

**4/82**

CMCRCZ 11 (4), 267-336 (1982)

**XHMIKA XPONIKA**

NEA ΣΕΙΡΑ

**CHIMIKA CHRONIKA**

NEW SERIES

**AN INTERNATIONAL EDITION  
OF THE GREEK CHEMISTS ASSOCIATION**

MANAGING COMMITTEE

Irene DILARIS, Yannis GAGLIAS, Vassilios M. KAPOULAS, Vassilios LAMBROPOULOS,  
Georgia MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU, Panayotis PROUNTZOS, George SKALOS

Ex-officio Members: Panayotis PAPAPOULOS (Asst. Gen. Secretary of G.C.A.),  
Stelios CHATZIYANNAKOS (Treasurer of G.C.A.)

EDITORS - IN - CHIEF

V.M. KAPOULAS G. SKALOS G. MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU

EDITORIAL ADVISORY BOARD

N. ALEXANDROU

*Org. Chem., Univ. Salonica*

A. ANAGNOSTOPOULOS

*Inorg. Chem., Tech. Univ. Salonica*

D. BOSKOS

*Org. Chem., Tech., Univ. Salonica*

P. CATSOULACOS

*Pharm. Chem., Univ. Patras*

G.D. COUMOULOS

*Physical Chemistry Athens*

C.A. DEMOPOULOS

*Biochemistry, Univ. Athens*

C.E. EFSTATHIOU

*Anal. Chem., Univ. Athens*

A.E. EVANGELOPOULOS

*Biochemistry, N.H.R.F., Athens*

S. FILIANOS

*Pharmacognosy, Univ. Athens*

D.S. GALANOS

*Food. Chem., Univ. Athens*

A.G. GALINOS

*Inorg. Chem., Univ. Patras*

P. GEORGAKOPOULOS

*Pharm. Techn., Univ. Salonica*

I. GEORGATSOΣ

*Biochemistry, Univ. Salonica*

M.P. GEORGIADIS

*Org./Med. Chem., Agr. Univ. Athens*

N. HADJICHRISTIDIS

*Polymer Chem., Univ. Athens*

T.P. HADJIIOANNOU

*Anal. Chem., Univ. Athens*

E. HADJLOUDIS

*Photochem., N.R.C. «D», Athens*

D. JANNAKOUidakis

*Phys. Chem., Univ. Salonica*

N.K. KALFOGLOU

*Polymer Sci., Univ. Patras*

E. KAMPOURIS

*Polymer. Chem., Tech. Univ. Athens*

M.I. KARAYANNIS

*Anal. Chem., Univ. Ioannina*

N. KATSANOS

*Phys. Chem., Univ. Patras*

A.KEHAYOGLOU

*Org. Chem. Tech., Univ. Salonica*

D. KIOUSSIS

*Petrochemistry, Univ. Athens*

A. KOSMATOS

*Org. Chem., Univ. Ioannina*

P. KOUROUNAKIS

*Pharm. Chem., Univ. Salonica*

S.B. LITSAS

*Bioorg. Chem., Arch. Museum, Athens*

G. MANOUSSAKIS

*Inorg. Chem., Univ. Salonica*

I. MARANGOSIS

*Chem. Mech., Tech. Univ. Athens*

I. NIKOKAVOURAS

*Photochem., N.R.C. «D», Athens*

D.N. NICOLAIDES

*Org. Chem., Univ. Salonica*

C.M. PALEOS

*N.R.C. «Democritos», Athens*

V. PAPAPOULOS

*N.R.C. «Democritos» Athens*

G. PAPAGEORGIOU

*Biophysics, N.R.C. «D», Athens*

V.P. PAPAGEORGIOU

*Nat. Products, Tech. Univ. Salonica*

S. PARASKEVAS

*Org. Chem., Univ. Athens*

G. PHOKAS

*Pharmacognosy, Univ. Salonica*

S. PHILIPAKIS

*N.R.C. «Democritos», Athens*

G. PNEUMATIKAKIS

*Inorg. Chem., Univ. Athens*

C.N. POLYDOROPOULOS

*Phys/Quantum Chem., Univ. Ioannina*

K. SANDRIS

*Organic Chem., Tech. Univ. Athens*

M.J. SCOULLOS

*Env./Mar. Chem., Univ. Athens*

C.E. SEKERIS

*Mol. Biology, N.H.R.F., Athens*

G.A. STALIDIS

*Phys. Chem., Univ. Salonica*

Ch. STASSINOPOULOU

*N.R.C. «Democritos», Athens*

A. STASSINOPOULOS

*Polymer Chem. Tech., Athens*

A. STAVROPOULOS

*Ind. Technol., G.S.I.S., Piraeus*

I.M. TSANGARIS

*Inorg. Chem., Univ. Ioannina*

G. TSATSARONIS

*Food Technol., Univ. Salonica*

G.A. TSATSAS

*Pharm. Chem., Univ. Athens*

A.K. TSOLIS

*Chem. Technol., Univ. Patras*

G. VALCANAS

*Org. Chem., Tech. Univ. Athens*

A.G. VARVOGLIS

*Org. Chem., Univ. Salonica*

G.S. VASSILIKIOTIS

*Anal. Chem., Univ. Salonica*

S. VOLIOTIS

*Instrum. Analysis, Univ. Patras*

E.K. VOUDOURIS

*Food Chem., Univ. Ioannina*

I. VOURVIDOU - FOTAKI

*Org. Chem., Univ. Athens*

I.V. YANNAS

*Mech. Eng., M.T.I., U.S.A.*

Correspondence, submission of papers, subscriptions, renewals and changes of address should be sent to *Chimika Chronika*, New Series, 27 Kaningos street, Athens, Greece. The Guide to Authors is published in the first issue of each volume, or sent by request. Subscriptions are taken by volume at 500 drachmas for members and 1.000 drachmas for Corporations in Greece and 28U.S. dollars to all other countries except Cyprus, where subscriptions are made on request.

Printed in Greece by ATHANASOPOULOS-PAPADAMIS-ZACHAROPOULOS, G.P.  
76, EMM. BENAKI ATHENS (145)

Υπεύθυνος σύμφωνα με το νόμο: Παναγιώτης Ξυθάλης, Κάνιγγος 27, Αθήνα (147)

CONTENTS

Retention behaviour of aromatic acids in ion-pair reversed phase liquid chromatography ( <i>in English</i> ) by L.G. Bachas, J.H.M. van den Berg and H.A.J. Linssen .....	269
Kinetic determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparation and biological fluids applying stopped-flow technique ( <i>in Greek</i> ) by D.I. Farasoglou and M.I. Karayannis .....	281
Starch damage of wheat varieties treated before and after milling; effect on baking quality ( <i>in English</i> ) by V. Pattakou, M.E. Komaitis and E. Voudouris .....	295
Synthesis of N-(aryl methyl) 5-oxo pyrrolidine 2-carboxyiques acids ( <i>in French</i> ) by N.M. Kolocouris and B. Rigo .....	309
Preparation and properties of halogen benzoylhydrazine Ni(II) complexes ( <i>in English</i> ) by C. Youri-Tsochatzi, C.L. Tsiamis and G.E. Manoussakis .....	319
SHORT PAPERS	
Use of atomic absorption spectrometry in determination of metal ions in metal ion-exchanged zeolites ( <i>in Englisch</i> ) by N.P. Evmerides and J. Dwyer .....	331

## **RETENTION BEHAVIOUR OF AROMATIC ACIDS IN ION-PAIR REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

LEONIDAS G. BACHAS, JOHAN H.M. VAN DEN BERG, HARRIE A.J. LINSSEN  
*DSM Research, P.O. Box 18, 6160 MD Geleen (The Netherlands)*

(Received November 14, 1979)

### **Summary**

The retention behaviour of some aromatic carboxylic acids (Mandelic acid, Benzoic acid, Salicylic acid, o-Phenoxybenzoic acid, p-Hydroxybenzoic acid and m-Hydroxybenzoic acid) was studied in a reversed phase ion-pair chromatographic system, using a hydrophobic column packing material and mixtures of propanol-1 and aqueous phosphate buffers, containing various concentrations of n-alkyltrimethylammonium ion, as mobile phases. The influence of this last ion on retention was investigated. The retention of ionized aromatic carboxylic acids can be increased considerably by adding such a compound.

In the system concerned, the retention is directed by an ion-exchange mechanism. That means that the quaternary ammonium ions are adsorbed on the surface of the packing material forming ion-pairs with the phosphate ions of the eluent, and those last ions are exchanged with the ionized form of the acids.

**Key words** : n-alkyltrimethylammonium ion, Aromatic acids (Mandelic acid, Benzoic acid, Salicylic acid, o-Phenoxybenzoic acid, p-Hydroxybenzoic acid, m-Hydroxybenzoic acid), ion-pair reversed phase liquid chromatography.

*Abbreviations* : MA = Mandelic acid; SA = Salicylic acid; BA = Benzoic acid; o-PBA = o-Phenoxybenzoic acid; m-HBA = m-Hydroxybenzoic acid; p-HBA = p-Hydroxybenzoic acid; TBA = Tetraethylammonium ion; TDTMA = Tetradecyltrimethylammonium ion.

### **Introduction**

A few years ago the separation of acids by liquid chromatography was almost always performed by ion-exchange columns. However, recently it was found that the reversed phase systems are preferable for the chromatography of ionizable organic compounds<sup>1</sup>. That was after the development of alkyl modified silicas as packing materials<sup>2</sup>.

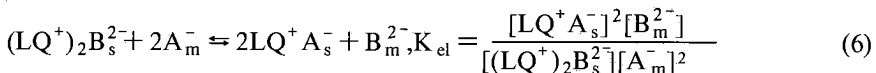
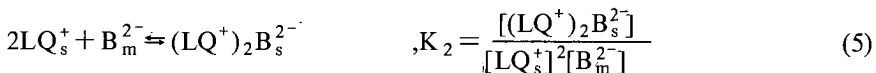
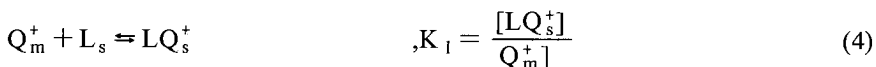
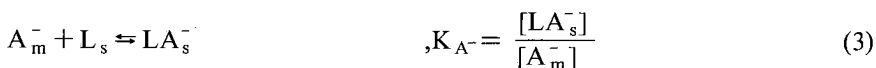
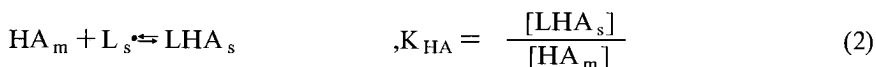
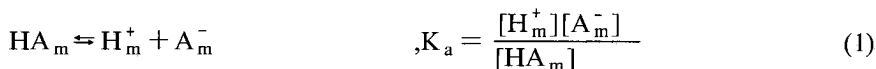
The technique used in this study was a reversed phase ion-pair chromatography, where the addition of a suitable reagent in the eluent increased the retention of those ionizable compounds<sup>3</sup>. The retention can be regulated by changing the concentration and the nature of the extracting ion, the counter-ion and the alcohol, or by changing the pH, the temperature and the packing material<sup>4</sup>. Several theories were postulated about the mechanism of this type of chromatography<sup>5-7</sup>. In this study, because an obvious adsorption of the extracting ion was observed, it was assumed that an ion-exchange mechanism directs the retention<sup>8</sup>.

The aim of this investigation was to study the retention behaviour of some aromatic acids (Mandelic acid, Benzoic acid, Salicylic acid, o-Phenoxybenzoic acid, p-Hydroxybenzoic acid and m-Hydroxybenzoic acid), in such a system by changing the nature and the concentration of the extracting ion (quaternary ammonium salt). It also gave preliminary data that might lead to a finding of a better system for their separation and determination.

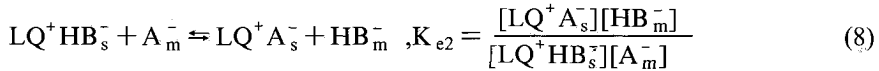
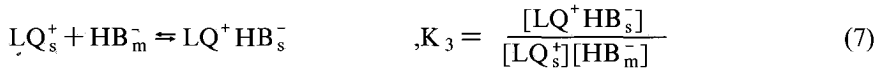
## Theoretical

It was apparent from the breakthrough curves that the extracting ion ( $Q^+$ ) was adsorbed onto the hydrophobic surface (L). Counter-ions from the eluent ( $B^{2-}$  and  $HB^-$ ) neutralize the positive charge of the adsorbed extracting ion<sup>9</sup>. Finally the tracer ions ( $A^-$ ) are exchanged with those counter-ions.

The equilibria that mainly contribute to the whole process are:



At the pH of this system both hydrogen phosphate ( $B^{2-}$ ) and dihydrogen phosphate ions ( $HB^-$ ) occur in the eluent, so another possible ion-exchange equilibrium may also be written:



But it is known from previous studies that divalent ions are bonded stronger than monovalent ions, so this last equilibria can be neglected<sup>7</sup>.

The subscripts s and m denote the stationary and mobile phases respectively. The distribution coefficient is defined as:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{[LQ^+ A_s^-] + [LHA_s] + [LA_s^-]}{[HA_m] + [A_m^-]} \quad (9)$$

A more useful expression is obtained by substitution of the relations (1), (2), (3) and (6) into the relation (9):

$$K = \frac{K_a [LQ^+ A_s^-]}{(K_a + [H^+])[A_m^-]} + \frac{H^+ [LHA_s]}{(K_a + [H^+])[HA_m]} + \frac{K_a [LA_s^-]}{(K_a + [H^+])[A_m^-]}$$

$$K = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \left( \frac{K_{el} [(LQ^+)_2 B_s^{2-}]}{[B_m^{2-}]} \right)^{1/2} +$$

$$+ K_{HA} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + K_{A^-} \frac{K_a}{K_a + [H^+]}$$

Because the dissociation constants of the acids used are in the order of  $10^{-3}$  to  $10^{-5}$  it can be assumed that  $[H^+] \ll K_a$  ( $pH > pK_a$ ) and thus:

$$K = \left( \frac{K_{el} [(LQ^+)_2 B_s^{2-}]}{[B_m^{2-}]} \right)^{1/2} + K_{A^-}$$

The adsorption of an extracting ion in a system like the one concerned, could be successfully described by a Freundlich type isotherm:<sup>10</sup>

$$[(LQ^+)_2 B_s^{2-}] = a [Q_m^+]^{1/n} \quad (10)$$

Thus

$$K = \left( \frac{a K_{el} [Q_m^+]^{1/n}}{[B_m^{2-}]} \right)^{1/2} + K_{A^-}$$

$$\log(K - K_{A^-}) = \frac{1}{2n} \log[Q_m^+] + C \quad (C = \text{constant})$$

Knowing that  $k' = qK$  (where  $q$  is the phase ratio) it can also be written that:

$$\log(k' - k'_{A^-}) = \frac{1}{2n} \log[Q_m^+] + C' \quad (11)$$

Therefore, the plot of  $\log(k' - k'_{A^-})$  vs.  $\log[Q_m^+]$  should be a straight line with a slope of  $1/2n$ .

## Experimental

### Apparatus

The apparatus was a self-built chromatograph (fig. 1) equipped with a pump

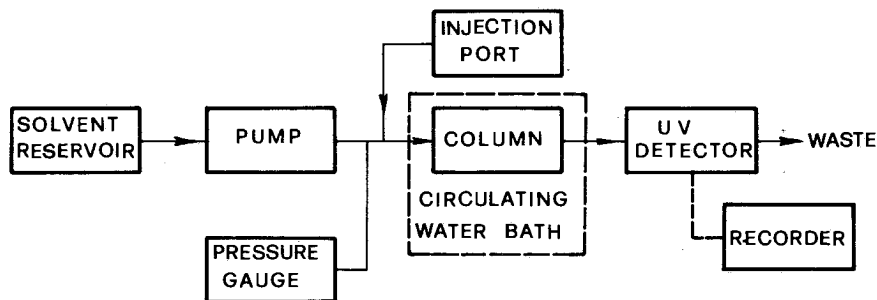


FIG. 1 : Chromatograph

(ORLITA, SK 15 with a pulsation damper), a high pressure sample injection valve (RHEODYNE, 70-10) with a 20  $\mu$ L standard sample loop (RHEODYNE, 70-11), a standard HPLC stainless steel column (length 15 cm, I.D. 4.6 mm, O.D. 6.35 mm), a UV detector (variable wavelength, Zeiss, PM 2D) and a recorder (KIPP and ZONEN, BD8). A circulating water bath (LAUDA THERMOSTAT, S 15/12) was used in order to maintain column's temperature at constant value.

The feed lines were of stainless steel 316 tubes with GYROLOK zero dead volume couplings and the column was equipped with GYROLOK tube fittings and WHATMAN stainless steel frits (2  $\mu$ m pores).

The wavelength in all experiments was set to 252 nm. The pH measurements were done by means of a digital pH meter (PHILIPS, PW 9409) equipped with a combination pH electrode (PUSL, 1290 H). The temperature was held at  $40 \pm 1^\circ\text{C}$  in all experiments. This temperature was selected because it would be less subject to alteration by increased summer temperatures.

For the monitoring of the breakthrough curves the several parts of the apparatus (fig. 2) were the same as previously mentioned except of a differential

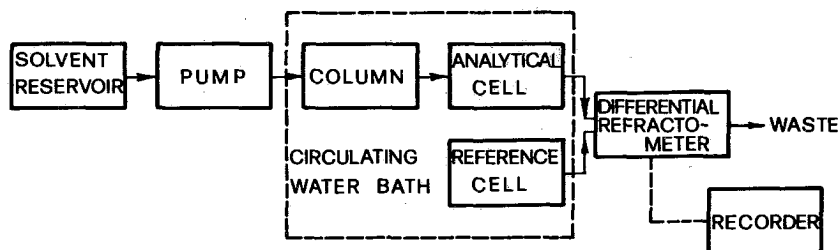


FIG. 2 : Apparatus for monitoring the breakthrough curves.

refractometer (LDC, 1103) that was used instead of the UV detector. Another difference was that now both the column and the detector cell were at constant temperature. This arose from the fact that the refractive index of a substance is highly temperature dependant.

#### Chemicals and Reagents

The phosphate buffers were prepared from orthophosphoric acid (Baker, Analytical grade) and DILUT-IT 1.000 *N* Sodium hydroxide solution (Baker). Distilled water and analytical (Baker) or for chromatography grade (Merck) propanol-1 were used in all experiments. The calibration of the pH meter was carried out using TITRISOL pH buffers (Merck). The quaternary ammonium compounds were tetrabutylammonium hydroxide (Merck, for synthesis) and tetradecyltrimethylammonium bromide (Sigma, Lab. use).

As packing material, a chemical modified silica gel, LiChrosorb RP-18 (Merck), was used. It had a mean particle size of 10  $\mu\text{m}$  and a carbon content of 20.7%.

#### Procedure

The mobile phases were prepared by adding an amount of propanol-1 to a phosphate buffer (total phosphate concentration = 0.0500 *M* and pH = 7.00) containing a preknown concentration of extracting ion, in order to obtain a final solution of 10 vol. % in propanol-1. The samples were prepared by dissolving an amount of the compound in the mobile phase without the extracting ion. All the chromatographic results reported are the means of duplicated or sometimes triplicated injection at a constant temperature. Before changing from one mobile phase to another the column was equilibrated with the new mobile phase.

Columns were filled by a slurry packing method. The most popular technique for packing chemically bonded packing materials is the balanced-density slurry packing technique<sup>11</sup>, but in this study reasonable columns were prepared (HEPT of about 60  $\mu\text{m}$ ) using a different slurry packing method. For this purpose a diluted slurry of the packing material in tetrachlorocarbon (ca. 2% w.w.) was prepared and this slurry was homogenized and degassed by means of an ultrasonic bath. Then it was introduced quickly into the filling funnel (fig. 3) and pressed with isoctane into the column by means of a mechanical pump. The pressure drop was about 450 atm.



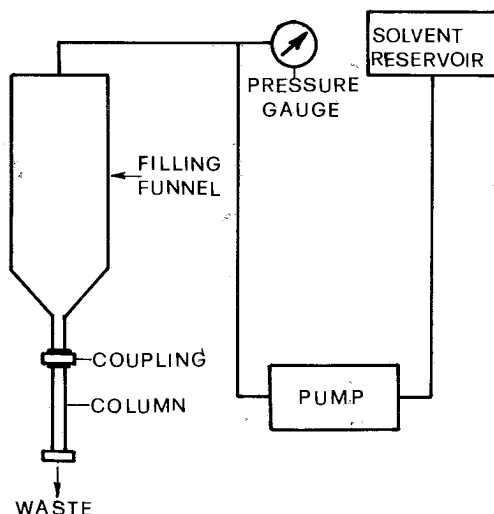


FIG. 3 : Apparatus for column packing.

After packing, the column was thoroughly washed with propanol-2 to remove isooctane and then by water. Then it was equilibrated with the mobile phase.

The adsorption isotherms were calculated from the breakthrough curves. Before measuring the breakthrough of the eluent with the lowest extracting ion concentration the column was equilibrated with the eluent without extracting ion. Then the eluent containing a known amount of quaternary ammonium salt was pumped through the column and the breakthrough curve was recorded using the eluent without extracting ion as a reference<sup>4</sup>. The quaternary ammonium salt in the eluate was also identified by an ion-pairing indicator (Alizarin sulfonate) or by simple shaking (foam formation).

Several methods have been proposed for determining the  $V_{R_0}$  but the problem of knowing its precise value has not been solved yet<sup>8,12</sup>. In this study several measurements of the retention volumes of three "unretained" compounds (sodium nitrate, methanol and propanol-2) were made in order to select the proper one for this determination.

Sodium nitrate was completely rejected because its retention volume values either gave  $\epsilon_r$  values of about 0.59 (TDTMA) which were far from the expected for such systems and so it was possible that it was excluded from the pores of the adsorbent, or were increasing with the concentration of the extracting ion (TBA) (fig. 4). The retention volumes obtained with methanol were taken as  $V_{R_0}$  because they gave better results. Besides the addition of quaternary ammonium ions does not affect those retention volumes (fig. 4).

