

**1/84**

CMCRCZ 13 (1), 1-68 (1984)

**XHMIKA XPONIKA**

NEA ΣΕΙΡΑ

**CHIMIKA CHRONIKA**

NEW SERIES

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

MANAGING COMMITTEE

Irene DILARIS, Georgia MARGOMENOU-LEONIDOPOULOU, George PETROUTSOS,  
Panayotis PROUNTZOS, Maria SABATAKOU

Ex. officio Members: Theodoros ARGIRIOU (Repr. Gen. Secretary of G.C.A.),  
Panayotis PAPAPOPOULOS (Treasurer of G.C.A.).

EDITORS - IN - CHIEF

I. DILARIS, 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*

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. GEORGATZOS

*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. JANNAKOUDAKIS

*Phys. Chem., Univ. Salonica*

V. KAPOULAS

*Biochemistry, Univ. Ioannina*

M.I. KARAYANNIS

*Anal. Chem., Univ. Ioannina*

N. KATSANOS

*Phys. Chem., Univ. Patras*

A.KEHAYOGLOU

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

A. KOSMATOS

*Org. Chem., Univ. Ioannina*

S.B. LITSAS

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

G. MANOUSSAKIS

*Inorg. Chem., Univ. Salonica*

I. MARANGOSIS

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

S. MYLONAS

*Org. Chem., 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. PAPAPOPOULOS

*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. SKALOS

*Microanalysis Tech. Univ. Athens*

G.A. STALIDIS

*Phys. Chem., Univ. Salonica*

Ch. STASSINOPOULOU

*N.R.C. «Democritos», Athens*

A. STASSINOPOULOS

*Argo AEBE Athens*

A. STAVROPOULOS

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

C. THOMOPOULOS

*Food Techn., Tech. Univ. Athens*

I.M. TSANGARIS

*Inorg. Chem., Univ. Ioannina*

G.A. TSATSAS

*Pharm. Chem., Univ. Athens*

A.K. TSOLIS

*Chem. Technol., Univ. Patras*

A. VALAVANIDIS

*Org. Chem., Univ. Athens*

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*

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 28 U.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 Χαμακιώτης, Κάνιγγος 27, Αθήνα (147).

CONTENTS

Physicochemical laws of biological transport ( <i>a review in Greek</i> ) by V.M. Kapoulas and D.K. Tsoukatos .....	3
The use of quadrupole and magnetic mass spectrometers for purity analysis of polyvinylchloride ( <i>in Greek</i> ) by M.K. Statheropoulos .....	27
Reversed-phase high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines in eggs ( <i>in English</i> ) by N.A. Botsoglou, V.N. Vassilopoulos and D.C. Kufidis .....	37
Investigation of the electrochemical behaviour of nitrobenzoic acids at carbon fibre and mercury electrodes ( <i>in English</i> ) by V. Missaelidis, E. Theodoridou and D. Jannakoudakis .....	45
Mechanism of photochromism and thermochromism of some salicylidenedehydroabietylamines and salicylidene-6-aminomethyldehydroabietates ( <i>in English</i> ) by E. Hadzoudis and J. Argyroglou .....	57

---

## REVIEW

---

*Chimika Chronika, New Series, 13, 3-26 (1984)*

### ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΙ ΝΟΜΟΙ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

B.M. ΚΑΠΟΥΛΑ, Δ.Κ. ΤΣΟΥΚΑΤΟΥ

*Εργαστήριο Βιοχημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*

(Ελήφθη 22 Σεπτεμβρίου 1982)

#### Περίληψη

Στην εργασία αυτή επισκοπούνται οι φυσικοχημικοί νόμοι της βιολογικής μεταφοράς. Ειδικότερα στην διαπραγμάτευση της «μεταβολικά συζευγμένης μεταφοράς» με όρους της θερμοδυναμικής των μη αντιστρεπτών διεργασιών συνάγεται η σχέση

$$A_o = \frac{-T(L_{21}/L_{22})}{L_{11} - (L_{12}/L_{22})} V_{ch}$$

που συνδέει τη συγγένεια  $A_o$  μιας ουσίας  $O$  γύρω από τη μεμβράνη με τη ταχύτητα  $V_{ch}$  μιας μεταβολικής πορείας στην οποία η ουσία  $O$  δεν συμμετέχει άμεσα. Η σύζευξη γίνεται μέσω των φαινομενολογικών συντελεστών  $L_{11}$ ,  $L_{22}$  και του διαγώνιου συντελεστή  $L_{12}$ .

Η σχέση αυτή αποτελεί και τη θερμοδυναμική βάση για την εξήγηση του όρου «ενεργός μεταφορά», που γίνεται αμέσως μετά, δείχνοντας τελικά ότι η χημική συγγένεια γύρω από ένα πολυφασικό σύστημα, όπως οι βιολογικές μεμβράνες, είναι μια ανυσματική παράμετρος.

#### «Φυσικοχημικοί νόμοι της βιολογικής μεταφοράς»

Η μεταβολική δραστηριότητα του οργανισμού αποτελείται από τη μια μεριά από χημικές αντιδράσεις δηλαδή διαδικασίες ανακατανομής των οργανικών χημικών δομικών μονάδων και απ' την άλλη από διαδικασίες μεταφοράς. Δηλαδή μετατόπιση ιόντων και μορίων από ένα σημείο προς ένα άλλο.

Οι διαδικασίες βιολογικής μεταφοράς πραγματοποιούνται σε πολυφασικά συστήματα με ειδικό ρυθμιστικό για το μεταβολισμό ρόλο.

Στη βιολογική μεταφορά διακρίνουμε την παθητική, τη διευκολυνόμενη και την ενεργή· τους φυσικοχημικούς τους δε νόμους θα εξετάσουμε στην εργασία αυτή.

#### A. Παθητική Διάχυση

##### I. Ο νόμος του Fick.

Μικρά οργανικά μόρια (1) καθώς και ιόντα και το νερό περνούν διαμέσου της

μεμβράνης λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης στα άκρα της. Μια τέτοια διάχυση καλείται παθητική και υπακούει στον νόμο του Fick.

Με τον όρο «διαπερατότητα» εννοούμε την ταχύτητα μιας τέτοιας παθητικής διάχυσης. Ο συντελεστής διαπερατότητας (Permeability Coefficient)  $P$  είναι ο αριθμός μορίων της διαχεόμενης ουσίας, που περνάει στη μονάδα του χρόνου τη μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, όταν στα άκρα της υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης ίση με τη μονάδα.

Ο  $P$  εξαρτάται τόσο απ' την ικανότητα μιας ουσίας να περνάει μια συγκεκριμένη μεμβράνη, όσο και από το πάχος της μεμβράνης. Αν τώρα το πάχος του «φράγματος» της μεμβράνης είναι γνωστό, μπορούμε να μετατρέψουμε τη διαφορά συγκέντρωσης σε μια «κλίση» (gradient) συγκέντρωσης. Ο συντελεστής διαπερατότητας μπορεί τώρα να αντικατασταθεί απ' τον συντελεστή διάχυσης (Diffusion Coefficient)  $D$ . Με δοσμένο, ότι το πάχος των μεμβρανών

είναι περίπου  $50\text{\AA}$ , τότε είναι:  $P = \frac{D}{50A}$ .

Ο συντελεστής  $P$ , σύμφωνα με τον ορισμό του θα έχει μονάδες:  $\text{ML}^{-2} \text{T}^{-1} \text{M}^{-1} \text{L}^3$  ή  $\text{LT}^{-1}$  δηλαδή μονάδες ταχύτητας π.χ.  $\text{m s}^{-1}$ , ενώ το  $D$  θα είναι  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Όταν η επιφάνεια των κυττάρων δεν είναι γνωστή χρησιμοποιείται για το  $P$  η μονάδα:  $\text{mmoles min}^{-1} / \text{mM gr}^{-1}$  ξηρού βάρους κυττάρων.

Ισχύει<sup>10</sup> (νόμος Fick), ότι ο αριθμός των μορίων, που περνάν την μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης στη μονάδα του χρόνου, είναι απευθείας ανάλογος της διαφοράς συγκέντρωσης ή:

$$\frac{dn}{dt} = -P \cdot A \cdot dC \quad (1.1)$$

ή με τον συντελεστή διάχυσης  $D$

$$\frac{dn}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dC}{dx} \quad (1.2)$$

Ο όρος  $\frac{dn}{dt}$  μας δίνει μια «καθαρή ροή»\* της διαχεόμενης ουσίας δια μέσου της μεμβράνης. Μια τέτοια καθαρή ροή (προς τα μέσα κίνηση μείον προς τα έξω) μπορεί να αναλυθεί σε μια εισροή και μια εκροή, άθροισμα των οποίων είναι η σχέση (1.1).

$$\text{Εισροή: } \frac{dn}{dt} = -P \cdot A \cdot C_0 \quad (1.3) \quad (C_0: \text{εξωτερική συγκέντρωση})$$

$$\text{Εκροή: } \frac{dn}{dt} = -P \cdot A \cdot C_1 \quad (1.4) \quad (C_1: \text{εσωτερική συγκέντρωση})$$

## 2. Θεωρητική περιγραφή της διάχυσης με όρους της θερμοδυναμικής των μη αντιστρεπτών διεργασιών.

Τουλάχιστον τρεις συντελεστές χρειάζονται για την περιγραφή της συμπεριφοράς μιας μεμβράνης απέναντι σε μια ουσία: α) Μια παράμετρος, που θα καθορίζει τη σχέση μεμβράνης/ουσίας. β) Μια άλλη παράμετρος, αυτή του

διαλύτη με τη μεμβράνη. γ) Και μια τρίτη για τη σχέση διαλύτη/ουσίας. Δυνατότητα για τον καθορισμό των τριών αυτών παραμέτρων μας δίνει η θερμοδυναμική των μη αντιστρεπτών διεργασιών. (2,3). Όπως είναι γνωστό, η θερμοδυναμική των μη αντιστρεπτών διεργασιών περιγράφει τις μεταβολές μακριά απ' το σημείο ισορροπίας και σαν μέτρο της εξέλιξής τους παίρνει την ταχύτητα παραγωγής της εντροπίας στη δοσμένη μη αντιστρεπτή διεργασία (όπως π.χ. στη διάχυση μέσα από μια μεμβράνη).

Η σύνδεση της ταχύτητας παραγωγής της εντροπίας με την ταχύτητα διεξαγωγής της μη αντιστρεπτής διεργασίας δίνει τη βάση για την θεωρητική περιγραφή τέτοιων φαινομένων.

Όλες οι διεργασίες μεταφοράς ύλης, θερμότητας, ενέργειας ή και όγκου μπορούν να θεωρηθούν, ότι δημιουργούνται από συγκεκριμένες δυνάμεις, που έχουν σαν συνέπεια μια καθαρή ροή της συγκεκριμένης ποσότητας. Τέτοιες δυνάμεις καλούνται και *κατευθύνουσες δυνάμεις της ροής* (Affinities ή generalized forces ή conjugate forces). Η ποσότητα τώρα της ροής (τουλάχιστον σε μικρές τιμές) είναι ανάλογη της κατευθύνουσας δύναμης, που τη δημιουργεί και ο συντελεστής αναλογίας καλείται *φαινομενολογικός συντελεστής* (Phenomenological coefficient) της συγκεκριμένης ροής.

Έστω, ότι εξετάζουμε τη μεταφορά μιας διαλελυμένης ουσίας  $s$  και του διαλύτη της, του νερού, μέσα από μια μεμβράνη<sup>11</sup>. Αν  $J_V$  η ολική ροή όγκου (διαλύτης + ουσία) με κατευθύνουσα δύναμη τη διαφορά πίεσης  $\Delta P$  στα άκρα της μεμβράνης και  $J_D$  η σχετική ροή ουσίας προς διαλύτη με αιτία τη διαφορά συγκέντρωσης  $\Delta C_s$  στα άκρα της μεμβράνης (σαν κατευθύνουσα δύναμη ο όρος  $RT\Delta C_s$ ), η ταχύτητα παραγωγής της εντροπίας μιας τέτοιας διεργασίας θα είναι:

$$\frac{d_i S}{dt} = J_V \Delta P + J_D RT \Delta C_s \quad (2.1)$$

θα είναι δε:

$$J_V = L_P \cdot \Delta P \quad \text{όταν} \quad \Delta C_s = 0 \quad (2.2)$$

και

$$J_D = L_D \cdot RT \Delta C_s \quad \text{όταν} \quad \Delta P = 0 \quad (2.3)$$

Οι φαινομενολογικοί συντελεστές  $L_P$  και  $L_D$  αντιστοιχούν ο πρώτος στο συντελεστή διαπερατότητας του νερού  $P_W$ . Ο δεύτερος δεν αντιστοιχεί άμεσα σε κάποιο κλασικό συντελεστή από τον νόμο του Fick. Αν τώρα η διαφορά συγκέντρωσης  $\Delta C_s \neq 0$ , δεν θα έχουμε μόνο μία ολική ροή  $J_V$  λόγω της  $\Delta P$ , αλλά και μια επιπρόσθετη ολική ροή λόγω της κίνησης της ουσίας αλλά και του συμπαρασυρόμενου μαζί της νερού για να εξισορροπήσει αυτή τη  $\Delta C_s$ , θα είναι δηλαδή:

$$J_V = L_P \cdot \Delta P + L_{PD} \cdot RT \Delta C_s \quad (2.4)$$

όπου  $L_{PD}$  καλείται διαγώνιος συντελεστής (Interference coefficient ή cross coefficient) και συνδέεται με την αλληλεπίδραση του διαλύτη και της ουσίας. Παρόμοια, αν  $\Delta P \neq 0$  θα έχουμε, λόγω αλληλεπίδρασης, αλλαγή στη σχετική ροή της ουσίας σε σχέση με το διαλύτη, θα είναι δηλαδή:

$$J_D = L_{DP} \cdot \Delta P + L_D \cdot RT \Delta C_s \quad (2.5)$$

όπου  $L_{DP}$  ανάλογος διαγώνιος συντελεστής του  $L_{PD}$ . Μεταξύ τους ισχύει:

$$L_{DP} = L_{PD} \quad (\text{θεώρημα του Onsager}) \quad (2.6)$$

Έχουμε έτσι τους τρεις συντελεστές<sup>12</sup>:  $L_P$ , που καθορίζει τη σχέση μεμβράνης/νερού,  $L_D$ , που καθορίζει τη σχέση μεμβράνης/ουσίας και διαλύτη και τον  $L_{PD}$  ή  $L_{DP}$ , που καθορίζει τη σχέση ουσίας/διαλύτη. Οι τρεις αυτοί συντελεστές περιγράφουν πλήρως τη συμπεριφορά της μεμβράνης. Απ' αυτούς όμως οι  $L_D$  και  $L_{PD}$  προσδιορίζονται δύσκολα πειραματικά. Με ισοδύναμους μετασχηματισμούς (2, 3, 4), μπορούμε να περάσουμε σε άλλες τριάδες συντελεστών, που προσδιορίζονται πιο εύκολα πειραματικά, όπως επεξηγείται στη συνέχεια.

a) Ο συντελεστής αντανάκλασης  $\sigma$  (Reflection Coefficient)

Στην περίπτωση της ιδανικής ημιπερατής μεμβράνης (η ουσία δεν περνά, παρά μόνο ο διαλύτης) αρκεί ένας συντελεστής για την περιγραφή της.

Θα έχουμε τώρα μόνο ροή νερού και η ροή ουσίας προς διαλύτη θα είναι ίση και αντίστροφη με την ολική ροή.

$$J_V = -J_D \quad (2.7)$$

και λόγω των (2.4) και (2.5) θα είναι:

$$(L_P + L_{DP}) \cdot \Delta P + (L_D + L_{PD}) \cdot RT \Delta C_s = 0 \quad (2.8)$$

Η (2.8) είναι 0 όταν:

$$L_P = -L_{DP} \quad \text{και} \quad L_D = -L_{PD} \quad (2.9)$$

και λόγω της (2.6) θα είναι:

$$L_P = L_D = -L_{PD} = -L_{DP} \quad (2.10)$$

Άρα μόνο ένας συντελεστής είναι αναγκαίος για την περιγραφή της ιδανικά ημιπερατής ως προς μία ουσία μεμβράνης.

Για να περιγράψουμε τη σχετική διαπερατότητα σε μια μη ιδανική μεμβράνη της ουσίας προς το διαλύτη, εισάγουμε το συντελεστή αντανάκλασης  $\sigma$  από τη σχέση:

$$\sigma = -\frac{L_{PD}}{L_P} \quad (2.11)$$

Για την ημιπερατή μεμβράνη είναι λόγω της (2.10)  $\sigma = 1$ . Ο  $\sigma$  απ' τις (2.11) και τις (2.4) και (2.5) μπορεί να γραφεί και

$$\sigma = \frac{-L_{PD}}{L_P} = \frac{-J_D}{J_V} \quad \text{όταν} \quad \Delta C_s = 0 \quad (2.12)$$

Η (2.12) μας δείχνει, όταν  $\Delta C_s = 0$ , τη σχέση μεταξύ της σχετικής ροής ουσίας διαλύτη προς την ολική ροή. Όταν η μεμβράνη δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ ουσίας και διαλύτη τότε είναι:  $J_D = 0$  και άρα ο  $\sigma = 0$ . Όταν διακρίνει απόλυτα (ιδανικά ημιπερατή) τότε  $\sigma = 1$ .

Ο  $\sigma$  προσδιορίζεται απ' ευθείας πειραματικά<sup>13</sup>, αν συγκρίνουμε την οσμωτική ροή δια μέσου μιας μεμβράνης, όταν δεν υπάρχει διαφορά πίεσης ( $L_{PD} RT \Delta C_s$ ), με την ροή όγκου χωρίς διαφορά συγκέντρωσης ( $L_P \Delta P$ ).

Για την ιδανικά ημιπερατή μεμβράνη η ταχύτητα της οσμωτικής ροής δίνεται απ' το νόμο του Van't Hoff σαν  $L_P RT \Delta C_s$ . Για ένα πραγματικό σύστημα ο νόμος της οσμωτικής ροής πρέπει να γράφεται:  $\sigma L_P RT \Delta C_s$ , όπου  $\sigma$  μεταβάλλεται από 0 έως 1.

β) Ο συντελεστής  $\omega$

Η συσχέτιση του συντελεστή  $L_P$  με τον συντελεστή  $P_W$  είναι αρκετά φανερή. Αντίθετα ο συντελεστής  $L_P$  της σχετικής κίνησης ουσίας διαλύτη δεν έχει απ' ευθείας σχέση με ένα συνηθισμένο συντελεστή του νόμου του Fick. Έτσι ο  $L_P$  πρέπει να μετασχηματιστεί σε συνηθισμένο, πειραματικά μετρήσιμο συντελεστή.

Εκείνο, που εύκολα προσδιορίζεται, είναι η ταχύτητα ροής της ουσίας διαμέσου της μεμβράνης, που μπορούμε να την συμβολίσουμε σαν  $J_s$ , θα είναι:

$$J_s = (J_V + J_D) \cdot C_s \quad (2.13)$$

Απ' τις (2.4) και (2.5) προκύπτει ότι:

$$J_s = (1 - \sigma) \cdot J_V C_s + (L_D - \sigma^2 L_P) C_s \cdot RT \Delta C_s \quad (2.14)$$

Αν  $J_V = 0$  τότε η  $J_s$  είναι ανάλογη της  $\Delta C_s$  έτσι τώρα ο όρος  $(L_D - \sigma^2 L_P) C_s \cdot RT$  είναι συνηθισμένος συντελεστής διαπερατότητας, μετρήσιμος πειραματικά και παίρνει το σύμβολο  $\omega$ . Έχω τώρα τρεις καινούργιους συντελεστές ( $\sigma$ ,  $\omega$ ,  $L_P$ ) πειραματικά μετρήσιμους και ισοδύναμους με τους ( $L_P$ ,  $L_D$ ,  $L_{DP}$ ).

### 3. Η κατανομή των ιόντων

Απλή και διπλή κατανομή Donnan.

Η διαδικασία διάχυσης των ιόντων περιπλέκεται από το γεγονός, ότι είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Έτσι η ηλεκτρική ουδετερότητα πρέπει αναγκαία να παίρνεται υπ' όψη για κάθε πλευρά της μεμβράνης. Δηλαδή η μεταφορά φορτίου, που φέρνει η κίνηση των ιόντων, υποχρεωτικά πρέπει να συνοδεύεται από ανάλογες κινήσεις θετικών ή αρνητικών φορτίων για να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Π.χ. η εισροή  $Na^+$  πρέπει να συνοδεύεται είτε απ' την ταυτόχρονη εκροή  $K^+$  είτε από συνεισροή  $Cl^-$ .

α) Η απλή κατανομή Donnan

Έστω μια απλή περίπτωση που, σαν ελεύθερα διαχεόμενα ιόντα έχω τα  $Na^+$  και  $Cl^-$ . Λόγω της ανάγκης για ηλεκτρική ουδετερότητα τα ιόντα αυτά θα συμμεταφέρονται. Θα είναι τώρα σύμφωνα με το νόμο του Fick:

$$\text{Εκροή} = P_{Na} (Na)_i \cdot (Cl)_i \quad (3.1)$$

$$\text{και} \quad \text{Εισροή} = P_{Na} (Na)_o \cdot (Cl)_o \quad (3.2)$$

Στη στάσιμη κατάσταση θα είναι: Εκροή = Εισροή. Άρα:

$$(Na)_i (Cl)_i = (Na)_o (Cl)_o \quad \text{ή}$$



$$\frac{(\text{Na})_i}{(\text{Na})_o} = \frac{(\text{Cl})_o}{(\text{Cl})_i} \quad (3.3)$$

Η σχέση (3.3) αναφέρεται στη κατανομή των ευκίνητων ιόντων και καλείται απλή κατανομή Donnan.

Αν τώρα απ' τη μια μεριά της μεμβράνης έχω ακίνητα φορτία μη διαπερνόντα ιόντα ή φορτισμένα αρνητικά μεγαλομόρια (χαρακτηριστικό φαινόμενο για βιολογικά συστήματα) θα εμφανίζεται μια άνιση κατανομή των θετικών ιόντων, αφού μια ποσότητά τους θα παραμένει στο εσωτερικό για να εξουδετερώνει το μεγαλομοριακό ανιόν. Τα δε ευκίνητα ανιόντα θα είναι λιγότερα στο εσωτερικό απ' ό,τι στο εξωτερικό.

Συγκεκριμένα, αν  $(X)_i$  η συγκέντρωση του μεγαλομοριακού ανιόντος, θα έχω:

$$\text{στο εσωτερικό } (\text{Na})_i = (\text{Cl})_i + (X)_i \quad (3.4)$$

$$\text{και στο εξωτερικό } (\text{Na})_o = (\text{Cl})_o \quad (3.5)$$

θα ισχύει και η κατανομή Donnan, όπου  $r$  ο συντελεστής της:

$$r = \frac{(\text{Na})_o}{(\text{Na})_i} = \frac{(\text{Cl})_i}{(\text{Cl})_o} = \frac{(\text{Cl})_o}{(\text{Cl})_i + (X)_i} \quad (3.6)$$

$$\text{ή } (\text{Cl})_o = r((\text{Cl})_i + (X)_i) \quad (3.7)$$

$$\text{ή } \frac{(\text{Cl})_i}{r((\text{Cl})_i + (X)_i)} = r \quad (3.8)$$

$$\text{ή } r = \frac{(\text{Na})_o}{(\text{Na})_i} = \frac{(\text{Cl})_i}{(\text{Cl})_o} = \sqrt{\frac{(\text{Cl})_i}{(\text{Cl})_i + (X)_i}} \quad (3.9)$$

Βλέπουμε, ότι η κατανομή Donnan  $r$  εξαρτάται απ' τη σχέση  $(\text{Cl})_i$  προς  $(X)_i$ . Όταν  $(\text{Cl})_i \gg (X)_i$  τότε  $r = 1$ . Άρα δεν έχουμε άνιση κατανομή. Αν όμως  $(\text{Cl})_i \ll (X)_i$  το  $r \neq 1$ . Τότε σύμφωνα με το νόμο του Nernst εμφανίζεται ένα δυναμικό Donnan:

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln r \quad (3.10)$$

Αν τώρα είναι (5, 6)  $(X)_i = p$  τα  $\text{Na}^+$ , που θα κρατάει θα είναι  $np$  (όπου  $n$  το φορτίο του ανιόντος). Έστω  $x$  η συγκέντρωση  $\text{NaCl}$  και  $y$  το ποσό του  $\text{NaCl}$ , που κινείται γύρω απ' τη μεμβράνη. Λόγω της άνισης κατανομής θα είναι σχηματικά:

Εσωτερικό			Εξωτερικό	
$x^{n-}$	$p$			
$\text{Na}^+$	$np$		$\text{Na}^+$	$x + y$
$\text{Na}^+$	$x - y$		$\text{Cl}^-$	$x + y$
$\text{Cl}^-$	$x - y$			

Λόγω τώρα της κατανομής Donnan θα είναι:

$$(x + y)^2 = (x - y + np)(x - y) \tag{3.11}$$

ή 
$$y = \frac{np \cdot x}{np + 4x} \tag{3.12}$$

Παρατηρούμε, ότι το  $y$  συμπεριφέρεται ανάλογα με το  $r$ . Όταν  $x \ll np$ , τότε το  $y$  αυξάνει, όσο αυξάνει το  $x$ . Όταν  $x \gg np$ , τότε σταθεροποιείται στα  $y = \frac{np}{4}$  ανεξάρτητα απ' την παραπέρα αύξηση του  $x$  (αυτό έχει σαν συνέπεια η άνιση κατανομή να τείνει να εξαφανιστεί  $r = 1$ ).

