及先前的使用 R2000 的方法测定 RET 时的相关图。

图 6：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法及先前的使用 R2000 的方法测定 LFR 时的相关图。

图 7：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法及先前的使用 R2000 的方法测定 MFR 时的相关图。

图 8：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明的方法及先前的使用 R2000 的方法测定 HFR 时的相关图。

图 9：表示本发明的测定方法中使用的具有红色波长的光源的流体测定仪的光学部分的概略图。

图 10：用先前的 R 系列测定装置测定网织红细胞时的散射图。

图 11：通过使用先前的 R2000 的方法测定正常人血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 12：通过使用先前的 R2000 的方法测定正常人血的前方散射光强度分布时的前方散射光强度分布图。

图 13：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定正常人血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 14：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定正常人血的前方散射光强度分布时的前方散射光强度分布图。

图 15：通过使用先前的 R2000 的方法测定缺铁性贫血患者治疗中的血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 16：通过使用先前的 R2000 的方法测定缺铁性贫血患者治疗中的血的前方散射光强度分布时的前方散射光强度分布图。

图 17：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定缺铁性贫血患者治疗中的血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 18：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定缺铁性贫血患者治疗中的血的前方散射光强度分布时的前方散射光强度分布图。

图 19：通过使用先前的 R2000 的方法测定出现椭圆红细胞的贫血患者的

血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 20：通过使用先前的 R2000 的方法测定出现椭圆红细胞的贫血患者的血的前方散射光分布时的前方散射光强度分布图。

图 21：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定出现椭圆红细胞的贫血患者的血的前方散射光强度及荧光强度时的散射图。