The capacity factors  $k'$  for a given column were measured by using the equation:

$$k' = \frac{t_R - t_{R_0}}{t_{R_0}} = \frac{V_R - V_{R_0}}{V_{R_0}}$$

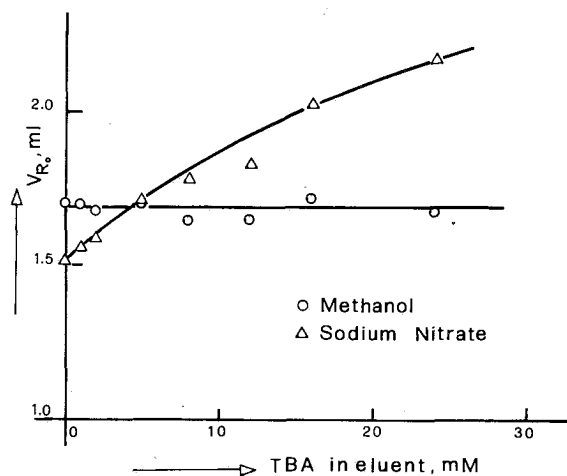


FIG. 4 : Stability of  $V_{R_0}$  of various "unretained" compounds as a function of the TBA concentration.

where  $t_R$ ,  $V_R$ ,  $t_{R_0}$ ,  $V_{R_0}$  are the retention times and volumes for a component and an unretained one respectively.

## Results and Discussion

The results obtained from the breakthrough curves are shown in tables I and II.

TABLE I : Breakthrough data of TBA

TBA in eluent, M	adsorbed TBA, $\mu\text{mol/g}^*$
$2.388 \times 10^{-4}$	2.205
$4.776 \times 10^{-4}$	2.615
$1.194 \times 10^{-3}$	3.176

\* grams of the packing material

TABLE II : Breakthrough data of TDTMA

TDTMA in eluent, M	adsorbed TDTMA, $\mu\text{mol/g}$
$5.025 \times 10^{-4}$	203.5
$1.008 \times 10^{-3}$	216.6
$2.040 \times 10^{-3}$	222.1

The logarithmic plot of the concentration of the extracting ion in the stationary phase vs. that in the mobile phase is a straight line and that was expected from the theory (equation 10). The slope for TBA was  $0.28 \pm 0.01$  (with correlation coefficient = 0.99) and for TDTMA  $0.13 \pm 0.04$  (correlation coefficient = 0.96). From these plots it could be assumed also that TDTMA is a stronger extracting ion than TBA (that is, it is more strongly adsorbed on the support) and that in the case of TDTMA the measurements were done in the flat part of the Freundlich type isotherm.

The effect of the extracting ion concentration on the  $k'$  was investigated and the results are shown in tables III and IV and fig. 5 and 6. These curves are of the Freundlich type and that was also expected from the theory (equation 11). No measurements were done for SA and o-PBA with TDTMA as the extracting ion in the eluent because of their strong retention in that system. By plotting  $\log(k' - k'_{A \rightarrow})$  vs.  $\log[Q_m^+]$  straight lines were obtained with a mean slope of  $0.74 \pm 0.08$  for TBA and  $0.11 \pm 0.02$  for TDTMA.

TABLE III : Retention data of aromatic acids using TBA as extracting ion.

TBA in eluent, M	$k'$			
	MA	BA	SA	o-PBA
0	0.0769	0.296	0.633	3.62
$1.003 \times 10^{-3}$	0.154	0.450	1.06	5.17
$2.043 \times 10^{-3}$	0.207	0.562	1.38	6.11
$5.014 \times 10^{-3}$	0.367	0.846	2.54	8.28
$7.997 \times 10^{-3}$	0.426	0.959	3.09	9.85
$12.167 \times 10^{-3}$	0.533	1.31	3.98	11.7
$16.010 \times 10^{-3}$	0.657	1.59	4.86	13.4
$24.082 \times 10^{-3}$	0.941	1.98	6.38	16.2

TABLE IV : Retention data of aromatic acids using TDTMA as extracting ion.

TDTMA in eluent, M	$k'$			
	MA	BA	p-HBA	m-HBA
0	0.0719	0.275		
$5.025 \times 10^{-4}$	7.37	23.1	4.44	11.0
$1.008 \times 10^{-3}$	8.01	24.6	4.91	12.4
$2.040 \times 10^{-3}$	7.86	24.0	4.99	12.5

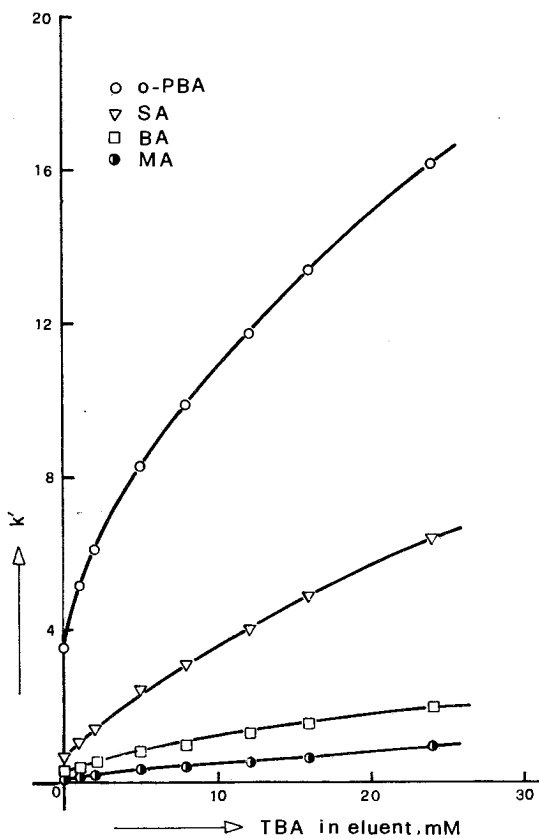


FIG. 5 : Capacity factors as a function of the TBA concentration.

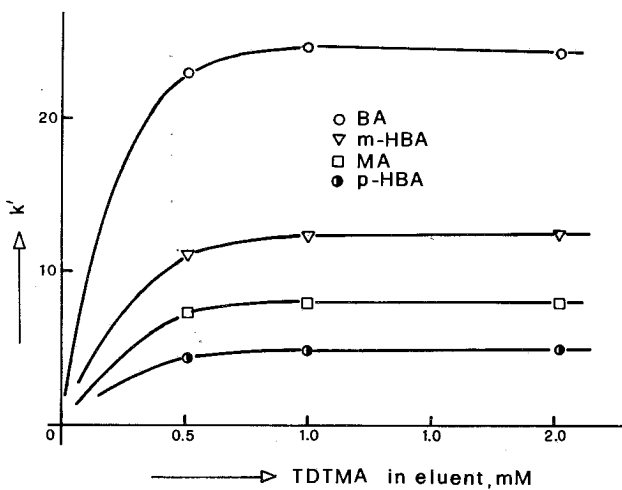


FIG. 6 : Capacity factors as a function of the TDTMA concentration.

The results from the slopes does not always fit the theory. Thus, for BA (slope of  $0.086 \pm 0.04$  with correlation coefficient = 0.92) and in the system with TDTMA it can be written:

$$1/2n = 0.086 \Rightarrow 1/n = 0.17$$

that is in good agreement with the calculated value from the adsorption isotherm ( $1/n = 0.13 \pm 0.04$ ) and supports the validity of the assumptions made. But this does not happen with the results obtained in the system with TBA. That means that some of the assumptions made are not absolutely correct in this system. A possible reason is that the ion-exchange in this case is not the predominant mechanism.

The influence of the type of the quaternary ammonium salt was tested and the results are shown also in tables III and IV. It is clear that the retention increases considerably with the chain length of the extracting ion.

## Conclusions

$k'$  values increase with the extracting ion concentration. The same effect is obtained when the carbon chain length of the extracting ion is increased. The measurements done show that sodium nitrate does not give reasonable  $V_{R0}$  values and it rather had some retention even though it was excluded from the pores of the stationary phase. This assumption, as well as the differences obtained between the slopes of the plots of the adsorption isotherms and the retention curves, is open for further investigation. In this study two extreme systems were studied (the first with a relatively small carbon chain length extracting ion and the second with a very large one). The investigation will be continued with intermediate carbon chain length, which may give the answers to the problems faced.

---

## Περίληψη

*Κατακράτηση αρωματικών οξέων σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσεως*

Μελετήθηκε η συμπεριφορά ως προς την κατακράτηση ορισμένων αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (μανδελικό, βενζοϊκό, σαλικυλικό, ο-φαινόξυ-βενζοϊκό, p- και m-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ), σε ένα σύστημα χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσης, με χρησιμοποίηση υδρόφοβης στάτικης φάσης και μιγμάτων προπανόλης-1 και υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών με pH = 7.00 που περιέχουν διάφορες ποσότητες n-άλκυλο-τριμέθυλο αμμωνιακού ιόντος σαν κινητή φάση. Στο σύστημα που εξετάστηκε, η κατακράτηση κατευθύνεται από ένα μηχανισμό ιοντεναλλαγής.

Ερευνήθηκε η επίδραση των αμμωνιακών αυτών ιόντων στην κατακράτηση

των οξέων αυτών, που μπορεί να αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό με την προσθήκη μιας τέτοιας ουσίας. Επίσης ήταν εμφανής η επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του εκχυλιζόμενου ιόντος στην κατακράτηση, αυξανόμενης μετ' αυτού.

---

## References

1. Colin, H. and Guiochon, G.: *J. Chromatogr.* **141**, 287 (1977).
2. Halasz, I and Sebestian, I.: *Angew. Chem.* **81**, 464 (1969).
3. Wittmer, D.P., Nuessle, N.O. and Haney, W.G.: *Anal. Chem.* **47**, 1422 (1975).
4. Terweij-Groen, C.P., Heemstra, S. and Kraak, J.C.: *J. Chromatogr.* **161**, 69 (1978).
5. Kissinger, P.T.: *Anal. Chem.* **49**, 883 (1977).
6. Kraak, J.C., Jonker, K.M. and Huber, J.F.K.: *J. Chromatogr.* **142**, 671 (1977).
7. Van de Venne, J.L.M., Hendrikx, J.L.H.M. and Deelder, R.S.: *J. Chromatogr.* **167**, 1 (1978).
8. Deelder, R.S., Linssen, H.A.J., Konijnendijk, A.P. and van de Venne, J.L.M.: *J. Chromatogr.* **218**, 327 (1981).
9. Plaisance, M. and Ter-Minassian-Saraga, L.: *J. Colloid Interface Sci.* **56**, 33 (1976).
10. Knox, J.H. and Laird, G.R.: *J. Chromatogr.* **122**, 17 (1976).
11. Majors, R.E.: *Anal. Chem.* **44**, 1722 (1972).
12. Scott, R.P.W. and Kucera, P.: *J. Chromatogr.* **175**, 51 (1979).

## **ΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΑΧΑΙΤΙΣΕΩΣ ΡΟΗΣ**

Δ.Ι. ΦΑΡΑΣΟΓΛΟΥ & Μ.Ι. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ

*Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

(Received January 2, 1982)

### **Περίληψη**

Εφαρμόζοντας τις αρχές των κινητικών μεθόδων ανάλυσης στην αντίδραση του ασκορβικού οξέος με την 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη, προσδιορίζεται το ασκορβικό οξύ σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Επίσης προσδιορίζεται το ασκορβικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C) στα ούρα.

Η προτεινόμενη μέθοδος συγκρίνεται ως προς την επαναληπτικότητα και την ακρίβεια με την κλασσική φωτομετρική μέθοδο. Η ακρίβεια και επαναληπτικότητα είναι καλύτερη από 1.0%.

Για τα φαρμακευτικά δισκία που περιέχουν βιταμίνη C η ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ  $(98,6 \pm 1,9)\%$  και  $(103,0 \pm 1,8)\%$ . Για τα ενέσιμα διαλύματα η ανάκτηση βρέθηκε μεταξύ  $(100,7 \pm 1,4)\%$  και  $(101,7 \pm 2,2)\%$ . Η μέση ανάκτηση για τα ούρα βρέθηκε 96,0% ενώ για το πλάσμα είναι χαμηλότερη.

Τέλος γίνεται σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με την κλασσική φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού δεϋδροασκορβικού οξέος με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH) για προσδιορισμούς στα ούρα. Μελετάται η παρεμποδιστική δράση διαφόρων ουσιών στην ακρίβεια της μεθόδου.

**Ορολογία :** Κινητική μέθοδος, Ασκορβικό οξύ, Φαρμακευτικά σκευάσματα, Βιολογικά υγρά, Αναχαιτίση ροής.

**Συντμήσεις :** Vc = Βιταμίνη C, AA = Ασκορβικό οξύ, DAA = Δεϋδροασκορβικό οξύ, DCPI = 2,6 -διχλωροφαινολινδοφαινόλη.

### **Εισαγωγή**

Ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης της βιταμίνης C δεν έχει ακόμη εντελώς διευκρινισθεί, είναι γνωστά όμως τα αποτελέσματα από την έλλειψή της. Έτσι, η έλλειψή της προκαλεί σκορβούτο, γιατί δεν παράγεται κολλαγόνο, οδοντίνη και χονδρώδης ουσία.

Η βιταμίνη C (Vc) ως ισχυρό οξειδοαναγωγικό σύστημα εισέρχεται στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του οργανισμού και μεταβάλλει την δραστηριότητα πολλών ενζύμων.

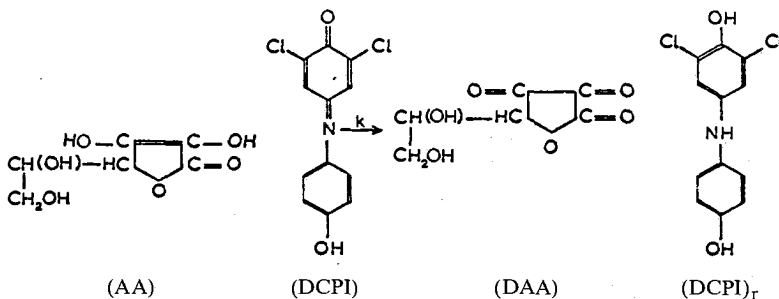
Ο προσδιορισμός της βιταμίνης C στα βιολογικά υγρά λαμβάνει ιδιαίτερη σημασία, αλλά το ίδιο σημαντικό είναι ο έλεγχος της παλαίωσης των φαρμάκων. Για τον σκοπό αυτό απαιτείται μια γρήγορη, ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος που να έχει χαμηλό όριο ανιχνευσιμότητας.

Έχουν προταθεί πολλές μέθοδοι βασισμένες στην χρήση αυτομάτων χημικών οργάνων: φασματοφωτομετρικές<sup>1</sup>, φθορισμομετρικές<sup>2</sup>, πολαρογραφικές<sup>3</sup>, χρωματογραφικές<sup>4</sup>, κ.ά. Οι βασικές αντιδράσεις στις οποίες στηρίζονται οι πιο πάνω μέθοδοι είναι: α) οξειδοαναγωγικές, όπως είναι η αντίδραση του ασκορβικού οξέος με την 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη<sup>5</sup>, β) σχηματισμού προϊόντων σύζευξης με την 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη προς σχηματισμό αντίστοιχης οξαζόνης<sup>6</sup>, και γ) συμπύκνωση με ορθο-φαινυλενοδιαμίνη προς σχηματισμό φθορίζουσας ένωσης<sup>2</sup>.

Σ' αυτή την μελέτη, εφαρμόζοντας τις αρχές των κινητικών μεθόδων ανάλυσης για την αντίδραση της βιταμίνης C με την 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη, γίνεται χρήση της τεχνικής αναχαίτησης ροής για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας διαφόρων φαρμακευτικών σκευασμάτων σε ασκορβικό οξύ και της περιεκτικότητας των ούρων σε ασκορβικό οξύ (AA), δεϋδροασκορβικό οξύ (DAA) και ολική βιταμίνη C (το άθροισμα AA και DAA).

### Θεωρητικό μέρος

Κατά τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος με την προτεινόμενη κινητική μέθοδο ανάλυσης, γίνεται χρήση της αντίδρασης του ασκορβικού οξέος (AA) με την 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη (DCPI), κατά την οποία η ινδοφαινόλη αποχρωματίζεται προς μια λευκοένωση (DCPI)<sub>r</sub>, το δε ασκορβικό οξύ οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ, σύμφωνα με την αντίδραση



Η ταχύτητα αποχρωματισμού της φαινολινδοφαινόλης εξαρτάται από την συγκέντρωση του (AA) και γι' αυτό η αντίδραση μπορεί να χρησιμεύσει σαν ενδεικτική αντίδραση για την μέτρηση της συγκέντρωσης του (AA) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά την ανάμειξη των αντιδραστηρίων (AA) και (DCPI). Η επιτυχής εφαρμογή οποιασδήποτε κινητικής μεθόδου ανάλυσης προϋποθέτει



την δημιουργία συνθηκών πρώτης ή ψευδοπρώτης τάξης αντίδραση ως προς το μετρούμενο συστατικό στο αντιδρών σύστημα, ώστε η ταχύτητα αντίδρασης να είναι ανάλογη προς την συγκέντρωσή του. Για να συμπληρωθεί η συνθήκη αυτή το (AA) βρίσκεται σε περίσσεια. Κατά την κινητική μέθοδο μεταβλητού χρόνου, που εφαρμόζεται στην εργασία αυτή, μετρούμε τον χρόνο που απαιτείται για μια ορισμένη μεταβολή της διαπερατότητας του αντιδρώντος διαλύματος στα 522 nm που είναι το ισοσβεστικό σημείο του (DCPI). Σύμφωνα με τον νόμο του Beer ισχύει η σχέση:

$$A = \epsilon b [\text{DCPI}] = -\log T \tag{1}$$

όπου A η απορρόφηση του διαλύματος,  $\epsilon$  ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, b η οπτική διαδρομή στην κυψελίδα, [DCPI] η μοριακή συγκέντρωση της απορροφούσης ουσίας και T η διαπερατότητα του διαλύματος.

Η αντίδραση (1) είναι 2ας τάξης και ο νόμος ταχύτητας είναι<sup>7</sup>

$$-\frac{d[\text{AA}]}{dt} = -\frac{d[\text{DCPI}]}{dt} = k [\text{AA}]_t [\text{DCPI}]_t \tag{2}$$

όπου k η σταθερά ταχύτητας αντίδρασης στις δεδομένες συνθήκες,  $[\text{AA}]_t$  και  $[\text{DCPI}]_t$  οι στιγμιαίες συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Η πιο συνηθισμένη κινητική μέθοδος προσδιορισμού είναι η της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης, όπου η παράγωγος  $\frac{d[\text{AA}]}{dt}$  ή  $\frac{d[\text{DCPI}]}{dt}$  ανάλογος της  $[\text{AA}]$  ή  $[\text{DCPI}]$  στην αρχή της αντίδρασης, μετρείται αυτόματα. Αφού το (DCPI) στο μελετούμενο σύστημα είναι η μόνη ουσία που απορροφεί στο μήκος κύματος που μετρούμε, ισχύουν οι ακόλουθες σχέσεις:

$$\log T = -\epsilon b [\text{DCPI}] \quad \text{ή} \quad \log(V/V_0) = -\epsilon b [\text{DCPI}] \tag{3}$$

όπου  $V_0$  το σήμα εξόδου του φωτοπολλαπλασιαστή για διαπερατότητα  $T=1$  (σ' αυτή την εργασία  $V_0=10V$ ), και V το σήμα εξόδου του φωτοπολλαπλασιαστή για διαπερατότητα T.

Η μεταβολή του V με τον χρόνο μπορεί να εκφρασθεί:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{dV}{d[\text{DCPI}]} \frac{d[\text{DCPI}]}{dt} \tag{4}$$

Από την σχέση (3) με κατάλληλη παραγωγή και με τις σχέσεις (2) και (4) καταλήγουμε τελικά στην σχέση:

$$\frac{dV}{dt} = k A_t V [\text{AA}]_t / 0,43 \tag{5}$$

όπου  $A_t = \varepsilon b [\text{DCPI}]$  είναι η στιγμιαία απορρόφηση του αντιδρώντος μίγματος. Από την στοιχειομετρία της αντίδρασης ισχύει:

$$[\text{AA}]_t = [\text{AA}]_0 - [\text{DCPI}]_0 + [\text{DCPI}]_t \quad (6)$$

όπου  $[\text{AA}]_0$  και  $[\text{DCPI}]_0$  οι αρχικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Συνδιασμός των (5) και (6) δίνει:

$$\frac{dV}{dt} = k \frac{A_t V}{0,43} [\text{AA}]_0 \left\{ 1 - \frac{[\text{DCPI}]_0}{[\text{AA}]_0} + \frac{[\text{DCPI}]_t}{[\text{AA}]_0} \right\} \quad (7)$$

Η σχέση (7) επιτρέπει τον υπολογισμό της  $[\text{AA}]_0$  αν η κλίση  $dV/dt$  μετρηθεί σε οποιοδήποτε σημείο της καμπύλης  $V = f(t)$ , είναι όμως εφαρμόσιμη για τους αναλυτικούς μας σκοπούς αν ισχύουν οι ακόλουθες προϋποθέσεις: i) η ποσότητα  $Q = (A_t V)/0,43$  να παραμένει σταθερή μέσα στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος, πράγμα που συμβαίνει στην περίπτωση της εργασίας αυτής,<sup>8</sup> ii) η ποσότητα  $Y = \{1 - ([\text{DCPI}]_0/[\text{AA}]_0) + ([\text{DCPI}]_t/[\text{AA}]_0)\}$  να παραμένει σταθερή και περίπου ίση με την μονάδα, μέσα στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος. Αν το (AA) είναι σε περίσσεια, αυτό συμβαίνει για τα αρχικά στάδια της αντίδρασης. Μ' αυτές τις προϋποθέσεις η εξίσωση (7) γράφεται

$$\frac{dV}{dt} = k Q Y [\text{AA}]_0 \quad (8)$$

Για μεταβολή της τιμής του δυναμικού  $V$  ίση με  $\Delta V$  στον χρόνο  $\Delta t$  η εξίσωση (8) γράφεται

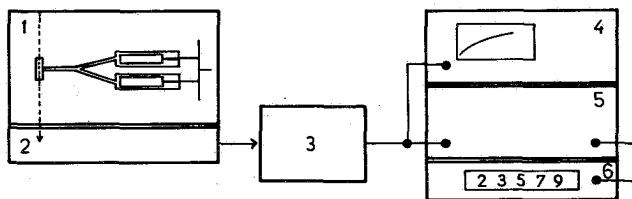
$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{S}{\Delta V} [\text{AA}]_0 \quad (9)$$

όπου  $S = k Q Y$ . Ο συντελεστής αναλογίας  $S/\Delta V$  στην εξίσωση (9) είναι η κλίση της αναλυτικής καμπύλης για τον προσδιορισμό της  $[\text{AA}]_0$ . Μετρώντας τον χρόνο  $\Delta t$  για μια ωρισμένη μεταβολή του σήματος στην αρχή της αντίδρασης μπορούμε να υπολογίσουμε την αρχική συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο δείγμα. Η καμπύλη αναφοράς δίνει τις τιμές του αντίστροφο χρόνου  $1/\Delta t$ , συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης του (AA) στο μετρούμενο δείγμα.

