

## Note

### **Bestimmung von Verunreinigungen in Salicylsäure durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie nach Computer gestützter Optimierung der Trennparameter\***

GÜNTER EPPERT\*, GERT LIEBSCHER, MANFRED IHRKE und GERD ARENDT

*VEB Leuna-Werke "Walter Ulbricht", 4220 Leuna (D.D.R.)*

(Eingegangen am 17. Juni 1985; geänderte Fassung eingegangen am 30. September 1985)

Bereits früher konnten wir zeigen, dass sich die Reinheit der aus Natriumphenolat und Kohlendioxyd nach dem Kolbe-Schmitt-Verfahren hergestellten Salicylsäure vorteilhaft planarchromatographisch charakterisieren lässt<sup>1,2</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen technischer Salicylsäuren (S) durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) berichtet. Die Methode eignet sich vorzüglich für eine schnelle und zuverlässige Reinheitskontrolle.

Grundlage der Trennung der Phenolcarbonsäuren waren die Umkehrphasenchromatographie und das Prinzip der Ionenunterdrückung (siehe Übersicht von Schwarzenbach<sup>3</sup>).

Im konkreten Falle der Untersuchung der Rohsalicylsäure erwies sich eine systematische Optimierung der Trennparameter insbesondere in Hinblick auf die spätere Routinemethode als notwendig. Hierzu diente das Window-Diagramm-Verfahren<sup>4,5</sup>, das sich in der HPLC bislang an Modellgemischen mit den Variablen pH-Wert<sup>6</sup>, pH-Wert und Ionenpaarkonzentration<sup>7,8</sup>, Ionenpaarkonzentration und Elutionsmittelstärke<sup>7</sup> sowie pH-Wert, Elutionsmittel- und Ionenstärke<sup>9</sup> bewährte.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

##### *Geräte*

Ein Flüssigchromatograph 1084 B (Hewlett-Packard) mit Detektor variabler Wellenlänge Typ 79875A, ein Digital-pH-Meter MV 870 (VEB Präcitronic) und ein Rechner CD 1604 A (Control Data) wurden benutzt.

##### *Lösungsmittel*

Die Lösungsmittel waren Methanol (M) rein (VEB Leuna-Werke) und frisch destilliertes Wasser (W), vor der Chromatographie über eine G4-Fritte filtriert.

##### *Testsubstanzen*

Die Testsubstanzen waren Salicylsäure (S), 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB), 2-Hydroxyisophthalsäure (2-HIP), 4-Hydroxyisophthalsäure (4-HIP), 3-Methylsali-

\* Vorgetragen auf der 5. Merseburger Analytiktagung, 7.–9. September 1983, Merseburg, D.D.R.

cylsäure (3-MS, *o*-Kresotinsäure), Phenol (P), 6-Hydroxytrimesinsäure (6-HT), 3-Hydroxybenzoesäure (3-HB), alle aus eigenem Aufkommen.

#### *Pufferlösungen*

Der Puffer bestand aus je 0.04 M Borsäure, Phosphorsäure, Essigsäure (universalpuffer nach Lure<sup>10</sup>). Die genaue pH-Wert-Einstellung erfolgte mit 5 M Phosphorsäure bzw. 4 M Natronlauge.

#### *Proben*

Die Proben waren Versuchsprodukte des VEB Leuna-Werke sowie Muster verschiedener Firmen.

#### *Bedingungen zur HPLC technischer Salicylsäure*

Die Bedingungen waren: Trennsäule, 200 × 4,6 mm I.D.; Kompaktphase, LiChrosorb RP-8; Korngrösse, 10 µm; Probenlösung, ca. 10 mg Probe pro ml M-W (3:1, v/v); Lösungsmittel (Lm) A, Wasser-Pufferlösung (95:5), pH-Wert 2,4; Lösungsmittel B, Methanol; Dosiervolumen, 10 µl (≅ 100 µg Probe); Fluss, 2 ml/min; Lm B in A, 24%, pH-Wert der Mischung 2,7; Säulenraumtemperatur, 313 K; Entgasungstemperatur für A, 353 K; Entgasungstemperatur für B, 313 K; Messwellenlängen, 214 nm, 314 nm; Signalabschwächung, 2<sup>6</sup>; Programm: 24% B, 4 min isokratisch; 24 bis 55% B in 14 min; nach 5,8 min automatische Umschaltung von 214 auf 314 nm.

### UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

Das vorliegende Trennproblem erforderte zunächst die Ermittlung des für die Trennung günstigsten pH-Bereichs. Dazu wurden die Nettoretentionszeiten der interessierenden Komponenten in wässriger Lösung in einem bestimmten pH-Intervall experimentell bestimmt und anschliessend die exakten Abhängigkeiten nach bekannten Gleichungen<sup>11,12</sup> im gesamten pH-Bereich berechnet (Fig. 1).

In Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturangaben<sup>3</sup> darf man die besten Trennergebnisse im pH-Bereich 2–3 erwarten, allerdings mit unakzeptablen Trennzeiten im rein wässrigen System.

Um den manuellen Aufwand bei der Optimierung mit dem organischen Lösungsmittel (M) möglichst gering zu halten, entschlossen wir uns zur Anwendung eines Computers und des Gradientenverfahrens von Marquardt<sup>13</sup>. Hierfür dienten ausser den schon erwähnten Gleichungen entsprechende empirische Beziehungen<sup>9,14</sup>. Die Ionenstärke wurde dabei vernachlässigt. Zur Berechnung des dreidimensionalen Window-Diagramms mussten Retentionswerte bei fünf diskreten pH-Werten im Bereich von pH 2–4 und bei jeweils fünf verschiedenen Methanolkonzentrationen (0–40 Vol.-%) ermittelt werden.

Der Erfolg einer Trennung hängt ausser von den Systemparametern sehr von der quantitativen Probenzusammensetzung ab, die das Window-Verfahren nicht berücksichtigt. Aus diesem Grunde wurde der Rechner nach Bedingungen abgefragt, unter denen die Salicylsäure (Überschusskomponente) im hinteren und Phenol (Spurenkomponente) im vorderen Chromatogrammteil erscheinen.

Nicht in die  $\alpha$ -Wert-Strategie einzubeziehen sind bekanntlich auch die Trenn-

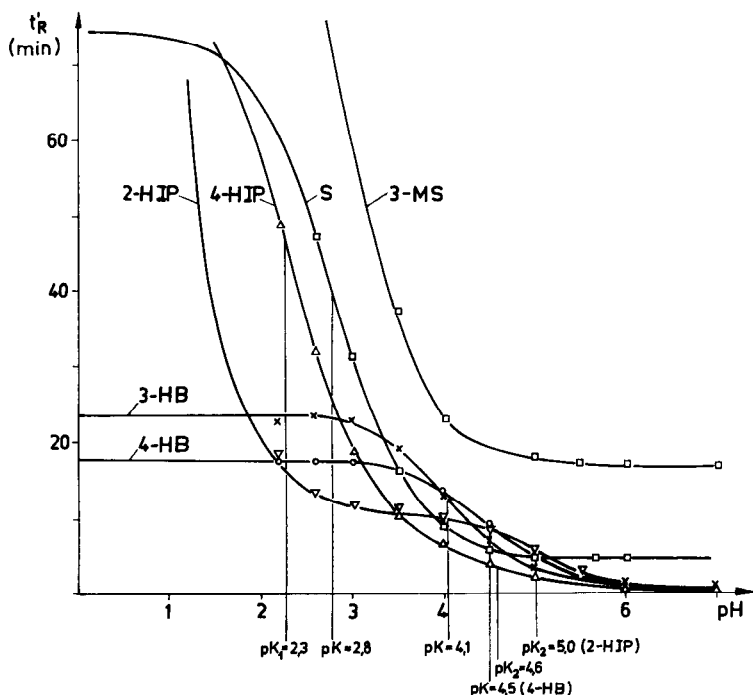


Fig. 1. Abhängigkeit der Nettoerhaltungszeiten  $t_R$  der Phenolcarbonsäuren vom pH-Wert. Experimentell bestimmte Messpunkte und durch Computer-Ausgleichs-Rechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnete Kurven (ausgezogen), Elutionsmittel Wasser, Universalpufferlösung. Bedingungen und Bezeichnungen vgl. experimenteller Teil; Totzeit  $t_M = 1,15$  min (6-HT). Die eingezeichneten pK-Werte der Säuren ergeben sich graphisch aus den Wendepunkten bzw. durch Rechnung. Sie stimmen gut mit anderweitig ermittelten Literaturwerten überein<sup>16-18</sup>.

zeiten. Im Anschluss an die entsprechend der rechnergestützten Optimierung festgelegten isokratischen Bedingungen haben wir dementsprechend den nicht kritischen hinteren Chromatogrammteil durch einen Lösungsmittelgradienten verkürzt (siehe experimenteller Teil). Ebenso vorteilhaft erwies sich die nachträgliche Programmierung der Messwellenlänge, um ein peakflächenmässig ausgeglichenes Chromatogramm zu erhalten.

#### DISKUSSION

Nicht nur der pH-Wert, auch der M-Gehalt im Elutionsmittel beeinflusst die Auftrennung der Salicylsäureverunreinigungen stark (Fig. 2a und b). Ein Vergleich der beiden Figuren (pH 2,2 und 4,0) zeigt sehr übersichtlich, dass alle Strukturen, die im aciden Bereich einen zweiten Sechsring über H-Brücken bilden können, bei niedrigerem pH-Wert (Fig. 2a) maximale Retentionswerte erreichen.

