

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

273 302

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 31/22

(21) PV 4009-77
(22) Přihlášeno 17 12 75
(30) Právo přednosti od 21 12 74
DE (P 24 60 903.8)

(40) Zveřejněno 14 08 90
(45) Vydáno 27 01 92

(72) Autor vynálezu

GÜTHLEIN WERNER RNDr., MANNHEIM-NECKARAN,
RITTERSDORF WALTER RNDr., MANNHEIM-WALDHOF,
TIEDEMANN HUGO RNDr., MANNHEIM-WALLSTADT,
VOGEL PETER RNDr., WEINHEIM, WERNER WOLF-
GANG RNDr., MANNHEIM-VOGELSTANG (DE)

(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH., MANNHEIM (DE)

(54)

Rychlotesty pro důkaz a stanovení
peroxidu vodíku a látek, reagujících
za tvorby peroxidu vodíku nebo pero-
xidicky účinných látek

(57) Řešení se týká rychlotestů pro důkaz
a stanovení peroxidu vodíku a látek, rea-
gujících za tvorby peroxidu vodíku nebo
periodicky účinných látek, a spočívá v
tom, že jako účinnou chromogenní látku
obsahují 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidín
obecného vzorce 9 ve kterém R₁, R₂, R₃ a
R₄ jsou stejné nebo rozdílné a znamenají
nižší alkylové skupiny s 1 až 6 atomy
uhlíku a přímým nebo rozvětveným řetěz-
cem.

Předmětem vynálezu jsou rychlotesty pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku a látek reagujících za tvorby peroxidu vodíku nebo peroxidicky účinných látek.

Reakce peroxidu vodíku s oxidačními indikátory za katalýzy peroxidázou nebo peroxidicky účinných látek za vzniku barevných sloučenin hraje v analytické chemii zvláštní úlohu, neboť dovoluje kromě důkazu vodíku a peroxidáz stanovit řadu látek, které reagují s kyslíkem a oxidázou za vzniku peroxidu vodíku. Dále jsou jako příklady uvedeny některé z těchto látek a v závorkách pak odpovídající oxidázy:

glukóza (glukózooxidáza), galaktóza (galaktooxidáza), L-aminokyseliny (oxidáza L-aminokyselin), cholesterolin (cholesterinoxidáza) a kyselina močová (urikáza). Jsou to především látky, jejichž důkaz má velký význam v lékařské diagnostice a v chemii potravin.

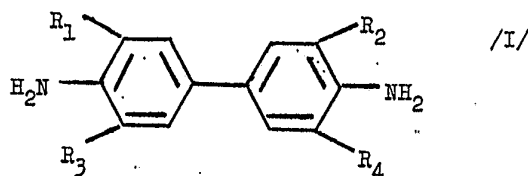
Jako reakce pro důkaz peroxidáz přichází v úvahu zejména metoda stanovení hemoglobinu, přičemž se místo peroxidu vodíku mohou jako oxidační prostředek používat také organické hydroperoxydy.

Shodně se svým velkým významem v lékařské rychlodiagnostice jsou téměř pro všechny shora jmenované reakce popsány tak zvané rychlotesty, které umožňují kvalitativní nebo kvantitativní stanovení jednotlivých reakčních složek. Při tom se používají nasákové nosiče nebo filmy, které obsahují všechny reagenty a na nich probíhá po styku se zkoumanou kapalinou v případě, že je přítomná látka o kterou jde, barevná reakce. Vzniklé zbarvení se určuje pomocí srovnávacích tabulek barev nebo se měří pomocí remisních fotometrů, takže se z intenzity zbarvení může usuzovat na koncentraci reagující látky.

Jako oxidační indikátory pro tyto rychlotesty je v literatuře a v patentech popsána řada sloučenin, avšak v praxi se jich prosadilo jen několik. Jedná se při tom výlučně o sloučeniny benzidínové řady a sice z těchto opět zejména o o-tolidin. Přes velké rozšíření tohoto indikátoru a jeho nepochybné přednosti oproti jiným známým indikátorům má ale o-tolidin i nedostatky. Za prvé není tato látka v recepturách pro rychlotesty vždy optimálně stálá, což může vést při delším skladování k nežádoucím zbarvením a ztrátám citlivosti. Za druhé není modrozelený radikálový kation, vznikající při reakci indikátoru příliš stálý, neboť přechází relativně snadno další oxidací v hnědý chinondiimin. Reakční zbarvení mají proto vzhledem k hnědému vedlejšímu zbarvení částečně špinavý charakter, přičemž se rychle mění a nelze je proto nejčastěji již krátce po předepsané době odčítání správně vyhodnotit. Při sériových analýzách a pro dokumentaci je toto rozhodujícím nedostatkem. Je sice možné stabilizovat radikálový kation anionickými smáčedly v určitém rozmezí, tyto nejsou ale vždy použitelné, neboť mohou působit destabilizačně na oxidázy při primární reakci.

