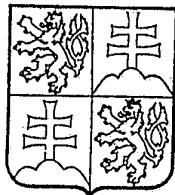


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

273 301

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
G 01 N 31/22
C 07 C 211/47

(21) PV 8622-75

(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-NECKARAU,
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)

3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin a
3,3', 5,5'-tetraethylbenzidin jakožto
oxidační indikátory při rychlotestech

(57) Použití 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidinu a 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidinu jako oxidačních indikátorů při rychlotestech pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku, látek reagujících za tvorby peroxidu vodíku a peroxidicky účinných látek.

Vynález se týká použití 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidínů s 1 nebo 2 atomy uhlíku v alkylovém podílu jako oxidačních indikátorů při rychlostestech pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku, látek reagujících za tvorby peroxidu vodíku a peroxidicky účinných látek.

Reakce peroxidu vodíku s oxidačními indikátory za katalýzy peroxidázou nebo peroxidicky účinných látek za vzniku barevných sloučenin má v analytické chemii zvláštní úlohu, neboť umožňuje kromě důkazu peroxidu vodíku a peroxidáz stanovit četné látky reagující s kyslíkem a oxidázou za vzniku peroxidu vodíku. Dále se uvádějí takové látky a v závorce vždy odpovídající oxidázy: glukóza (glukózooxidáza), galaktasa (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 prostředky používat také organické hydroperoxydy.

Pro velký význam v lékařské rychlodiagnostice jsou téměř pro všechny shora uvedené reakce popsány tak zvané rychlotesty, které umožňují kvalitativní nebo kvantitativní stanovení jednotlivých reakčních složek. Přitom 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 stanovit koncentrace 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 téměř výlučně o sloučeniny benzidinové řady, 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 ztrátě citlivosti. Za druhé není modrozelený radikálový kation, vznikající při reakci indikátoru, příliš stálý, neboť přechází relativně snadno další oxidací v hnědý chinodimin. Reakční zbarvení mají proto vzhledem k hnědému vedlejšímu zbarvení částečně špinavý charakter, přičemž se rychle mění, nelze je proto nejčastěji již krátce po předepsané době odečítání správně vyhodnotit. Při sériových analýzách a pro dokumentaci je to rozhodující nedostatek. Je sice možné stabilizovat radikálový kationt anionickými smáčedly v určité míře, tato smáčedla nejsou však vždy použitelná, jelikož mohou působit destabilizačně na oxidázy při primární reakci.

Nyní se s překvapením zjistilo, že se získají rychlotesty shora uvedeného druhu, které jsou trvanlivější a poskytují stálejší radikály barviva, jestliže se místo o-tolidinu použije 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidinu nebo 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidinu. Vynález se tedy týká použití 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidinu a 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidinu jako indikačních indikátorů při rychlostech k důkazu a stanovení peroxidu vodíku, látek, které reagují za vzniku peroxidu vodíku a peroxidicky účinných látek.

Způsob výroby 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidínů je znám, avšak až dosud je přesně charakterizován toliko 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin například teplotou tání 168 °C a 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidin například teplotou tání v čisté formě 346 až 348 °C (ve formě dihydrochloridu 229 až 231 °C). Tetramethylbenzidin se podle V. R. Hollanda a kol. [Tetrahedron 30, 3299-3302 (1974)] vyrábí o sobě známým způsobem redukcí známého tetramethylbenzenu zinkovým práchem a následným benzidinovým přesmykem. Podle R. Stroha a kol. [Angew. Chem. 69, 124-131 (1957)] se 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidin

připravuje ethylací benzidinu.

Zásadní schopnost 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidinů s 1 nebo 2 atomy uhlíku v alkylovém podílu, kterou lze očekávat na základě struktury těchto sloučenin, pro důkaz okultního krvácení ve stolici a moči, je popsána v uvedené práci V. R. Hollanda a kol., přičemž jako přednost se zdůrazňuje nižší kancerogenita oproti tolidinu. Neočekávatelně větší stálost aminu a jeho radikálového aniontu v rychlostech není však Hollandem popsána, jelikož neprovedl odpovídající zkoušky, a proto tuto vlastnost ani nemohl zjistit. Pro takové zkoušky nevznikl ani popud, neboť uživatel rychlotestů nemani-puloval přímo s činidly a otázka kancerogenity pro něho tedy neměla význam.

