CH 619 048 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: G 01 N 31/22
G 01 N 33/50

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 619 048

(21) Gesuchsnummer: 16431/75

(22) Anmeldungsdatum: 18.12.1975

(30) Priorität(en): 21.12.1974 DE 2460903

(24) Patent erteilt: 29.08.1980

(45) Patentschrift veröffentlicht: 29.08.1980

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

(72) Erfinder:
Dr.rer.nat. Werner Güthlein,
Mannheim-Neckarau (DE)
Dr.rer.nat. Walter Rittersdorf,
Mannheim-Waldhof (DE)
Dr.rer.nat. Hugo Tiedemann,
Mannheim-Wallstadt (DE)
Dr.rer.nat. Peter Vogel, Weinheim (DE)
Dr.rer.nat. Wolfgang Werner,
Mannheim-Vogelstang (DE)

(74) Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich

(54) Verfahren zur Herstellung eines zur Durchführung von Schnelltests bestimmten diagnostischen Mittels.

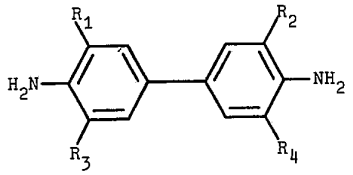
(57) Ein zur Durchführung von Schnelltests bestimmtes diagnostisches Mittel zum Nachweis und zur Bestimmung von

a) Wasserstoffperoxyd oder Substanzen, die mit Sauerstoff in Gegenwart von Peroxydasen unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagieren; oder
b) Peroxydasen oder Substanzen, die peroxydatisch reagieren,

wird hergestellt, indem man einen saugfähigen Träger mit einer Lösung (1), welche

a) eine Peroxydase oder eine peroxydatisch wirksame Substanz; oder
b) ein Peroxyd oder eine Substanz, die mit Sauerstoff in Gegenwart von Peroxydasen unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagiert,

in Wasser oder einer Alkohol/Wasser-Mischung gelöst enthält, tränkt, anschliessend trocknen lässt und danach mit einer Lösung (2), welche ein 3,3',5,5'-Tetraalkylbenzidin der nebenstehenden Formel I, worin R_1, R_2, R_3 und R_4, die gleich oder verschieden sind, geradkettige oder verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen bedeuten, in einem organischen Lösungsmittel gelöst enthält, nachimprägniert.



(I)

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines zur Durchführung von Schnelltests bestimmten diagnostischen Mittels zum Nachweis und zur Bestimmung von

a) Wasserstoffperoxyd oder Substanzen, die mit Sauerstoff in Gegenwart von Peroxydasen unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagieren; oder

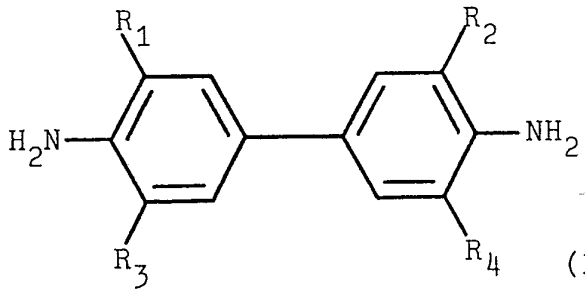
b) Peroxydasen oder Substanzen, die peroxydatisch reagieren,

dadurch gekennzeichnet, dass man einen saugfähigen Träger mit einer Lösung (1), welche

a) eine Peroxydase oder eine peroxydatisch wirksame Substanz; oder

b) ein Peroxyd oder eine Substanz, die mit Sauerstoff in Gegenwart von Peroxydasen unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagiert,

in Wasser oder einer Alkohol/Wasser-Mischung gelöst enthält, tränkt, anschliessend trocknen lässt und danach mit einer Lösung (2), welche ein 3,3′,5,5′-Tetraalkylbenzidin der Formel I



(I),

worin R_1, R_2, R_3 und R_4, die gleich oder verschieden sind, geradkettige oder verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen bedeuten, in einem organischen Lösungsmittel gelöst enthält, nachimprägniert.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als saugfähigen Träger Filterpapier verwendet.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel I, worin R_1, R_2, R_3 und R_4, die gleich oder verschieden sind, geradkettige oder verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, verwendet.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Verbindung der Formel I 3,3′-Dimethyl-5,5′-diäthylbenzidin verwendet.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Verbindung der Formel I 3,3′,5,5′-Tetraisopropylbenzidin verwendet.

