



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

MKP G01n 33/16

Zgłoszono: 20.12.75 (P. 185741)

Pierwszeństwo: 21.12.74 Republika Federalna
Niemiec

Int. Cl.² G01N 33/16

Zgłoszenie ogłoszono: 20.11.76

Opis patentowy opublikowano: 15.09.1978

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
(Republika Federalna Niemiec)

**Środek analityczny do wykrywania i oznaczania nadtlenków
i substancji działających nadtlenkowo**

1 Przedmiotem wynalazku jest środek analityczny do wykrywania i oznaczania nadtlenków i substancji działających nadtlenkowo.

Reakcja nadtlenku wodoru ze wskaźnikami utleniania katalizowana peroksydazą lub substancjami działającymi nadtlenkowo, prowadząca do związków barwnych, odgrywa w chemii analitycznej szczególną rolę, ponieważ poza wykrywaniem nadtlenku wodoru i peroksydaz pozwala ona także na oznaczenie szeregu substancji, które z tlenem i oksydazą reagują tworząc nadtlenek wodoru. Niżej wyliczono przykładowo niektóre z tych substancji a w nawiasach im odpowiadające oksydazy: glikoza (oksydaza glikozowa), galaktoza (oksydaza galaktozowa), L-aminokwas (oksydaza L-aminokwasowa), cholesterol (oksydaza cholesterolowa) i kwas moczowy (oksydaza moczanova). Przede wszystkim są to substancje, których wykrywanie i oznaczanie ma ważne znaczenie w diagnostyce medycznej i w chemii środków spożywczych.

Jako reakcja wykrywająca peroksydazy nadaje się ta metoda zwłaszcza przy oznaczaniu hemoglobiny, przy czym zamiast nadtlenku wodoru jako utleniacz można stosować wodoronadtlenki organiczne.

Ze względu na swe wielkie znaczenie w szybkościowej diagnostyce medycznej są dla prawie wszystkich wyżej wymienionych reakcji opisane środki analityczne, które umożliwiają jakościowe

2 i ilościowe oznaczanie poszczególnych składników reakcji. Stosuje się przy tym nasączalne nośniki lub filmy, które zawierają wszystkie odczynniki i w których po zetknięciu z cieczą badaną zachodzi reakcja barwna, o ile obecna jest w niej substancja poszukiwana. Utworzoną barwę ocenia się za pomocą porównawczych tablic barwnych lub na fotometrach remisyjnych tak, że można wnioskować o stężeniu substancji reagujących.

Jako wskaźniki utleniania dla tych środków analitycznych zalecano w literaturze fachowej i patentach szereg związków, jednak tylko kilka z nich zyskało uznanie w praktyce. Chodzi przy tym prawie wyłącznie o związki z szeregu benzydynowego i to zwłaszcza o o-tolidynę. Pomimo szerokiego rozpowszechnienia tego wskaźnika i jego niewątpliwych zalet w porównaniu z innymi znanymi wskaźnikami ma o-tolidyna jednak także wady. Jedną z nich jest to, że substancja ta w recepturach dla środków analitycznych nie zawsze jest optymalnie trwała, co przy dłuższym składowaniu może prowadzić do niepożądanych zmian barwy i obniżenia stopnia czułości. Inną wadą jest powstający w reakcji ze wskaźnikiem, niezbyt trwały niebieskozielony kation rodnika, który w warunkach dalszego utleniania przechodzi stosunkowo łatwo w brązową chinodwuminę. Barwy reakcyjne wskutek ubocznego brązowego zabarwienia mają zatem częściowo brudny wygląd, przy tym zmieniają się one szybko a stąd też prze-

ważnie już w chwilę po zaleconym okresie odczytu nie dają się prawidłowo ocenić. Jest to zasadnicza wada w analizach seryjnych i dla dokumentacji. Wprowadzie kation rodnika można w pewnym zakresie stabilizować anionowymi środkami zwilżającymi, jednakże nie dają się one stosować w każdym przypadku, ponieważ mogą działać destabilizująco na oksydazy w reakcji pierwotnej.