### Πειραματικό μέρος

#### a) Όργανα και διατάξεις.

Χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που αναφέρεται σε προηγούμενες εργασίες και που δείχνεται στο σχήμα 1<sup>8,9</sup>.



ΣΧΗΜΑ 1. Διαγραμματική παράσταση του φασματοφωτομέτρου κινητικής μελέτης ταχειών αντιδράσεων και της μετρητικής διάταξης 1: Σύστημα ανάμειξης και αναχάιτισης ροής, 2: Φωτοπολλαπλασιαστής, 3: Ενισχυτής και διαμορφωτής ηλεκτρικού σήματος, 4: Ηλεκτρονικός παλμογράφος, 5: Υπολογιστής χρόνου  $\Delta t$ , 6: Ψηφιακός μετρητής.

### β) Αντιδραστήρια.

1. Οξαλικό οξύ 0,2 M σε απεσταγμένο ύδωρ.
2. Ασκορβικό οξύ 0,1 M σε διάλυμα οξαλικού οξέος 0,2 M. Διατηρείται στο ψυγείο για ένα μήνα χωρίς σημαντική αλλοίωση του (AA) (Merck, Extra pure).
3. 2,6-διχλωροφαινολινδοφαινόλη (DCPI), διάλυμα  $1,0 \cdot 10^{-3}$  M σε 0,02%  $\text{NaHCO}_3$  (Merck pro analysis). Η τιτλοδότηση του διαλύματος αυτού μπορεί να γίνει είτε ογκομετρικά με πρότυπο διάλυμα (AA), είτε φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας την τιμή του μοριακού συντελεστή απορρόφησης  $\epsilon = 8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  στο μήκος κύματος  $\lambda = 522\text{nm}$ <sup>10</sup>. Το διάλυμα διατηρείται αναλλοίωτο στο ψυγείο για ένα μήνα περίπου.
4. Μεταφωσφορικό οξύ  $(\text{HPO}_3)_n$ , υδατικό διάλυμα 20%. Διατηρείται στο ψυγείο το πολύ για δύο εβδομάδες.
5. 2,3-διμερκαπτοπροπανόλη-1. Χημικώς καθαρό αντιδραστήριο.
6. Υδροξείδιο του καλίου KOH, υδατικό διάλυμα 50%.
7. Ν-αιθυλ-μαλεϊμίδιο, υδατικό διάλυμα 3,2% w/v.
8. 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), διάλυμα με θειουρία. Διαλύουμε 2g DNPH και 1g θειουρίας σε 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 N και διηθούμε.
9. Τριχλωροοξικό οξύ 4% w/v.
10. Οξικό οξύ 10% v/v.
11.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  85% w/v.

### γ) Χάραξη της Καμπύλης Αναφοράς.

Η προετοιμασία και η ρύθμιση του οργάνου γίνεται κατά τα αναφερόμενα σε προηγούμενες εργασίες<sup>8,9</sup>. Σημειώνουμε τις ενδείξεις του μετρητή χρόνου για 5 τουλάχιστον μετρήσεις και για όλα τα πρότυπα διαλύματα. Για κάθε πρότυπο διάλυμα διαβάζουμε στον μετρητή τον χρόνο  $\Delta t$  για μια ωρισμένη (την ίδια για όλα τα πρότυπα διαλύματα) μεταβολή του σήματος,  $\Delta V = 0,5 \text{ V}$ , στο αρχικό γραμμικό τμήμα της καμπύλης αντιδράσεως και σημειώνουμε σε χιλιοστόμετρικό χαρτί τους αντίστροφους χρόνους  $1/\Delta t$  συναρτήσεως της συγκέντρωσης του (AA) των προτύπων διαλυμάτων. Με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων βρίσκουμε την κλίση της καμπύλης αναφοράς (Κ.Α.). Η τιμή της κλίσης βρέθηκε  $164270 \pm 1540 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  και  $75220 \pm 705 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  για συγκεντρώσεις DCPI  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  και  $0,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  αντίστοιχα και θερμοκρασία  $25^\circ \text{C}$ . Και στις δυο περιπτώσεις  $\Delta V = 0,5 \text{ V}$ .

δ) Προετοιμασία των δειγμάτων για προσδιορισμό (AA) σε φαρμακευτικά σκευάσματα

1. Δισκία ασκορβικού οξέος: Ζυγίζονται και κονιοποιούνται τα δισκία δειγματοληψίας σε Ίγδιο πορσελάνης. Μεταφέρεται ακριβώς ζυγισθείσα ποσότητα της σκόνης, που αντιστοιχεί περίπου σε 1 mg (AA), σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Το δείγμα διαλύεται σε οξαλικό οξύ 0,2 M και συμπληρώνεται η φιάλη με τον ίδιο διάλυτη μέχρι χαραγής. Το λαμβανόμενο διαυγές διάλυμα μετά από διήθηση ή φυγοκέντρηση είναι έτοιμο για μέτρηση.

2. Δισκία (AA) που περιέχουν ασβέστιο ή άλλες ουσίες που αντιδρούν με οξαλικό οξύ: Ακολουθείται η ίδια πορεία που περιγράψαμε πιο πάνω, με την διαφορά ότι αντί για οξαλικό οξύ χρησιμοποιείται οξικό οξύ 10%.

3. Ενέσιμα ή σιρόπια (AA): Μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, ακριβώς μετρημένος όγκος ενέσιμου ή σιροπιού που αντιστοιχεί σε 1 mg (AA). Συμπληρώνεται με οξαλικό οξύ 0,2 M μέχρι την χαραγή.

ε) Προετοιμασία των δειγμάτων για τον προσδιορισμό βιταμίνης C στα ούρα.

1. Προσδιορισμός (AA) στα ούρα: Αραιώνονται 10,0 ml ούρα μέχρι όγκου 50,0 ml με τριχλωροοξικό οξύ 4%. Το λαμβανόμενο διάλυμα, μετά από διήθηση είναι έτοιμο για τον προσδιορισμό.

2. Προσδιορισμός ολικής βιταμίνης C στα ούρα: Αραιώνονται 10,0 ml ούρα μέχρι όγκου 50,0 ml με  $\text{HPO}_3$  5%. Το διάλυμα διηθείται σε πτυχωτό ηθμό. Σε 30,0 ml του διηθήματος προστίθενται 0,1 ml διμερκαπτοπροπανόλης και KOH 50% μέχρις ότου το pH γίνει 5,5. Αφήνεται το διάλυμα σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C για 10 λεπτά. Προστίθενται 10,0 ml N-αιθυλ-μαλεϊμίδιο και το δείγμα αφήνεται στο υδρόλουτρο για ένα λεπτό ακόμη. Οξινίζεται με  $\text{HPO}_3$  20% και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι 50,0 ml με απεσταγμένο ύδωρ. Το διάλυμα αυτό είναι έτοιμο για μέτρηση.

3. Προσδιορισμός (DAA) στα ούρα: Από την διαφορά της ολικής βιταμίνης C και του (AA) υπολογίζεται το ποσό του υπάρχοντος (DAA) στα ούρα.

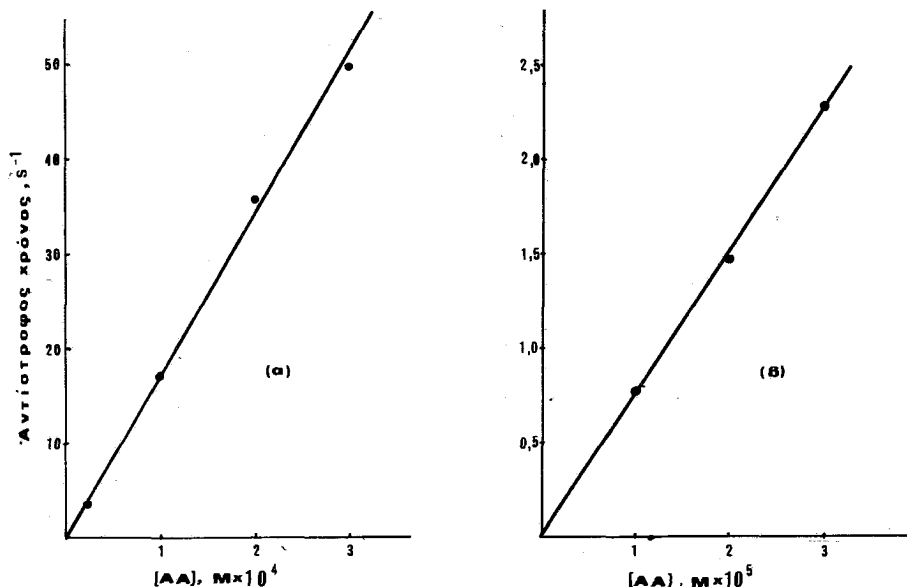
στ) Μέτρηση των δειγμάτων.

Επαναλαμβάνεται η πορεία εργασίας για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς. Από τις τιμές  $1/\Delta t$  (σε  $\text{s}^{-1}$ ) που βρίσκονται για κάθε άγνωστο δείγμα και διαιρέσεώς τους με την τιμή της κλίσης της καμπύλης αναφοράς, υπολογίζεται η συγκέντρωση του (AA) και γίνεται αναγωγή στα αρχικά δείγματα.

### Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει πολύ καλή γραμμικότητα για την περιοχή συγκεντρώσεων (AA) από  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  μέχρι  $50,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  και από  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  μέχρι  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , όταν η συγκέντρωση του DCPI παραμένει η ίδια και ίση με  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  και  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  αντίστοιχα για τις δύο περιοχές συγκεντρώσεων του (AA). Το σχήμα 2 δείχνει τις καμπύλες αναφοράς με πρότυπα διαλύματα (AA), όπου φαίνεται η καλή επαναληπτικότητα και γραμμικότητα αυτών. Ο συντελεστής

συσχετίσεως είναι  $r = 0,9998$ . Η επαναληπτικότητα είναι τόσο καλή ώστε να μπορεί να προταθεί χάραξη της καμπύλης αναφοράς με ένα μόνο σημείο, γνωρίζοντας από στατιστική ανάλυση πειραματικών δεδομένων ότι αυτή διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι καμπύλες αναφοράς με ένα μόνο σημείο δίνουν κλίσεις που βρίσκονται μέσα στην περιοχή τιμών κλίσεων των καμπύλων αναφοράς με περισσότερα σημεία. Για πιο μεγάλη



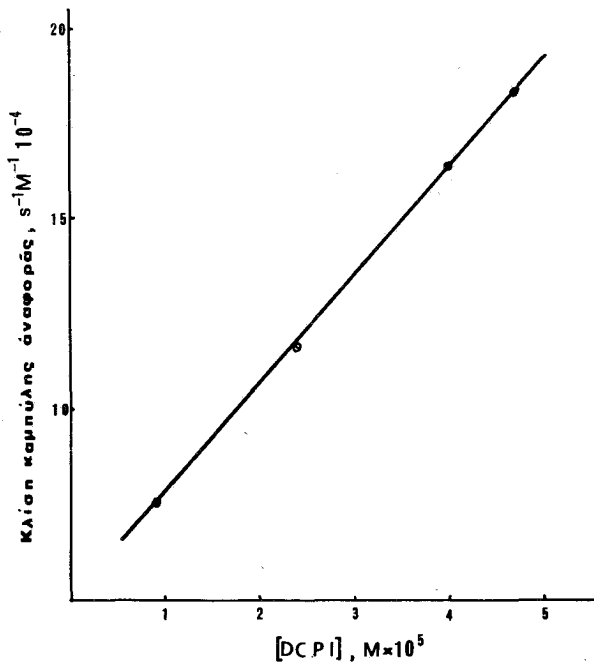
ΣΧΗΜΑ 2. Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό ασκορβικού-οξέος σε φαρμακευτικά σκευάσματα και βιολογικά υγρά.

(α) [DCPI] = 4,0 · 10<sup>-5</sup> M (β) [DCPI] = 0,9 · 10<sup>-5</sup> M

ακρίβεια η μέτρηση των προτύπων και των δειγμάτων γίνεται με το ίδιο διάλυμα DCPI οπότε δεν είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της συγκέντρωσής του. Σύγκριση μετρήσεων δειγμάτων και προτύπων διαλυμάτων (AA) που έγιναν με διαλύματα DCPI διαφορετικών συγκεντρώσεων είναι δυνατόν να γίνει με χρήση του διαγράμματος του σχήματος 3. Το γράφημα του σχήματος 3 δείχνει την εξάρτηση της τιμής της κλίσης καμπύλων αναφοράς από την συγκέντρωση του DCPI. Η μεταβολή της κλίσης είναι 28750 ανά 1,0 · 10<sup>-5</sup> M DCPI.

Πολλοί ερευνητές μελέτησαν την επίδραση του είδους του οξέος και διαπίστωσαν διαφορές στην προσδιοριζόμενη συγκέντρωση του (AA) ανάλογα με το οξύ<sup>11</sup>. Στην προτεινόμενη μέθοδο, επειδή είναι κινητική και στηρίζεται σε σχετικές μετρήσεις, δεν έχει σημασία το είδος του οξέος που χρησιμοποιείται αρκεί να μην παρεμποδίζει χημικά.

Το DCPI σε όξινο περιβάλλον καταστρέφεται. Σε pH μικρότερο του 2 διασπάται σε κινίνη και αμίνη<sup>12</sup>. Στην προτεινόμενη μέθοδο δεν υπάρχει τέτοιος κίνδυνος, γιατί το διάλυμα του DCPI διατηρείται σε αλκαλικό περιβάλλον και έρχεται σε επαφή με το όξινο διάλυμα για μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου κατά την ανάμιξη.



ΣΧΗΜΑ 3. Μεταβολή της κλίσης της καμπύλης αναφοράς με την συγκέντρωση του DCPI.

Στον πίνακα I δείχνονται πειραματικά δεδομένα από μέτρηση 5 δειγμάτων που παρασκευάστηκαν από διάλυση 0,1091 g βιταμινούχου σκευάσματος Sorbex T σε 100,0 ml οξαλικού οξέος 0,2 M και αραιώσεως, σε 5 ξεχωριστές ογκομετρικές φιάλες των 100 ml, κάθε φορά 5 ml αυτού του διαλύματος στα 100 ml πάλι με οξαλικό οξύ 0,2 M. Τα πέντε δείγματα μετρήθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με την κλασσική φασματοφωτομετρική μέθοδο που στηρίζεται στην ίδια αντίδραση<sup>13</sup>.

Ο πίνακας I δείχνει την επαναληπτικότητα στις 6 μετρήσεις του ίδιου δείγματος, την επαναληπτικότητα μέσα στα πέντε δείγματα και την σχετική διαφορά στα αποτελέσματα με τις δύο μεθόδους για κάθε δείγμα. Η μέση τιμή της επαναληπτικότητας του μέσου όρου των μετρήσεων κάθε δείγματος είναι 0,5%. Η σχετική τυπική απόκλιση του μέσου όρου για τα πέντε δείγματα με την κλασσική μέθοδο βρέθηκε 0,6% ενώ με την προτεινόμενη μέθοδο είναι 0,4%. Η ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου, αν εκφρασθή ως σχετική διαφορά μεταξύ των τιμών που δίνουν οι δύο μέθοδοι, είναι 0,5%.

Η σύγκριση της προτεινόμενης μεθόδου με την κλασσική φασματοφωτομετρική μέθοδο, έγινε και σε μια σειρά έξι φαρμακευτικών σκευασμάτων δισκίων, ενέσιμων και σταγόνων που περιέχουν ασκορβικό οξύ. Τα αποτελέσματα συμφωνούν ικανοποιητικά, όπως δείχνει ο πίνακας II και το σχήμα 4. Η κλίση της ευθείας του σχήματος 4 είναι 0,9744 και ο συντελεστής συσχέτισης  $r = 0,9996$ <sup>14</sup>

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι : Πειραματικά δεδομένα μέτρησης φαρμακευτικού σκευάσματος, που δείχνουν την επαναληπτικότητα και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου.

A/A	1	2	3	4	5	Μέσοι όροι	
Χρόνοι $\Delta t$ ms	234	231	236	231	240		
	232	225	233	230	233		
	239	233	228	233	232		
	232	235	230	230	230		
	234	232	229	232	235		
	232	229	229	228	234		
Μέσος όρος $\bar{\Delta t}$ , ms	233,8	230,8	230,8	230,7	234,0		
Τυπική απόκλιση μέσου όρου $S_{\bar{x}}$	1,1 ή 0,5 %	1,4 ή 0,6 %	1,2 ή 0,5 %	0,7 ή 0,3 %	1,4 ή 0,6 %	1,2 ή 0,5 %	
Συγκέντρωση σε ΑΑ mg/100 ml	κλασσική μέθοδος	45,73	46,09	46,68	46,21	46,09	46,2 0,6 %
		προτεινό- μενη μέθο- δος	45,97	46,50	46,50	46,50	45,97
Διαφορά με- ταξύ των με- θόδων, %	0,52		0,89	0,38	0,63	0,26	0,54

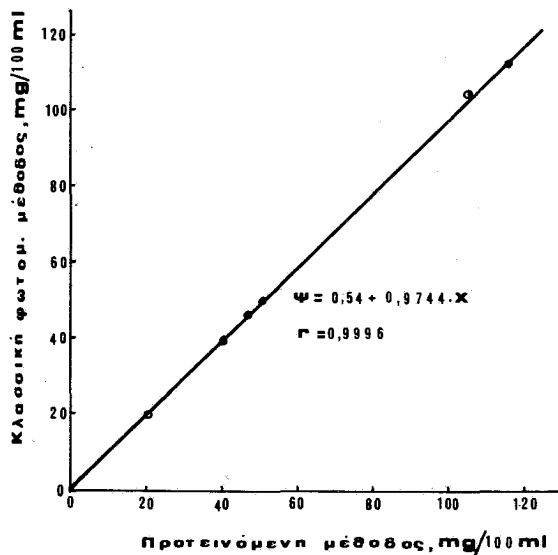
ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ : Αποτελέσματα συγκριτικών μετρήσεων συγκεντρώσεως ασκορβικού οξέος σε διάφορα δείγματα, με την κλασσική φωτομετρική και την προτεινόμενη μέθοδο.

Δείγμα	Περιεκτικότητα ΑΑ, mg/100ml*		Διαφορά %
	κλασσική μέθοδος (X)	προτεινόμενη μέθοδος (Ψ)	
Σταγόνες	19,91	20,09	+ 0,9
Χυμός	39,57	40,54	+ 2,4
Ενέσιμο	46,16	46,29	+ 0,3
Δισκίο	49,47	50,34	+ 1,8
Δισκίο	104,67	104,89	+ 0,2
Εκχύλισμα	112,0	116,0	+ 3,6

\* Η περιεκτικότητα αυτή αναφέρεται στο μετρούμενο και όχι στο αρχικό δείγμα.

Η εξίσωση συμμεταβολής είναι  $\Psi = 0,54 + 0,974 X$

Ο συντελεστής συσχέτισης είναι  $r = 0,9996$



ΣΧΗΜΑ 4. Συσχέτιση της προτεινόμενης και της κλασσικής φωτομετρικής μεθόδου προσδιορισμού του ασκορβικού οξέος.



Η προτεινόμενη μέθοδος είναι πλήρως εφαρμόσιμη στον έλεγχο περιεκτικότητας (AA) φαρμακευτικών σκευασμάτων του εμπορίου. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση δισκίων (AA) ήταν πολύ καλά, όπως δείχνει ο πίνακας III. Τα προϊόντα Β και Γ από τα δισκία αυτά περιείχαν ασβέστιο και άλλες έκδοχες ουσίες, που όπως φαίνεται δε παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.

ΠΙΝΑΚΑΣ III : Αποτελέσματα εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου στον προσδιορισμό (AA) σε δισκία του εμπορίου.<sup>(α)</sup>

Κατασκευαστής	AA, δηλωμένο ανά δισκίο, mg	AA ευρεθέν ανά δισκίο, mg	Ανάκτηση %
A	1000	1030	103,0 ± 1,8
B	1000	1022	102,2 ± 4,6
Γ	1000	985	98,5 ± 1,9
Δ	200	203	101,1 ± 2,8

<sup>(α)</sup> Οι τιμές που δίνονται είναι ο μέσος όρος 5 προσδιορισμών, και τα σφάλματα είναι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις.

Διάφορα ενέσιμα διαλύματα και σιρόπια αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο και έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα όπως δείχνει ο πίνακας IV.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV : Προσδιορισμός (AA) σε ενέσιμα διαλύματα και σιρόπια του εμπορίου<sup>(α)</sup>.

Κατασκευαστής	AA, δηλωμένο	AA ευρεθέν	Ανάκτηση
A	500mg/φύσιγγα	503,5mg/φύσιγγα	100,7 ± 1,4
B	500mg/φύσιγγα	507,7mg/φύσιγγα	101,5 ± 1,1
Γ	100mg/ml	101,7mg/ml	101,7 ± 2,2

<sup>(α)</sup> Τα δείγματα A και B είναι ενέσιμα, ενώ το Γ σιρόπι. Οι τιμές που δίνονται είναι ο μέσος όρος 5 προσδιορισμών, και τα σφάλματα είναι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις.

Στα βιολογικά υγρά είναι δυνατόν να περιέχεται ένα σημαντικό ποσοστό (DAA) με αντιασκορβουτική δράση, το οποίο δεν προσδιορίζεται άμεσα με την προτεινόμενη μέθοδο. Ανάγοντας το (DAA) με προσθήκη διμερκαπτοπροπανόλης προσδιορίζεται η ολική βιταμίνη C, που περιέχεται στα βιολογικά υγρά και από την διαφορά το (DAA). Όπως διαπιστώθηκε με πειράματα σε συνθετικά δείγματα η αναγωγή είναι ποσοτική και δεν υπάρχει απώλεια (AA), αρκεί να εξουδετερωθεί το μεταφωσφορικό οξύ μετά την προσθήκη της διμερκαπτοπροπανόλης <sup>15</sup>. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε με την επίσημη φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού του (DAA) των Roe και Kuether, με αντιδραστήριο

σύζευξης του (DAA) την 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη<sup>6</sup>. Ο πίνακας V δείχνει την συμφωνία των αποτελεσμάτων κατά τον προσδιορισμό (AA) και (DAA) στα ούρα με τις δύο μεθόδους.