6. Diagnostisches Mittel, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 1.

Die Reaktion von Wasserstoffperoxyd mit Oxydationsindikatoren unter Katalyse durch Peroxydase oder peroxydatisch wirksame Stoffe zu farbigen Verbindungen spielt in der analytischen Chemie eine besondere Rolle, weil sie ausser dem Nachweis von Wasserstoffperoxyd und Peroxydasen auch die Bestimmung einer Reihe von Stoffen gestattet, die mit Sauerstoff und einer Oxydase unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagieren. Im folgenden seien als Beispiele einige dieser Stoffe und in Klammern die entsprechenden Oxydasen aufgezählt:

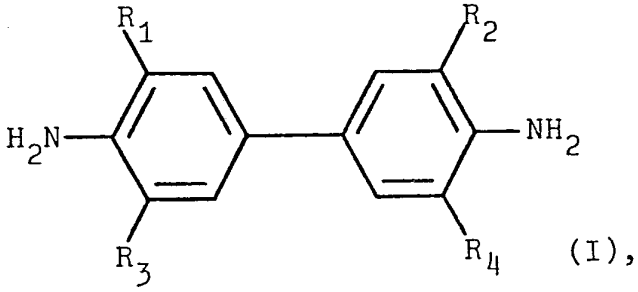
Glucose (Glucoseoxydase), Galactose (Galactoseoxydase), L-Aminosäure (L-Aminosäureoxydase), Cholesterin (Cholesterinoxydase) und Harnsäure (Uricase). Es sind dies vor allem Stoffe, deren Nachweis und Bestimmung in der medizinischen Diagnostik und in der Lebensmittelchemie von grosser Bedeutung sind.

Als Nachweisreaktion für Peroxydasen kommt die Methode insbesondere für die Bestimmung von Hämoglobin infrage, wobei man anstelle von Wasserstoffperoxyd auch organische Hydroperoxyde als Oxydationsmittel verwenden kann.

Entsprechend ihrer grossen Bedeutung in der medizinischen Schnelldiagnostik sind für fast alle der oben genannten Reaktionen sogenannte Schnelltests beschrieben, die eine qualitative oder quantitative Bestimmung einzelner Reaktionskomponenten ermöglichen. Dabei werden saugfähige Träger oder Filme verwendet, die alle Reagenzien enthalten und bei denen nach dem Kontakt mit der Untersuchungsflüssigkeit die Farbreaktion abläuft, wenn die fragliche Substanz anwesend ist. Die gebildete Farbe wird mit Hilfe von Farbvergleichstafeln beurteilt oder an Remissionsphotometern gemessen, so dass aus der Farbintensität auf eine Konzentration der reagierenden Substanz geschlossen werden kann.