Stwierdzono, że próbники szybkościowe powyższego rodzaju, dają trwalsze i stabilniejsze rodniki barwne, gdy zamiast o-tolidyny stosuje się 3,3', 5,5'-czteroalkilobenzydyny o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R_1 , R_2 , R_3 i R_4 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają prostolaneuchowe lub rozgałęzione niższe rodniki alkilowe o 1—6, korzystnie o 1—4 atomach węgla.

Oczekiwana na podstawie struktury, zasadnicza przydatność 3,3', 5,5'-czterometylobenzydyny do wykrywania krwi utajonej w moczu i stolcu jest opisana w publikacji V. R. Holland'a i współpracowników, przy czym jako zaletę w porównaniu z tolidyną podkreśla się niższą rakotwórczość. Nieoczekiwanie większa trwałość aminy i kationu jej rodnika w środku analitycznym nie została jednak przez Holland'a opisana, ponieważ nie przeprowadził on odpowiednich badań. Do takich badań nie było zresztą bodźca, gdyż użytkownicy tego typu środków analitycznych nie manipulują bezpośrednio odczynnikami, a tym samym problem rakotwórczości nie odgrywa przy tym praktycznie żadnej roli.

Związki o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku są także wspomniane (kanadyjski opis patentowy nr 818 344) dla przypadku środków analitycznych do wykrywania halogenków względnie pseudohalogenków w płynach ustrojowych. Te środki analityczne zawierają dodatkowo związki miedzi (II), które reagują z halogenkami tworząc halogenki miedzi (I) i wolne chlorowce, a te ostatnie natomiast utleniają związki benzydynowe. Utlenianie to prowadzi oczywiście do takich samych barwnych kationów rodnikowych jak katalizowane peroksydazą utlenianie wodoronadtlenkami. We wspomnianym opisie patentowym z licznych, zastrzeżonych pochodnych benzydyny wyróżniono o-tolidynę (3,3'-dwumetylobenzydynę), z czego można wnioskować, że czteroalkilobenzydyny są mniej odpowiednie dla próbników szybkościowych.

Większa trwałość związków o wzorze przedstawionym na rysunku i ich kationów rodnikowych jest nadto o tyle zaskakująca, że raczej należałoby oczekiwać podwyższonej zdolności do utleniania a tym samym dalszej reakcji do brunatnej chinonodwuiminy, niż wpływu dodatkowych grup alkilowych na ciśnienie gazu elektronowego.

Środek analityczny według wynalazku zawiera jako wskaźnik utleniania 3,3', 5,5'-czteroalkilobenzydynę o ogólnym wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R_1 , R_2 , R_3 i R_4 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają proste lub rozgałęzione niższe rodniki alkilowe o 1—6, korzystnie o 1—4 atomach węgla.

Według wynalazku można czteroalkilobenzydyny

stosować we wszystkich tych przypadkach, w których dotychczas stosowano o-tolidynę, przy czym znane receptury ewentualnie można nieco zmodyfikować. Stosowane w celu stabilizacji zabarwienia, anionowe zwilżacze można ewentualnie zastąpić mniej aktywnymi lub zaniechać ich wprowadzania. I tak, np. można czteroalkilobenzydyny stosować w bibułach probierczych do wykrywania glikozy w moczu, cholesterolu w osoczu, nadtlenku wodoru w mleku, albo stosować w filmach probierczych do oznaczania glikozy w krwi i osoczu i w wielu środkach analitycznych. Wszystkie te środki analityczne wyróżniają się tym, że reakcje barwne są bardziej świejące, trwalsze a niekiedy łatwiej dające się stopniować niż w przypadku stosowania o-tolidyny, ponieważ niebiesko-zielone do zielonych zabarwienia kationów rodnikowych czteroalkilobenzydyn nie są zabrudzone obecnością brunatnych chinonodwuimin.

W przypadkach środków analitycznych, opisanych w niżej podanych przykładach ujawniają się szczególnie właściwości czteroalkilobenzydyn stosowanych według wynalazku, przy czym poszczególni przedstawiciele tej grupy związków mogą wykazywać jeszcze bardziej korzystne działanie. I tak np. pojawia się podwyższona trwałość czteroalkilobenzydyn o wzorze przedstawionym na rysunku, w porównaniu z o-tolidyną, zwłaszcza podczas składowania bibuł probierczych do wykrywania krwi w moczu. Podwyższona stabilność kationów rodnikowych prowadzi w przypadku filmów probierczych do tego, że pomiar można prowadzić w stosunkowo długim okresie czasu.

