

**2/84**

CMCRCZ 13 (2), 69-136 (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 PAPADOPOULOS (Treasurer of G.C.A.).

EDITORS - IN - CHIEF

I. DILARIS, G. MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU

EDITORIAL ADVISORY BOARD

N. ALEXANDROU <i>Org. Chem., Univ. Salonica</i>	M.I. KARAYANNIS <i>Anal. Chem., Univ. Ioannina</i>	C.N. POLYDOROPOULOS <i>Phys/Quantum Chem., Univ. Ioannina</i>
A. ANAGNOSTOPOULOS <i>Inorg. Chem., Tech. Univ. Salonica</i>	N. KATSANOS <i>Phys. Chem., Univ. Patras</i>	K. SANDRIS <i>Organic Chem., Tech. Univ. Athens</i>
D. BOSKOS <i>Org. Chem., Tech., Univ. Salonica</i>	A. KEHAYOGLOU <i>Org. Chem. Tech., Univ. Salonica</i>	M.J. SCULLOS <i>Env./Mar. Chem., Univ. Athens</i>
P. CATSOULACOS <i>Pharm. Chem., Univ. Patras</i>	A. KOSMATOS <i>Org. Chem., Univ. Ioannina</i>	C.E. SEKERIS <i>Mol. Biology, N.H.R.F., Athens</i>
C.A. DEMOPOULOS <i>Biochemistry, Univ. Athens</i>	S.B. LITSAS <i>Bioorg. Chem., Arch. Museum, Athens</i>	G. SKALOS <i>Microanalysis Tech. Univ. Athens</i>
C.E. EFSTATHIOU <i>Anal. Chem., Univ. Athens</i>	G. MANOUSSAKIS <i>Inorg. Chem., Univ. Salonica</i>	G.A. STALIDIS <i>Phys. Chem., Univ. Salonica</i>
A.E. EVANGELOPOULOS <i>Biochemistry, N.H.R.F., Athens</i>	I. MARANGOSIS <i>Chem. Mech., Tech. Univ. Athens</i>	Ch. STASSINOPOULOU <i>N.R.C. «Democritos», Athens</i>
S. FILIANOS <i>Pharmacognosy, Univ. Athens</i>	S. MYLONAS <i>Org. Chem., Univ. Athens</i>	A. STASSINOPOULOS <i>Argo AEBE Athens</i>
D.S. GALANOS <i>Food. Chem., Univ. Athens</i>	I. NIKOKAVOURAS <i>Photochem., N.R.C. «D», Athens</i>	A. STAVROPOULOS <i>Ind. Technol., G.S.I.S., Piraeus</i>
A.G. GALINOS <i>Inorg. Chem., Univ. Patras</i>	D.N. NICOLAIDES <i>Org. Chem., Univ. Salonica</i>	C. THOMOPOULOS <i>Food Techn., Tech. Univ. Athens</i>
P. GEORGAKOPOULOS <i>Pharm. Techn., Univ. Salonica</i>	C.M. PALEOS <i>N.R.C. «Democritos», Athens</i>	I.M. TSANGARIS <i>Inorg. Chem., Univ. Ioannina</i>
I. GEORGATSOS <i>Biochemistry, Univ. Salonica</i>	V. PAPADOPOULOS <i>N.R.C. «Democritos» Athens</i>	G.A. TSATSAS <i>Pharm. Chem., Univ. Athens</i>
M.P. GEORGIADIS <i>Org./Med. Chem., Agr. Univ. Athens</i>	G. PAPAGEORGIOU <i>Biophysics, N.R.C. «D», Athens</i>	A.K. TSOLIS <i>Chem. Technol., Univ. Patras</i>
N. HADJICHRISTIDIS <i>Polymer Chem., Univ. Athens</i>	V.P. PAPAGEORGIOU <i>Nat. Products, Tech. Univ. Salonica</i>	A. VALAVANIDIS <i>Org. Chem., Univ. Athens</i>
T.P. HADJIOANNOU <i>Anal. Chem., Univ. Athens</i>	S. PARASKEVAS <i>Org. Chem., Univ. Athens</i>	G. VALCANAS <i>Org. Chem., Tech. Univ. Athens</i>
E. HADJLOUDIS <i>Photochem., N.R.C. «D», Athens</i>	G. PHOKAS <i>Pharmacognosy, Univ. Salonica</i>	A.G. VARVOGLIS <i>Org. Chem., Univ. Salonica</i>
D. JANNAKOUDAKIS <i>Phys. Chem., Univ. Salonica</i>	S. PHILIPAKIS <i>N.R.C. «Democritos», Athens</i>	G.S. VASSILIKIOTIS <i>Anal. Chem., Univ. Salonica</i>
V. KAPOULAS <i>Biochemistry, Univ. Ioannina</i>	G. PNEUMATIKAKIS <i>Inorg. Chem., Univ. Athens</i>	S. VOLIOTIS <i>Instrum. Analysis, Univ. Patras</i>
		E.K. VOUDOURIS <i>Food Chem., Univ. Ioannina</i>

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

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

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

CONTENTS

Comparison between preparative chromatography and common separation methods for the deterpenation of essential oils ( <i>a review in Greek</i> ) by S. E. Liodakis, N.E. Tzamtzis and G.K. Parissakis .....	71
Effects of chromium ions of the cholesterol biosynthesis in vitro and on the drug métabolizing enzymes of rat liver microsomes ( <i>in English</i> ) by G.H. Deliconstantinos, A. Polychronopoulou-Trichopoulou and V. M. Kapoulas .....	89
Study of the dilution effect as a function of time by means of Acree relation ( <i>in French</i> ) by G. Papanastasiou, A. Papoutsis and D. Jannakoudakis .....	99
Relation between Grüneisen constant and crosslink density of polymer networks ( <i>in Greek</i> ) by C. Delidis .....	109
A new synthesis of I,I diacyloxy iodobenzenes and some mixed I,I diacyloxy iodobenzenes ( <i>in English</i> ) by S.Spyroudis .....	121
Short paper	
Copper complexes of pyridine-2-thiol ( <i>in English</i> ) by P. Karagianidis .....	129

## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΠΟΤΕΡΠΕΝΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΞΕΥΓΕΝΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Σ.Ε. ΛΙΟΔΑΚΗΣ, Ν.Η. ΤΖΑΜΤΖΗΣ και Γ.Κ.ΠΑΡΙΣΑΚΗΣ

*Τμήμα Χημικών Μηχανικών Ε.Μ. Πολυτεχνείου.*

(Ελήφθη 29 Νοεμβρίου 1983).

### Περίληψη

Στο άρθρο αυτό γίνεται ανασκόπηση σχετικά με την αποτερπενίωση των αιθερίων ελαίων και δικαιολογείται η σπουδαιότητα που έχει το θέμα ιδιαίτερα στον Ελληνικό χώρο. Γίνεται αναφορά στις κλασικές μεθόδους αποτερπενίωσης, ενώ το κύριο βάρος δίνεται στην παρασκευαστική χρωματογραφία, που με την τεχνολογική ανάπτυξη της τα τελευταία χρόνια υπόσχεται πολλά.

*Λέξεις - Κλειδιά.* Παρασκευαστική χρωματογραφία - αποτερπενίωση - αιθέρια έλαια.

Είναι γνωστό, ότι τα αιθέρια έλαια έχουν μεγάλη σημασία στη φαρμακοβιομηχανία και βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια με βάση τη γενική τάση προς αναζήτηση φυσικών πρώτων υλών.

Στην Ελλάδα τα τελευταία πέντε - έξι χρόνια, έχει εκδηλωθεί προσπάθεια για την καλλιέργεια και αξιοποίηση αρωματικών φυτών, με ιδιαίτερη έμφαση τη μέντα και λεβάντα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1.

Η μελέτη της διεθνούς και Ελληνικής αγοράς σε αιθέρια έλαια<sup>1-13</sup> έδειξε τα εξής:

1. οι τιμές των αιθερίων ελαίων ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με την ποιότητα τους π.χ. στην Ελληνική αγορά η πρώτης ποιότητας μέντα έχει τετραπλάσια τιμή της κατώτερης<sup>5</sup>
2. οι τιμές των αιθερίων ελαίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση προσφοράς και ζήτησης π.χ. παγετώνας στο Oregon ή Indiana της Αμερικής, όπου κατ'εξοχή καλλιεργείται η μέντα, επηρεάζουν την τιμή της μέντας διεθνώς. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ο εξευγενισμός των αιθερίων ελαίων να στρέφεται προς τη μετατροπή του αιθερίου ελαίου σε μια σταθερότερη μορφή, χωρίς έτσι να απαιτείται ιδιαίτερη φροντίδα στην αποθήκευση του
3. η Ελλάδα εξάγει αιθέρια έλαια χαμηλής ποιότητας και εισάγει αιθέρια έλαια

υψηλής ποιότητας, δηλαδή εξευγενισμένα, με αποτέλεσμα πολύτιμο συνάλλαγμα να χάνεται.

Από τα παραπάνω, φαίνεται η σπουδαιότητα που παρουσιάζει το θέμα του εξευγενισμού των αιθερίων ελαίων, ιδιαίτερα στον Ελληνικό χώρο.

Τα συστατικά ενός αιθερίου ελαίου μπορούν να ταξινομηθούν, όπως φαίνεται στο πίνακα I στις παρακάτω ομάδες με τα εξής χαρακτηριστικά<sup>13-16, 17a</sup>.

ΠΙΝΑΚΑΣ I. Ταξινόμηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων

1η Ομάδα	2η Ομάδα	3η Ομάδα	4η Ομάδα
Τερπενικοί Υδρογονάνθρακες	Πτητικές Οξυγονούχες ενώσεις	Σεσκυτερπενικοί υδρογονάνθρακες	Μη Πτητικές ενώσεις
-έχουν γενικό τύπο $C_{10}H_{16}$ -σ.ζ 155-180°C σε ατμοσφ. πίεση -μη πολικές ενώσεις -άκυκλες ή μονοκυκλικές ή δικυκλικές ενώσεις π.χ. λεμονένιο, πινένιο.	-σ.ζ. 180-250°C σε ατμοσφ. πίεση -πολικές ενώσεις -προσδίδουν συνήθως το χαρακτηριστικό άρωμα στα αιθέρια έλαια π.χ. μινθόλη, μινθόνη.	-έχουν γενικό τύπο $C_{15}H_{24}$ -σ.ζ. 240-300°C σε ατμοσφ. πίεση -μη πολικές -άκυκλες ή μονοκυκλικές ή δικυκλικές ή τρικυκλικές π.χ. καρυοφυλλένιο.	-σ.ζ.~300°C σε ατμοσφ.πίεση -είτε οξυγονούχες ενώσεις είτε υδρογονάνθρακες π.χ. λακτόνες, πολυμερή τερπένια, χρωστικές, κηροί.

Ο εξευγενισμός των αιθερίων ελαίων, γνωστός με τον ανεπιτυχή όρο αποτερπενίωση, αφορά την απομάκρυνση συστατικών της ομάδας 1,3 και 4 του προηγούμενου πίνακα και συνεπώς τη συμπύκνωση του αιθερίου ελαίου σε οξυγονούχα συστατικά. Κατ' αυτό τον τρόπο το αιθέριο έλαιο αποκτά ορισμένα βασικά πλεονεκτήματα, όπως:

1. χάνει το σκούρο χρώμα που έχει και γίνεται ανοικτόχρωμο που είναι γενικώς αποδεκτό στο εμπόριο
2. γίνεται περισσότερο διαλυτό στα υδατικά ή αλκοολικά διαλύματα, πράγμα που διευκολύνει τη χρήση του ιδιαίτερα στη βιομηχανία καλλυντικών<sup>15β, 17, 18</sup>
3. αποκτά σταθερότερη μορφή, επειδή οι τερπενικοί υδρογονάνθρακες εύκολα οξειδώνονται, σχηματίζουν εποξειδία και στη συνέχεια πολυμερίζονται<sup>15β, 17, 20</sup>
4. γενικά η αποτερπενίωση οδηγεί σε αιθέρια έλαια με καλύτερα χαρακτηριστικά, επειδή οι τερπενικοί υδρογονάνθρακες προσδίδουν δριμεία οσμή και γεύση στα αιθέρια έλαια.

Παρ' όλα αυτά, η αποτερπενίωση μερικές φορές συνοδεύεται από ορισμένα μειονεκτήματα<sup>21, 22</sup>, όπως:

1. το αιθέριο έλαιο χάνει τη φυσική οσμή του
2. η αποτερπενίωση δεν συνεπάγεται απαραίτητως μεγαλύτερη σταθερότητα στο αιθέριο έλαιο, π.χ. μπορεί να απομακρυνθούν με τους υδρογονάνθρακες και τα φυσικά αντιοξειδωτικά του αιθερίου ελαίου
3. είναι πολύ δύσκολη η τυποποίηση των αποτερπενιωμένων αιθερίων ελαίων, επειδή τα αποτερπενιωμένα προϊόντα ποικίλουν ανάλογα με την ποιότητα της πρωτογενούς ύλης και τη μέθοδο αποτερπενιώσεως που χρησιμοποιείται. Συμπερασματικά όμως, μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε ότι τα πλεονεκτήματα της αποτερπενιώσεως είναι πολύ περισσότερα των μειονεκτημάτων, γι' αυτό και οι μέθοδοι αποτερπενιώσεως έχουν μεγάλη βιομηχανική σημασία.

Οι κυριώτεροι μέθοδοι αποτερπενιώσεως είναι:

1. η κλασματική απόσταξη
2. η απόσταξη με υδρατμούς
3. η εκχύλιση
4. η υδροτροπική εκχύλιση
5. η χρωμάτογραφία.

Η επιλογή μιας από τις παραπάνω μεθόδους για βιομηχανική χρήση βασίζεται, όπως είναι γνωστό<sup>23,24</sup> σε ορισμένες παραμέτρους, όπως:

- ο ρυθμός παραγόμενης ποσότητας αιθερίων ελαίων
- ο απαιτούμενος βαθμός καθαρότητας
- η σταθερότητα αυτών
- η αξία τους
- η σχετική πτητικότητα τους.

Η αποτερπενίωση πολλές φορές συμπληρώνεται με διήθηση κατόπιν ψύξεως του αιθερίου ελαίου, οπότε κυρίως απομακρύνονται τα συστατικά της 4ης ομάδας του Πίνακα Ι<sup>25</sup>.

### Κλασματική Απόσταξη<sup>15β,21,26-41</sup>

Λόγω της χαμηλής πτητικότητας και θερμικής ευαισθησίας που έχουν τα περισσότερα συστατικά των αιθερίων ελαίων, η απόσταξη θα πρέπει να γίνει υπό κενό. Παρ' όλα αυτά, θερμοκρασίες της τάξεως 250-300<sup>0</sup>C επιβάλλονται λόγω της παρουσίας των λιγότερο πτητικών συστατικών των αιθερίων ελαίων (π.χ. κηροί και σεσκυτερπένια). Οι παραπάνω θερμοκρασίες όμως πολλές φορές διασπούν, πολυμερίζουν ή ισομεριώνουν μερικά βασικά συστατικά των αιθερίων ελαίων, με αποτέλεσμα το άρωμα να αλλοιώνεται και γενικά η ποιότητα του αιθερίου ελαίου να υποβαθμίζεται. Άλλο μειονέκτημα που έχει αναφερθεί<sup>28</sup> είναι, ότι τα φυσικά αντιοξειδωτικά του αιθερίου ελαίου μπορεί να παραμείνουν λόγω της χαμηλής πτητικότητας τους στο δοχείο απόσταξης, με αποτέλεσμα το αποτερπενιωμένο αιθέριο έλαιο να παρουσιάζεται λιγότερο σταθερό.