Η διαφορά της οσμωτικής πίεσης στις δύο μεριές θα είναι απ' τη σχέση:

$$\Delta\pi = RT(p + np - 4y) \tag{3.13}$$

Παρατηρούμε δηλαδή, ότι επηρεάζεται απ' την άνιση κατανομή των ιόντων: αν το  $x \gg np$  το  $4y = np$  άρα

$$\Delta\pi = RTp \tag{3.14}$$

(γίνεται ίση με την οσμωτική πίεση του μεγαλομοριακού ανιόντος, αν αυτό ήταν αφόρτιστο). Αν το  $x = 0$  τότε

$$\Delta\pi = (n + 1)RTp \tag{3.15}$$

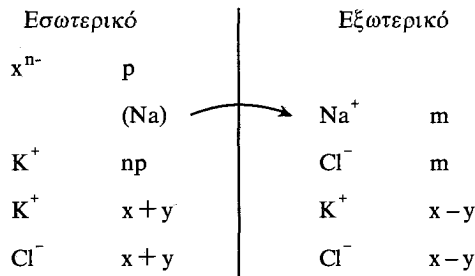
είναι η οσμωτική πίεση, που δείχνει το φορτισμένο ανιόν λόγω και των ιόντων που συγκρατεί. Τέλος, όταν  $x \ll np$ , τότε  $y = x$  και η

$$\Delta\pi = RT(p + np - x) \tag{3.16}$$

εξαρτάται απευθείας απ' τη συγκέντρωση του άλατος στο περιβάλλον.

*β) Η διπλή κατανομή Donnan*

Αν τώρα φανταστούμε μία αντλία, που μεταφέρει χωρίς να καταστρέφει την ηλεκτρική ουδετερότητα  $Na^+$  απ' το εσωτερικό στο εξωτερικό δημιουργώντας μία κλίση  $m$ . Αν στην κατανομή το ρόλο των ευκίνητων ιόντων παίζουν τα  $K^+$  και  $Cl^-$ . Αν στο ρόλο του ακίνητου πολυανιόντος προσθέσουμε φωσφορικούς εστέρες  $RO-P^{n-}$ , έχουμε ένα μοντέλο, που πλησιάζει περισσότερο στη βιολογική πραγματικότητα. Θα είναι τώρα σχηματικά:



$x$ : η συγκέντρωση του  $KCl$  στο εξωτερικό  $y$ : η ποσότης που κινείται προς τα μέσα λόγω της άνισης κατανομής.

Θα ισχύει για τα ευκίνητα ιόντα πάλι η κατανομή Donnan:

$$(np + x + y)(x + y) = (x - y)(x - y + m) \quad (3.17)$$

$$y = \frac{(m - np)x}{m + np + 4x} \quad (3.18)$$

Παρατηρούμε τώρα, ότι καθοριστικό ρόλο πλην της σχέσης  $x/np$  παίζει η αντλία  $Na$  δηλαδή το  $m$ . Αν έχουμε  $m = np$  τότε το  $y = 0$  παύει δηλαδή η κίνηση των ιόντων. Το ίδιο ισχύει και για την οσμωτική πίεση:

$$\Delta\pi = RT(p + np + 4y - 2m) \quad (3.19)$$

Η ελάττωσή της εξαρτάται τώρα απ' τον παράγοντα της αντλίας.

## B. Διευκολυνόμενη Διάχυση

Συστήματα, που ελέγχουν την ταχύτητα μεταφοράς και που συλλέγουν την ουσία, που τα διαπερνά στη βάση μιας υπάρχουσας κλίσης συγκέντρωσης (και όχι ενάντιά της) καλούνται συστήματα διευκολυνόμενης διάχυσης.

### 4. Κριτήρια για το χαρακτηρισμό τους

1ο Τα συστήματα διευκολυνόμενης διάχυσης λειτουργούν στη βάση μιας δοσμένης ηλεκτροχημικής κλίσης και έχουν την τάση στην λειτουργία τους να την εξουδετερώσουν. Δεν χρειάζονται ελεύθερη ενέργεια για την διατήρησή τους, εκτός από την γενικά απαραίτητη για τη διατήρηση της δομής της μεμβράνης.

2ο Η ταχύτητα είναι τώρα μεγαλύτερη απ' την παθητική μεταφορά, ο συντελεστής θερμοκρασίας είναι μικρότερος, στο δε πέρασμα παίζει ρόλο και η στερεοχημική δομή της διαχεόμενης ουσίας.

3ο Η ταχύτητα περάσματος ακολουθεί κινητική κορεσμού· δεν ισχύει δηλαδή ο νόμος του Fick.

4ο Η ταχύτητα πέφτει σημαντικά με την παρουσία παρόμοιων μόριων. Παρουσιάζεται δηλαδή το φαινόμενο της παρεμπόδισης.

5ο Εμποδίζεται από χημικούς αναστολείς.

6ο Υπάρχουν σαφείς διαφορές μεταξύ της καθαρής ροής και της μονοδιάστατης.

7ο Μπορεί μέσω του μηχανισμού διευκολυνόμενης διάχυσης να γίνει μεταφορά αντίθετα στο ηλεκτροχημικό δυναμικό μέσα απ' την αντίστροφη μεταφορά κάποιου ανάλογου μόριου.

## 5. Κινητική μελέτη

## α) Μονοδιάστατη ροή (Unidirectional flux)

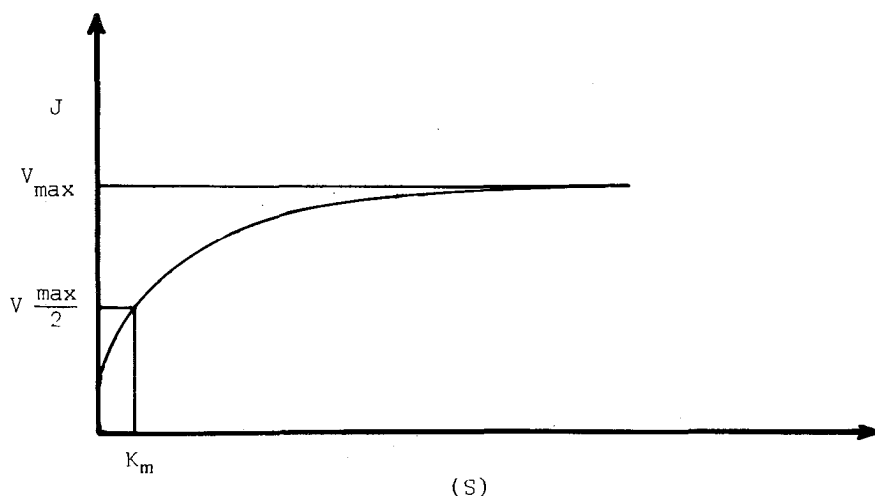
Για τα συστήματα διευκολυνόμενης διάχυσης η μονοδιάστατη ροή  $J$  μιας ουσίας δια μέσου της μεμβράνης δίνεται από μια έκφραση της μορφής:

$$J = \frac{S \cdot V_{\max}}{K_m + S} \quad (5.1)$$

όπου  $S$  η συγκέντρωση απ' τη μεριά της μεμβράνης, που ξεκινά η ροή και  $V_{\max}$  και  $K_m$  σταθερές.

Ένας τέτοιος νόμος διαφέρει φανερά από το νόμο του Fick:  $J = P \cdot A \cdot S$  (γραμμική εξάρτηση της ροής απ' τη συγκέντρωση).

Στη βάση της σχέσης (5.1) η  $J = f(s)$  ακολουθεί μια κινητική κορεσμού Michaelis-Menten (σχ. 1) με όλα τα βασικά της χαρακτηριστικά.



ΣΧΗΜΑ 1 : Η καμπύλη κορεσμού για την διευκολυνόμενη διάχυση.

$V_{\max}$ : Εξαρτάται απ' το συνολικό αριθμό των κυττάρων, το είδος τους, την κατηγορία της ουσίας και είναι η μέγιστη ροή, που μπορούμε να φτάσουμε.

$K_m$ : Χαρακτηρίζει ανεξάρτητα απ' τον αριθμό των κυττάρων το ζευγάρι κύτταρο/ουσία σαν ένα μέτρο της συγγένειάς τους. Είναι η αναγκαία συγκέντρωση της ουσίας για να φτάσουμε στη  $\frac{V_{\max}}{2}$ .

Η αναλογία μεταξύ της ενζυματικής κινητικής και της διευκολυνόμενης μεταφοράς επεκτείνεται και στον τομέα της δράσης των αναστολέων της μεταφοράς (7).

*Ανταγωνιστικοί αναστολείς.* Ελαττώνουν την συγγένεια κύτταρου/ουσίας, κινητικά αυξάνουν την  $K_m$ . Παρεμποδίζουν τις ενεργούς θέσεις του συστήματος μεταφοράς και έχουν σαν συνέπεια την ελάττωση της συγγένειας του συστήματος «κύτταρο/ουσία». Αυξάνει έτσι η ποσότητα της ουσίας, η αναγκαία για  $V_{max}/2$ .

Στον τύπο η  $K_m$  αντικαταστίεται απ' την  $\left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_m$ , όπου  $I$  η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_I$  η σταθερά του (συγκέντρωση αναστολέα αναγκαία για να διπλασιαστεί η φαινομενική  $K_m$ ).

Ανταγωνιστικοί αναστολείς συνήθως είναι μη ανάλογες ουσίες με τη μεταφερόμενη.

*Μη ανταγωνιστικοί αναστολείς.* Ελαττώνουν τον αριθμό των θέσεων μεταφοράς και έχουν σαν συνέπεια ελάττωση της  $V_{max}$ . Η  $V_{max}$  διαιρείται τώρα με τον όρο  $\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)$  ανάλογο του προηγούμενου.

### β) Η καθαρή ροή

Μέχρι τώρα για το σύστημα της διευκολυνόμενης μεταφοράς δεν εισαγάγαμε τίποτα περισσότερο απ' την απλή ενζυματική κινητική. Η κατάσταση περιπλέκεται όταν περιγράψουμε την καθαρή ροή, την αλγεβρική δηλαδή άθροιση εισροής και εκροής:

$$\text{καθαρή ροή} = J_{in} - J_{out} \quad (5.3)$$

$$\frac{S_e V_{max}}{K_m + S_e} - \frac{S_i V_{max}}{K_m + S_i} \quad (5.4)$$

(σε περίπτωση συμμετρικότητας της μεμβράνης) τελικά:

$$\text{καθαρή ροή} = \frac{(S_e - S_i) K_m V_{max}}{(K_m + S_e)(K_m + S_i)} \quad (5.5)$$

αν τώρα είναι  $S_e, S_i \ll K_m$  η σχέση μετασχηματίζεται σε:

$$\text{καθαρή ροή} = (S_e - S_i) \frac{V_{max}}{K_m} \quad (5.6)$$

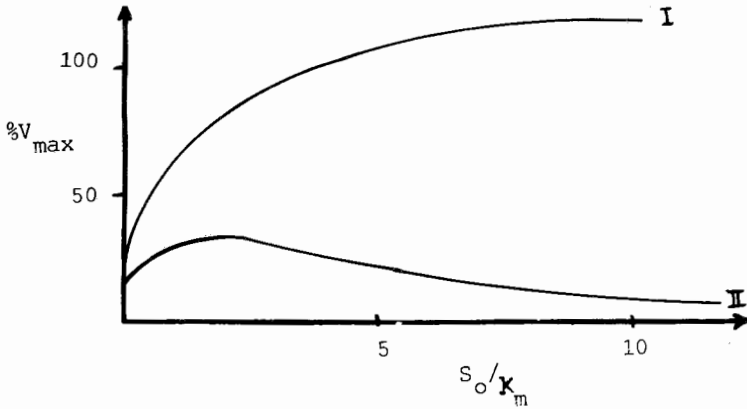
ανάλογη μ' αυτή του νόμου του Fick.

Έστω τώρα σαν μέτρο της ολικής ροής ο «χρόνος ημιπληρώσεως» του κυττάρου. Ο χρόνος δηλαδή, που  $S_i = \frac{S_e}{2}$  σύμφωνα με το νόμο του Fick θα είναι:

$$\text{καθαρή ροή} = \frac{S_e}{2} \frac{V_{max}}{K_m} \quad (5.7)$$

και θα αυξάνει γραμμικά με την  $S_e$ .

Αντίθετα, αν ισχύει η σχέση (5.5), όταν το  $S_e$  αυξάνει, η  $k_p$  θα τείνει στο μηδέν (οι δυο ροές θα τείνουν να εξισορροπηθούν) (σχ. 2).



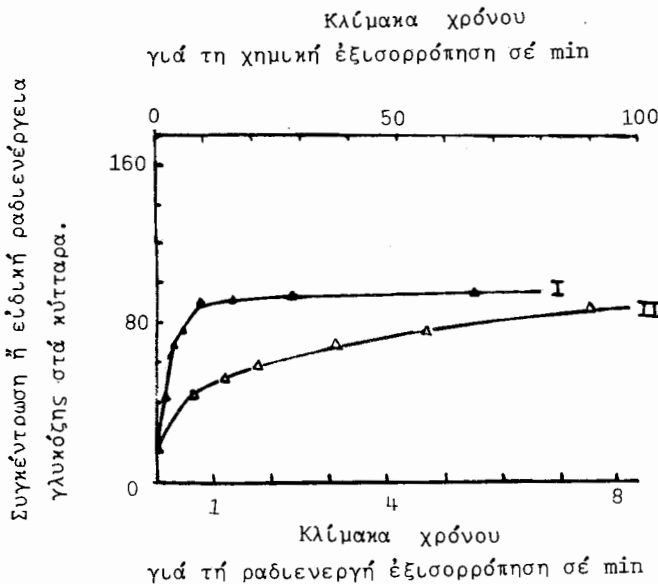
ΣΧΗΜΑ 2 : Ο βαθμός κορεσμού στη μονοδιάστατη (I) και στη καθαρή (II) ροή μιας ουσίας που υπακούει στους νόμους της διευκολυνόμενης διάχυσης.

γ) Λόγος μονοδιάστατης προς καθαρή ροή

Γίνεται φανερό, ότι ο λόγος μονοδιάστατης ροής προς καθαρή, με αυξανόμενο S<sub>e</sub> τείνει στο άπειρο.

$$\text{Τυπικά θα είναι } \frac{\text{Μονοδιάστατη}}{\text{καθαρή}} = \frac{S_e(K_m + S_i)}{K_m(S_e - S_i)} \quad (5.8)$$

Η καθαρή ροή μετρείται με χημικό τρόπο, ενώ η μονοδιάστατη με επισημασμένα ραδιοϊσότοπα (σχ. 3).

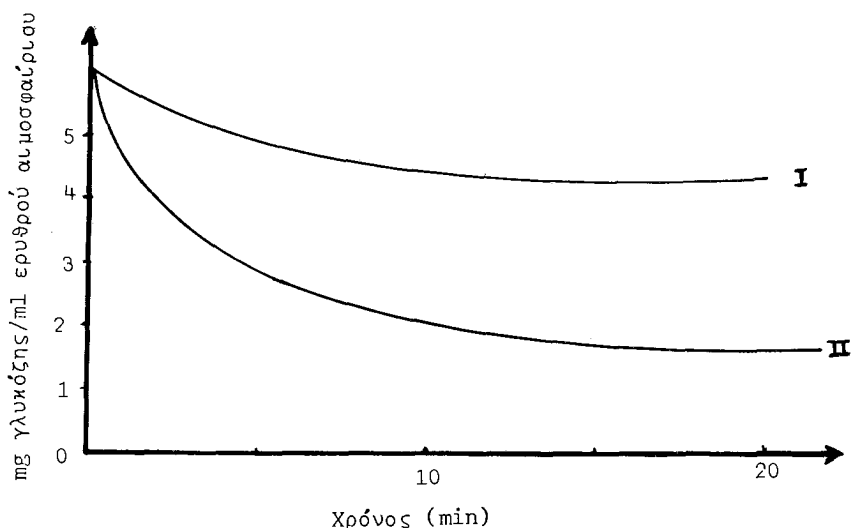


ΣΧΗΜΑ 3 : Η διαφορά μεταξύ μονοδιάστατης (I) που παρακολουθείται με ραδιενεργή γλυκόζη και της καθαρής εισροής (II) που μετρείται με χημικό τρόπο (I).

Η έντονη διαφορά μεταξύ μονοδιάστατης και καθαρής ροής δείχνει την κυριαρχία του νόμου της διευκολυνόμενης μεταφοράς. Είναι πολύ μεγαλύτερη απ' την προβλεπόμενη απ' τον νόμο του Fick.  $\left(\frac{S_e}{S_e - S_i}\right)$

δ) *Ανταγωνιστική διάχυση ανταλλαγής (Competitive Exchange Diffusion)*

Η εκροή π.χ. της γλυκόζης από τα κύτταρα, μετρημένη με χημικό τρόπο, είναι η καθαρή εκροή. Αυτή ταυτίζεται με τη μονοδιάστατη, μόνο αν δεν υπάρχει γλυκόζη στο εξωτερικό μέσο, κάτι όμως δύσκολο να το πετύχουμε πειραματικά. Αν όμως τώρα ένα άλλο σάκχαρο μπορεί να κορένει το σύστημα απ' την έξω πλευρά, τότε παρεμποδίζεται η εισροή γλυκόζης και η μετρούμενη με χημικά μέσα ροή ταυτίζεται με την μονοδιάστατη (σχ. 4). Σε ένα τέτοιο σύστημα ανταγωνιστικής διάχυσης ανταλλαγής, η αρχική χαμηλή ολική ροή μετατρέπεται σε μια μεγάλη μονοδιάστατη.



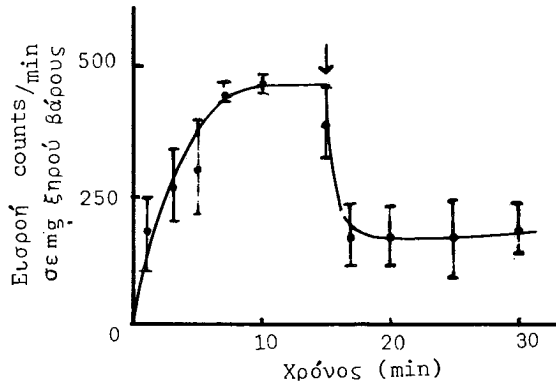
ΣΧΗΜΑ 4 : Το φαινόμενο της ανταγωνιστικής διάχυσης ανταλλαγής κατά την εκροή γλυκόζης από ερυθρά αιμοσφαίρια στους  $0^\circ$  (I): Χωρίς ανταγωνιζόμενο σάκχαρο (II) Με ανταγωνιζόμενο (I).

ε) *Το φαινόμενο της αντι-ροής (counterflow)*<sup>14</sup>

Σε ανάλογο μηχανισμό με τη διάχυση ανταλλαγής υπακούει το φαινόμενο της αντι-ροής. Έτσι κατά την πρόσληψη σακχάρου η προσθήκη ενός άλλου ανταγωνιζόμενου το πρώτο μπορεί να οδηγήσει στη μεταφορά του πρώτου ενάντια στο χημικό του δυναμικό (σχ. 5).

Στην αρχή όταν δεν υπάρχει ανταγωνιζόμενο σάκχαρο έχουμε μία καθαρή ροή (από έξω προς τα μέσα) του αρχικού σάκχαρου. Αν τώρα προσθέσουμε στο εξωτερικό επαρκή ποσότητα του ανταγωνιζόμενου (μεγαλύτερη από το  $K_m$ ), τότε θα δεσμευθεί η από τα έξω προς τα μέσα κίνηση του αρχικού σακχαρου, ενώ η

αντίστροφη όχη. Έτσι θα έχουμε τελικά μια ολική εκροή του αρχικού σάκχαρου ενάντια στην κλίση συγκέντρωσής του.



ΣΧΗΜΑ 5 : Το φαινόμενο της αντιρροής. Παρατηρείται όταν κατά την εισροή D-γλυκόζης σε *Tetrahymena pyriformis* προσθέσουμε τη χρονική στιγμή που δείχνει το βέλος D-φρουκτόζη (14).

Το φαινόμενο αυτό είναι φυσική συνέπεια της κινητικής κορεσμού για τη διαχεόμενη ουσία. Για να συμβεί αυτό, πρέπει να πληρούνται οι παρακάτω όροι.

- α) Οι δύο ουσίες να έχουν κοινό σύστημα διευκολυνόμενης μεταφοράς.
- β) Πρέπει να υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης για την ανταγωνιζόμενη ουσία.
- γ) Πρέπει στη μια ή στην άλλη πλευρά η ουσία αυτή να έχει υψηλή συγκέντρωση.

δ) Η εισροή και η εκροή από το σύστημα διευκολυνόμενης μεταφοράς δεν πρέπει να αλληλοεμποδίζονται.

ε) Συνέπεια όλων αυτών είναι και ότι η ενεργός θέση ή ο παράγοντας της μεταφοράς πρέπει να «κινούνται» απ' τη μια μεριά προς την άλλη μεταφέροντας στο «πήγαινε έλα» προς τη μια ή την άλλη κατεύθυνση την διαχεόμενη ουσία.

Στη στάσιμη κατάσταση αν είναι  $\frac{S_i}{S_e}$  ο λόγος συγκέντρωσης του αρχικού σάκχαρου και  $\frac{G_i}{G_e}$  του ανταγωνιζόμενου, ισχύει η σχέση, αν εφαρμόσουμε τον τύπο της μη ανταγωνιστικής αναστολής στη στάσιμη κατάσταση:

$$\frac{S_i}{S_e} = \frac{1 + G_i/K_m}{1 + G_e/K_m} \quad (5.9)$$

όπου  $K_m$  η σταθερά της ουσίας G.

#### 6. Η υπόθεση του κινητού μεταφορέα

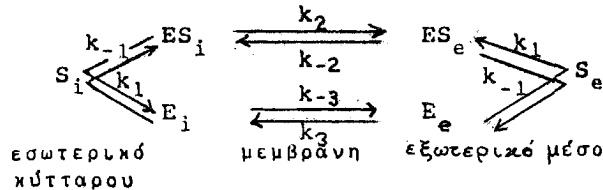
Για την εξήγηση του φαινομένου της διευκολυνόμενης διάχυσης κάνουμε την υπόθεση, ότι το σύστημα αποτελείται από μεταφορείς με την ικανότητα:

- 1) Να ενώνονται με την προς μεταφορά ουσία.



2) Το σύμπλοκο αυτό έχει την δυνατότητα να διασχίζει τη μεμβράνη με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα απ' ό,τι η ουσία μόνη της.

