

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

⑫ OPIS PATENTOWY ⑲ PL ⑪ 161185

⑬ B1

⑳ Numer zgłoszenia: 281408

⑤① IntCl<sup>5</sup>:  
C07C 59/08

㉑ Data zgłoszenia: 12.09.1989

⑤④ Sposób oksydatywnej degradacji kwasu mlekowego znakowanego izotopami węgla i izotopami wodoru

④③ Zgłoszenie ogłoszono:  
25.03.1991 BUP 06/91

④⑤ O udzieleniu patentu ogłoszono:  
31.05.1993 WUP 05/93

⑦③ Uprawniony z patentu:  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków, PL

⑦② Twórcy wynalazku:  
Mieczysław Zieliński, Kraków, PL  
Wiesław Tracz, Olkusz, PL

⑤⑦ Sposób oksydatywnej degradacji kwasu mlekowego znakowanego izotopami węgla i izotopami wodoru, **znamienny tym**, że sól kwasu mlekowego i/lub kwas mlekowy miesza się z zawiesiną wodną dwutlenku manganu, wytwarza się próżnię i wprowadza do mieszaniny reakcyjnej kwas siarkowy i/lub kwas ortofosforowy albo kwas mlekowy miesza się z kwasem siarkowym i/lub kwasem ortofosforowym po czym wytwarza się próżnię, utlenia się kwas mlekowy dwutlenkiem manganu i/lub nadmanganianem potasu z wytworzeniem między innymi aldehydu octowego i dwutlenku węgla, które w postaci gazowej opuszczają samoczynnie i gwałtownie środowisko reakcji, po czym przeprowadza się częściowy ich rozdział schładzając do temperatury około 190 K, a następnie została się je przez schładzanie do temperatury 80-90 K i poddaje całkowitemu rozdzieleniu na drodze niskotemperaturowej destylacji próżniowej nad chlorek cynku.

PL 161185 B1

**SPOSÓB OKSYDATYWNEJ DEGRADACJI KWASU MLEKOWEGO ZNAKOWANEGO IZOTOPAMI  
WĘGLA I IZOTOPAMI WODORU**

**Z a s t r z e ż e n i e   p a t e n t o w e**

Sposób oksydatywnej degradacji kwasu mlekowego znakowanego izotopami węgla i izotopami wodoru, znany jest tym, że sól kwasu mlekowego i/lub kwas mlekowy miesza się z zawiesiną wodną dwutlenku manganu, wytwarza się próżnię i wprowadza do mieszaniny reakcyjnej kwas siarkowy i/lub kwas ortofosforowy albo kwas mlekowy miesza się z kwasem siarkowym i/lub kwasem ortofosforowym po czym wytwarza się próżnię, utlenia się kwas mlekowy dwutlenkiem manganu i/lub nadmanganianem potasu z wytworzeniem między innymi aldehydu octowego i dwutlenku węgla, które w postaci gazowej opuszczają samoczynnie i gwałtownie środowisko reakcji, po czym przeprowadza się częściowy ich rozdział schładzając do temperatury około 190 K, a następnie zestala się je przez schładzanie do temperatury 80-90 K i poddaje całkowitemu rozdzielaniu na drodze niskotemperaturowej destylacji próżniowej z nadchlorkiem cynku.

\* \* \*

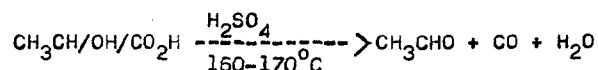
Przedmiotem wynalazku jest udoskonalenie sposobu oksydatywnej degradacji kwasu mlekowego znakowanego izotopami węgla:  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  lub  $^{14}\text{C}$  oraz izotopami wodoru:  $^2\text{H}$  lub  $^3\text{H}$ .