Als Oxydationsindikatoren für diese Schnelltests sind eine Reihe von Verbindungen in der Literatur und in Patenten beschrieben, jedoch haben sich in der Praxis nur wenige durchgesetzt. Es handelt sich hierbei fast ausschliesslich um Verbindungen der Benzidinreihe und zwar von diesen wiederum insbesondere um o-Tolidin. Trotz der weiten Verbreitung dieses Indikators und seiner unzweifelhaften Vorteile gegenüber den anderen bekannten Indikatoren hat o-Tolidin jedoch auch Nachteile. Zum einen ist die Substanz in den Rezepturen für die Schnelltests nicht immer optimal haltbar, was zu unerwünschten Verfärbungen und Empfindlichkeitseinbussen bei längerer Lagerung führen kann. Zum anderen ist das bei der Indikator-Reaktion entstehende blaugrüne Radikalkation nicht sehr stabil, da es relativ leicht unter Weiteroxydation in das braune Chinodiimin übergeht. Die Reaktionsfarben haben daher durch die braune Nebenfärbung zum Teil einen schmutzigen Charakter, zudem verändern sie sich rasch und sind daher meist schon kurz nach der vorgeschriebenen Ablesezeit nicht mehr richtig auswertbar. Bei Serienanalysen und für die Dokumentation ist dies ein entscheidender Nachteil. Man kann zwar das Radikalkation mit anionischen Netzmitteln in gewissem Umfang stabilisieren, diese sind jedoch nicht immer anwendbar, da sie auf die Oxydasen für die Primärreaktion destabilisierend wirken können.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass man Schnelltests der obigen Art erhält, die haltbarer sind und die stabilere Farbstoffradikale liefern, wenn man anstelle von o-Tolidin 3,3′,5,5′-Tetraalkylbenzidine der Formel I



(I),

worin R_1, R_2, R_3 und R_4 gleich oder verschieden sind und geradkettige oder verzweigte Alkylgruppen mit 1 bis 6, vorzugsweise 1 bis 4, Kohlenstoffatomen bedeuten, verwendet.

Gegenstand der Erfindung ist daher das in Patentanspruch 1 definierte Verfahren sowie nach diesem Verfahren hergestellte diagnostische Mittel.

Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I sind bekannt, jedoch sind bisher lediglich 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (V.R. Holland et al., Tetrahedron 30 [1974] 3299–3302) und 3,3',5,5'-Tetraäthylbenzidin (R. Stroh et al., Angew. Chem. 69 [1957] 124–131) näher charakterisiert. Die Herstellung von Tetramethylbenzidin nach V.R. Holland et al. (loc. cit.) erfolgte auf an sich bekanntem Wege durch Zinkstaubreduktion des bekannten 2,2',6,6'-Tetramethylazobenzols und anschliessende Benzidinumlagerung.

Die bisher nicht beschriebenen Verbindungen 3,3'-Dimethyl-5,5'-diäthylbenzidin und 3,3',5,5'-Tetraisopropylbenzidin können beispielsweise nach Stroh et al. (loc. cit.) aus o-Tolidin und Athylen bzw. aus Benzidin und Propylen hergestellt werden.

Weitere Wege, die prinzipiell auch für die noch nicht beschriebenen höheren Alkylderivate gangbar sein sollten, sind die folgenden:

a) Oxydation von 2,6-Dialkylanilin mit alkalischem Ferricyanid.

b) Oxydation von 2,6-Dialkylanilin mit Silber-(II)-oxyd.

c) Reduktion von 2,6-Dialkylnitrobenzol mit Lithiumaluminiumhydrid.

d) Umsetzung von 2,6-Dialkylbenzoldiazoniumsalzen mit ammoniakalischer Kupfer-(I)-Lösung.

Die weitere Reduktion der auf diese Weise erhaltenen Azobenzole zu Hydrazobenzolen und deren (zum Teil gleichzeitige) Benzidin-Umlagerung kann nach bekannten Methoden erfolgen.

Die aus der Struktur zu erwartende prinzipielle Eignung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl und Harn ist in der genannten Arbeit von V.R. Holland et al. (loc. cit.) beschrieben, wobei als Vorteil gegenüber Tolidin die geringere Cancerogenität hervorgehoben wird. Die unerwartet grössere Stabilität des Amins und seines Radikalkations in Schnelltests ist von Holland jedoch nicht beschrieben, da er entsprechende Versuche nicht durchgeführt hat. Für solche Versuche bestand auch kein Anlass, da der Benutzer von Schnelltests die Reagenzien nicht direkt handhabt und somit die Frage der Cancerogenität für ihn praktisch keine Rolle spielt.