### Απόσταξη με υδρατμούς<sup>15β,27-29,31,36,42-46</sup>

Τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να αρθούν με την τεχνική της απόσταξης με υδρατμούς. Ο ατμός στη προκειμένη περίπτωση λειτουργεί ως φορέας για την απόσταξη των αιθερίων ελαίων σε χαμηλή θερμοκρασία. Όμως, σε περιπτώσεις μη πτητικών αιθερίων ελαίων, η απαιτου-

μένη ποσότητα ατμών είναι πολύ μεγάλη και ο χρόνος απόσταξης πολύς, με αποτέλεσμα η διαδικασία να θεωρείται χρονοβόρα και αντιοικονομική. Άλλα μειονεκτήματα αναφέρονται<sup>28</sup>:

- η αδυναμία να διαχωριστούν ορισμένα συστατικά των αιθερίων ελαίων από το νερό
- η υδρόλυση συστατικών των αιθερίων ελαίων
- η απόσταξη υδατοδιαλυτών οξυγονούχων ενώσεων μαζί με τους τερπενικούς υδρογονάνθρακες.

### **Εκχύλιση** <sup>15β,27β,36,47-53</sup>

Συνήθως μ'ένα σύστημα πολικού-μη πολικού διαλύτη επιτυγχάνεται ο εξευγενισμός του αιθερίου ελαίου. Οι οξυγονούχες ενώσεις διαλύονται στον πολικό διαλύτη, ενώ οι τερπενικοί υδρογονάνθρακες παραλαμβάνονται από το μη πολικό διαλύτη. Η απόδοση της αποτερπενίωσης κατ'αυτό τον τρόπο υστερεί σε σχέση με την απόσταξη. Αντίθετα, τα προβλήματα που προκύπτουν με τη θέρμανση κατά την απόσταξη (π.χ. αλλοίωση ορισμένων συστατικών) και που υποβαθμίζουν την ποιότητα των αιθερίων ελαίων, δεν εμφανίζονται κατά την εκχύλιση.

Όμως η χρησιμοποίηση διαλυτών καθώς και το στάδιο διαχωρισμού διαλύτη - αιθερίου ελαίου, που γίνεται συνήθως με κλασματική απόσταξη, ανεβάζουν σημαντικά το κόστος της αποτερπενίωσης σε σύγκριση με την απόσταξη. Επίσης, μεγάλη περιεκτικότητα αιθερίων ελαίων σε κηρούς δημιουργεί προβλήματα, λόγω σχηματισμού γαλακτωμάτων κατά την εκχύλιση<sup>14</sup>.

### **Υδροτροπική εκχύλιση** <sup>14,54-57</sup>

Τα υδροτροπικά διαλύματα ως γνωστό είναι υδατικά διαλύματα αλάτων και αποτελούν άριστους διαλύτες για τις πολικές ενώσεις<sup>55</sup>. Συνεπώς, η αποτερπενίωση των αιθερίων ελαίων μπορεί πολύ καλά να επιτευχθεί με την εκλεκτική εκχύλιση των οξυγονούχων ενώσεων, που αποτελούν τα πολικά συστατικά των αιθερίων ελαίων, με υδροτροπικά διαλύματα. Στη συνέχεια το αποτερπενιωμένο αιθέριο έλαιο εύκολα παραλαμβάνεται από το υδροτροπικό διάλυμα με αραίωση αυτού με νερό. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται και η αναγέννηση του υδροτροπικού διαλύματος, που μπορεί πλέον να επαναχρησιμοποιηθεί<sup>14</sup>.

Τα παραπάνω αποτελούν και τα βασικά πλεονεκτήματα της υδροτροπικής εκχύλισης έναντι της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες.

### **Χρωματογραφία**

Η χρωματογραφία διακρίνεται από τις προηγούμενες μεθόδους λόγω της μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας που διαθέτει. Αυτό σε συσχέτισμό με το πλήθος των ενώσεων και την ποικιλία των προβλημάτων διαχωρισμού που εμφανίζονται στα αιθέρια έλαια, οδήγησε στη καθιέρωση της αέριας χρωματογραφίας για την ανάλυση των αιθερίων ελαίων<sup>15β,58-102</sup>. Πρόσφατα μεγάλη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση των αιθερίων ελαίων με υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία - HPLC<sup>103-118</sup>.

Παρ' όλα αυτά, πολύ λίγες μελέτες έχουν ανακοινωθεί αναφορικά με την απο-

τερπενίωση των αιθερίων ελαίων με παρασκευαστική χρωματογραφία. Οι περισσότερες απ' αυτές αναφέρονται στη δεκαετία 1950-1960, όταν η τεχνολογία της παρασκευαστικής χρωματογραφίας ήταν σχεδόν ανύπαρκτη. Οι μεταγενέστερες δημοσιεύσεις, αναφέρονται περισσότερο στην αέρια χρωματογραφία, που ως γνωστό μειονεκτεί σε παρασκευαστική κλίμακα από την υγρή χρωματογραφία, ειδικά σε περιπτώσεις διαχωρισμών μη πτητικών θερμικά ευαίσθητων ενώσεων, όπως είναι τα' συστατικά των αιθερίων ελαίων.

Η σημαντική τεχνολογική ανάπτυξη της παρασκευαστικής χρωματογραφίας τα τελευταία χρόνια<sup>119-240</sup>, έδωσε τη δυνατότητα στη δημιουργία εμπορικών χρωματογραφικών συστημάτων, με ποικιλία πληρωτικών υλικών και με σχετικά χαμηλό κόστος αγοράς και λειτουργικό κόστος<sup>241-248</sup>. Ο πίνακας II αποτελεί πηγή αναφοράς για τις σημαντικότερες τεχνολογικές εξελίξεις, που έχουν επιτευχθεί στο τομέα της παρασκευαστικής χρωματογραφίας. Ενώ ο πίνακας III, δείχνει μερικές από τις πιο σημαντικές εργασίες που έχουν γίνει με θέμα το διαχωρισμό - εξευγενισμό των αιθερίων ελαίων με παρασκευαστική χρωματογραφία. Με βάση τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, η παρασκευαστική χρωματογραφία θεωρείται σήμερα μια από τις πλέον συναγωνιστικές μεθόδους στο τομέα της αποτερπενίωσης των αιθερίων ελαίων. Αναμένεται μάλιστα ολοένα και περισσότερο η εφαρμογή της να επεκτείνεται, ιδιαίτερα για την ποιοτική αναβάθμιση αιθερίων ελαίων χαμηλής ποιότητας.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω συμπερασμάτων, έγινε μια σειρά πειραμάτων με υγρά χρωματογραφικά συστήματα μέτριας πίεσης για τον εξευγενισμό των αιθερίων ελαίων της μέντας, λεβαντίνης και ορισμένων εσπεριδοειδών<sup>249,259-262</sup>.

ΠΙΝΑΚΑΣ II. Βασικά σημεία αναφορικά με την εξέλιξη της παρασκευαστικής χρωματογραφίας

II.1 Τεχνικές κλιμάκωσης της χρωματογραφίας	Βιβλιογραφικές παραπομπές
- αύξηση του μήκους της στήλης	152
- χρησιμοποίηση συστήματος παραλλήλων στηλών	152
- αύξηση της διαμέτρου της στήλης	156
- τεχνικές συνεχούς λειτουργίας	119-144 και 180-203,224,233
- τεχνικές επαναληπτικής εισαγωγής δείγματος	153, 155, 171-173
II.2 Μεθόδοι βελτίωσης της αποτελεσματικότητας χρωματογραφικών στηλών μεγάλης διαμέτρου	Βιβλιογραφικές παραπομπές
- νέες τεχνικές πληρώσεως στηλών	145, 151, 157-160, 150
- συστήματα διανομής ροής της κινούμενης φάσης	161-167
- συστήματα εισόδου/εξόδου της στήλης	152, 168
- μη κυκλικής διατομής χρωματογραφικές στήλες	152, 169, 170



---

 Π.3 Χρωματογραφικά συστήματα συνεχούς λειτουργίας Βιβλιογραφικές παραπομπές
 

---

κινούμενης	Διασταυρού- μενης ροής	-ελικοειδούς ροής	180-184
		-ακτινωτής ροής	185-187
		-λοιπά	188
κλίνης	Κατ'αντιροή	-με κινούμενο πληρωτικό υλικό	119, 120, 128, 189-195
		-με κινούμενη στήλη	120-128, 135-138
		-με ψευδοκινούμενη στήλη ή πληρωτικό υλικό	129-134, 139-144, 224, 233, 176, 177, 196
Σταθερής	Κυκλικής λειτουργίας	-παράμετρικής άντλησης	197-200
		-λοιπά	201
κλίνης	Ηλεκτροχρωματογραφία		202, 203

---

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ: Βιβλιογραφικά στοιχεία με θέμα τους διαχωρισμούς - εξευγενισμούς αιθερίων ελαίων με παρασκευαστική χρωματογραφία.

Χρονο-λογίες	Συγγραφείς (Αναφορές)	Επιτεύγματα	Σχόλια - Παρατηρήσεις
1952 1955	Kirchner and Miller (250,251)	Αποτερπενίωση 8 διαφορετικών αιθερίων ελαίων, σε ποσότητες της τάξεως των 100 g με απλή χρωματογραφία στήλης, διαστάσεων 5 X 8.4cm, πληρωμένη με πυριτικό οξύ και διαλύτες έκλουσης διαδοχικά, εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Τα εκλουόμενα κλάσματα αναλυόταν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.	Η πρώτη και ίσως πιο ουσιαστική εργασία που έχει γίνει με θέμα την αποτερπενίωση των αιθερίων ελαίων με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία. Η εργασία έγινε σε χρονική περίοδο που η χρωματογραφία ήταν σε υποβαθμισμένο τεχνολογικά επίπεδο, με αποτέλεσμα η όλη διαδικασία να είναι επίπονος, χρονοβόρα και όχι ακριβής.
1957	Braverman and Solomiansky (252)	Αποτερπενίωση αιθερίων ελαίων εσπεριδοειδών σε ποσότητες μέχρι 4l με απλές χρωματογραφικές στήλες, διαστάσεων μέχρι 4 x 67 cm, πληρωμένες με διάφορα πληρωτικά υλικά (π.χ. αλούμινα, πυριτικό οξύ) και με διαλύτη έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα.	Η εργασία μοιάζει αρκετά με την προηγούμενη και συνεπώς έχει τα ίδια αδύνατα σημεία μ' αυτή. Όμως η μελέτη επί πλέον παραμέτρων, όπως π.χ. η διάμετρος, το μήκος της στήλης, το είδος του πληρωτικού υλικού, ο βαθμός κορεσμού της στήλης, έδωσε δυνατότητα αποτερπενίωσης πολύ μεγαλύτερης ποσότητας αιθερίου ελαίου με πολύ μικρότερη κατανάλωση διαλυτών. Η εργασία περιορίζεται σε αιθέρια έλαια μεγάλης περιεκτικότητας σε τερπένια π.χ. εσπεριδοειδή.
1961	A.B. Heric and J.R. Trowbridge (253)	Αποτερπενίωση αιθερίων ελαίων με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης σε στήλη διαστάσεων 45.7 X 5.7 cm πληρωμένη με πολυμερή προϊόντα π.χ. φυσικό ελαστικό, νεοπρένιο, Buna s και διαλύτη έκλουσης μεθανόλη. Η ανίχνευση των προϊόντων έκλουσης γινόταν με διαθλασίμετρο.	Ο Βαθμός εξευγενισμού των παραγόμενων αιθερίων ελαίων ήταν πολύ καλός. Η μέθοδος όμως περιορίζεται, σε αιθέρια έλαια με χαμηλό ποσοστό τερπενίων. Επίσης έχει το μειονέκτημα, ότι η στήλη έχει μικρή χωρητικότητα σε αιθέριο έλατο (π.χ. 5.1 g) και ότι η κατανάλωση των διαλυτών έκλουσης είναι υψηλή (π.χ. 3l).

Χρονο- λογίες	Συγγραφείς (Αναφορές)	Επιτεύγματα	Σχόλια - Παρατηρήσεις
1963	G.L.K.Hunter and M.K. Veldhuis (254)	Ο διαχωρισμός τερπενίων σε ποσότητες της τάξεως των 25 g μελετήθηκε σε παρασκευαστικό αέριο χρωματογράφο, αποτελούμενο από 8 σε σειρά συνδεδεμένες στήλες διαστάσεων 3.2 X 30 cm. Ο χρωματογράφος διέθετε σύστημα προγραμματισμού θερμοκρασίας και ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας. Τα αποτελέσματα των διαχωρισμών κρίθηκαν πολύ ικανοποιητικά, κατόπιν συγκρίσεως με αντίστοιχους αναλυτικούς διαχωρισμούς με τριχοειδείς χρωματογραφικές στήλες.	Η εργασία περιορίζεται σε διαχωρισμούς πτητικών τερπενικών ενώσεων με ανώτατη θερμοκρασία λειτουργίας του χρωματογράφου μέχρι 160 <sup>0</sup> C.
1964	R. Lasztiy J. Nedelkovits and N. Bogyo (225)	Η αποτερπενίωση των αιθερίων ελαίων λεμονιού και πορτοκαλιού μελετήθηκε με απόσταξη, εκχύλιση και χρωματογραφία στήλης. Καλύτερα αποτελέσματα απ' απόψεως ποιότητας αποτερπενιωμένου αιθερίου ελαίου έδωσε η χρωματογραφία με πληρωτικό υλικό silica gel (ενεργοποιημένο με θέρμανση στους 150 <sup>0</sup> επί 25 h) και διαλύτες έκλουσης τον πετρελαϊκό αιθέρα και οξείκο αιθυλεστέρα.	Στοιχεία σχετικά με το βαθμό αποτερπενίωσης και την % ανάκτηση δεν έχουν ανακοινωθεί. Έτσι, συγκριτική μελέτη της εργασίας αυτής με άλλες παρεμφερείς δεν είναι δυνατή.

Χρονο- λογίες	Συγγραφείς (Αναφορές)	Επιτεύγματα	Σχόλια - Παρατηρήσεις
1966	J.M. Rayan and G.L. Dienes (175)	Διερευνώνται οι δυνατότητες εφαρμογής της αέριας χρωματογραφίας σε παραγωγική κλίμακα για το διαχωρισμό διαφόρων τερπενικών ενώσεων. Γίνεται σύγκριση μεταξύ απόσταξης και αέριας χρωματογραφίας αναφορικά με τη ποιότητα και το κόστος διαχωρισμού.	Δίνονται ορισμένα τεχνοοικονομικά στοιχεία σχετικά με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας σε παραγωγική κλίμακα. Εκτίθενται οι δυνατότητες εφαρμογής της παραγωγικής αέριας χρωματογραφίας στη βιομηχανία φαρμάκων και αρωμάτων.
1966	G.R. Fitch (256)	Γίνεται ανασκόπηση σχετικά με τη παραγωγική αέρια χρωματογραφία, τις διάφορες μεθοδολογίες συνεχούς λειτουργίας της και τις δυνατότητες εφαρμογής της στη βιομηχανία καλλυντικών.	Παρ' όλα αυτά, σήμερα πιστεύουμε, ότι σε παραγωγική κλίμακα η υγρή χρωματογραφία πλεονεκτεί σε πολλά σημεία έναντι της αέριας, ιδιαίτερα σε εφαρμογές που αφορούν τη φαρμακοβιομηχανία και αρωματοποιία όπως είναι ο διαχωρισμός συστατικών αιθερίων ελαίων.
1968	Dixon, Ma- lone and Umbreit (257)	Μελετάται ο διαχωρισμός του αιθερίου ελαίου Bergamot σε ποσότητες μέχρι 50 ml με αέριο χρωματογραφική στήλη διαστάσεων 10 x 203 cm στους 150 <sup>0</sup> C, με σκοπό την απομόνωση ορισμένων συστατικών του. Η ανάλυση των εκλούσιμων κλασμάτων γινόταν με IR, NMR ή MS.	Συγκεκριμένα, η αέριος χρωματογραφία έχει το μειονέκτημα της μικρότερης χωρητικότητας σε τροφοδοσία, το πρόβλημα της μη αποτελεσματικής συλλογής των κλασμάτων και την ανάγκη χρησιμοποίησης σχετικά υψηλών θερμοκρασιών πράγμα που επηρεάζει ορισμένα συστατικά των αιθερίων ελαίων.
1969	P.E. Barker and S. Al- Madfay (124-126)	Ο διαχωρισμός ορισμένων αιθερίων ελαίων μελετήθηκε με αέριο χρωματογράφο συνεχούς λειτουργίας, αποτελούμενος από 44 στήλες διαστάσεων 2.5 X 30 cm. Ο χρωματογράφος είχε μεγίστη χωρητικότητα τροφοδοσίας 150 ml/h και ανωτάτη θερμοκρασία λειτουργίας 250 <sup>0</sup> C.	Ο χρωματογράφος εξασφαλίζει τη συνέχεια της λειτουργίας του με ένα πολύπλοκο σύστημα βαλβίδων, που παρουσιάζει μηχανικά προβλήματα. Ιδιαίτερα, η κλιμάκωση του χρωματογράφου σε παραγωγική κλίμακα παρουσιάζει μεγάλες δυσκολίες.