Aus dem Window-Diagramm der Optimierung liess sich ableiten, dass das in erster Näherung allein die Elutionsmittelstärke regulierende M insbesondere im vorderen Chromatogrammbereich die Selektivität merklich beeinflusst. Unter Berücksichtigung aller Einflussgrößen optimierte Chromatogramme enthält Fig. 3.

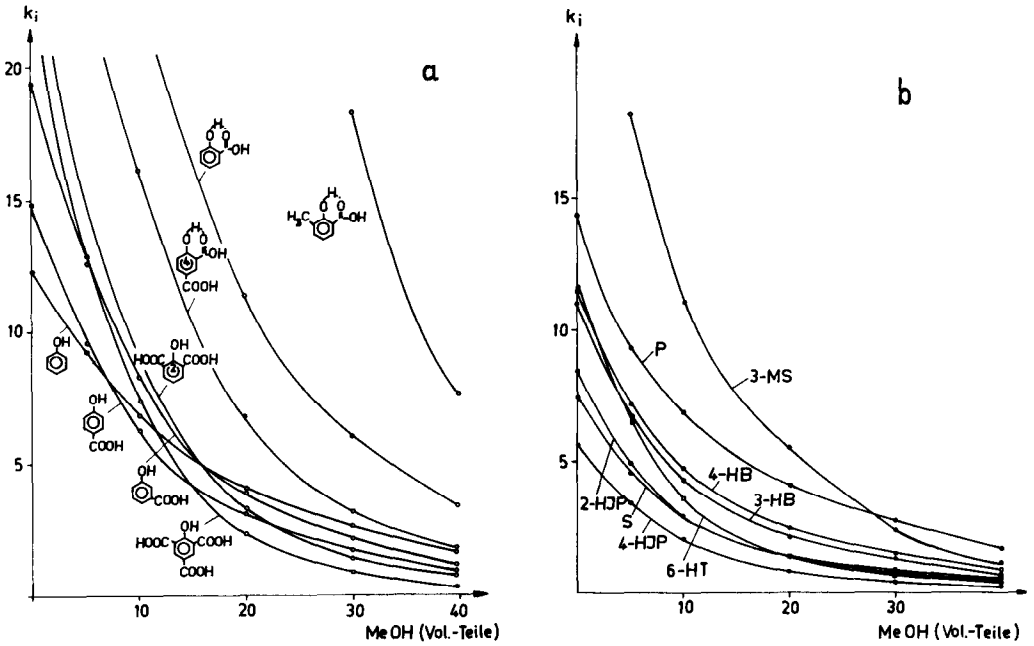


Fig. 2. Abhängigkeit der Kapazitätsfaktoren  $k_i$  vom M-Gehalt bei pH 2,2 (a) und bei pH 4,0 (b) Universalpufferlösung. Bedingungen vgl. experimenteller Teil. MeOH = Methanol.

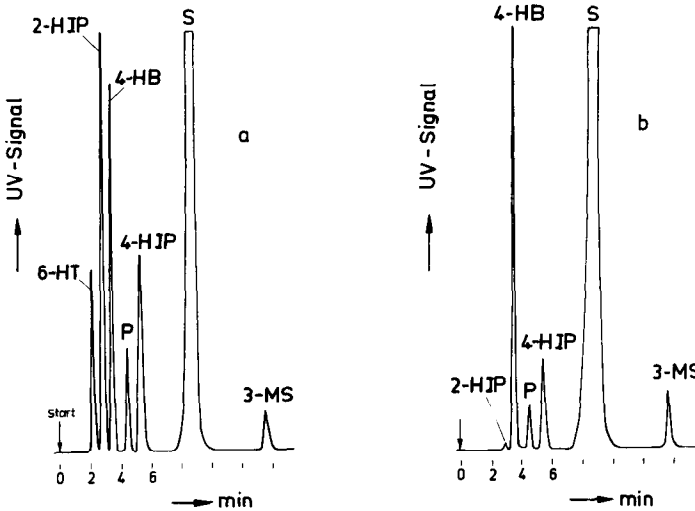


Fig. 3. (a) Chromatogramm eines Gemisches aus Phenolcarbonsäuren und Phenol. Bedingungen siehe experimenteller Teil. (b) Chromatogramm von Salicylsäure techn. (VEB Leuna-Werke). Bedingungen siehe experimenteller Teil.

TABELLE I

## VERGLEICH SPEKTROPHOTOMETRISCH UND DURCH HPLC ERMITTELTEN GEHALTE FÜR 4-HB UND P

Spektrophotometrische Methode aus Ref. 19.