Die Verbindungen der Formel I sind auch für Schnelltests zum Halogenid- bzw. Pseudohalogenid-Nachweis in Körperflüssigkeiten beschrieben (CA-P 818 344). Diese Schnelltests enthalten noch Kupfer-(II)-Verbindungen, welche mit den Halogeniden unter Bildung von Kupfer-(I)-halogeniden und freien Halogenen reagieren, die ihrerseits die Benzidin-Verbindungen oxydieren. Diese Oxydation führt offenbar zu den gleichen farbigen Radikalkationen wie die peroxydase-katalysierte Oxydation mit Hydroperoxyden. In dem genannten Patent wird von den zahlreichen beanspruchten Benzidin-Abkömmlingen o-Tolidin (3,3'-Dimethylbenzidin) bevorzugt, woraus zu schliessen ist, dass Tetraalkylbenzidine für Schnelltests weniger geeignet sind.

Die grössere Stabilität der Verbindungen der Formel I und ihrer Radikalkationen ist weiterhin insofern überraschend, als der elektronendrückende Einfluss der zusätzlichen Alkylgruppen eher eine gesteigerte Oxydierbarkeit und damit eine Weiterreaktion zum braunen Chinondiimin hätte erwarten lassen.

Die Tetraalkylbenzidine der Formel I können in allen Fällen eingesetzt werden, in denen bisher o-Tolidin verwendet wurde, wobei die bekannten Rezepturen gegebenenfalls etwas modifiziert werden können. Gegebenenfalls können zur Farbstabilisierung verwendete anionische Netzmittel durch weniger aktive ersetzt oder ganz weggelassen werden. So können die Tetraalkylbenzidine beispielsweise in Testpapieren zum Nachweis von Glucose im Harn, von Blut im Harn, von Cholesterin im Serum, Wasserstoffperoxyd in Milch oder in Testfilmen zur Bestimmung von Glucose in Blut und Serum und in vielen anderen Tests verwendet werden. Alle diese Tests zeichnen sich dadurch aus, dass die Farbreaktionen leuchtender, stabiler und zum Teil besser abgestuft sind als bei der Verwendung von o-Tolidin, da die blaugrünen bis grünen Färbungen der Radikalkationen der Tetraalkylbenzidine nicht durch Anteile der braunen Chinondiimine «verschmutzt» sind.

Bei den in den folgenden Beispielen beschriebenen Schnelltests treten die Eigenschaften der erfindungsgemäss verwendeten Tetraalkylbenzidine besonders hervor, wobei einzelne Vertreter der Verbindungsklasse gegebenenfalls noch besonders vorteilhafte Wirkungen haben können: So zeigt sich die gesteigerte Haltbarkeit der Tetraalkylbenzidine der Formel I gegenüber o-Tolidin insbesondere bei der Lagerung von Testpapieren zum Nachweis von Blut im Harn. Die gesteigerte Stabilität der Radikalkationen führt bei den Testfilmen zur Glucosebestimmung dazu, dass die Messung in einem relativ langen Zeitraum vorgenommen werden kann. Die Verwendung von Tetraäthylbenzidin beim Harnglucose-Test führt zu Testpapieren, bei denen die Reaktionsfarbe tagelang nahezu unverändert bleibt, was für Früherkennungsaktionen, bei denen die Probanden die benutzten Teststreifen an eine zentrale Auswertungsstelle senden, von besonderer Bedeutung ist.