Χρονο- λογίες	Συγγραφείς (Αναφορές)	Επιτεύγματα	Σχόλια - Παρατηρήσεις
1975	L.B.Rockland and C.R. Debenedict (258)	Μελετάται η αποτερπενίωση αιθερίων ελαίων με χρωματογραφία στήλης σε συνδυασμό με μοριακή απόσταξη. Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν ουδέτερη αλουμίνα, επεξεργασμένη κατάλληλα με οξικό αιθυλεστέρα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες διαλυτών έκλουσης, ο τερπενιοφιλικός (π.χ. πεντάνιο) για την απομάκρυνση των τερπενίων και ο οξυγονούχος (π.χ. αιθανόλη) για την απομάκρυνση των οξυγονούχων ενώσεων.	Η μελέτη αυτή θυμίζει την αρχική εργασία των Kirchner - Miller. Βέβαια τα αποτελέσματα της αποτερπενίωσης είναι πολύ καλύτερα λόγω της μοριακής απόσταξης με την οποία συνδυάζεται εδώ η χρωματογραφία στήλης. Η διαδικασία επεξεργασίας του πληρωτικού υλικού είναι επίπονος και χρονοβόρα και παρ'όλο που οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα δεν συνίσταται σε παραγωγική κλίμακα.
1978	R. Bonmati and G. Guiochon (245)	Δίνονται εφαρμογές ενός παραγωγικού αέριου χρωματογράφου χωρητικότητας 3-20 tons/year, για το διαχωρισμό και αποτερπενίωση αιθερίων ελαίων με πολύ καλά αποτελέσματα.	Είναι η πρώτη σημαντική προσπάθεια για την εφαρμογή της χρωματογραφίας σε παραγωγική κλίμακα. Αντίστοιχη αεριοχρωματογράφοι διατίθενται σήμερα στο εμπόριο με χωρητικότητα μέχρι 300 tons/year. Παρ'όλα αυτά, πιστεύουμε, ότι η υγρή χρωματογραφία είναι πλέον ενδεδειγμένη σε παραγωγική κλίμακα.

---

## Summary

*Comparison between preparative chromatography and common separation methods for the deterpenation of essential oils*

S.E. Liodakis, N.E.Tzamtzis and G.K.Parissakis

A review on the deterpenation of essential oils and its industrial importance is given. The most common methods of producing terpeneless oils such as steam distillation, fractional distillation, solvent extraction and hydrotropic extraction are critically presented. Preparative chromatography has several advantages over the other methods, (i.e. flexibility, high selectivity power), particularly for difficult separations heat sensitive materials, when high purity products are required. Such separations are encountered for the preparation of high quality terpeneless essential oils. The various schemes for increasing the chromatography column utilisation, the technological development of preparative chromatography and its applications for the separation of essential oils are reviewed.

**Key words.** Preparative chromatography, deterpenation, essential oils.

---

## Βιβλιογραφία

1. Στατιστικά Στοιχεία από την Εθνική Στατιστική Υπηρεσία Ελλάδος.
2. Στοιχεία από το Τμήμα Μελετών της Αγροτικής Τράπεζας Ελλάδος.
3. Παζιώνης, Δ.: Υπουργείο Γεωργίας, Διεύθυνση Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών (ιδιαίτερη συζήτηση).
4. Παζιώνης, Δ.: *Η καλλιέργεια των Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών στην Ελλάδα*, Υπουργείο Γεωργίας, Αθήνα (1978).
5. Τζαμτζής, Ν.Η.: *Εξευγενισμοί και Διαχωρισμοί Αιθερίων Ελαίων με Παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία*, Διδακτορική Μελέτη, Ε.Μ.Π., Αθήνα (υπό προετοιμασία).
6. Τετράδης, Π.: Βιορύλ Χημ. και Γεωργ. Βιομ. Επιστημ. Έρευνα Α.Ε., Αθήνα (ιδιαίτερη συζήτηση).
7. Skrubis, B.S.: *Perfumery Essent. Oil Record* **12**,788 (1964).
8. Κρητικός, Π.: Τα Φαρμακευτικά Φυτά και η Εθνική Οικονομία, Επιτροπή Ερεύνης και Οργανώσεως Οικονομικού Προγραμματισμού, Τόμος II, τεύχος 5, Αθήνα (1959).
9. Virmani, O.P and Datta, S.C.: *Flavour Ind.* **2**,111 (1970).
10. Virmani, O.P and Datta, S.C.: *Flavour Ind.* **12**,856 (1970).
11. Bauer, J.B.: *Am. Rerfumes Cosmet.* **79**, 50 (1964).
12. Αναλογίδης, Χ.Γ.: *Παραγωγή και Εκμετάλλευσις Αιθερίων Ελαίων εν Ελλάδι*, Διατριβή επί Διδακτορία, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα (1934).
13. Σκρουμπής, Β.Γ.: *Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσ/νικης, Θεσ/νικη (1971).
14. Broderick, J.J.: *Mfg. Chemist* **3**, 112 (1955).
15. Guenther, E.: *The Essential Oils*, R.E. Krieger Publishing Co, Inc., New York (1974).  
α) Volume II  
β) Volume I p. 218 and 17.

16. Sterrett, F.S.: *J. Chem. Educ.* **39**, 246 (1962).
17. Poucher, W.A.: *Perfumes Cosmetics and Soaps*, Chapman and Hall
  - α) Volume 1, "The Raw Materials of Perfumery", (7<sup>th</sup> ed.), Revised by G.M. Howard, London (1974).
  - β) Volume 2, "The Production Manufacture and Application of Perfumes", (8<sup>th</sup> ed), London (1979).
  - γ) Volume 3, "Modern Cosmetics", (8th ed.). Revised by G.M. Howard, London (1979).
18. Dorland, W.E. and Rogers, J.A.: *The Fragrance and Flavor Industry*, Publ. W.E. Dorland Co, New Jersey (1977).
19. Heath, H.: *Flavour Ind.* **9**, 586 (1970).
20. Waginaire, L. and Guillot, B.: *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **63**, 1084 (1961).
21. Littlejohn, W.R.: *Flavours* **3**, 7 (1940).
22. Craveri, C.: *Riv. Ital. Ess. Profum.* **7**, 89 (1925).
23. King, C.J.: *Separation Processes*, (2d edition), Mc Graw - Hill Inc., New York (1980).
24. Karger, B.L., Snyder, L.R and Horvath, C.: *An Introduction to Separation Science*, John Wiley and Sons, Inc., New York (1973).
25. Έξαρχος, Κ.: Δελτίον Εργασιών, No 4, p. 184, Υπουργείο Γεωργίας, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Φυτικών Προϊόντων, Αθήνα (1968).
26. Ruys, A.H.: *Perfumery Essent. Oil Record* **48**, 584 (1957).
27. α) Turnaire SA, Distillation Equipments Catalogue, France.  
β) Turnaire SA, General Catalogue No 5529, France.
28. Swaleh, M.: *Indian Perfumer* **7**, 93 (1963).
29. Muller, P.A.: *Perfumery Essent. Oil Record* **59**, 18 (1968).
30. Sardanovskii, M.V.: *Chem. Zent. II*, 1456 (1930).
31. Bloomfield, A.L.: *Perfumery Essent. Oil Record* **27**, 131 (1936).
32. Leone, P.: *Riv. Ital. Ess. Prof.* **28**, 5 (1946).
33. Jacobs, M.B.: *Am. Perfumer Essent. Oil Rev.* **59**, 121 (1952).
34. Zapata, J.M and Tanago J.G.del.: *Farmacognosia (Madrid)*, **13**, 273 (1953).
35. Zapata, J.M and Tanago, J.G.del.: *Farmacognosia (Madrid)*, **19**, 281 (1959).
36. Braverman, J.B.S.: *Citrus Products Chemical Composition and Chemical Technology*, p. 207, Interscience Publishers, New York (1949).
37. Nicoll, B.J.: *Chem. Process Eng.* **49**, 99 (1968).
38. Myint, K.H and Gale, M.M.: *Union Burma J. Sci. Technol.* **2**, 363 (1969).
39. Kroom, J.: *Indian Perfumer* **13**, 35 (1969).
40. Millet, F., Rollet, M., Dorche, J.: *Ann. Pharm. Fr.* **32**, 525 (1974).
41. Devakumar, C., Ramesh, S. and Kham, M.N.: *Perfum.* **21**, 65 (1977).
42. Nelson, E.K and Mottern H.H.: *Ind. Eng. Chem.* **26**, 634 (1934).
43. Katz, A.: *Spice Mill* **54**, 748 (1931).
44. Naves, Y.R.: *Documentation Sci.* **6**, 269 (1937).
45. Hendriks, H.: *Planta Med.* **24**, 158 (1973).
46. Pickett, J.A., Coates, J. and Sharpe, R.F.: *Chem. Ind. (London)* **13**, 571 (1975).
47. Van Dijck, W.J.D and Ruys, A.H.: *Perfumery Essent. Oil Record* **28**, 91 (1937).
48. Bataafsche, N.V.: Petroleum Maatschappij, British Patent. 486, 347 (2 June 1938).
49. Von Wijk W.R and Van Dijck, W.J.D.: Dutch Patent 45, 836 (15 May 1939).
50. Mariotti, E.: Ital. Patent 439, 240 (14 Sept. 1948).
51. Rugi, A.H.: *Perfumery Essent. Oil Record* **42**, 118 (1951).
52. Flickenschildt, K.H. and Bischofswerder, K.: German Patent 384, 676 (30 July 1953).
53. Othmer, F., Jacobs, M.B and Wishnefsky, N.: U.S Patent 2, 631, 145 (10 March 1953).
54. Neuberg, C.: *Biochem. Z.* **76**, 107 (1916).
55. Mckee, R.H.: *Ind. Eng. Chem.* **38**, 382 (1946).

56. Booth, H.S. and Everson, H.E.: *Ind. Eng. Chem.* **40**, 1949 (1948).
57. Booth, H.S. and Everson, H.E.: *Ind. Eng. Chem.* **41**, 2627 (1949).
58. Masada, Y.: *Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, John Wiley, New York (1976).
59. British Standards Institution: *Methods of Test for Essential Oils*, BS 2073, 1976.
60. Παπαθανασίου, Γ.Θ.: *Ανάλυσις των Αιθερίων Ελαίων δια της Χρωματογραφίας Αερίωδους Φάσεως*, Διατριβή επί Διδακτορία, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών Αθήνα (1960).
61. Σκρουμπή, Β.Γ.: *Μελέτη του Φυσικού Αιθερίου Ελαίου του Kumquat - Παραλαβή - Ανάλυσις - Μέθοδος Αεριο-υγροχρωματογραφίας*, Διατριβή επί Διδακτορία, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Αθήνα (1961).
62. Teranishi, R.: *International Laboratory* **9**, 18 (1979).
63. Guenther, E., Kulka, K. and Rogers, J.A.: *Anal. Chem.* **35**, 39R (1963).
64. Guenther, E., Rogers, J.A., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **37**, 46R (1965).
65. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **39**, 48R (1967).
66. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **41**, 40R (1969).
67. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **43**, 45R (1971).
68. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **45**, 45R (1973).
69. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **47**, 139R (1975).
70. Guenther, E., Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **49**, 83R (1977).
71. Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **51**, 18R (1979).
72. Gilbertson, G. and Koenig, R.T.: *Anal. Chem.* **5**, 61R (1981).
73. Zubyk, W.J. and Conner, A.Z.: *Anal. Chem.* **32**, 912 (1960).
74. Cartoni, G.P. and Liberti, A.: *J. Chromatogr.* **3**, 121 (1960).
75. Bernhard, R.A.: *J. Chromatogr.* **3**, 471 (1960).
76. Clark, J.: *J. Chromatogr.* **7**, 433 (1962).
77. Klouwen, M.H. and Ter Heide, R.: *J. Chromatogr.* **7**, 297 (1962).
78. Nigam, J.C. and Levi, L.: *Can. J. Chem.* **40**, 2083 (1962).
79. Bernhard, R.A.: *Anal. Chem.* **34**, 1576 (1962).
80. Howard, G.E.: *Analyst* **88**, 633 (1963).
81. Valkanas, G. and Iconomou, N.: *J. Chromatogr.* **12**, 536 (1963).
82. Kolšek, J. and Matičič, M.: *J. Chromatogr.* **14**, 331 (1964).
83. Bapat, B.V., Ghatge, B.B. and Bhattacharyya, S.C.: *J. Chromatogr.* **18**, 308 (1965).
84. Nigam, J.C. and Levi, L.: *J. Chromatogr.* **23**, 217 (1966).
85. Shulgin, A.T.: *J. Chromatogr.* **30**, 54 (1967).
86. Regan, A.F. and Andrews, B.R.: *J. Chromatogr.* **31**, 209 (1967).
87. Ter Heide, R., Timmer, R. and Wobben, H.J.: *J. Chromatogr.* **50**, 127 (1970).
88. Gillen, D.G. and Scanlon, J.T.: *J. Chromatogr.* **10**, 729 (1972).
89. Von Rudloff, E.: "Gas-Liquid Chromatography of Terpenes" in Giddings, J.C. and Keller, R.A.: *Advances in Chromatography*, Vol. 10 p. 173, Marcel Dekker, Inc., New York, 1974.
90. Kugler, E., Langlais, R., Halang, W. and Hufschmidt, M.: *Chromatographia* **8**, 468 (1975).
91. Ter Heide, R.: *J. Chromatogr.* **129**, 143 (1976).
92. Senanayake, U.M., Edwards, R.A. and Lee, T.H.: *J. Chromatogr.* **116**, 468 (1976).
93. Averill, W. and March, E.W.: *Chromatogr. Newslett.* **4**, 20 (1976).
94. Jones, R.A., Neale, M.E. and Ridlington, J.: *Chromatogr.* **130**, 368 (1977).
95. Averill, W.: *Chromatogr. Newslett.* **5**, 40 (1977).
96. Skrubis, B.G.: *Flavour Ind.* **11**, 566 (1972).
97. Hendriks, H. and Bruins, A.P.: *J. Chromatogr.* **190**, 321 (1980).