ΠΙΝΑΚΑΣ V : Προσδιορισμός ασκορβικού και δεϋδροασκορβικού οξέος στα ούρα. Σύγκριση των αποτελεσμάτων με την κλασσική φωτομετρική μέθοδο.<sup>(α)</sup>

[AA]	ολική βιταμίνη C	[DAA] από διαφορά	[DAA] μέθοδος DNPΗ	Διαφορά των δύο μεθόδων %
4,42	6,49	2,07	2,00	3,38
2,95	3,41	0,46	0,45	2,17
0,18	1,24	1,06	1,00	5,66
4,82	6,28	1,46	1,40	4,11

(α) Οι συγκεντρώσεις δίνονται σε mg/100ml. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος πέντε προσδιορισμών.

Η αστάθεια του (AA) στα βιολογικά υγρά είναι χαρακτηριστική. Παρατηρήθηκε ότι στα ούρα σε θερμοκρασία δωματίου υπάρχει μια συνεχής απώλεια (AA). Σε δύο ώρες η ποσότητα του (AA) στα ούρα μειώνεται κατά 42%, ενώ σε 4 ώρες η μείωση φτάνει τα 75% της αρχικής τιμής.

Επειδή, όπως αναφέρθηκε, η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του (AA) με το (DCPI), κάθε ένωση που βρίσκεται στο δείγμα και ανάγει το (DCPI) είναι πηγή παρεμποδίσεων για τον προσδιορισμό του (AA). Οι ενώσεις αυτές όμως αντιδρούν με το (DCPI) πολύ αργά σε σύγκριση με το (AA). Η κινητική μέθοδος που προτείνεται εξουδετερώνει τα προβλήματα αυτά, γιατί η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση του (AA) βρίσκεται από την ταχύτητα της αντίδρασης, που είναι πολύ πιο μεγάλη, σε σύγκριση με τις των άλλων αναγωγικών ουσιών. Η αντίδραση του (AA) με το (DCPI), ανάλογα με την συγκέντρωση του (AA) συμπληρώνεται σε 20-500 ms<sup>7</sup>, ενώ οι αντιδράσεις των άλλων αναγωγικών συμπληρώνονται μετά από 5-10 s<sup>16</sup>. Μελέτες παρεμποδιστικής δράσης που έγιναν με γλυκόζη, φρουκτόζη και ξυλόζη έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του (AA) σε συγκέντρωση 2 mg/ml του δείγματος.

Επανελημένα πειράματα έδειξαν μια μέση ανάκτηση (AA) 96% για τα ούρα, ενώ για τον ορρό και το πλάσμα του αίματος το ποσοστό ανάκτησης είναι χαμηλότερο.

Η χρήση του φασματοφωτομέτρου αναχαίτησης ροής προσφέρει ένα ακόμη πλεονέκτημα: την σύγχρονη εφαρμογή κινητικής και μεθόδου τελικού σημείου με το ίδιο όργανο. Η διαφορά ΔA της απορρόφησης που διαβάζεται στην οθόνη του παλμογράφου από την αρχή της αντίδρασης μέχρι σταθεροποίησης του σήματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του (AA) στο δείγμα με βάση την γνωστή σχέση  $\Delta A = \epsilon \cdot b \cdot \Delta C$ . Η συγκέντρωση του

(DCPI) στην περίπτωση αυτή πρέπει να είναι λίγο μεγαλύτερη από την συγκέντρωση του (AA).

Η προτεινόμενη μέθοδος δείχνει όλα τα πλεονεκτήματα των κινητικών μεθόδων ανάλυσης και λόγω του μεγάλου συντελεστή απορρόφησης του (DCPI) παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία. Η επαναληπτικότητα είναι καλύτερη από 1,0%. Δεδομένου ότι η προετοιμασία των δειγμάτων στην κλασσική και την προτεινόμενη μέθοδο είναι η ίδια, η τελευταία πλεονεκτεί και ως προς την ταχύτητα. Η ακρίβεια της μεθόδου είναι καλύτερη από 2% και έχει δυνατότητα περαιτέρω αυτοματοποίησης για προσδιορισμούς ρουτίνας.

---

## Summary

### *Kinetic Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids Applying Stopped-Flow Technique.*

Ascorbic acid, in pharmaceutical preparations and biological fluids is determined applying stopped-Flow techniques and the principles of kinetic methods of analysis on the reaction of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenolindophenol. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid is also assayed in urine.

The proposed method is compared, concerning precision and accuracy, to the classical photometric method based on the same reaction. The accuracy and precision was found better than 1.0 per cent.

For tablets, containing Vitamin C, the recovery was found between  $98.6 \pm 1.9$  and  $103.0 \pm 1.8$  per cent. For injectable liquid preparations the recovery lies in the range  $100.7 \pm 1.4$  and  $101.7 \pm 2.2$  while for urine it is 96.0 per cent. For blood plasma the recovery is lower.

Finally the method is compared to the classical photometric method based on the coupling reaction of ascorbic acid with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), for the determination of dehydroascorbic acid in urine.

The interference of different reductants is also studied.

---

## Βιβλιογραφία

1. Bessey, O.A., *J. Biol. Chem.* **126**, 771, (1938).
2. Deutsch, M.J. and Weeks C.E., *J. AOAC* **48**, 1248, (1965).
3. Lindquist J. and Farroha S.M., *Analyst* **100**, 377, (1975).
4. Chen Yu-Thau, Isherwood F.A. and Mapson L.W., *Biochem. J.* **55**, 821, (1953).
5. Tillmans J., *Z. Unters. Lebens.*, **54**, 33, (1927).
6. Roe J.H. and Kuether C.A., *J. Biol. Chem.* **147**, 399, (1943).
7. Karayannis M.I., *Talanta* **23**, 27, (1976).

8. Karayannis M.I., *Anal.Chim.Acta* **76**, 121, (1975).
9. Karayannis M.I. and Farasoglou D.I., submitted for publication in *Analyst*.
10. Armstrong J. McD., *Biophys. Acta* **86**, 194, (1964).
11. Fürtig W. and Pohloudek-Fabini, *Pharmazie* **20**, 714, (1965).
12. Becker M., *Arch.Gartenbau* **11**, 547, (1963).
13. Welcher F.J., Editor *Standard Methods of Chemical Analysis*, 6<sup>th</sup> Edition Vol. 3, Part B, Van Nostrand, N. York p. 1155.
14. Καραγιάννης Μ.Ι., «Επεξεργασία Αξιολόγηση Παρουσίαση Αναλυτικών Δεδομένων», Αθήνα 1978, σελ. 166 και 188.
15. Bourgeois C.F., Czornomaz A.M., George P., Belliot J.P., Mainguy P.R. et Watier B., *Analysis* **3** (10), 540, (1975).
16. Efstathiou C.E. and Hadjiioannou T.P., *Anal.Chim.Acta* **89**, 55, (1977).

### Ευχαριστίες

Το πειραματικό μέρος αυτής της εργασίας έγινε με το φασματοφωτόμετρο αναχαιτήσης ροής του εργαστηρίου αναλυτικής χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι συγγραφείς ευχαριστούν το διευθυντή του εργαστηρίου καθηγητή Θ.Π. Χατζηϊωάννου για τη διάθεση του οργάνου.

Η εργασία αυτή επιχορηγήθηκε από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Αριθ. Επιχορήγησης 204).

## **STARCH DAMAGE OF WHEAT VARIETIES TREATED BEFORE AND AFTER MILLING; EFFECT ON BAKING QUALITY**

V. PATTAKOU, M.E. KOMAITIS and E. VOUDOURIS

*Cereal Institute, Thessaloniki, Greece, Department of Food Chemistry, University of Athens, Greece and Department of Food Chemistry, University of Ioannina, Ioannina Greece.*

(Received March 10, 1982)

### **Summary**

The mechanical damage of starch during the milling of ten wheat varieties (T. Aestivum) produced in four regions of experimental cultivation was studied. The effects of various treatments of wheat and flour were also examined. The magnitude of the damage was correlated with various factors of bread making quality of the flours such as; the carbon dioxide production, maltose index, water absorption, the maximum viscosity of starch gelatinization, the loaf weight, volume and colour of the bread as well as the wheat endosperm hardness.

Variations of wheat moisture during milling had no effect on the extent of the starch damage. However, hydrothermal treatment, resulted in characteristically reduced damage.

Addition of pregelatinized starch increased the overall damage and improved the cases with very low damage associated with very little amylolysis, while the fine fraction of the air-classified flours was enriched with damaged starch granules.

**Key Words** : Starch damage, milling, baking quality.

### **Introduction**

The mechanical damage of wheat starch during the milling process has been extensively studied<sup>1-3</sup>. Its effect on the bread making quality of flours is known from the fact that the action of  $\alpha$ - and  $\beta$ - amylase is easier and faster on amylose and amylopectin of the damaged granules, while in the intact granules is more difficult and slow<sup>4-7</sup>. It has been stated that the differences in diastatic activity between various flours is a result of their content in damaged starch granules rather than the fluctuation of  $\beta$ - amylase of the wheat from which they are produced<sup>8,9</sup>.

The differences in water absorption result from the multicorrelation of protein content and damaged starch<sup>1</sup>.

Jones<sup>3</sup> showed that the maltose index is a measure of the mechanically damaged starch. Many workers studied the starch damage and gave different explanations as to the reasons that cause it<sup>10-14</sup>.

Experimental studies on a certain type of flour combined with the X-ray measurement of crystallization index in comparison with crystalline and amorphous patterns, showed that the reduction of the starch crystallization, was connected with linear relation with the damage<sup>15</sup>.

The extent of the damage is affected by the variety and the region of cultivation.

In the present study, the effect of various technological treatments of the wheat before and after milling on the extent of starch damage was studied.

## Experimental

### Materials and Methods

Samples of 1977 crop of ten wheat varieties (T. Aestivum) were collected from four experimental fields with four replications each. The sample of each variety was a mixture from the four replications of each field.

After harvesting, the samples were stored at room temperature for 30 days under constant humidity  $10 \pm 0.5\%$  followed by cold storage at  $5^{\circ}\text{C}$ .

Milling was carried out on an experimental Brabender Quadrumat Junior mill with an average yield of 62% flour. As regards moisture no difference was observed.

Starch damage was measured photometrically by a method developed by the Flour Milling and Baking Research Association, Chorleywood<sup>2</sup>.

Flour (0.5g) was treated with trichloroacetic acid at  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. The amylose extract of the damaged starch granules was treated with iodine solution and the blue-green colour developed was measured at 600 nm. The results were expressed in units of optical density (Abs).

Maltose index was estimated after the caramelization of the extracted sugars with 1N NaOH in a boiling waterbath and measurement of the developed colour colorimetrically<sup>16</sup>. The maltose index was expressed in mg/100g.

The water absorption was measured with a Brabender microfarinograph in 10g of flour and dough consistency 500 B.U.

#### *Moisture of Milled Wheat.*

The initial moisture of the wheat samples was around 10%.

Milling was carried out at two different moisture levels one high and one low (average of replications 16% and 13% respectively).

The moistening of the grains was effected by addition of water to the desired level, and storage of the grains in plastic bags for four hours. The moisture was determined electrometrically with a Steinlite moisturemeter.

#### *High Temperature Hydrothermal Treatment (Conditioning).*

Wheat (100g of 16% moisture) was sealed in plastic bags and left for three hours. Then, they were placed in a closed metallic box (7mm thick), which was immersed in a boiling waterbath for 10, 20 and 30 minutes. At the end of each period the temperature of the grains was as follows:

Time (min)	Temperature
10	67
20	75
30	84

The samples were air dried to 13% moisture and milled.

#### *Air-classification of Flours*

The flours from two hard and two soft wheat varieties were air-classified under constant air current of  $19 \text{ cm}^3/\text{h}$ <sup>17</sup>. In the resulting three fractions, fine, medium and coarse, the protein was determined by the Kjeldahl method ( $\text{N} \times 5.70$ ). Starch damage and maltose index were also measured.

#### *Gelatinization of Starch.*

A Brabender amylograph was employed to attain maximum viscosity. A quantity of the gel was lyophilized in a Virtis apparatus under vacuum (5 mmHg) at  $-50^\circ\text{C}$ . The gelatinization was carried out on three varieties of flour and the starch damage of the lyophilized preparation was measured.

Dry pregelatinized starch of the variety with the greatest amount of damage (1.25 absorbance units) was added to the original flour of the three varieties in different amounts (5 to 30% increments of 5%) with starch damage and maltose index being calculated (Table IV).

#### *Evaluation of Endosperm Hardness.*

The hardness was estimated as the resistance to the force applied to break up the endosperm, e.g., the time in seconds required for milling 100g wheat in a Retsek-Haan Typ SK1 mill with a metallic sieve of 2mm. Because of the dependence of time milling on the endosperm structure, which in turn is dependent on the moisture content, provision was taken that all samples had the same moisture level 10%.

#### *Bread Baking Test.*

The experimental method of the Institute of Cereals of Thessaloniki was used. Flour (300g) with yeast (1.25%) and salt (2%) were blended in a farinograph for eight minutes with enough water to give a dough consistency of 500 B.U. The fermentation and proofing time were 2 and 1.5 h, respectively<sup>18</sup>.

After baking, the weight and the volume of the bread were measured and the bread colour was evaluated by a four membered panel and rated on a scale from 1 (white, no colour) to 10 (brownish, gold pink).

The final score was the mean of the evaluations.

## **Results and Discussion**

#### *Effect of Milling Moisture.*

The moisture of milled wheat at two different levels (ca. 16% and 13%) did not affect the amount of starch damage (Table I).

TABLE I : Effect of Moisture Content (%) of Grains on Starch Damage during Milling.

Variety	Moisture Content of Grain during Milling								Starch Damage (Abs)							
	High Moisture Trials				Low Moisture Trials				High Moisture Trials				Low Moisture Trials			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Generoso	15.5	16.0	15.7	17.0	13.8	11.2	13.7	13.6	.050	.073	.078	.072	.074	.075	.086	.075
Yecora	17.2	16.0	15.8	16.1	13.4	11.2	13.5	13.9	.105	.142	.200	.176	.160	.138	.220	.289
G-84909	15.5	17.0	16.0	15.9	13.2	11.8	13.8	13.2	.090	.094	.068	.064	.072	.070	.082	.068
Mec	15.4	15.0	15.8	16.6	13.9	11.8	13.7	13.5	.084	.076	.089	.065	.075	.065	.085	.065
Strampelli	15.9	17.5	16.0	16.2	13.3	11.9	13.8	13.0	.076	.065	.077	.075	.083	.078	.070	.080
Yupateco	16.8	17.0	15.9	16.7	13.5	11.8	13.9	13.2	.110	.136	.205	.141	.155	.121	.212	.163
Recanati	16.6	16.0	15.8	16.6	13.4	11.4	13.2	12.9	.050	.093	.090	.065	.052	.104	.080	.076
Torim	16.7	17.0	16.0	15.9	13.1	11.6	14.0	13.0	.165	.136	.201	.184	.170	.147	.182	.189
G-84865	15.5	15.5	15.9	15.9	13.3	11.5	13.5	13.7	.045	.040	.065	.063	.063	.046	.058	.064
S. Cerros	15.2	17.0	16.0	15.7	13.2	11.5	13.8	13.5	.200	.220	.272	.210	.228	.230	.260	.224



However, significant differences in damaged starch were observed among individual varieties. The varieties receiving the highest and lowest amounts of damage are S. Cerros and C-84865 respectively.

Electron microscopy of these two varieties clearly showed the characteristic rupture of the starch granules.

*Enzymatic Characteristics.*

The maltose index (Fig. 1), the carbon dioxide formation (Table II), and the

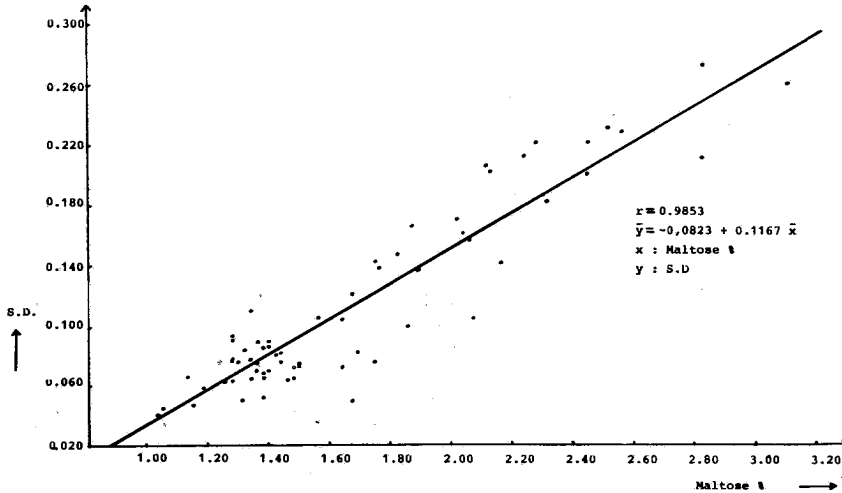


FIG. 1 : Correlation of starch damage (S.D.) and maltose index.

TABLE II : Total Carbon Dioxide Fermentographic Production in Relation to the Starch Damage of the Wheat Varieties.

Variety	S.D.** (Abs)	CO <sub>2</sub> Production ml/4h
Generoso	0.075	1330
Yecora	0.210	2165
G-84909	0.090	1000
Mec	0.070	1135
Strampelli	0.090	1115
Yupateco	0.208	1940
Recanati	0.105	1300
Torim	0.190	2265
G-84865	0.059	985
S. Cerros	0.295	2365

\*\* S.D.: Starch Damage

water absorption increased (Fig. 2), as a result of the starch damage. Farrand<sup>19</sup>

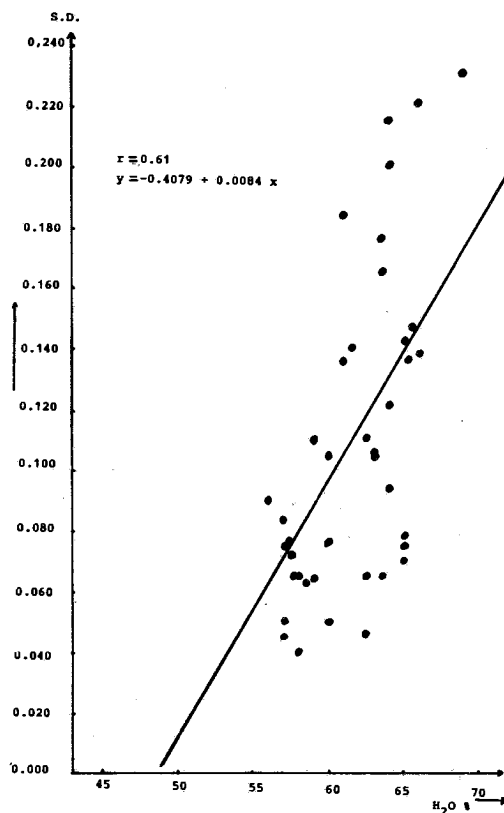


FIG. 2 : Starch damage and water absorption.

calculated that the ability of water absorption was 300 mg/g for the intact starch granules and 1000 mg/g for the damaged granules. This showed that the percentage of water absorbed by a single starch granule is not linearly connected with the absolute degree of polymerization, but rather with the crystalline structure. This relatively high water absorption ability by the amorphous starch creates the structure it has after gelatinization.

#### *Effect of Endosperm Hardness and Cultivation Place.*

A high statistical correlation was established between the endosperm hardness and the amount of starch damage (Fig. 3), whereas the environmental conditions had no effect on the differences observed in damaged starch for most of the varieties, except the harder ones (Yecora, Yupateco, Torim and S. Cerros) (Fig. 4), which showed a characteristic highest effect in the experimental region 3. This can be attributed to the morphological development and the endosperm structure during the wheat ripening because of the different climate that affects the consistency and hardness as a result of the binding between protein and starch<sup>20,21</sup>.

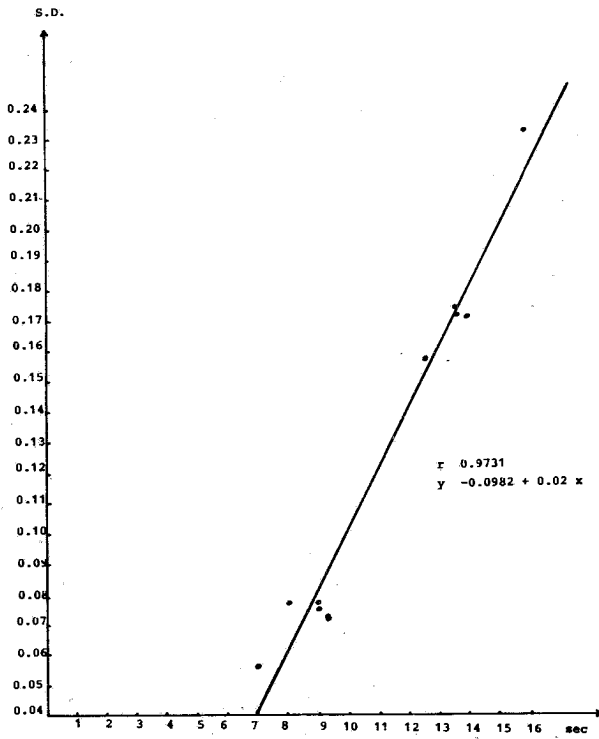


FIG. 3 : Correlation of starch damage and wheat endosperm hardness estimated from the grinding time.