Anhand der folgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

Beispiel 1

Testpapier zum Nachweis von Blut im Harn

Filterpapier (Schleicher und Schüll Nr. 23SL) wird nacheinander mit folgenden Lösungen imprägniert und bei 40 °C getrocknet:

Lösung 1		
1,2 molarer Citratpuffer vom pH 5,25		35,0 ml
Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz		0,1 g
Dioctylnatriumsulfosuccinat		0,5 g
2,5-Dimethylhexan-2,5-dihydroperoxyd (ca. 70%ig)		1,6 g
Phosphorsäuretrimorpholid		12,7 g
Äthanol		30,0 ml
dest. Wasser	ad	100,0 ml
Lösung 2		
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin		0,3 g
Phenanthridin		0,2 g
Toluol		ad 100,0 ml

Man erhält ein weisses Testpapier, welches sich beim Eintauchen in bluthaltigen Urin nach ca. 5 bis 20 Sekunden blaugrün verfärbt. Sind die Erythrozyten intakt, so sind die Papiere blaugrün gesprenkelt. Ist Hämolyse eingetreten oder befindet sich von vornherein freies Hämoglobin im Urin, so werden die Papiere gleichmässig blaugrün gefärbt. Die Empfindlichkeit liegt bei ca. 5 Erythrozyten/mm³ oder der entsprechenden Menge Hämoglobin. Eine niedrige Zahl intakter Erythrozyten kann unter Umständen noch einzelne blaugrüne Punkte auf dem Testpapier hervorrufen. Die Empfindlichkeit gegenüber Myoglobin entspricht der von Hämoglobin.

Nach dreitägiger Temperaturbelastung bei 60 °C sind die Testpapiere ganz schwach gelblich gefärbt, ihre Empfindlichkeit ist im wesentlichen gleich geblieben, lediglich die Reaktionszeiten haben sich auf ca. 60 bis 90 Sekunden verlängert. Ein Testpapier der gleichen Zusammensetzung mit o-Tolidin anstelle von Tetramethylbenzidin ist nach der gleichen Belastung gelbbraun verfärbt, die Empfindlichkeit liegt etwa bei 20 Erythrozyten/mm³.

Papiere gleicher Empfindlichkeit und Stabilität, die lediglich etwas langsamer und mit rein grüner Farbe reagieren, erhält man bei Verwendung äquimolarer Mengen von 3,3',5,5'-Tetraäthyl-, 3,3'-Dimethyl-5,5'-diäthyl- oder 3,3',5,5'-Tetraisopropylbenzidin.

Beispiel 2
Testpapier zum Nachweis von Blut im Harn

Ersetzt man in der Rezeptur von Beispiel 1 das Dioctylnatriumsulfosuccinat durch die gleiche Menge Lauroylsarkosin oder lässt das oberflächenaktive Mittel ganz weg, so erhält man Testpapiere, die zwar weniger empfindlich sind als die gemäss Beispiel 1, die aber immer noch empfindlicher sind als entsprechende Papiere mit o-Tolidin. Die Farbreaktionen mit einem Harn, der 50 hämolysierte Erythrozyten/mm³ enthält, sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

	ohne Netzmittel	Lauroylsarkosin
Tetramethylbenzidin	schwach grün	grün
o-Tolidin	schwach graubraun	schwach braungrün

Beispiel 3
Testpapier zum Nachweis von Glucose im Harn

Filterpapier (Schleicher & Schüll 597 NF) wird mit Lösungen folgender Zusammensetzung getränkt und bei 50 °C getrocknet:

Lösung 1		
Glucoseoxydase (70 U/mg)		222 mg
Peroxydase (70 U/mg)		28 mg
Morpholinoäthansulfonat-Puffer (pH 6, 1,0 m)		50 ml
Tartrazin		80 mg
Polyvinylpyrrolidin		300 mg
Wasser, dest.	ad	100 ml
Lösung 2		
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin		600 mg
Äthanol	ad	100 ml