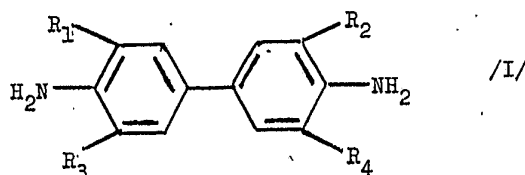
Nyní bylo s překvapením zjištěno, že se získají rychlotesty shora uvedeného druhu, které jsou trvanlivější a poskytují stálejší radikály barviva, když se místo o-tolidinu použije 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidín.

Podstata vynálezu, který se týká rychlotestů pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku a látek, reagujících za tvorby peroxidu vodíku nebo peroxidicky účinných látek, sestávající z nasákového nosiče nebo nabobtnávajícího filmu ze syntetické hmoty, impregnovaného impregnačním roztokem, který na 100 ml obsahuje 0,01 až 0,5 g peroxidázy, popřípadě 0,1 až 2 g hydroperoxidu, do 20 g pufru, například nebo morfolinetansulfonového, do 5 g smáčedla, například dioktylnatriumsulfojantarátu, lauroylsarkosinu, polyoxyethylensorbitanmonolaurátu, do 15 g aktivátoru například 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxidu a 0,1 až 1 g chromogenu spočívá v tom, že jako účinnou chromogenní látku obsahují 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidín obecného vzorce I



ve kterém R₁, R₂, R₃ a R₄ jsou stejné nebo různé a znamenají nižší alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou 1 až 4 atomy uhlíku a s přímým nebo rozvětveným řetězcem.

Předmětem vynálezu podle tohoto tedy jsou rychlotesty k důkazu a stanovení peroxidu vodíku a látek, které reagují za tvorby peroxidu vodíku nebo peroxidicky účinných látek sestávajících z nasádkavého nosiče nebo nabobtnávajícího filmu ze syntetické hmoty, které obsahují buď peroxidicky účinnou látku nebo hydroperoxid a chromogen, reagující za vzniku zbarvení s hydroperoxidem nebo peroxidicky účinnou látkou, jakož popřípadě i pufr, smáčedlo, zahušťovací prostředek a aktivátory, jejichž podstata spočívá v tom, že jako účinnou chromogenní látku obsahují 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidín obecného vzorce I



ve kterém R₁, R₂, R₃ a R₄ jsou stejné nebo různé a znamenají nižší alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou 1 až 4 atomy uhlíku a přímým nebo rozvětveným řetězcem.

Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I je znám, avšak blíže je až dosud charakterizován pouze 3-3', 5-5'-tetrametylbenzidín (V.R. Holland et al. Tetrahedron 30, 3299-3302 (1974)) a 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidín (R. Stroh et al. Angew. Chem. 69, 124-131 (1957)). Výroba tetrametylbenzidínu podle V.R. Hollanda et al. loc. cit., se prováděla o sobě známým způsobem redukcí známého 2,2', 6,6'-tetrametylazobenzenu zinkovým prachem a následujícím benzidínovým přesmykem.

Až dosud nepopsané sloučeniny 3,3'-dimetyl-5,5'-diethylbenzidín a 3,3', 5,5'-tetra-isopropylbenzidín se mohou vyrobit například podle Stroha et al. loc. cit., z o-toluidinu a etylenu, popřípadě z benzidínu a propylenu.

Další způsoby, které by měly být principiálně přístupné i pro ještě nepopsané vyšší alkylderiváty jsou následující:

- a) oxidace 2,6-dialkylanilinu alkalickým ferrikyanidem (srovn. V.R. Holland, loc.cit.)
G. Schulz, Ber. dtsch., chem. Ges. 17, 476-478 (1884);
E. Haselbach, Helv. chem. Acta. 53, 1526-1543 (1970).
- b) oxidace 2,6-dialkylanilinu kyslíčným stříbrným (srovn. B. Ortiz et al., J. Org. Chem. 37, 2748-2750 (1972)).
- c) redukce 2,6-dialkylnitrobenzenu lithiualuminiumpyridem (srovn. R.F. Nyström a H.C. Brown, J. Amer. chem. Soc. 70, 3738-3740 (1948)).
- d) reakce 2,6-dialkylbenzendiazoniových solí s amoniakálním roztokem jednocenné mědi (srovn. D. Vorländer a F. Mayer, Liebigs Ann. Chem. 320, 122-144 (1902)).