Zastosowanie czteroetylobenzydyny w próbach oznaczania glukozy w moczu na bibule probierczej pozwala na otrzymanie prawie niezmięnionej przez długi okres czasu barwy reakcji, co ma szczególnie istotne znaczenie w przypadkach akcji wczesnego rozpoznawania, w której osobnicy badań wysyłają użytkowane taśmy probiercze do centralnego ośrodka analitycznego.

Sposoby wytwarzania związków o wzorze przedstawionym na rysunku są znane, jednak dotychczas są bliżej scharakteryzowane zaledwie 3,3', 5,5'-czterometylobenzydyna [V. R. Holland i współpracownicy, Tetrahedron 30, 3299—3302 (1974)] i 3,3', 5,5'-czteroetylobenzydyna [R. Stroh i współpracownicy, Angew. Chem. 69, 124—131 (1957)]. Wytwarzanie czterometylobenzydyny według wyżej cytowanego V. R. Holland'a i współpracowników prowadzono w znany sposób przez redukcję pyłem cynkowym znanego 2,2', 6,6'-czterometylobenzenu i następnego przegrupowania benzydynowego.

Dotychczas nieopisane związki, a mianowicie 3,3'-dwumetylo-5,5'-dwuetylobenzydynę i 3,3', 5,5'-czteroizopropylbenzydynę można wytwarzać według wyżej cytowanego sposobu, podanego przez Stroh'a i współpracowników, z o-tolidyny i etylenu lub z benzydyny i propylenu.

Inne drogi postępowania, zasadniczo możliwe również do przeprowadzenia dla jeszcze nieopisanych wyższych pochodnych alkilowych są następujące:

a) utlenianie 2,6-dwualkiloaniliny żelazicyjankiem metalu alkalicznego [porównaj wyżej cytowany V. R. Holland; G. Schulz, Ber. dtsch. chem. Ges. 17, 476—78 (1884); E. Haselbach, Helv. chem. Acta 53, 1526—43 (1970)];

b) utlenianie 2,6-dwualkiloaniliny tlenkiem srebra (II) [porównaj B. Ortiz i współpracownicy, J. Org. Chem. 37, 2748—50 (1972)];

c) redukcja 2,6-dwualkilodinitrobenzenu wodorkiem litowoglinowym [porównaj R. F. Nyström i H. C. Brown, J. Amer. chem. Soc. 70, 3738—40 (1948)];

d) reakcja soli 2,6-dwualkilobenzenodwuazoniowych z amoniakalnym roztworem miedzi (I) [porównaj D. Vörländer i F. Mayer, Liebigs Ann. Chem. 320, 122—144 (1902)].

Dalsza redukcja otrzymanych w ten sposób azobenzenów do hydrazobenzenów i ich (niekiedy równoczesne) przegrupowanie benzydynowe następuje w znany sposób (np. Houben-Weyl X/2, 705—724 i X/1, 839—848).

Sposób wytwarzania 3,3'-dwumetylo-5,5'-dwuetylobenzydyny i 3,3', 5,5'-czteroizopropylbenzydyny według wynalazku polega na przegrupowaniu odpowiedniego związku hydrazobenzenowego, albo na kondensacji o-tolidyny względnie benzydyny z etylenem względnie propylenem.

Podane niżej przykłady objaśniają bliżej wynalazek.

Przykład I. Bibuła probiercza do wykrywania krwi w moczu

Bibułę filtracyjną (np. firmy Schleicher und Schüll nr 23SL) impregnuje się kolejno podanymi niżej roztworami 1 oraz 2 i suszy w temperaturze 40°C.