Znana jest metoda Boasa, która po udoskonaleniu pozwala określić z 98-procentową wydajnością zawartość kwasu mlekowego w próbce biologicznej. Polega ona na wkraplaniu w ciągu 15 minut starannie przygotowanego koloidalnego  $\text{MnO}_2$  do kolby Kjeldahl'a, zawierającej analizowaną próbkę rozpuszczoną we wrzącym roztworze siarczanu manganu z dodatkiem talku w rozcieńczonym roztworze kwasu fosforowego lub siarkowego pod ciśnieniem atmosferycznym. Ulatniający się wraz z parami wodnymi aldehyd octowy jest pochłaniany w kolbie zawierającej nadmiarową ilość około 0,1 N roztworu kwaśnego siarczynu. Po 15 minutach i ochłodzeniu kolby z otrzymanym adduktem aldehydu octowego z kwaśnym siarczynem sodu, odmiareczkuje się standardowym roztworem jodu w obecności krochmalu do pojawienia się koloru niebieskiego najpierw swobodny siarczyn, następnie siarczyn związany po rozłożeniu adduktu siarczynu z aldehydem nasyconym roztworem  $\text{NaHCO}_3$ .

Metodę tę zastosowano do wyznaczenia położenia węgla izotopowego w kwasie mlekowym. Aldehyd octowy i dwutlenek węgla unosi się z kolby reakcyjnej w strumieniu powietrza. Aldehyd pochłania się w płuczce zawierającej kwaśny siarczyn sodu, zaś dwutlenek węgla, po wcześniejszym usunięciu z powietrza dwutlenku siarki w wieży wypełnionej półnasyconym roztworem nadmanganianu potasu, pochłania się w roztworze alkalicznym, z którego jest następnie wytrącany wodorotlenkiem baru.

Przedstawiona powyżej metoda jest kłopotliwa i pracochłonna ze względu na stosowanie metod konwencjonalnych do przygotowania odpowiednich próbek stałych, umożliwiających ilościowy pomiar radioaktywności radiowęgla.

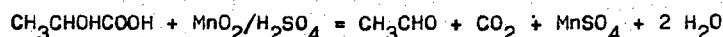
Znana jest także enzymatyczna metoda utleniania kwasu mlekowego do kwasu pirogronowego z późniejszą syntezą krystalicznej pochodnej tego ketokwasu. Pozwala ona określić sumaryczną radioaktywność wszystkich trzech węgla w kwasie mlekowym, lecz gubi nielabilny tryt lub deuter znajdujący się w wiązaniu  $\text{C}-\text{H}$  i wymaga degradacji ketokwasu w celu wyznaczenia procentowej zawartości radiowęgla w pozycjach  $\text{C}/1$ ,  $\text{C}/2$ , i  $\text{C}/3$ . Ponadto przygotowanie pochodnej krystalicznej kwasu pirogronowego i aldehydu octowego przydatnej do ilościowych oznaczeń radioanalitycznych wymaga dłuższego czasu co jest dużą niedogodnością w przypadku pracy z kwasem mlekowym znakowanym izotopem  $^{11}\text{C}$ . Znany jest też sposób oznaczania zawartości kwasu mlekowego w próbkach biologicznych metodą dekarbonylacji we wrzącym kwasie siarkowym według schematu:



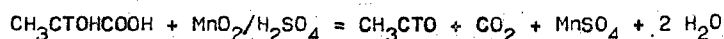
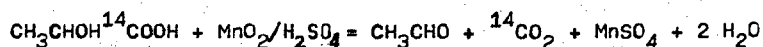
Miarą stężenia kwasu mlekowego jest dwutlenek węgla otrzymany z utleniania tlenku węgla sproszkowanym  $\text{J}_2\text{O}_5$ .

Istota sposobu według wynalazku polega na tym, że sól kwasu mlekowego i/lub kwas mlekowy miesza się z zawiesiną wodną dwutlenku manganu, po czym wytwarza się próżnię i wprowadza do mieszaniny reakcyjnej kwas siarkowy i/lub kwas ortofosforowy albo kwas mlekowy miesza się z kwasem siarkowym i/lub kwasem ortofosforowym, po czym wytwarza się próżnię i utlenia kwas mlekowy dwutlenkiem manganu i/lub nadmanganianem potasu.