Další redukce tímto způsobem získaného azobenzenu na hydrazobenzenu a jejich (zčásti okamžitý) benzidinový přesmyk se provádí známými metodami (například Houben-Weyl X/2, 705-724 a X/1, 839-848).

Zásadní schopnost 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidinu, kterou lze očekávat na základě struktury pro důkaz okultního krvácení ve stolici a moči je popsána v uvedené práci V.R. Hollanda et al., přičemž jako přednost je vyzdvížena nižší kancerogenita oproti tolidinu. Neočekávaně větší stálost aminu a jeho radikálového kationtu v rychlostech není ale Hollandem popsána, neboť tento neprovedl odpovídající pokusy. Pro takové pokusy nevznikl také žádný popud, neboť využivatel rychlostů nemanipuloval přímo s činidly a otázka kancerogenity tedy pro něho nehraje prakticky žádnou roli.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou popsány také pro rychlotesty důkazu halogenidů popřípadě pseudohalogenidů v tělesných tekutinách (Can. Pat. Nr. 818 344). Tyto rychlotesty obsahují ještě sloučeniny dvojmočné mědi, které reagují s halogenidy za vzniku halogenidů jednocenné mědi a volných halogenů, které oxidují bezidinové sloučeniny. Tato oxidace vede zřejmě ke stejným barevným radikálovým kationtům jako oxidace hydroperoxidů katalyzovaná peroxidázou. V uvedeném patentu je z četných nárokováných derivátů výhodný o-tolidin (3,3'-dimetylbenzidin), z čehož lze učinit závěr, že tetraalkylbenzidiny jsou pro rychlotesty méně vhodné.

Větší stálost sloučenin obecného vzorce I a jejich radikálových kationtů je dále potud překvapující, že vlivem tlaku elektronů přídavných alkylových skupin by bylo možné spíše očekávat zvýšenou oxidovatelnost a tím i další reakci na hnědý chinondiimin.

Tetraalkylbenzidiny podle vynálezu se mohou použít ve všech případech, ve kterých byl až dosud používán o-tolidin, přičemž se mohou eventuálně trochu modifikovat známé receptury. Popřípadě se mohou pro stabilizaci barvy použít anionická smáčedla nahradit méně aktivními nebo úplně vynechat. Tak se mohou použít například tetraalkylbenzidiny v testovacích papírcích pro důkaz glukózy v moči, krve v moči, cholesterolu v séru, peroxidu vodíku v mléce nebo testovacích filmech pro stanovení glukózy v krvi a séru a v mnoha jiných testech. Všechny tyto testy se vyznačují tím, že barevné reakce jsou jasnější, stálější a zčásti lépe odstupňovány než při použití o-tolidinu, neboť modrozelená až zelená zbarvení radikálových kationtů tetraalkylbenzidinů nejsou zašpiněna podíly hnědého chinondiiminu.

U rychlostů, popsaných v následujících příkladech vystupují do popředí zejména vlastnosti tetraalkylbenzidinů podle vynálezu, přičemž jednotliví zástupci třídy sloučenin mohou mít popřípadě ještě obzvláště výhodné účinky: tak se ukazuje zvýšená stálost tetraalkylbenzidinů podle vzorce I oproti o-tolidinu zejména při skladování testovacích papírků pro důkaz krve v moči. Zvýšená stálost radikálových kationtů vede u testovacích filmů pro stanovení glukózy k tomu, že měření se může

provádět v relativně dlouhém časovém období. Použití tetraalkylbenzidinu při testu glukózy v moči vede k testovacím papírkům, u kterých reakční zbarvení zůstává po celé dny téměř nezměněno, což má obzvláštní význam pro časné diagnózy, při kterých diagnostici posílají použité testovací papírky do centrálních míst k vyhodnocování.