98. Bicchi, C. and Frattini, C.: *J. Chromatogr.* **190**, 471 (1980).
99. Cazdag, M. Szepesi, G., Mihályfi, K., Vigh, Gy. and Hlavany, J.: *Chromatographia* **5**, 296(1981).
100. Hlavay, J., Bartha, A., Vigh, Gy., Gazdag, M. and Szepesi, G.: *J. Chromatogr.* **204**, 59 (1981).
101. Verzele, M., Maes, G., Vuye, A., Godefroot, M., Van Alboom, M. Vervisch, J. and Sandra, P.: *J. Chromatogr.* **205**, 367 (1981).
102. Godefroot, M., Sandra, P. and Verzele, M.: *J. Chromatogr.* **203**, 325 (1981).
103. Schmit, J.A., Williams, R.C. and Henry, R.A.: *J. Agric. Food Chem.* **21**, 551 (1973).
104. Porcaro, P.J. and Shubiak, P.: *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **57**, 145 (1974).
105. Komae, H. and Hayashi, N.: *J. Chromatogr.* **114**, 258 (1975).
106. Shu, C.K. and Walradt, J.P. and Taylor, W.J.: *J. Chromatogr.* **106**, 271 (1975).
107. Fisher, J.F.: *Agric. Food Chem.* **23**, 1199 (1975).
108. Scheffer, J.J.C. and Svendsen, A.B.: *J. Chromatogr.* **115**, 607 (1975).
109. Ross, M.S.F.: *J. Chromatogr.* **118**, 273 (1976).
110. Selim, S.: *J. Chromatogr.* **136**, 271 (1977).
111. Ross, M.S.F.: *J. Chromatogr.* **160**, 199 (1978).
112. Latz, H.W. and Ernes, D.A.: *J. Chromatogr.* **166**, 189 (1978).
113. Fisher, J.F.: *J. Agric. Food Chem.* **26**, 497 (1978).
114. Jones, B.B., Clark, B.C. and Iacobucci, G.A.: *J. Chromatogr.* **178**, 575 (1975).
115. Waters Associates Inc.: Separation of Essential Oils by HPLC, (not published work).
116. Rouseff, R.L. and Fisher, J.F.: *Anal. Chem.* **52**, 1228 (1980).
117. Solinas, V., Gessa, C. and Delitala, L.F.: *J. Chromatogr.* **219**, 332 (1981).
118. Liang-Pi Wu, J. and Chung-May Wu.: *J. Chromatogr.* **214**, 234 (1981).
119. Barker, P.E. and Lloyd, D.: Symposium on «*The Less Common Means of Separation 1963*», Inst. Chem. Eng., London (1964).
120. Barker, P.E. and Huntington, D.H.: *J. Gas Chromatogr.* **4**, 59 (1966).
121. Barker, P.E. and Huntington, D.H. in Littlewood, A.B.: *Gas Chromatography 1966*, p. 135, Inst. of Petroleum, 1967.
122. Barker, P.E. and Huntington D.H.: *Dechema Monographien* **62**, 153 (1969).
123. Barker, P.E. and Universal Fisher Eng. Co. Ltd. Crawley, Sussex.: British Patent Applications 5764/68 and 443775/68.
124. Barker, P.E. and Al-Madfai, S.: *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 425 (1969).
125. Al-Madfai, S.: Ph. D. Thesis, Univ. of Birmingham, Birmingham (1969).
126. Barker, P.E. and Al-Madfai, S.: Proc. 5<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Chromatography, Las Vegas, Preston Technical Abstracts Co., Evanston, Illinois (1969).
127. Barker, P.E., Barker, S.A., Hatt, B.W. and Somers, P.J.: *Chem. and Proc. Eng.* **52**, 64 (1971).
128. Barker, P.E. in Zlatkis, A.: *Preparative Gas Chromatography*, p. 325, Wiley-Interscience, London, 1971.
129. Barker, P.E. and Deeble, R.E.: British Patent 1, 418, 503 and U.S. Patent 4, 001, 112.
130. Barker, P.E. and Deeble, R.E.: *Anal. Chem.* **45**, 1121 (1973).
131. Barker, P.E. and Deeble, R.E.: *Chromatographia* **8**, 67 (1975).
132. Deeble, R.E.: Ph. D. Thesis, Univ. of Aston in Birmingham, Birmingham (1974).
133. Bell, M.D.: Ph. D. Thesis, Univ. of Aston in Birmingham, Birmingham (1977).
134. Barker, P.E., Bell, D.M. and Deeble, R.E.: *Chromatographia* **5**, 277 (1979).
135. Barker, P.E., Hatt, B.W. and Williams, A.N.: *Chromatographia* **9**, 487 (1978).
136. Barker, P.E., Hatt, B.W. and Williams, A.N.: *Chromatographia* **7**, 377 (1977).
137. Hatt, B.W.: Ph. D. Thesis, Univ. of Birmingham, Birmingham (1970).
138. Williams, A.N.: Ph. D. Thesis, Univ. of Aston in Birmingham, Birmingham (1976).

139. Barker, P.E., Ellison, F.J. and Hatt, B.W. in "*Chromatography of Synthetic and Biological Polymers*", Vol I, p. 218, Horwood Ltd., 1978.
140. Ellison, F.J.: Ph. D. Thesis, Univ. of Aston in Birmingham, Birmingham (1976).
141. Barker, P.E. in Knapman, C.E.H.: *Developments in Chromatography*, Applied Science Publishers, London, 1978.
142. Barker, P.E. and Liodakis, S.E.: *Chromatographia*, **12**, 703 (1978).
143. Barker, P.E., Liodakis, S.E. and Howari, M.I.: *Can. J. Chem. Eng.* **57**, 42 (1979).
144. Liodakis Ph. D. Thesis, Univ. of Aston in Birmingham, Birmingham (1977).
145. Reese, C.E. and Grushka, E.: *Chromatographia* **8**, 85 (1975).
146. Guichon G. and Jacob, L.: *Chromatogr. Rev.* **14**, 77 (1971).
147. Conder, J.R. and Purnell, J.H.: *Trans. Faraday Soc.* **64**, 1505 (1968).
148. Conder, J.R. and Purnell, J.H.: *Trans. Faraday Soc.* **65**, 824 (1969).
149. Peter, J. and Euston, C.B.: *Anal. Chem.* **37**; 657 (1965).
150. Hupe, K.P. and Busch, U. and Winde, K.: *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 1 (1969).
151. Higgins, G.M.C. and Smith, J.F. in Goldup, A.: *Gas Chromatography* **1964**, p. 73, Inst. of Petroleum, London, 1965.
152. Pecsar, R.E. in Zlatkis, A.: *Preparative Gas Chromatography*, p. 73, Wiley-Interscience, London, 1971.
153. Conder, J.R. in Purnell, J.H.: *New Developments in Gas Chromatography*, p. 137, Wiley-Interscience, New York and London, 1973.
154. Giddings, J.C.: *J. Gas Chromatogr.* **1**, 12 (1963).
155. Pretorius, V. and De Clerk, K. in Zlatkis, A.: *Preparative Gas Chromatography*, p. 1, Wiley-Interscience, London, (1971).
156. Rijnders, G.W.A. in Giddings, J.C. and Keller, R.A.: *Advances in Chromatography*, p. 215, Marcel Dekker, New York, 1966.
157. Guillemin, G.L.: *J. Chromatogr.* **12**, 163 (1963).
158. Guillemin, G.L.: *J. Chromatogr.* **4**, 104 (1966).
159. Guillemin, G.L.: *J. Chromatogr.* **30**, 222 (1967).
160. Albrecht, J. and Verzele, M.: *J. Chromatogr. Sci.* **8**, 586 (1970).
161. Frisone, G.J.: *J. Chromatogr.* **6**, 97, (1961).
162. Ryan, J.M., Timmins, R.S. and O' Donnell, J.F.: *Chem. Eng. Prog.* **64**, 53 (1968).
163. Timmins, R.S., Mir, L. and Ryan, J.M.: *Chem. Eng.* **76**, 170 (1969).
164. Carel, A.B. and Perkins, G.: *Anal. Chim. Acta* **34**, 83 (1966).
165. Carel, A.B., Chement, R.E. and Perkins, G.: *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 218 (1969).
166. Golay, M.J.E. in Noebels, H.J., Wall R.F. and Brenner, N.: *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1961.
167. Mir, L.: *J. Chromatogr. Sci.* **9**, 436 (1971).
168. Musser, W.N. and Sparks, R.E.: *J. Chromatogr. Sci.* **9**, 116 (1971).
169. Wright, J.W.: *J. Gas Chromatogr.* **1**, 10 (1963).
170. Reiser, R.W.: *J. Gas Chromatogr.* **4**, 390 (1966).
171. Gordon, S.M., Krige, G.J. and Pretorius, V.: *J. Gas Chromatogr.* **2**, 241 (1964).
172. Gordon, S.M., Krige, G.J. and Pretorius, V.: *J. Gas Chromatogr.* **3**, 87 (1965).
173. Conder, J.R.: Paper presented at the Symposium on Less Common Means of Separation, Inst. Chem. Eng., London, 1972.
174. Valentin, P., Hagenbach, G., Roz, B. and Guiochon, G. in Perry, S.G.: *Gas Chromatography* **1972**, p. 157, Inst. of Petroleum, 1973.

175. Ryan, J.M. and Dienes, G.L.: *Drug Cosmet. Ind.* **99**, 60 (1966).
176. Broughton, D.B.: *Chem. Eng. Prog.* **64**, 60 (1968).
177. Broughton, D.B. Nenzil, R.W. Phasris, J.M. and Brearly, C.S.: *Chem. Eng. Prog.* **66**, 70 (1970).
178. Sussman, M.V. and Rathore, R.S.: *Chromatographia* **8**, 55 (1975).
179. Conder, J.R.: *Chromatographia* **8**, 60 (1975).
180. Martin, A.J.P.: *Disc. Faraday Soc.* **7**, 332 (1949).
181. Dinelli, D., Polezzo, S. and Taramasso, M.: *J. Chromatogr.* **7**, 477 (1962).
182. Fox, J.B.: *J. Chromatogr.* **11**, 9 (1963).
183. Polezzo, S. and Taramasso, M.: *J. Chromatogr.* **11**, 9 (1963).
184. Taramasso, M.: *J. Chromatogr.* **49**, 27 (1970).
185. Mosier, L.D.: U.S. Patent **3**, 078, 647 (1963).
186. Sussman, M.V., Astill, K.N., Rombach, R. and Cerullo, A. and Chen, S.S.: *Ind. Eng. Chem. Fund.* **11**, 181, (1972).
187. Sussman, M.V., Astill, K.N. and Rathore, R.N.S.: *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 91 (1974).
188. Turina, S., Krajovan, V. and Kostomaj, T.: *Anal. Chem.* **189**, 100 (1962).
189. Scott, R.P.W. in Desty, D.H.: *Gas Chromatography* **1958**, p. 189, Butterworths, London, 1958.
190. Fitch, G.R., Probert, M.E. and Tiley, R.F.: *J. Chem. Soc.* **4875** (1962).
191. Schultz, H. in Van Swaay, M.: *Gas Chromatography* **1962**, p. 225, Butterworths, London, 1963.
192. Bradley, B.J. and Tiley, R.F.: *Chem. Ind.* **18**, 743 (1963).
193. Berg, C.: *Chem. Eng. Prog.* **47**, 585 (1951).
194. Sussman, M.V.: *Chemtech April*, 260 (1976).
195. Phillips Petroleum Company: U.S. Patent **2**, 869, 672.
196. Szepesy, L., Sebestyén, Sz., Feher, I. and Nagy, Z.: *J. Chromatogr.* **108**, 285 (1975).
197. Wilhelm, R.H., Rice, A.W. and Bendelius, A.R.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **5**, 141 (1966).
198. Wilhelm, R.H., Rice, A.W. Rolke, and Sweed, N.H.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **7**, 337 (1968).
199. Sweed, N.H. in Perry, E.S. and Van Oss, C.J.: *Progress in Separation and Purification*, Vol. 4, p. 171, Wiley, New York, 1971.
200. Tuthill, E.J.: *J. Chromatogr. Sci.* **8**, 285 (1970).
201. Wankat, P.C.: *Separ. Sci.* **9**, 85 (1974).
202. Pucar, Z.: *Chromatogr. Rev.* **3**, 38 (1961).
203. Hybarger, R., Tobias, C.W. and Vermeulen, T.: *Ind. Eng. Chem. Process Design Develop.* **2**, 65 (1963).
204. Rose, A., Royer, D.J. and Henly, R.S.: *Separ. Sci.* **2**, 211 (1967).
205. Rose, A., Royer, D.J. and Henly, R.S.: *Separ. Sci.* **2**, 257 (1967).
206. Scholfield, C.R.: presented in Am. Chem. Soc. Meeting, Atlantic City, New Jersey, Sept. 1974.
207. McNair, H.M.: *Chromatographia* **7**, 161 (1974).
208. Waters, J.L.: *J. Chromatogr. Sci.* **9**, 428 (1971).
209. Loibner, H. and Seidl, G.: *Chromatographia* **9**, 600 (1979).
210. Kohler, D.A. and Telepchak, M.J.: *International Laboratory* **9**, 139 (1979).
211. Destefano, J.J. and Beachell, H.C.: *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 654 (1972).
212. Coq, B., Cretier, G., Gonnet, C. and Rocca J.L.: *Chromatographia* **12**, 139 (1979).
213. Miller, J.M. and Strusz, R.: *International Laboratory* **3**, 87 (1980).
214. Geeraert, E. and Verzele, M.: *Chromatographia* **12**, 50 (1980).
215. Bombaugh, K.J. and Levangie, R.F.: *J. Chromatogr. Sci.* **8**, 560 (1970).