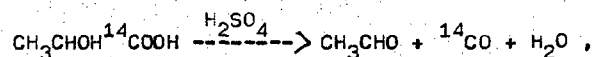
Reakcja utleniania przebiega według schematu:



Stechiometrię reakcji sprawdza się stosując kwas mlekowy znakowany izotopem  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej oraz kwas mlekowy znakowany trytem w nielabilnych pozycjach:



Reakcja utleniania kwasu mlekowego zachodzi szybciej od konkurującej reakcji dekarbonylacji:



przebiegającej ze znacznym kinetycznym efektem izotopowym  $^{14}\text{C}$ . Wytwarzane w reakcji utleniania między innymi aldehyd octowy i dwutlenek węgla w postaci gazowej samoczynnie i gwałtownie opuszczają środowisko reakcji, po czym poddaje się je rozdzielaniu na drodze niskotemperaturowej destylacji próżniowej nad chlorku cynku. Miarą zawartości kwasu mlekowego w analizowanym materiale jest stu procentowa wydajność końcowa dwutlenku węgla. Źródłem kwasu mlekowego jest korzystnie serwatka odpadowa. Jako dwutlenek manganu stosuje się korzystnie piroluzyt i/lub odpadowy, końcowy produkt powstający w czasie utleniania połączeń organicznych lub nieorganicznych manganianem lub nadmanganianem potasu w środowisku zasadowym.

Korzystnie niskotemperaturową destylację próżniową nad  $\text{ZnCl}_2$  prowadzi się w temperaturze  $170-240^\circ\text{K}$ , w której sublimuje zestalony dwutlenek węgla, po czym podnosi się temperaturę do wysokości  $290-345^\circ\text{K}$  i wydziela wolny aldehyd octowy. Korzystnie niskotemperaturową destylację próżniową prowadzi się pod ciśnieniem nie przekraczającym  $0,1 \text{ kPa}$ .

Przedstawiony sposób umożliwia bardzo szybkie oznaczenie izotopów węgla w grupie karboksylowej oraz szybkie oznaczenie izotopów znajdujących się w pozycjach alfa i beta kwasu mlekowego co ma szczególnie istotne znaczenie, gdy cząsteczki kwasu mlekowego są znakowane krótkożyłowym izotopem  $^{11}\text{C}$  o okresie półżycia  $T_{1/2} = 20,3$  minut. Ponadto otrzymać można w sposób szybki i prosty małe porcje gazowego aldehydu octowego, znakowanego izotopami wodoru lub izotopami węgla z wydajnością  $50-75\%$ . Pozostałe  $25-50\%$  aldehydu octowego stanowi roztwór wodny aldehydu lub jego połączenie chemiczne ewentualnie addukt, z którego można wydzielić aldehyd octowy.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawione jest bliżej w przykładach wykonania.

**P r z y k ł a d I.** W kolbie reakcyjnej ze szlifem o objętości  $250 \text{ cm}^3$  sporządza się zawiesinę wodną  $\text{MnO}_2$ , redukując ilościowo  $0,3819 \text{ g} / 2,4165 \text{ mmola} / \text{KMnO}_4$   $18\text{-ma cm}^3$  rozcieńczonej wody utlenionej. Do zawiesiny dodaje się  $0,14 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  oraz  $2 \text{ cm}^3$   $2,162$  molarne-go roztworu wodnego  $/1\text{-}^{14}\text{C}/$  mleczanu sodu. Kolbę podłącza się do reaktorka połączonego z układem próżniowym. Po usunięciu powietrza mieszaninę wodną, zawierającą  $\text{MnO}_2$ , mleczan sodu i  $\text{Mn}^{+2}$ , zadaje się  $100 \text{ cm}^3$  stężonego kwasu siarkowego, w efekcie czego dwutlenek manganu w całości przereagowuje z kwasem mlekowym w ciągu 30 sekund. W czasie reakcji ulatnia się gaz, który przepuszcza się przez wymrażarkę o temperaturze  $190^\circ\text{K}$ , a następnie zamraża całkowicie w wymrażarce drugiej w temperaturze  $90^\circ\text{K}$ . Przeprowadzony pomiar ciśnienia otrzymanego gazu w części aparatury o znanej objętości i znanej temperaturze oraz pomiar jego