Σχηματικά αν E εταφορέας και S η ουσία, θα είναι:



Όπου  $\frac{k_1}{k_{-1}}$  μέτρο της συγγένειας ουσίας μεταφορέα και  $\frac{k_2}{k_{-2}}, \frac{k_3}{k_{-3}}$  μέτρα

για την ταχύτητα διάχυσης τόσο του σύμπλοκου, όσο και του ελεύθερου μεταφορέα, δια μέσου της μεμβράνης. Θα είναι δηλαδή:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (6.1) \text{ η σταθερά διάστασης του σύμπλοκου}$$

$$\text{και } r = \frac{k_2}{k_3} = \frac{k_{-2}}{k_{-3}} \quad (6.2) \text{ η σχετική ταχύτητα διάχυσης σύμπλοκου προς τον ελεύθερο μεταφορέα.}$$

Θα ισχύουν οι σχέσεις:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{E_e S_e}{ES_e} = \frac{E_i S_i}{ES_i} \quad (6.3)$$

$$\text{TotE} = E_e + E_i + ES_e + ES_i \quad (6.4)$$

Στη στάσιμη κατάσταση:

$$k_{-3}E_e + k_{-2}ES_e = k_3E_i + k_2ES_i \quad (6.5)$$

$$\text{ή } E_e + rES_e = E_i + rES_i \quad (6.6)$$

Λύνοντας το σύστημα των εξισώσεων θα έχω:

$$E_i = \frac{(K_s + rS_e) K_s \text{TotE}}{(K_s + rS_i)(K_s + S_e) + (K_s + rS_e)(K_s + S_i)} \quad (6.7)$$

$$ES_i = \frac{(K_s + rS_e) S_i \text{TotE}}{(K_s + rS_i)(K_s + S_e) + (K_s + rS_e)(K_s + S_i)} \quad (6.8)$$

Ανάλογες δε εκφράσεις θα έχω για τα  $E_e$  και  $ES_e$ . Η δε μονοδιάστατη ροή απ' το εσωτερικό θα είναι:

$$J = k_2 ES_i \quad (6.9)$$

δηλαδή:

$$J = \frac{k_2 \text{TotE} S_i (K_s + r S_e)}{(K_s + r S_i)(K_s + S_e) + (K_s + r S_e)(K_s + S_i)} \quad (6.10)$$

Παρατηρούμε επομένως, ότι αν και μονοδιάστατη εξαρτάται απ' τη συγκέντρωση και απ' τις δύο πλευρές. Αν τώρα κάνουμε την υπόθεση ότι:  $r=1$  (τόσο το σύμπλοκο όσο και ο ελεύθερος μεταφορέας έχουν την ίδια ταχύτητα διάχυσης). Τότε απ' την (6.10) καταλήγουμε στη γνώριμη μορφή:

$$J = \frac{k_2 \text{TotE} S_i}{2(K_s + S_i)} \quad (6.11)$$

Αν τώρα ο ελεύθερος μεταφορέας δεν μπορεί να κινείται, όταν είναι ελεύθερος, για να παραλάβει καινούργια προς μεταφορά μόρια, τότε έχοντας:  $k_3=0$  και  $r=\infty$  παίρνω τη σχέση:

$$J = \frac{k_2 \text{TotE} \cdot S_e S_i}{K_s(S_e + S_i) + S_e S_i} \quad (6.12)$$

που είναι συμμετρική προς τη μια και την άλλη κατεύθυνση ως προς  $S_e$  και  $S_i$ . Στην ακραία αυτή περίπτωση ανεξάρτητα απ' τα  $S_e$  και  $S_i$  δεν έχουμε ολική ροή παρά μόνο στοιχειομετρική 1:1 ανταλλαγή της ουσίας.

Καλούμε ένα τέτοιο φαινόμενο ανταλλαγής «αναγκαστική διάχυση ανταλλαγής» (Compulsory Exchange Diffusion) σε αντίθεση με το χαμήλωμα της ολικής ροής, όταν και οι δυο πλευρές έχουν κορεστεί, που την καλούμε «ανταγωνιστική διάχυση ανταλλαγής». «Επιταχυνόμενη διάχυση ανταλλαγής (Accelerative Exchange Diffusion) εμφανίζεται σε συστήματα, που ο ελεύθερος μεταφορέας κινείται λιγότερο γρήγορα απ' το σύμπλοκο. Η διαφορά μεταξύ «ανταγωνιστικής» και «επιταχυνόμενης» πιστοποιείται, όταν η μία πλευρά έχει χαμηλή συγκέντρωση της ουσίας ώστε να αποκλείεται ανταγωνισμός και παρ' όλα αυτά έχουμε μία ανταλλαγή.

Συνοψίζοντας την υπόθεση του κινητού μεταφορέα έχω:

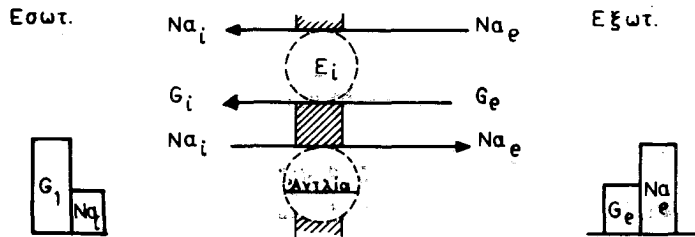
- 1) Οι μεταφορείς υπάρχουν σε πεπερασμένο αριθμό στις μεμβράνες.
- 2) Βρίσκονται σε συγκεκριμένη και εξειδικευμένη συγγένεια με την προς μεταφορά ουσία.
- 3) Το σύμπλοκο μπορεί να διασχίζει τη μεμβράνη προς τη μία και προς την άλλη κατεύθυνση.
- 4) Μπορεί να διαφέρει η ταχύτητα κίνησης μέσα στη μεμβράνη του σύμπλοκου απ' τον ελεύθερο μεταφορέα.

### Γ. Σύζευξη μεταξύ ενεργού μεταφοράς και διευκολυνόμενης διάχυσης.

Η ασύμμετρη κατανομή των ιόντων μέσα από διαδικασίες ενεργού μεταφοράς έχει σαν συνέπεια την συµμεταφορά μέσα από μηχανισμούς διευκολυνόμενης διάχυσης ουσιών κόντρα στην ηλεκτροχημική τους κλίση.

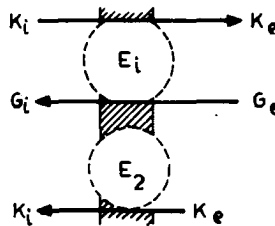
### 7. Ο μηχανισμός της συν-μεταφοράς (Co-Transport)

Για την εξήγηση του φαινομένου της συν-μεταφοράς δεχόμαστε ένα σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης  $E_i$ , που για να λειτουργήσει δεσμεύοντας την προς μεταφορά ουσία  $G$  χρειάζεται απ' την ίδια πλευρά και ιόντα  $Na^+$ . Αν τώρα μία αντλία διατηρεί στο εσωτερικό χαμηλή τη συγκέντρωση των ιόντων τότε απ' το εξωτερικό εισρέουν ιόντα συμπαρασύροντας μέσα από το σύστημα  $E_i$  και την ουσία  $G$ , που μεταφέρεται τώρα μέσα από το σύστημα διευκολυνόμενης διάχυσης, αλλά ενάντια στην κλίση συγκέντρωσής της. (σχ. 6).



ΣΧΗΜΑ 6: Παράλληλη συν-μεταφορά

Για τα ιόντα  $K^+$ , που η κίνησή τους «ενεργά» είναι αντίστροφη απ' αυτή του  $Na^+$ , ένας μηχανισμός συμμεταφοράς μπορεί να λειτουργεί και αντιπαράλληλα (ο μεταφορέας να ενεργοποιείται απ' το  $K^+$  απ' την εσωτερική πλευρά). (σχ. 7).



ΣΧΗΜΑ 7: Αντιπαράλληλη συν-μεταφορά

Οι απαραίτητες ενδείξεις για μια τέτοια υπόθεση είναι:

1ο) Να υπάρχει στοιχειομετρική σχέση μεταξύ των mol του σακχάρου ή του αμινοξέος και του συμμεταφέροντος ιόντος.

2ο) Η συμμεταφορά να είναι συμμετρική (ροή  $Na$  να συμπαρασύρει το  $G$  αλλά και αντίστροφα).

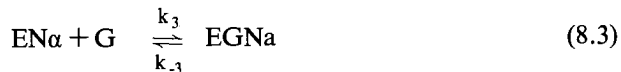
3ο) Η ολική ροή του  $G$  μπορεί να αλλάζει με αλλαγή του ηλεκτροχημικού δυναμικού του  $Na$  (το ίδιο ισχύει και για την ολική ροή του  $Na$ ).

4ο) Στη στάσιμη κατάσταση ο λόγος συγκέντρωσης της  $G$  πρέπει να βρίσκεται σε συγκεκριμένη αλληλοεξάρτηση με το λόγο συγκέντρωσης του  $Na$ .

5ο) Η μεταφορά του  $G$  πρέπει να εκπληρώνει όλες τις προϋποθέσεις της διευκολυνόμενης διάχυσης.

## 8. Η κινητική μελέτη της συν-μεταφοράς.

Ένα σύστημα συν-μεταφοράς, όπως περιγράφηκε πριν, θα κυριαρχείται απ' τις παρακάτω ισορροπίες:



Βασικά υπάρχουν δύο δρόμοι: Ο ένας, να σχηματιστεί πρώτα το ENa και στη συνέχεια να προστίθεται το G. Στη περίπτωση αυτή έχουμε μία απ' το Na εξαρτώμενη συγγένεια υποστρώματος μεταφορέα (το Na επηρεάζει την  $K_m$  της κινητικής διάχυσης της ουσίας).

Ο άλλος δρόμος να σχηματίζεται πρώτα το σύμπλοκο EG και το Na απλά να επιταχύνει τη διάχυση του σύμπλοκου δια μέσου της μεμβράνης προστιθέμενο μετά. Έχουμε δηλαδή μία απ' το Na εξαρτώμενη κινητικότητα του σύμπλοκου και επηρεασμό της  $V_{max}$ .

Αν είναι  $k_5$  η σταθερά ταχύτητας μετατόπισης του πλήρους σύμπλοκου και είναι ίδια για το σύμπλοκο και τον ελεύθερο μεταφορέα, θα έχω

$$TotE = E + EG + ENa + EGNa \quad (8.5)$$

$$EGNa = \frac{TotE \cdot G \cdot Na \left( \frac{1}{k_1 k_3} + \frac{1}{k_2 k_4} \right)}{1 + \frac{Na}{k_1} + \frac{G}{k_2} + \frac{GNa}{k_1 k_3} + \frac{GNa}{k_2 k_4}} \quad (8.6)$$

Η ταχύτητα τώρα μεταφοράς της ουσίας G θα είναι:

$$K_5 \cdot EGNa \quad (8.7)$$

Έστω τώρα, ότι πάμε απ' το δεύτερο δρόμο, σχηματίζεται δηλαδή EG και το Na διευκολύνει τη διάχυσή του. Τότε τα  $k_1, k_3 \rightarrow \infty$  και η (8.6) μετασχηματίζεται:

$$\begin{aligned} \text{Ταχύτητα διάχυσης} \\ \text{απ' το 2ο δρόμο} &= \frac{k_5 TotE \left( \frac{Na}{k_3 + Na} \right) G}{\left( \frac{k_2 k_4}{k_4 + Na} \right) + G} \end{aligned} \quad (8.8)$$

Στη σχέση αυτή, αν το  $Na \ll k_4$  παίρνουμε μία σχέση, που το Na επηρεάζει γραμμικά τη  $V_{max}$  ενώ αφήνει ανεπηρέαστη την  $K_m$  στην κινητική διάχυση της G.

Αν τώρα πηγαίνω απ' τον 1ο δρόμο το  $Na$  επηρεάζει τη συγγένεια  $E$  και  $G$  δηλαδή  $k_2, k_4 \rightarrow \infty$ . Η σχέση γίνεται:

$$\text{Ταχύτητα διάχυσης απ' το 1ο δρόμο} = \frac{k_5 \text{Tot}E \cdot G}{\left(\frac{k_1 + Na}{Na}\right) k_3 + G} \quad (8.9)$$

Βλέπουμε δηλαδή, ότι το  $V_{\max}$  μένει ανεπηρέαστο ενώ το

$$K_m = k_3 \left(1 + \frac{k_1}{Na}\right) \quad (8.10)$$

### 9. Η σχέση κατανομής στη στάσιμη κατάσταση.

Αν τώρα η ουσία  $G$  χρησιμοποιεί τον δεύτερο δρόμο (σχηματίζεται κατ' αρχάς το  $EG$ ) για την εισροή, μπορούμε να γράψουμε:

$$\text{Εισροή} = \frac{V_{\max} \cdot Na_e \cdot G_e}{K_m + G_e} \quad (9.1)$$

Αν η ουσία  $G$  δεν χρησιμοποιεί άλλο δρόμο εισροής ή εκροής μπορούμε να γράψουμε μια ανάλογη σχέση για την εκροή, και στη στάσιμη κατάσταση να τις εξισώσουμε. Αν το σύστημα δεν είναι κορεσμένο σε σχέση με την ουσία  $G$  και ανεξάρτητα απ' τη συγκέντρωση  $Na$ , θα έχω:

$$\frac{G_i}{G_e} = \frac{Na_e}{Na_i} \quad (9.2)$$

Αν όμως το σύστημα χρησιμοποιεί τον πρώτο δρόμο τότε:

$$\frac{G_i}{G_e} = \frac{Na_e}{Na_i} \cdot \frac{k_1 + Na_i}{k_1 + Na_e} \quad (9.3)$$

Στη περίπτωση αυτή μόνο αν  $Na \ll k_1$  έχουμε μια ανάλογη κατανομή με τη σχέση (9.2), αλλιώς:

$$\frac{G_i}{G_e} = 1 \quad (9.4)$$

Τον όρο  $Na_i$  τον καθορίζει ένα πρωτογενές σύστημα ενεργού μεταφοράς και στη συνέχεια δευτερογενώς το σύστημα συνμεταφοράς καθορίζει την κατανομή του  $G$  στη στάσιμη κατάσταση.

Αν τώρα στη στάσιμη κατάσταση το  $Na$  εισρέει μέσω της συν-μεταφοράς και εκρέει μέσα απ' την συν-μεταφορά και την αντλία (σε περίπτωση, που το σύστημα δεν έχει κορεστεί) θα έχω στη στάσιμη κατάσταση:

$$k_5 \frac{V_{\max}}{K_m} G_e \cdot Na_e = k_5 \frac{V_{\max}}{K_m} G_i \cdot Na_i + k_8 \cdot Na_i \quad (9.5)$$

όπου  $k_8$  η σταθερά της αντλίας. Θα είναι:

$$Na_i = \frac{k_5 \frac{V_{\max}}{K_m} G_e \cdot Na_e}{k_8 + k_5 \frac{V_{\max}}{K_m} G_i} \quad (9.6)$$

Αν τώρα το  $k_8$  είναι αρκετά μεγάλο θα έχω:

$$Na_i = \frac{k_5}{k_8} \frac{V_{\max}}{K_m} G_e \cdot Na_e \quad (9.7)$$

και

$$\frac{Na_i}{Na_e} = \frac{k_5}{k_8} \frac{V_{\max}}{K_m} G_e \quad (9.8)$$

Αν η εισροή του Na γίνεται κυρίαρχα από ένα δρόμο διαφορετικό απ' την συν-μεταφορά, τότε το  $Na_i/Na_e$  μπορεί να είναι ανεξάρτητο απ' το  $G_e$ . Η σχέση (9.8) μας δίνει όλους τους συντελεστές του συστήματος της συν-μεταφοράς.

#### Δ. Η πρωτογενής ενεργός μεταφορά.

Μέχρι τώρα αναφερθήκαμε στη δυνατότητα πρωτογενούς άντλησης π.χ. ιόντων  $Na^+$  ανεξάρτητα και ενάντια στο ηλεκτροχημικό τους δυναμικό. Ας περιγράψουμε πρώτα θεωρητικά το φαινόμενο στη βάση της θερμοδυναμικής των μη αντιστρεπτών διεργασιών<sup>2</sup>.

#### 10. Η σύζευξη στη στάσιμη κατάσταση ροών και χημικών αντιδράσεων.

Η αλληλεπίδραση των διαφόρων μη αντιστρεπτών διεργασιών εκτός από άμεσα με την σύζευξη μέσω διαγώνιων συντελεστών μπορεί να γίνει και έμμεσα στη στάσιμη κατάσταση.

Έστω ανοιχτό σύστημα, που παίρνει συστατικό M απ' το περιβάλλον και το μετατρέπει με σειρά διαδοχικών αντιδράσεων στο N (μέσω μιας μεταβολικής πορείας). Το N αποβάλλεται στο περιβάλλον. Έστω συστατικό O, που αλληλεπιδρά με την είσοδο του M ή την έξοδο του N μέσα απ' τη διάχυσή του μέσω της μεμβράνης χωρίς να συμμετέχει πάρα πέρα στην μεταβολική πορεία. Η ταχύτητα παραγωγής της εντροπίας θα είναι:

$$T \cdot \frac{d_i S}{dt} = A_M \cdot \frac{d_e n_M}{dt} + A_N \cdot \frac{d_e n_N}{dt} + A_O \cdot \frac{d_e n_O}{dt} + A_{ch} V_{ch} > 0 \quad (10.1)$$

όπου  $A_M, A_N, A_O$  οι συγγένειες  $\left(\frac{A}{T}\right)$  οι κατευθύνουσες δυνάμεις) των M, N, O

μεταξύ εσωτερικού και περιβάλλοντος,  $\frac{d_e n}{dt}$  οι ανάλογες ροές,  $A_{ch}$  η συγγένεια των χημικών αντιδράσεων και  $V_{ch}$  η ταχύτητά τους.

Μπορώ να γράψω τις παρακάτω φαινομενολογικές σχέσεις:

$$\frac{d_e n_M}{dt} = L_{11} \frac{A_M}{T} + L_{12} \frac{A_O}{T} \quad (10.2)$$

όπου  $L_{12}$  ο συντελεστής αλληλεπίδρασης της ροής του Μ με αυτή του Ο.

$$\frac{d_e n_O}{dt} = L_{21} \frac{A_M}{T} + L_{22} \frac{A_O}{T} \quad (10.3)$$

$$\frac{d_e n_N}{dt} = L_N \frac{A_N}{T} \quad (10.4)$$

και 
$$v_{ch} = L_{ch} \frac{A_{ch}}{T} \quad (10.5)$$

θα είναι δε:  $L_{12} = L_{21}$  (θεώρημα του Onsager)

Στη στάσιμη κατάσταση θα είναι:

$$\frac{dn_M}{dt} = \frac{d_e n_M}{dt} - v_{ch} = 0 \quad (10.6)$$

$$\frac{dn_N}{dt} = \frac{d_e n_N}{dt} + v_{ch} = 0 \quad (10.7)$$

$$\frac{dn_O}{dt} = \frac{d_e n_O}{dt} = 0 \quad (10.8)$$

ή 
$$v_{ch} = \frac{d_e n_M}{dt} = - \frac{d_e n_N}{dt} \quad (10.9)$$

και 
$$\frac{d_e n_O}{dt} = 0 \quad (10.10)$$

Αν λύσουμε τώρα το σύστημα των εξισώσεων, θα έχω για τις συγγένειες:

$$A_M = \frac{T}{L_{11} - (L_{12}^2/L_{22})} v_{ch} \quad (10.11)$$

$$A_N = - \frac{T}{L_N} v_{ch} \quad (10.12)$$

και 
$$A_O = \frac{-T(L_{11}/L_{22})}{L_{11} - (L_{12}^2/L_{22})} v_{ch} \quad (10.13)$$

Η τελευταία σχέση έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι δείχνει, ότι η συγγένεια του Ο και κατά συνέπεια και η διαφορά συγκέντρωσής του μεταξύ συστήματος και περιβάλλοντος αλληλοεπηρεάζεται άμεσα με την ταχύτητα της χημικής αντίδρασης στη στάσιμη κατάσταση, χωρίς το Ο να συμμετέχει στη μεταβολική πορεία. Έτσι λοιπόν μπορεί π.χ. το ηλεκτροχημικό δυναμικό ενός ιόντος γύρω από μία μεμβράνη να είναι άμεσα δεμένο με χημική αντίδραση. Μπορούμε να μιλάμε δηλαδή για «μεταβολικά συζευγμένη μεταφορά».

### 11. Η ενεργός μεταφορά

Μια τέτοια σύζευξη, που με δαπάνη της ενέργειας της χημικής αντίδρασης

μια ουσία ή ένα ιόν, μπορεί να κατανέμεται ενάντια στο ηλεκτροχημικό του δυναμικό γύρω απ' τη μεμβράνη, καλείται και «ενεργός μεταφορά». Με τη λογική πάλι της θερμοδυναμικής των μη αντιστρεπτών διεργασιών, αν θεωρήσουμε όλες τις πιθανές συγγένειες, που οδηγούν μια καθαρή ροή ενός συστατικού  $i$ , που μπορεί να ονομάζω  $J_i$ , αυτές θα είναι:

1) Η ηλεκτροχημική συγγένεια του ίδιου του  $i$ , δηλαδή

$$A_i = \Delta\mu_i + z_i F\psi \quad (11.1)$$

2) Η αλληλεπίδραση με την ροή  $J_i$  άλλων συστατικών μέσω διαγώνιων συντελεστών.

3) Η ενέργεια μιας χημικής αντίδρασης έστω  $J_r$ , με την οποία είναι συζευγμένη.

Θα είναι δηλαδή:

$$J_i = L_{ii}A_i + \sum_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n L_{ij}J_j + L_{ir}J_r \quad (11.2)$$

Ο πρώτος όρος αναφέρεται στην παθητική διάχυση, ο δεύτερος στη διευκολυόμενη συν-μεταφορά και ο τρίτος στην «ενεργό».

Η ανάλυση αυτού του τρίτου όρου απασχόλησε έντονα τους επιστήμονες<sup>8</sup>.

Επειδή η  $J_i$  είναι διανυσματική ποσότητα (έχει φορά προς τα μέσα ή προς τα έξω απ' το κύτταρο), τα γινόμενα  $L_{ij}J_j$  πρέπει και αυτά να είναι διανυσματικά μεγέθη (δηλαδή γινόμενα ενός διανύσματος επί αριθμό), για να εκπληρούται το θεώρημα της Curie «Είναι αδύνατον για μια δύναμη ενός δοσμένου τανυστικού χαρακτήρα να οδηγήσει μια ροή διαφορετικού τανυστικού χαρακτήρα».

Για το  $L_{ij}J_j$  το  $L_{ij}$  είναι αριθμητικό μέγεθος αλλά η ροή  $J_j$  διάνυσμα· άρα δεν υπάρχει πρόβλημα.

Στη περίπτωση του  $L_{ir}J_r$  τα πράγματα δεν είναι σαφή. Αν φερ' ειπείν η  $J_r$  είναι η ταχύτητα  $v_{ch}$  μιας αντίδρασης, θα πρέπει ο συντελεστής  $L_{ir}$  να έχει ανυσματικό χαρακτήρα. Μια πρωτογενής ενεργός μεταφορά γίνεται με διατάραξη της στάσιμης κατάστασης του συστήματος, που έχει σαν συνέπεια αλλαγή της  $A_o$  και μεταφορά της ουσίας  $O$ . Για να γίνει όμως αυτό, πρέπει το συστατικό  $O$  να συζευχθεί με ασύμμετρο σύστημα τοποθετημένο στη μεμβράνη συνδεδεμένο με την παραγωγή κάποιου μεταβολίτη ή το πέρασμα κάποιου μεταβολίτη, που συμμετέχει σε μια καταβολική, άρα και εξεργονική πορεία, που καθορίζει τη στάσιμη κατάσταση (ο συντελεστής  $L_{12}$  της προηγούμενης παραγράφου). Η ασύμμετρη διάταξη στο χώρο ενός τέτοιου συστήματος δίνει στο συντελεστή  $L_{ir}$  διανυσματικά χαρακτηριστικά.

## 12. Κινητική των συστημάτων «άντλησης» και «διαρροής».

Η πραγματοποίηση της στάσιμης κατάστασης προϋποθέτει εκτός απ' το σύστημα «άντλησης» (“Pump”) και ένα σύστημα «διαρροής» (“Leak”) που να εξισορροπεί τη συσσώρευση ή την εκροή με αντίστροφη λειτουργία. Η διαρροή



λοιπόν είναι μια φυσιολογική αναγκαιότητα δεμένη με την αντλία για οποιοδήποτε υπόστρωμα.