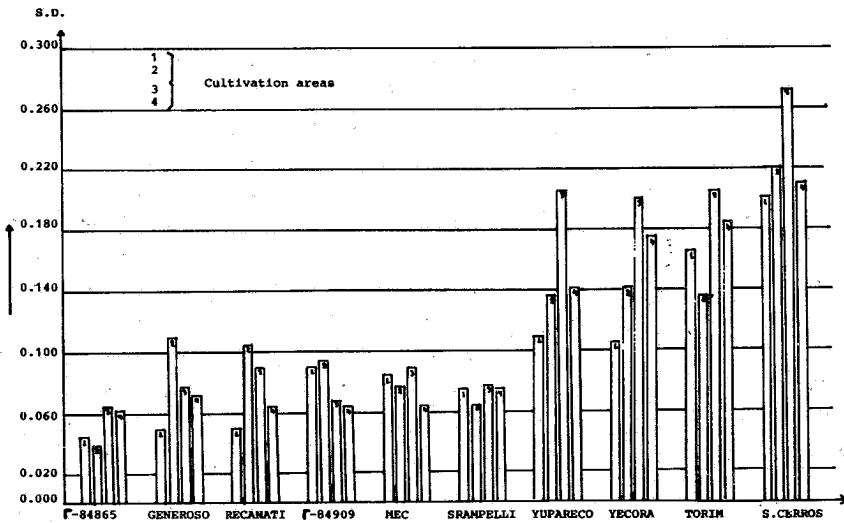


FIG. 4 : Comparison of starch damage of 10 wheat varieties grown in four cultivation areas.

*Effect of Hydrothermal Treatment.*

The improvement of the rheological properties of flour due to the hydrothermal treatment at high temperatures, is already known<sup>22-25</sup>.

This is a result of the change of the protein structure and especially of the-SH and -SS bonds<sup>26</sup>.

The consequences on starch have not been studied, but generally a reduction of the maltose index is observed because of the inactivation on the amyolytic enzymes at high temperatures. The measurement of the amount of starch damage after the hydrothermal treatment (30 minutes) in all varieties showed a reduction and simultaneously a gradual decrease in the maltose index (Fig. 5).

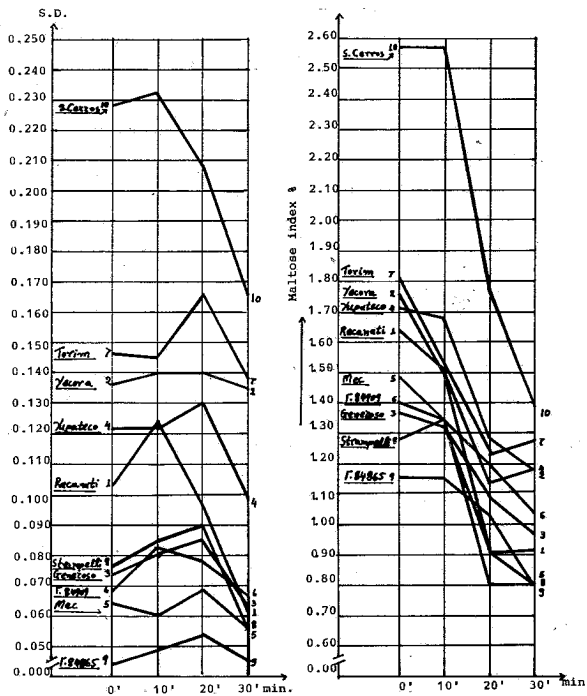


FIG. 5 : Changes of S.D. and maltose index after high temperature hydrothermal treatment (conditioning).

*Starch Damage in the Air-classified Fractions.*

The air-classification of the flour resulted in the transfer of proteins in the fine fraction (Table III). This fraction was also enriched with damaged starch granules, which as lighter and smaller were separated from the undamaged ones remaining in the heavy fraction<sup>27</sup>.

The displacement of the damaged starch granules into the fine fraction was higher in the flours of the hard varieties than in the soft varieties, although the percentage that was separated in the first ones was smaller (Table III).

TABLE III : Air-classification of Wheat Flour on the Hard and Soft Varieties.

Variety	Fraction	% Yield of Fraction	Protein Content % (as is)	S.D. (Abs)	Maltose Index %
Yecora (Hard)	Fine	7.9	20.93	0.290	4.95
	Medium	9.6	10.58	0.180	1.77
	Coarse	82.5	11.95	0.176	2.32
	Initial	100.0	12.78	0.145	2.09
S. Cerros (Hard)	Fine	8.5	18.75	0.390	5.38
	Medium	12.2	9.13	0.230	2.18
	Coarse	79.3	10.06	0.220	2.20
	Initial	100.0	11.46	0.205	2.85
G-84865 (Soft)	Fine	13.8	24.11	0.080	1.71
	Medium	8.2	7.15	0.038	0.83
	Coarse	78.0	9.26	0.045	1.23
	Initial	100.0	10.32	0.055	1.28
Generoso (Soft)	Fine	17.2	22.80	0.165	2.56
	Medium	10.9	7.91	0.045	1.03
	Coarse	81.1	9.78	0.105	1.67
	Initial	100.0	10.46	0.100	1.48

#### *Change of the Enzymic Action with Addition of Pregelatinized Starch.*

The starch gelatinization of the flour of the three varieties examined changed their crystallinity and resulted in an amorphous state.

Addition of different amounts of lyophilised gel of the variety S. Cerros (S.D. 1.250 Abs, maximum viscosity 800 A.U.) in the original flour of the three varieties increased not only the starch damage, but also the maltose index (Table IV). The correlation coefficient of these two parameters was high irrespective of the substrate on which the addition had acted (Fig. 6). The addition of gel resulted in the increase of the starch damage (Fig. 6).

Addition of 5% pregelatinized starch improved the carbon dioxide formation significantly (Fig. 7).

#### *Effect of Starch Damage on Bread Characteristics.*

The baking experiment was carried out on a mixture of samples of the same

TABLE IV : Change of Starch Damage and Maltose Index after Addition of Pregelatinized Starch in the Flour of three Wheat Varieties.

Variety	Pregelatinized Starch Addition %	S.D. (Abs)	Maltose Index %
G-84865	0	0.055	1.28
	5	0.106	—
	10	0.153	1.85
	15	0.212	—
	20	0.276	2.90
	25	0.311	—
	30	0.350	4.89
Yecora	0	0.210	1.76
	5	0.268	—
	10	0.330	5.45
	15	0.368	—
	20	0.400	6.50
	25	0.442	—
	30	0.490	6.65
S. Cerros	0	0.240	2.70
	5	0.295	—
	10	0.355	5.45
	15	0.372	—
	20	0.420	6.12
	25	0.450	—
	30	0.500	6.45

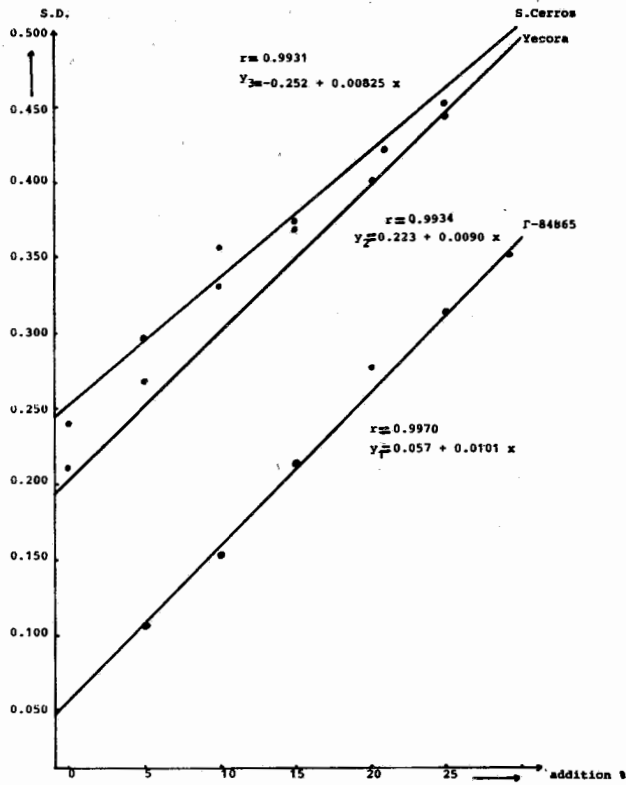


FIG. 6 : Correlation of starch damage and percentage of pregelatinized starch added in three wheat varieties.

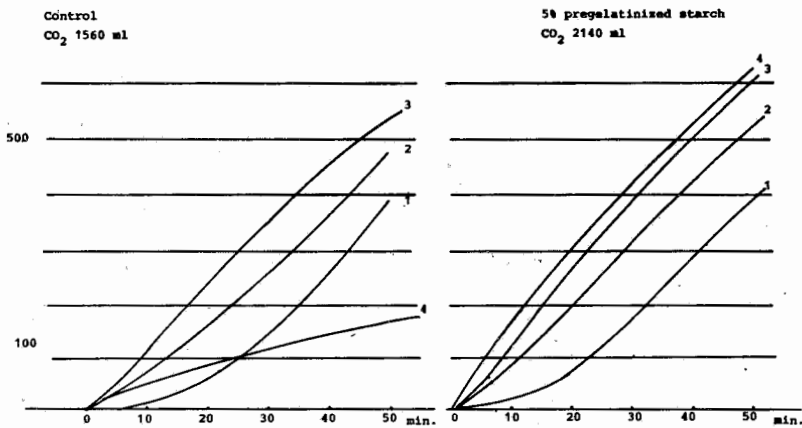


FIG. 7 : Change of fermentographic carbon dioxide production with the addition of pregelatinized starch during the 1st, 2nd, 3rd and 4th hour of fermentation.

variety and from the four experimental fields in order to have the same protein content (13%, determined according the Kjeldahl method). Figures 8, 9, 10 show the differences in weight, volume and colour of the bread.

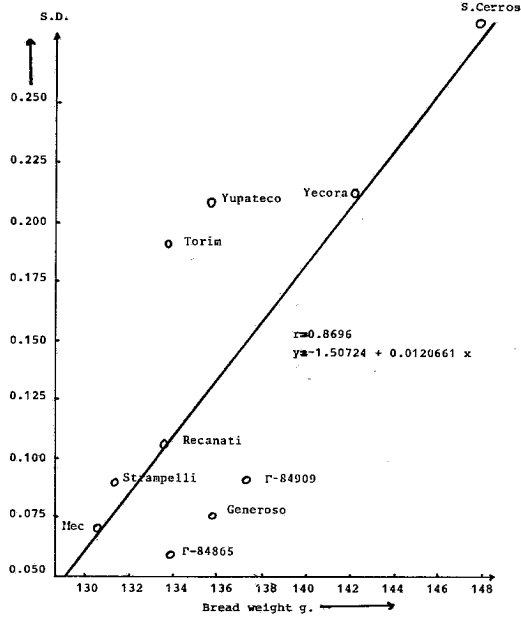


FIG. 8 : Correlation of starch damage and bread weight.

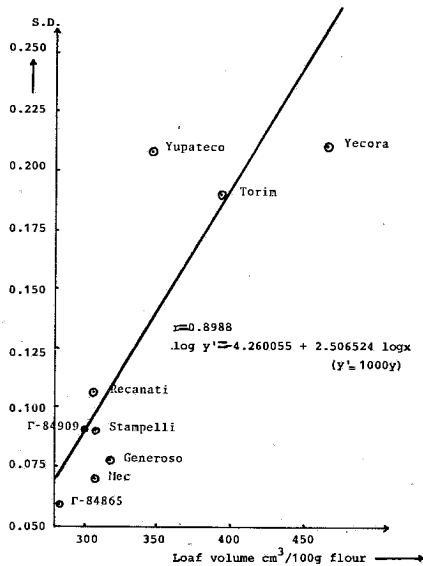


FIG. 9 : Correlation of starch damage and loaf volume score.



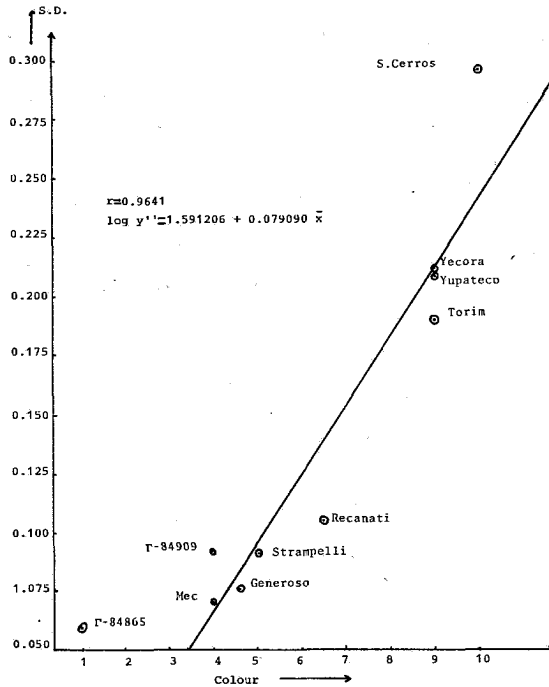


FIG. 10 : Correlation of starch damage and bread crust colour.

Varieties exhibiting higher starch damage gave higher yield in bread and better loaf characteristics in volume and colour. In our country, with warm and dry climate and low diastatic activity, the increased starch damage is desirable because of its improving effect on bread quality.

From the data of this study it is inferred that the starch damage is a genetic characteristic connected with the wheat variety and a desirable factor for good baking quality. Various treatments, before and after milling can change the starch damage, while the influence of place and enviromental conditions are apparent especially on the hard type varieties.

**Περίληψη**

*Προσβολή του Άμυλου διαφόρων Ποικιλιών Σιταριού πριν και μετά την Άλεση: Επίδραση στην Αρτοποιητική Ικανότητα*

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της μηχανικής προσβολής του άμυλου κατά τη διάρκεια της άλεσης 10 ποικιλιών σιταριού (T. Aestivum) από τέσσερες περιοχές πειραματικής καλλιέργειας.

Επίσης εξετάσθηκε η επίδραση των διαφόρων κατεργασιών πριν και μετά την άλεση του σιταριού. Οι κατεργασίες αυτές ήταν: κοντσιονάρισμα, αεροδιαχωρισμός, προσθήκη προζελατινοποιημένου άμυλου και η επίδραση της υγρασίας στην άλεση. Το μέγεθος της προσβολής του αμυλοκόκκου συσχετίστηκε με διάφορους παράγοντας της αρτοποιητικής ικανότητας ως η παραγωγή CO<sub>2</sub>,

δείκτης μαλτόζης, απορροφητική ικανότητα νερού, μέγιστο ιξώδες ζελατινοποίησης του αμύλου, το βάρος, ο όγκος και το χρώμα του ψωμιού καθώς και η σκληρότητα του ενδοσπέρματος.

Άλεση του αλευριού σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν είχε επίδραση πάνω στη προσβολή που όμως ελαττώθηκε χαρακτηριστικά μετά το κοντισιονάρισμα.

Η προσθήκη του προζελατινοποιημένου άμυλου αύξησε το ποσόν της ολικής προσβολής του αμυλόκοκκου και καλυτέρευσε τις πιθανότητες επαρκούς αμυλόλυσης σε περιπτώσεις με χαμηλό ποσό προσβολής. Κατά τον αεροδιαχωρισμό σε κλάσματα αλευριού το λεπτό πρωτεϊνικό κλάσμα εμπλουτίστηκε με σπασμένους κόκκους άμυλου. Οι ποιοτικές διαφορές στο αρτοποιητικό πείραμα ήταν χαρακτηριστικές.

## References

1. Dodds, J.H.: *Die Stärke*, **1**, 23-27 (1971).
2. Greenwood, C.T.: *Bull. Anc. Elev. Ensmic.*, **271**, 13-25 (1976).
3. Jones, C.R.: *Cereal Chem.*, **17**, 133-139 (1940).
4. Belderok, B.: "Effect of starch damage on dough and bread properties" Comm. at "Cereal 78" Winnipeg, Canada, Inst. of Cereals TNO, Wageningen, The Netherlands (1978).
5. Kent-Jones, D.W. and Amos, A.J.: *Modern Cereal Chemistry*, 6th edition, Food Trade Press Ltd, London (1967).
6. Mažerand, C. and Pilon, R.: *Meunerie française*, **310**, 12-20 (1974).
7. Mercier, C.: *Amidon et enzymes amylolytiques*, 9me Congrès de l' ICC, Vienne (1976).
8. Dadswell, I. and Garner, J.F.: *Cereal Chem.*, **24**, 79-99 (1947).
9. Dubois, M.: *Bull. des Anciens Elèves de l' Ecole Franc. de Meun.* **113**, 170-187 (1949).
10. Badenhuizen, N.P.: "Starch Chemistry and Technology", Ed. Whistler and Pascall, Vol. I, Acad. Press N. York (1965).
11. Czajia, A.T.: *Die Stärke*, **13**, 357 (1961).
12. Knight, R.A. and Wade, P.: *Chem. Ind.*, 568 (1971).
13. Sterling, C.: "Starch and its Derivatives" Ed. J.A. Radley Chapman and Hall, United Kingdom (1968).
14. Woodruff, S. and Weber, L.: *J. Agr. Research*, **46**, 1099-1108 (1933).
15. Lelièvre, J.: *Die Stärke*, **3**, 85-88 (1974).
16. Röhrlich, M. and Bruckner, G.: *Das Getreide und seine Untersuchung*, Verl. Hayns Erben, Berlin, 32-33 (1957).
17. Jones, C.R., Halton, P. and Stevens, D.J.: *J. Bioanal. Microb. Technology and Engin.*, **1**, 77-98 (1959).
18. Patakou, V., Papastefanou, S. and Gioupsanis, T.: *Qualité du blé des récoltes 1976 et 1977*. An. N° 64 Cereal Institute, Salonika (1979).
19. Farrand, E.A.: *Cereal Chem.*, **41**, 98-111 (1964).
20. Barlow, K.K., Buttrose, M.S., Simonds, D.H. and Veski, M.: *Cereal Chem.*, **50**, 443 (1973).
21. Wringley, C.W.: *Cereal Sci. to day*, **17**, 370 (1972).
22. Belderok, B.: *Getreide und Mehl*, **17**, 20-23 (1967).
23. Bloksma, A.H.: *Bakers Digest*, **38**, 53-60 (1964).
24. Mecham, D.K.: *Brot u. Geback*, **21**, 145-149 (1967).
25. Röhrlich, M. and Essner, W.: *Brot u. Geback*, **20**, 4-10 (1966).
26. Woychik, J.H., Jubner, F.R. and Dimler, R.J.: *Arch. Bioch. Bioph.*, **105**, 151-155 (1964).
27. De la Guerivière, J.F., Audidier, Y., Seince, Y. and Benoualid, K.: *Centre Technique de l' Union Bull.*, **1**, 11 (1967).

## **ETUDE DANS LA SERIE DES PYRROLIDINONES. SYNTHÈSE DES ACIDES N-(ARYL METHYL) OXO-5 PYRROLIDINE CARBOXYLIQUES-2.**

NICOLAS M. KOLOCOURIS et BENOIT RIGO

*Laboratoire de Pharmacie Chimique, Université d'Athènes, 104 rue Solonos, Athènes (144) Grèce et Laboratoire de Chimie Organique, Ecole H.E.I. 13 rue de Toul 59046 LILLE CEDEX FRANCE*

(Received March 26, 1982)

### **Sommaire**

L'intérêt du présent mémoire se porte sur la synthèse des esters N-(aryl méthyl)oxo-5 pyrrolidine carboxyliques-2 et certains de leurs dérivés, matières premières à la préparation de nouvelles séries hétérocycliques. La méthode qui utilise une petite quantité de méthanol et un solvant polaire aprotique semble donner les meilleurs résultats.

**Key words :** N-(aryl méthyl) 5-oxo pyrrolidine carboxyliques acids and esters.

### **Introduction**

L'utilisation des acides N-(arylméthyl) oxo-5 pyrrolidine carboxyliques-2 4 (acides N-arylméthyl pyroglutamiques) et de leurs dérivés comme matières de base pour obtenir de nouvelles séries du type 5<sup>1</sup>, 6<sup>1</sup>, 7<sup>21</sup>, et 8<sup>1</sup> nous a incité de mettre au point une méthode de préparation qui nous fournirait ces acides d'une part avec un rendement satisfaisant et d'autre part nous permettrait de travailler avec des quantités importantes de matières premières.

Cette synthèse a été décrite par nous même en 1973<sup>3</sup>, puis Campaigne<sup>4</sup> en 1975 et Ferlux<sup>5</sup> en 1976 selon un principe identique: formation du dérivé sodé du pyroglutamate de méthyle 2 avec du sodium finement dispersé dans le toluène<sup>3,5</sup> ou de l'hydrure de sodium dans le benzène<sup>4</sup>, suivie de condensation avec un halogénure de benzyle en présence d'un solvant polaire aprotique, puis saponification de l'ester formé. Ce type de réaction présente l'inconvénient de ne pouvoir s'utiliser qu'avec des quantités restreintes de matières premières; la réaction elle-même et aussi la formation des associations de haut poids moléculaire du 2 dans les solvants aromatiques sont fortement exothermiques avec toutes les conséquences lorsqu'on travaille avec des quantités importantes de matières premières. Nous avons donc cherché d'autres méthodes de synthèse.

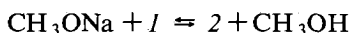
## Discussion et résultats

La méthode qui utilise le carbonate de potassium et le bromure de méthyle pour méthyler le *1*<sup>6</sup> appliquée au chlorure de benzyle ne nous a donné que 10% de rendement en *3* (R = H). En travaillant en milieu fondu et en présence de carbonate de potassium et d'un agent de transfert de phase<sup>7</sup>, le dibenzo-crown-6, dans diverses conditions de durée et de température, nous ne sommes pas arrivés à dépasser les 40% de rendement en *3* (R = H).

On sait que les imino-éthers dérivés des lactames peuvent être alkylés sur l'azote<sup>8,9</sup>.

En faisant réagir l'éthoxy-2  $\Delta$ -1 pyrroline carboxylate de méthyle-5 *14* obtenu par<sup>10</sup> avec le chlorure de benzyle nous ne sommes pas parvenus à obtenir un rendement supérieur à 37% en *3* (R = H).

On peut enfin songer à une réaction d'échange entre le *1* et un alcoolate de sodium pour former le *2*.



La réaction du *1* avec le méthylate de sodium, formé in situ, puis avec le chlorure de benzyle ne nous a donné que 14,3% d'ester *3* (R = H) accompagné d'une quantité importante de méthyl benzyl éther. Le choix d'un autre alcool comme l'éthanol ou l'isopropanol n'améliore guère le rendement qui est probablement dû à l'équilibre ci-dessus. On peut déplacer cet équilibre en diluant avec le benzène. L'addition d'une quantité importante de N-méthyl pyrrolidinone -2 est aussi nécessaire<sup>10</sup> car ce solvant détruit les associations du *2* formées qui ne sont pas attaquées par le chlorure de benzyle.

