

Sposób oznaczania kwasów karboksylowych i pochodnych kwasów karboksylowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania kwasów karboksylowych i pochodnych kwasów karboksylowych, zwłaszcza obecnych obok siebie, z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Sposób przeznaczony jest szczególnie do oznaczania chlorków acylowych, bezwodników i kwasów acylowinowych.

Bezwodniki *O,O'*-diacylowinowe (BDAW) stosowane są jako substraty do syntezy kwasów *O,O'*-diacylowinowych (KDAW). KDAW wykorzystywane są do rozdzielenia mieszanin racemicznych – chiralnych amin, alkoholi czy alkaloidów. Stosowane są głównie w przemyśle farmaceutycznym przy produkcji leków.

Kwasy i hydroksykwasy oraz ich pochodne oznaczane są metodami chromatografii cienkowarstwowej (TLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), a także metodą chromatografii gazowej (GC). Analiza HPLC wykonywana jest na kolumnach z odwróconą fazą (RP), gdzie stosowane fazy ruchome są roztworami wody (roztwory buforowe o określonym pH) z różnymi rozpuszczalnikami organicznymi np. metanol, acetonitryl (I. Mato, S. Sua' rez-Luque, J. F. Huidobro, Food Research International 38, 2005, 1175–1188, A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines). Jednak jeżeli w oznaczanej próbce oprócz kwasów są obecne bezwodniki lub chlorki kwasowe, to można je oznaczyć tylko jako sumę kwasów po odpowiedniej hydrolizie próbki, ponieważ bezwodniki i chlorki kwasowe w środowisku wodnym ulegają hydrolizie.

Problem ten pojawia się w różnych procesach otrzymywania bezwodników i kwasów karboksylowych, zwłaszcza acylowinowych, bez względu na zastosowaną metodę syntezy. Najbardziej pożądane z technologicznego punktu widzenia byłoby zastosowanie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej, jednak, ze względu na skład fazy ruchomej dla kolumn RP, bezwodniki, a także chlorki kwasowe, hydrolizują do odpowiednich kwasów, nie

można więc tą metodą określić ich ilości obok obecnych w mieszaninie kwasów karboksylowych.

W literaturze nie znaleziono informacji na temat możliwości oznaczania obok siebie różnych pochodnych acylowych kwasu winowego, takich jak np. bezwodniki i kwasy.

W analizie chemicznej znany jest sposób postępowania, zwany derywatyzacją, polegający na otrzymywaniu pochodnych analizowanych związków o korzystniejszej charakterystyce fizykochemicznej. W przypadku kwasów i hydroksykwasów znane jest wykorzystywanie reakcji estryfikacji lub silylowania kwasów w celu derywatywacji oznaczanych związków do odpowiednich estrów i pochodnych silylowych (I. Mato, S. Sua´rez-Luque, J. F. Huidobro, *Food Research International* 38, **2005**, 1175–1188, A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines).

O użyteczności derywatywacji decydują warunki jej przeprowadzania. Na przykład derywatywacja przez estryfikację bezwodników diacylowinowych i chlorków acylowych alkoholami wymaga długiego czasu i/lub podwyższonej temperatury reakcji. Taka procedura przygotowania próbki do analizy jest więc zbyt uciążliwa.

Celem wynalazku było zatem opracowanie metody pozwalającej na zastosowanie HPLC do oznaczania odpowiednich pochodnych kwasu winowego i kwasów karboksylowych. W szczególności celem wynalazku było opracowanie metody oznaczania wszystkich reagentów obecnych obok siebie w trakcie syntezy odpowiednich pochodnych acylowych kwasu winowego, z wykorzystaniem chromatografii HPLC.