Na dalších příkladech má být vynález blíže vysvětlen:

Příklad 1

Testovací papírek pro důkaz krve v moči

Filtrační papír (Schleider a Schüll č. 23SL) se impregnuje následujícími roztoky a usuší se při 40 °C:

Roztok 1

1,2 molární citrátový pufr o pH 5,25	35,0 ml
etylendiaminotetraoctová kyselina, dvojsodná sůl	0,1 g
dioktylnatriumsulfojantarán	0,5 g
2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid (asi 70%ní)	1,6 g
trimorfolid kyseliny fosforečné	12,7 g
etanol	30,0 ml
destilovaná voda	ad 100,0 ml

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin	0,3 g
fenantridin	0,2 g
toluen	ad 100,0 ml

Získá se bílý testovací papírek, který se při namočení do moči, obsahující krev asi po 5 až 20 vteřinách zbarví modrozeleně. Jestliže jsou erytrocyty intaktní, tak jsou papírky modrozeleně tečkované. Jestliže dojde k hemolýze, nebo jestliže se nachází předem volný hemoglobin v moči, tak se papírky zbarví rovnoměrně modrozeleně. Citlivost se pohybuje asi okolo 5 erytrocytů/mm³ nebo odpovídajícího množství hemoglobinu. Nižší počet intaktních erytrocytů může za určitých okolností vyvolat ještě jednotlivé modrozelené body na testovacím papírku. Citlivost vůči hemoglobinu odpovídá citlivosti hemoglobinu.

Po třídním tepelným zatížením při 60 °C jsou testovací papírky zcela slabě nažloutle zbarveny, jejich citlivost zůstala v podstatě stejná, pouze reakční doby se prodloužily asi na 60 až 90 vteřin. Testovací papírek stejného složení s o-tolidinem namísto tetramethylbenzidinu je po stejném zatížení žlutohnědě zbarven, citlivost se pohybuje asi okolo 20 erytrocytů/mm³.

Papírky se stejnou citlivostí a stabilitou, které pouze o něco pomaleji a s čistou zelenou barvou reagují se získají při použití ekvimolárních množství 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidinu, 3,3'-dimethyl-5,5'-diethylbenzidinu nebo 3,3', 5,5'-tetraisopropylbenzidinu.

Příklad 2

Testovací papírek pro stanovení krve v moči

Jestliže se v receptuře z příkladu 1 nahradí dioktylnatriumsulfojantarán stejným množstvím lauroylsarkozinu nebo se zcela vynechá povrohově aktivní prostředek, tak se získají testovací papírky, které jsou sice o něco méně citlivé než v příkladě 1, které jsou ale vždy ještě citlivější než odpovídající papírky s o-tolidinem. Barevné reakce s močí, která obsahuje 50 hemolyzovaných erytrocytů/mm³ jsou shrnuty v dole uvedené tabulce.

	bez smáčedla	lauroylsarkozin
tetrametylbenzidin	slabě zelené	zelené
o-tolidin	slabě šedohnědé	slabě hnědozelené

Příklad 3

Testovací papírek pro důkaz glukózy v moči

Filtrační papír (Schleicher a Schüll 597 NF) se impregnují roztoky následujícího složení a usuší při 50 °C:

Roztok 1

Glukózooxidáza (70 U/mg)	222 mg
peroxidáza (70 U/mg)	28 mg
morfolinoetansulfonový pufr (pH 5, 1,0 M)	50 ml
tartrazin	80 mg
polyvinylpyrrolidon	300 mg
destilovaná voda	ad 100 ml

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin	600 mg
etanol	ad 100 ml

Stejným způsobem se vyrobí testovací papírky, které obsahují ekvimolární množství 3,3', 5,5'-tetraetylbenzidinu popřípadě o-tolidinu. Reakční zbarvení těchto testovacích papírků s močemi, obsahujícími glukózu asi po 60 až 120 vteřinách po namočení jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. U tetrametylbenzidinu zůstanou tato zbarvení asi 10 až 15 minut konstantní, při usušení dostanou spíše namodralý charakter a v této formě zůstanou stálé po celé dny. Zbarvení s tetraetylbenzidinem zblednou poněkud při sušení aniž by se změnila hodnota zbarvení a jsou potom po celé dny stálá.

Zbarvení získaná s o-tolidinem začnou již po 5 až 10 minutách žloutnout a blednout a jsou po usušení během 2 až 4 hodin vždy podle koncentrace glukózy zcela vybledlá nebo slabě olivověhnědá.

mg % glukóza	o-tolidin	tetrametylbenzidin	tetraetylbenzidin
0	žluté	žluté	žluté
50	světle zelené	světle zelené	světle zelené
100	zelené	modrozelené	středně zelené
250	modrozelené	zelenomodré	zelené
500	zelenomodré	modročerné	tmavozelené
1000	olivově černé	černé	hluboce zelené

Testovací papírky, které obsahují ekvimolární množství 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinu chovají se s ohledem na charakter a stálost reakčních barev prakticky tak jako papírky s tetraetylbenzidinem.