Auf die gleiche Weise werden Testpapiere hergestellt, die äquimolare Mengen 3,3',5,5'-Tetraäthylbenzidin bzw. o-Tolidin enthalten. Die Reaktionsfarben dieser Testpapiere mit glucosehaltigen Harnen etwa 60 bis 120 Sekunden nach dem Eintauchen sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst. Beim Tetramethylbenzidin bleiben diese Farben etwa 10 bis 15 Minuten konstant, beim Trocknen bekommen sie einen mehr bläulichen Charakter und bleiben in dieser Form tagelang stabil. Die Farben mit Tetraäthylbenzidin verblassen beim Trocknen geringfügig, ohne den Farbwert zu ändern, und sind dann über Tage stabil. Die mit o-Tolidin erhaltenen Farben beginnen schon nach 5 bis 10 Minuten zu vergilben und zu verblassen und sind nach dem Trocknen in ca. 2 bis 4 Stunden je nach Glucosekonzentration ganz verblasst oder schwach olivbraun.

mg % Glucose	o-Tolidin	Tetramethylbenzidin	Tetraäthylbenzidin
0	gelb	gelb	gelb
50	hellgrün	hellgrün	hellgrün
100	grün	blaugrün	mittelgrün
250	blaugrün	grünblau	grün
500	grünblau	blauschwarz	dunkelgrün
1000	olivschwarz	schwarz	tief grün

Testpapiere, die äquimolare Menge 3,3'-Dimethyl-5,5'-diäthylbenzidin enthalten, verhalten sich hinsichtlich Charakter und Stabilität der Reaktionsfarben praktisch so wie solche mit Tetraäthylbenzidin.

Beispiel 4
Testpapiere zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd

Filterpapier wird mit folgenden Lösungen getränkt und bei 40 °C getrocknet:

Lösung 1		
Trinatriumcitrat, Dihydrat		225 mg
Citronensäure, Monohydrat		175 mg
Peroxydase (70 U/mg)		50 mg
Natriumalginat		150 mg
Polyoxyäthylensorbitanmonolaurat (Tween 20)		1300 mg
Vinylpyrrolidin-Vinylacetat-Mischpolymerisat		375 mg
Wasser, dest.	ad	100 ml
Lösung 2		
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin		500 mg
Aceton	ad	100 ml

Das so gefertigte Testpapier gibt mit Wasserstoffperoxyd in wässrigen Lösungen, beispielsweise Milch, blaugrüne Farbreaktionen bis herunter zu Konzentrationen von 0,1 mg %.

Beispiel 5
Testpapier zum Nachweis von Cholesterin und Cholesterinestern in Serum

Filterpapier (Schleicher & Schüll 597 NF, Ind.) wird mit Lösungen folgender Zusammensetzung getränkt und bei 40 °C getrocknet:

Lösung 1		
1 molarer Citratpuffer pH 7		20,0 ml
Cholesterinoxydase (60 U/mg)		0,1 g
Cholesterinesterase (18 U/mg)		0,25 g
Peroxydase (70 U/mg)		0,05 g
Wasser, dest.	ad	100,0 ml
Lösung 2		
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin		0,28 g
Polyäthylenoctylphenoläther (Triton X 100)		0,5 g
Methylenchlorid	ad	100,0 ml

Die so erhaltenen Testpapiere reagieren mit Seren, die Cholesterin und/oder Cholesterinester enthalten, mit grünen Farbtönen, deren Intensität der Konzentration des Cholesterins entspricht. Entsprechende Testpapiere, die anstelle von Tetramethylbenzidin o-Tolidin enthalten, reagieren ebenfalls mit grünen Farbtönen, die aber weniger intensiv sind.

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von 2 bislang nicht bekannten Verbindungen der Formel I beschrieben.

Herstellungsbeispiel A
3,3'-Dimethyl-5,5'-diäthylbenzidin
Variante I

In einem 2-Liter-Dreihalskolben mit Rührer und Tropftrichter und Thermometer suspendiert man 96,5 g (0,564 Mol) 2-Methyl-6-äthyl-anilin-hydrochlorid in einer Mischung von 79,5 ml konzentrierter Salzsäure (d = 1,18) und 330 ml Wasser und tropft unter guter Eiskühlung bei 0 bis 3 °C eine Lösung von 39 g Natriumnitrit in 150 ml Wasser unter Rühren innerhalb 30 Minuten zu. Man rührt dann noch ca. 1 Stunde bei 0 bis 3 °C nach und verdünnt die Diazoniumsalzlösung durch Zugabe von 600 ml Eiswasser.

