



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤1 Int. Cl.³: G 01 N 33/48
G 02 B 21/34
G 01 N 1/30



⑪

621 629

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑬ Gesuchsnummer: 4393/76

⑭ Inhaber:
Boehringer Mannheim GmbH,
Mannheim-Waldhof (DE)

⑬ Anmeldungsdatum: 07.04.1976

⑭ Erfinder:
Dr.rer.nat. Dieter Berger, Viernheim (DE)
Dr.rer.nat. Werner Güthlein,
Mannheim-Neckarau (DE)
Dr.rer.nat. Wolfgang Werner,
Mannheim-Vogelstang (DE)
Dr.rer.nat. Peter Rieckmann, Mannheim-Waldhof
(DE)

⑬ Patent erteilt: 13.02.1981

⑭ Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich⑬ Patentschrift
veröffentlicht: 13.02.1981

⑮ Vorgefärbte Objektträger für die Blutuntersuchung.

⑯ Die vorgefärbten Objektträger für die Blutuntersuchung weisen hochgereinigtes Methylenblau N und Kresylviolettacetat im Gewichtsverhältnis 1 : 1,5 bis 1 : 5 auf.

Die neuen Objektträger ergeben kontrastreiche, leuchtende Färbungen, welche eine sichere Differenzierung der Granulozyten ermöglichen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorgefärzte Objektträger für die Blutuntersuchung, gekennzeichnet durch hochgereinigtes Methylenblau N und Kresylviolettacetat im Gewichtsverhältnis 1:1,5 bis 1:5.
2. Vorgefärzte Objektträger nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Methylenblau N als Monohydrochlorid vorliegt.
3. Vorgefärzte Objektträger nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Farbstoffe aufgesprüh sind.
4. Verwendung des vorgefärbten Objektträgers nach Patentanspruch 1 zur Blutuntersuchung.

Das sogenannte Differential-Blutbild gehört zu den am häufigsten durchgeführten mikroskopischen Methoden. Hierbei werden die einzelnen Blutpartikel (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten etc.) mit Farbstoffen selektiv angefärbt, wodurch die mikroskopische Differenzierung und die Erkennung von pathologischen Veränderungen ermöglicht wird. Die bisher üblichen Färbeverfahren (z.B. nach Wright, May-Grünwald oder Pappenheim) beinhalten mehrere Arbeitsschritte wie z.B. Blutaussstrich, Fixieren, z.T. mehrfaches Färben, Waschen und Trocknen und sind daher recht umständlich. Ausserdem ist die Qualität der Anfärbung stark von der Qualität der Farbstoffe, sowie von Übung und Erfahrung der damit befassten Personen abhängig.

Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, diese Verfahren zu vereinfachen. In jüngerer Zeit ist in der DOS 2 153 673 ein Verfahren beschrieben, welches sich sogenannter vorgefärpter Objektträger bedient, die mit Methylenblau Kresylviolettacetat beschichtet sind. Wird auf diese Objektträger ein Tropfen Blut aufgebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt, so kann nach ca. 5 Min. mikroskopiert werden. Hierbei ist neben der Differenzierung der verschiedenen Leukozytenformen und der Thrombozyten, zusätzlich die Erkennung von jugendlichen Erythrozyten, der sogenannten Retikulozyten möglich. Dies ist, neben der einfachen und sicheren Handhabung, ein weiterer Fortschritt gegenüber dem herkömmlichen Differentialblutbild.

Trotz des unbestreitbaren Fortschritts, den dieses Verfahren erbrachte, weist es aber auch einige gravierende Nachteile auf.

So sind die Färbungen allgemein relativ stumpf, diffus und kontrastarm, ferner lassen sich die drei verschiedenen Formen der granulierten Leukozyten (Eosinophile, Neutrophile und Basophile) nur schwierig differenzieren.