Roztwór 1 zawiera	
1,2 molarne bufor cytrynianowy o pH = 5,25	35,0 ml
sól dwusodowa kwasu etylenodwusulfobursztynianu	0,1 g
sulfobursztynian dwuoktylosodowy	0,5 g
2,5-dwuodoronadtlenek 2,5-dwumetyloheksanu (około 70%)	1,6 g
trójmorfolid kwasu fosforowego	12,7 g
etanol	30,0 ml
woda destylowana, uzupełniająca do objętości	100,0 ml

Roztwór 2 zawiera	
3,3' 5,5'-czterometylobenzydyna	0,3 g
fenantrydyna	0,2 g
toluen uzupełniający do objętości	100,0 ml

Otrzymuje się białą bibułę probierczą, która po zanurzeniu w moczu, zawierającym krew, zabarwia się po upływie 5—20 sekund na niebieskozielono. Jeśli erytrocyty są nienaruszone, to bibuła jest niebieskozielona pocętkowana. Jeśli zaszła hemoliza, albo jeśli w moczu znajduje się wolna hemoglobina, to bibuła barwi się równomiernie na niebieskozielono. Wykrywalność wynosi około 5 erytrocytów w 1 mm³ lub odpowiadającą ilość hemoglobiny. Niższa ilość nienaruszonych erytrocytów może w pewnych warunkach wywoływać jeszcze poszczególne niebieskozielone punkty na papierku próbnym. Wykrywalność mioglobiny odpowiada hemoglobinie.

Po trzydniowym utrzymywaniu w temperaturze 60°C bibuły probiercze są lekko żółtawo zabarwione, ich stopień czułości pozostaje zasadniczo taki sam, jedynie czas trwania reakcji przedłuża się do około 60—90 sekund. Bibuła probiercza o identycznym składzie, lecz zawierająca o-tolidynę zamiast czterometylobenzydyny, po identycznej obróbce cieplnej zabarwia się żółtobrunatnie, a stopień czułości wynosi około 20 erytrocytów w 1 mm³.

Bibuły o identycznym stopniu czułości i takiej samej trwałości, lecz jedynie reagujące nieco wolniej i z czysto zielonym zabarwieniem, otrzymuje się stosując równomolową ilość 3,3', 5,5'-czteroetylobenzydyny, 3,3'-dwumetylo-5,5'-dwuetylobenzydyny lub 3,3', 5,5'-czteroizopropylbenzydyny.

Przykład II. Bibuła probiercza do wykrywania krwi w moczu.

Sulfabursztynian dwuoktylosodowy w recepturze podanej w przykładzie I zastępuje się taką samą ilością lauroilosarkozyny albo całkowicie pomija się środek powierzchniowo czynny, otrzymując w ten sposób bibułę probierczą, która wprawdzie wykazuje nieco niższy stopień czułości niż bibuła z przykładu I ale nadal jeszcze wykazuje wyższy stopień czułości niż odpowiednie bibuły, zawierające o-tolidynę. Reakcje barwne z moczem, zawierającym 50 zhemolizowanych erytrocytów w 1 mm³, są przedstawione w podanym niżej zestawieniu.

czterometylobenzydyna	bez zwińacza	lauroilosarkozyna
o-tolidyna	lekko zielone	zielone
	lekko zielonobrunatne	lekko brunatnozielone

Przykład III. Bibuła probiercza do wykrywania glikozy w moczu.

Bibułę filtracyjną (np. firmy Schleicher und Schüll nr 597 NF) nasycza się roztworami 1 oraz 2 o podanych niżej składach i suszy w temperaturze 50°C.

Roztwór 1 zawiera:

oksydaza glikozowa [70 U/mg]	222 mg
peroksydaza [70 U/mg]	28 mg
bufor morfolinoetanosulfonianowy (pH 6, 1, 0 m)	50 ml
tartrazyna	80 mg
poliwinylpirolidyna	300 mg
woda destylowana uzupełniająca do objętości	100 ml