图 22：使用含有本发明的色素的网织红细胞测定用试剂，利用本发明方法测定出现椭圆红细胞的贫血患者的血的前方散射光强度分布时的前方散射光强度分布图。

图 23：利用先前的电阻抗检测法得到的出现椭圆红细胞的贫血患者的血的红细胞粒度分布图。

图 1

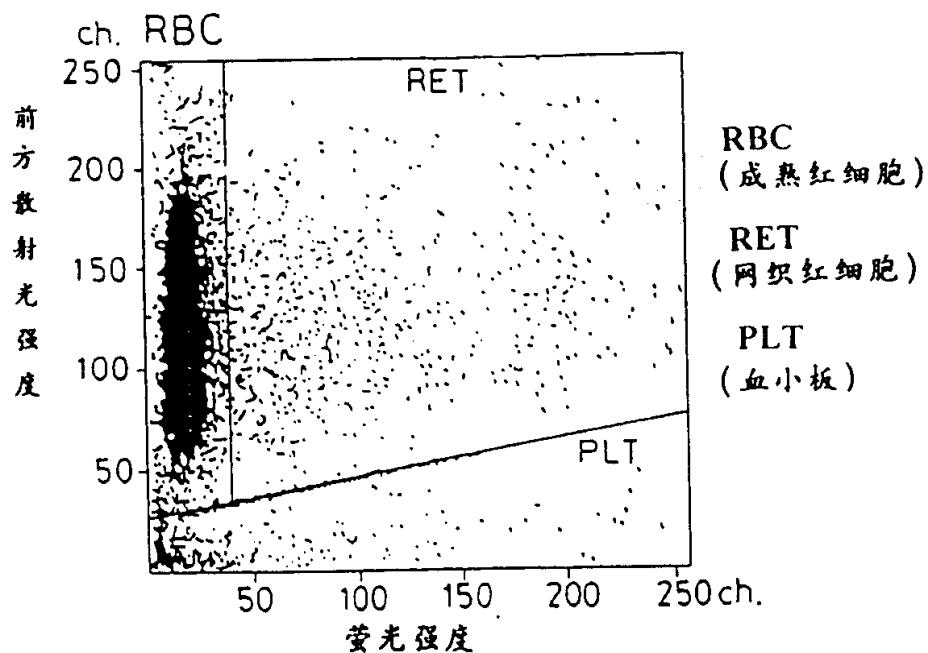


图 2