3,3', 5,5'-Tetraalkylbenzidiny s 1 nebo 2 atomy uhlíku jsou popsány také pro rychlotesty k důkazu halogenidů, popřípadě pseudohalogenidů v tělesných tekutinách (kan. patent č. 818 344). Při těchto rychlostech se používá ještě sloučenina dvojmocné mědi, které reagují s halogenidy za vzniku halogenidů jednomocné mědi a volných halogenů, které oxidují benzidinové sloučeniny. Tato oxidace vede zřejmě ke stejným barevným radikálovým kationtům jako oxidace hydroperoxydů katalyzovaná peroxidázou. V uvedeném patentovém spisu je z četných nárokováných derivátů benzidinu uváděn jako výhodný o-tolidin (3,3'-dimethylbenzidin), z čehož lze usuzovat, že tetraalkylbenzidiny se považují pro rychlotesty jako méně vhodné.

Vysoká stálost 3,3', 5,5'-tetraalkylbenzidinů a jejich radikálových kationtů, na které je vynález založen, je překvapující také proto, že vlivem tlaku elektronů přídavných alkylových skupin by bylo možno spíše očekávat zvýšenou oxidovatelnost a tím i další reakci na hnědý chinondiimin.

Tetraalkylbenzidiny se podle vynálezu mohou používat ve všech případech, ve kterých byl až dosud používán o-tolidin, přičemž se mohou popřípadě trochu modifikovat známé receptury. Popřípadě se mohou pro stabilizaci barvy použít anionická smáčedla nahradit méně aktivními nebo zcela vynechat. Tak se mohou použít například tetraalkylbenzidiny v testovacích papírkách pro důkaz glukózy v moči, krve v moči, cholesterolu v séru, peroxidu vodíku v mléce nebo se mohou použít v 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 zabarvení radikálových kationtů tetraalkylbenzidinů nejsou zašpiněna podíly hnědého chinondiiminu.

U rychlotestů, popsaných v následujících příkladech praktického provedení, vystupují do popředí zejména překvapivé vlastnosti tetraalkylbenzidinů s 1 nebo 2 atomy uhlíku, zejména jejich zvýšená stálost ve srovnání s o-tolidinem zvláště při skladování testovacích papírků pro důkaz krve v moči. Zvýšená stálost radikálových kationtů v případě testovacích filmů pro stanovení glukózy umožňuje provádět měření v relativně dlouhém časovém období. Použití tetraethylbenzidinu při testu glukózy v moči vede k testovacím papírkům, u kterých reakční zabarvení zůstává po celé dny téměř nezměněno, což má zvláštní význam pro časné diagnózy, při kterých diagnostici posílají použité testovací papírky do centrálních míst k vyhodnocení.

Následující praktické příklady vynález blíže objasňují, nijak jej však neomezuje.

Příklad 1

Testovací papírek pro důkaz krve v moči

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

Roztok 1

1,2 molární citrátový pufr o pH 5,25	35,0 ml
dvojsodná sůl etylendiamintetraoctové kyseliny	0,1 g
dioktylnatriumsulfojantaran	0,5 g
2,5-dimethylhexan-2,5-dihydroperoxid 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 po 5 až 20 s zbarví modrozeleně. Jestliže jsou erythrocyty intaktní, jsou papírky modrozeleně tečkované. Jestliže dojde k hemolýze nebo jestliže se nachází předem volný hemoglobin v moči, papírky se zbarví rovnoměrně modrozeleně. Citlivost se pohybuje okolo 5 erythrocytů/mm³ nebo odpovídajícího množství hemoglobinu. Nižší počet intaktních erythrocytů může za určitých okolností vyvolat ještě jednotlivé modrozelené body na testovacím papírku. Citlivost vůči myoglobinu odpovídá citlivosti hemoglobinu.