Roztwór 2 zawiera

3,3'—5,5'-czterometylobenzydyna	600 mg
etanol uzupełniający do objętości	100 ml

W identyczny sposób wytwarza się bibuły probiercze, które zawierają równomolową ilość 3,3', 5,5'-czteroetylobenzydyny lub o-tolidyny. Zabbarwienia reakcyjne tych bibuł probierczych z moczem, zawierającym glikozę, po upływie 60—120 sekund od zanurzenia są przedstawione w podanym niżej zestawieniu. W przypadku czterometylobenzydyny zabarwienia te pozostają stałe w ciągu około 10—15 minut, podczas suszenia przyjmują one nieco bardziej niebieskawy charakter a w tej postaci trwale utrzymują się w ciągu wielu dni. Zabbarwienia z czteroetylobenzydyną bled-

na podczas suszenia nieznacznie nie zmieniając zabarwienia a następnie są trwałe w ciągu dnia. Zabarwienia otrzymane za pomocą o-tolidyny już po upływie 5—10 minut zaczynają żółknąć i płowić, a po suszeniu są w ciągu 2—4 godzin w zależności od stężenia glikozy całkowicie wyblakłe lub lekko oliwkowobrunatne.

mg % glikozy	o-tolidyna	czterometylobenzydyna	czteroetylobenzydyna
0	żółte	żółte	żółte
50	jasnozielone	jasnozielone	jasnozielone
100	zielone	niebieskozielone	średniozielone
250	niebieskozielone	zieleniebieskie	zielone
500	zieleniebieskie	nietęskoczarne	ciemnozielone
1000	oliwkowo-czarne	czarne	głębokozielone

Bibuly probiercze, zawierające równomolową ilość 3,3'-dwumetylo-5,5'-dwuetylobenzydyny, zachowują się pod względem charakterystyki i trwałości zabarwień reakcyjnych praktycznie tak samo jak bibuly zawierające czteroetylobenzydynam.

Przykład IV. Bibuly probiercze do wykrywania nadtlenu wodoru

Bibulę filtracyjną nasycy się podanymi niżej roztworami 1 oraz 2 i suszy w temperaturze 40°C.

Roztwór 1 zawiera

dwuwodnian cytrynianu trójsodowego	225 mg
wodnian kwasu cytrynowego	175 mg
peroksydaza [70 U/mg]	50 mg
alginian sodowy	150 mg
monolaurnian polioksyetylenosorbitanu (Tween 20)	1300 mg
kopolimer winylopirolidyny z octanem winylu	375 mg
woda destylowana uzupełniająca do objętości	100 ml.

Roztwór 2 zawiera

3,3'—5,5'-czterometylobenzydyna	500 mg
aceton uzupełniający do objętości	100 ml.

Tak sporządzona bibula probiercza daje z nadtlakiem wodoru w roztworach wodnych, jak mleko, niebieskozielone zabarwienie reakcyjne przy stężeniach do poniżej 0,1 mg%.

Przykład V. Bibuly probiercze do wykrywania cholesterolu i estrów cholesterolu w osoczu.

Bibulę filtracyjną (np. firmy Schleicher und Schüll nr 597 NF Ind.) nasycy się roztworami 1 oraz 2 o podanych niżej składach i suszy w temperaturze 40°C.

Roztwór 1 zawiera:

1 molarny bufor cytrynianowy o pH=7	2,0 ml
oksydaza cholesterolowa [60 U/mg]	0,1 g
esteraza cholesterolowa [18 U/mg]	0,25 g
peroksydaza [70 U/mg]	0,05 g
woda destylowana uzupełniająca do objętości	100,00 ml

Roztwór 2 zawiera

3,3', 5,5'-czterometylobenzydyna	0,28 g
polietylenooktylowy eter fenolu	0,5 g

(Triton X 100)

chlorek metylenu uzupełniający do objętości 100,0 ml.

Z osoczem, zawierającym cholesterol i/lub estry cholesterolu, reagują tak otrzymane bibuly probiercze dając zielone odcienie barw, których intensywność odpowiada stężeniu cholesterolu. Im odpowiadające bibuly probiercze, zawierające o-tolidynę zamiast czterometylobenzydyny, reagują dając również zielone odcienie barw, jednak o mniejszej intensywności.

Przykład VI. Filmy probiercze do oznaczania małych zawartości glikozy w krwi lub w osoczu.

Składniki

zawiesina octanopropionianu poliwinylowego (o nazwie handlowej Propiofan 70 D)	45,0 g
1,85% roztwór alginianu sodowego w 0,5 m buforze fosforanowym o pH = 5,5	35,5 g
nonylosiarczan sodowy rozpuszczony w 5,0 ml wody	0,75 g

oksydaza glikozowa [62,7 U/mg]	rozsuszone 0,189 g
peroksydaza [6,8,8 U/mg]	10 ml wody 0,235 g
3,3', 5,5'-czterometylobenzydyna rozpuszczona w 5 ml acetonu	0,68 g.