Es wurde überraschenderweise nun gefunden, dass man vorgefärzte Objektträger erhält, die kontrastreiche und leuchtende Färbungen ergeben und die eine sichere Differenzierung der Granulozyten ermöglichen, wenn man die Farbstoffe Methylenblau N und Kresylviolettacetat in hochgereinigter Form in einem Gewichtsverhältnis von 1:1,5 bis 1:5 einsetzt. Vorzugsweise wird Methylenblau N als Monohydrochlorid anstelle des handelsüblichen Zinkdoppelsalzes eingesetzt.

Aus der DOS 2 153 673 geht nicht hervor, von welcher Qualität die verwendeten Farbstoffe waren. Die Tatsache, dass bei der Herstellung der Farbstoff-Lösungen von ungelösten Rückständen abfiltriert werden soll, lässt auf handelsübliche Qualitäten schliessen. In der Tat wurden bei der Nacharbeitung der DOS mit handelsüblichen Farbstoffen vorgefärzte Objektträger erhalten, deren Färbeeigenschaften denen in der DOS (S. 5-6) entsprachen.

Die Reinigung von Mikroskopierfarbstoffen ist im allgemeinen nicht üblich. So werden oftmals schon seit Jahrzehnten Farbstoffe von zweifelhafter Reinheit benutzt, die sonst zur Textilfärbung verwendet werden. Bei vielen Farbstoffen ist zudem nicht bekannt, ob und welche Verunreinigungen das Färbeergebnis beeinflussen. So ist es z.B. nicht verwunderlich, dass die amerikanische Biological Stain Commission als wichtig-

stes Kriterium bei der Spezifikation eines Farbstoffs die Brauchbarkeit in bestimmten Färberezepturen ansieht und für die Gehaltsbestimmung lediglich photometrische und reduktometrische, aber keine chromatographischen Methoden vorschreibt.

5 Diese photometrischen und reduktometrischen Methoden geben aber höchstens Aufschlüsse über den Gesamtfarbstoffgehalt und nicht über etwaige färbende Verunreinigungen.

Methylenblau N (Neumethylenblau, C.I. Basic Blue 24, 3,7-Bis-(N-äthylamino)-2,8-dimethylphenothenothiazoniumchlorid) ist 10 als ca. 50-70%ige Ware im Handel erhältlich und weist nach unseren Befunden bei der dünnsschichtchromatographischen Analyse 3-4 Nebenflecken in wechselnder Menge auf. Der Rest ist Zinkchlorid und Natriumchlorid. Es wurde von uns gefunden, dass eine ausgezeichnete Reinigung durch Lösen in Wasser 15 und Ausfällen des Hydrochlorides mit Salzsäure erfolgen kann. Man erhält so ein chromatographisch reines Produkt, das nur noch ca. 0,5% Zinkchlorid enthält und in Form des Monohydrochlorids vorliegt.

Kresylviolettacetat (Cresylechtviolett, Cresyl Fast Violet 20 Acetate, 5,9-Diaminobenzo(a)phenoxazonium-acetat) ist im Handel mit mehr oder weniger grossen Mengen Natriumacetat verunreinigt erhältlich. Auch hier weist die dünnsschichtchromatographische Analyse 3 Nebenflecken in wechselnder Menge auf. Die Reinigung kann wie folgt vorgenommen werden:

25 Zuerst wird durch vorsichtiges Digerieren in Wasser das Natriumacetat entfernt. Danach wird in Methanol gelöst und mit Äther ausgefällt. Die Wiederholung dieser Prozedur liefert ein chromatographisch reines Produkt.

Die so gereinigten Farbstoffe lösen sich im Gegensatz zu 30 den Handelsprodukten rückstandslos in Methanol und können in der in der DOS 2 153 673 (Seite 4) beschriebenen Weise auf Objektträger ausgestrichen werden. Sie können auch gemäss DOS 2 424 955 in Wasser gelöst und zusammen mit Polyoxyäthylen-sorbitan-monopalmitat (Tween 80) aufgebracht 35 werden.