216. Baker, D.R., Henry, R.A., Williams, R.C., Hudson, D.R. and Parris, N.A.: *J. Chromatogr.* **83**, 233 (1973).
217. Coq, B., Cretier, G., Rocca, J.L. and Kastner, R.: *J. Chromatogr.* **178**, 41 (1979).
218. Waters Associates Inc. Massachusetts: "Applications in Preparative Scale Chromatography".
  - α) AN 127, May 1973
  - β) H76, March 1977
  - γ) J 39, January 1979
  - δ) H 81, June 1977
  - ε) H 60, October 1975
  - στ) H 85, July 1977
  - ζ) AN 130, October 1973.
219. Zief, M., Crane, L.J. and Horvath, J.: *International Laboratory* **5**, 72 (1982).
220. Barford, R.A., McGraw, R. and Rothbart, H.L.: *J. Chromatogr.* **166**, 365 (1978).
221. Coq, B., Cretier, G., Rocca, J.L. and Kastner, R.: *J. Chromatogr.* **178**, 41 (1979).
222. Roumeliotis, P. and Unger, K.: *J. Chromatogr.* **185**, 445 (1979).
223. Thiem, J. and Sievers, A.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* **304**, 369 (1980).
224. Barker, P.E., Bell, D.M. and Deeble, R.E.: *Chromatographia* **6**, 334 (1980).
225. Tiebach, R.K.D. and Schramm, M.: *Chromatographia* **7**, 403 (1980).
226. Kupaš, M., Křiž, J., Triska, J. and Vodička, L.: *J. Chromatogr.* **191**, 319 (1980).
227. Gareil, P., Personnaz, L., Feraud, J.P. and Caude, M.: *J. Chromatogr.* **192**, 53 (1980).
228. Gasparrini, F., Cacchi, S., Caglioti, L., Misiti, D. and Giovannoli, M.: *J. Chromatogr.* **194**, 239 (1980).
229. Ito, Y.: *J. Chromatogr.* **196**, 295 (1980).
230. Jones, B.B., Clark, Jr, B.C. and Iacobucci, G.A.: *J. Chromatogr.* **202**, 127 (1980).
231. Hostettmann, K., Hostettmann-Kaldas, M. and Sticher, O.: *J. Chromatogr.* **202**, 154 (1980).
232. Vogh, J.W. and Thomson, J.S.: *Anal. Chem.* **53**, 1345 (1981).
233. Barker, P.E., Howary, M.I. and Irlam, G.A.: *Chromatographia* **4**, 192 (1981).
234. Pietrzyk, D.J. and Stodola, J.D.: *Anal. Chem.* **53**, 1822 (1981).
235. Hupe, K.P. and Lauer, H.H.: *J. Chromatogr.* **203**, 41 (1981).
236. Ito, Y. and Bhatnagar, R.: *J. Chromatogr.* **207**, 171 (1981).
237. Westwood, R. and Hairsine, R.W.: *J. Chromatogr.* **219**, 140 (1981).
238. Evershed, R.P., Morgan, E.D. and Thomson, L.D.: *J. Chromatogr.* **237** 350 (1982).
239. Prusiewicz, K., Kamiński, M. and Klawiter, J.: *J. Chromatogr.* **238**, 232 (1982).
240. Sakodinskii, K.I., Volkov, S.A., Kovanko, Yu. A., Zel Venskii, V., Reznikov, V.I. and Averin, V.: *J. Chromatogr.* **204**, 167 (1981).
241. Wright Scientific Limited, Gloucestershire, England.:
  - a) Publication No 1830-001, "Production Chromatography Column Selection Chart"
  - b) Publication No 1870-060, "Large Scale Production Chromatography Columns"
  - c) Publication No 1890-040, "Glass Production Chromatography Columns"
242. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts USA.:
  - a) Bulletin 14, July 1977
  - b) Bulletin 37, March 1981.
243. Bonmati, R.G., Chapelet-Letourneux, G. and Margulis, J.R.: *Chem. Eng.* **24**, 70 (1980).
244. Société Nationale Elf Aquitaine and Société de Recherches Techniques et Industrielles.: *Chem. Eng.* **88**, 70 (1981).
245. Bonmati, R. and Guiochon, G.: *Perfumer and Flavorist* **3**, 17 (1978).
246. ELF-SRTI, Technical Information:

- a) "Preparative and Production-Scale Gas Chromatography" (G. Chapelet), Boite Postale 22 May 1982.
- b) "Automatic Production-Scale High Performance Liquid Chromatography, HPLC", (G. Chapelet), Elf France, April 1983.
247. Chementator: *Chem. Eng.* **86**, 87 (1979).
248. Instruments SA, Division Jobin-Yvon, Longjumeau, France:
  - a) Preparative Liquid Chromatograph-Chromatospac, Catalogue
  - b) Preparative Liquid Chromatograph-Chromatospac, Prep 100, Operating Instructions
  - c) Application Notes, Booklets Nr 1 and 2.
249. Τζαμτζής, Ν.Η., Λιοδάκης, Σ.Ε., Παρισάκης, Γ.Κ.: Πρακτικά 8ου Πανελληνίου Συνεδρίου Χημείας, Ένωση Ελλήνων Χημικών, Αθήνα 1983.
250. Kirchner, J.G. and Miller, J.M.: *J. Ind. Eng. Chem.* **44**, 318 (1952).
251. Kirchner, J.G. and Miller, J.M.: *U.S. Patent* 2, 712, 008 (28 June 1955).
252. Braverman, J.B.S. and Solomiansky, L.: *Perfumery Essent. Oil Record* **6**, 284 (1957).
253. Heric, A.B. and Trowbridge, J.R.: *U.S. Patent* 2, 975, 170 (14 March 1961).
254. Hunter, G.L.K. and Veldhuis, M.K.: *J. Chromatogr.* **11**, 11 (1963).
255. Lasztity, R., Nedelkovits, J. and Bogyo, N.: *Elelm. Ipar* **16**, 80 (1964).
256. Fitch, G.R.: *J. Soc. Cosmetic Chemists* **17**, 657 (1966).
257. Dixon, C.W., Malone, C.T. and Umbreit, G.R.: *J. Chromatogr.* **35**, 475 (1968).
258. Rockland, L.B., Debenedict, C.R.: *U.S. Patent* 3, 867, 262 (18 Feb. 1975).
259. Τζαμτζής, Ν.Η., Σταθερόπουλος Μ.Κ., Λιοδάκης Σ.Ε.: Πρακτικά Ημερίδας Φασματογραφίας Μάζας, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα 1983.
260. Χατζηδάκης, Λ.: Διπλωματική Εργασία, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα 1983.
261. Σιδερή, Ξ.: Διπλωματική Εργασία, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα 1983.
262. Παπακωνσταντίνου, Κ.: Διπλωματική Εργασία, Ε.Μ. Πολυτεχνείο, Αθήνα 1983.

## **EFFECTS OF CHROMIUM IONS ON THE CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS IN VITRO AND ON THE METABOLIZING ENZYMES OF RAT LIVER MICROSOMES**

G.H. DELICONSTANTINOS, A. POLYCHRONOPOULOU-TRICHOPOULOU,  
and V.M. KAPOULAS

*Department of Physiology, School of Medicine, University of Athens, Department of Nutrition and Biochemistry, Athens' School of Hygiene, and Department of Biochemistry, School of Natural Sciences, University of Ioannina, Greece.*

Received January 12, 1983)

### **Summary**

The influence of trivalent chromium ion on the in vitro cholesterol biosynthesis has been studied, using [<sup>14</sup>C] acetate and [<sup>14</sup>C] mevalonate as precursors.

Cholesterol biosynthesis by rat liver 15,000 xg supernatant was inhibited by Cr<sup>3+</sup> at concentrations between 8.10<sup>-4</sup>M and 8.10<sup>-5</sup>M; 8.10<sup>-6</sup>M Cr<sup>3+</sup> inversely caused an increase of cholesterol biosynthesis. Differences were more pronounced when using [<sup>14</sup>C] mevalonate instead of [<sup>14</sup>C] acetate as precursor.

Since the cholesterol biosynthetic route involves certain microsomal enzymes including cytochrome P450, requiring both NADPH and molecular oxygen, the influence of Cr<sup>3+</sup> on the activity of NADPH-cytochrome C reductase, NADPH-oxidase and biphenyl-4-hydroxylase was studied. It was shown that Cr<sup>3+</sup> in all concentrations used inhibited the activity of the above enzymes except at the concentration of 8.10<sup>-6</sup>M which caused a profound increase of the biphenyl-4-hydroxylase activity.

**Key words:** Chromium, cholesterol, biphenyl-4-hydroxylase, cytochrome C reductase, NADPH-oxidase

### **Introduction**

Among the essential trace metals, chromium is unique in that its concentration in animal tissues declines with ageing<sup>1</sup>, and accumulating evidence suggests that human chromium deficiency is an important factor in atherosclerosis<sup>2,3</sup>. Chromium ions have been shown to play a multifunctional role in lipid and carbohydrate metabolism<sup>4</sup> by mechanisms largely unknown, since the strong inter-relationships between these two processes, plus their inherent dependence on insulin seriously hinder conclusive interpretation of experimental observations.

*In vivo* observations have indicated that chromium deficiency induces glucose intolerance<sup>5</sup>, higher levels of serum cholesterol and of aortic lipids, and deposition of aortic plaques<sup>6</sup>, while consumption of water enriched with chromium salts restores these disturbances to normal<sup>7,8,9</sup>.

*In vitro* studies have shown that besides the well-known activation of phosphoglucosyltransferase<sup>10</sup> by chromium ions, their critical role in glucose tolerance is most probably exerted through a chromium-dependent glucose tolerance factor<sup>11</sup>, which interacts with insulin in cell membranes<sup>12</sup>. In contrast, early observations have shown chromium ions ( $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ) to stimulate rather than inhibit the *in vitro* hepatic biosynthesis of fatty acids and cholesterol from acetate<sup>13</sup>. Later studies<sup>14</sup>, revealed that upon addition of insulin alone, glucose alone, and insulin plus glucose into the assay system, containing  $10^{-6} \text{M}$  chromium ions, the incorporation of [<sup>14</sup>C] acetate into the lipids increased up to 6%, 24% and 51% respectively. A reasonable interpretation of these effects by the authors<sup>14</sup> postulates that the stimulatory action of chromium ions on cholesterol biosynthesis is a secondary effect, caused by the increased NADPH-levels resulting from glucose, especially in the presence of insulin.

Therefore, in searching for an insight into the opposite effects of chromium *in vivo*, it seemed worthwhile to study the concentration-dependent action of chromium ion on cholesterol biosynthesis from [<sup>14</sup>C] acetate and [<sup>14</sup>C] mevalonate as well as on several microsomal enzymic activities influencing the levels of cytoplasmic NADPH. The latter possibility was suggested by the following combination of the existing evidence: First, the involvement of microsomal enzymes, including cytochrome P450, in the process is manifested by the fact that cholesterol biosynthesis is inhibited by carbon monoxide, whereas the rate of hepatic biosynthesis of cholesterol from [<sup>14</sup>C] acetate or [<sup>14</sup>C] mevalonate *in vitro* is highly increased by pre-treatment of the animal with drugs increasing the activity of liver microsomal hydroxylases<sup>15,16,17</sup>. Second, the *in vitro* activities of several microsomal enzymes undergo changes highly responsive to changes of metal ion concentrations in the assay system, thus suggesting an important role of essential trace metals in maintaining the activities of microsomal enzymes at normal levels<sup>18,19,20</sup>.

The microsomal enzymic activities selected for this study are NADPH-Cytochrome C reductase, NADPH-oxidase and biphenyl-4-hydroxylase. Measurements of the activity of the latter activity provides very useful information about the liver microsomal enzymes since both, its rate and specificity are largely modified by exogenous inducers. Namely, pretreatment of the animal with phenobarbital and other non-carcinogenic substances stimulates the 4-hydroxylation of biphenyl, whereas pre-treatments with carcinogenic agents (e.g. 3-methylcholanthrene) stimulates the 2-hydroxylation of biphenyl<sup>21</sup>.

## Materials and methods

### I. Materials

[<sup>14</sup>C]: acetate (spec. act. 55 mCi/mmol) and DL-[<sup>14</sup>C] mevalonate (spec. act.

12,9 mCi/mmol) were obtained from CIS company. ATP, NADP, NADPH, Glucose-6-phosphate and Glucose-6-phosphate dehydrogenase were obtained from Boehringer Mannheim. Biphenyl was recrystallized from 96% ethanol, m.p. 69-70° (lit. 70°) and 4-hydroxybiphenyl was recrystallized from methanol, m.p. 166-167° (lit. 166.5°). The organic solvents used were of the highest commercial purity available. PPO and POPOP (Scintillation grade) were obtained from Packard Instruments International. Radioactive products were separated by thin-layer chromatography using silica gel H:

## II. Preparation of homogenates

Adult male rats of Sprague-Dawley strain, weighing between 150 and 200 g were used. The rats were killed by a blow on the head and exsanguinated. The livers were excised. The homogenates and subcellular fractions were prepared essentially as described by Burke and Bridges<sup>21</sup>, but keeping the pH at 6.5 to avoid hydrolysis of chromium salt. The microsomal fraction was suspended in a 1.15% KCl, 0.1M potassium phosphate buffer pH 6.5 at a concentration of 10 mg protein per ml. The protein content was determined as described by Lowry *et al*<sup>22</sup> using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

For the preparation of microsomes from phenobarbital treated animals, five animals were injected once daily, intraperitoneally with sodium phenobarbital (10 mg as a 1% aq. soln. per 100 g body wt.) for 5 days, while controls were injected with saline (0.5 ml 0.9% NaCl). At least 20 h were allowed to elapse between the last injection and sacrifice of animals in all cases.

## III. Cholesterol biosynthesis

Cholesterol biosynthesis in the presence of chromium ions was carried out as follows: Chromium ions (as  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) at concentration of  $8.10^{-4}\text{M}$ ,  $8.10^{-5}\text{M}$  and  $8.10^{-6}\text{M}$  were added to 1.5 ml of the 105,000 xg supernatant plus 0.25 ml of the microsomal suspension (2.5 mg of microsomal protein). After preincubation for 30 min at 37°C in a shaking waterbath, the precursors [<sup>14</sup>C] acetate (500,000 cpm) and [<sup>14</sup>C] mevalonate (500,000 cpm) were added and the incubate was fortified with NADP, 1 μmole; glucose-6-phosphate, 10, μmoles; glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.25 units; ATP, 4 μmoles;  $\text{MgCl}_2$ , 6 μmoles. [<sup>14</sup>C] mevalonate solution in benzene was then added with 10 μl of propylene glycol. The final volume of each incubation mixture was adjusted to 2.5 ml with the 105,000 xg supernatant. Incubation was further continued for 1 h and terminated by addition of 7.5 ml of methanol-chloroform, 2:1 (v/v).

Lipids were extracted from the incubation mixture with 2.5 ml chloroform. After centrifugation, the chloroform layer was removed and evaporated to dryness at 50°C under nitrogen. Lipid extracts were chromatographed on silica gel (250 μ thin layer plates) using ethyl acetate-hexane, 25:75 (v/v) as developing solvent. Radioactive incubation products were localized on the plates by co-chromatography of reference substances and staining with iodine (cholesterol,  $R_f$  0.25; lanosterol,  $R_f$  0.38). The bands corresponding to the reference substances were then



scraped off and transferred to a scintillation vial containing scintillant (5 g PPO and 300 mg POPOP in 1 l toluene). Segments of silica gel from the plates served as blanks. Radioactivity was measured in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer. Quenching due to the presence of the gel scintillator was negligible.

#### IV. Microsomal enzymes assays

*Assay of biphenyl-4-hydroxylase activity.* Biphenyl-4-hydroxylase activity was determined by a modification of a procedure described by Prough and Bruke (23). Chromium ions (as  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) at concentrations of  $8 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}\text{M}$  and  $8 \cdot 10^{-6}\text{M}$  were added to 1.5 ml phosphate buffer pH 6.5 plus 0.25 ml of the microsomal suspension (2.5 mg of protein). After preincubation for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in an air atmosphere in a shaking waterbath, biphenyl (3.25 mM) was added as a 10  $\mu\text{l}$  portion of a 0.65 M solution in dimethyl formamide. NADPH was added as a regenerating system consisting of NADP, 5.0  $\mu\text{moles}$ ; glucose-6-phosphate, 25  $\mu\text{moles}$ ; glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2 units;  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{moles}$ . The final volume was adjusted to 2.0 ml with phosphate buffer. Incubation was continued for a further 20 min period and terminated by the addition 0.5 ml saturated  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  and 0.6 ml 5%  $\text{ZnSO}_4$ . Incubation mixtures were extracted in centrifuge tubes with 5.0 ml ethyl acetate using a Vortex mixer for 1 min. After centrifugation at 2,000 rpm for 10 min at  $5^\circ\text{C}$ , 4.0 ml of the upper ethyl acetate phase were removed and evaporated to dryness at  $40^\circ\text{C}$  in a 10 ml spherical flask on a rotary evaporator. The residue was redissolved in 0.1 ml of ethyl acetate and the 4-hydroxybiphenyl formed was determined by GLC (Perkin Elmer F-17). An 1.0  $\mu\text{l}$  portion of the ethyl acetate solution plus 2.0  $\mu\text{l}$  of the silylating agent (BSA) were injected into a 6 ft 3% OV-1 column with  $\text{N}_2$  as carrier gas (50 ml/min) and with temperature program. This consisted of 4 min post-injection pause at  $210^\circ\text{C}$ , followed by an increase to  $235^\circ\text{C}$  at a rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  and a final 10 min at  $235^\circ\text{C}$ . Flame-ionization detector was used. The internal standard was benzylideneacetophenone in ethyl acetate. Corrections for any nonenzymatic formation of 4-hydroxybiphenyl were made by subtracting values from a blank tube incubated under identical conditions with an equivalent volume of boiled microsomal homogenate. GLC retention times (min) were: 4-hydroxybiphenyl, 9.5; internal standard, 15. The enzyme activity is expressed as nmoles of 4-hydroxybiphenyl formed per min per mg of microsomal protein.