Nous avons ainsi pu obtenir un rendement de 63% en *3* (R = H). Les caractéristiques des esters que nous avons synthétisés sont rassemblées dans le tableau I; Les rendements indiqués sont ceux obtenus par dispersion du sodium dans le toluène.

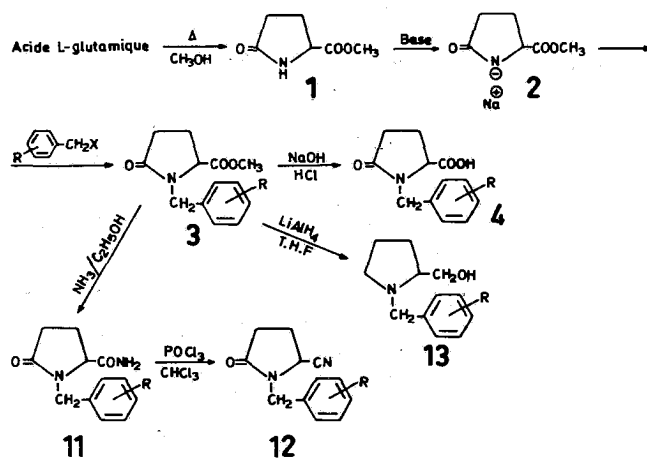
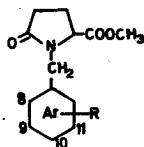





TABLE I : N- (aryl méthyl) pyroglutamates de méthyle



Ar	R	F <sup>o</sup> C	E <sup>o</sup> C;mmHg	Rdt %	FORMULE (f)
H(a)	-	43	104;0,6	73-80	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (b)	H	63	142;0,2	84	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	8 - CH <sub>3</sub>	17-21	149;0,3	85	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - CH <sub>3</sub>	98	157;0,3	88	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	8 - Cl	39-40	168;0,2	75	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> Cl
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (c)	10 - Cl	114	-	79	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> Cl
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - Br	112	-	74	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> Br
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - O - CH <sub>3</sub>	21-22	166;0,1	81	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	9 - CF <sub>3</sub>	58,5	129;0,01	81	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> F <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> (d)	9,10,11-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>			56	
	-	29	156;0,1	72	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S
	-	-	205;0,3	73	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>
	-	73	-	>62	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S

(a): litt. (10); (b): litt. (5): F=61<sup>o</sup>; litt. (4): F=63,5-65<sup>o</sup>, Rdt=73% ;  
(c): litt. (5): F=115<sup>o</sup>; Rdt=71%.

(d): le produit n'a pas été caractérisé, mais saponifié directement en acide.

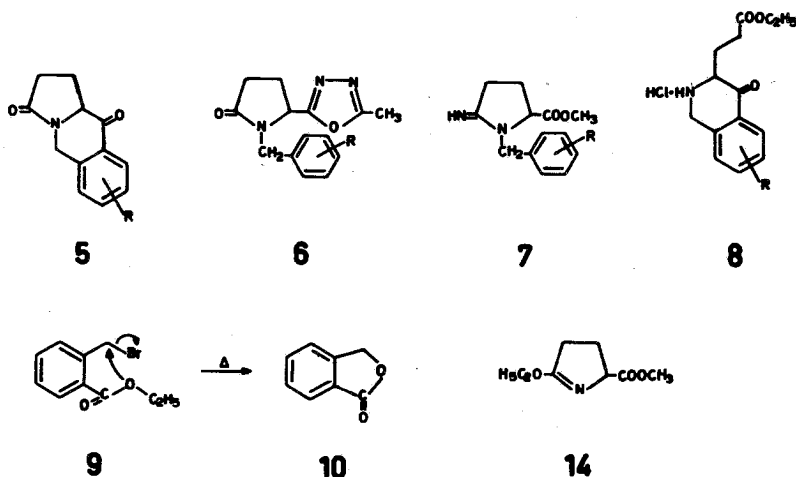
(e): une partie du produit cristallise et est caractérisé; les huiles restantes sont saponifiées en acide et le rendement est calculé sur la somme ester plus acide.

(f): les analyses sont conformes aux valeurs théoriques à ± 0,4%

Différents halogénures de benzyle substitués sur le noyau ne nous ont pas donné les résultats attendus: la cyclisation thermique<sup>11</sup> du bromométhyl benzoate d'éthyle 9 est plus rapide que sa condensation avec le 2 et on obtient le phtalide 10 quantitativement. Par ailleurs, le dérivé sodé 2 arrache un proton méthylénique au chlorure de paranitrobenzyle qui se transforme ainsi en dinitro trans stilbène.

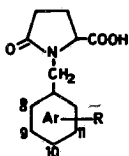
Les acides N-(aryl méthyl) pyroglutamiques sont obtenus quantitativement par saponification des esters précédents. Les caractéristiques des acides sont rassemblées dans le Tableau II.




Les esters 3 réagissent avec les solutions aqueuses de méthylamine ou d'hydrazine pour donner les amides correspondants. L'ammoniaque dans les mêmes



SCHEMA 2

TABLE II : Acides N- (aryl méthyl) pyroglutamiques



Ar	R	F <sup>o</sup> C	Rdt%	FORMULE (F)
H (a)		158	93	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (b)	H	123	90 - 95	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	8 - CH <sub>3</sub>	151	100	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - CH <sub>3</sub>	131	98	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	8 - Cl	148	95	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> Cl
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (c)	10 - Cl	133 - 134	91	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> Cl
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - Br	140	100	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> Br
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10 - OCH <sub>3</sub>	99,5	91	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (d)	9 - CF <sub>3</sub>	118	79	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> F <sub>3</sub>
C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	9,10,11 - (OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	182	80	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>
		109 - 110	95	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub>
		179	77	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>
		185	>62	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S

(a): réf. (10); (b): litt. (4): F:122-123<sup>o</sup>; Rdt 89%; (c): litt. (5): F = 135<sup>o</sup>; (d): litt. (5): F = 119<sup>o</sup>

(f): les analyses sont conformes aux valeurs théoriques à ± 0,4%

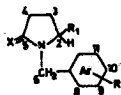
conditions conduit au sel d'ammonium de l'acide. En solution, éthanolique, cette réaction fournit l'amide *II* quantitativement.

Après avoir essayé plusieurs méthodes nous avons obtenu le nitrile *12* par déshydratation de cet amide dans le chloroforme; ce nitrile a été déjà obtenu à partir de la cyano-5 butyrolactone et de la benzylamine<sup>12</sup>. La réduction des esters *3* avec l'hydrure de lithium et d'aluminium fournit les aminoalcools *13* correspondants. Ils sont des composés solubles dans l'eau et présentent des liaisons hydrogènes intramoléculaires qui leur confèrent de faibles températures d'ébullition.

Les hydrogènes du méthylène benzylique des pyrrolidinones et des pyrrolidines synthétisées apparaissent toujours en RMN sous forme d'un quadruplet de type AB, la non équivalence magnétique de ces protons traduisant probablement une diminution de la libre rotation du groupement benzyle provoquée par le groupement en position 5.

Les principales caractéristiques en RMN des produits principaux synthétisés sont rassemblées dans le Tableau III.

TABLE III : Spectre rmn de N- (aryl méthyl) pyrrolidinomes et pyrrolidines\*



Ar	R	R <sub>1</sub>	X	Solvant	H - 3, 4	H - 2	H - 6 * * * δ expérimental	rapport des intensités calculées (31).	rapport des intensités expérimentales.	Aromatiques
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10	OCH <sub>3</sub>	C(=O)OCH <sub>3</sub>	O	CDCl <sub>3</sub>	1,8 à 2,7 (M)	3,95 (T) 3,80 - 4,05 - 4,75 - 5,00 J = 15 Hz Δδ = 0,92	1,71	1,50	6,70 - 6,85 - 7,05 - 7,20 J = 9 Hz
	—	C(=O)OCH <sub>3</sub>	O	CDCl <sub>3</sub>	1,9 à 2,8 (M)	4,50 (T) 4,30 - 4,55 - 5,02 - 5,27 J = 15 Hz Δδ = 0,67	2,06	1,89	7,32 à 8,30 (M)	
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	9	CF <sub>3</sub>	C(=O)OCH <sub>3</sub>	O	CDCl <sub>3</sub>	2 à 2,9 (M)	4,15 (T) 4,10 - 4,35 - 4,95 - 5,20 J = 15 Hz Δδ = 0,81	1,83	1,84	7,65 (S)
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10	OCH <sub>3</sub>	C(=O)OH	O	CDCl <sub>3</sub>	1,9 à 2,9 (M)	4,05 (T) 3,80** - 4,05** - 4,96 - 5,20 J = 14,5 Hz Δδ = 1,13	1,54	1,36	6,75 - 6,90 - 7,10 - 7,25 J = 9 Hz
C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	9,10,11 (O CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	C(=O)OH	O	C D <sub>3</sub> OD	1,9 à 2,7 (M)	4,15 (S) 3,90 - 4,15 - 4,80 - 5,05 J = 15 Hz Δδ = 0,86	1,77	1,67	6,6 (S)	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	C(=O)N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	O	CDCl <sub>3</sub>	1,8 à 2,6 (M)	3,95 (T) 3,65 - 3,90 - 4,85 - 5,10 J=15Hz Δδ=1,17	1,52	1,37	7,25 (S)	
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10	Cl	CH <sub>2</sub> OH	H <sub>2</sub>	CDCl <sub>3</sub>	1,4 à 2,5 (M)	2,5 à 3,2 (M) 3,22-3,45 - 3,92 - 4,15 J = -14 Hz Δδ = 0,66	1,98	1,95	7,40 (S)
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	10	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H <sub>2</sub>	CDCl <sub>3</sub>	1,3 à 2,3 (M)	2,3 à 3,1 (M) 3,13-3,34 - 3,79-4,00 J = 12,5 Hz Δδ = 0,63	1,93	1,92	6,72 - 6,87 - 7,13 - 7,28 J = 9 Hz
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	CH <sub>2</sub> OH	H <sub>2</sub>	CDCl <sub>3</sub>	1,3 à 2,3 (M)	2,3 à 3,1 (M) 3,16-3,38 - 3,88 - 4,16 J = 13 Hz Δδ = 0,69	1,88	1,81	7,30 (S)	

\* Les valeurs sont données en ppm ; l'étalon interne est le TMS ; M = multiplet ; S = singulet ; T = triplet

\*\* Les pics correspondants sont inclus dans des massifs et les valeurs indiquées sont approximatives.

\*\*\* On trouve dans l'ordre la position réelle des bandes, la constante de couplage et la différence des déplacements chimiques calculée au second ordre.

## Partie Expérimentale

Les points de fusion ont été déterminés au bloc Maquenne électrique et ils ne sont pas corrigés. Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer 700. Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Jeol à 60 MHz en utilisant la T.M.S. comme référence interne. Les microanalyses ont été réalisées par le service de microanalyse du C.N.R.S de Thiais.

Le phényl-2 chlorométhyl-4 thiazole est obtenu selon <sup>13</sup>, le triméthoxy-3,4,5 chlorométhyl benzène selon <sup>14</sup>, le chlorométhyl-2 thiophène selon <sup>15</sup>, le para chlorométhyl anisole selon <sup>16</sup>, le chlorométhyl-1 naphthalène selon <sup>17</sup> et le pyroglutamate de méthyle *1* en injectant un grand excès de méthanol dans l'acide pyroglutamique fondu à 150° obtenu in situ par chauffage de l'acide L-glutamique.

### *N-(aryl méthyl) pyroglutamate de méthyle. Méthode I. N-(ortho chlorobenzyl) pyroglutamate de méthyle*

On disperse finement 4,83 g (0,21 atom-gram) de sodium dans 30 ml de toluène anhydre exempt de thiophène. On ajoute 100 ml de benzène anhydre, puis lentement, 30 g (0,21 mole) de pyroglutamate de méthyle dilué dans du benzène. Après disparition du sodium on ajoute 60 ml de N-méthyl pyrrolidinone-2 anhydre contenant 33,8 g (0,21 mole) de chlorure d'ortho chlorobenzyle. On chauffe pendant 2 heures à reflux et laisse reposer une nuit. On ajoute, en refroidissant s'il est nécessaire, 100 ml d'eau, extrait au chlorure de méthylène, lave plusieurs fois les phases organiques à l'eau, sèche sur sulfate de sodium et distille sous pression réduite. L'ester solide est finement broyé et lavé avec un mélange éther-éther du pétrole 1/10.

Rendement : 75,5%.

### *N-(aryl méthyl) pyroglutamate de méthyle. Méthode II. N-benzyl pyroglutamate de méthyle*

On fait réagir 48,3 g de sodium (2,1 atom-gram) avec 200 ml de méthanol anhydre. On additionne sous forte agitation mécanique 300 g (2,1 moles) de pyroglutamate de méthyle en solution dans 1000 ml de benzène anhydre, puis 265,6 g (2,1 moles) de chlorure de benzyle dans 600 ml de N-méthyl pyrrolidinone-2 anhydre. Après réaction pendant 2 heures à reflux, on filtre le chlorure de sodium, évapore les solvants et distille de résidu. Le distillat cristallise dans l'éther.

Rendement : 63%.

### *Ethoxy-2 A-1 pyrroline carboxylate de méthyle-5 13*

Dans une solution de 3,6 g (0,018 mole) de pyroglutamate de méthyle dans 10 ml de chlorure de méthylène anhydre, on ajoute 3,7 g (0,0195 mole) de triéthyl oxonium fluoborate <sup>18,19</sup>. On agite pendant deux heures à la température ambiante puis refroidit à -20° et traite avec une solution saturée de carbonate de potassium. La couche aqueuse est extraite encore une fois au chlorure de méthylène. On sèche sur sulfate de sodium, évapore le solvant et distille sous courant d'azote. On obtient l'imino éther avec un rendement de 66%.



$E_{0,3} = 80^\circ$        $n_D^{20} = 1,4552$   
 IR (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  : 1745 C=O, 1645 C=N.

*Acide N-paraméthoxy benzyl pyroglutamique 4* (R = CH<sub>3</sub>O)

On ajoute 110,3 g (0,457 mole) de N-paraméthoxy benzyl pyroglutamate de méthyle dans une solution de 18,7 g (0,467 mole) de soude dans 450 ml d'eau. On porte à 90° et maintient cette température 1/2 heure. On laisse refroidir et acidifie avec 46,8 ml d'acide chlorhydrique concentré. On filtre l'acide et le recristallise dans un mélange eau-éthanol.

Rendement 93%.

*N-benzyl pyroglutamide 10* (R = H)

Dans une suspension de 300 g (1,29 mole) de 3 (R = H) dans 300 ml de méthanol anhydre, on fait barboter sous agitation magnétique de l'ammoniac jusqu'à saturation (environ 4 heures). On laisse reposer une nuit et sature de nouveau. On répète une troisième fois cette opération, puis porté à 0° pendant 48 heures. Par filtrations, concentrations successives on récupère un rendement quantitatif en amide brut.

F (alcool-éther) 171°; IR (nujol)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  1680 et 1710 (C=O) 3150-3325 (NH)

RMN (deutérométhanol)  $\delta_{\text{ppm}}$  1,8 à 2,7 (multiplet) (4H) 3,70-3,95-4,95-5,20 (quadruplet J = 15Hz) (2H), 4,05 (multiplet) (1H), 7,35 (singulet) (5H).

Analyse pour C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Calculé	Trouvé
C 66,04	65,70
H 6,47	6,54
N 12,84	12,78

*N-benzyl pyrrolidinone-2 carbonitrile-5 11* (R = H)

On additionne au goutte à goutte et sous agitation magnétique 9 ml d'oxychlorure de phosphore à un mélange de 10 g (0,046 mole) d'amide 10 et de 30 ml de chloroforme exempt d'éthanol placé dans un bain froid. On porte à léger reflux pendant 2.30 heures, laisse revenir à la température ambiante et hydrolyse avec 100 ml d'eau sous agitation pendant une heure.

On extrait au chlorure de méthylène, lave avec une solution de bicarbonate de sodium, puis à l'eau et sèche sur sulfate de sodium. Le produit est distillé sous vide et le distillat cristallise dans un mélange éther-éther de pétrole.

Rendement : 81%      F = 21,5-23°

$E_{0,3} = 170^\circ$  IR (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  : 2275 (C≡N), 1700 à 1720 (C=O), 1675,1600,1505, 1450 aromatiques.

Analyse pour C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O

Calculé	Trouvé
C 71,98	71,68
H 6,04	6,09
N 13,99	14,12

*Para chloro benzyl-1 hydroxyméthyl-2 pyrrolidine 12* (R = para chloro)

Dans une suspension de 0,19 mole d'hydrure de lithium et d'aluminium dans 120 ml de tétrahydrofurane anhydre, on ajoute au goutte à goutte et sous refroidissement une solution concentrée de 0,0748 mole d'ester 3 (R = para chloro) dans le même solvant. On porte pendant 5 heures à reflux, détruit l'excès d'hydrure par addition de 7 ml d'eau, 7 ml de soude à 15% et 21 ml d'eau (méthode Steinhart<sup>20</sup>). On filtre le précipité, le lave au chloroforme, sèche, évapore et distille sous pression réduite.

Rendement : 80%  $E_{0,1} = 125^\circ$

IR (film)  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  : 3400 (OH) 1600 et 1500 (aromatiques).

RMN (deutériochloroforme)  $\delta$ ppm 1,4 à 2,5 massif (6H du cycle), 2,5 à 3,2 (multiplet) (1H:H5), 3,22-3,45-3,92-4,14 (quadruplet  $J = 14$  Hz), 3,55 (singulet) (N-CH<sub>2</sub>), 3,60 (1H disparaît par addition d'eau deutérée), 3,65 (doublet  $J = 3$  Hz) (2H: CH<sub>2</sub>O), 7,4 (singulet) (4H).

Analyse pour C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NOCl

Calculé	Trouvé
C 63,86	63,80
H 7,10	7,11
N 6,21	6,22

En travaillant d'une manière semblable on obtient les aminoalcools suivants :

*Ortho chlorobenzyl-1 hydroxy méthyl-2 pyrrolidine 12* (R = ortho chloro)

Rendement 74%  $E_{0,1} = 106 - 108^\circ$ .

*Para méthyl benzyl-1 hydroxy méthyl-2 pyrrolidine 12* (R : para méthyle)

Rendement : 65%  $E_{0,01} = 83^\circ$

*Benzyl-1 hydroxy méthyl-2 pyrrolidine 12* (R = H)

Rendement 80%  $E_{0,1} = 90^\circ$ .

**Summary***Synthesis of N-(aryl methyl) 5-oxo pyrrolidine 2-carboxyliques acids*

The synthesis of N-(aryl methyl) 5-oxo pyrrolidine 2-carboxyliques esters was achieved using 5-oxo pyrrolidine 2-carboxyliques esters, aryl methyl halides and sodium methoxide prepared in situ in presence of N-methyl pyrrolidine diluting with benzene.

*Σύνθεσις των Ν-άρυλο μέθυλο 5-οξο πυρολιδίνιο 2-καρβοξυλικών οξέων*

Η παρασκευή των Ν-άρυλο μέθυλο 5-οξο πυρολιδίνιο 2-καρβοξυλικών εστέρων δεν είχε καταστή δυνατή μέχρις πρό τίνος εν αντιθέσει προς τους ανάλογους Ν-άλκυλο εστέρας που είναι από μακρόν γνωστοί.

Η χρησιμοποίησις των εστέρων αυτών και των παραγώγων των σαν πρώτες ύλες για την σύνθεση νέων ετεροκυκλικών σειρών του τύπου 5 6 7 και 8 ώθησε τους συγγραφείς να βελτιώσουν την υπ' αυτών εφαρμοσθείσα για πρώτη φορά μέθοδο με σκοπό να μπορεί να χρησιμοποιηθή και με μεγάλες ποσότητες πρώτων υλών. Η αντικατάστασις του νατρίου εν διασπορά με μεθανολικό νάτριο παρασκευαζομένου *in situ*, η αραίωσις με βενζόλιο και η παρουσία σημαντικών ποσοτήτων Ν-μεθυλοπυρολιδίνης δίνει αυτήν την δυνατότητα.

**Bibliographie**

1. B. Rigo et N. Kolocouris: *J. Heterocyclic Chem.* publications à paraitre.
2. Seizo Kanao: *J. Pharm. Soc. Japan*, **66**, 4-7 (1946).
3. B. Rigo: (1973) D.E.A. Université des Sciences et Techniques de Lille (1975) Doctorat Ingenieur No 166.
4. E. Campaigne et D.P. Matthews: *J. Heterocyclic Chem.* **12** (2), 391-2 (1975).
5. Ferlux, Fr. demandé 2.273.533, 2 Janvier (1976).
6. *Société d'Etudes et de Recherches Cliniques et Pharmacologiques Fr.* 1.298.571 8 Juillet (1961).
7. M. Fedorynski, K. Wojciechowski, Z. Matacz et M. Makosza: *J. Org. Chem.* **43** (24) 4682-4 (1978).
8. R.E. Benson et T.L. Cairns: *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2115-8 (1948).
9. T. Fujii, S. Yoshifuji et K. Yamada: *Chem. Pharm. Bull.* **26** (7), 2071-80 (1978) et *Chem. Ind. (London)* **4** 177-8 (1975).
10. N. Kolocouris, Thèse d'Etat des Sciences et Techniques de Lille No ordre 247 (1971), et *Bull. Soc. Chim. Fr.* **3**, 1053-60 (1973).
11. Davis et Perkin: *J. Chem. Soc.* **121**, 2204 (1922).
12. Toa Gosei: *Chemical Industry Co. Ltd. Japan* 7322.698 7 Juillet 1973.
13. F.E. Hooper et T.B. Johnson: *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 470-1 (1934) *ibid* **56**, 484-5 (1934).
14. Abdel-Rahman, Mohamed O.: *J. Chem. U.A.R.*, **11** (3) 401-4 (1968); *Chem. Abst.* **71** 30602 f (1969).
15. K.B. Wiberg et H.F. McShane: *Org. Synth. Col. Vol.* **3**, 197.
16. R. Quelet: *C.R. Acad. Sci. Paris* **198**, 102 (1934).
17. O. Grummit et A. Buck: *Org. Synth. Col. Vol.* **3**, 195.
18. Fieser et Fieser: *Reagents for Organic Synthesis Vol 1* p. 1210.
19. H. Meerwein, E. Battenberg, H. Gold, E. Pfeil et G. Willfang: *J. Pract. Chem.* **154** (2), 83 (1940).
20. Référence 18 p. 584.
21. N. Kolocouris, E. Costakis, Ch. Romond, L. Bubreuil, J. Devos, M. Cazin, C. Brunet et J.C. Cazin: *Annales Pharmaceutiques Françaises* **39** No 3 p. 201-213 (1981).