Es ist weiterhin sehr erstaunlich, dass man nur dann brauchbare Objektträger mit den überraschend verbesserten Eigenschaften erhält, wenn man das Verhältnis der zwei Farbstoffe zwischen 1:1,5 und 1:5 wählt. In der DOS 2 153 673 wird nämlich umgekehrt behauptet und beansprucht, dass das Verhältnis 3:1 bzw. gemäss DOS 2424955 2,5:1 sein soll und merkliche Abweichungen tunlichst zu vermeiden sind.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erhält man, wenn man die Farbstofflösung gemäss der 45 Methode der DE-PS 2 515 869 auf die Objektträger aufsprüht.

Die gereinigten Farbstoffe werden dabei in Gesamtmengen von ca. 0,5 bis 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf die Objektträger aufgebracht. Das Verhältnis von Methylenblau N zu Kresylviolettacetat darf dabei zwischen den Werten von 1:1,5 bis 1:5 variieren.

50 Die erfindungsgemäss vorbeschichteten Objektträger werden wie in der DOS 2 153 673 (Seite 4-5) beschrieben, mit einem Blutstropfen und danach mit einem Deckgläschen versehen und nach ca. 3-5 Min. mit einem Ölimmersionsobjektiv mikroskopiert.

Die Färbungen sind ausserordentlich klar, kontrastreich und gut reproduzierbar. Gegenüber den in der DOS 2 153 673 (Seiten 5-6) beschriebenen Färbecharakteristiken treten folgende Besonderheiten auf:

55 a) Die Granula der Eosinophilen sind leuchtend gelb gefärbt, gegenüber einer dort beschriebenen Orangefärbung.
b) Die Granula der Basophilen sind orangerot gefärbt im Gegensatz zur dort beschriebenen Purpurfärbung. Die als Wirk-65 sames identifizierendes Merkmal bezeichnete Orangefärbung tritt dort nur am Rand der Zelle bei geeigneter Fokussierung auf.
c) Die Konturen der Kerne sind ausserordentlich klar erkennbar, was die Differenzierung von Lymphozyten, Mono-

zyten und den verschiedenen Reifestadien der Granulozyten sehr erleichtert.

Ein weiterer Vorteil der erfundungsgemässen diagnostischen Mittel besteht darin, dass die Färbungen nicht mehr von den Qualitätsschwankungen der handelsüblichen Farbstoffe abhängen. Bei der technischen Herstellung grosser Stückzahlen ist die Reproduzierbarkeit bezüglich Farbstoffauftrag und -zusammensetzung von grösster Bedeutung.

Als Material für die Objektträger kann Glas verwendet werden. Sofern die Farbstoffe gemäss der Methode der DE-PS 2 515 869 aufgesprüht werden, können auch Kunststoffe verwendet werden, wobei die Farbstoffe natürlich auch auf Deckglässchen aus Glas oder Kunststoff aufgebracht sein können.

In den folgenden Beispielen soll die Erfindung näher erläutert werden.

Beispiel 1

Reinigung von Kresylviolettacetat

50 g Kresylviolettacetat (Matheson Coleman & Bell) werden in 100 ml Wasser suspendiert und 15 Min. kräftig gerührt. Danach wird der Farbstoff abgesaugt und zweimal mit je 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Der Filterrückstand wird in 1,6 ltr. Methanol unter Erwärmung gelöst und bei ca. 30° von den unlöslichen Anteilen abgesaugt. Das Filtrat wird langsam unter Röhren mit 3,5 ltr. Äther versetzt und unter Eiskühlung 30 Min. 25 nachgerührt. Die gebildeten Kristalle werden abgesaugt, in 620 ml Methanol unter Erwärmung gelöst, die Lösung auf 30° abgekühlt und der Farbstoff durch Zugabe von 1,85 ltr. Äther unter Röhren und Eiskühlung abgeschieden. Nach Absaugen und Waschen mit dreimal 120 ml Äther-Methanol (3:1) erhält man nach Trocknen über Diphosphorpentoxid 22 g Kresylviolettacetat in Form dunkelgrüner Kristalle. Zusammensetzung: ca. 82% Kresylviolettacetat, 8% Kresylviolettchlorid und 10% Wasser. Beim Erwärmen auf 150° tritt Zersetzung ein. Die Substanz ist nach chromatographischer Untersuchung (DC-Fer- 35