radioaktywności wykazują, że uzyskano 2,47 mmola substancji gazowej, której aktywność właściwa jest trzykrotnie większa od aktywności właściwej dwutlenku węgla otrzymanego ze spalenia całkowitego  $^{14}\text{C}$ /mleczanu sodu użytego w reakcji. Pozostałą porcję zestalonego gazu umieszcza się w retorcie próżniowej zawierającej 2 g  $\text{ZnCl}_2$  i pozostawia na 12 godzin, w którym to czasie desorbuje się 99,57% gazu. Wynika stąd, że praktycznie cały aldehyd octowy powstały w reakcji został pochłonięty przez stężony kwas siarkowy w toku szybkiej reakcji utleniania i otrzymany gaz jest praktycznie czystym dwutlenkiem węgla pochodzącym z grupy karboksylowej kwasu mlekowego.

**P r z y k ł a d II.** Do kolby reakcyjnej ze szlifem, w której otrzymano w nadmiarze stechiometrycznym  $\text{MnO}_2$  redukując 0,5980 g/3,784 mmola/  $\text{KMnO}_4$  30-cm<sup>3</sup> rozcieńczonej wody utlenionej, wprowadza się 0,6 cm<sup>3</sup> 3,275 molarnego roztworu wodnego mleczanu sodu znakowanego trytem w nielebilnych pozycjach. Po wymieszaniu zawartości kolby i wytworzeniu próżni zadaje się jej zawartość 0,5 cm<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 0,5 cm<sup>3</sup>  $\text{H}_3\text{PO}_4$  rozcieńczonymi wodą w stosunku objętościowym 1:9. W wyniku reakcji wytwarza się gaz, który ulatnia się do wymrażarki pierwszej schłodzonej do temperatury 190-230°K, a następnie przechodzi do wymrażarki drugiej schłodzonej do temperatury 90°K, w której ulega zestaleniu. Z wymrażarki tej oddestylowuje się w temperaturze 190-240°K do zbiornika o znanej objętości 3,3106 mmoli mieszaniny gazowej, którą zamraża się w retorcie zawierającej  $\text{ZnCl}_2$ . Następnie rozmraża się retortę do temperatury pokojowej i przetrzymuje gaz nad  $\text{ZnCl}_2$  w ciągu 1 godziny, po czym całość ponownie zamraża się do temperatury 190°K. W efekcie uzyskuje się 1,949 mmoli  $\text{CO}_2$ , który wprowadza się do licznika Geigera-Müllera w celu oznaczenia jego aktywności. Aldehyd octowy desorbuje się z 70% wydajnością w ilości 1,362 mmoli z solwatu w temperaturze 340°K do zbiornika gazowego, po czym mierzy się aktywność par nad ciekłym aldehydem.

Z porównania aktywności dwutlenku węgla zanieczyszczonego resztkami aldehydu radioaktywnego z aktywnością par nad zdesorbowanym ciekłym aldehydem wynika, że dwutlenek węgla odsublimerowany w temperaturze 190-240°K z nad solwatu  $\text{ZnCl}_2$  z aldehydem zawiera 0,44% aldehydu octowego.

Aldehyd octowy zestalony w wymrażarce pierwszej wraz z parami wodnymi oraz aldehyd czysty zdesorbowany z nad  $\text{ZnCl}_2$  użyto do syntezy żółtego hydrazonu stosując reagent na grupę aldehydową, sporządzony przez rozpuszczenie 3,24 g 2,4-dwunitrofenylohydrazyny  $^{14}\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_2\text{O}_2$  w mieszaninie zawierającej 15 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  i 75 ml 96% EtOH. Aldehyd trytowany jest odzyskiwany w postaci gazowej z wydajnością 70±5%. Aktywność właściwa aldehydu trytowanego otrzymanego z wysokoaktywnego kwasu mlekowego rozcieńczonego nieaktywnym kwasem mlekowym wynosi  $2,74 \cdot 10^4$  Bq/mmol.