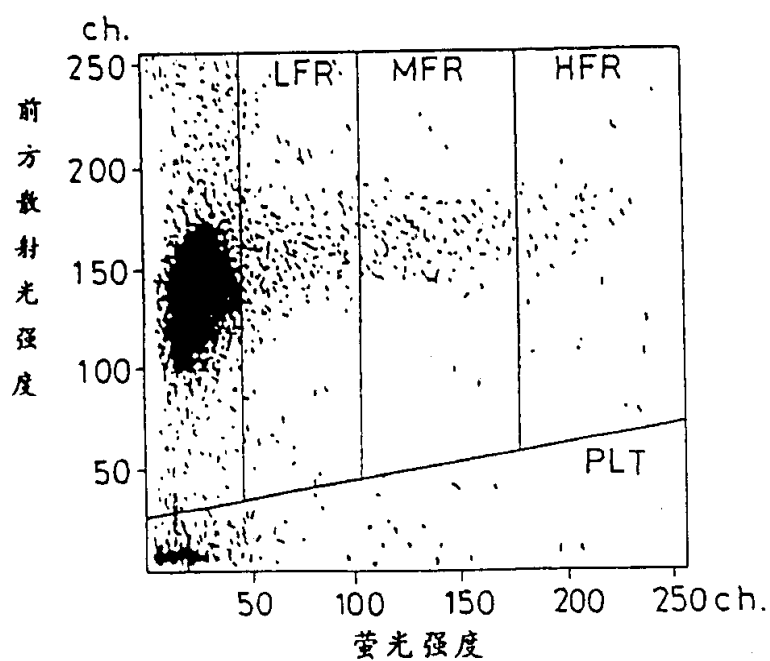


图 3

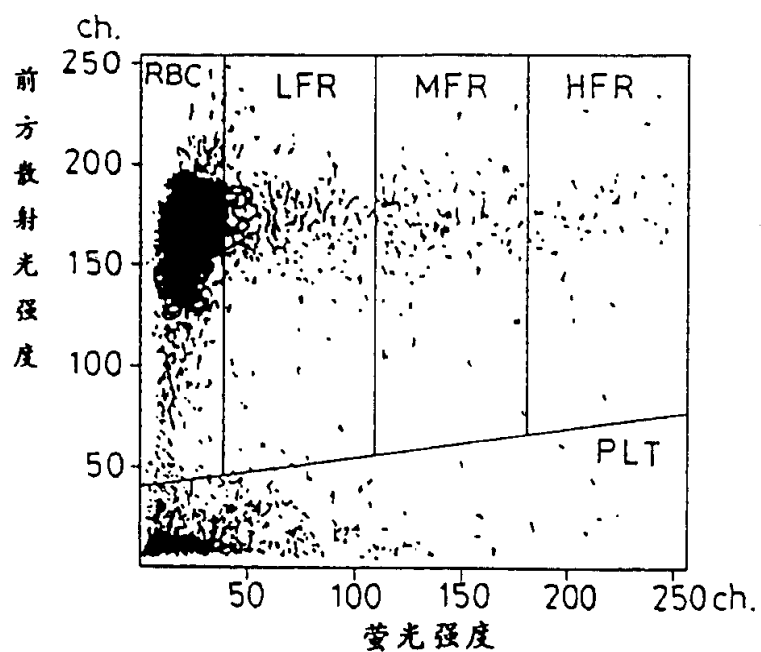


图 4

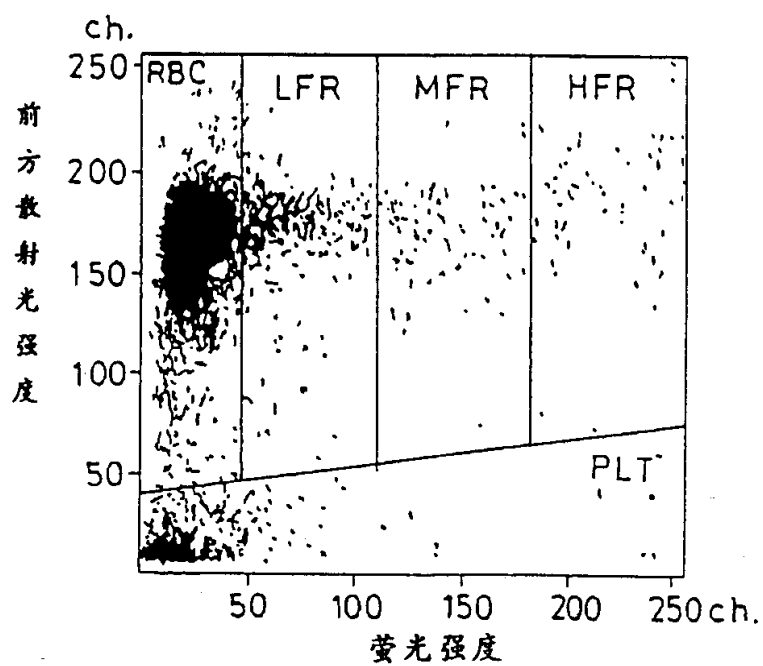


图 5

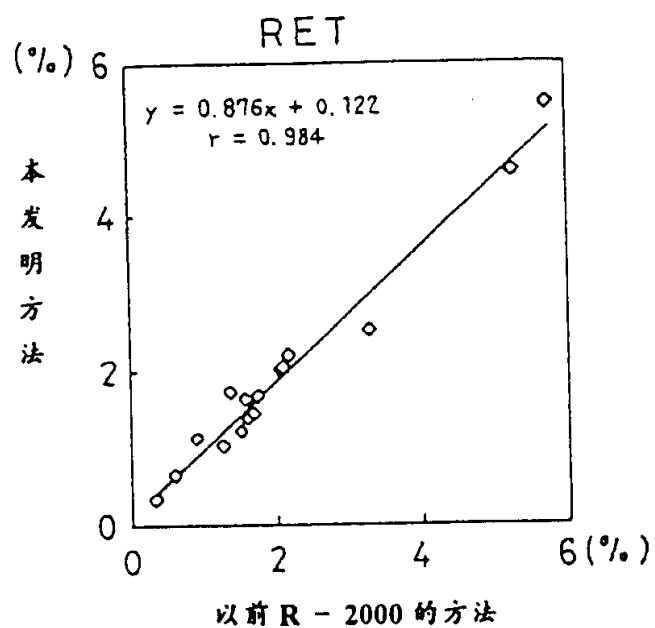