tigplatte Kieselgel 60 F 254 Merck, Laufmittelsystem Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) praktisch rein. R_F -Wert: 0.6.

Beispiel 2

Reinigung von Methylenblau N

In einem 4 ltr.-Dreihalskolben werden 100 g Methylenblau N (New Methylene Blue – Matheson Coleman & Bell) in 1 ltr. Wasser unter Röhren gelöst und mit 1 ltr. konzentrierter Salzsäure, $d = 1,18$, versetzt. Nach 4 Std. Röhren unter Eiskühlung, 8 Std. Stehen im Kühlschrank bei +5° saugt man die gebildeten 45 Kristalle ab, wäscht mit 400 ml eiskühlter 6 N Salzsäure und 500 ml Äther. Man erhält 36,5 g schwarze, metallisch glänzende Kristalle, Zersetzung ab 253°. Der gereinigte Farbstoff besteht aus 95–97% Methylenblau N-chlorid-Hydrochlorid und enthält

3–5% Wasser. Zink ist nur noch in Spuren vorhanden. Der Farbstoff ist nach chromatographischer Untersuchung (DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F 254 Merck, Laufmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) praktisch rein. R_F -Wert: 0,5.

5

Beispiel 3

Vorgefärbte Objektträger

Es wird eine Lösung folgender Zusammensetzung unter Verwendung der gemäss Beispiel 1 und 2 gereinigten Farbstoffe 10 hergestellt:

Methylenblau N-Hydrochlorid	130 mg
Kresylviolettacetat	270 mg
Methanol	ad 100 ml

15

Diese Lösung wird mit einem Wattebausch auf Objektträger als Film verstrichen und getrocknet oder aus einer 0,5 mm Breitstrahldüse (SS 60 67228-45 der Fa. Spraying Systems) mit einem Sprühwinkel von ca. 25° im Abstand von 20 cm durch eine Maske in einer Breite von 3 cm auf Objektträger gesprüht, die mit einer Geschwindigkeit von 1,5 m/min unter der Düse vorbeigeführt werden.

Sprühdruck: 1,2 atü; Flüssigkeitsdurchsatz durch die Düse 10 ml/min.

Bei einer mittleren Tröpfchengröße von ca. 20 μ beträgt die aufgebrachte Farbstoffmenge ca. 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Auf so hergestellte vorgefärbte Objektträger wird ein Blutstropfen von ca. 5–10 μl aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Nach ca. 3–5 Min. wird die Anfärbung unter dem 30 Mikroskop bei ca. 800-facher Vergrösserung unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs beurteilt.

Die einzelnen Partikel des Blutes stellen sich in folgender Anfärbung dar:

Retikulozyten:	purpurfarbenes Netzwerk innerhalb der kaum angefärbten Erythrozyten.
Neutrophile:	purpurfarbener Kern innerhalb eines fein granulierten fast farblosen Plasmas.
Eosinophile:	purpurfarbener Kern innerhalb eines grob granulierten gelben Plasmas.
Basophile:	dunkelpurpurfarbener Kern innerhalb eines mittelgross kompakt granulierten orangefarbenen Plasmas.
Lymphozyten:	purpurfarbener Kern mit hellpurpurfarbenem Plasma.
Monozyten:	wie Lymphozyten, nur grösser und mit mehr Plasma.
Thrombozyten:	kleine purpurfarbene Partikel.