Probe	4-HB (%)		P (%)	
	Spektrophotometrie	HPLC	Spektrophotometrie	HPLC
1	3,40	3,52	0,110	0,115
2	1,27	1,27	0,070	0,074
3	0,43	0,43	0,060	0,056
4	0,74	0,61	0,066	0,059
5	0,74	0,59	0,086	0,074
6	0,50	0,40	0,066	0,059
7	1,00	0,92	0,075	0,072
8	0,84	0,75	0,064	0,066
9	0,81	0,68	0,070	0,065
10	0,44	0,44	0,054	0,055
11	0,60	0,50	0,064	0,050
12	0,60	0,53	0,058	0,052

Ein Vergleich zwischen chromatographisch und spektrophotometrisch bestimmten Gehalten an 4-HB und Phenol ergab gute Übereinstimmung (Korrelationskoeffizienten<sup>15</sup>  $r_{4-HB} = 0,998$ ,  $r_P = 0,942$ , Tabelle I).

Die chromatographische Untersuchung verschiedener Qualitäten roher und gereinigter Salicylsäure (Tabelle II) lässt als ständige Verunreinigungen 4-HB, 4-HIP und 3-MS erkennen, während 2-HIP in der Mehrzahl der Proben nicht vorkommt. 3-MS stammt aus dem zu 0,1–0,5% im Reinphenol enthaltenen *o*-Kresol. Am Tabellenende wurde als Vergleich die Zusammensetzung des bei der Synthese primär anfallenden Natriumsalicylats aufgeführt. In keiner der Proben liess sich 6-HT nach-

TABELLE II

## HPLC UNTERSUCHUNGEN AN SALICYLSÄUREPROBEN

Bedingungen siehe experimenteller Teil.  $\Sigma$  = Total. n.n. = Nicht nachweisbar.

Proben-Provenienz	4-HB (%)	P (%)	2-HIP (%)	4-HIP (%)	3-M (%)	$\Sigma$ (%)
Rumänien	0,304	0,032	n.n.	0,026	0,066	0,428
Italien	1,450	0,096	0,008	0,307	0,089	1,950
Polen	0,035	n.n.	n.n.	0,035	0,043	0,113
UdSSR	0,015	0,015	n.n.	0,490	0,065	0,585
DDR*	0,380	0,061	0,005	0,087	0,110	0,643
BRD	0,095	0,177	n.n.	0,279	0,058	0,609
BRD	0,018	n.n.	0,004	0,008	n.n.	0,030
Natriumsalicylat	4,496	4,88	0,116	0,441	0,043	9,976

\* Salicylsäure techn., TGL 16300.

weisen, deren Entstehung beim Kolbe-Schmitt-Verfahren durch abermalige Einführung einer Carboxylgruppe aus den Hydroxyisophthalsäuren denkbar ist. Die Säure fand sich aber in geringer Menge in den Sublimationsrückständen der technischen Salicylsäurereinigung.

## LITERATUR

- 1 G. Eppert und M. Ihrke, *Z. Chem.*, 5 (1965) 464.
- 2 G. Eppert und M. Ihrke, *Pharmazie*, 22 (1967) 88.
- 3 R. Schwarzenbach, *J. Chromatogr.*, 251 (1982) 339.
- 4 R. J. Laub, *Int. Lab.*, Mai/Juni (1981) 16.
- 5 R. J. Laub und J. H. Purnell, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 71.
- 6 S. N. Deming und M. L. H. Turoff, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 546.
- 7 R. C. Kong, B. Sachok und S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 307.
- 8 B. Sachok, R. C. Kong und S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 317.
- 9 M. Otto und W. Wegscheider, *J. Chromatogr.*, 258 (1983) 11.
- 10 J. J. Lure, *Handbuch der analytischen Chemie*, (russ.), Verlag Chimija, Moskau, 1971, S. 238.
- 11 Cs. Horváth, W. Melander und I. Molnar, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 142.
- 12 D. J. Pietrzyk, E. P. Kroeff und T. D. Rotsch, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 497.
- 13 D. W. Marquardt, *Soc. Ind. Appl. Math.*, 11 (1963) 431.
- 14 B. Sachok, J. J. Stranahan und S. N. Deming, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 70.
- 15 K. Doerffel, *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1966, S. 191.
- 16 Z. L. Ernst und J. Menashi, *Trans. Far. Soc.*, 59 (1963) 1803.
- 17 G. Kortüm, W. Vogel und K. Andrussov, *Pure Appl. Chem.*, 1 (1960) 187.
- 18 Y. Murakami und A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 2119.
- 19 *Staatlicher Standard der D.D.R., TGL 16300, Organische Zwischenprodukte, Salicylsäure technisch*, Bezugsquelle VEB Leuna-Werke "Walter Ulbricht", Leuna, 1980.