Ένα κινητικό παράδειγμα: έστω ουσία  $s$  που συσσωρεύεται μέσω μιας αντλίας θα είναι:

$$\text{για την εισροή μέσω της αντλίας: } \frac{V_{\max} S_e Q}{K_m + S_e} \quad (12.1)$$

όπου  $S_e$  η συγκέντρωση στο εξωτερικό  $K_m$  η σταθερά Michaelis  $V_{\max}$  η μέγιστη ταχύτητα στη μονάδα συγκέντρωσης κάποιου μεταβολίτη  $Q$ , που καθοδηγεί την ενεργό μεταφορά.

Η διαρροή απ' το εσωτερικό θα είναι:

$$k S_i \quad (12.2)$$

όπου  $k$  η σταθερά εκροής και  $S_i$  η συγκέντρωση της ουσίας στο εσωτερικό. Στη στάσιμη κατάσταση θα είναι:

$$k S_i = \frac{V_{\max} \cdot S_e \cdot Q}{K_m + S_e} \quad (12.3)$$

και ο συντελεστής κατανομής

$$DR = \frac{S_i}{S_e} = \frac{V_{\max} \cdot Q}{k(K_m + S_e)} \quad (12.4)$$

Απ' τη σχέση (12.4) μπορούν να βγούν βασικά δύο συνέπειες:

**Πρώτον:** Όταν  $S_e \rightarrow 0$  ο συντελεστής κατανομής  $DR \rightarrow \text{maximum}$  ίσον με

$$\frac{V_{\max} Q}{k K_m} \quad (12.5)$$

**Δεύτερον:** Όταν  $S_e$  ο συντελεστής  $DR \rightarrow 0$ , αυτό σημαίνει, ότι αυξανόμενου του  $S_e$  σταθεροποιείται ο  $S_i$ .

Η κινητική αυτή χρησιμοποιείται σαν μια μέθοδος για την περιγραφή του συστήματος μεταφοράς  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ .

Αν τη σχέση (12.4) τη γράψω

$$\frac{1}{S_i} = \frac{k}{V_{\max} Q} + \frac{k \cdot K_m}{V_{\max} Q} \times \frac{1}{S_e} \quad (12.6)$$

έχω μια σχέση, που μπορεί να με βοηθήσει να προσδιορίσω γραφικά τους όρους:

$$\frac{k}{V_{\max} Q} \quad \text{και} \quad \frac{k \cdot K_m}{V_{\max} Q}$$

## Summary

### *"Physicochemical laws of biological transport"*

The physicochemical laws of biological transport are reviewed.

Especially a treatment of the "metabolically coupled transport" in terms of Irreversible Thermodynamics leads to the relation

$$A_o = \frac{-TL_{21}/L_{22}}{Ln - L_{12}/L_{22}}$$

This relation connects the affinity  $A_o$  of a solute O across the membrane with the rate  $V_{ch}$  of a metabolic route in which the substance O does not participate directly. This coupling takes place through the phenomenological coefficients  $L_{11}$ ,  $L_{22}$  and the cross coefficient  $L_{12}$ .

The relation gives a thermodynamic basis for the explanation of the term "active transport" showing that the chemical affinity across a multiphase system, such as biological membranes, is a vectorial parameter.

## Βιβλιογραφία

1. Stein W.D.: *"The Movement of Molecules across Cell Membranes"* p. 36 Academic Press. New York. San Francisco. London (1967).
2. Prigogine I.: *"Thermodynamics of Irreversible Processes"* Interscience Publishers. New York. London. Sydney (1967).
3. Τσουκάτου Δ.Κ.: «Εισαγωγή στη Θερμοδυναμική των μη αντιστρεπτών διεργασιών» Αθήνα 1978.
4. Guggenheim E.A.: *"Thermodynamics"* North-Holland Publishing Company Amsterdam (1967).
5. Davies M.: *"Functions of Biological Membranes"* Chapman and Hall Ltd. London (1973).
6. Καπούλα Β.Μ.: «Χημεία του Πρωτοπλάσματος» Αθήνα 1977.
7. Δημοπούλου Κ.Α.: «Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων» Αθήνα 1977.
8. Mitchell P.: "Active Transport and Ion Accumulation" in Florkin and Stotz *"Comprehensive Biochemistry"* Vol. 22 *"Bioenergetics"* p. 167 Elsevier Publishing Company. Amsterdam (1967).
9. Τσουκάτου Δ.Κ.: «Μελέτη της μεταφοράς και της ρύθμισης ιόντων στο Πρωτόζωο *Tetrahymena Pyriformis*» Διδακτορική διατριβή. Αθήνα (1981).
10. O. Sten-Knudsen: *"Passive Transport Processes"* in G. Giebisch D.C. Tosteson, H. H. Ussing *"Membrane Transport in Biology"* Vol. I *"Concepts and Models"* p. 5 Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York (1978).
11. Kadem O, Katchalsky A.: "Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes" *Biochim. Biophys. Acta* 27, 129-246 (1958).

12. Kadem O, Katchalsky A.: "A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability" *J. Gen. Physiol.* **45** 143-179 (1961).
13. Durbin R.P.: "Osmotic flow of water across permeable cellulose membranes" *J. Gen. Physiol.* **44** 315-326 (1960).
14. Aomine M.: "The mechanism of sugar uptake in *Tetrahymena Pyriformis*" III *Comp. Bioch. Physiol.* **60A** 41-56 (1978).

## **Η ΧΡΗΣΗ ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΩΝ ΜΑΖΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΒΙΝΥΛΟΧΛΩΡΙΔΙΟΥ (PVC)**

**Μ.Κ. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΥΛΟΣ**

*Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα.*

Received March 29, 1983).

### **Περίληψη**

Κόκκοι PVC από διάφορα είδη πολυμερισμού, διαφόρων παρτίδων, θερμαίνονται απ' ευθείας στην πηγή ιονισμού δύο διαφορετικών τύπων φασματομέτρων μάζας, τετραπολικού και μαγνητικού. Η θέρμανση των κόκκων στην περιοχή 70-120 ° C (μερικές φορές υψηλότερα) απεγκλωβίζει τις διάφορες προσμίξεις (υπολλείμματα πολυμερισμού, πρόσθετα) από τους κόκκους επιτρέποντας την ταχύτατη ταυτοποίηση τους. Εξετάζονται οι δυνατότητες που έχει ο κάθε ένας από τους δύο τύπους φασματομέτρων μάζας σε συνδυασμό με υπολογιστή (DATA SYSTEM).

Λέξεις κλειδιά: Ανάλυση πολυμερών. Φασματόμετρα μάζας τετραπολικού και μαγνητικού τύπου.

### **Εισαγωγή**

Είναι γνωστό ότι η παρουσία προσμίξεων (υπολλειμμάτων και προσθέτων) στο πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) επηρεάζει τόσο τη γήρανση του υλικού<sup>1</sup>, όσο και την τοξικότητα<sup>2</sup>, το χρώμα και τη γενικότερη αποδοχή του.

Η ταχύτατη και λεπτομερειακή γνώση του είδους των προσμίξεων, μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της ποιότητας του πολυμερούς από παρτίδα σε παρτίδα του ίδιου ή διαφορετικών προμηθευτών. Για τον προσδιορισμό των προσμίξεων σε διάφορα πολυμερή έχουν προταθεί διάφοροι μέθοδοι, όπως εκχύλιση και στην συνέχεια χρωματογραφία, φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), πυρόλυση -αέρια χρωματογραφία (PY/GC), NMR, X-RAY<sup>3</sup>. Έχει επίσης προταθεί η χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC)<sup>4,5</sup> ή ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC/MS)<sup>6,7,8</sup>. Πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της προσαρμογής διατάξεων απ' ευθείας στην είσοδο του φασματομέτρου μάζας (MS)<sup>9,10</sup>. Καμιά από τις παραπάνω διατάξεις δεν είχε γενική αποδοχή, μερικές δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα, αλλά είναι χρονοβόρες, ενώ σ' όλες τις περιπτώσεις απαιτείται η κατασκευή ειδικής διάταξης.

Στην μέθοδο που παρουσιάζεται στην εργασία αυτή δεν χρησιμοποιείται καμιά ιδιαίτερη διάταξη, αλλά αξιοποιούνται οι δυνατότητες δύο πολύ δημοφιλών τύπων φασματομέτρων μάζας του τετραπολικού και του μαγνητικού. Το πρώτο κάνει διαχωρισμό των παραγόμενων ιόντων με τη βοήθεια ενός «φίλτρου μάζων», ενώ το δεύτερο διαχωρίζει τα ιόντα με τη βοήθεια μαγνητικού πεδίου<sup>11</sup>. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή κόκκοι PVC εισάγονται απ' ευθείας στην πηγή ιονισμού του φασματομέτρου μάζας, όπου θερμαίνονται με χαμηλό ρυθμό θέρμανσης στην περιοχή 70-120<sup>0</sup>C (μερικές φορές υψηλότερα). Οι ουσίες που είναι παραδευμένες στους κόκκους του PVC εκλύονται με ικανοποιητικό διαχωρισμό. Τα φάσματα των ουσιών που λαμβάνονται φυλάσσονται σε μαγνητικές δισκέτες με τη βοήθεια του Data System των οργάνων. Η απ' ευθείας θέρμανση στην πηγή ιονισμού έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση των πτητικών που είναι παραδευμένα στο νάυλον, τα πολυκαρβονικά το πολυπροπυλένιο, το πολυστερένιο και τα ελαστικά<sup>12</sup>. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό μονομερών σε FOAM πολυουρεθάνη και στον προσδιορισμό κυκλικών ολιγομερών σε πολυ-ε-καπρολακτάμη.<sup>13,14</sup>

### Αποτελέσματα και συζήτηση

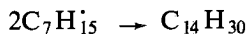
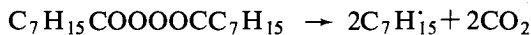
Κατά τη θέρμανση των κόκκων του PVC μπορούμε να διακρίνουμε τρεις θερμοκρασιακές περιοχές. Η περιοχή 70—120<sup>0</sup>C είναι αυτή, στην οποία εκλύονται τα παραδευμένα υπολείμματα του πολυμερισμού. Στην περιοχή αυτή δεν λαμβάνει χώρα διάσπαση του PVC. Αυτό στο φασματομέτρο μάζας φαίνεται από την αμελητέα παρουσία των κορυφών 36 και 38 (με λόγο 3:1), που αντιστοιχούν στο HCl, βασικό και πρωταρχικό προϊόν της θερμοκλής διάσπασης του PVC. Στην δεύτερη (120-270<sup>0</sup>C) και τρίτη (270-400<sup>0</sup>C) περιοχή, αντιστοίχως, γίνεται διάσπαση του PVC. (Εκλύονται HCl, βενζόλιο και άλλοι υδρογονάνθρακες). Η διάκριση αυτών των περιοχών γίνεται με παρακολούθηση και συνεχή καταγραφή με το φασματομέτρο μάζας όλων των πτητικών, που παράγονται κατά την θέρμανση κόκκων PVC με σταθερό ρυθμό 5<sup>0</sup>C/min. Η παρακολούθηση αυτή γίνεται με συνεχή καταγραφή του ολικού ρεύματος ιόντων (TIC) που προέρχεται απ' όλα τα πτητικά που ιονίζονται στο φασματομέτρο μάζας.

Στο σχήμα I δίνεται το TIC για θέρμανση του PVC συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας. Η χρήση της περιοχής 70 έως 120<sup>0</sup>C γενικά εξασφαλίζει έκλυση των προσμίξεων και όχη των πτητικών προϊόντων της διάσπασης του PVC.

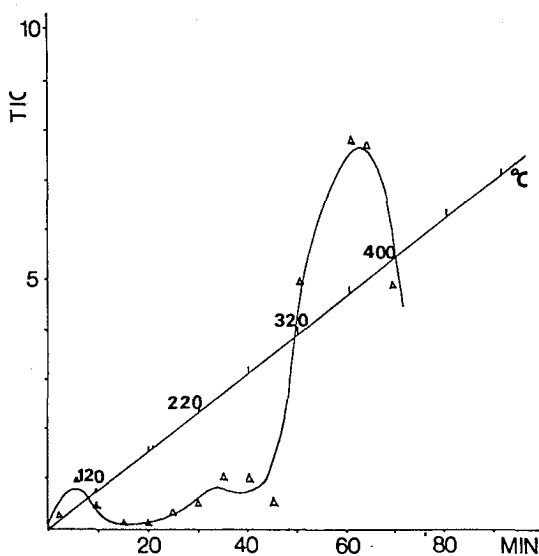
Στον πίνακα I και II δίνονται τ' αποτελέσματα αναλύσεως πέντε διαφορετικών ειδών PVC (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B, Γ), ενώ στα σχήματα 2 και 3 δίνονται τα λαμβανόμενα φάσματα μάζας.

Στο δείγμα A<sub>1</sub> ταυτοποιείται πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), τριχλωροαιθυλένιο (TCE) και ένας υδρογονάνθρακας (H/C) με MB 198. Η PVA χρησιμοποιείται σαν αιωρηματοποιητική ουσία, ενώ το TCE χρησιμοποιείται πολλές φορές στην παραγωγή χαμηλού MB PVC. Στα δείγματα A<sub>2</sub> και A<sub>3</sub> ταυτοποιείται PVA και

έναν Η/С με MB 198. Ο Η/С με MB 198 έχει Μ.Τ.  $C_{14}H_{30}$ . Στην περίπτωση αυτή γίνεται η υπόθεση ότι ο Η/С με MB 198 είναι το προϊόν επαναντιδράσεως των τμημάτων του καταλύτη ενάρξεως πολυμερισμού,  $C_7H_{15}COOCC_7H_{15}$  (υπεροξείδιο του οκτανοϊκού οξέως) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η υπόθεση αυτή χρειάζεται βεβαίως περαιτέρω μελέτη.

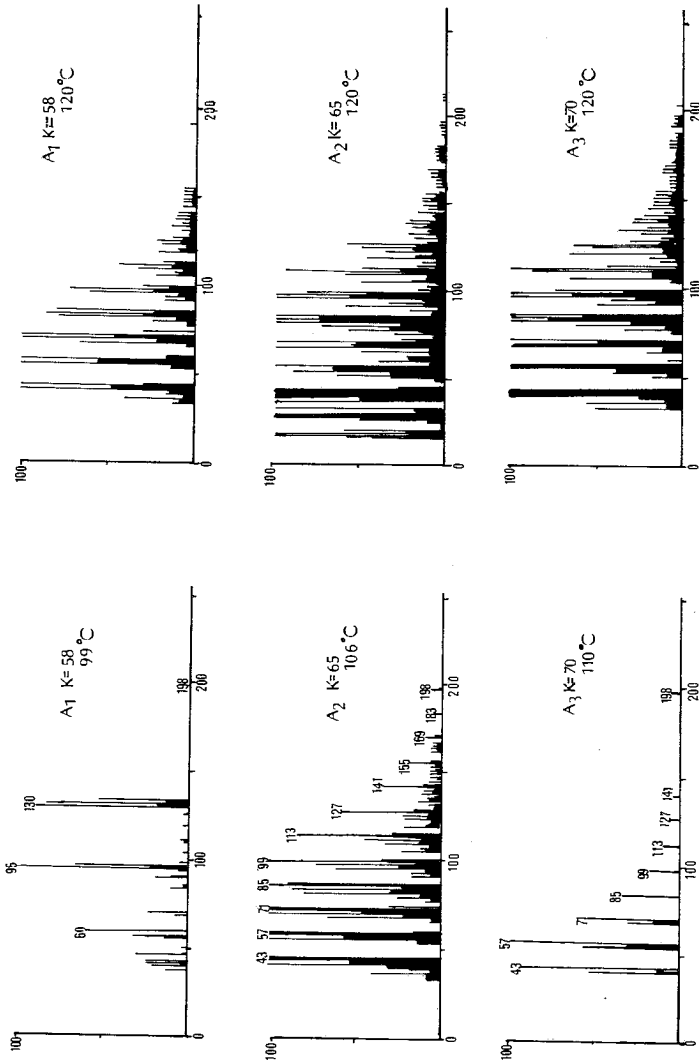


ΣΧΗΜΑ 1. Έκλυση ολικών πηκτικών (TIC) συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας κατά την θέρμανση κόκκων PVC απ' ευθείας στην πηγή ιονισμού του τετραπολικού φασματομέτρου μάζας (Ρυθμός θέρμανσης  $5^{\circ}C/min$ , Θερμοκρασία πηγής ιονισμού  $220^{\circ}C$ , Ρεύμα εκπομπής 0,7 mA, Ενέργεια ιονισμού 70eV).

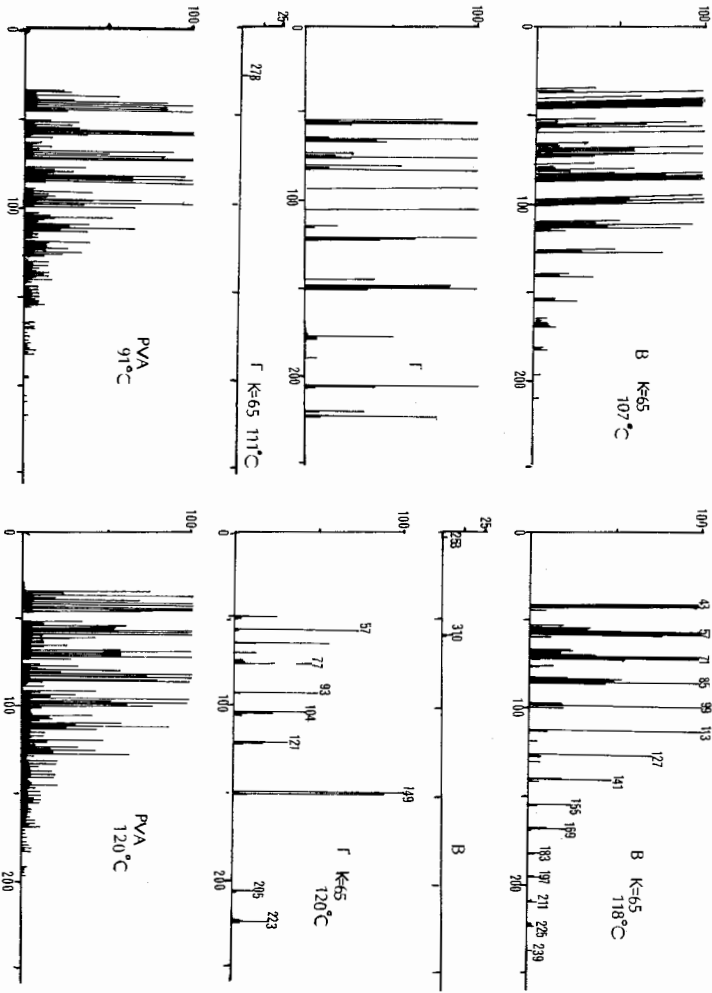
Στο δείγμα Β ταυτοποιείται PVA και ένας κεκορεσμένος Η/С με MB 310. Με βάση την παραπάνω υπόθεση αυτός ο Η/С μπορεί να προέρχεται από τον ευρύτατα χρησιμοποιούμενο καταλύτη ενάρξεως  $C_{11}H_{23}COOOCC_{11}H_{23}$  (υπεροξείδιο του λαυρικού οξέως) με επαναντίδραση των αλκυλίων που παράγονται κατά την αντίδραση ενάρξεως πολυμερισμού.

Το δείγμα Γ περιέχει ένα αντιοξειδωτικό (2,6 δι-*t*-βουτύλο-*p*-κρεζόλη) και ένα πλαστικοποιητή (φθαλικός διβουτυλεστέρας).

Από τη μελέτη των πινάκων I και II παρατηρούμε ότι και οι δύο τύποι φασματομέτρων μάζας ταυτοποιούν τις αυτές προσμίξεις. Η χρήση θερμοπρογραμματισμού κατά τη θέρμανση του δείγματος εξασφαλίζει το πλεονέκτημα

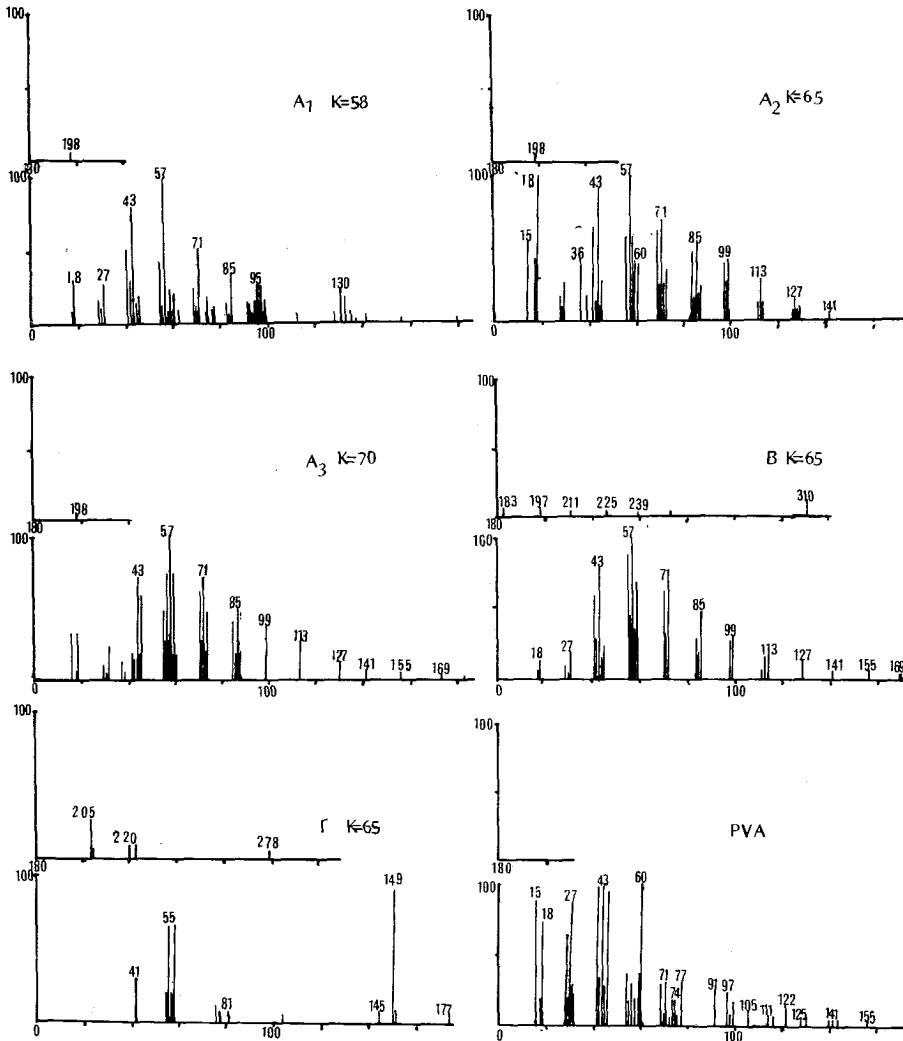


ΣΧΗΜΑ 2. Τα φάσματα μάζας που λαμβάνονται κατά τη θέρμανση κόκκων PVC, απ' ευθείας στην πηγή ιονισμού τετραπολικού φασματομέτρου μάζας (MAT 44). Ρυθμός θέρμανσης 5°C/min στην περιοχή 70-120°C. Ενέργεια ιονισμού 70eV, Ρεύμα εκπομπής 0,7mA. Θερμοκρασία πηγής ιονισμού 200°C.



ΣΧΗΜΑ 2 (συνέχεια)





ΣΧΗΜΑ 3. Τα φάσματα μάζας που λαμβάνονται κατά τη θέρμανση κόκκων PVC απ'ευθείας στην πηγή ιονισμού μαγνητικού τύπου φασματομέτρου μάζας (RMU-6M). Ενέργεια ιονισμού 70eV, Ρεύμα εκπομπής 0,7mA. Θερμοκρασία πηγής ιονισμού 200°C.