Cel ten został osiągnięty dzięki zastosowaniu metody analizy pośredniej, w której właściwą analizę HPLC poprzedzono derywatyzacją próbki w celu przeprowadzenia łatwo hydrolizowalnych związków w odpowiednio trwałe amidy. Wiadomo jednak, że amidy kwasów diacylowinowych mogą ulec deacylowaniu pod wpływem amin. Taki proces jest znany na przykład w przypadku reakcji odbenzoilowania *N*-benzylamidu kwasu *O,O'*-dibenzoilowinowego do *N*-benzylamidu kwasu *O*-benzoilowinowego zachodzącej pod wpływem amin (K. H. Bell *Aust. J. Chem.*, **40**, 1723 (1987), Selective Aminolysis of Benzoates and Acetates of α -Hydroxy Acids and Phenols with Benzylamine and Butan-1-amine). Wiadomo również, że w nadmiarze aminy mogą powstawać imidy, diamidy i/lub amidy (Duhamel, T. Herman, P. Angibaud, *Synth. Commun.* **1992**, 22, 735, An Easy Access to (3*R*,4*R*)-*O,O'*-Diacyltartrimidates).

Derywatywacja próbki musi zatem być przeprowadzona w takich warunkach, które eliminują możliwość deacylowania, gdyż mogłoby ono prowadzić do mylnych wniosków na temat obecności oznaczanych związków w środowisku reakcji.

Sposób oznaczania pochodnych kwasu winowego i/lub kwasów karboksylowych metodą analizy chromatograficznej HPLC według wynalazku charakteryzuje się tym, że do próbki oznaczanego związku lub mieszaniny związków dodaje się rozpuszczalnik i pierwszo- lub drugorzędową aminę w ilości od 1,5 do 3 części objętościowych na 1 część masową oznaczanej próbki, po czym, nie później niż po upływie 60 min, próbkę zakwasza się do pH od 3,5 do 5,5, rozcieńcza fazą ruchomą i poddaje analizie chromatograficznej metodą HPLC.

Korzystnie próbkę po pobraniu zabezpiecza się przed dostępem wilgoci.

Korzystnie jako rozpuszczalnik stosuje się rozpuszczalnik polarny, najkorzystniej acetonitryl.

Korzystnie rozpuszczalnik stosuje się w ilości od 25 do 40 części objętościowych na 1 część masową oznaczanej próbki.

Korzystnie jako aminę stosuje się aminę aromatyczną, najkorzystniej benzyloaminę.

Korzystnie do zakwaszenia stosuje się kwas octowy lub trifluorooctowy.

Korzystnie próbkę zakwasza się po upływie od 5 do 30 minut.

Korzystnie jako fazę ruchomą stosuje się $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ w stosunku objętościowym (400 do 600) : (600 do 400) : (1,5 do 25)

Korzystnie pH fazy ruchomej jest nie większe niż 3,5.

Korzystnie stosuje się prędkość przepływu od 0,5 do 1,5 l/min.

W sposobie według wynalazku do derywatyzacji stosuje się aminę pierwszo- lub drugorzędową, najkorzystniej benzyloaminę. Benzyloamina reaguje szybko i w łagodnych warunkach z bezwodnikami kwasowymi i chlorkami acylów, przekształcając je odpowiednio w amidosole i amidy, natomiast obecne w układzie kwasy tworzą z nią odpowiednie sole benzyloamoniowe. Odpowiednie rozcieńczenie próbki przed dodaniem aminy i zakwaszenie próbki po czasie nie dłuższym niż 60 min, pozwoliło całkowicie wyeliminować możliwość przebiegu deacylowania w czasie derywatyzacji. Po zakwaszeniu zderywatyzowanej próbki, w celu odbezpieczenia soli, otrzymuje się mieszaninę amidokwasów, amidów i kwasów, nadającą się już do analizy na RP-HPLC z detektorem UV-Vis.

W celu zweryfikowania sposobu według wynalazku sporządzono mieszaninę wzorców symulującą skład derywatyzowanej próbki z syntezy BDAW i wykazano na przykładzie benzoilowych pochodnych, że w warunkach analizy chromatograficznej (HPLC z detektorem UV-Vis), związki te doskonale dzielą się na zastosowanej kolumnie w układzie odwróconej fazy i dają na chromatogramie dobrze wyodrębnione piki. Czasy retencji oznaczanych związków zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1.