Příklad 4

Testovací papírky pro důkaz peroxidu vodíku

Filtrační papír byl impregnován následujícími roztoky a usušen při 40 °C.

Roztok 1

trojsodná sůl kyseliny citronové, dihydrát	225 mg
kyselina citronová, monohydrát	175 mg
peroxidáza (70 U/mg)	50 mg
natriumalginat	150 mg
polyoxyetylen sorbitanmonolaurat (Tween 20)	1300 mg
směsný polymer vinylpyrolidinu s vinylacetátem	375 mg
destilovaná voda	ad 100 mg

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin	500 mg
aceton	ad 100 ml

Takto vyrobený testovací papírek dává s peroxidem vodíku ve vodných roztocích, například mléce, modrozelené reakční zbarvení až do koncentrace 0,1 mg %.

Příklad 5

Testovací papírek pro důkaz cholesterolu a esterů cholesterolu v séru

Filtrační papír (Schleicher a Schüll 597 NF Ind.) se impregnuje roztoky následujícího složení a usuší se při 40 °C:

Roztok 1

1 molární citranový pufr pH 7	20,0 ml
cholesterinoxidáza (60 U/mg)	0,1 g
cholesteriesteráza (18 U/mg)	0,25 g

peroxidáza (70 U/mg)
destilovaná voda

0,05 g
ad 100,0 ml

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin
polyetylenoktylphenoleter (Triton X 100)
metylechlorid

0,28 g
0,5 g
ad 100,0 ml

Takto získané testovací papírky reagují se séry, které obsahují cholesterol a/nebo cholesterinester, za vzniku zelených barevných tónů, jejichž intenzita odpovídá koncentraci cholesterolu. Odpovídající testovací papírky, které obsahují místo tetrametylbenzidinu o-tolidin, reagují rovněž za vzniku zelených barevných tónů, které jsou ale méně intenzivní.

Příklad 6

Testovací film pro stanovení nižších obsahů glukózy v krvi nebo séru

Komponenty

disperze polyvinylacetátpropionanu (Propiofan 70 D)	45,0 g
1,85%ní roztok natriumalginátu v 0,5 m fosforečnanovém pufru o pH 5,5	35,0 g
natriumnonylsíran rozpuštěný v 5,0 ml vody	0,75 g
glukózooxidáza (62,7 U/mg)	0,189 g
peroxidáza (68,8 U/mg)	0,235 g
3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin rozpuštěný v 5 ml acetonu	0,68 g

Složky se dobře promísí, natřou se v tloušťce vrstvy 200 μ na fólii a 35 minut se suší při 60 °C. Nakapání krve obsahující glukózu a jejím otřením po 1 minutě poskytuje po dalších 2 minutách, při rozmezí obsahu glukózy od 5 až asi do 100 mg %, modrozelené reakční zbarvení stoupající intenzity, které se může změřit běžně prodávaným remisním fotometrem. Následující tabulka ukazuje kinetiku vývoje zbarvení při 60 mg % glukózy ve srovnání s testovacím filmem, ve kterém je místo tetrametylbenzidinu obsaženo 500 mg o-tolidinu. Jestliže se testovací film zahřívá 12 dní na 50 °C, tak nelze zjistit prakticky žádné zbarvení. Testovací film s o-tolidinem je naproti tomu silně žlutohnědě zbarven.

čas (min)	1	2	3	5	10
intenzita tetrametylbenzidinu (TMB)	88	87	85	84	85
intenzita o-tolidinu	73	68	64	60	67

mg % glukóza	o-tolidin	tetrametylbenzidín	tetraetylbenzidín
0	žluté	žluté	žluté
50	světle zelené	světle zelené	světle zelené
100	zelené	modrozelené	středně zelené
250	modrozelené	zelenomodré	zelené
500	zelenomodré	modročerné	tmavozelené
1000	olivově černé	černé	hluboce zelené

Testovací papírky, které obsahují ekvimolární množství 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinu chovají se s ohledem na charakter a stálost reakčních barev prakticky tak jako papírky s tetraetylbenzidinem.

Příklad 4

Testovací papírky pro důkaz peroxidu vodíku

Filtrační papír byl impregnován následujícími roztoky a usušen při 40 °C.

Roztok 1

trojsodná sůl kyseliny citronové, dihydrát	225 mg
kyselina citronová, monohydrát	175 mg
peroxidáza (70 U/mg)	50 mg
natriumalginat	150 mg
polyoxyetylen sorbitan monolaurat (Tween 20)	1300 mg
směsný polymer vinylpyrolidinu s vinylacetátem	375 mg
destilovaná voda	ad 100 mg

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín	500 mg
aceton	ad 100 ml

Takto vyrobený testovací papírek dává s peroxidem vodíku ve vodných roztocích, například mléce, modrozelené reakční zbarvení až do koncentrace 0,1 mg %.