του καλύτερου διαχωρισμού των εκλυόμενων ουσιών. Η χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος εξάλλου είναι απαραίτητος για να μην δημιουργηθούν προβλήματα μόλυνσης στην πηγή ιονισμού. Η δυνατότητα χρήσης μεγάλων ταχυτήτων σαρώσεως επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλών ουσιών, ενώ η χρήση μαγνητικού τύπου οργάνων δίνει καλλίτερη ευσθησία. Σε κάθε περίπτωση είναι αναγκαία πολλές φορές η «αφαίρεση» μεταξύ δύο φασμάτων, για την εξάλειψη του Background και την καλλίτερη ταυτοποίηση των ουσιών. Αυτό μπορεί να γίνει με τη βοήθεια υπολογιστή που επεξεργάζεται τις μετρήσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι. Ταυτοποιούμενες ουσίες σε διάφορα δείγματα κόκκων PVC με χρήση τετραπολικού φασματομέτρου μάζας. Θέρμανση δείγματος από 70-120<sup>0</sup>C με ρυθμό θέρμανσης 5<sup>0</sup>C/min.

Δείγμα	Θερμοκρασία ( <sup>0</sup> C)	Ταυτοποιούμενη ουσία
A <sub>1</sub> (K = 58)	70-120	Πολυβινυλική αλκοόλη
	70-110	Τριχλωροαιθυλένιο
	90-120	Κεκ. H/C C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
A <sub>2</sub> (K = 65)	70-120	Πολυβινυλική αλκοόλη
	90-120	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
A <sub>3</sub> (K = 70)	70-120	Πολυβινυλική αλκοόλη
	90-120	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
B(K = 65)	70-120	Πολυβινυλική αλκοόλη
	100-120	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
Γ(K = 65)	70-110	2,6 Δι- <i>t</i> -βουτυλο-π-κρεζόλη
	70-120	Φθαλικός διβουτυλεστέρας
PVA	70-120	Ακόρεστοι H/C και οξυγονωμένα προϊόντα
	70-120	Ύδωρ
	70-100	Οξικό οξύ
	80-100	Οξικός μεθυλεστέρας
	80—120	Αρωματικές ενώσεις
	100-120	Μεθανόλη

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ. Ταυτοποιούμενες ουσίες σε διάφορα δείγματα κόκκων PVC με χρήση μαγνητικού φασματομέτρου μάζας. Λήψη φασμάτων σε διάφορες θέσεις του συστήματος εισαγωγής (αριθμός σάρωσης), κατά την εισαγωγή του στην πηγή ιονισμού.

Δείγμα	Αριθμός Σάρωσης	Ταυτοποιούμενη ουσία
A <sub>1</sub> (K = 58)	1	Πολυβινυλική αλκοόλη (PVA)
	2	PVA, τριχλωροαιθυλένιο, C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
	3	PVA
A <sub>2</sub> (K = 65)	1	PVA, C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
	2	PVA
	3	PVA
A <sub>3</sub> (K = 70)	1	PVA, C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>
	2	PVA
	3	PVA
B(K = 65)	1	PVA, C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
	2	PVA, C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
	3	PVA, C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
Γ(K = 65)	1	2,6 δι- <i>t</i> -βουτυλο-π-κρεζόλη (DBC), Φθαλικός διβουτυλεστέρας (DBP)
	2	DBC, DBP
	3	DBC, DBP
PVA	1	Ακόρεστοι H/C και οξυγονωμένα προϊόντα, ύδωρ.
	2	Ακόρεστοι H/C και οξυγονωμένα προϊόντα, ύδωρ, οξικό οξύ, οξικός μεθυλεστέρας, αρω- ματικές ενώσεις, μεθανόλη.

Πολύ ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η χρήση των δυνατοτήτων υπολογιστή (Data System) για τη λήψη και αποθήκευση (Library) ενός μεγάλου αριθμού φασμάτων σε δισκέτα. Τα φάσματα μπορούν να επεξεργαστούν μετά το πέρας των μετρήσεων. Αυτή ακριβώς η δυνατότητα επιτρέπει την ταχύτητα ταυτοποίηση των προσμίξεων.

## Πειραματικό μέρος

### α. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικά δείγματα PVC. Τα δείγματα A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> A<sub>3</sub> προέρχονται από τον ίδιο κατασκευαστή, είναι πολυμερισμού αιωρήματος, μη πλαστικοποιημένα και αντιστοιχούν σε χαμηλό, μέσο και υψηλό βαθμό πολυμερισμού (έχουν K-Values 58,65,70 αντιστοίχως). Τα δείγματα A<sub>2</sub> και B έχουν τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού (K-Values 65), είναι μη πλαστικοποιημένα και προέρχονται από διαφορετικούς κατασκευαστές. Το Γ είναι πολυμερισμού μάζας και έχει K-Value 65.

### β. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δύο χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματομέτρα μάζας (LRMS). Το τετραπολικού τύπου MAT 44 και το μαγνητικού τύπου απλής εστίασεως, Hittachi RMU-6M.

### γ. Χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο MAT 44 ήταν η εισαγωγή του δείγματος στην πηγή ιονισμού και η θέρμανση του στην περιοχή 70 έως 120<sup>0</sup>C (μερικές φορές υψηλότερα) με ρυθμό θέρμανσης 5<sup>0</sup>C/min. Οι συνθήκες λήψης των φασμάτων ήταν: Ενέργεια ιονισμού 70 eV, ρεύμα εκπομπής 0,7 mA, θερμοκρασία πηγής 200<sup>0</sup>C, δυναμικό ηλεκτρονοπολλαπλασιαστή 1800 V. Η σάρωση της περιοχής μαζών 33-499 γινόταν σε χρόνο 0,99 sec. Η ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρότερη των 0,5 mg.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο Hittachi RMU-6M ήταν η εισαγωγή του δείγματος απ' ευθείας στην πηγή ιονισμού και η λήψη των φασμάτων σε διάφορες θέσεις του συστήματος εισαγωγής καθώς αυτό πλησιάζει την πηγή ιονισμού. Οι συνθήκες λήψης των φασμάτων μάζας ήταν: Ενέργεια ιονισμού 70 eV, ρεύμα εκπομπής 0,7 mA, θερμοκρασία πηγής 200<sup>0</sup>C, ταχύτητα σαρώσεως 4 και ποσότητα δείγματος μικρότερη των 0,1 mg.

---

## Summary

*The use of quadrupole and magnetic mass spectrometers for purity analysis of polyvinylchloride.*

Two widely used mass spectrometers (quadrupole, magnetic) are used for purity analysis of PVC grains. Different types of PVC are used (suspension and mass polymerization polymers of different K-Values). Among the substances identified are suspension agent, molecular weight regulator, hydrocarbons, antioxidant, plastisizer. The advantages of those two mass spectrometers are presented.

---

## Βιβλιογραφία

1. G. Ayrey, B.C. Poller: *J. Pol. Sci. Macrom. Rev.*, **8**, 1 (1974).
2. U.S. Environmental Protection Agency, *Scientific and Technical Assessment Report on Vinyl Chloride and PVC*, Report EPA - 600/6 - 75 - 004, Research Triangle Park, N.C. (Dec., 1975).
3. J. Haslam, H.A. Willis, D.C.M. Squirrell.: *Identification and analysis of plastics*, Heyden, London, 2ed 1980, p. 143-214 and p. 551-602.
4. O. Mleznek: *J. Chromatogr.*, **65**, 271 (1972).
5. J. Meyer: *J. Chromatogr.*, **99** 709 (1974)
6. N. Ligon and R. Johnson: *Anal. Chem.*, **48**, 481 (1976).
7. W. Ligon and M. George: *J. Pol. Sci. Pol. Chem. Ed.*, **16**, 2703 (1978).
8. J. Shen: *Anal. Chem.*, **49**, 886 (1977).
9. A. Power: *Anal. Chem.*, **3**, 1135 (1981).
10. K. Chan et al.: *Anal. Chem.*, **54**, 1238 (1982).
11. I. Howe, D.H. Williams, R.D. Bowen: *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 2ed Mc Graw - Hill, UK, 1981.
12. T. Signond: *Vacuum*, **25**, 239 (1975).
13. C. REED, BR.: *Polym. J.* 239 (1975).
14. Leuderwald et al.: *Angew. Makromol. Chem.*, **67**, 193 (1978).
15. J. Seibl: *Massen spektrometrie*, 1ed, Academiche Verlagsgesellschaft, Frankfurt, 1970.

## Ευχαριστίες

Ο συγγραφέας του παρόντος άρθρου επιθυμεί να εκφράσει τις ευχαριστίες του στον Prof. Dr. Seibl J. του ETH-ZÜRICH (Lab. für Org. Chem.) τόσο για τη λήψη των φασμάτων στο RMU - 6M, όσο και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

## REVERSED - PHASE HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF TETRACYCLINES IN EGGS

N. A. BOTSOGLOU, V. N. VASSILOPOULOS, D. C. KUFIDIS

*Laboratory of Nutrition, Department of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece.*

(Received July 1, 1983)

### Summary

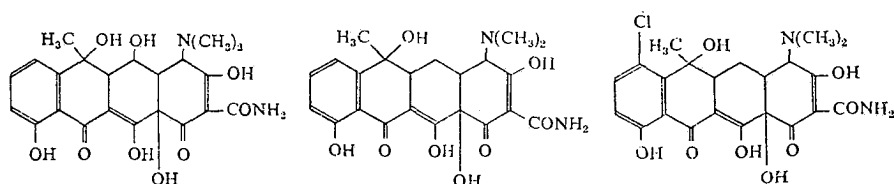
Separation and quantitative analysis of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline from eggs were accomplished by reversed - phase ion - pair liquid chromatography. Samples fortified with tetracyclines were subjected to a complexation with calcium ions and ion pairing with phenylbutazone. Extraction of the tetracycline - phenylbutazone ion pairs was effected by dichloromethane, followed by back extraction into acid.

The method is rapid, sensitive and reproducible. As low as 16, 50 and 80 ppb of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline can be measured respectively.

**Key words:** Tetracyclines, antibiotics, residues in eggs, HPLC.

### Introduction

The extensive use of tetracyclines in poultry, mainly for the prevention of early mortality and the treatment of diseases, has raised the possibility that traces of these antibiotics might be present in eggs<sup>1,2</sup>. Because antibiotic residues in foods can be a potential health hazard to man<sup>3</sup>, an assay procedure capable of detecting the presence of as low as possible amounts of oxytetracycline I, tetracycline II and chlortetracycline III in eggs would be of great value.



I

II

III

Much work has been carried out on the chromatographic separation of the tetracycline group of drugs. Previously reported chromatographic methods<sup>4,5,6,7,8,9,10,11</sup> have proved laborious and generally not sufficiently sensitive or precise. Among the more recently developed techniques for the analysis of tetracyclines, high pressure liquid chromatography (HPLC) seems to have the most promise<sup>12,13,14,15,16</sup>.

Several HPLC procedures allowing quantitation of tetracyclines in pharmaceutical preparations have been reported<sup>17,18,19,20</sup>, but they were unsuited to the analysis of eggs, because endogenous ultraviolet absorbing components were eluted with the drugs.

A few HPLC methods have already been applied to the analysis of tetracyclines in biological materials such as urine<sup>21,22,23,24</sup>, blood<sup>21</sup> and tissues<sup>23</sup>. They were useful, but lacked the sensitivity required to study the low concentration of tetracyclines expected in eggs, during the final stage of drug elimination.

This method involves an extraction procedure<sup>23</sup>, slightly modified to suit eggs analysis, and an HPLC system which provides increased sensitivity.

## Experimental

### *Apparatus*

A modular liquid chromatograph (Perkin Elmer, Series 3) was used in this study. A HC-ODS-SIL-X-I (Perkin Elmer) column, 2.6 mm wide and 250 mm long, prepacked with octadecylsilane chemically bonded on 10  $\mu$ m silicagel, was attached to a Rheodyne valve injector fitted with a 175  $\mu$ l loop.

Column eluants were monitored with a single beam variable wavelength UV-Visible spectrophotometer (Perkin Elmer LC-55B) through a 8  $\mu$ l flow cell.

A digital scanner (Perkin Elmer, LC-55-S) provided background correction for the spectrophotometer to produce true spectra of the eluted compounds on stop-flow conditions.

The detector signal was recorded on a variable-span recorder (Perkin-Elmer, 023). A column oven (Perkin Elmer, LC - 100) was used to control the column temperature.

### *Reagents and materials*

a. Mobile phase. 200 ml distilled acetonitrile (p.a., Ferak) and 700 ml distilled water were mixed with 100 ml 0.1 M sodium dihydrogen phosphate dihydrate (p.a. Ferak).

The resulting solution was adjusted to pH 2.6 with concentrated nitric acid (p.a. Merck) and used after degassing.

b. Calcium chloride (p.a. Merck) solution 4% w/v.

c. 5,5 - diethylbarbituric acid sodium salt (sodium barbital, p.a., Serva) 0.8 M aqueous solution.

d. Phenylbutazone sodium salt solution 20% w/v. In a beaker containing 10 ml water and 2 gr phenylbutazone (p.a., Serva), the quantity of sodium hydroxide, just needed for the phenylbutazone to be dissolved, was added in small portions under stirring. The pH of the resulting solution must be 8.2.

- e. Dichloromethane (p.a., Merck)
- f. Oxytetracycline hydrochloride, tetracycline hydrochloride and 7-chlortetracycline (pharm., Serva)

Quantities (7-9 mg) of tetracyclines were accurately weighed in 100 ml volumetric flasks and diluted to the above volume with distilled water just prior to use. Aliquots of these stock solutions were diluted to 25 ml with distilled water to make working standards containing 0.5-12.5  $\mu\text{g/ml}$ . Volumes of 0.2 ml were used to "spike" eggs.

#### *Chromatographic conditions*

The column temperature was adjusted to 30°C. Each analysis was performed by programming the flow rate of the mobile phase as follows: for the first 4.7 min. the flow rate was 0.5 ml/min. and then, for 1 min. the flow rate was linearly increased from 0.5 ml/min. to 1 ml/min.; for the last 2.5 minutes the flow remained constant, 1 ml/min.

The column eluants were monitored at 361 nm. Recordings were made at a chart speed of 30 cm/h and at a sensitivity of 0.020 a.u.f.s.

At the above conditions, oxytetracycline was eluted in 4.1 min., tetracycline in 4.6 min. and chlortetracycline in 7.0 min.

#### **Extraction procedure and preparation of standard curves for eggs**

Samples of 5 gr of the homogenized hens eggs (yolk and albumen) were weighed in 50 ml glass - stoppered centrifugal tubes. A 0.2 ml portion of a tetracycline working standard was added to each tube so that the resulting fortified samples contained 0.02-0.5  $\mu\text{g}$  of tetracycline per gr of egg.

Calcium chloride solution (1.0 ml), sodium barbital solution (3.0 ml), phenylbutazone sodium salt solution (0.5 ml) and dichloromethane (25.0 ml) were added successively to the tubes containing the "spiked" eggs. Then the tubes were vigorously agitated for 10 min. and centrifuged for 15 min at 2,500 g. Three layers were formed; an upper aqueous layer which was discarded, a cream - like mass which was detached from the walls with a glass rod and a lower organic layer containing the tetracyclines. Portions of 20.0 ml from these organic layers were filtered through Whatman No 42 filter papers into round bottom ground glass flasks. The filter papers were rinsed with 6 ml of dichloromethane and the washings were collected in the flasks. The solvent from each flask was removed, using a rotary evaporator, at a temperature of 30°C. Distillation was interrupted, when a viscous liquid remained in the flasks. Then, the contents of the flasks were redissolved in 4.0 ml of dichloromethane and transferred into 15 ml glass - stoppered centrifugal tubes containing 0.5 ml 1N phosphoric acid. The distillation flasks were rinsed with an additional volume of dichloromethane, (2.0 ml) which was added to the tubes. The tubes were agitated for 3 min. and then centrifuged for 15 min. at 2,500 g. From the upper acidic layers containing the tetracyclines, at least 200  $\mu\text{l}$  were pipetted into Durham tubes. A volume of 50  $\mu\text{l}$  from the content

of each tube was injected into the valve injector of the liquid chromatograph.

Each analysis was done in duplicate and standard curves were prepared by plotting the concentrations of tetracyclines ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ ) versus average peak heights.

## Results and discussion

The extraction of tetracyclines from eggs was most efficient when samples were buffered to pH 9 with sodium barbital solution in the presence of calcium chloride and phenylbutazone sodium salt solutions. No tetracyclines were detected in the extracts of fortified eggs, to which only calcium chloride solution had been added; the addition of sodium barbital solution resulted to a better but still poor extraction efficiency.

When the extraction process was repeated on aqueous solutions of tetracyclines, the efficiency of extraction arrived its maximum; however absence of phenylbutazone sodium salt solution resulted in a less efficient extraction.

From the above it was concluded that phenylbutazone increases the extraction efficiency, but cannot competitively displace tetracyclines from sites of protein binding. These results are in good agreement with the findings of previous investigators<sup>23</sup>.

Usage of ethylacetate<sup>23</sup> instead of dichloromethane as extracting agent should



FIG. 1 Chromatograms of an aqueous solution of tetracycline extracted with ethylacetate (a) or dichloromethane (b) ; a chromatogram (c) of control water extracted with ethylacetate is presented. Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  (20:80) with 0.01M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.6 with  $\text{HNO}_3$ ; column: 2.6X250 mm HC-ODS-SIL-X-1 (10  $\mu\text{m}$ ); column temperature: 30 $^\circ\text{C}$ ; flow rate: programmed (see text); detector: UV,  $\lambda = 361 \text{ nm}$ ; recorder sensitivity: 0.020 a.u./s.



be avoided because, as it is shown in Figure 1, extraction with ethylacetate results to a change of the chromatographic behaviour of tetracycline, by decreasing its retention time. This can be explained by considering the different solubilities, in water, of ethylacetate (5 ml dissolved in 50 ml water) and dichloromethane (1 ml dissolved in 50 ml of water)<sup>25</sup>. It seems that a certain amount of ethylacetate is dissolved in the phosphoric acid solution during the reextraction process. Consequently an injection volume of 50  $\mu$ l of the acidic solution will contain enough ethylacetate to change the chromatographic behaviour of tetracycline, apparently due to alteration in the partition process. The HC-ODS-SIL-X-I column, used for this analysis, had a constant activity over the entire period of this work. After each assay day, the column was washed free of buffer solution with a mixture of 20% acetonitrile - water to avoid unnecessary exposure of the packing material to low pH buffer overnight. Special column preconditioning such as washing with EDTA<sup>19</sup> was not required since no tailing was observed.

The absorption spectra of tetracyclines in the mobile phase, taken between 325-425 nm, indicated that the absorption maxima of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline were 357, 361 and 377 nm respectively. The wavelength of 361 nm was selected for their simultaneous determination.

Linear calibration curves were obtained (Figure 2) when the concentrations of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in the fortified eggs were plotted against peak heights.

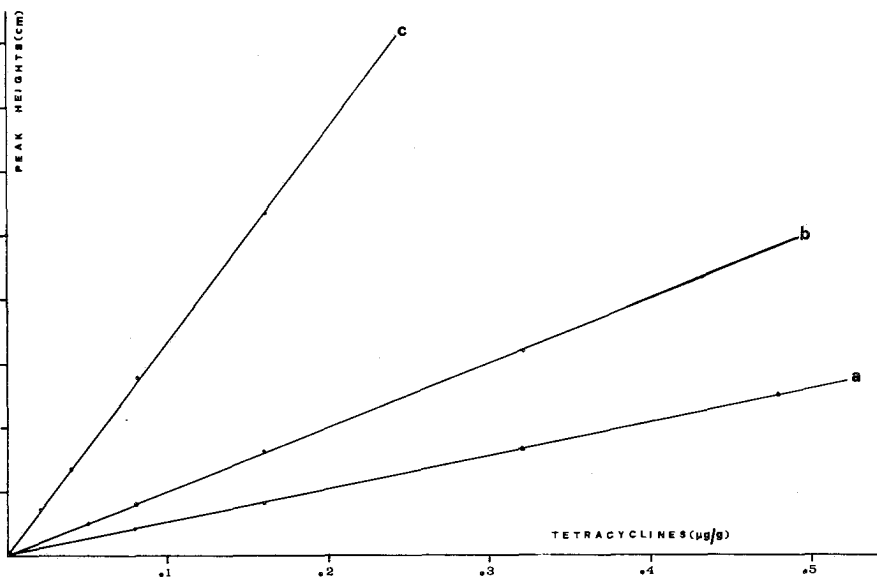


FIG. 2. Calibration curves for the determination of tetracyclines in eggs. (a) Chlortetracycline; (b) oxytetracycline; (c) tetracycline.

The limits of assay sensitivity in eggs were 0.016  $\mu$ g/gr for tetracycline 0.050  $\mu$ g/gr for oxytetracycline and 0.080  $\mu$ g/gr for chlortetracycline.

The precision and accuracy data of this method are presented in Table I; chro-

TABLE I: Precision and accuracy data for the determination of tetracyclines in eggs.

Tetracyclines	Tetracycline added (ppm)	Number of determinations	Mean tetracyclines found (ppm)	Standard deviation	Coefficient of variation %	Mean error	Relative error %
Oxytetracycline	0.080	6	0.082	0.0036	4.43	+ 0.002	2.50
	0.160	6	0.162	0.0076	4.72	+ 0.002	1.25
	0.320	6	0.333	0.0121	3.63	+ 0.013	4.06
	0.480	6	0.476	0.0273	5.73	- 0.004	0.83
Tetracycline	0.040	6	0.038	0.0020	5.39	- 0.002	5.00
	0.080	6	0.085	0.0031	3.60	+ 0.005	6.25
	0.160	6	0.170	0.0089	5.21	+ 0.010	6.25
	0.320	6	0.300	0.0100	3.35	- 0.020	6.25
Chlortetracycline	0.080	6	0.079	0.0067	8.46	- 0.001	1.25
	0.160	6	0.152	0.0159	10.42	- 0.008	5.00
	0.320	6	0.330	0.0102	3.10	+ 0.010	3.12
	0.480	6	0.457	0.0429	9.40	- 0.023	4.79

matograms of control and fortified egg extracts as well as of a standard aqueous solution of tetracyclines are shown in Figure 3. A single determination by this method can be completed in 1 hour.

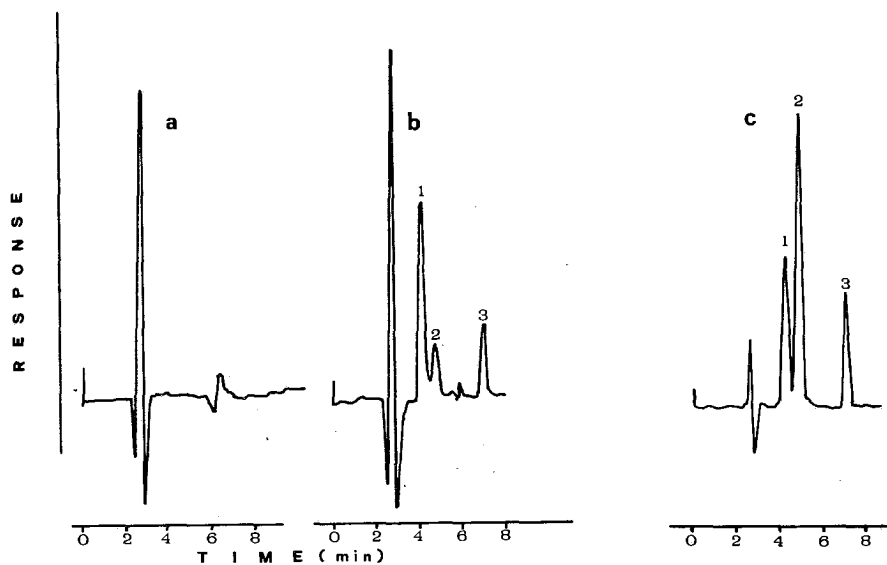


FIG. 3. Chromatograms of a control egg extract (a) a fortified one (b) and a std. aq. mixture of tetracyclines (c): chromatographic conditions as in Fig. 1. Peaks: 1, oxytetracycline; 2, tetracycline; 3, chlortetracycline.

### Περίληψη

Ποσοτικός προσδιορισμός τετρακυκλινών σε αυγά με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Η συχνή θεραπευτική χρήση των τετρακυκλινών και συγκεκριμένα της χλωροτετρακυκλίνης, της οξυτετρακυκλίνης και της τετρακυκλίνης στην περίπτωση των πουλερικών, σε συνδυασμό με τους κινδύνους που εγκυμονεί για τον άνθρωπο ή ύπαρξη καταλοίπων τέτοιων φαρμάκων στα εδάδιμα προϊόντα των πτηνών μας ώθησαν στη μελέτη μιας μεθόδου με μεγάλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό αυτών των αντιβιοτικών σε αυγά ορνίθων.

Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των τετρακυκλινών στα αυγά έγινε με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Προηγήθηκε σχηματισμός ζευγών ιόντων των τετρακυκλινών με φαινυλοβουταζόνη, παρουσία ιόντων ασβεστίου, και ακολούθησε εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο και επανεκχύλιση με αραιό φωσφορικό οξύ.

Χρησιμοποιήθηκε, για το διαχωρισμό, υγρο-χρωματογράφος (Perkin-Elmer Series 3) με στήλη χρωματογραφίας (HC-ODS-SIL-X-1, Perkin Elmer) εσωτ. διαμ. 2.6 mm και μήκους 250 mm. Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν silicagel 10 μm χημικά ενωμένο με υδρογονάνθρακα με 18 άτομα άνθρακα. Τα υγρά

έκλωσης της στήλης φωτομετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer LC-55B) απλής δέσμης -σε μήκος κύματος 361 nm.

Η κινητή φάση ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου - νερού (20:80) 0.01 M σε  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.6.

Στην εικ. 2 σημειώνονται καμπύλες αναφοράς των τετρακυκλινών σε αυγά.

Οι παραλαβές των ουσιών αυτών από αυγά που επιβαρύνθηκαν τεχνητά εκθέτονται στον πίνακα I, ενώ χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων από αυγά με και χωρίς τετρακυκλίνες παρουσιάζονται στην εικ. 3.

Με τις συνθήκες ροής που χρησιμοποιήθηκαν στον χρωματογράφο η οξυτετρακυκλίνη ελκούεται σε 4.1', η τετρακυκλίνη σε 4.6' και η χλωροτετρακυκλίνη σε 7'. Τα όρια μέτρησης των παραπάνω αντιβιοτικών στα αυγά είναι 16,50 και 80 ppb, αντίστοιχα.

## References

1. Raica, N., Heywang, B.W. and Kemmerer, A.R.: *Poultry Sci.* **35**, 884 (1954).
2. Katz, S.E., Fassbender, C.A. and Dowling J.J.: *J.A.O.A.C.* **55**, 128 (1972).
3. Smith, D.H.: *F.D.A. Papers* **2**, 10 (1968).
4. Kohn, K.W.: *Anal. Chem.* **33**, 862 (1961).
5. Kelly, R.G.: *J. Pharm. Sci.* **53**, 1551 (1964).
6. Ascione, P.P., Zagar, J.B. and Chrekian, C.P.: *J. Pharm. Sci.* **56**, 1393 (1967).
7. Kelly, R.G., Peets, L.J. and Hoyt, K.D.: *Anal. Biochem.* **28**, 222 (1969).
8. Ascione P.P. and Chrekian, G.P.: *J. Pharm. Sci.* **59**, 1480 (1970).
9. Radecka, C. and Wilson, W.L.: *J. Chromatogr.* **57**, 297 (1971).
10. Fike, W.W. and Brake, N.W.: *J. Pharm. Sci.* **61**, 615 (1972).
11. Tsuji, K. and Robertson, J.H.: *Anal. Chem.* **45**, 2136 (1973).
12. Knox, J.H. and Pryde, A.: *J. Chromatogr.* **112**, 171 (1975).
13. Chevalier, G., Bollet, C., Rohrbach, P., Risse, C., Caude, M. and Rosset, R.: *J. Chromatogr.* **124**, 343 (1976).
14. De Leenheer, A.P. and Nelis, H.J.C.F.: *J. Chromatogr.* **140**, 293 (1977).
15. Mack, G.D. and Ashworth, R.B.: *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 93 (1978).
16. Von Steinbach, D. and Strittmatter, T.: *Pharm. Z.* **123**, 1083 (1978).
17. Tsuji, K., Robertson, J.H. and Beyer, W.F.: *Anal. Chem.* **46**, 539 (1974).
18. Butterfield, A.G., Hughes, D.W., Wilson, W.L. and Pound, N.J.: *J. Pharm. Sci.* **64**, 316 (1975).
19. Knox, J.H. and Jurand, J.: *J. Chromatogr.* **110**, 103 (1975).
20. White, E.R., Carrol, M.A., Jarembo, J.E. and Bender, A.D.: *J. Antibiot.* **28**, 205 (1975).
21. Sharma, J.P., Perkins, E.G. and Bevill, R.F.: *J. Chromatogr.* **134**, 441 (1977).
22. Sharma, J.P., Koritz, G.D., Perkins, E.G. and Bevill, R.F.: *J. Pharm. Sci.* **66**, 1319 (1977).
23. Sharma, J.P. and Bevill, R.F.: *J. Chromatogr.* **166**, 213 (1978).
24. Knox, J.H. and Jurand, J.: *J. Chromatogr.* **186**, 763 (1979).
25. The Merck Index (9th edition) 494 and 791, Merck and Co., Rahway, N.J., 1976.

## **INVESTIGATION OF THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF NITROBENZOIC ACIDS AT CARBON FIBRE AND MERCURY ELECTRODES**

N. MISSAELIDIS, E. THEODORIDOU AND D. JANNAKOUDAKIS

*Laboratory of Physical Chemistry of the Aristotelian University, Thessaloniki*

(Received September 30, 1983)

### **Summary**

The reduction of the isomeric nitrobenzoic acids in aqueous, methanolic and acetonitrile solutions at carbon fibre electrodes – obtained by graphitization of polyacrylonitrile (PAN) – as well as at mercury electrodes, is comparatively studied.

For this purpose, the techniques of Cyclovoltammetry, Polarography and constant potential Electrolysis are employed.

It is found out that, in acid aqueous solutions the reduction of all three isomeric depolarizers takes place at the carbon electrodes in one four-electron step to the corresponding hydroxylamine, while at the mercury electrodes this reduction is also followed by a characteristic two-electron step to the corresponding amino- compound.

In methanolic solutions the reduction of the nitrobenzoic acids is facilitated at both electrodes, because the carboxylic groups existing in the depolarizer molecules act as proton-donors.

In acetonitrile solutions the behaviour of o-nitrobenzoic acid is greatly different from that of m- and p-isomers. In the case of the o-isomer a three-step reduction takes place, while in the case of the other two isomers only a two-step reduction occurs.

The different behaviour of the depolarizers studied at the above electrodes in all three solvent systems is discussed in detail.

**Key words:** Nitrobenzoic acids, carbon fibre and mercury electrodes, electrochemical reduction

### **Introduction**

During our recent studies in the field of nitrocompounds electroreduction at several electrodes – particularly at carbon fibre and mercury electrodes – the behaviour of nitrophenols and nitronaphthols, having in their molecule in addition to the electroactive also an electroinactive acidic group, has been investigated<sup>1-3</sup>.

Continuing the above research we wanted to study in the present work the electrochemical behaviour of the three nitrobenzoic acids. These depolarizers contain in their molecule besides the electroactive also a carboxylic group, which in both forms - dissociated or not - considerably influences their electrochemical behaviour.

This behaviour of the three isomeric nitrobenzoic acids (o-,m- and p-NBA) was comparatively studied at carbon fibre and mercury electrodes in aqueous, methanolic and acetonitrile solutions.

## Experimental

The whole investigation was carried out using the techniques of cyclic voltammetry, polarography and constant potential electrolysis. Bundles of carbon fibres (GY 70 fibres, Celanese Corp., USA) obtained by graphitization of polyacrylonitrile (PAN), were used as carbon electrodes. The current densities in the corresponding cyclic voltammograms refer to the electrochemically effective area of the carbon electrodes, which was determined comparing the peak currents of the reversible reaction  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e^- \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  at carbon fibre electrodes with those obtained at a Pt wire electrode having a fixed surface area.

The nitrobenzoic acids ("puriss. p.a.", Fluka AG) and methanol ("zur Analyse", Merck) were used as received. Acetonitrile ("puriss p.a.", Fluka AG) was further purified by the Donnell, Ayres and Mann procedure<sup>4</sup>.

All electrochemical experiments were carried out at 25<sup>0</sup>C.

## Results and Discussion

### *Behaviour in aqueous solutions*

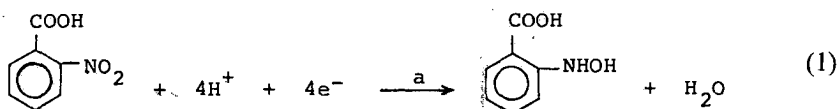
The cyclovoltammetric behaviour of o-NBA at carbon fibre electrodes in 10 % v/v methanol solutions was investigated first.

In acidic media the above depolarizer is reduced to the corresponding hydroxylamine. A second reduction wave to amine is not observed; only the appearance of a "shoulder" in the vicinity of the potential, where the supporting electrolyte deposition occurs, is noticed in some acidic solutions. Because of the amine formation the deposition of the supporting electrolyte takes place at more positive potentials than in the corresponding acidic solution without depolarizer, i.e. a remarkable decrease of the hydrogen overvoltage is noticed, caused by the catalytic effect of the amine.

The quantity of current calculated during the electrolysis at carbon electrodes with big surface area, at potentials a little more negative than that of the first cathodic step, indicates a four-electron reduction.

Fig. 1 illustrates, as an example, the cyclic voltammograms of o-NBA in acidic buffer solution with pH 2.

The observed cathodic step (peak a,  $E_p = -0,5$  V) corresponds to the electrochemical reaction:



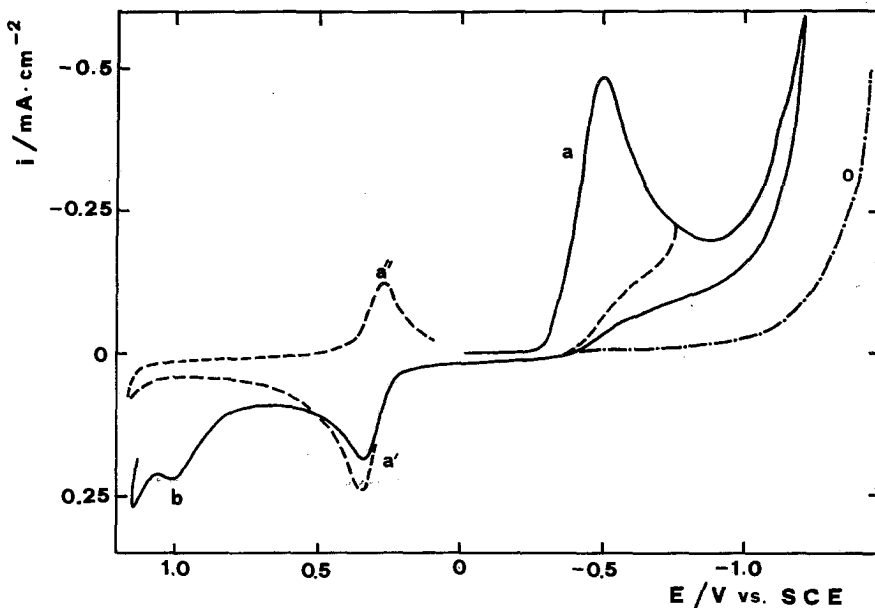
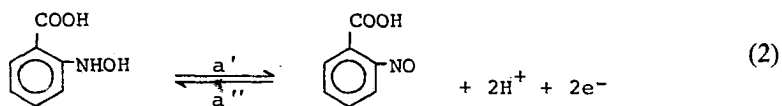


FIG. 1. Cyclic voltammograms ( $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of *o*-NBA ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ) on carbon fibre electrodes. Curve 0: hydrogen overvoltage on carbon.  $\text{pH} = 2$ .

In the anodic potential sweep two steps (a' and b) appear. Peak a' corresponds to the oxidation of the hydroxylamine to the respective nitroso-derivative, peak b to the oxidation of the amine. The latter becomes more intensive, when the electrode remains at the potential value  $-1,2 \text{ V}$  for a few minutes. This indicates a formation of the corresponding amine at the potential range, where the supporting electrolyte is reduced. On the other hand, as Fig. 1 shows, the deposition of the supporting electrolyte in fact takes place at more positive potential values than in the same acidic solution without depolarizer in the bulk (curve 0 in Fig. 1), i.e. the amine formed causes also a significant decrease of the hydrogen overvoltage on carbon electrodes in acidic aqueous solutions.

Potential cycling after the cathodic step a, f.i. at  $-0,75 \text{ V}$ , results in the cyclic voltammogram illustrated by the dotted line in Fig. 1. At the anodic sweep of this voltammogram only the oxidation step a' appears, which yields the reduction step a'' during the subsequent cathodic sweep. These two peaks correspond to the reversible redox system hydroxylamine-nitrosocompound:

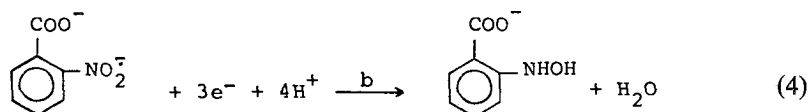
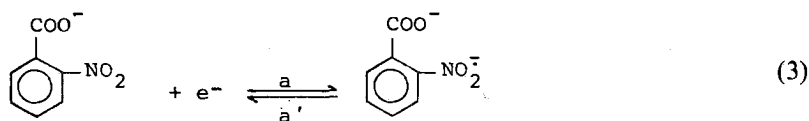


In this latter case, illustrated by the dotted line in Fig. 1, amine is by no means formed, as it is indicated by the disappearance of the oxidation peak b.

As far as the pH influence on the  $E_p$  values is concerned, we can see a normal shift of about 60 mV pro pH-unit within the acidic region.

In weakly alkaline solutions a similar behaviour to that of the acidic solutions is observed. The only difference is that the reduction potential remains here independent of the pH-change. Furthermore, reduction to the corresponding amine is never observed in this case, even at the potential range of the supporting electrolyte deposition.

The reduction mechanism of o-NBA is totally changed in strong alkaline solutions, where double reduction waves are obtained. The first wave is due to the formation of the respective radical anion arising through the capture of one electron by the anions of o-NBA and the second one to the further reduction to hydroxylamine. That is to say, in this case, a separation of the cathodic wave to an one-electron and a multi-electron step takes place, without an inhibitor presence in the solution. Obviously, the separation of the four-electron reaction in two partial steps is caused by the presence of the ionic form of the carboxylic group:



In Fig. 2 the cyclic voltammograms of o-NBA on carbon fibre electrodes at pH 12 are represented. The first peak (a), due to the formation of the radical anion, appears at -0,85 V - i.e. at the same potential, where the four-electron reduction in the weak alkaline solutions occurred - whereas the further reduction of the radical anion to hydroxylamine takes place at considerably more negative potentials. There exists hence a clear difference of 400 mV between the two steps.

In the anodic potential sweep, peak b', due to the oxidation of hydroxylamine, is observed. The nitrosocompound, formed in peak b', is reversibly re-reduced in peak b''. Stopping of the potential sweep at -0,95 V results in the appearance of peak a' in the reverse cycle, which corresponds to the reversible oxidation of the radical anion, according to reaction (3).

Substitution of the carbon fibre electrodes with the dropping mercury electrode has a considerable effect on the mechanism of the o-NBA reduction in acidic media. Up to pH 5, a characteristic reduction of o-NBA to the corresponding amine is noticed, as it is shown by the polarogram of Fig. 3.

The four-electron reduction to hydroxylamine takes place on Hg at -0,2 V, i.e. at more positive potentials than on carbon in the same buffer solution ( $E_p = -0,5$  V, Fig. 1), while the further two-electron reduction to amine occurs at -0,6 V.



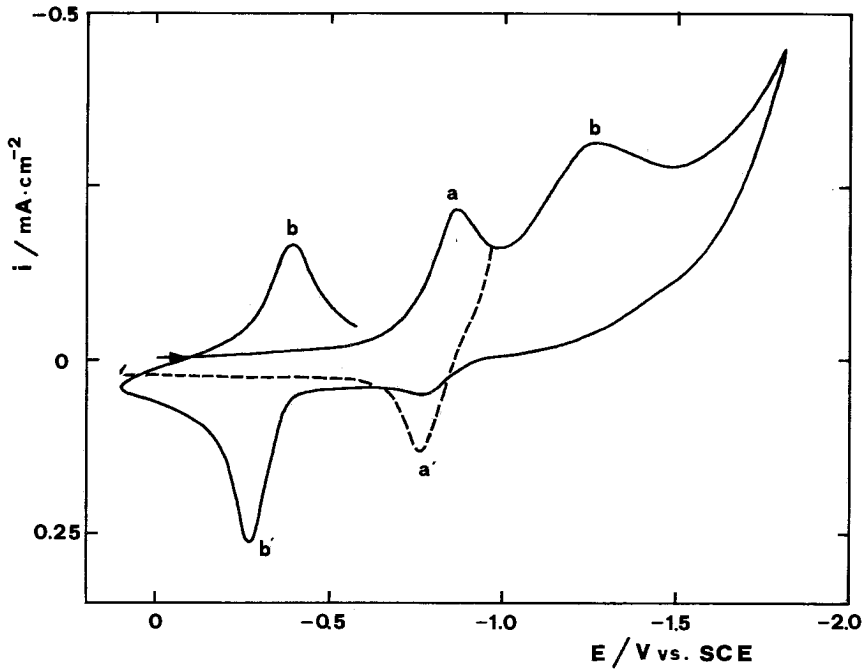


FIG. 2. Cyclic voltammograms ( $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of *o*-NBA ( $c = 10^{-3}$ ) on carbon fibre electrodes.  $\text{pH} = 12$ .

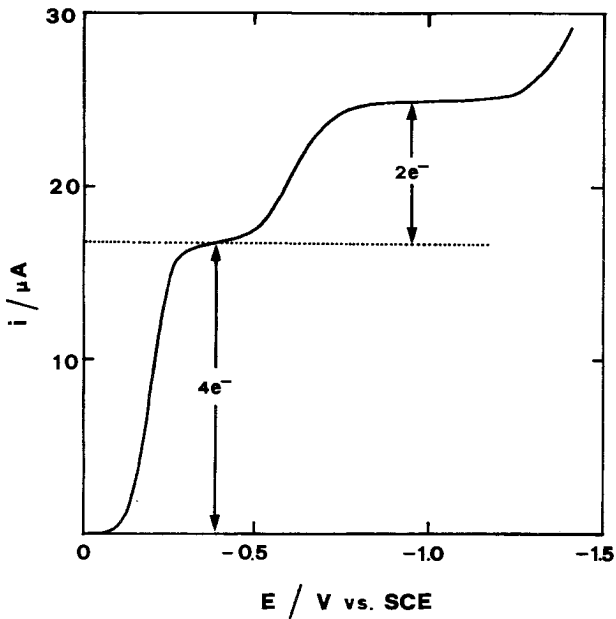


FIG. 3. Polarogram of *o*-NBA ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ).  $\text{pH} = 2$ .

The difference in the potential value of the four-electron step between the two electrodes may be attributed to a stronger adsorption of the depolarizer on the carbon fibre electrodes. Even more the reduction product of *o*-NBA, i.e. the hydroxylamine-derivative, may remain strongly adsorbed on the carbon electrodes; therefore, the further reduction of hydroxylamine takes place at much more negative potentials, almost at the position of the supporting electrolyte reduction wave.

The pH dependence on  $E_{1/2}$  is expressed by a straight line with a normal slope of 60 mV pro pH-unit, up to pH value equal to 3. Beyond this value, the slope of the straight line changes and becomes 75 mV pro pH-unit up to pH 7. This change is attributed to the fact that, at higher than 3 pH values the anions of *o*-NBA are predominant in the solution, since the pK of *o*-NBA in 10 % v/v methanolic solutions is equal to 2,4. This behaviour is in accordance with the results of Heyrovsky and Vavricka, who have attributed the appearance of a "break" in the  $E_{1/2}$  vs. pH plots to the different rate of the depolarizers molecular form protonation than that of their ionic form, when these depolarizers contain also an acidic group in their molecule<sup>5</sup>.

In weakly alkaline solutions *o*-NBA is reduced on mercury in a four-electron wave, whereas in strong alkaline solutions the one-electron step, caused by the formation of the radical anion, appears. The potential difference between the one-electron and the multi-electron step is on mercury less intensive in comparison to that on carbon, as it is shown by the polarogram of Fig. 4.

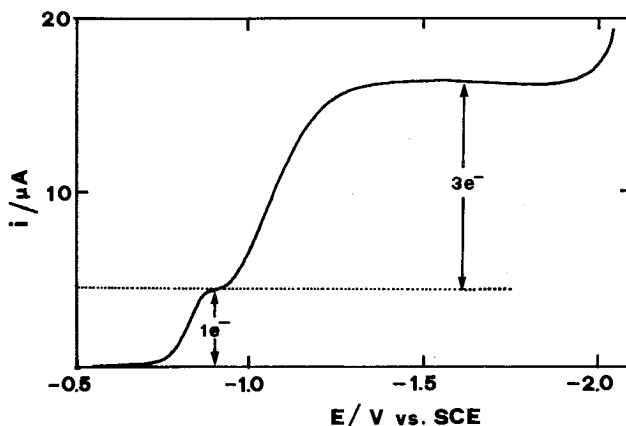


FIG. 4. Polarogram of *o*-NBA ( $c = 10^{-3} M$ ). pH = 12.

The electrochemical behaviour of the other two isomers (*m*- and *p*-NBA) is essentially the same to that of *o*-NBA on both electrodes. Only little differences exist between the reduction potentials of the three compounds in acidic solutions (f.i. at pH 1 :  $E_{1/2}$  of *p*-NBA = -0,085 V,  $E_{1/2}$  of *m*-NBA = -0,115 V and  $E_{1/2}$  of *o*-NBA = -0,140 V).

The break at the linear parts of the  $E_{1/2}$  vs. pH plots appears also in the case of

m- and p-NBA. In this case the change of the slope takes place at greater than 4, pH values, i.e. in the vicinity of the pK (pK is equal to 3,6 in 10 % v/v methanolic solutions for both compounds) of these two isomers.

#### Behaviour in methanolic solutions

In methanolic solutions double reduction waves appear at carbon electrodes for all three isomeric nitrobenzoic acids. However, the first wave is not due to the formation of the respective radical anion, but to the facilitated reduction of 1/4 of the molecules, because of the presence of the carboxylic group in the molecule of these depolarizers, which acts as proton donor in methanolic solutions.

In Fig. 5 (curve 1) the cyclic voltammogram of o-NBA on carbon fibre electrodes in methanol, with the presence of  $\text{LiClO}_4$  as supporting electrolyte, is represented.

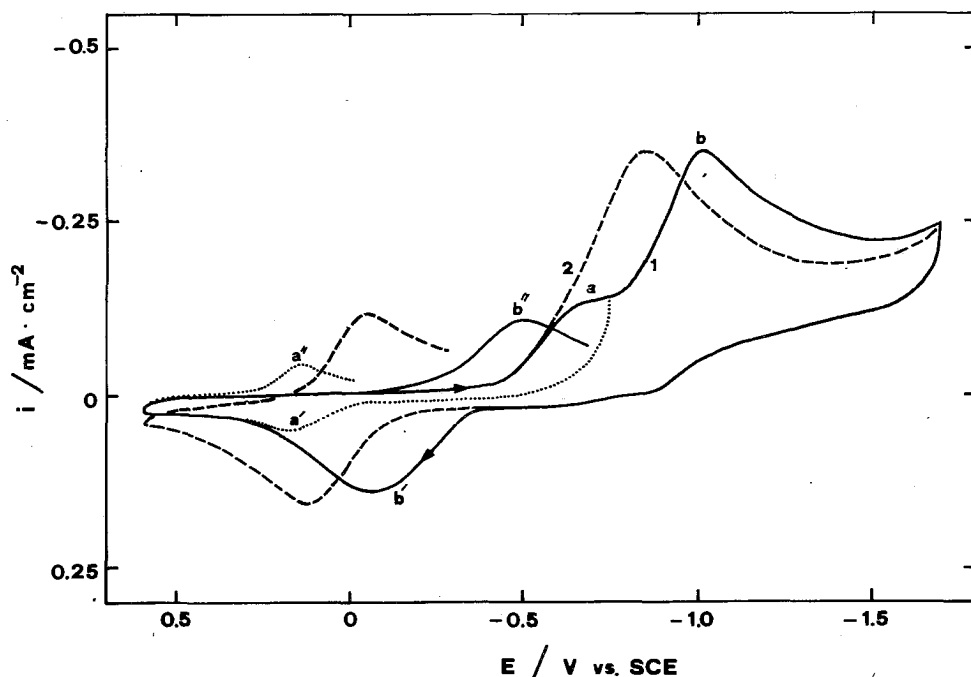
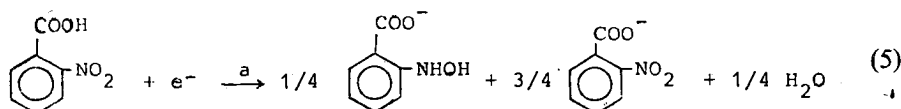
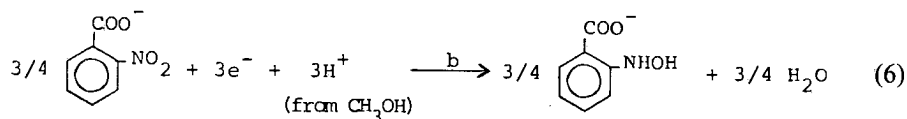


FIG. 5. Cyclic voltammograms ( $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of o-NBA ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ) on carbon fibre electrodes in methanol ( $\text{LiClO}_4$  0,1 M), 1) in the absence, 2) in the presence of  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$  ( $c = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ).