## PREPARATION AND PROPERTIES OF HALOGEN BENZOYL HYDRAZINE Ni(II) COMPLEXES

C. YOURI-TSOCHATZI, C. L. TSIAMIS and G. E. MANOUSSAKIS  
*Department of Chemistry, University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece*

(Received June 23, 1982)

### Summary

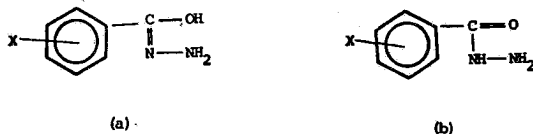
A new series of Ni(II) complexes with *ortho*-, *meta*-, and *para*- halogen (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>) ring monosubstituted benzoylhydrazines (XBAH) has been synthesized and their spectral were studied. Evidence provided by the ir spectra suggests that the benzoylhydrazines act as bidentate ligands with the oxygen (>C=O group) and the nitrogen of the -NH<sub>2</sub> group as the coordination sites. The stoichiometry and conductivity measurements indicate that the complexes are cationic of the general formula Ni(XBAH)<sub>3</sub><sup>2+</sup>. The low-temperature magnetic susceptibility measurements and the electronic spectra suggest that the Ni(II) microsymmetry is octahedral.

**Key Words :** Benzoyl hydrazine Nickel (II) complexes, preparation, properties spectra, magnetic susceptibility.

### Introduction

The discovery that many complexes with aroylhydrazines as ligands have anti-tubercular properties<sup>1</sup> and that have been used for psychotic and psychoneurotic conditions<sup>2</sup> gave new impetus to the study of analogous complexes<sup>3,4</sup>. A review<sup>5</sup> has covered major aspects of the coordination chemistry of substituted hydrazines. Complex formation can take place with these ligands acting as monodentates<sup>6-8</sup> or bidentates<sup>9-16</sup>. Functional substituents, i.e. substituents containing potential donor atoms, usually participate in the formation of stable complexes and in the case of aroylhydrazines, where the carbonyl group is adjacent to nitrogen, the probability of bidentate behaviour is enhanced. The factors influencing coordination with aroylhydrazines have not been fully understood since the conditions of complex formation could have a profound effect as found by Miller and Morton<sup>9</sup>. Paul and others<sup>6</sup> have suggested that aroylhydrazines react as monodentates *via* the carbonyl oxygen whereas Ahmed and Chaudhuri<sup>7</sup> proposed as ligation site the nitrogen bonded to carbon. Other studies are in concordance with results by Sacconi<sup>8</sup> that the ligands coordinate as bidentates. As bidentates it is presumed that they

coordinate by the carbonyl oxygen and the terminal nitrogen atom either in the enolic form<sup>8</sup> (a), or in the keto form<sup>10,11</sup> (b), thus forming five-membered chelate rings each having a planar configuration about the central atom.



There has been no detailed study on the conditions favouring coordination of aroylhydrazines as monodentates or bidentates and existing information suggest<sup>5</sup> that there is dependence both on the metal and the hydrazines themselves.

In this work, some complexes of Ni<sup>2+</sup> with *o*-, *m*-, *p*-, halogen benzoylhydrazines have been prepared and their infrared, electronic and mass spectra were recorded. Their stoichiometry and structure were determined by elemental analysis, spectroscopic data and conductivity measurements.

## Experimental

### Chemicals

*Preparation of halogen benzoylhydrazines* : Halogen benzoylhydrazines were prepared using the general method described elsewhere<sup>17a,b</sup>.

*Preparation of metal complexes* : NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O and Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, A.R. grade were used throughout this work for the preparation of complexes in the following general method: A quantity of the nickel salt (1 mmol) was dissolved in 20 cm<sup>3</sup> of anhydrous ethanol (EtOH) and the solution was added dropwise to 30 cm<sup>3</sup> of anhydrous EtOH containing 4 mmol of halogen benzoylhydrazines (XBAH). The mixture was stirred magnetically at room temperature (25° C) for one hour and then was filtered using a sintered glass filtering funnel. The product was washed with a small amount of cold water and was dried under vacuum. The product obtained was recrystallized by dissolving the crude solid in a small volume of hot anhydrous EtOH.

### Measurements

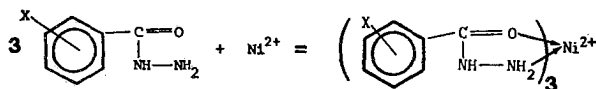
Infrared spectra (4000-250 cm<sup>-1</sup>) of the complexes in Nujol mulls and KBr matrix (concentration ~0,5%) were recorded on a Perkin-Elmer 467 spectrophotometer, calibrated against polystyrene.

Mass spectra were measured on a RMU-61 Hitachi Perkin-Elmer mass spectrometer with a ionization source AT-2P operating at ~70 eV.

Electronic spectra in the region 200-800 nm were recorded at ca 30° C using a Perkin-Elmer model 200 spectrophotometer. Solutions in alcohol were in 10 mm «suprasil» cells fitted with teflon stoppers, with pure solvent in the reference cell. Measurements in the near ir were made on a Zeiss M4QIII spectrophotometer.

## Results and discussion

Fourteen new complexes of nickel(II) have been prepared by reacting *o*-, *m*-, and *p*- halogen benzoylhydrazines (XBAH) with  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in anhydrous ethanol solutions according to the general equation:



where X = F, Cl, Br, I

Attempts to prepare the complexes from aqueous solutions failed, although the presence of small amounts of water in the reacting mixture did not prevent the reaction taking place. As controversy exists over the number of ligands coordinated to the metal ion<sup>10,11</sup>, several batches were prepared in which the mole ratio of the reactants varied from 1:1 to 1:4. In all cases the results of the elemental analyses of the complexes were found to be independent of the mole ratio of the reactants, under the reaction conditions described. The results of elemental analyses and some physical properties are given in Table I.

The analyses indicate that the moles of the anion ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) present were equal to those in the uncoordinated metal ion, so in this case the XBAH behaves as neutral ligand. Further proof of the cationic nature of the complexes were obtained from conductivity measurements<sup>18</sup> and quantitative determination by standard methods<sup>19</sup> of the anion present.

The molar conductivity of the complexes (Table I) was determined in 10% ethanol solution and in the cases of  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{NiCl}_2$  is consistent with 2:1 electrolytes. It is worth noting that the values obtained are somewhat higher than those reported<sup>14</sup> for similar complexes.

The mass spectra of these complexes have some differences relative to the spectra of the ligands but cannot be attached any significance to these differences. The main peaks for the chloro-substituted compounds are listed in Table II. The base peak at  $m/e = 139$  was attributed to the  $\{\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CO}\}^+$  ion in all cases. The peak at  $m/e = 141$  is partly due to the  $^{37}\text{Cl}$  isotope as the ratio of peak intensity in the *o*- and *m*-cases exceeds by far the one corresponding to the  $^{37}\text{Cl} : ^{35}\text{Cl}$  ratio.

### Infrared Spectra

Evidence for the form of existence of the ligands as well as the mode of bonding to nickel(II) is provided by infrared spectroscopy.

The absence of absorption bands at frequencies higher than  $3500 \text{ cm}^{-1}$  indicates that formation of  $-\text{OH}$  in the free ligand does not occur to any significant extent. Similarly, the strong absorption at about  $1660 \text{ cm}^{-1}$  is attributed<sup>14,20b</sup> to the carbonyl group and this further supports the notion that the halogen ring substituted benzoylhydrazines exist in the *keto* form.

The differences observed in the spectra between the free and the coordinated ligand are typical for the entire series. Thus, the bands in the region  $3400\text{-}3250$

TABLE I : Yield, melting point, molar conductivity and elemental analysis of Ni(XBAH)<sub>3</sub><sup>2+</sup> complexes

Compound	Yield	M. Point	Conductivity $\Lambda/S.m^2.mol^{-1}$	Ni%	C %	N %	H %	Cl %
		$^{\circ}C$						
1 Ni(o-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	18	136-140	$257 \times 10^{-4}$	10.1 (10.0)	42.9(42.6)	13.4(14.2)	3.7(3.6)	12.2(12.1)
2 Ni(m-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	38	193-196	$249 \times 10^{-4}$	9.9 (10.0)	42.3(42.6)	13.8(14.2)	3.3(3.6)	12.1(12.1)
3 Ni(p-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	53	263-265	$243 \times 10^{-4}$	10.4 (10.0)	42.5(42.6)	13.9(14.2)	3.9(3.6)	12.4(12.1)
4 Ni(o-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	22	226-228	$250 \times 10^{-4}$	9.34(9.2)	39.6(39.3)	12.8(13.1)	3.4(3.3)	10.9(11.0)
5 Ni(m-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	35	192-194	$275 \times 10^{-4}$	9.2 (9.2)	39.5(39.3)	13.4(13.1)	3.4(3.3)	11.1(11.05)
6 Ni(p-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	51	210-215d	$298 \times 10^{-4}$	9.9 (9.2)	39.0(39.3)	13.0(13.1)	3.2(3.3)	10.8(11.05)
7 Ni(o-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	21	176-178	$263 \times 10^{-4}$	7.5 (7.6)	32.2(32.5)	10.5(10.9)	3.0(2.7)	9.1(9.2)
8 Ni(m-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	37	308-310	$258 \times 10^{-4}$	7.4 (7.6)	32.3(32.5)	10.7(10.9)	2.9(2.7)	9.1(9.2)
9 Ni(p-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	47	210-214	$267 \times 10^{-4}$	7.4 (7.6)	32.4(32.5)	10.9(10.9)	2.8(2.7)	9.0(9.2)
10 Ni(o-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	19	230d	$232 \times 10^{-4}$	6.3 (6.4)	27.9(27.5)	9.3(9.2)	2.5(2.3)	7.7(7.7)
11 Ni(m-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	32	192-194	$257 \times 10^{-4}$	6.3 (6.4)	27.3(27.5)	9.0(9.2)	2.3(2.3)	7.5(7.7)
12 Ni(p-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	49	224-226	$261 \times 10^{-4}$	6.2 (6.4)	27.2(27.5)	9.0(9.2)	2.3(2.3)	7.5(7.7)
13 Ni(m-BrC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	70	193-195	—	7.2 (7.1)	30.0(30.4)	13.3(13.5)	2.2(2.5)	—
14 Ni(p-BrC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CONHNH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	55	208d	—	7.0 (7.3)	31.9(31.5)	10.8(10.5)	2.4(2.6)	—

TABLE II : Mass spectra of (o-, m-, p)-Chlorobenzoylhydrazine and their Ni(II) complexes.

m/e	Relative abundance I %					
	Ligand			Ni(II) complex		
	o-Cl	m-Cl	p-Cl	o-Cl	m-Cl	p-Cl
31	4.7	*	*	53.3	20.6	16.8
50	18.2	9.5	8.3	15.3	14.7	12.5
51	12.3	6.7	4.5	9.9	9.1	7.8
74	9.1	3.0	*	6.0	8.0	*
75	52.9	26.3	21.4	35.0	38.2	21.8
76	13.2	6	5.2	9.4	11.9	*
77	6.2	3	*	6.9	8.1	9.3
111	88.2	65.1	62.1	86.1	79.4	43.7
113	52.9	22.2	19	34.3	4.5	16.1
139	100	100	100	100	100	100
140	41.8	14	*	19.7	23.4	*
141	88.2	60.3	45.5	75.9	76.7	32
142	12.4	4.8	*	6.9	7.7	*
170	83.3	38.4	27.6	52.5	73.5	22.2
172	35.3	12.7	9.3	17.5	23.5	7.2

\* trace

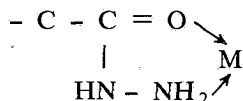
$\text{cm}^{-1}$ , which are associated with the N-H stretching vibration<sup>20</sup>, exhibit a bathochromic shift of *ca*  $30 \text{ cm}^{-1}$  upon coordination and become broader. The lowering of the N-H stretching mode is evidence for bond formation through nitrogen. Evidence for the simultaneous existence of a metal-oxygen bond is provided by the displacement of the «amide I»<sup>22</sup> band. The «amide I» band is associated with a C=O bond deformation and substantial deformation of the C-C bond at the angles CCN, CNN, NCO, CNH so that this vibration is a stretching-deformation type.

This band (the coupled carbonyl absorption) appears at  $\sim 1668 \text{ cm}^{-1}$  in the m- and p- halogen benzoylhydrazines<sup>17</sup> and at  $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$  in the o- ones. Upon coordination the shift is  $25\text{-}40 \text{ cm}^{-1}$  towards lower wave-numbers for the ligands with the halogen in m- or p- position and only about  $10 \text{ cm}^{-1}$  for the rest. Apparently, the effect of o-halogen substitution in benzoylhydrazines<sup>17</sup> is eliminated upon complex formation. In addition to the «amide I» band the «amide II» and «amide III» bands are also observed. These are again coupled vibrations.

The «amide II» band<sup>22</sup> arises primarily from the C-N-N stretching mode and appears at  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ . On chelation this band is shifted only very slightly by



approximately  $1\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ . The «amide III» absorption involving the N-H in-plane deformation and the C-N mode gives a sharp band at  $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ . In the complexes studied this band is shifted appreciably to higher frequencies, sometimes by more than  $60\text{ cm}^{-1}$ . It is also split in two bands, the lower frequency band having slightly smaller extinction coefficient. The bidentate nature of the ligands and bond formation via the carbonyl oxygen and the terminal nitrogen are supported by the normal coordinates analysis<sup>20b</sup> of the model



The model comprises a five-membered ring of  $C_s$  symmetry. Apart from giving insight on the nature of the «amide I» mode, the agreement between experimental results and the calculated values is excellent.

Iskander and coworkers<sup>10,12</sup> suggested that the anion of the nickel (II) salt is coordinated to the metal. In the case of similar complexes with Ni(II) and Cu(II) chlorides, Iskander favours an octahedral structure with two benzoylhydrazine molecules and two chloride anions, the last ones in *trans* position. The use of  $\text{NiSO}_4$  to form the complexes was expected to alter the structure of the molecule, as the  $\text{SO}_4^{2-}$  would coordinate in *cis* positions rather than axial ones. However, the only differences observed in the infrared spectra worth mentioning were the absorptions attributed<sup>23</sup> to the  $\text{SO}_4^{2-}$  moiety indicating that structural changes depending on the anion do not occur.

### Electronic Spectra

The electronic absorption spectra of the halogen benzoylhydrazine nickel(II) complexes were measured in ethanol solution in the region 220-1800 nm. Comparative measurements were made in DMSO to examine the effect of solvent on the energy of the observed transitions. The results are listed in Table III.

The solution spectra show three regions of absorption. In the first region ( $8000\text{-}14000\text{ cm}^{-1}$ ) a weak band  $\tilde{\nu}_1$  ( $\epsilon \sim 11\text{ mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$ ) is seen at  $\sim 9800\text{ cm}^{-1}$  which overshadows a weaker band at  $\sim 13000\text{ cm}^{-1}$ . In the second region ( $14000\text{-}20000\text{ cm}^{-1}$ ) appears a broad band  $\tilde{\nu}_2$  of similarly weak intensity ( $\epsilon \sim 12\text{ mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$ ) which has a maximum at  $\sim 16600\text{ cm}^{-1}$ . Finally in the third region ( $> 20000\text{ cm}^{-1}$ ), a number of intense bands occur. For energy and intensity reasons the first and second regions should be associated with ligand field transitions, whereas the shape of the band envelope in the high energy region suggest a band system rather than a specific transition.

These light blue complexes have at room temperature a magnetic moment of  $\sim 3.5$  B.M. which definitely rules out the presence of square planar divalent nickel<sup>24</sup>. The magnetic moments and the ligand to metal ratio are further indications of octahedral structure which is strongly supported by the low extinction coefficient of the long wavelength bands. Using group theoretical notation the bands can be assigned to transitions that characterize a  $d^8$  system in an octahedral

TABLE III : Electronic transitions and interelectronic repulsion parameter B' values for halogen benzoylhydrazine complexes of nickel (II).

C o m p o u n d	${}^3T_{2g}(F) \leftarrow {}^3A_{2g}(F)$	B'	${}^3T_{1g}(F) \leftarrow {}^3A_{2g}(F)$	${}^3T_{1g}(F) \leftarrow {}^3A_{2g}(F)$	${}^3T_{1g}(P) \leftarrow {}^3A_{2g}(F)$
	$\tilde{\nu}_1/\mu\text{m}^{-1}$	$\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}_2/\mu\text{m}^{-1}$	Calc. $\tilde{\nu}_2/\mu\text{m}^{-1}$	Calc. $\tilde{\nu}_3/\mu\text{m}^{-1}$
Ni(o-FBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.990	962	1.626	1.626	2.787
Ni(m-FBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	970	1.613	1.597	2.768
Ni(p-FBAH) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	980	1.600	1.598	2.782
Ni(o-ClBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	980	1.600	1.598	2.782
Ni(m-CLBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.980	980	1.600	1.617	2.795
Ni(p-ClBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	980	1.600	1.598	2.782
Ni(o-BrBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.962	960	1.587	1.583	2.734
Ni(m-BrBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	970	1.626	1.597	2.768
Ni(p-BrBAH) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.980	980	1.600	1.616	2.795
Ni(o-IBA H) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	950	1.575	1.595	2.740
Ni(m-IBA H) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.990	960	1.626	1.626	2.787
Ni(p-IBA H) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	0.971	980	1.600	1.598	2.782

field. Thus the lowest energy band,  $\tilde{\nu}_1$ , is attributed to the spin allowed parity forbidden transition  ${}^3T_{2g}(F) \leftarrow {}^3A_{2g}(F)$  which determines the quantity  $10 Dq$ . Consequently the higher energy band  $\tilde{\nu}_2$  is assigned to the transition  ${}^3T_{1g}(F) \leftarrow {}^3A_{2g}$ . On the basis of these assignments the position of the  $\tilde{\nu}_3$  band, corresponding to the transition  ${}^3T_{1g}(P) \leftarrow {}^3A_{2g}$ , is estimated to lie at  $28000 \text{ cm}^{-1}$ . The  $\tilde{\nu}_3$  band maximum was calculated from standard equations<sup>25</sup>.

The  ${}^3T_{1g}(P) \leftarrow {}^3A_{2g}$  transition leads to the assessment of several spectroscopic parameters which offer some understanding of the electronic structure of this series of compounds. Thus, the Racah parameter  $B'$  has a value of  $\sim 980 \text{ cm}^{-1}$ .

The value of  $B'$  indicates that the delocalization is greater than that caused by the coordinated ammonia and that the average interelectronic repulsion of the metal d electrons is quite significant owing to the coordination via the oxygen atoms. Although the broadness of the bands does not allow any great emphasis to be put on the band maxima, nevertheless the influence of the coordinated atoms can be assessed from the rule of average environment<sup>26a,b</sup>. It is necessary as starting point to make two assumptions: a) that the effect of the coordinated oxygen atoms on the ligand-field strength is equal to that in  $\text{Ni}(\text{OH}_2)_6^{2+}$ , i.e.  $B' = 870 \text{ cm}^{-1(27)}$  b) similarly the coordinated  $-\text{NH}_2$  group causes the same ligand-field splitting as does  $\text{NH}_3$  in  $\text{Ni}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ , i.e.  $B' = 1080^{28} \text{ cm}^{-1}$ . The rule of average environment gives  $x \sim 3$ . The above simplistic treatment suggests that, at first approximation, the substitution of a hydrogen atom in ammonia by the  $\text{X}-\Phi-\text{CO}-\text{NH}$  moiety induces a perturbation of the field effects. Subsequently, this perturbation is balanced by the changes in electronic structure of the coordinated oxygen atom when the two bonded hydrogens are replaced by the  $\text{X}-\Phi-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHNH}_2$  group. However, it should be borne in mind that electronic effects do not always account<sup>29</sup> for the ligand-field splitting ability of the ligands. As was pointed out by Drago and coworkers<sup>30</sup>, the  $Dq$  values for various amides with  $\text{Ni}(\text{II})$  do not correlate well with the inductive order for groups bonded to carbon or the amide nitrogen. In fact, it was established that steric hinderance is the predominant factor in determining the  $Dq$  value of the amide ligand to such an extent that overshadows the inductive effects. Unfortunately, the presence of the bulky phenyl group in all the ligands employed makes difficult the assessment of the relative contribution of these effects to the observed  $Dq$  values.

The present results are consistent with the findings of Gogorishvili and others<sup>16</sup> for analogous complexes for which they suggested coordination number six with three neutral ligands forming a cationic complex. The ligands are in the *keto* form as the conditions for complex formation do not favour the enolic form. The enolic form is prominent when complexes are formed<sup>14</sup> at high pH values ( $\text{pH} > 10$ ). Further support on the form of the ligands comes from a study<sup>17c</sup> on the hydrolysis on halogen benzoylhydrazines.

### Magnetic Susceptibility

The magnetic moments,  $\mu_{\text{eff}}$ , of the halogen benzoylhydrazine complexes of  $\text{Ni}(\text{II})$  measured at room temperature are given in Table IV. In the case of the chloro-substituted complexes the temperature covered ranged from 5 K to 300 K in

order to amplify indications concerning the structure of these complexes. Until now, to the best of our knowledge, no low temperature susceptibility measurements were reported for this class of compounds. The results for the p-chloro- are listed in Table IV.