Příklad 5

Testovací papírek pro důkaz cholesterolu a esterů cholesterolu v séru

Filtrační papír (Schleicher a Schüll 597 NF Ind.) se impregnuje roztoky následujícího složení a usuší se při 40 °C:

Roztok 1

1 molární citranový pufr pH 7	20,0 ml
cholesterinoxidáza (60 U/mg)	0,1 g
cholesteriesteráza (18 U/mg)	0,25 g

peroxidáza (70 U/mg)	0,05 g
destilovaná voda	ad 100,0 ml

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín	0,28 g
polyetylenoktylfenoleter (Triton X 100)	0,5 g
metylechlorid	ad 100,0 ml

Takto získané testovací papírky reagují se séry, které obsahují cholesterol a/nebo cholesterinester, za vzniku zelených barevných tónů, jejichž intenzita odpovídá koncentraci cholesterolu. Odpovídající testovací papírky, které obsahují místo tetrametylbenzidinu o-tolidin, reagují rovněž za vzniku zelených barevných tónů, které jsou ale méně intenzivní.

Příklad 6

Testovací film pro stanovení nižších obsahů glukózy v krvi nebo séru

Komponenty

disperze polyvinylacetátpropionanu (Propiofan 70 D)	45,0 g	
1,85%ní roztok natriumalginátu v 0,5 M fosforečnanovém pufru o pH 5,5	35,0 g	
natriumnonylsíran rozpuštěný v 5,0 ml vody	0,75 g	
glukózooxidáza (62,7 U/mg)	} rozpuštěné v 10 ml vody	0,189 g
peroxidáza (68,8 U/mg)		0,235 g
3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín rozpuštěný v 5 ml acetonu		0,68 g

Složky se dobře promísí, natřou se v tloušťce vrstvy 200 μ na fólii a 35 minut se suší při 60 °C. Nakapání krve obsahující glukózu a jejím otřením po 1 minutě poskytuje po dalších 2 minutách, při rozmezí obsahu glukózy od 5 až asi do 100 mg %, modrozelené reakční zbarvení stoupající intenzity, které se může změřit běžně prodávaným remisním fotometrem. Následující tabulka ukazuje kinetiku vývoje zbarvení při 60 mg % glukózy ve srovnání s testovacím filmem, ve kterém je místo tetrametylbenzidinu obsaženo 500 mg o-tolidinu. Jestliže se testovací film zahřívá 12 dní na 50 °C, tak nelze zjistit prakticky žádné zbarvení. Testovací film s o-tolidinem je naproti tomu silně žlutohnědě zbarven.

čas (min)	1	2	3	5	10
intenzita tetrametylbenzidinu (TMB)	88	87	85	84	85
intenzita o-tolidinu	73	68	64	60	67

Příklad 7

Testovací film pro stanovení normálního a zvýšeného obsahu glukózy v krvi a séru

Testovací film se vyrobí podle příkladu 6, tento obsahuje dodatečně 0,050 g 9-(β -aminopropyl)-3-aminokarbazoldihydrochloridu. Nakapání krve, obsahující glukózu a její setření po 1 minutě poskytuje po další minutě následující reakční zbarvení:

60 mg % glukózy	- okrové
120 mg % glukózy	- olivové
180 mg % glukózy	- modrozelené s proměnnou hloubkou zbarvení

Tyto barvy se samy o sobě nemění při dvoudenním uchovávání v atmosféře laboratoře. U analogického testovacího filmu, který obsahuje 0,600 g o-tolidinu a 0,025 g 9-(β -aminopropyl)-3-aminokarbazoldihydrochloridu se mění modrozelené zbarvení směrem k žlutozeleným tónům.

Dobu trvání stálosti barvy při obsahu 150 mg % glukózy, měřeno na reflomatu ukazuje následující tabulka

doba (hod)	0	1	2	4	8	24
TMB	61	62	62	62	62	62
o-tolidin	51	52	51	50	47	42

Jestliže se testovací film zahřívá 12 dní na 50 °C, tak nelze zjistit prakticky žádné zbarvení a vyhodnocení pomocí srovnávacích barev je nesporně možné. Testovací proužky, obsahující o-tolidin jsou naproti tomu silně žlutohnědě zbarveny a srovnání s barevnou škálou již není možné.