Składniki starannie miesza się razem, folię powleka się warstwą mieszaniny o grubości 200 μ i suszy w ciągu 35 minut w temperaturze 60°C. Nakropienie krwi, zawierającej glikozę, i starcie jej po upływie 1 minuty daje po upływie dalszych 2 minut, przy zakresie 5—100 mg % glikozy, niebieskozielone zabarwienie reakcyjne o wzrastającej intensywności, którą można mierzyć za pomocą dostępnych w handlu fotometrów remisyjnych (np. o nazwie Reflomat). Podane niżej zestawienie ujmuje kinetykę rozwijania zabarwienia za pomocą 60 mg % glikozy w porównaniu z filmem probierczym, który zamiast czterometylobenzydyny zawiera 500 mg o-tolidyny. Jeśli film probierczy ogrzewa się w ciągu 12 dni w temperaturze 50°C, to praktycznie nie stwierdza się żadnej zmiany zabarwienia, w przeciwieństwie do tego film probierczy zawierający o-tolidynę jest wówczas bardzo silnie zabarwiony żółtobrunatnie.

czas (minuty)	1	2	3	5	10
intensywność czterometylobenzydyny (TMB)	88	87	85	84	85
intensywność o-tolidyny	73	68	64	60	67

Przykład VII. Film probierczy do oznaczania normalnej i podwyższonej zawartości glikozy w krwi lub w osoczu.

Według przykładu VI wytwarza się film probierczy, który dodatkowo zawiera 0,050 g dwuchlorowodoru 9-(γ -aminopropyl)-3-aminokarbazolu. Nakropienie krwi, zawierającej glikozę, i starcie jej po upływie 1 minuty daje po upływie dalszej minuty następuje zabarwienie reakcyjne: 60 mg% glikozy — ochra, 120 mg % glikozy — oliwkowe 180 mg % glikozy — niebieskozielone z rosnącą głębią barwy.

Zabarwienia te nie zmieniają się same podczas dwudniowego przechowywania na powietrzu w laboratorium. W przypadku analogicznego filmu probierczego, zawierającego 0,600 g o-tolidyny i 0,025 g dwuchlorowodoru 9-(γ -aminopropyl)-3-aminokarbazolu, zmieniają się niebieskozielone zabarwienia w kierunku żółtozielonych odcieni.

Długoterminowa trwałość zabarwienia spowodowanego 150 mg % glikozy, zmierzona za pomocą fotometru remisyjnego (o nazwie Reflomat), jest przedstawiona w podanym niżej zestawieniu:

czas (godziny)	0	1	2	4	8	24
czterometylobenzydyna (TMB)	61	62	62	62	62	62
o-tolidyna	51	52	51	50	47	42

Jeżeli ten film probierczy ogrzewa się w ciągu 12 dni w temperaturze 50°C, to praktycznie nie stwierdza się żadnych zmian zabarwienia i możliwa jest bezbłędna ocena za pomocą barw porównawczych. W przeciwieństwie do tego taśmy probiercze, zawierające o-tolidynę, zmieniają bar-

wę na silnie żółto-brunatną, a porównanie ze skalą barw nie jest już możliwe.

Zastrzeżenia patentowe

1. Środek analityczny do wykrywania i oznaczania nadtlenków i substancji działających nadtlenkowo, **znamienny tym**, że jako wskaźnik utleniania zawiera 3,3', 5,5'-czteroalkilobenzynydy o wzorze przedstawionym na rysunku, w którym R_1 , R_2 , R_3 i R_4 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają proste albo rozgałęzione niższe rodniki alkilowe o 1—6, korzystnie o 1—4 atomach węgla, na nasączalnym nośniku lub filmie i ewentualnie inne substancje pomocnicze.

2. Środek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako wskaźnik zawiera 3,3'-dwumetylo-5,5'-dwumetylobenzynydy.

3. Środek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako wskaźnik zawiera 3,3', 5,5'-czteroizopropylbenzynydy.