The two reduction peaks (a and b) are due respectively to the facilitated or not reduction:

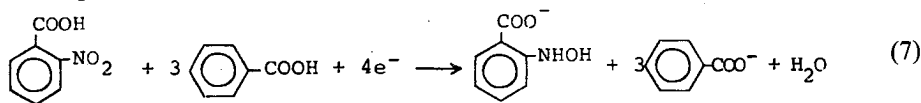




The fact, that potential cycling after the pre-wave (a) results in the appearance of the peak pair (a', a''), due to the reversible system phenylhydroxylamine-nitrosocompound, provides further evidence, that peak (a) is not caused by the formation of the radical anion.

Subsequently, the presence of the carboxylic group in the molecule of the depolarizer has a similar effect on its reduction at carbon electrodes as the introduction of an equimolecular quantity of benzoic acid to methanolic solutions of depolarizers, without a proton-donating group in their molecule<sup>6</sup>.

When a threefold quantity of benzoic acid (with respect to that of the depolarizer) is introduced, the whole reduction wave is shifted towards more positive potentials (curve 2 in Fig. 5):



Shape and height of this wave do not change, if an excess of benzoic acid is added in the solution.

A similar behaviour of the *o*-NBA reduction in methanol, in the presence or absence of benzoic acid, is also polarographically observed (Fig. 6).

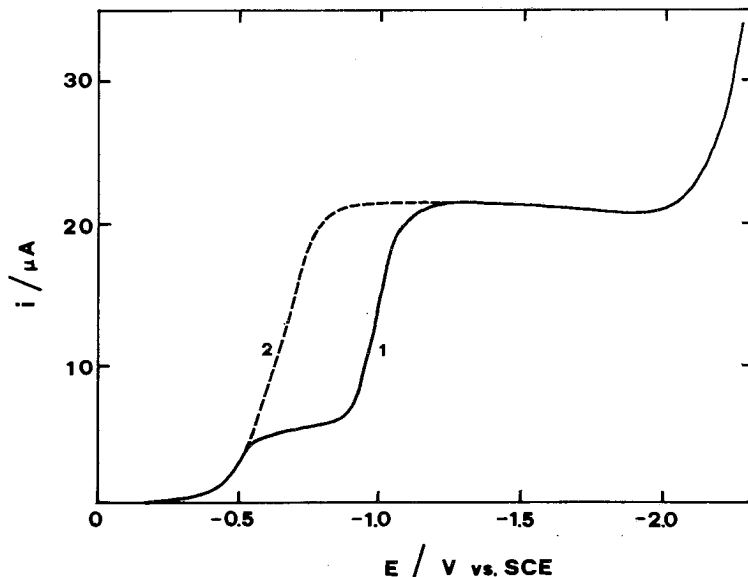


FIG. 6. Polarograms of *o*-NBA ( $c=10^{-3} M$ ) in methanol ( $\text{LiClO}_4$  0,1 M), 1) in the absence, 2) in the presence of  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$  ( $c=3 \cdot 10^{-3} M$ ).

The half-wave potentials of all three isomers have almost the same value in methanolic solutions.

In the cyclic voltammograms on carbon fibre electrodes as well as in the polarograms on the dropping mercury electrode, the position of the second reduction wave in methanol is exactly the same with that of the single reduction wave in the presence of a LiOH excess; this fact proves that the second wave is really due to the reduction of the depolarizer anions<sup>7</sup>.

The electrochemical behaviour of the other two isomers does not significantly differ from that of the *o*-isomer in methanolic solutions; the only difference is that the separation between the two waves is less intensive in the case of the *m*- and *p*-isomers.

#### *Behaviour in acetonitrile solutions*

The electrochemical behaviour of *o*-NBA is different from that of the other two isomers in acetonitrile solutions.

The cyclic voltammograms of the *o*-isomer on carbon fibre electrodes have only two reduction steps (a and b), as it is shown in Fig. 7, while in the case of the other two isomers three reduction steps appear, as Fig. 8 for *p*-NBA shows.

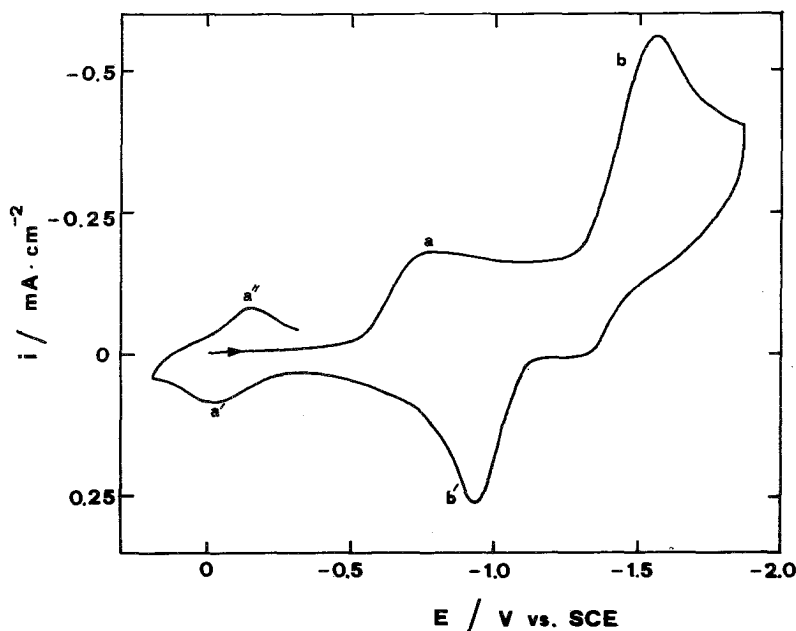


FIG. 7. Cyclic voltammogram ( $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of *o*-NBA ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ) on carbon fibre electrodes in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{Et}_4\text{NClO}_4$   $0.1 \text{ M}$ ).

The first step in both cases is due again to the facilitated reduction of the 1/4 of the depolarizer molecules, i.e. the presence of the carboxylic group has a similar action to that of an equimolecular quantity of benzoic acid in the reduction of depolarizers not having carboxylic groups in their molecule<sup>6,8</sup>.

The remaining anions in the case of *o*-NBA are very difficultly reduced, so that

the one-electron wave is blended with the multielectron one (step b in Fig. 7). On the contrary, in the case of the other two isomers, the first electron capture by the remaining anions is not so difficult, so that the one-electron step appears very clearly (peak c in Fig. 8).

In conclusion, a strong inductive effect of the  $-\text{COO}^-$  group, being close - in o-position - to the  $-\text{NO}_2$  group, is observed in the acetonitrile solutions.

In the case of m- and p-NBA the appearing peak c (Fig. 8) is really due to the formation of the corresponding radical anion, as it is proved by the fact, that potential cycling after peak c gives the reversible oxidation peak of the radical anion (peak c' in Fig. 8).

In the cyclic voltammograms of the figures 7 and 8, peak b' is due to the oxidation of the hydroxylamine derivative, formed at the reduction wave b, while peak a' is caused by the oxidation of the hydroxylamine, formed at the pre-wave a.

When a threefold benzoic acid quantity is added to the acetonitrile solutions of the nitrobenzoic acids, a single reduction wave appears, shifted to more positive potential values, i.e. at the position of the initial pre-wave. A similar behaviour is observed, when we use as electrodes thermally oxidized carbon fibres, which have carboxylic groups on their surface<sup>6</sup>. The two reduction steps are here replaced by a single, positively shifted, wave at a depolarizer concentration of  $5 \cdot 10^{-4}$  M, as it has been also observed in the case of nitrobenzene<sup>6</sup> and nitroethane<sup>9</sup>.

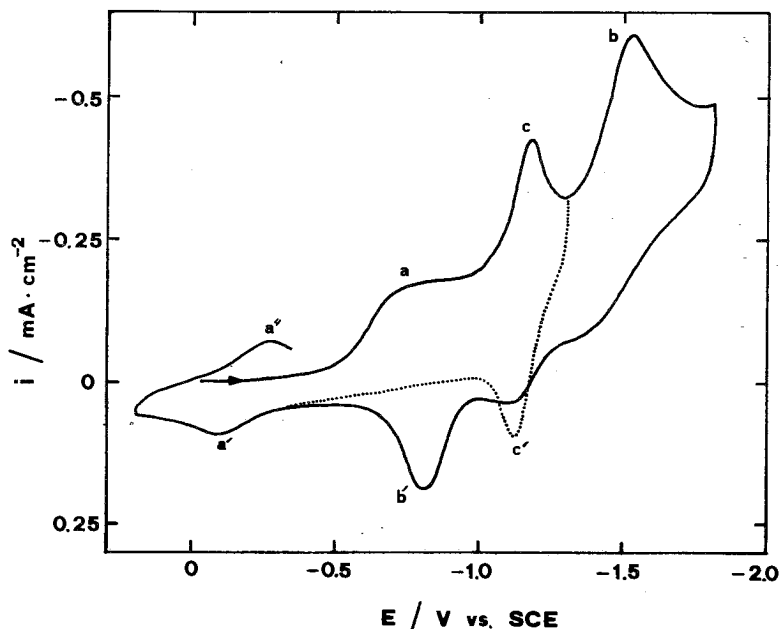


FIG. 8. Cyclic voltammogram ( $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of p-NBA ( $c = 10^{-3} \text{ M}$ ) on carbon fibre electrodes in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{Et}_4\text{NClO}_4$  0,1 M).

The action of the electrode surface carboxylic groups is most evident on the reduction of o-NBA in acetonitrile, where a remarkable difference between the first and the second reduction step exists, so that the increase of the pre-wave

constitutes a measure of the carbon fibres oxidation extent. In Fig. 9 the cyclic voltammogram of thermally oxidized fibres (heating at 150°C for 40 h in the presence of water vapor) is given as an example.

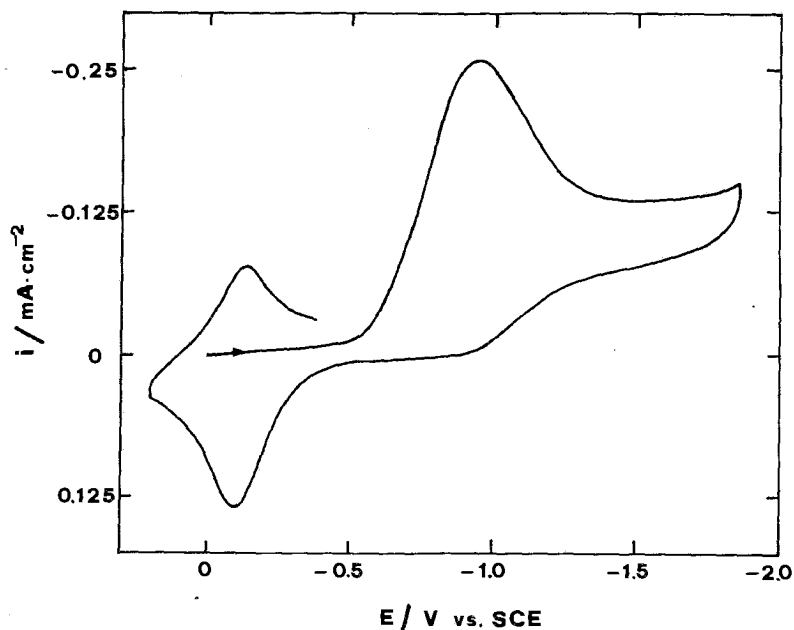


FIG. 9. Cyclic voltammogram ( $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$ ) of *o*-NBA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) on thermally oxidized carbon fibres in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{Et}_4\text{NClO}_4$  0,1 M).

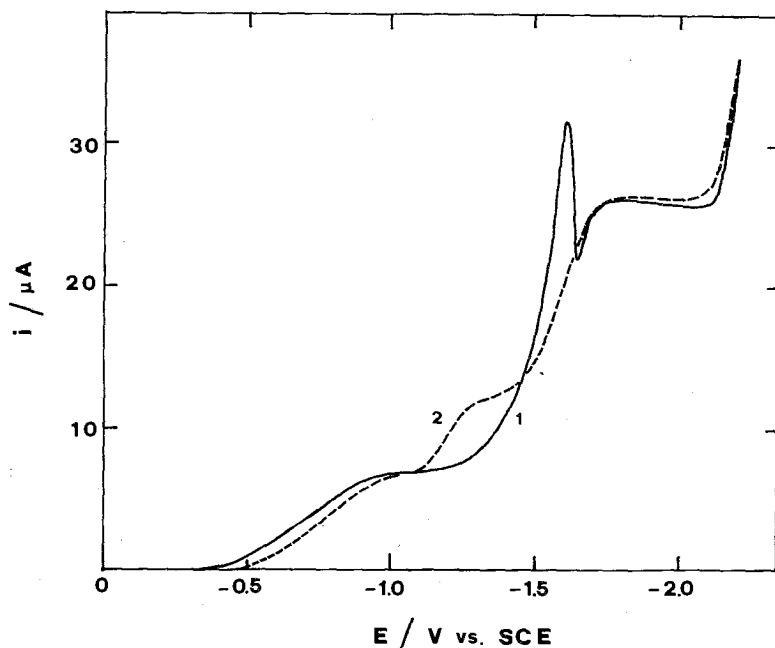


FIG. 10. Polarograms of *o*-NBA (curve 1) and *p*-NBA (curve 2) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{Et}_4\text{NClO}_4$  0,1 M).  $c = 10^{-3} \text{ M}$ .

The polarographic behaviour of o-NBA in acetonitrile is also different from that of the other two isomers. In the case of the o-isomer two waves appear, the second having a maximum, whereas the other two isomers undergo reduction in three steps. In Fig. 10 the polarograms of o- and p-isomer are comparatively given. The m-isomer polarogram is similar to that of the p-isomer.

Studying the polarograms of the three isomers we come to the conclusion that the first electron capture by the remaining anions is really hindered in the case of the o-isomer. The further reduction to the hydroxylamine-derivative takes place at the same potential, where the first electron is captured and this is the reason for the appearance of the characteristic maximum.

## Περίληψη

*Μελέτη της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς νιτροβενζοϊκών οξέων σε ηλεκτρόδια ινών άνθρακα και υδραργύρου*

Μελετάται συγκριτικά η αναγωγή των ισομερών νιτροβενζοϊκών οξέων σε υδατικά, μεθανολικά και ακετονιτριλικά διαλύματα, σε ηλεκτρόδια αποτελούμενα από ίνες άνθρακα, που λαμβάνονται από τη γραφίτοποίηση του πολυακρυλονιτριλίου, ως και σε ηλεκτρόδια υδραργύρου.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της κυκλοβολταμετρίας, της πολαρογραφίας και της ηλεκτρολύσεως σε σταθερό δυναμικό.

Διαπιστώνεται ότι στα όξινα υδατικά διαλύματα η αναγωγή και των τριών ισομερών αποπολωτών γίνεται στα ηλεκτρόδια του άνθρακα σε μία τετραηλεκτρονική βαθμίδα προς την αντίστοιχη υδροξυλαμίνη, ενώ στα ηλεκτρόδια υδραργύρου η αναγωγή αυτή ακολουθείται και από μία εμφανή διηλεκτρονική βαθμίδα προς την αντίστοιχη αμινοένωση.

Στα μεθανολικά διαλύματα και στις δύο περιπτώσεις των ηλεκτροδίων συμβαίνει μία έντονη διευκόλυνση της αναγωγής λόγω της δράσεως των καρβοξυλικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο του αποπολωτή ως δοτών πρωτονίων.

Στα ακετονιτριλικά διαλύματα η συμπεριφορά του ο-νιτροβενζοϊκού οξέος διαφέρει σημαντικά από αυτή του μ- και π-ισομερούς. Στην περίπτωση του ο-ισομερούς λαμβάνει χώρα αναγωγή σε τρεις βαθμίδες, ενώ στα άλλα δύο ισομερή σε δύο μόνο βαθμίδες.

Συζητείται λεπτομερώς η διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των αποπολωτών που μελετήθηκαν στα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν και στα τρία διαλυτικά συστήματα.

## References

1. Jannakoudakis D. and Theodoridou E.: *Z. Naturforsch.* **35b**, 705 (1980).
2. Theodoridou E. and Jannakoudakis D.: *Z. Naturforsch.* **36b**, 840 (1981).
3. Theodoridou E., Karabinas P. and Jannakoudakis D.: *Z. Naturforsch.* **37b**, 97 (1982).
4. O'Donnell J.F., Ayres J.T. and Mann C.K.: *Anal. Chem.* **37**, 1161 (1965).
5. Heyrovsky M. and Vavricka S.: *J. Electroanal. Chem.* **36**, 223 (1972).
6. Theodoridou E. and Jannakoudakis A.D.: *Z. Phys. Chem. Neue Folge* **132**, 175 (1982).
7. Jannakoudakis D. and Wildenau A.: *Z. Naturforsch.* **22b**, 118 (1967).
8. Jannakoudakis P.D. and Theodoridou E.: *Z. Phys. Chem. Neue Folge* **130**, 167 (1982).
9. Theodoridou E., Jannakoudakis A.D. and Jannakoudakis D.: *Z. Phys. Chem. Neue Folge* **134**, 227 (1983).



## **MECHANISM OF PHOTOCHROMISM AND THERMOCHROMISM OF SOME SALICYLIDENEDEHYDROABIETYLAMINES AND SALICYLIDENE -6- AMINOMETHYLDEHYDROABIETATES\***

E. HADJLOUDIS and J. ARGYROGLOU

*Chemistry Departement, Nuclear Research Center "Demokritos" Aghia Paraskevi, Attiki, Greece*

(Received November 9, 1983)

\* Partly presented in the 16th European Congress on Molecular Spectroscopy, Sept. 12-16, 1983 Sofia, Bulgaria.

### **Summary**

A number of 6-aminodehydroabietate and dehydroabietomethylamine Schiff bases have been synthesized and their photochromic and thermochromic properties have been investigated in the crystalline state, in rigid glasses and in solution, in a variety of solvents over a range of temperature and solute concentrations and the results were compared with those of salicylideneanilines.

Among the compounds studied in the crystalline state, some of them are found to be both photochromic and thermochromic against solid salicylideneanilines which are either photochromic or thermochromic but not both.

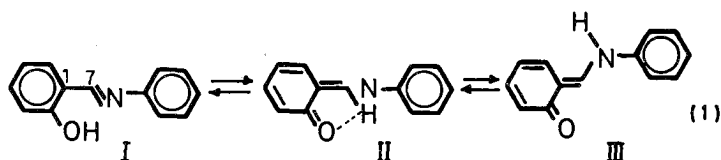
**Key words:** Flash photolysis, energy of activation, spectra, irradiation

### **Introduction**

Salicylideneaniline (I) and its derivatives exhibit in the crystalline state photochromic or thermochromic phenomena, i.e. they show a reversible colour change, mostly from yellow to red, as a result of ultraviolet irradiation or under variation of temperature<sup>1,2</sup>.

It was suggested<sup>3,4</sup> that the appearance of these phenomena depend upon the structure of the compounds, since no correlation exists between photosensitivity and the chemical nature of the ring substituents. Thus, in the crystalline state, an "open" crystal structure associated with non-planar molecules and allowing molecular movement, is necessary in order to allow photochromism, whereas in thermochromic crystals the molecules are planar and closely packed. Structural studies<sup>5,6</sup> support this idea.

The presence of the ortho-OH group is considered to be an essential condition for both phenomena and the following model is proposed<sup>2,7</sup> to explain the mechanism in the solid state: in planar molecules exhibiting thermochromism, there is a temperature sensitive equilibrium (Eq. 1), between two tautomeric forms: a yellow "enol" form, the "OH-form" (I) stable at low temperature, where the chelating hydrogen is covalently bonded to the oxygen and a red quinoid "keto" form, the "NH-form" (II) at high temperatures, with the hydrogen covalently bonded to the nitrogen. The intramolecular proton transfer would thus occur in the thermochromic systems both in the ground and the excited electronic state, whereas in photochromic systems this transfer occurs only in the excited electronic state<sup>8,9</sup>.



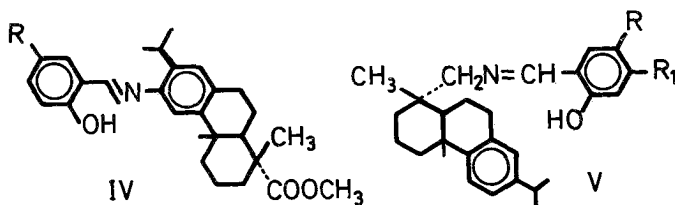
This is, according to the proposed model, a result of the fact that too high an energy would be required for proton transfer in the ground state in view of the non-planarity of the photochromic molecules and thus an E-keto form (III) may be produced.

In a more recent work<sup>10</sup> with salicylidene-2-aminopyridines it was found that the appearance of the thermochromic phenomenon in the solid state depends upon the crystal structure and the molecular orientation of the compounds and in another, with salicylideneanilines, the presence of the keto and enol forms was demonstrated<sup>11</sup>.

In solution the process is so fast that photochromism can only be followed by flash photolysis techniques. Thus a transient species was observed<sup>12,13</sup> with a spectrum similar to that of the photoproduct in rigid solution and, on the basis of two transients observed later<sup>14</sup>, it was suggested that photochromism involves, in addition to proton transfer, a simultaneous rotation around the C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> and C<sub>7</sub>-N bonds. Recent experiments using picosecond and nanosecond emission spectroscopy resulted in the observation of bimolar fluorescence kinetics which appear to represent excited state vibrational relaxation occurring on a 10 ps time scale, quite unusual for such large molecules<sup>15</sup>.

In conclusion, the nature of the coloured species in the solid state and the photochromic mechanism in solution are still subjects for research. The purpose of the present paper is to report the results of our studies on thermochromism and photochromism in a number of salicylidene-6-aminomethyldehydroabietate (IV) and salicylidenedehydroabietylamine (V) Schiff bases which present interest as bacteriostatic and fungistatic agents<sup>16</sup> and to compare them with their benzene analogs (I).

The studies compounds of group IV are: 1 (R=H), 2 (R=CH<sub>3</sub>) and 3 (R=Cl) and of group V: 4 (R=CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=H), 5 (R=H, R<sub>1</sub>=N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6 {R=H, R<sub>1</sub>=H (no ortho-OH group)}, and 7 {R=CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=H (NHCH<sub>2</sub> instead of N=CH)}.



These Schiff bases in comparison with salicylideneanilines have lower symmetry and present increased breadth (addition of two more rings in the aniline part of the molecule) and therefore substantial structural differences are expected which could affect both the photochromic and thermochromic properties, if present.

### Experimental

The salicylidene-6-aminomethyldehydroabietate (IV) and salicylidenedehydroabietylamine (V) Schiff bases were prepared according to published processes<sup>17,18</sup> and summarized in Table I. All the compounds were purified by repeated

TABLE I. Salicylidenehydroabietylamines and salicylidene-6-aminomethyldehydroabietates.