V následujících příkladech je popsána výroba dvou až dosud neznámých sloučenin obecného vzorce I.

Příklad 8

3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidín

Varianta I

Ve dvoulitrové tříhrdlé baňce s míchadlem a kapací nálevkou a teploměrem se suspenduje 96,5 g (0,564 mol) 2-metyl-6-etylanilinhydrochloridu ve směsi se 79,5 ml koncentrované kyseliny solné ($d = 1,18$) a 350 ml vody a za dobrého chlazení ledem se při 0 až 3 °C přikape roztok 39 g dusitanu sodného ve 150 ml vody během 30 minut za míchání. Potom se míchá ještě asi 1 hodinu při 0 až 3 °C a roztok diazoniové soli se zředí přidáním 600 ml ledové vody.

Mezitím se v 6ti litrové tříhrdlé baňce s míchadlem, kapací nálevkou a teploměrem (Y-kusem) rozpustí 210 g síranu měďnatého v 900 ml vody a doplní 363 ml koncentrovaného amoniaku ($d = 0,88$). Potom se rozpustí 90 g hydroxylamoniumchloridu ve 150 ml vody a za chlazení ledem se přikape roztok 95 g hydroxidu draselného v 72 ml vody. Tento dobře ochlazený roztok se přidá při 10 až 15 °C pod dusíkem během 15 minut k míchanému roztoku tetraminu měďnatého, přičemž vznikne světlemodrý komplex soli

jednomocné mědi. Za chlazení ledem, mohutného míchání a pod dusíkem se nyní při 12 až 15 °C přikape během 1,5 hodiny ochlazený roztok diazoniové soli (kapací nálevka je opatřena zaváděcí trubicí, která ohnutím ve tvaru U dosahuje pod povrch roztoku soli mědi). Po ukončeném přidávání se míchá ještě jednu hodinu, potom se reakční roztok vytřepe s 4 x 200 ml eteru. Spojené eterické roztoky se protřepou 3 x 50 ml 25%ního sodného louhu, 2 x 100 ml vody, 3 x 100 ml 2N kyseliny solné a 2 x 100 ml vody. Získá se 55,4 g azosloučeniny ve formě červeného oleje. Chromatografické dělení na křemelině (výška náplně 100 cm, průměr sloupce 4,8 cm) se směsí chloroformu s ligroinem 1 : 4 (množství křemeliny 1,5 kg, průměr 0,063 až 0,2 mm) dává 33,7 g čistého 2,2'-dimetyl-6,6'-dietylazobenzenu ve formě červeného oleje. Tento se rozpustí v 1,6 litru dietyleteru, přidá se 330 ml etanolu, potom roztok 135 g amoniumchloridu v 1,5 litru vody a za mohutného míchání se po částech přidá při 22 °C 300 g zinkového práchu. Po 5ti hodinovém míchání je redukce ukončena. Téměř úplně se oddělí odbarvená, organická fáze a vodná vrstva se protřepe třikrát vždy 250 ml eteru. Spojené eterické extrakty se potom doplní 210 ml 3N kyseliny sírové a míchají. Při tom se vytvoří síran ve formě bezbarvé, nejdříve lepivé sraženiny. Po přidavku 200 ml etanolu se získá 30,5 g 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinsíranu ve formě bezbarvých krystalů. Tento produkt se vnese do 150 ml vroucí vody, za míchání se ochladí na teplotu místnosti, doplní se 200 ml 2N louhu sodného a extrahuje se 4 x 100 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se usuší nad síranem sodným a zahustí. Zbytek 22,5 g světlehnědých krystalů. Tento surový produkt se překrystaluje ze směsi metanolu s vodou. Získá se 23 g = 30,4 % přibarvených krystalů, t.t. 69 až 70 °C.

Dihydrochlorid ($C_{18}H_{24}N_2 \cdot 2HCl$) taje při 289 až 291 °C (rozklad).

Variananta II

1,5 g hliníku a 0,1 g chloridu rtuťného se zahřívá se 75 g anilínu v autoklávu na 300 °C, přičemž se hliník rozpustí za vývoje vodíku. Po ochlazení se přidá 92 g o-tolidínu a 4,5 g bezvodého chloridu hlinitého. Potom se zahřeje na teplotu 280 až 300 °C a vtlačí se etylen s tlakem 200 atm. Asi po 3 hodinách je pohlcování etylenu ukončeno. Potom se ochladí a reakční hmota se vytřepe se zředěným louhem sodným. Z organické fáze se ve vakuu oddestiluje 2-etylanilin a 2,6-dietylanilin (až asi 120°/10 mm).