Po třídním teplotním zatížení při 60 °C jsou testovací papírky zcela slabě nažloutle zbarveny, jejich citlivost zůstala v podstatě stejná, pouze reakční doby se prodloužily na 60 až 90 s. Testovací papírek stejného složení s o-tolidinem namísto tetramethylbenzidinu je po stejném zatížení žlutohnědě zbarven, citlivost se pohybuje okolo 20 erythrocytů/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 dioktylnatriumsulfojantaran stejným množstvím lauroylsarkozinu nebo se zcela vynechá povrchově aktivní prostředek, získají se testovací papírky, které jsou sice o něco méně citlivé než v příkladu 1, které jsou ale vždy ještě citlivější než odpovídající papírky s o-tolidinem. Barevné reakce s močí, která obsahuje 50 hemolyzovaných erythrocytů/mm³ jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

	bez smáčedla ...	lauroylsarkosin
tetramethylbenzidin	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
morfolinoetansulfonátový pufr (pH 6, 1,0 M)	50 ml
tartrazin	80 mg
polyvinylpyrrolidin	300 mg
destilovaná voda	ad 100 ml

Roztok 2

3,3', 5,5'-tetrametylbenzidín	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 po 60 až 120 s po namočení jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. U tetrametylbenzidinu zůstanou tato zbarvení 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 měnila hodnota zbarvení a jsou potom po celé dny stálé.

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

Tabulka 2

mg % glukózy ve 100 ml roztoku	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, se chovají s ohledem na charakter a stálost reakčních barev 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

trojnásobná sůl kyseliny citronové, dihydrát	225 mg
kyselina citronová, monohydrát	175 mg
peroxidáza (70 U/mg)	50 mg
natriumalginát	150 mg
polyoxyetylen sorbitanmonolaurát (Tween 20)	1300 mg
kopolymér vinylpyrrolidinu 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 na 100 ml roztoku.

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
cholesterinesteráza (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'-tetrametylbenzidin	0,28 g
polyetylenokrylfenoleter (Triton X 100)	0,5 g
metylenchlorid	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 místo tetrametylbenzidinu obsahují 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

disperse polyvinylacetátpropionanu (Propiofan 70 D)	45,0 g	
1,85%ní roztoku 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, natrou se v tloušťce vrstvy 200 μm na fólii a 35 minut se suší při 60 °C. Nakapání krve obsahující glukózu a její měření po 1 minutě poskytuje po dalších 2 minutách, při rozmezí obsahu glukózy od 5 až do 100 mg na 100 ml roztoku, modrozelené reakční zbarvení stoupající intenzity, které se může změřit běžně prodáváním remisním fotometrem. Následující tabulka 3 ukazuje kinetiku vývoje zbarvení při 60 mg glukózy ve 100 ml roztoku 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, nelze zjistit prakticky žádné zbarvení. Testovací film s o-tolidinem je naproti tomu velmi silně žlutohnědě zbarven.

Tabulka 3

čas (min)	1	2	3	5	10
intenzita tetrametylbenzidinu (dále 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-(γ -aminopropyl)-3-aminokarbazoldihydrochlorid. Nakapání krve obsahující glukózu a její setření po jedné minutě poskytuje po další minutě následující reakční zbarvení:

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

(vždy ve 100 ml roztoku)

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-(γ -aminopropyl)-3-aminokarbazoldihydrochloridu se mění modrozelené zbarvení

směrem k žlutozeleným tónům.

Dobu trvání stálosti barvy při obsahu 150 mg glukózy na 100 ml roztoku, měřeno na re-flomatu, ukazuje následující tabulka 4.

Tabulka 4

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

Jestliže se testovací film zahřívá 12 dní na 50 °C, nelze zjistit žádné změny 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 zmíněných shora.

Příklad 8

3,3'-Dimetyl-5,5'-dietylbenzidín

Varianta I

Ve dvoulitrové tříhrdlé baňce s míchadlem, kapací nálevkou a teploměrem se suspenduje 96,5 g (0,564 mol) 2-metyl-6-etylanilinhydrochloridu ve směsi se 79,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($d = 1,18 \text{ g/cm}^3$) a 330 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 přídavkem 600 ml ledové vody.