In der Zwischenzeit werden in einem 6-Liter-Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Thermometer (Y-Stück)

210 g Kupfer-(II)-sulfat in 900 ml Wasser gelöst und mit 363 ml konzentriertem Ammoniak (d = 0,88) versetzt. Dann löst man 90 g Hydroxylammoniumchlorid in 150 ml Wasser und tropft unter Eiskühlung eine Lösung von 95 g Kaliumhydroxyd in 72 ml Wasser zu. Diese gut gekühlte Lösung gibt man bei 10 bis 15 °C unter Stickstoff innerhalb 15 Minuten zu der gerührten Kupfertetraminlösung, wobei ein hellblauer Kupfer-(I)-salzkomplex gebildet wird. Unter Eiskühlung, kräftigem Rühren und unter Stickstoff wird nun bei 12 bis 15 °C innerhalb von 1,5 Stunden die gekühlte Diazoniumsalzlösung zugetropft (Tropftrichter mit Einleitungsrohr versehen, das mit U-förmiger Biegung unter die Oberfläche der Kupfersalzlösung reicht). Nach beendeter Zugabe wird eine Stunde nachgerührt, danach schüttelt man die Reaktionslösung mit 4 × 200 ml Äther aus. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit 3 × 50 ml 25% Natronlauge, 2 × 100 ml Wasser, 3 × 100 ml 2N-Salzsäure und 2 × 100 ml Wasser durchgeschüttelt. Man erhält 55,4 g Azoverbindung als rotes Öl. Die chromatographische Trennung an einer Kieselgelsäule (Füllhöhe 100 cm, Säulendurchmesser 4,8 cm) mit Chloroform-Ligroin 1 : 4 (Kieselgelmenge 1,5 kg, Durchmesser 0,063 bis 0,2 mm) gibt 33,7 g reines 2,2′-Dimethyl-6,6′-diäthylazobenzol als rotes Öl. Man löst dieses in 1,6 Liter Diäthyläther, gibt 330 ml Äthanol dazu, dann eine Lösung von 135 g Ammonchlorid in 1,5 Liter Wasser und fügt unter kräftigem Rühren portionsweise bei 22 °C 300 g Zinkstaub zu. Nach 5stündigem Rühren ist die Reduktion beendet. Man trennt die fast völlig entfärbte, organische Phase ab und schüttelt die wässrige Schicht dreimal mit je 250 ml Äther nach. Die vereinigten Ätherextrakte werden dann mit 210 ml 3N-Schwefelsäure versetzt und gerührt. Dabei bildet sich das Sulfat als farblose, zunächst klebrige Fällung. Nach Zugabe von 200 ml Äthanol erhält man 30,5 g 3,3′-Dimethyl-5,5′-diäthylbenzidinsulfat als farblose Kristalle. Man trägt dieses Produkt in 150 ml siedend heisses Wasser ein, kühlt unter Rühren auf Zimmertemperatur, versetzt mit 200 ml 2N-Natronlauge und extrahiert mit 4 x 100 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Rückstand 25,5 g hellbraune Kristalle. Dieses Rohprodukt wird aus Methanol–Wasser umkristallisiert. Man erhält 23 g = 30,4% beigefarbene Kristalle, Schmelzpunkt 69 bis 70 °C.

Das Dihydrochlorid ($C_{18}H_{24}N_2$ · 2 HCl) schmilzt bei 289 bis 291 °C (Zers.).