Zbytek se vícekrát překrystaluje ze zředěné kyseliny solné. Získá se dihydrochlorid 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinu.

T.t. 288 až 292 °C (rozklad).

Příklad 9

3,3', 5,5'-tetraisopropylbenzidín

Roztok 100 g 2,6-diisopropylanilinu ve 1280 ml vody a 102 ml koncentrované kyseliny solné ($d = 1,18$) se zahřívá na 90 °C a potom se rychle přikape k 97 °C horkému roztoku, sestávajícímu z hexakvanoželezitanu draselného v 5100 ml vody a 143 g hydroxidu sodného. V důsledku vzniklé volné kyseliny kyanovodíkové se pracuje za použití dobře odtahujícího odtahu. Vzniklá červeně zbarvená suspence se míchá ještě 15 minut, ochladí se a vytřepe 6 x 300 ml eteru. Eterické extrakty se usuší nad síranem sodným, odsají a zahustí. Získá se 97 g azosloučeniny ve formě červeného oleje. Chromatografické dělení na křemelinovém sloupci (výška náplně 110 cm, průměr sloupce 8 cm)

se směsí chloroformu s ligroinem 1 : 4 (množství křemeliny 1,5 kg, průměr 0,05 až 0,2 mm) poskytne 32,45 g cihlově červených krystalů. T.t. 134 až 136 °C.

Azosloučenina se rozpustí v 500 ml ledové kyseliny octové, přidá se 150 g prachového zinku a 30 minut se zahřívá za míchání pod zpětným tokem. Potom se odsaje přebytečný zinkový prášek a rozpouštědlo se ve vakuu zahustí. Získá se 17,5 g bezbarvých krystalů, tyto se smíchávají se 150 ml vody, přidá se 150 ml 2N louhu sodného a protřepe se třikrát vždy se 150 ml chloroformu. Při tom se získá 12,4 g surového 3,3', 5,5'-tetra-isopropylbenzidinu; tento se doplní 90 ml acetanhydridu, krátce se povaří a přebytečný acetanhydrid se odpaří na rotačním odpařovači. Zbytek se rozpustí ve 20 ml isopropanolu, přidá se 180 ml ligroinu a vzniklé krystaly se odsají. Získaná N,N'-diacetylsloučenina se ještě jednou překrystaluje ze směsi isopropanolu s ligroinem 2 : 1. Izoluje se 7,6 g bezbarvých krystalů, t.t. 366 °C. Tyto se pro odštěpení N-acetyl-skupin zahřívají ve směsi, sestávající ze 180 ml ledové kyseliny octové a 50 ml koncentrované kyseliny solné v autoklávu 6 hodin na 130 až 140 °C.

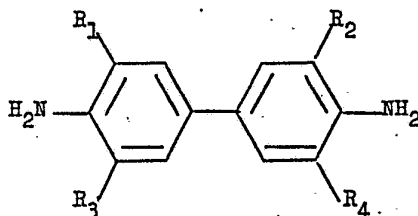
Potom se reakční roztok zahustí, zbytek se doplní 200 ml 2N sodného a uvolňná báze se extrahuje 4 x 50 ml chloroformu. Chloroformové extrakty se usuší nad síranem sodným, odsají a zahustí. Při tom se získá 3,3', 5,5'-tetraisopropylbenzidin ve formě nahnědlého oleje.

Výtěžek 5,6 g (mol. váha 352).

Dihydrochlorid ($C_{24}H_{36}N_2 \cdot 2HCl$) taje při 263 až 265 °C (rozklad).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Rychlotesty pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku a látek, reagujících za tvorby peroxidu vodíku nebo peroxidicky účinných látek, sestávající z nasákavého nosiče nabobtnávajícího filmu ze syntetické hmoty, impregnovaného impregnačním roztokem, který na 100 ml obsahuje 0,01 až 0,5 g peroxidázy, popřípadě 0,1 až 2 g hydroperoxidu, do 20 g pufru, například citrátového nebo morfolinethansulfonového, do 5 g smědla, například dioktylnatriumsulfojantarátu, lauroylsarkosinu, polyoxyethylensorbitanmonolaurátu, do 15 g aktivátoru například 2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxidu a 0,1 až 1 g chromogenu, vyznačující se tím, že jako účinnou chromogenní látku obsahují 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidin obecného vzorce I.



/I/

ve kterém R₁, R₂, R₃ a R₄ jsou stejné nebo různé a znamenají nižší alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou 1 až 4 atomy uhlíku a přímým nebo rozvětveným řetězcem.