TABLE IV : Variation of molar susceptibility values  $\chi_M$  with temperature for the Ni(XBAH)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> complex

T/K	$\frac{\chi_M * 10^9}{m^3 \cdot mol^{-1}}$	$\frac{1/\chi_{Ni} * 10^{-3}}{m^3 \cdot mol^{-1}}$	T/K	$\frac{\chi_M * 10^9}{m^3 \cdot mol^{-1}}$	$\frac{1/\chi_{Ni} * 10^{-3}}{m^3 \cdot mol^{-1}}$
5.5	2706	369	51.0	317	3124
5.7	2601	384	57.3	293	3380
5.8	2572	388	63.2	272	3637
6.0	2518	397	68.9	253	3904
6.4	2377	421	75.7	234	4221
6.9	2255	443	83.7	213	4641
7.3	2113	473	91.5	198	4991
7.8	2009	497	100.3	183	5378
8.5	1839	543	107.1	176	5561
9.3	1695	589	111.3	170	5782
10.2	1472	687	122.2	158	6235
11.3	1420	703	134.1	147	6668
12.3	1308	763	147.0	137	7161
13.6	1190	838	161.8	128	7647
14.7	1108	900	174.7	121	7998
15.9	1018	982	195.3	110	8793
17.5	920	1084	215.3	104	9310
19.2	884	1181	235.1	95	10098
21.0	770	1295	256.7	91	10552
22.0	702	1418	274.3	85	11197
27.7	638	1560	294.3	80	11865
29	574	1734			
33.9	531	1872			
36.5	436	2278			
39.5	404	2455			
43.5	370	2680			
47.1	347	2812			

The diamagnetic susceptibility of the ligand  $\chi_L$  was measured at 297 K and the value obtained was in good agreement with that derived from Pascal's constants<sup>31</sup>. It was assumed that  $\chi_L$  remained unchanged over the temperature range examined. However, corrections for the susceptibility changes of the sample holder were applied.

Plots of the inverse of Ni(II) molar susceptibility  $1/\chi_{Ni}$  ( $\chi_{Ni}^P = \chi_{Ni} - \chi_L$ ) against temperature (Fig. 1) gives curves similar to those in the literature<sup>32</sup> for octahedral  $^3A_{2g}$  ground state arising from  $^3F$  free ion ground term. The plot follows a Curie law up to about 100 K, but as the temperature is raised, the levels for which there are first- and second-order Zeeman effects become more accessible and T.I.P. contribution is more noticeable as it is shown by the pronounced curvature. It appears

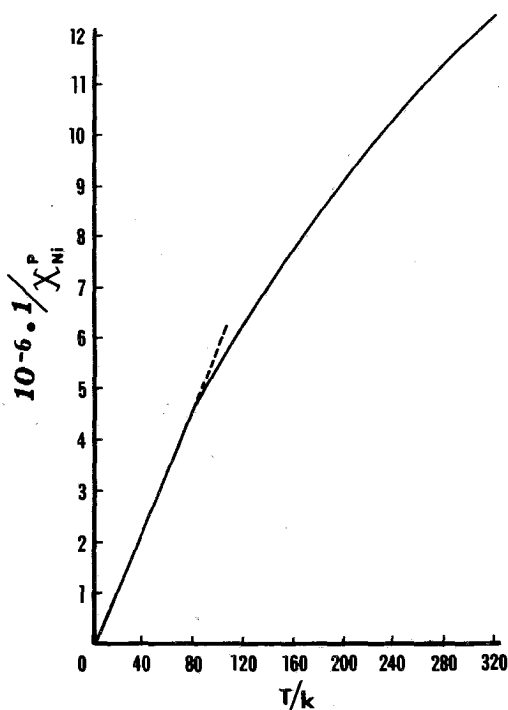


FIG. 1 : Plot of  $1/\chi_{Ni}^P$  against temperature for  $Ni(XBAH)_3Cl_2$  complexes.

that in the case of these complexes there might be a substantial «mixing-in» with the higher-lying  $^3T$  states which arise from the  $^3F$  term as it is evidenced by the unusually high value of the magnetic moment  $\mu \sim 3.5$  BM. Calculation of the T.I.P. gives a value ranging from  $Na = 0.12 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$  at 150 K to about  $0.18 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$  at 300 K. This variation may be due to the (uncorrected) value used for the susceptibility,  $\chi_L$ , of the ligand.

## Conclusions

Nickel (II) forms cationic complexes with halogen benzoylhydrazines. Evidence from the infrared spectra imply that the ligands react in their keto-form and that the ligation sites are the carbonyl oxygen and the nitrogen of the amide group resulting in five membered chelate rings. The electronic spectra and the magnetic susceptibility of these complexes can be interpreted on the basis of octahedral structure.

## Περίληψη

*Παρασκευή και ιδιότητες των συμπλόκων Ni(II) με αλογο-βενζοϋλοϋδραζίνη*

Παρασκευάσθηκε μια σειρά νέων συμπλόκων του Ni(II) με *ορθο-*, *μετα-*, και *παρα-*μονοαλογονομένες (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>) στον αρωματικό δακτύλιο βενζοϋλοϋδραζίνες (XBAN). Από τα δεδομένα των φασμάτων IR συνάγεται ότι οι βενζοϋλοϋδραζίνες δρουν σαν διδραστικά ligands χρησιμοποιώντας το οξυγόνο (ομάδα >C=O) και το άζωτο της ομάδας -NH<sub>2</sub> για την συναρμογή. Η στοιχειομετρία των ενώσεων και οι τιμές της αγωγιμότητας δείχνουν ότι τα σύμπλοκα είναι κατιονικά και ότι έχουν το γενικό τύπο Ni(XBAN)<sub>3</sub><sup>2+</sup>. Συνδυασμός των προηγούμενων ενδείξεων με τα δεδομένα από τα ηλεκτρονικά φάσματα και τη μαγνητική επιδεκτικότητα οδηγούν στην παραδοχή ότι η μικροσυμμετρία των συμπλόκων είναι οκταεδρική.

## References

1. a) W.O. Foye and R.N. Duvall, *J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, **47**, 285 (1958).  
b) K. Nagano, H. Kinoshita and A. Hirakawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 1198 (1964).
2. J.H. Biel, A. Horita and A.E. Drukker, *Psycho Pharmacological Agents* Vol. I., Ed. M. Gordon, Academic Press, N.Y., 1964.
3. J. Cymerman-Graig, D. Willis, S.D. Rubbo and J. Edgar, *Nature*, **176**, 34, (1955).
4. R.J. Baker, S.C. Nyburg and J.T. Szymanski, *Inorg. Chem.*, **10**, 138, (1971).
5. J.R. Dilworth, *Coord. Chem. Rev.*, **21**, 29, (1976).
6. R.C. Paul and S.L. Chadha, *Spectroch. Acta*, **23 A** 1249, (1967).
7. A.D. Ahmed and N.R. Chaudhuri *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 189, (1971).
8. L. Sacconi, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4503, (1952).
9. J.D. Miller and D.S. Morton, *Inorg. Nucl. Chem. Letters*, **11**, 1 (1975).
10. R.M. Issa, M.F. El-Shazly and M.F. Iskander, *Z. Anorg. allg. Chem.*, **354**, 90, (1967).
11. Yu. Ya. Kharitonov and R.I. Machkhoshvill, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **16**, 1438, (1971).
12. M.F. Iskander, S.E. Zayan, M.A. Khalifa, and L. El-Sayed, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **36**, 551, (1974).

13. L. El-Sayed, M.F. Iskander, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **33**, 435, (1971).
14. a) P.I. Shmanko and S.A. Butsko, *Zhur. Fizich. Khim.*, **49**, 512 (1975).  
b) P.I. Shmanko, N.V. Gerbeleu and S.S. Butsko, *Zhur. Neorg. Khim.*, **20**, 2408, (1975)
15. A.A. Poepf' and V.A. Shchukin, *Zhur. Anal. Khim.*, **29**, 1008 (1974).
16. P.V. Gogorishvili, Yu. Ya. Kharitonov, M.V. Karkarashvili and R.I. Machkhoshvili, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **14**, 1525, (1969).
17. a) G.E. Manoussakis, D.A. Haristos, C.E. Youri, *Chim. Chron.* **1**, 182, (1972).  
b) G.E. Manoussakis, D.A. Haristos and C.E. Youri, *Can. J. Chem.*, **51**, 811, (1973).  
c) D.A. Haristos, PhD Thesis, Aristotelian Univ. of Thessaloniki, 1979.
18. W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.*, **7**, 81, (1971).
19. A. Vogel, *Quantitative Inorganic Analysis*, Longmans, London, 1964, p. 449, p. 460.
20. a) Yu. Ya. Kharitonov, R.I. Machkhoshvili, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **16**, 638, (1971).  
b) Yu. Ya. Kharitonov, R.I. Machkhoshvili, P.V. Gogorishvili and M.V. Karkarashvili, *Russ. J. Inorg. Chem.*, **17**, 1059, (1972).
21. Yu. Ya. Kharitonov and R.I. Machkhoshvili, *Zhur. Neorg. Khim.*, **16**, 1203, (1971).
22. L.J. Bellamy, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Vol. 1, 3<sup>rd</sup> Ed., Chapman and Hall, London, 1975.
23. S.D. Ross *Inorganic Infrared and Raman Spectra*, McGraw-Hill, London (1972).
24. B.N. Figgis and J. Lewis, *Prog. Inorg. Chem.*, **6**, 37, (1964).
25. R.S. Drago, *Physical Methods in Inorganic Chemistry*, Reinhold, N.Y., 1965, p. 410.
26. a) C.J. Ballhausen, *Introduction to Ligand Field Theory*, Mc Graw-Hill, 1962, p. 261.  
b) B.N. Figgis, *Introduction to Ligand Fields*, Interscience, N.Y., 1966, p. 236.
27. *ibid.*, p. 220.
28. A.B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 1968, p. 334.
29. C.L. Krahanzel and S.C. Grenda, *Inorg. Chem.*, **4**, 1037, (1965).
30. R.S. Drago, D.W. Meek, M.P. Joesten and L.La Roche, *Inorg. Chem.*, **2**, 124, (1963).
31. J. Lewis and R. Wilkins, Ed., *Modern Coordination Chemistry*, Interscience Publ. New York, 1960.
32. F.E. Mabbs and D.J. Machin, *Magnetism and Transition Metal Complexes*, Chapman and Hall, London, 1973.

---

## Short Papers

---

*Chimika Chronika, New Series, 11, 331-336 (1982)*

### USE OF ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY IN DETERMINATION OF METAL IONS IN METAL ION-EXCHANGED ZEOLITES

N.P. EVMERIDES, J. DWYER

*University of Manchester Institute of Science and Technology, P.O. Box 88, Sackville Street, Manchester, M60 1QD.*

(Received September 7, 1981)

#### Introduction

Atomic Absorption Spectrometry offers a rapid, accurate method for determination of metallic elements. One of the main problems which is widely discussed in the literature is the extent of severity of analytical interferences.

Chemical interferences arise when the dried salt formed in the flame process does not dissociate at the flame temperature, thus reducing the amount of ground state metal atoms. Examples of this are the silica interference in determination of Fe, Mn, and Ca<sup>1</sup>; and the presence of phosphate which reduces the absorption of zinc<sup>2</sup>. Matrix interferences have also been reported<sup>3,4</sup>. Furthermore, molecular absorption occurs when molecular species formed in the flame absorb some of the incident light<sup>5</sup>. Finally ionization interferences have been reported<sup>6,7,8</sup>.

Metal ion exchanged zeolites consist of SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and the exchanged metal ion or ions.

In cases when the metal ion is Fe(III) or Fe(II) Ca(II) or Mn(II) silica is found to interfere. Furthermore matrix interferences can also be a factor in the quantitative analysis of zeolites by AAS.

The determination of Fe(III) in zeolites by AAS was found previously to be inadequate<sup>9</sup>.

These points led us to investigate the possibility of using AAS to provide a quick and accurate method for the analysis of metal ions in zeolites.



## Experimental

Fe(III), and Cu(II) ion exchanged zeolites of type A and X were investigated. The Fe(III) and Cu(II) ions were exchanged for Na(I) in the X type zeolites, and for Na(I) and Ca(II) in the A type zeolites.

Atomic Absorption Spectroscopy was used to determine Na(I) and Fe(III) or Na(I) and Cu(II) in the X type exchanged zeolites. In the A type exchanged zeolites, Na(I), Ca(II) and Fe(III) or Na(I), Ca(II) and Cu(II) coexisted. The Fe(III) or Cu(II) were determined by AAS and by colorimetry, and the sodium was determined by flame photometry and AAS.

### *Apparatus*

All results were obtained with a Perkin-Elmer Model 403 atomic absorption spectrophotometer.

### *Reagents*

Standard solutions of copper and iron were prepared by dissolving the pure metals in the minimum quantity of nitric acid and then diluted appropriately with distilled water.

A standard solution of sodium ions was prepared from sodium chloride and the standard solution of calcium ions was prepared as follows. A 24% solution of NaCl ( $5 \text{ cm}^3$ ) was mixed with a 17.4% solution of  $\text{LaCl}_3$  ( $5 \text{ cm}^3$ ) in nitric acid and the proper amount of Ca(II) was added. The resulting solution was diluted to  $100 \text{ cm}^3$  with distilled water. A second standard solution of calcium was prepared similarly but the dilution was carried out using a «blank» solution prepared by treating sodium X with a solution of hydrofluoric acid (40% w/w ex Merck) and concentrated sulphuric acid (Analar).

### *Flame characteristics*

An air/acetylene flame was used for the determination of Fe(III), Cu(II) and Na(I), and an  $\text{N}_2\text{O}$ /acetylene (5/2) with burner height (red feather) 6 mm was used for the determination of Ca(II).

### *Method*

A sample of zeolite (c.a. 0.5g) was dried in an oven for an hour at  $550^\circ\text{C}$  in a platinum crucible fitted with lid. The dry material was moistened with a few drops of distilled water. Then concentrated sulphuric acid ( $3 \text{ cm}^3$ ) was added and 40% HF ( $10 \text{ cm}^3$ ). The lid was placed on the crucible and the crucible was heated on a steam bath overnight to convert all the Si to  $\text{SiF}_4$ . The lid was then removed and the crucible was heated until  $\text{SO}_3$  fumes were observed. Then distilled water was added and the heating continued until most of the residue dissolved. The whole was then transferred from the crucible to a beaker and dissolved in distilled water.

Further dilution with distilled water was made so that the concentration of the metal ion was between 2 and 2.5 ppm.

## Results and discussion

Iron or copper and sodium or calcium were determined using atomic absorption spectrometry (AAS). To provide a check on results by AAS, standard colorimetric<sup>10</sup> methods were used to determine Fe(III) and Cu(II) and flame photometry to determine Na(I). However, the flame photometric results were variable and not very suitable as a check on AAS.

TABLE I : Comparison of Atomic Absorption and colorimetric methods for determination of Fe(III) and Cu(II) in zeolites A and X.

Zeolite Sample	Results mg/g	
	Atomic Absorption	colorimetry
CaFe5A (1)	5.75 ± 0.09	5.64 ± 0.07
(2)	11.45 »	10.90 »
(3)	13.8 »	13.65 »
(4)	27.1 »	27.00 »
(6)	19.4 »	17.90 »
CaCu5A (1c)	11.4 ± 0.12	11.83 ± 0.00
(1c)	11.42 »	11.83 »
(2c)	26.6 »	27.5 »
(3c)	56.5 »	55.4 »
(4w)	103.0 »	116.9 »
(3d)	17.2 »	16.7 »
(4d)	28.5 »	28.5 »
(5d)	32.0 »	32.4 »
NaFe13x(1)	8.45 ± 0.09	9.02 ± 0.07
(2)	23.85 »	21.75 »
(3)	33.25 »	28.30 »
(4)	37.35 »	37.50 »
(J)	100.10 »	100.00 »
NaCu13x(1)	13.95 ± 0.12	14.05 ± 0.00
(2)	28.40 »	27.70 »
(3)	64.70 »	61.0 »
(4)	105.1 »	100.05 »
(5)	121.6 »	119.8 »

Table I shows compared results for Fe(III) and Cu(II) using atomic absorption spectrometry and colorimetric methods. In the colorimetric analyses Fe(III) was complexed with 4, 7-diphenyl -1, 10-phenanthroline and Cu(II) with neocuproine. Agreement between the two methods is excellent in the majority of cases.

A measure of the agreement between the determinations of Fe(III) and Na(I) or Ca(II); Cu(II) and Na(I) or Ca(II), can be obtained by summing the concentrations expressed as a percentage exchange. The percentage exchange should sum to 100%.

TABLE II : Ions exchanged (%) expressed as equivalent to unit cell.

	Fe(III) or Cu(II) (a)	Na(I) (a)	Ca(II) (a)	TOTAL
CaA	—	25.82	75.0	100.82
CaFe5A (1)	4.26	19.35	69.5	93.0
CaFe5A (2)	8.49	17.93	76.0	102.5
CaFe5A (3)	10.23	16.25	70.5	96.—
CaFe5A (4)	20.80	13.42	68.2	102.4
CaFe5A (6)	14.36	12.97	72.5	100.0
NaCu5A (1c)	5.35	19.70	75.5	100.5
(1c)	5.36	19.43	73.5	98.3
(2c)	12.50	16.25	72.5	101.2
(3c)	26.50	10.86	61.0	98.4
(4w)	48.35	7.58	53.0	108.9
(3d)	8.07	14.88	70.5	93.5
(4d)	13.40	11.60	70.3	95.3
(5d)	15.00	18.10	79.5	112.6
Na13x		94.0		94.0
NaFe13x (1)	6.86	100.0		106.86
(2)	19.40	80.6		100.0
(3)	27.00	77.7		104.7
(4)	30.35	63.65		94.0
(J)	81.40	21.30		102.7
NaCu13x(1)	7.15	87.0		94.15
(2)	14.57	77.0		91.60
(3)	33.10	60.25		93.40
(4)	53.80	48.20		102.0
(5)	62.35	40.90		103.25

(a) Determined by atomic absorption.

Data in Table II show that the summations vary between 90% and 110%. Aside from any errors in determination, particularly of Na(I) or Ca(II) low results could arise by exchange of Na(I) or Ca(II) by protons and high results by occlusion of Fe(III) or Cu(II) salts.

When Na(I) or Ca(II) comprise the majority of the zeolitic cations the percentage exchange in most cases sums to less than 100% total which suggests that low results might be related to difficulty in accurate determination of sodium and calcium ions perhaps due to interference of aluminium in the AAS measurements.

Fitting between colorimetric and Atomic Absorption measurements is shown in Fig. 1, for Cu(II) ion-exchanged zeolites. Similar plots for Fe(III) ion-exchanged

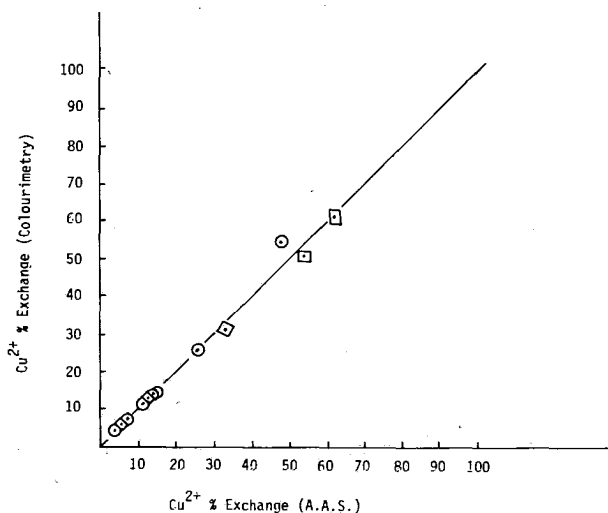


FIG. 1 : Correlation between colorimetric and atomic absorption methods for determination of copper in Ca Cu<sub>5</sub>A (○) and in Na Cu<sub>13</sub>x (□) zeolites.

zeolites gave a linear equation fit :

$$y = 1.0x - 0.1$$

where  $y = \%Fe(III)$  ion-exchange by colorimetry.

$x = \%Fe(III)$  ion-exchange by AAS

with correlation coefficient of 0.998.

Plots of %Cu(II) vs %Na(I) Exchange and %Fe(III) vs %Na(I) exchange treated statistically for linear relationships gave best fit with the following equations :

$$\%Cu(II) \text{ exchange} = -1.11x + 103.00$$

$$\%Fe(III) \text{ exchange} = -0.97x + 99.41$$

respectively where  $x = \%Na(I)$  exchange.

---

## Abstract

A method for the determination of iron, copper, calcium and sodium in zeolites by Atomic Absorption Spectrophotometry is described. The zeolite is freed from silicon by the use of hydrofluoric acid and the cations, in aqueous solution, are determined by Atomic Absorption Spectrophotometry. Agreement with colorimetric methods used for determination of Fe(III) and Cu(II) is excellent. The determination of sodium and calcium was found to be fairly good when taking the total amount of metal ion exchanged into the zeolites as a criterion.

## Περίληψη

*Ποσοτικός προσδιορισμός μεταλλοϊόντων εναλλαχθέντων εντός ζεολίθων δια χρήσεως της μεθόδου ατομικής απορροφήσεως*

Μια μέθοδος προσδιορισμού σιδήρου, χαλκού, ασβεστίου και νατρίου σε τεχνητούς ζεολίθους, περιγράφεται δια της μεθόδου της Φασματομετρίας Ατομικής Απορροφήσεως. Οι ζεόλιθοι ελευθερούνται από το Si δια της μεθόδου  $H_2SO_4$ -HF και τα κατιόντα, εις υδατικό διάλυμα, προσδιορίζονται φασματομετρικώς δια της τεχνικής της ατομικής απορροφήσεως. Η ακρίβεια της μεθόδου δια τον προσδιορισμόν του Fe(III) και Cu(II) καταφαίνεται δια της συγκρίσεως των αποτελεσμάτων με αυτά της χρωματομετρικής μεθόδου. Κριτήριο της ακριβείας του προσδιορισμού Na(I) και Ca(II) ελήφθη το ποσοστόν % ιοντοεναλλαγής το οποίον πρέπει, δια τα υπολοιπούμενα αρχικά ιόντα και τα νεοεισερχόμενα ιόντα, αθροιζόμενο να είναι 100 %.

---

## References

1. J.A. Platte and V.M. Marey: *At. Absorption Newslett.*, **4**, 289 (1965).
2. K. Fuwa, P. Puledo, R. McKay and B. Vallee: *Anal. Chem.*, **36**, 2407 (1964).
3. W. Reuter, IBM Tech.Rep. RC 1796, Research, Yorktown Heights, N.Y., April 1967.
4. B.W. Barnett: *Anal. Chem.*, **44**, (1972).
5. S.R. Koirtyohan and E.G. Pickett: *Anal. Chem.*, **38**, 585 (1966).
6. J.B. Willis: *Spectrochim. Acta*, **16**, 259 (1960).
7. J.B. Willis: *ibid*, **16**, 551 (1960).
8. P.E. Paus: *Anal. Chim. Acta*, **54**, 164 (1971).
9. J. Dewing, Private communication.
10. International Series of Monographs in Analytical Chemistry. Vo. 32, A. Schilt, Analytical Applications of 1,10-Phenanthroline and Related Compounds, Pergamon Press, Int. (1969) p. 56, 71.