*Assay of NADPH-cytochrome C reductase activity.* The activity of NADPH-cytochrome C reductase was determined according to the method of Philipps and Langdon<sup>24</sup>. Liver microsomes were preincubated with chromium ions for 30 min as described in the biphenyl-4-hydroxylase assay.

*Assay of NADPH-oxidase activity.* The activity of NADPH-oxidase was determined under the same conditions as those of NADPH-cytochrome C reductase in the absence of acceptor other than  $\text{O}_2$ .

## Results

Inspection of the data depicted in Table I indicates that high and low concentrations of chromium ions cause an opposite effect on the rate of cholesterol biosynthesis from acetate and mevalonate *in vitro*. Namely, the stimulatory effect (50% with [ $^{14}\text{C}$ ] acetate and 79% with [ $^{14}\text{C}$ ] mevalonate caused at a concentration of 0.008 mM  $\text{Cr}^{3+}$ , is reversed to inhibition (40% and 55% respectively) at the 100-fold concentration of 0.8 mM  $\text{Cr}^{3+}$ . Statistical analysis (t-test) yields a significance level of  $P \leq 0.001$  for these differences, while at the intermediate concentration of 0.08 mM  $\text{Cr}^{3+}$ , the observed effect is statistically significant only with mevalonate as precursor ( $P \leq 0.01$ ).

TABLE I: Effect of chromium ions on the incorporation of radioactive acetate and mevalonate into cholesterol.

The results are given as mean values  $\pm$  SB of 4 experiments.

Concentration $\text{Cr}^{3+}$ (mM)	$^{14}\text{C}$ Acetate		$^{14}\text{C}$ Mevalonate	
	cpm	%	cpm	%
0	2,020 $\pm$ 180	100	5,585 $\pm$ 565	100
0.8	1,210 $\pm$ 200 ( $P \leq 0.001$ )	-40	2,515 $\pm$ 290 ( $P \leq 0.001$ )	-55
0.08	2,210 $\pm$ 210	+9	4,020 $\pm$ 430 ( $P \leq 0.01$ )	-28
0.008	3,020 $\pm$ 235 ( $P \leq 0.001$ )	+50	9,980 $\pm$ 625 ( $P \leq 0.0001$ )	+79

Table II shows the effect of chromium ions on several microsomal enzymes. All the concentrations of chromium ions used in this study caused a profound inhibition of the NADPH-cytochrome C reductase activity, being also inhibitory (to a lesser extent) for the activity of NADPH-oxidase. Therefore, of the observed concentration-dependent reversal of the chromium-ion effects on the rate of cholesterol biosynthesis cannot be attributed to these two enzymic activities.

In contrast, the activity of rat liver microsomal biphenyl-4-hydroxylase was influenced by chromium ions in a mode similar to that on the rate of cholesterol biosynthesis from acetate and mevalonate.

The two higher concentrations of chromium ions were both inhibitory of the biphenyl-4-hydroxylase activity to an extent similar to that on mevalonate incorporation into cholesterol. Statistical analysis (t-test) indicated also a high significance level of these effects ( $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.0001$  respectively for the high and low concentrations and  $P \leq 0.10$  for the intermediate concentrations).

TABLE II: Effect of chromium ions on the activities of liver microsomal enzymes. The results are given as mean values  $\pm$  SB of 3 experiments, expressed as nmoles of altered substrate/min/mg microsomal protein. Statistical analysis (t-test) was carried out with regard to controls.

Assay system	Biphenyl-4-hydroxylase	NADPH-Cytochrome c reductase	NADPH-oxidase
Microsomes (control rats)	2.5 $\pm$ 0.21	31.0 $\pm$ 3.7	6.0 $\pm$ 0.3
Microsomes (BP-treated rats)	7.2 $\pm$ 0.30 (P $\leq$ 0.0001)	70.0 $\leq$ 4.2 (P $\leq$ 0.001)	10.0 $\pm$ 0.5 (P $\leq$ 0.001)
Microsomes (controls) + 0.008 mM Cr <sup>3+</sup>	5.5 $\pm$ 0.25 (P $\leq$ 0.0001)	22.0 $\leq$ 2.8 (P $\leq$ 0.05)	6.0 $\pm$ 0.8
Microsomes (controls) 0.08 mM Cr <sup>3+</sup>	2.1 $\pm$ 0.23 (P $\leq$ 0.10)	17.0 $\leq$ 2.6 (P $\leq$ 0.01)	5.1 $\pm$ 0.6 (P $\leq$ 0.10)
Microsomes (controls) + 0.8 mM Cr <sup>3+</sup>	0.8 $\pm$ 0.22 (P $\leq$ 0.001)	14.0 $\leq$ 2.3 (P $\leq$ 0.01)	3.2 $\pm$ 0.7 (P $\leq$ 0.01)

## Discussion

Among pre-existing evidence on the effect of chromium ions on the rate of the *in vitro* incorporation of precursors into cholesterol, most pertinent to the present results is the early observation by Curran<sup>13</sup>. According to this observation [<sup>14</sup>C] acetate incorporation into cholesterol is stimulated by 0.05 mM Cr<sup>3+</sup>, that is, at a concentration expected also by the present data to yield stimulation rather than inhibition.

On the other hand, higher concentrations of chromium ions (1 and 3 mM) were reported<sup>20</sup> as causing aggregation of microsomes, and decreasing or abolishing the activity of P-450 reductase. These observations support and give a most probable explanation of the observed inhibitory effects of high chromium concentrations on cholesterol biosynthesis, as well as of the inhibition of NADPH-cytochrome C reductase and NADPH-oxidase activity observed in all the chromium concentrations used in this study, which cover a 100-fold range. As has been mentioned, the latter effects are not sufficient to indicate any relation of these two enzymic activities with the reversal of chromium action on cholesterol biosynthesis. However, the observed significant stimulation of the latter by response of one single enzyme system, biphenyl-4-hydroxylase, to changes of chromium-ion concentrations provides important insights into a possible mode, by which chromium ions may influence the entire process of cholesterol metabolism. Namely, our present findings combined with pertinent literature data permit postulating that several microsomal mixed-function oxygenases involved in cholesterol biosynthesis may resemble biphenyl-4-hydroxylase in its response to changes of chromium ion concentration, thus exerting a concomitant effect on the entire process. In such electron-transport systems, one of the carriers is postulated to have an absolute requirement for chromium, whereas reversal of stimulation occurs at increasing chromium concentrations, which gradually diminish the activity of another carrier of the system.

To support this concept and its implications with respect to the primary role of chromium resulting in its above effects the following data are taken into account:

Phenobarbital treatment of the donor animal is known to induce a 10 - fold increase of the rate of incorporation of [<sup>14</sup>C] acetate into cholesterol *in vitro*<sup>17</sup>, whereas the data of Table II indicate a 3 - fold increase in biphenyl - 4 - hydroxylase activity. This higher stimulation of cholesterol biosynthesis in comparison to biphenyl hydroxylation supports the postulated contribution of more than one, possibly distinct to each other mixed - function oxygenases in the overall effect of chromium on the rate of cholesterol biosynthesis.

The individual microsomal electron - transport systems may be distinct to each other not only with respect to the substrate - specificity determining terminal oxidase, but also to other subunits. For instance, a carbon - monoxide sensitive<sup>25</sup> cytochrome P-450 involved in the 7  $\alpha$  - hydroxylation of cholesterol is distinct to the cytochrome P-450 mediating drug hydroxylation<sup>26</sup>. However, increasing evidence suggests that at least one of the electron carriers of NADPH - cytochrome C reductase may be the same for a whole set of mixed - function oxygenases. Thus,

recent studies on microsomal squalene epoxidase, solubilized with Triton  $\times$  100 and resolved into two fractions,  $F_A$  and  $F_B$ , by DEAE - cellulose chromatography<sup>27</sup> revealed that  $F_B$  is identical with a detergent - solubilized NADPH - cytochrome C reductase and that squalene epoxidation is not inhibited by carbon monoxide<sup>28</sup>, indicating that the oxidase of the system is quite distinct to cytochrome P-450.

A further implication of the so indicated involvement of a common flavoprotein subunit, identical to NADPH - cytochrome C reductase in microsomal electron - transport systems is related to the earliest indication for a biological role of chromium in metabolism, reported by Horecker *et al*<sup>29</sup> in 1939. According to these authors the flavoprotein - containing succinate - cytochrome dehydrogenase has an absolute requirement for chromium ions.

In such electron - transport systems the terminal oxidase might have an absolute requirement for chromium ions, whose inhibitory action on the flavoprotein component at low chromium concentrations is not capable to reverse the overall effect, according to the data reported in the present paper, and furthermore it would be counterbalanced by the higher concentration of the common subunit. Higher chromium concentrations gradually would abolish the activity of the flavoprotein subunit, thus inhibiting the overall reaction.

An intriguing implication of the above postulated mode by which chromium ions function in cholesterol metabolism lies in its inherent self - regulatory mechanism of abolishing often fluctuations and thus serving as a coarse - control of the process. This is manifested by the very wide range in which increasing chromium ion concentrations diminish their overall stimulatory effects and then, gradually increase their inhibitory influence.

Finally, of critical importance to us is the possible significance of the absolute correlation of the chromium - concentration dependent effects on cholesterol biosynthesis *in vitro* reported in this paper, with the observed *in vivo* consequences of chromium deficiency and its restoration (see INTRODUCTION). Although there is no way to compare the concentrations of chromium ions used in this investigation with those at the sites of cholesterol biosynthesis in the populations used by several investigators of the metabolic role of chromium ions *in vivo* (2,3,6-9), it is important that chromium is well - known to bind itself selectively with specific cellular constituents, its highest reported concentration being as high as 1200 ppm in complex protein - ribonucleic acid fractions<sup>12</sup>. Therefore, any attempt to obtain such information would be without any immediate significance, while a reasonable speculation is that chromium concentration in the micro - environment of microsomal electron - transport systems is regulated by special molecular species resembling the glucose - tolerance factor, probably identical with some component of the microsomal electron - transport systems.

## Περίληψη

*Επιδράσεις ιόντων χρωμίου στη βιοσύνθεση in vitro χοληστερόλης και στα μικροσωμικά ένζυμα συκωτιού αρουραίου.*

Η επίδραση των ιόντων τρισθενούς χρωμίου στη βιοσύνθεση χοληστερόλης in vitro μελετήθηκε με τη χρήση  $^{14}\text{C}$  - οξικού και  $^{14}\text{C}$  - μεβαλονικού οξέος ως προδρόμων ενώσεων.

Στο υπερκείμενο φυγοκέντρωσης σε 15.000 × g ομογενοποιημένου συκωτιού αρουραίου η βιοσύνθεση χοληστερόλης αναστέλλεται από  $\text{Cr}^{3+}$  σε συγκεντρώσεις μεταξύ  $8 \times 10^{-4}\text{M}$  και  $8 \times 10^{-5}\text{M}$ , ενώ η συγκέντρωση  $\text{Cr}^{3+} 8 \times 10^{-6}\text{M}$  προκαλεί αυξημένη βιοσύνθεση χοληστερόλης. Οι διαφορές αυτές ήταν πιο χαρακτηριστικές όταν πρόδρομη ένωση ήταν το  $^{14}\text{C}$  - μεβαλονικό οξύ.

Επειδή στην πορεία βιοσύνθεσης χοληστερόλης παίρνουν μέρος ορισμένα μικροσωμιακά ένζυμα και το-κυτόχρωμα  $\text{P}_{450}$ , που απαιτούν και NADPH και μοριακό οξυγόνο, μελετήθηκε η επίδραση των ιόντων  $\text{Cr}^{3+}$  στη δραστηριότητα της ρεδουκτάσης NADPH - κυτροχρώματος C της οξειδάσης NADPH και της διφαινυλιο - 4 - υδροξυλάσης. Αποδείχθηκε ότι τα ιόντα  $\text{Cr}^{3+}$  σε όλες τις παραπάνω συγκεντρώσεις αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, με μόνη εξαίρεση ότι σε συγκέντρωση  $8 \times 10^{-6}\text{M}$  τα ιόντα  $\text{Cr}^{3+}$  προκαλούν μια πολύ σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της διφαινυλιο - 4 - υδροξυλάσης.

## References

- Schroeder, H.A., Balassa, J. J. and Tipton, H.I.: «Abnormal trace metals in man: chromium», *J. Chrom. Diseases* **15**, 941-964 (1962).
- Schroeder, H.A., Nason, A.P. and Tipton, I.H.: «Chromium deficiency as a factor in atherosclerosis», *J. Chron. Diseases* **23**, 123-142(1970).
- Taylor, O.G. and Williams, A.O.: «Lipid and trace metal content in coronary arteries of Nigerian Africans», *Exper. Mol. Path.* **21**, 371-380 (1974).
- Mertz, W.: «Chromium occurrence and function in biological systems», *Physiol. Rev.* **49**, 165-239 (1969).
- Mertz, W.: «New views concerning the action of the trace element chromium in carbohydrate metabolism», *Fortschr. Med.* **85**, 739-741 (1967).
- Schroeder, H.A. and Balassa, J.J.: «Influence of chromium, cadmium and lead on rat aortic lipids and circulating cholesterol», *Am. J. Physiol.* **209**, 433-437 (1965).
- Schroeder, H.A.: «Serum cholesterol and glucose levels in rats fed refined and less refined sugars and chromium», *J. Nutr.* **97**, 237-242 (1969).
- Hopkins, L.L., Jr., Ransome - Kyti O. and Majaj A.S.: «Improvement of impaired carbohydrate metabolism by chromium (III) in malnourished infants», *Am. J. Clin. Nutr.* **21**, 203-211 (1968).
- Carter, J.P., Kattab A., Abd -el - Hadi K., Davis J.T., El Cholmy A. and Pathwardhan V.N.: «Chromium (III) in hypoglycemia and in impaired glucose utilization in Kwashiorkor», *Am. J. Clin. Nutr.* **21**, 195-202(1968).