Oznaczany związek (przed derywatyzacją)	Czas retencji (min)
Kwas winowy (KW)	1,6
Kwas <i>O</i> -benzoilowinowy (KBW)	1,8
Kwas <i>O,O'</i> -dibenzoilowinowy (KDBW)	2,6
Amid kwasu <i>O</i> -benzoilowinowego (ABW) (Bezwodnik <i>O</i> -benzoilowinowy (BBW))	2,8
Kwas benzoesowy (KB)	3,4
Amid kwasu benzoesowego (AKB) (Chlorek benzoilu (CB))	6,2
Amid kwasu <i>O,O'</i> -dibenzoilowinowego (ADBW) (Bezwodnik <i>O,O'</i> -dibenzoilowinowy (BDBW))	6,7

Chromatogram mieszaniny wzorców z syntezy BDBW przedstawiono na rysunku.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach stosowania. Analizę HPLC próbek wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego HP 1100 Firmy Agilent Technologies z kolumną LiChrospher 100 RP-18 i detektorem UV-Vis przy długości fali od 200 do 280 nm. Parametry kolumny: 250 mm, Φ 4 mm, grubość ziarna 5 μ m, nastrzyk 20 μ l, prędkość przepływu 1 ml/min. Fazą ruchomą był układ w częściach objętościowych $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} = 500:500:2$ o pH= 3,2

Przykład 1.

Benzoilowanie kwasu winowego

Próbkę mieszaniny reakcyjnej z syntezy bezwodnika benzoilowego na drodze benzoilowania kwasu winowego chlorkiem benzoilu, w której w roztworze toluenowym znajduje się ok. 0,4 g surowców i produktów, pobrano za pomocą ogrzanej strzykawki z metalową igłą przez gumowe uszczelnienie i jak najszybciej przeniesiono do zważonej 50 ml kolbki miarowej, po czym kolbkę zabezpieczono przed dostępem wilgoci. Po ostygnięciu, kolbkę z próbką zważono i dodano do niej 15 ml acetonitrylu, wymieszano i następnie dodano 1,0 ml benzyloaminy. Po upływie 5 min dodano 16 ml 4% roztworu wodnego kwasu octowego. Po rozpuszczeniu dopełniono do kreski fazą ruchomą. Przed nastrzykiem na kolumnę HPLC próbkę rozcieńczono stukrotnie fazą ruchomą. Zawartość oznaczanych składników wyznaczono na podstawie krzywych wzorcowych przygotowanych w tych samych warunkach analizy. Zawartości poszczególnych składników mieszaniny wynoszą KDBW

3,5%, KB 29,7%, CB 8,5%, BDBW 24,6%. Czasy retencji oznaczanych związków przedstawia Tabela 1.

Przykład 2

Hydrolyza bezwodnika dibenzoilowego

Próbkę mieszaniny reakcyjnej hydrolyzy BDBW w wodzie, w której w roztworze wodnym znajduje się około 0,4 g BDBW i KDBW, pobrano za pomocą ogrzanej strzykawki z metalową igłą przez gumowe uszczelnienie i szybko przeniesiono do zważonej 50 ml kolbki miarowej. Po ostygnięciu, kolbkę z próbką zważono i dodano do niej 15 ml acetonitrylu, wymieszano i następnie dodano 1,0 ml benzyloaminy. Po upływie około 5 min dodano 16 ml 4% roztworu wodnego kwasu octowego. Po rozpuszczeniu dopełniono do kreski fazą ruchomą. Przed nastrzykiem na kolumnę HPLC próbkę rozcieńczono stukrotnie fazą ruchomą. Zawartość oznaczanych składników wyznaczono na podstawie odpowiednich krzywych wzorcowych przygotowanych w tych samych warunkach analizy. Zawartości składników wynoszą KDBW 25,6%, KB 0,02%, BDBW 0,04%. Czasy retencji oznaczanych związków przedstawia Tabela 1.

Przykład 3

Otrzymywanie *N*-benzyloimidu kwasu dibenzoilowinowego.