图 6

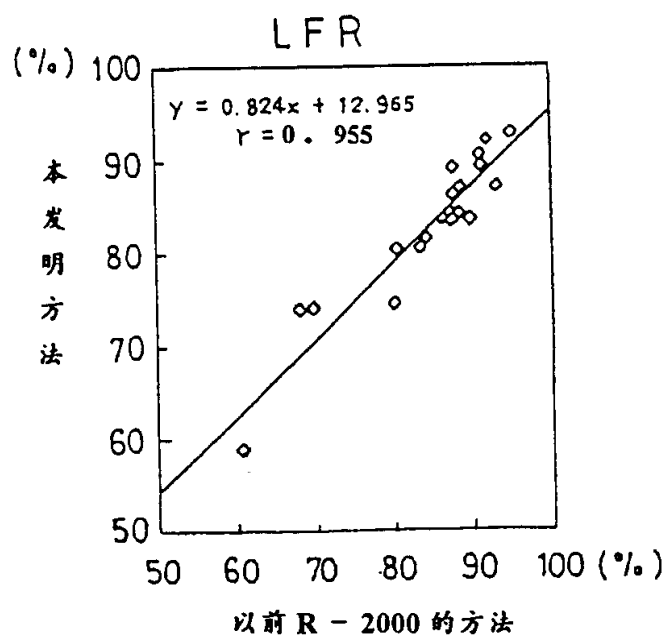


图 7

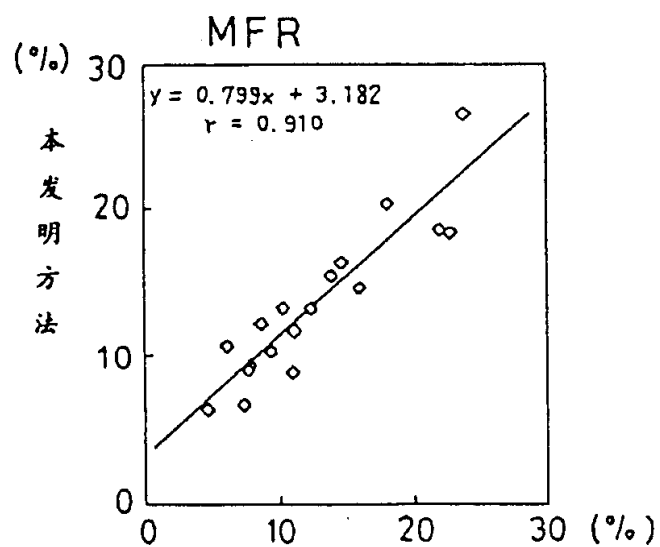


图 8

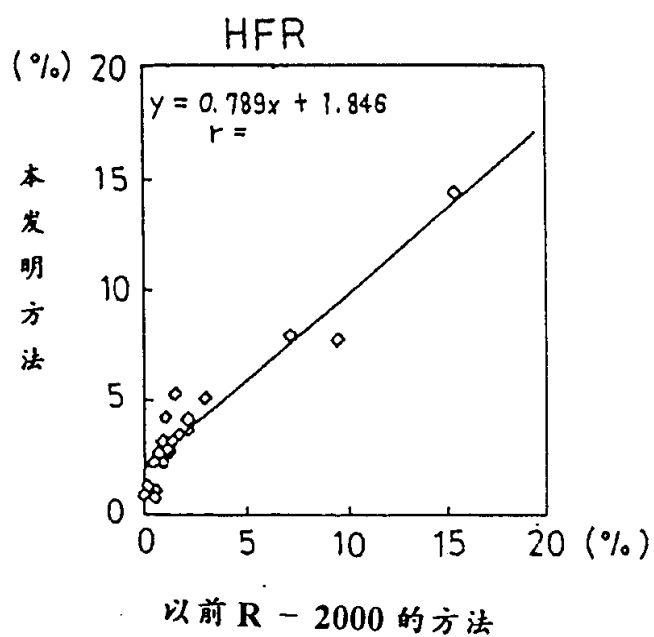


图 9