Compound	M.p. °C	Calculated%			Found%		
		C	H	N	C	H	N
1	162-163	74.83	7.85	3.23	74.98	7.94	3.42
2	153-154 <sup>18</sup>	77.85	8.27	3.13	78.14	8.40	3.01
3	157-157.5	72.00	7.10	3.00	72.14	7.13	3.08
4	138-139	83.37	9.18	3.47	83.67	9.07	3.58
5	182-183	80.55	9.25	6.28	80.81	9.18	6.59
6	102-102.5	86.86	9.38	3.75	87.11	9.80	3.82
7	108-109	82.96	9.62	3.45	83.35	10.04	3.55

recrystallization from ethanol. Infra-red spectra of the compounds 1-3 showed strong absorption around 1720 and 1620  $\text{cm}^{-1}$  characteristic of the CO and  $>\text{C}=\text{N}-$  groups and compounds 4-7 around 1620  $\text{cm}^{-1}$  characteristic of the  $>\text{C}=\text{N}-$  group.

The mass spectra showed the following prominent ions: Compound 2,  $m/e$  447 ( $\text{M}^+$ ), 432, 371, 314, 250. Compound 4,  $m/e$  388 ( $\text{M}^+$ ), 251, 194, 185, 173. Compound 5,  $m/e$  432 ( $\text{M}^+$ ), 415, 237, 176, 160. Compound 6,  $M/e$  358 ( $\text{M}^+$ ), 373, 225, 185, 173, 155.

Crystalline thin films were prepared from the melt between two quartz optical plates under pressure. The films were examined under polarized microscope and showed pleochromism.

The experiments in rigid glasses were conducted with solutions in EPA (ether: isopentane: alcohol, 1:5:5) at liquid nitrogen temperature and in polymerized methyl methacrylate (PMMA) at room temperature and at liquid nitrogen temperature. In these rigid media, the fading of the photo-colour was not appreciable during the measurements and therefore, all the spectra were obtained satisfactorily. No correction was made to the spectra for concentration of the solution on cooling as this was found to be less than 10% in EPA and of the order of 5% in PMMA.

Absorption spectra were recorded on a Cary-17 spectrophotometer. A quartz Dewar vessel with quartz windows was used for the measurements of optical spectra in thin films and rigid glasses at low temperatures.

Steady-state irradiations were carried out with a 200W high pressure Hg lamp and appropriate filters.

The flash photolysis apparatus had a 100W quartz-iodine lamp as the analysing source; it was focused by means of quartz lenses through the long axis of the flash photolysis cells onto the entrance slit of a Hilger-Watts grating monochromator. The output of an EMI 9660 B Photomultiplier tube was fed via a cathode to a Tektronix 545B oscilloscope equipped with a 1A5 plug-in unit and a C-12 Tektronix camera. The photolytic flash had a width at half-height of about 30 $\mu$ s at full power. The sample in a quartz cell 20cm long was placed between two krypton flashlamps. Concentrations were generally 10<sup>-4</sup>M. For variable temperature studies the flash cell was mounted in an optical quartz Dewar and was cooled by a flow of heated liquid nitrogen. The temperature inside the Dewar was monitored by an iron-constantan thermocouple, the voltage of which regulated a relay to control a heating coil which boiled the liquid nitrogen. A fresh solution was used after each flash.

Reaction rate constants were determined by a least-squares approximation of first and second order reactions using a computer.

## Results

### *Photochemical and Thermochemical Experiments in the Crystalline State.*

*Polycrystalline Powders.* By screening the compounds of group IV in the form of polycrystalline powders for photochromic and thermochromic properties, it was found that compound 1 presents, although weakly, both photochromic and thermochromic phenomena. Thus the compound changes reversibly from yellow, at room temperature, to white, at liquid nitrogen temperature; this white colour turns to red under UV-irradiation at liquid nitrogen temperature. The yellow crystals at room temperature do not change colour under UV-irradiation, indicating that the photochromic phenomenon operates at low temperatures films. This will be clear later with experiments in thin polycrystalline films. The compound shows weak fluorescence at room temperature and stronger at liquid nitrogen temperature.

Compound 2 is photochromic at room temperature down to liquid nitrogen temperature. The colour changes on UV-irradiation from light yellow to red-orange. The process is reversible, thus the compound returns to its original colour

thermally or under visible light. The compound is non-fluorescent and presents no change in colour with temperature.

Compound 3 behaves in general like compound 1.

Among compounds of group V, compound 4 behaves like compound 1 and compound 5 is only thermochromic and fluorescent.

Compounds 6 and 7 are inactive against heat or light and are not fluorescent.

All the above results are summarized in Table II.

TABLE II. Effect of Light and Heat on the Crystalline Salicylidenedehydroabietylaminates and Salicylidene-6-aminomethyldehydroabietates

Compounds	Effect of Light	Effect of Heat	Fluorescence	Property
	reversible colouration	reversible colouration	fluorescent	photo/thermochromic
2	reversible colouration	inactive	non-fluorescent	photochromic
3	reversible colouration	reversible colouration	fluorescent	photo/thermochromic
4	reversible colouration	reversible colouration	fluorescent	photo/thermochromic
5	inactive	reversible colouration	fluorescent	thermochromic
6	inactive	inactive	non-fluorescent	inactive
7	inactive	inactive	non-fluorescent	inactive

*Thin Films.* The results with polycrystalline powders are exemplified with experiments in thin polycrystalline films. Fig. 1(a) shows the photochromic phenomenon at  $-40^{\circ}\text{C}$  together with thermochromic one for compound 1. Irradiation at room temperature brings no change in the spectrum. However, an examination for photochromism over a range of temperature shows that there is a "working range" between  $-70^{\circ}\text{C}$  and  $-100^{\circ}\text{C}$  in which the phenomenon appears stronger. Figs. 1(b), (c) and (d) show the photochromic phenomenon of compounds 2 and 3, the photochromic/thermochromic properties of compound 4.

Finally, as it was noted with their powders also, compounds 6 and 7 are inactive; their thin films remain, under UV-irradiation or variations with temperature, unchanged.

In Figs. 1(a) and (b) the fluorescence spectra of compounds 1 and 3 in the same thin films; are displaced for reasons of comparison.

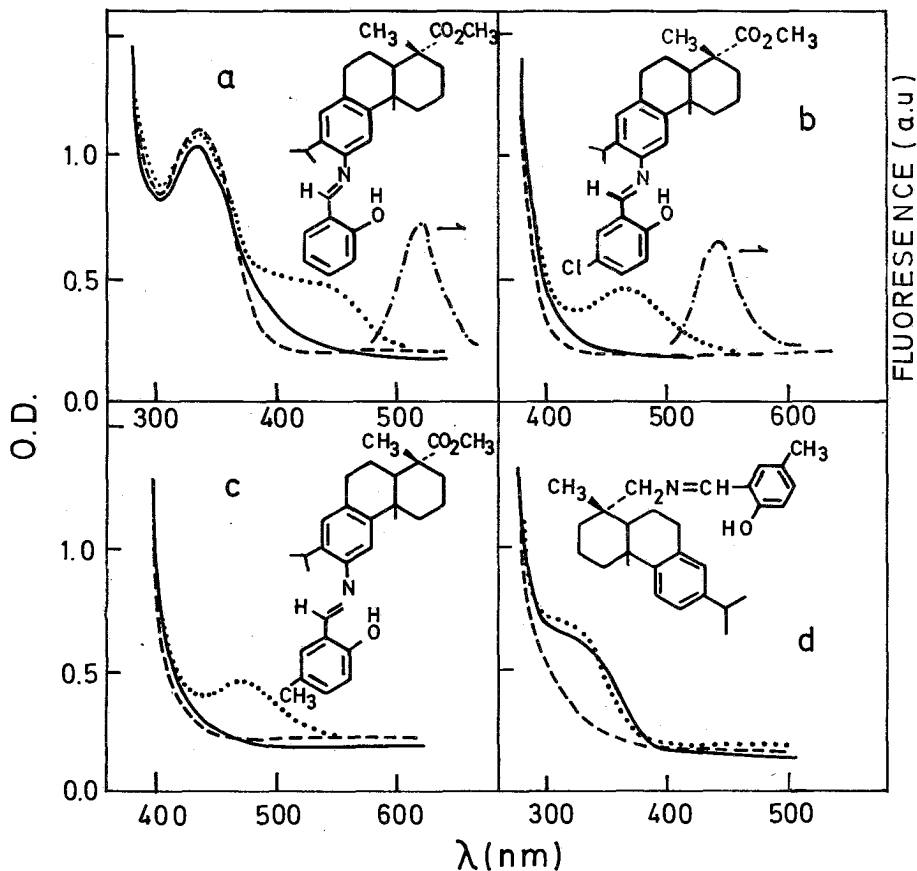


FIG. 1. The absorption spectra of crystalline films of the indicated compounds at room (full lines) and low (broken lines) temperature; the dotted lines are after UV irradiation at low temperature. In (a) and (b), the emission spectra are displaced (broken dotted lines) for reasons of comparison.

#### Photochemical Experiments in the Rigid State.

Experiments in the rigid state were conducted with solutions of EPA at liquid nitrogen temperature and with PMMA at room temperature and at liquid nitrogen temperature. The results may be summarized as follows:

- (i) photocoloration in rigid glassy solutions of the examined compounds occurs only at liquid nitrogen temperature; in the case of EPA, the effect is reversed when the rigid solution softens and in PMMA when the sample is warmed up.
- (ii) the compounds, thermochromic or photochromic in the crystalline state, are all photochromic in rigid glasses.

(iii) in the absence of the ortho-OH group from the salicylaldehyde moiety (compound 6) or when the C=N bridge is saturated (compound 7), photochromism is not observed. Fig. 2 summarizes some of the above results.

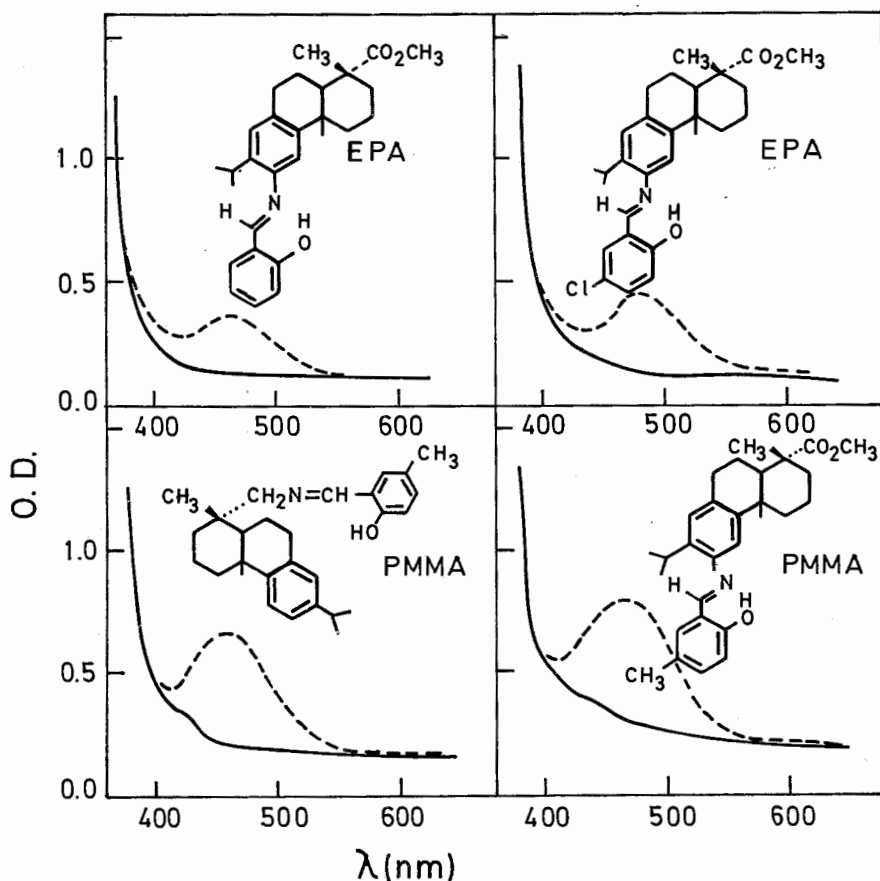


FIG. 2. Absorption spectra of the indicated compounds at liquid nitrogen temperature (full lines) and after UV irradiation at the same temperature (broken lines).

#### Spectra and Steady-State Irradiation.

The electronic absorption spectra of the compounds studied in ethanol, dimethylformamide, acetonitrile, heptane and for concentrations from  $10^{-6}$  to  $10^{-4}$  M consist of two fairly intense bands with maxima in the range 245-370 nm. There was no appreciable concentration effect but, in two cases (compounds 2 and 4) a solvent effect was observed. Thus in protic polar solvents (e.g. ethanol) a third band appears around 425 nm. This band is more intense in the case of compound 4 (Fig. 3).

Steady-state long time irradiation of ethanol or heptane solutions has no effect; the spectra remain practically unchanged.

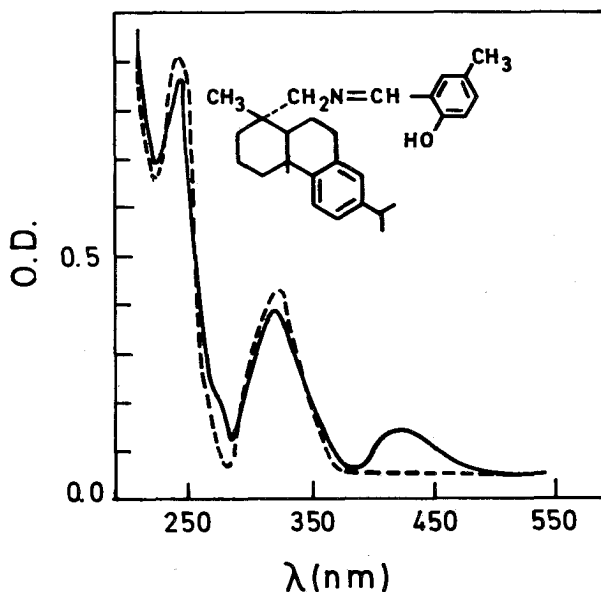


FIG. 3. Absorption spectra of the indicated compound in ethanol (full line) and heptane (broken line) solution ( $10^{-4} M$ ).

#### Flash Photolysis Experiments.

Flash photolysis experiments were conducted with compounds 1, 2, 4 and 5. In all cases strong transients were observed in ethanol, EPA or PMMA. The transients were not affected by the presence of oxygen and repeated flashing could be performed since there was not any substantial change in the height of the transient. This is in agreement with the steady-state time irradiation experiments.

An examination of the oscillograms in the 380-550 nm range reveals the presence of two transient species in the ms region for each compound. The first transient is formed directly after excitation and decays fast while the second is much slower. It is not clear from our results if this second transient is formed from the first. Fig. 4 shows the fast and the slow-transient absorption spectra of compound 4 in  $10^{-3} M$  PMMA taken immediately after the flash and 60 ms later. The absorption spectrum of the same compound in PMMA is displaced in the same figure for reasons of comparison. The fast-transient spectra of the other compounds are very similar. The spectra are not affected by solvent (EtOH, cyclohexane, EPA, PMMA) and the transients are not quenched by oxygen. The transients are observed also, in air-equilibrated solutions.



At room temperature, the two transients are better observed in polymethylmethacrylate (PMMA) because of its high rigidity. Thus, for compound 2 in this

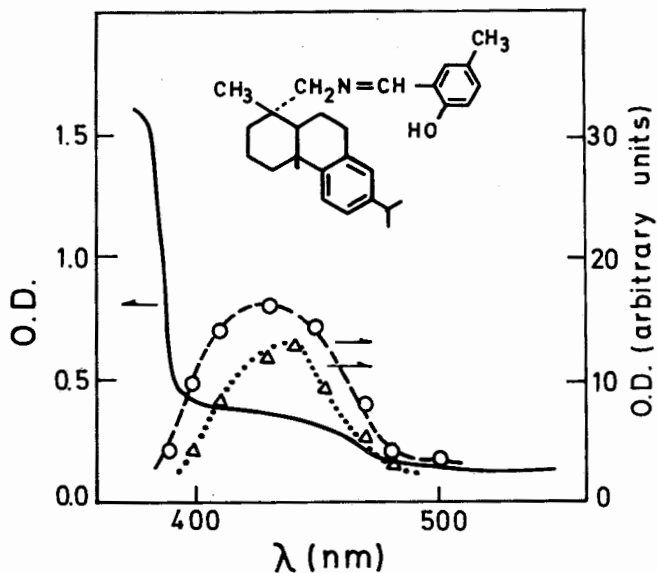


FIG. 4. Transient absorption spectra immediately after the flash (broken line) and 60 ms later (dotted line) of the indicated compound in  $10^{-3} M$  PMMA solution. The absorption spectrum in the same solvent is also displaced (full line) for reasons of comparison.

substrate, the life-times of the two transients at 450nm, as estimated from the oscillogram which is reproduced in Fig. 5, are 50 and 300 ms.

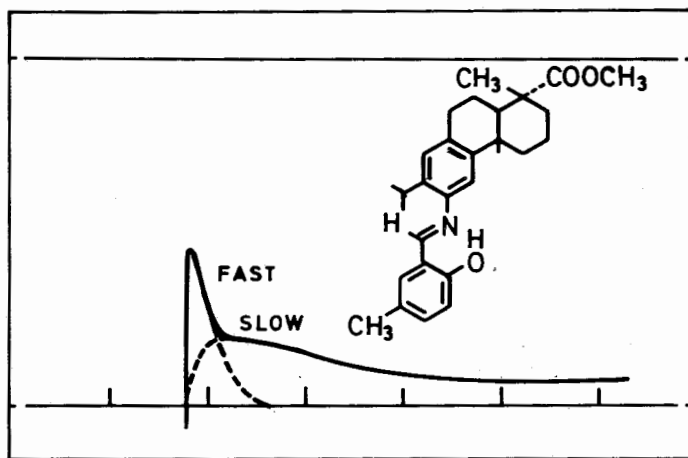


FIG. 5. Demonstration of the two transient absorption (room temperature, 450nm) of the indicated compound in PMMA. Horizontal scale 100 ms/division.

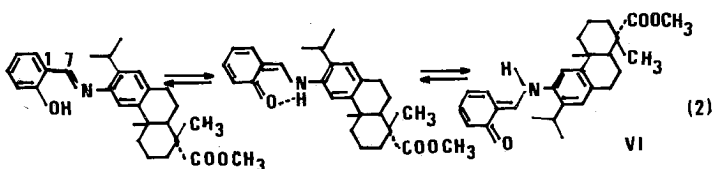
Kinetic analysis at 450nm yields a good fit to first-order kinetics. No concentration effect of the decays of the species product, and the original enol form, do not affect the relaxation process which may, therefore, be considered as purely exponential. The kinetics of fading of the two transient species in the case of compounds 2 followed at various temperatures (between 25°C and -70°C) in EPA yields  $E = 3\text{Kcal/mol}$  for the activation energy of the decay at 450nm for the fast transient and 7Kcal/mol for the slow. Finally, the inactive compounds 6 and 7 present no transients at all.

## Discussion

In rigid glasses and in fluid solutions where the orientation of the molecules is random all the examined compounds (except the inactive ones) appear photochromic as in the case of salicylideneanilines<sup>3</sup>. The inactive compounds demonstrate the importance of the ortho-OH and the  $>C=N$ -groupings. The kinetic and spectral considerations by flash photolysis indicate two photoproducts with activation energies 3Kcal/mol and 7Kcal/mol for the thermal back reaction against 2.4 and 6 Kcal/mol in salicylideneanilines<sup>14</sup>.

The transients, in general, show absorption spectra similar to those of the photoproducts in rigid glasses (compare Figs. 2 and 4) although structureless. In addition, in the case of compounds 2 and 4, these spectra are similar with the third band which appears in protic polar solvents (see Fig. 3). This last similarity may be explained if we assume that the photoproducts are already present in the dark in equilibrium with the original compounds as it was suggested for salicylideneanilines<sup>19</sup>.

The similarities of the experimental results in rigid glasses and in fluid solutions with those of salicylideneanilines suggest that the mechanism of photo-colouration resembles the one, including enol-keto transformation and rotations around  $C_1-C_7$  and  $C_7-N$  bonds, postulated for salicylideneanilines on the basis of the two transients observed also in that case<sup>14</sup>.



We turn now to the problem of thermo -and photo- coloured species in the crystalline state, where the molecules possess a certain crystal and molecular structure.

By comparing again our findings with those of salicylideneanilines we notice two substantial differences. First, we have now compounds which are both photochromic and thermochromic, and second, in the elongated bridge compounds (by the addition of the  $-CH_2-$ grouping), we do not have exclusively photochromic

compounds as in salicylideneanilines<sup>3</sup>, but thermochromic/photochromic and thermochromic as well. This is an indication that the structural requirements for salicylideneanilines-planarity with short interplanar distances of the order of 3.5Å for thermochromism and nonplanarity with interplanar distances more than 4.5Å for photochromism are not enough, as it was found also for some salicylideneaminopyridines<sup>21</sup>, to explain the present results. Therefore either there are structures which permit the simultaneous appearance of photochromism and thermochromism or the planar structures, in the present case, are also "open" with interplanar distances more than 4.5Å and therefore permit rotations analogous to that shown in Eq. 2, which produce photoproducts of the "keto" form VI. These structures have to wait an X-rays three-dimensional analysis.

---

### Περίληψη

*Μηχανισμός του φωτοχρωτισμού και του θερμοχρωτισμού ορισμένων σαλικυλιδενο-δευδροαβιetylαμινών και σαλικυλιδενο 6-αμινοδευδροαβιetylικών μεθυλεστέρων*

Παρασκευάστηκε ένας αριθμός βάσεων του Schiff και συγκεκριμένα ενώσεις διαφόρων παραγώγων της σαλικυλικής αλδεύδης με 6-αμινοδευδροαβιetylικό μεθυλεστέρα και δευδροαβιetylική μεθυλαμίνη. Για όλες τις ενώσεις αυτές εξετάστηκαν οι φωτοχρωμικές και θερμοχρωμικές ιδιότητες στην κρυσταλλική κατάσταση, στην υαλώδη κατάσταση και σε διαλύματα. Εξετάστηκε επίσης η επίδραση των διαλυτών, της συγκέντρωσης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που δίνουν οι απλές βάσεις του Schiff, δηλαδή οι σαλικυλιδενοανιλίνες.

Στην υαλώδη κατάσταση και στα διαλύματα όπου ο προσανατολισμός των μορίων είναι τυχαίος όλες οι εξετασθείσες ενώσεις (εκτός από τις αδρανείς) εμφανίζονται φωτοχρωμικές όπως και στις σαλικυλιδενοανιλίνες<sup>3</sup>. Τα κινητικά και φασματοσκοπικά αποτελέσματα της παλμικής φωτόλυσης δείχνουν δύο φωτοπροϊόντα με ενέργεια ενεργοποίησης 3 και 7 Kcal/mol για τη θερμική αντίδραση επαναφοράς έναντι το 2.4 και 6 Kcal/mol στις σαλικυλιδενοανιλίνες<sup>14</sup>. Οι ομοιότητες αυτές μας κάνουν να πιστεύουμε ότι ο μηχανισμός του φωτοχρωτισμού μοιάζει να περιλαμβάνει ένα μετασχηματισμό από ενολική σε κετονική μορφή και μια περιστροφή γύρω από τους δεσμούς C<sub>1</sub>—C<sub>7</sub> και C<sub>7</sub>—N όπως στις σαλικυλιδενοανιλίνες<sup>14</sup> (δες ισορροπία 2).

Στην κρυσταλλική κατάσταση βρέθηκαν τρεις περιπτώσεις που παρουσιάζουν και φωτοχρωτισμό και θερμοχρωτισμό σε αντίθεση με τις σαλικυλιδενοανιλίνες οι οποίες είναι ή φωτοχρωμικές ή θερμοχρωμικές αλλά όχι και τα δύο. Η διαφορά αυτή αποδίδεται σε πιθανή διαφορά δομής των ενώσεων αυτών.

---

### References

1. Senier A. and Shephard, F.G.: *Chem Soc.*, **95**, (1909)
2. De Gaouke V. and Le Fevre, R.J.W.: *J. Chem. Soc.*, 1457 (1939)