Próbkę mieszaniny reakcyjnej otrzymywania benzyloimidu monobenzoilowinowego (reakcja KDBW z benzyloaminą w ksylene), w której znajduje się ok. 0,4 g surowców i produktów, pobrano za pomocą ogrzanej strzykawki z metalową igłą przez gumowe uszczelnienie i szybko przeniesiono do zważonej 50 ml kolbki miarowej. Po ostygnięciu, kolbkę z próbką zważono i dodano do niej 15 ml acetonitrylu, wymieszano i następnie dodano 1,0 ml benzyloaminy. Po upływie 5 min dodano 16 ml 4% roztworu wodnego kwasu octowego. Po rozpuszczeniu dopełniono do kreski fazą ruchomą, CH₃CN/A (1:1). Przed nastrzykiem na kolumnę HPLC próbkę rozcieńczono stukrotnie fazą ruchomą. Zawartość oznaczanych składników wyznaczono na podstawie krzywych wzorcowych przygotowanych w tych samych warunkach analizy. Zawartości składników wynoszą KDBW 3%, KB 38%, ADBW 2%, diamid 4%, imid monobenzoilowinowy 43%, imid dibenzoilowinowy 29%. Czasy retencji oznaczanych związków przedstawia Tabela 2.

Tabela 2

Oznaczany związek (przed derywatyzacją)	Czas retencji (min)
Imid benzyłowy kwasu <i>O</i> -benzoilowinowego	10,3
Diamid benzyłowy kwasu <i>O,O'</i> -dibenzoilowinowego	24,5
Imid benzyłowy kwasu <i>O,O'</i> -dibenzoilowinowego	52,3

Przykład 4

Anizoilowanie kwasu winowego

Próbkę mieszaniny reakcyjnej z syntezy bezwodnika dianizoilowego przez anizoilowanie kwasu winowego chlorkiem anizoilu w toluenie, w której znajduje się ok. 0,4 g surowców i produktów pobrano, przygotowano i wykonano analizę HPLC jak w przykładzie 1. Zawartość oznaczanych składników wyznaczono na podstawie odpowiednich krzywych wzorcowych przygotowanych w tych samych warunkach analizy. Zawartości składników wynoszą KA 1,5%, CA 2,2 %, BDAW 52 %. Czasy retencji anizoilowych pochodnych kwasu winowego po derywatywacji benzyloaminą przedstawia Tabela 3.

Tabela 3.

Oznaczany związek (przed derywatyzacją)	Czas retencji (min)
Kwas winowy (KW)	1,6
Kwas <i>O,O'</i> -dianizoilowinowy (KDAW)	2,8
Kwas anyżowy (KA)	3,5
Amid kwasu anyżowego (AKA) (Chlorek anizoilu (CA))	6,3
Amid kwasu <i>O,O'</i> -dianizoilowinowego (ADAW) (Bezwodnik <i>O,O'</i> -dianizoilowinowy (BDAW))	7,2

Przykład 5

Otrzymywanie kwasu diizopropoksybenzoilowinowego

Próbkę mieszaniny poreakcyjnej z syntezy kwasu diizopropoksybenzoilowinowego, zawierającą kwas diizopropoksybenzoilowy, chlorek tionylu i kwas winowy, w dimetoksyetanie, w której znajduje się ok. 0,4 g surowców i produktów pobrano,

przygotowano i wykonano analizę HPLC jak w przykładzie 1. Zawartość oznaczanych składników wyznaczono na podstawie odpowiednich krzywych wzorcowych przygotowanych w tych samych warunkach analizy. Zawartości składników wynoszą KW 5,61%, KMDIPBW 15,9%, KDIPB 1,0%. Czasy retencji diizopropoksylowych pochodnych kwasu winowego po derywatacji benzyloaminą przedstawia Tabela 4.

Tabela 4.

Oznaczany związek (przed derywatacją)	Czas retencji (min)
Kwas winowy (KW)	1,6
Kwas <i>O</i> -monodiizopropoksybenzoilowinowy (KDIPBW)	3,1
Kwas diizopropoksybenzoesowy (KDIPB)	6,3

RZECZNIK PATENTOWY


dr. hab. Krzysztof Pudło