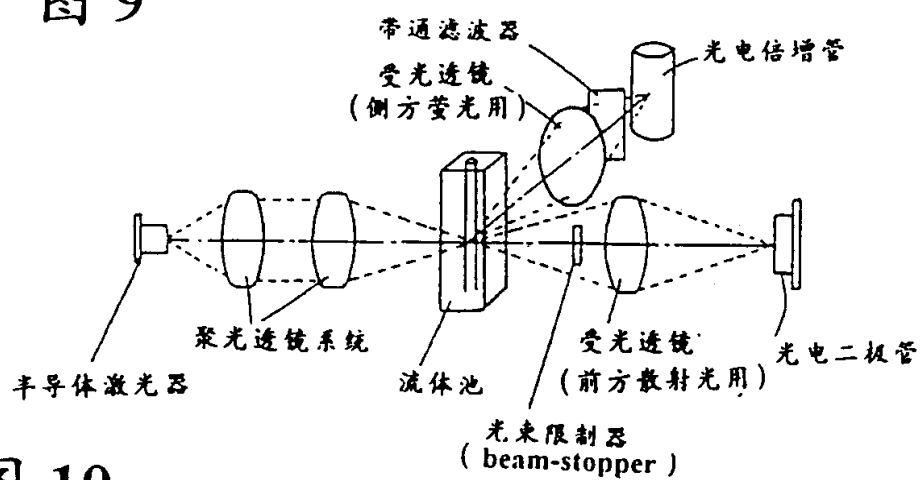


图 10

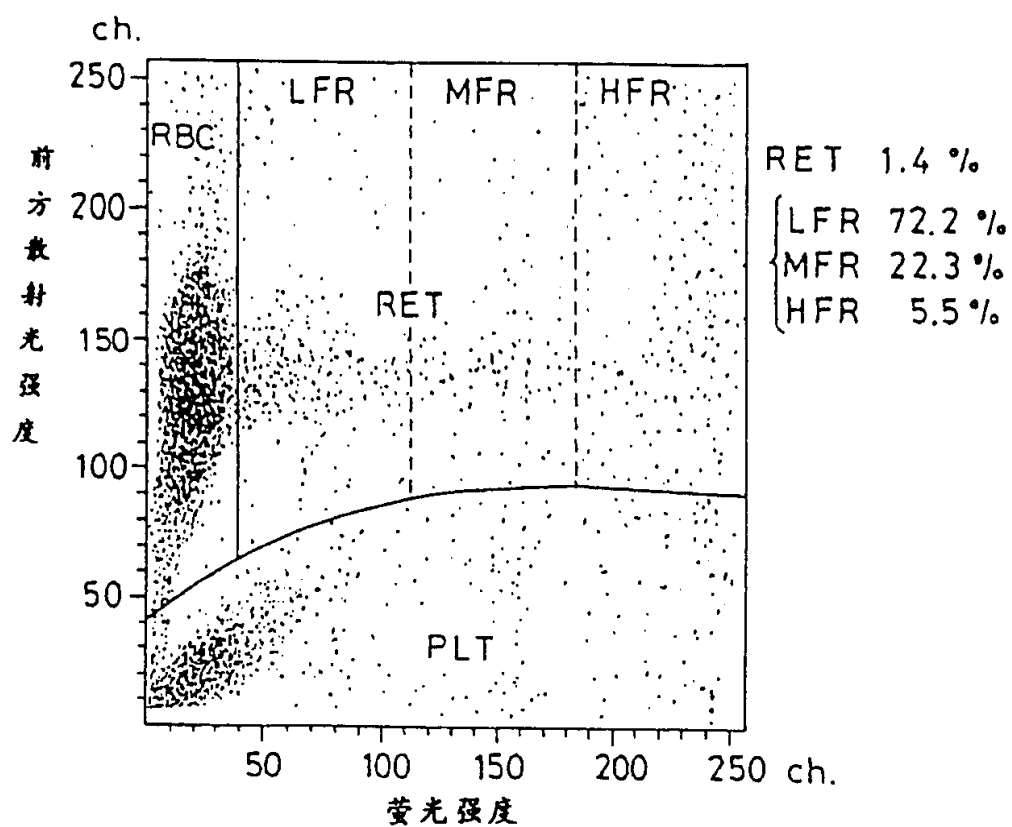


图 11

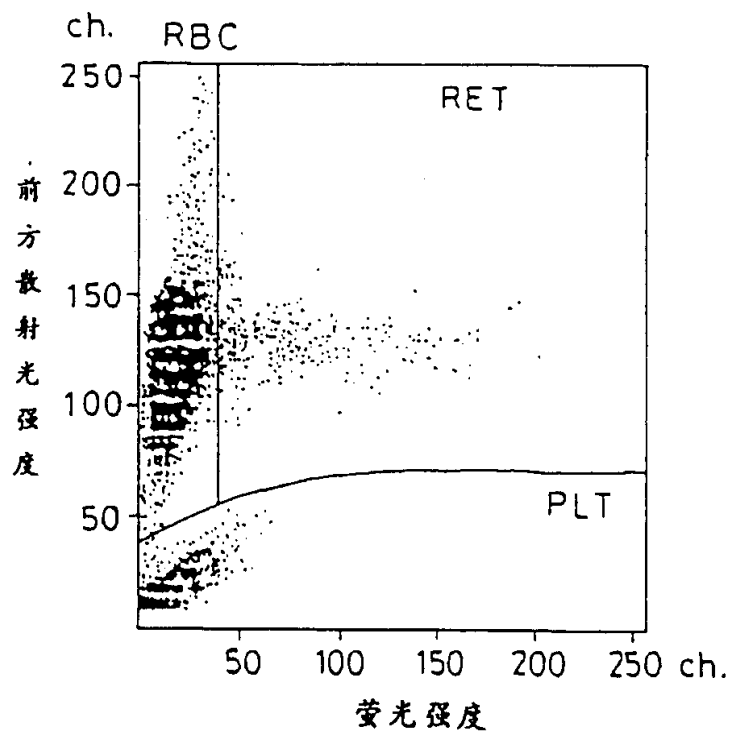


图 12

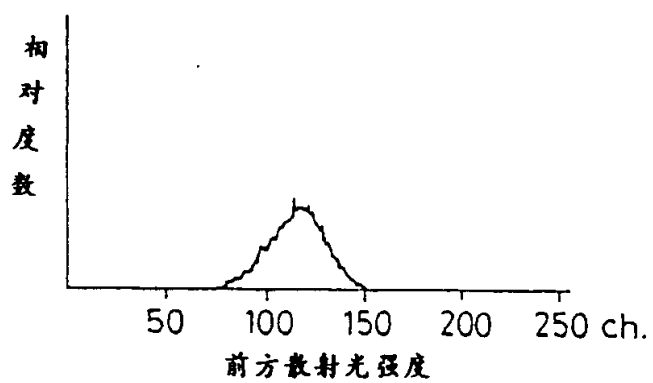