10. Stickland, L.H.: «Activation of phosphoglucosmutase by metal ions», *Biochem. J.* **44**, 190-197 (1949).
11. Schwarz, K. and Mertz W.: «Chromium (III) and the glucose tolerance factor», *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 292-295 (1959).
12. Mertz, W.: «Biological role of chromium», *Federation Proc.* **26**, 186-193 (1967).
13. Curran, G.L.: «Effect of certain transition group elements on hepatic synthesis of cholesterol in the rat», *J. Biol. Chem.* **210**, 765-770.
14. Mertz, W., Roginski E.E. and Schwarz K.: «Effect of trivalent chromium complexes on glucose uptake by epididymal fat tissue of rats», *J. Biol. Chem.* **236**, 318-322 (1961).
15. Kuntzaman, R.: «Drugs and enzyme induction», *Ann. Rev. Pharmacol.* **9**, 21-36 (1969).
16. Wada, F. Hirata K. and Sakamoto: «Possible participation of cytochrome P<sub>450</sub> in cholesterol synthesis», *J. Biochem.* **65**, 171-175 (1969).
17. Mitoma, C., Yasuda D., Tagg, J.S., Neubauer S.E., Calderoni F.J. and Tanabe M.: «Effects of various chemical agents on drug metabolism and cholesterol biosynthesis». *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1377-1383 (1968).
18. Dingell, J.V., Joiner P.D. and Hurwitz L.: «Impairment of drug metabolism in calcium deficiency», *Biochem. Pharmacol.* **15**, 971-976 (1966).
19. Peters, M.A. and Fouts, J.R.: «The influence of magnesium and some other divalent cations on hepatic microsomal drug metabolism in vitro», *Biochem. Pharmacol.* **19**, 533-544 (1970).
20. Fouts, J.R., Pohl J.R.: «Further studies on the effects of metal ions on rat liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - cytochrome P<sub>450</sub> reductase», *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **179**, 91-100 (1971).
21. Burke, D.M., and Bridges J.W.: «Biphenyl hydroxylations and spectrally apparent interactions with liver microsomes from hamsters pre - treated with phenobarbitone and 3 - methylcholanthrene», *Xenobiotica*, **5**, 357 (1975).
22. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall R.J.: «Protein measurements with the Folin phenol reagent», *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
23. Prough, R.A., and Burke M.D.: «The role of NADPH - cytochrome C reductase in microsomal hydroxylation reactions», *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 160-168 (1975).
24. Philipps, A.H., and Langdon G.G.: «Hepatic triphosphopyridine nucleotide - cytochrome C reductase: Isolation, characterization and kinetic studies», *J. Biol. Chem.* **237**, 2652-2660 (1962).
25. Krishnajah, K.V., and Ramasarma T.: «Regulation of hepatic cholesterolgenesis by ubiquinone», *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 332-342 (1970).
26. Lofland, H.B. Jr., Clarkson, T.B., Clair, B.W. and Lehner, N.D.: «Studies on the regulation of plasma cholesterol levels in squirrel monkeys of two genotypes», *J. Lipid Res.* **13**, 39-47 (1972).
27. Ono, T., and Bloch, K.: «Solubilization and partial characteriazation of rat liver squalene epoxidase», *J. Biol. Chem.* **250**, 1571-1579 (1975).
28. Ono, T., Ozasa, S., Hasegawa, F. and Imai, Y.: «Involvement of NADPH-cytochrome C reductase in the rat liver squalene epoxidase system», *Biochim. Biophys. Acta* **486**, 401-407 (1977).
29. Horecker, B.L., Stotz, E. and Hogness, T.R.: «The promoting effect of chromium and the rare earths in the succinic dehydrogenase - cytochrome system» *J. Biol. Chem.* **128**, 251-256 (1939).

## **SUR LA RELATION D'ACREE. EFFET DE DILUTION EN FONCTION DU TEMPS**

G.PAPANASTASIOU, A.PAPOUTSIS et D.JANNAKOUDAKIS

*Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté des Sciences de l'Université de Thessalonique, Thessalonique (Grèce).*

(Received October 10, 1983)

### **Sommaire**

Etude de l'effet d'ion commun sur la variation du coefficient de vitesse de divers systèmes réactionnels constitués d'un alcoolate alcalin (ROM) et un halogénure d'alcoyle (R'X) dans l'alcool correspondant à l'alcoolate choisi.

Variation du degré de dissociation  $\alpha$  des formes associées de l'alcoolate considéré dans le cas où le sel formé au cours du temps est partiellement associé en paires d'ions.

Détermination des régions des concentrations initiales en ROM qui sont les plus sensibles pour les variations de  $\alpha$  au fur et à mesure de l'avancement de la réaction.

**Key words:** Alcoxides, reactivity of ions and ion pairs.

### **Introduction**

Acree a émis au début du siècle l'hypothèse que "les acides, les bases et les sels pouvaient réagir sous leurs formes ionisées ou non ionisées"<sup>1</sup>.

Cette hypothèse dualiste a permis de donner une explication satisfaisante de l'"effet de dilution"<sup>2</sup> qui se manifeste par une variation des coefficients de vitesse avec la dilution à température constante dans une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire, telle que la réaction d'un alcoolate alcalin, dans l'alcool correspondant, sur un halogénure organique.

En admettant que les formes ionisées et non ionisées de l'alcoolate réagissent concurremment avec des coefficients de vitesse propres  $k_i$  pour l'ion et  $k_m$  pour la molécule, on aboutit, en adoptant le formalisme classique aux relations

$$dx/dt = k_m(a-x)(b-x)(1-\alpha) + k_i(a-x)(b-x)\alpha \quad (1)$$

et

$$k_g = k_m + (k_i - k_m)\alpha \quad (2)$$

où  $k_g$  est le coefficient de vitesse "global", expérimentalement mesuré et  $\alpha$ , le coefficient de dissociation de l'alcoolate.



Depuis l'introduction de la notion des paires d'ions, on considère volontiers la relation d'Acree<sup>2</sup> des entités non dissociées ou paires d'ions, au lieu des molécules (coefficient de vitesse  $k_p$  au lieu de  $k_m$ ).

Il est à noter que l'hypothèse dualiste d'Acree, ayant été critiquée dans le passé<sup>2</sup>, ne semble plus mise en doute grâce en particulier aux nombreux travaux de Beronius et ses collaborateurs parus ces dernières années<sup>3</sup>.

Par ailleurs la relation 2 a été appliquée généralement avec bonheur dans un bon nombre des réactions et a permis un certain nombre de raffinements mécanistiques<sup>4</sup>.

Comme cela a été déjà souligné, la relation d'Acree 2 traduit quantitativement l'effet de dilution observé lorsqu'on fait réagir un alcoolate alcalin, en solution dans l'alcool correspondant, sur un dérivé halogéné. En règle générale, on observe un accroissement de la constante de vitesse globale,  $k_g$ , avec la dilution (les ions libres sont alors considérés comme plus réactifs que les paires d'ions). A titre d'exemple on peut citer le cas de la réaction entre l'iodure de méthyle et d'éthylate de sodium. Nous avons constaté que dans l'éthanol à 25°C les coefficients de vitesse  $k_g$  ( $l \cdot mole^{-1} \cdot min^{-1}$ ). $10^{-4}$  passent de 96,3 pour la concentration initiale en éthylate égale à 0,2 M et 115,9 pour 0,08 M.

Cet effet, observé sur une série d'expériences indépendantes, devait, en toute rigueur, se retrouver au cours d'une expérience unique, en fonction du temps, au fur et à mesure de l'avancement de la réaction. Ainsi si l'on considère les constantes de vitesse ci-dessus, on voit que, pour un essai dont la concentration initiale en éthylate de sodium est de 0,2 M, déjà à 60% de réaction (la concentration étant alors de 0,08 M), on devrait avoir eu une croissance de 20,4% pour la constante de vitesse.

Néanmoins, ce n'est pas ce que l'on observe expérimentalement. Les coefficients de vitesse semblent rester constants jusqu'à environ 70% de réaction étant donné que les courbes respectives représentant la dépendance  $\log \{b(a-x)/a(b-x)\} = f(t)$  sont de bonnes droites en accord avec la formulation classique d'une réaction du second ordre. Evidemment ces dépendances sont parfaitement linéaires seulement dans le cas où  $k_g$  resterait rigoureusement constant tout au cours de l'expérience.

Nous avons pensé, en accord avec la littérature<sup>5</sup>, que cette situation apparemment incohérente pouvait être imputée à la formation du sel alcalin au cours de l'avancement de la réaction. En effet, on peut imaginer que celui-ci agit soit par effet de sel primaire, soit par effet d'ion commun avec l'alcoolate alcalin.

Nous n'avons pas retenu la première hypothèse parce qu'il est connu que pour les réactions entre un ion et une molécule neutre, les effets de sel primaire sont, en général, faibles et que lorsqu'ils existent, ils se manifestent surtout en solution concentrée<sup>6</sup>.

Par contre, l'hypothèse d'un effet de sel secondaire, en affectant par la loi d'action des masses l'équilibre de dissociation d'un des réactifs, nous est apparue plus apte à donner une explication satisfaisante du phénomène.

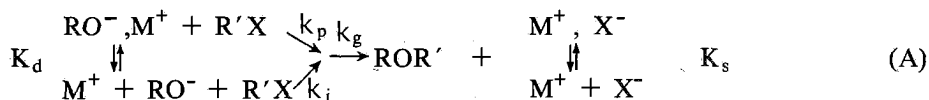
Nous avons ainsi enterpris une étude systématique concernant l'influence du sel alcalin formé au cours du temps sur le coefficient de dissociation,  $\alpha$ , de l'alcoolate, par effet d'ion commun et d'essayer de circonscrire par le calcul son étendue en partant de la relation d'Acree.

Notons encore que l'effet de sel secondaire et les répercussions de ce phénomène sur le coefficient  $k_g$  d'une réaction d'un alcoolate alcalin sur un halogénure d'alcoyle (dans l'alcool correspondant à l'alcoolate) a fait l'objet d'une étude antérieure<sup>7</sup>. Cependant celle-ci n'était qu'une description qualitative du phénomène, étant donné que le coefficient d'activité moyen de deux ions,  $\gamma_{\pm}$ , a été considéré, grâce à la simplicité des calculs, comme pratiquement constant au cours du déroulement d'un essai cinétique. Mais si cela est dans certains cas particuliers une approximation qui n'affecte en rien le sens de variation de  $\alpha$ , il ne constitue dans le cas général qu'une approximation plus ou moins satisfaisante.

Nous avons ainsi été amenés, dans ce présent article, à compléter les résultats de cette étude antérieure et d'en tenir compte de toutes les variations éventuelles du coefficient d'activité  $\gamma_{\pm}$ , en précisant ainsi, quantitativement, la répercussion des variations de  $\alpha$  (coefficient de dissociation de l'alcoolate) sur la constante de vitesse  $k_g$  au cours de l'avancement de la réaction.

### Influence du sel alcalin formé au cours du temps sur la dissociation d'un alcoolate alcalin dans un milieu réactionnel homogène

Dans cette étude nous avons retenu comme réaction modèle celle d'un alcoolate alcalin (ROM) sur un halogénure d'alcoyle dans l'alcool, exempt d'eau, correspondra à l'alcoolate:



Tout d'abord, dans ce modèle nous supposons que tant l'alcoolate (ROM) que le sel alcalin (MX) formé au cours du temps se trouvent sous deux formes que nous désignerons par "dissociée" et "non dissociée" sans préciser s'il s'agit d'ions libres, de paires d'ions séparées par le solvant ou de paires d'ions de contact.

Nous admettons également que ces entités réagissant sur l'halogénure organique, conduisent par des processus semblables à des vitesses distinctes aux mêmes produits réactionnels.

Aussi, dans ce traitement nous avons considéré les équilibres entre les formes non dissociées et dissociées tant de l'alcoolate que du sel alcalin dont les constantes de dissociation sont respectivement égales à  $K_d$  et  $K_s$ :

$$K_d = \frac{[\text{RO}^-][\text{M}^+]}{[\text{RO}^-, \text{M}^+]} \gamma_{\pm}^2 \quad (3)$$

$$K_s = \frac{[\text{M}^+][\text{X}^-]}{[\text{M}^+, \text{X}^-]} \gamma_{\pm}^2 \quad (4)$$

où  $\gamma_{\pm}$  est le coefficient d'activité moyen de deux ions dans le système réactionnel considéré.

Si nous désignons la concentration initiale de l'alcoolate par  $C_o$ , nous pouvons écrire pour le temps  $t$  de la réaction (A) les relations suivantes:

$$C_o = [RO^-, M^+]_t + [RO^-]_t + [ROR']_t \quad (5)$$

et comme

$$[ROR']_t = [X^-]_t + [M^+, X^-]_t \quad (6)$$

on aboutit à

$$[RO^-, M^+]_t + [RO^-]_t + [X^-]_t + [M^+, X^-]_t = C_o. \quad (7)$$

Si  $x$  est le degré d'avancement de la réaction au temps  $t$  exprimé sous sa forme décimale (ex.  $x = 0,20$  pour 20% d'avancement de la réaction), on a

$$C_o \cdot x = [X^-]_t + [M^+, X^-]_t. \quad (8)$$

Par ailleurs

$$[M^+]_t = [RO^-]_t + [X^-]_t. \quad (9)$$

En désignant par  $\alpha_x$  et  $\alpha_{sx}$  les coefficients de dissociation des paires d'ions, respectivement,  $(RO^-, M^+)$  et  $(M^+, X^-)$ , nous pouvons écrire:

$$[M^+]_t = C_o(1-x)\alpha_x + xC_o\alpha_{sx} \quad (10)$$

$$[X^-]_t = xC_o\alpha_{sx} \quad (11)$$

$$[M^+, X^-]_t = xC_o(1-\alpha_{sx}) \quad (12)$$

$$[RO^-]_t = C_o(1-x)\alpha_x \quad (13)$$

$$[RO^-, M^+]_t = C_o(1-x)(1-\alpha_x) \quad (14)$$

En tenant compte de ces relations, les constantes de dissociation  $K_d$  et  $K_s$  s'expriment:

$$K_d = \frac{\alpha_x \{ \alpha_x(1-x) + x\alpha_{sx} \}}{1-\alpha_x} C_o \gamma_{\pm}^2 \quad (15)$$

$$K_s = \frac{\alpha_{sx} \{ \alpha_x(1-x) + x\alpha_{sx} \}}{1-\alpha_{sx}} C_o \gamma_{\pm}^2. \quad (16)$$

Si l'on appelle  $\mu$  le rapport  $K_s/K_d$ , on obtient la relation

$$\mu = \frac{K_s}{K_d} = \frac{\alpha_{sx} (1-\alpha_x)}{\alpha_x (1-\alpha_{sx})} \quad (17)$$

qui montre que

$\mu = \infty$  si  $\alpha_{sx} = 1$  ( $M^+, X^-$  entièrement dissocié) ou si

$\alpha_x = 0$  ( $RO^-, M^+$  entièrement associé)

$\mu = 0$  si  $\alpha_{sx} = 0$  ( $M^+$ ,  $X^-$  entièrement associé) et  
 $\mu = 1$  si  $K_s = K_d$  ( $M^+$ ,  $X^-$  et  $RO^-$ ,  $M^+$  également dissociés).

De l'équation (17) il résulte que

$$\alpha_{sx} = \frac{\mu \alpha_x}{1 + \alpha_x(\mu - 1)} \quad (18)$$

En tenant compte des relations (15) et (18) on aboutit à

$$\frac{\alpha_x C_0}{1 - \alpha_x} \left\{ (1-x)\alpha_x + x \frac{\mu \alpha_x}{1 + \alpha_x(\mu - 1)} \right\} \gamma_{\pm}^2 - K_d = 0 \quad (19)$$

où le coefficient d'activité moyen de deux ions s'exprime par la loi de Debye-Hückel:

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{-Az_1 z_2 \sqrt{I}}{1 + B \dot{a} \sqrt{I}} \quad (20)$$

dans laquelle les paramètres A et B peuvent être calculés à l'aide des formules appropriées<sup>8</sup>, tandis que  $\dot{a}$  s'identifie à la distance critique de Bjerrum<sup>9,10</sup> exprimant à la réalité la distance d'approche minimale à partir de laquelle les deux ions sont considérés libres

$$\dot{a} = q = \frac{|z_1 z_2| e^2}{2\epsilon kT} \quad (21)$$

En ce qui concerne la force ionique I du milieu un calcul simple (à l'aide des relations précédentes) nous conduit à

$$I = C_0 \left\{ (1-x)\alpha_x + x \frac{\mu \alpha_x}{1 + \alpha_x(\mu - 1)} \right\} \quad (22)$$

Finalement, en tenant compte des relations 19-22 on aboutit à

$$\frac{C_0 \alpha_x}{1 - \alpha_x} \left\{ (1-x)\alpha_x + \frac{\mu \alpha_x}{1 + \alpha_x(\mu - 1)} \right\} \exp \left\{ \frac{-2 \cdot 2,303A \sqrt{I}}{1 + Bq \sqrt{I}} \right\} - K_d = 0 \quad (23)$$

qui permet de calculer tant les valeurs que les variations du coefficient d'activité de l'alcoolate  $\alpha$  en fonction du degré d'avancement, x, de la réaction pour diverses valeurs des paramètres  $C_0$ ,  $K_d$  et  $\mu$ .