Mezitím se v 6ti litrové tříhrdlé baňce s míchadlem, kapací nálevkou a teploměrem (Y-kusem) se rozpustí 210 g síranu měďnatého v 900 ml vody a doplní 363 ml koncentrovaného amoniaku ($d = 0,88 \text{ g/cm}^3$). 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 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 ukončení přidávání se míchá ještě jednu hodinu, potom se reakční roztok vytřepe s 4 x 200 ml eteru. Spojené eterické extrakty se protřepou 3 x 50 ml 25% hydroxidu sodného, 2 x 100 ml vody, 3 x 100 ml 2N kyseliny chlorovodíkové a 2 x 100 ml vody. Získá se 55,4 g azosloučeniny ve formě červeného oleje. Chromatografické dělení na silikagelu (výška náplně 100 cm, průměr sloupce 4,8 cm) se směsí chloroformu s ligoinem 1 : 4 (množství silikagelu 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, který 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 prachu. 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. Přitom se vytvoří síran ve formě bezbarvé, nejdříve lepivé sraženiny. Po přidavku 200 ml etanolu se získá 30,5 g 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinsulfátu 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 hydroxidu sodného a extrahuje se 4 x 100 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se usuší síranem sodným a zahustí. Zbytek, 22,5 g světlehnědých krystalů 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).

Varianta II

1,5 g hliníku a 0,1 g chloridu rtuťného se zahřívá se 75 g anilinu v autoklávu na 300 °C, přičemž se hliník rozpustí za vývoje vodíku. Po ochlazení se přidá 92 g o-tolidinu a 4,5 g bezvodého chloridu hlinitého. Potom se vše zahřeje na teplotu 280 až 300 °C a vtlačí se etylen s tlakem 20 MPa. Asi po 3 hodinách je pohlcování etylenu ukončeno. Autokláv se ochladí a reakční hmota se vytřepe se zředěným hydroxidem sodným. Z organické fáze se ve vakuu oddestiluje 2-etylanilin a 2,6-dietylanilin (až 120 °C/1,3 kPa).

Zbytek se několikrát překrystalizuje ze zředěné kyseliny chlorovodíkové. Získá se dihydrochlorid 3,3'-dimetyl-5,5'-dietylbenzidinu.

T.t. 288 až 292 °C (rozklad).

Příklad 9

3,3', 5,5'-Tetraisopropylbenzidin

Roztok 100 g 2,6-diisopropylanilinu ve 1 280 ml vody a 102 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové ($d = 1,18 \text{ g/cm}^3$) se zahřívá na 90 °C a potom se rychle přikape k 97 °C horkému roztoku složenému z hexakynoželezitanu draselného v 5 100 ml vody a 143 g hydroxidu sodného. V důsledku vzniklé volné kyseliny kyanovodíkové se pracuje za použití dobře odtahující digestoře. Vzniklá červeně zbarvená suspenze se míchá ještě 15 minut, ochladí se a vytřepe 6 x 300 ml eteru. Eterické extrakty se suší síranem sodným, odsají a zahustí. Získá se 97 g azosloučeniny ve formě červeného oleje. Chromatografické dělení na sloupci silikagelu (výška náplně 110 cm, průměr sloupce 8 cm) se směsí chloroformu s ligroinem 1 : 4 (množství silikagelu 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 smíchají se 150 ml vody, přidá se 150 ml 2N hydroxidu sodného a protřepe se třikrát vždy se 150 ml chloroformu. Přitom se získá 12,4 g surového 3,3', 5,5'-tetraisopropylbenzidinu; 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 v poměru 2 : 1. Izoluje se 7,6 g bezbarvých krystalů, t.t. 366 °C. Tyto se

pro odštěpení N-acetylskupin zahřívají ve směsi složené ze 180 ml ledové kyseliny octové a 50 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové v autoklávu 6 hodin na 130 až 140 °C.

Potom se reakční roztok odpaří, odparek se doplní 200 ml 2N hydroxidu sodného a uvolněná báze se extrahuje 4 x 50 ml chloroformu. Chloroformové extrakty se suší síranem sodným, odsají a zahustí. Přitom se získá 3,3', 5,5'-tetraisopropylbenzidin ve formě nahnědlého oleje.

Výtěžek 5,6 g (mol. hmot. 352).

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

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Použití 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidinu nebo 3,3', 5,5'-tetraethylbenzidinu jako oxidačních indikátorů při rychlotestech pro důkaz a stanovení peroxidu vodíku, látek reagujících za tvorby peroxidu vodíku a peroxidicky účinných látek.