图 13

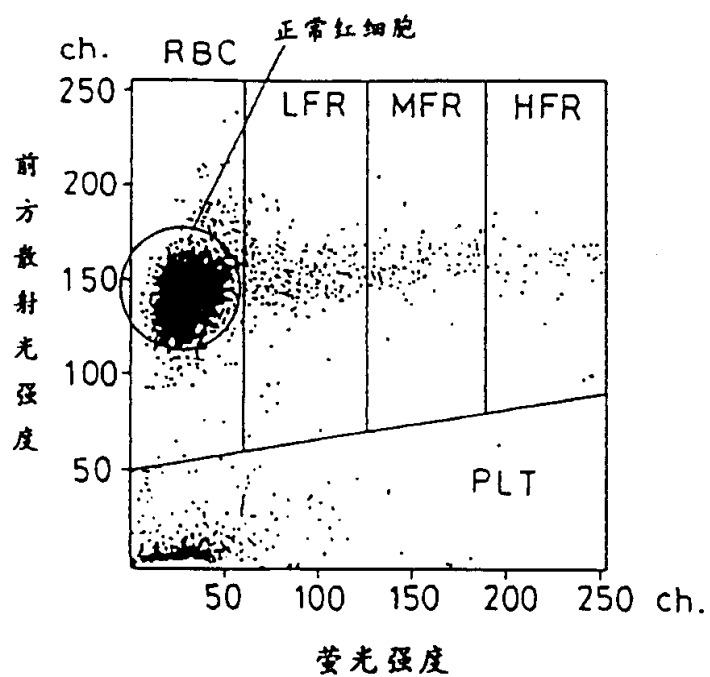


图 14

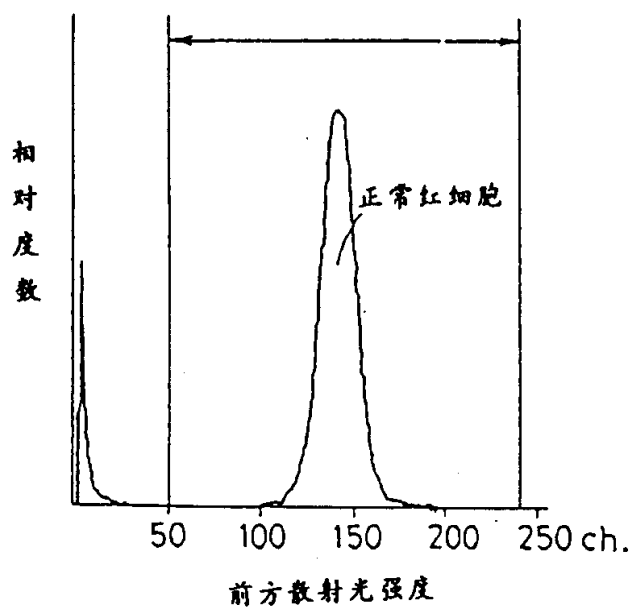


图 15

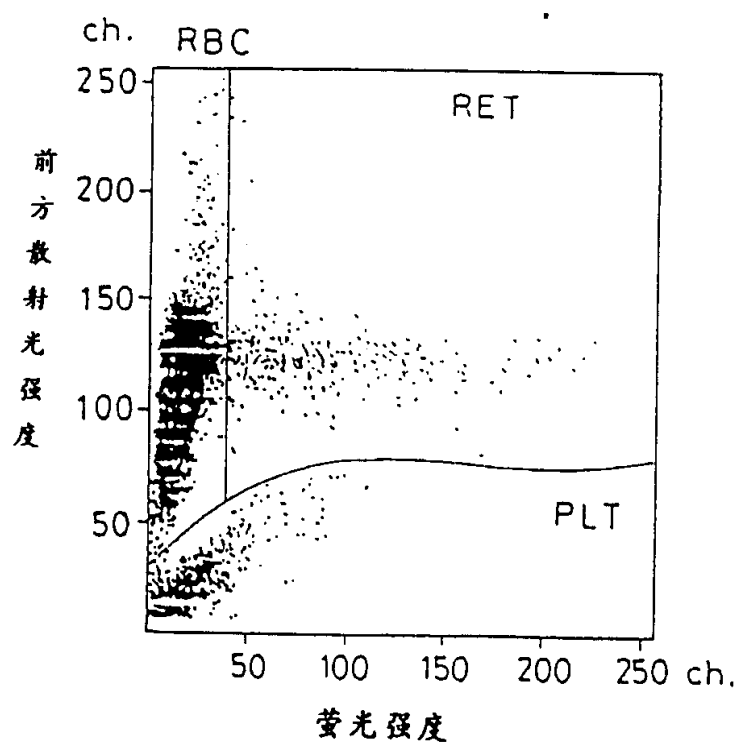


图 16