Variante II

1,5 g Aluminium und 0,1 g Quecksilberchlorid werden mit 75 g Anilin im Autoklaven auf 300 °C erhitzt, wobei sich das Aluminium unter Wasserstoff-Entwicklung auflöst. Nach dem Erkalten werden 92 g Tolidin und 4,5 g wasserfreies Aluminiumchlorid zugegeben. Danach wird auf 280 bis 300 °C hochgeheizt und Äthylen von 200 atm. aufgepresst. Nach etwa 3 Stunden ist die Äthylenaufnahme beendet. Danach wird abgekühlt und die Reaktionsmasse mit verdünnter Natronlauge ausgeschüttelt. Aus der organischen Phase werden im Vakuum 2-Äthylanilin und 2,6-Diäthylanilin abdestilliert (bis etwa 120 °C/10 mm).

Der Rückstand wird mehrfach aus verdünnter Salzsäure umkristallisiert. Man erhält das Dihydrochlorid des 3,3′-Dimethyl-5,5′-diäthylbenzidins. Schmelzpunkt 288 bis 292 °C (Zers.).

Herstellungsbeispiel B

3,3′,5,5′-Tetraisopropylbenzidin

Eine Lösung von 100 g 2,6-Diisopropylanilin in 1280 ml Wasser und 102 ml konzentrierter Salzsäure (d = 1,18) wird auf 90 °C erwärmt und rasch zu einer 97 °C heissen Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat-(III) in 5100 ml Wasser und 143 g Natriumhydroxyd getropft. Wegen der auftretenden freien Blausäure wird unter einem gut ziehenden Abzug gearbeitet. Die entstehende, rotgefärbte Suspension wird 15 Minuten nachgerührt, abgekühlt und mit 6 × 300 ml Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet, abgesaugt und eingeengt. Man erhält 97 g Azoverbindung als rotes Öl. Die chromatographische Trennung an einer Kieselgelsäule (Füllhöhe 110 cm, Säulendurchmesser 8 cm) mit Chloroform-Ligroin 1 : 4 (Kieselgelmenge 1,5 kg, Durchmesser 0,05 bis 0,2 mm) gibt 32,45 g ziegelrote Kristalle, Schmelzpunkt 134 bis 136 °C.

Die Azoverbindung wird in 500 ml Eisessig gelöst, 150 g Zinkstaub zugegeben und 30 Minuten unter Rühren am Rückfluss erhitzt. Danach wird der überschüssige Zinkstaub abgesaugt und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Man erhält 17,5 g farblose Kristalle, diese rührt man mit 150 ml Wasser an, gibt 150 ml 2N-Natronlauge zu und schüttelt dreimal mit je 150 ml Chloroform durch. Dabei erhält man 12,4 g rohes 3,3′,5,5′-Tetraisopropylbenzidin; dieses wird mit 90 ml Acetanhydrid versetzt, kurz aufgekocht und das überschüssige Acetanhydrid am Rotationsverdampfer eingeengt. Man löst den Rückstand in 20 ml Isopropanol, gibt 180 ml Ligroin zu und saugt die gebildeten Kristalle ab. Die erhaltene N,N′-Diacetylverbindung wird nochmals aus Isopropanol-Ligroin 2 : 1 umkristallisiert. Man isoliert 7,6 g farblose Kristalle, Schmelzpunkt 366 °C. Diese werden zur Abspaltung der N-Acetylgruppen in einem Gemisch von 180 ml Eisessig und 50 ml konzentrierter Salzsäure im Autoklaven 6 Stunden auf 130 bis 140 °C erhitzt.

Danach wird die Reaktionslösung eingeengt, der Rückstand mit 200 ml 2N-Natronlauge versetzt und die in Freiheit gesetzte Base mit 4 × 50 ml Chloroform extrahiert. Man trocknet die Chloroformextrakte über Natriumsulfat, saugt ab und engt ein. Dabei wird 3,3′,5,5′-Tetraisopropylbenzidin als bräunliches Öl erhalten.

Ausbeute 5,6 g (Mol.-Gew. 352).

Das Dihydrochlorid ($C_{24}H_{36}N_2$ · 2 HCl) schmilzt bei 263 bis 265 °C (Zers.).