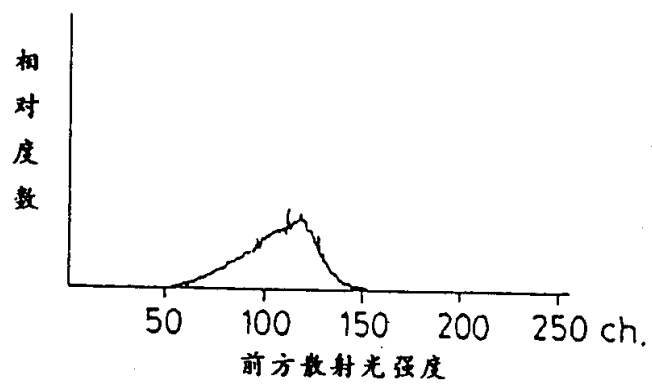


图 17

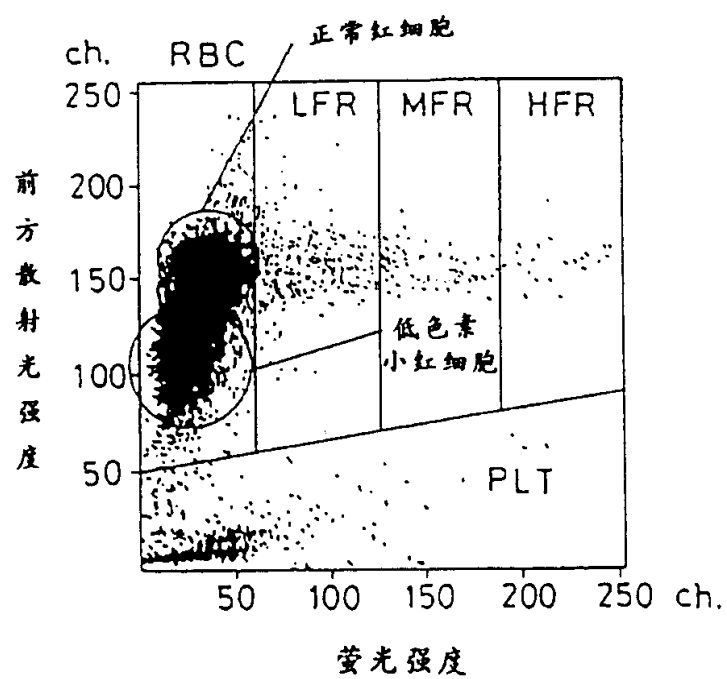


图 18

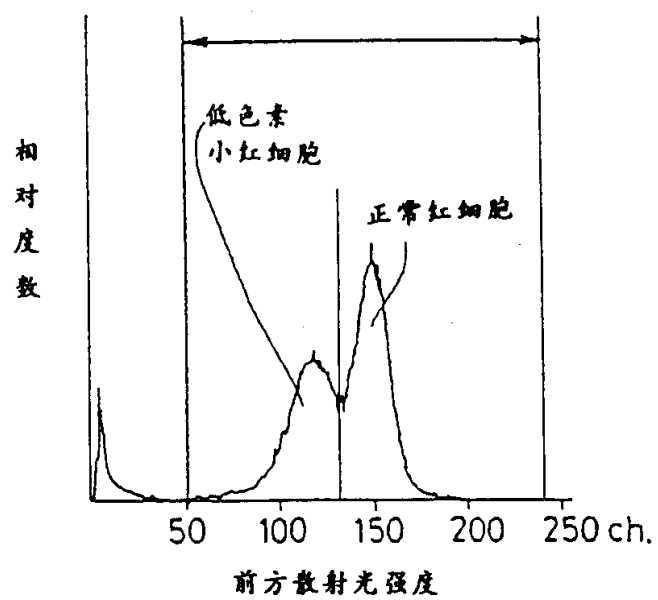


图19

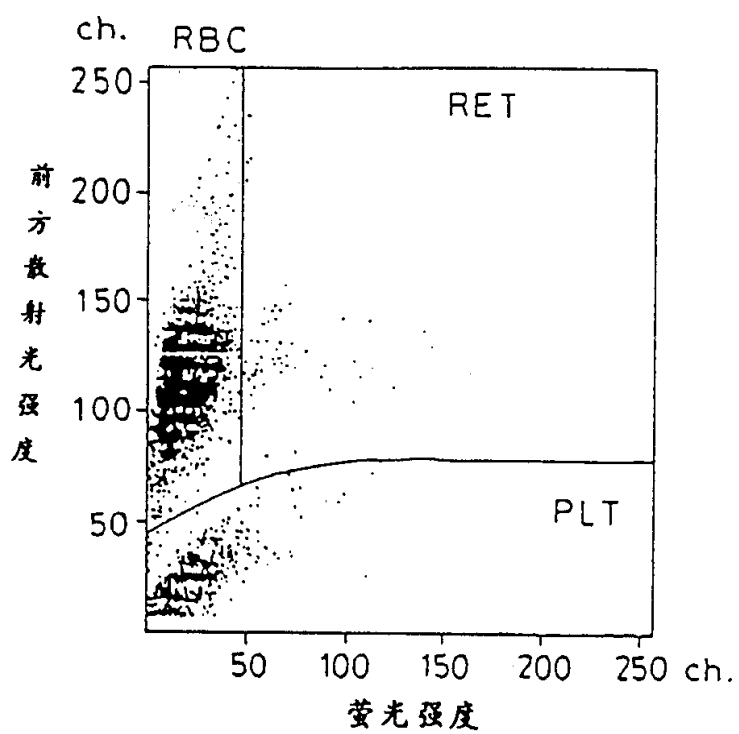


图 20

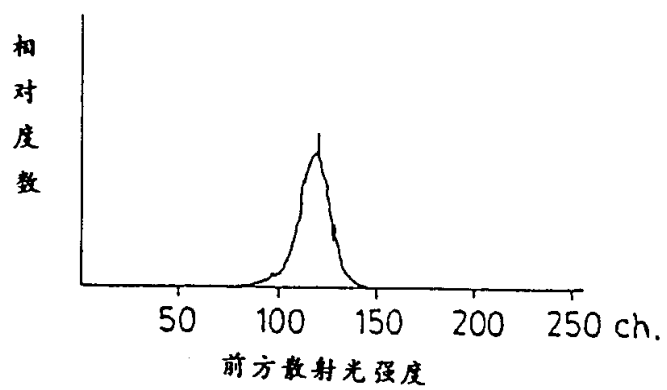


图 21

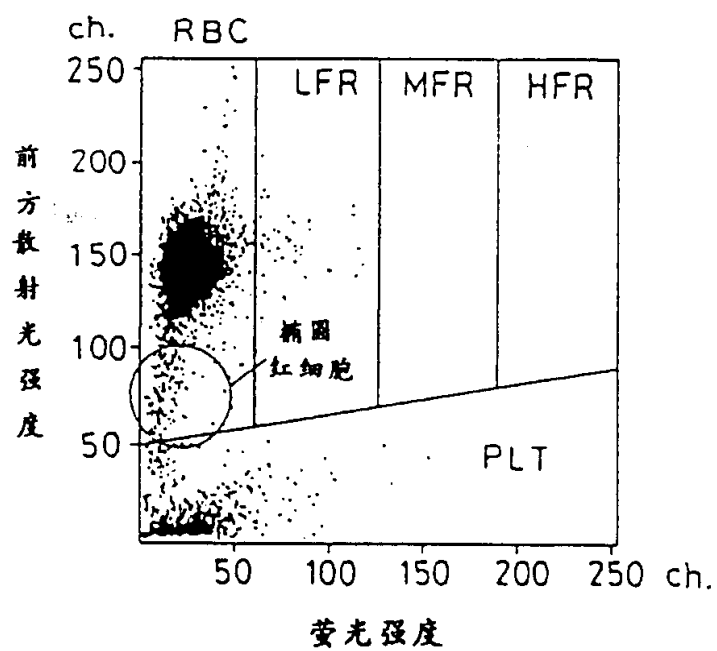


图 22

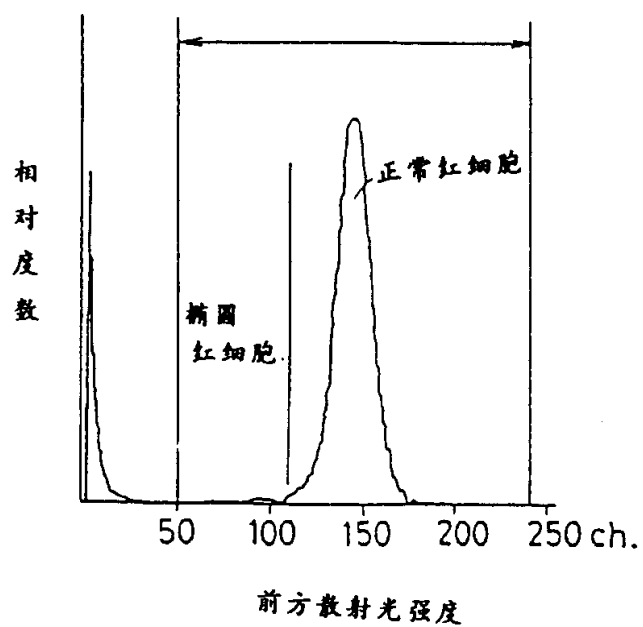


图 23