Afin d'évaluer l'ampleur de ces variations, nous avons examiné tout d'abord la réaction modèle (A) effectuée dans l'éthanol, exempt d'eau, à 25°C. Dans ce modèle on a fixé la valeur de  $K_d$  à  $1,0 \cdot 10^{-2}$  qui correspond à une valeur moyenne pour les éthylates alcalins à 25°C<sup>11,12</sup>.

Il est à noter que les calculs de  $\alpha_x$ , à l'aide de la relation 23, ont été effectués en nous servant d'une méthode itérative dite des sécantes. Nous avons ainsi obtenu les valeurs du paramètre  $\Delta\alpha$  ( $\Delta\alpha = \alpha_{x=0} - \alpha_{x=1}$ ) exprimant la variation totale du coefficient de dissociation de l'alcoolate considéré pour toute la durée de la

réaction. Ces calculs sont résumés par le diagramme de la figure 1. Dans ces calculs on a fait varier  $C_0$  de 0,01 à 7,0 M, c'est à dire dans une gamme des concentrations couvrant les valeurs de  $C_0$  qui sont usuelles aux mesures cinétiques.

Nous avons aussi examiné la variation de  $\alpha_x$  en fonction du degré d'avancement de la réaction en traçant les courbes  $\alpha_x = f(x)$ . La figure 2 représente deux exemples de ces variations dans le cas où  $C_0$  est égal à 0,1 et 0,2 M respectivement.

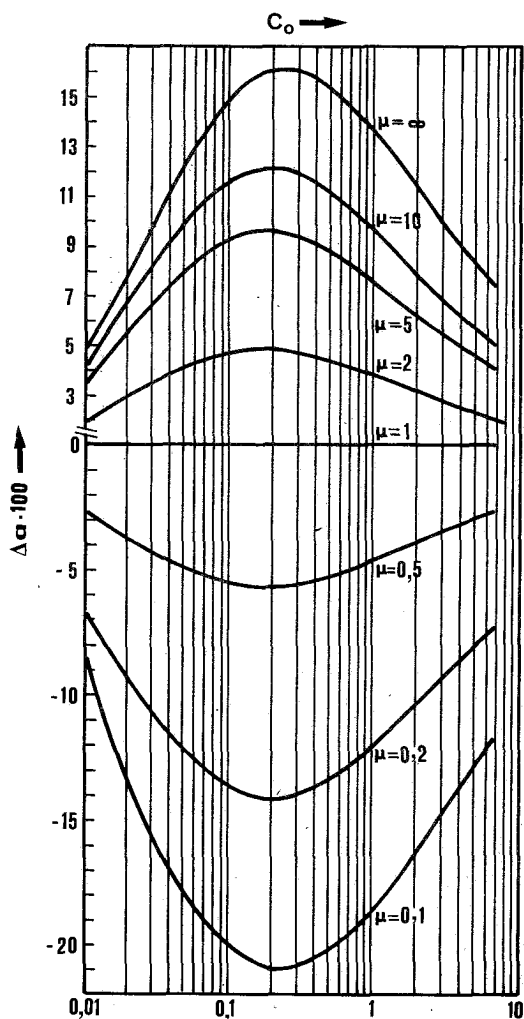


FIG. 1. Variation du paramètre  $\Delta\alpha (= \alpha_{x=0} - \alpha_x = 1)$  en fonction de la concentration initiale  $C_0$  de l'alcoolate pour diverses valeurs de  $\mu = K_s/K_d$ .

Les valeurs rapportées dans les figures 1 et 2 montrent que le coefficient de dissociation,  $\alpha$ , de l'alcoolate considéré reste constant, pour toute la durée de la réaction uniquement dans le système réactionnel correspondant à  $\mu = 1$ . Etant

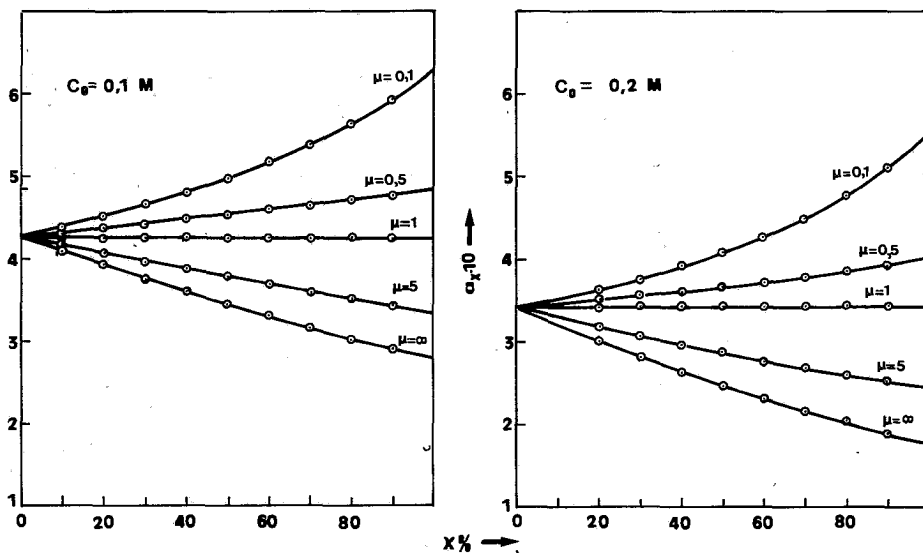


FIG. 2. Variation du coefficient de dissociation  $\alpha$  d'un alcoolate alcalin dans l'éthanol pendant l'avancement de la réaction pour diverses valeurs de  $\mu$ .  $K_d = 10^{-2}$ .

donné que, en partant de l'équation d'Acree, la répercussion des variations de  $\alpha$  sur la constante  $k_g$  peut s'exprimer à l'aide de la relation

$$\Delta k_g = (k_i - k_p) \cdot \Delta \alpha \quad (24)$$

on constate que uniquement dans ce dernier système réactionnel (avec  $\mu = 1$ ) le coefficient de vitesse  $k_g$  reste rigoureusement constant tout au cours de la réaction.

Par contre, si  $\mu \neq 1$ , les variations de  $\alpha$  entraînent généralement des variations sur  $k_g$  qui sont plus ou moins importantes suivant les valeurs correspondantes de  $\mu$  ( $= K_s / K_d$ ).

Mais il est intéressant de souligner que dans le cas des systèmes réactionnels correspondant aux valeurs de  $\mu$  voisines de 1,  $\alpha$  (et par conséquent  $k_g$ ) reste pratiquement constant (figure 2) pour la durée habituelle des mesures cinétiques, à savoir de 0 à 70% de transformation.

Il est également à remarquer que les variations de  $\Delta \alpha$  ( $= \alpha_{x=0} - \alpha_{x=1}$ ) en fonction de  $C_0$  atteignent, à toutes les valeurs de  $\mu$ , des maximums trouvés dans une région,  $\delta C$ , des concentrations initiales relativement étroite. Nous avons constaté que cette région  $\delta C$  dépend sensiblement de  $K_d$  étant donné que lorsque la valeur de ce dernier paramètre est modifiée  $\delta C$  se déplace à des concentrations  $C_0$  différentes. Dans la figure 3 nous représentons ces régions des concentrations étant les plus sensibles pour la variation de  $\alpha$  en fonction de  $K_d$ .

Notons encore que tous les calculs effectués dans ce travail nous ont révélé que le remplacement d'un alcoolate par un autre dans la réaction modèle (A), un fait qui se traduit au niveau des calculs par une modification de la valeur de  $K_d$ , est peu important en ce qui concerne le comportement qualitatif des systèmes réactionnels correspondants.

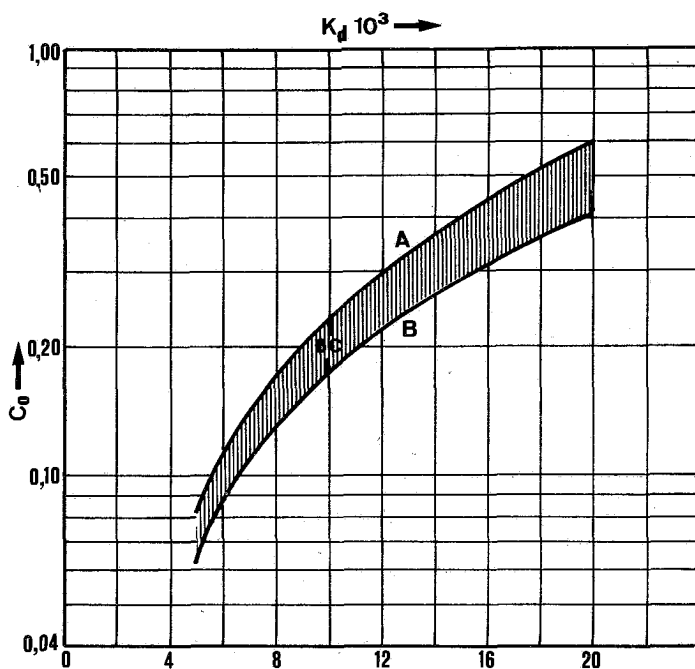


FIG. 3. Diagramme montrant en chaque valeur de  $K_d$  la région des concentrations initiales en alcoolate,  $\delta C$ , étant la plus sensible pour la variation de  $\alpha$ .

### Conclusions

L'ensemble des calculs effectués en partant de la réaction modèle (A) nous permet de formuler les remarques suivantes:

i. Le coefficient de dissociation,  $\alpha$ , de l'alcoolate considéré reste rigoureusement constant pendant toute la durée de la réaction uniquement dans le cas des systèmes réactionnels où  $\mu = 1$ .

ii. Dans le cas où  $\mu \neq 1$  les variations de  $\alpha$  peuvent être positives ou négatives. Ainsi si l'alcoolate est moins dissocié que le sel alcalin formé ( $\mu = K_s / K_d > 1$ ), la dissociation de l'alcoolate va regresser en fonction du degré d'avancement de la réaction ( $\Delta\alpha < 0$ ). Par contre, si le sel alcalin est moins dissocié que l'alcoolate ( $\mu < 1$ ), ce dernier sera de plus en plus dissocié au cours du déroulement d'un essai cinétique. Notons encore que l'ampleur des variations de  $\alpha$  dépend sensiblement des valeurs des paramètres  $C_0$  (concentration initiale de l'alcoolate) et  $\mu (= K_s / K_d)$ .

iii. En chaque valeur de  $K_d$  correspond une région des concentrations initiales en alcoolate,  $\delta C_0$ , étant la plus sensible pour les variations de  $\alpha$ .

iv. La répercussion des variations de  $\alpha$  (coefficient de dissociation de l'alcoolate correspondant) sur le coefficient de vitesse  $k_g$  qui est la grandeur expérimentalement déterminée dépend de la différence  $k_i - k_p$  (relation 24). Si celle-ci est nulle, c'est à dire si  $k_i = k_p$ , il est évident que le phénomène cinétique ne sera pas affecté par les variations de  $\alpha$  et si encore ces dernières seraient très importantes.

---

## Summary

*Study of the dilution effect as a function of time by means of Acree relation*

The subject of this work is to study the influence of the common ion on the change of the rate constant of various reactions between alkali metal alcoxides (ROM) and alkyl halides (R'X) carried out in solutions of the corresponding to ROM alcohol.

The time dependence of the dissociation constant,  $\alpha$ , of the associated ionic forms of the alcoxide is studied for all the cases where the alkaline salt formed is partially associated in ion pairs.

The initial concentration ranges of ROM are determined, in which the greatest variations of the  $\alpha$  values is observed in the course of the over all reaction.

## Περίληψη

*Μελέτη βάσει της σχέσεως του Acree του αποτελέσματος αραιώσεως συναρτήσει του χρόνου.*

Στην εργασία αυτή μελετάται η επίδραση κοινού ιόντος πάνω στη μεταβολή της ειδικής ταχύτητας διαφόρων αντιδράσεων μεταξύ αλκοξειδίου (ROM) και αλκυλαλογονιδίου (R'X) μέσα στην αντίστοιχη προς το ROM αλκοόλη.

Εξετάζονται οι μεταβολές του βαθμού διαστάσεως  $\alpha$  των εταιρισμένων ιονικών μορφών του αλκοξειδίου συναρτήσει του χρόνου σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις, που το σχηματιζόμενο από την αντίδραση άλας (MX) βρίσκεται μερικώς σε κατάσταση συζεύξεως.

Προσδιορίζονται ακόμα οι περιοχές αρχικών συγκεντρώσεων των ROM, στις οποίες παρατηρούνται οι μεγαλύτερες μεταβολές στην τιμή του αντίστοιχου  $\alpha$  σε όλη τη διάρκεια της πορείας της αντιδράσεως.

---

## Bibliographie

1. S.F. Acree et coll.: *Amer. Chem.*, **38** (1907) 258; **48** (1912) 352; *Trans. Faraday Soc.*, **15** (1919) 18.
2. E.A. Moelwyn-Hughes: *Chemical Statics and Kinetics of Solutions*, Academic Press, London et New York, 1971, σ. 228.
3. P. Beronius et coll.: *Acta Chim. Scand.*, **23** (1969) 1175; **24** (1970) 189; **25** (1971) 3705; **26** (1972) 3881; **27** (1973) 670; *J.Am. Soc.*, **92** (1970) 4518.
4. F. Guibe et G. Bram: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, n° 3-4 (1975) 933.
5. A. Brandstrom: *Ark. Kemi.*, **11** (1975) 567.
6. L. P. Hammet: *Physical Organic Chemistry*, McGraw Hill, 1970, p. 211.
7. P. Cayzergues C. Georgoulis et G. Papanastasiou: *J.Chim. Phys.*, **74** (1977) 1103.



8. R.A. Robinson et R.H. Stokes: *Electrolyte Solutions*, Butterworths, London, p. 491.
9. J.-C. Justice: *Électrochim. Acta* (London), **16**(1971) 701.
10. J. Barthel, J.-C. Justice et R. Wächter: *Z. physik. chem.*, Neue Folge, **84** (1973) 100.
11. P. Cayzergues, C. Georgoulis et G. Papanastasiou: *C.R. Acad. Sci. Paris*, **285** (1977) 163.
12. J. Barthel: *Angew. chem. (Inter. Ed.)*, **7** (1968) 260.

## **ΣΧΕΣΗ ΣΤΑΘΕΡΑΣ GRUNEISEN ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΥ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ ΔΙΚΤΥΩΜΑΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ**

**ΚΩΣΤΑΣ Γ. ΔΕΛΙΔΗΣ**

*Καθηγητής Φυσικής ΤΕΙ Κοζάνης*

(Ελήφθη 2 Νοέμβρη 1983)

### **Περίληψη**

Στην εργασία αυτή εξετάζονται οι θερμομηχανικές ιδιότητες δικτυωμάτων πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) που βρίσκονται σε κομμώδη κατάσταση (rubbery state). Τα πλέγματα με διαφορετική πυκνότητα σταυροδεσμών δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια γ ακτινοβολίας από πηγή  $Co^{60}$ .

Η σύνδεση των θερμικών και των μηχανικών ιδιοτήτων έγινε με τη χρήση της σταθεράς του Grüneisen, που είναι γνωστή από τη Φυσική του στερεού σώματος.

Ειδικότερα έγιναν οι παρακάτω μετρήσεις:

Μέτρηση της ειδικής θερμότητας με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας (Differential Scanning Calorimetry, DSC).

Μέτρηση της ταχύτητας διάδοσης του ήχου με υπερηχητικές μεθόδους (Ultrasonics) και με τη μέθοδο της μη ελαστικής σκέδασης του φωτός (Inelastic Light Scattering), γνωστή σα μέθοδος Brillouin γι' αυτή την περιοχή των συχνοτήτων.

Επί πλέον μετρήθηκαν η πυκνότητα, ο δείκτης διάθλασης και ο συντελεστής θερμικής διαστολής.

Η ειδική θερμότητα των δικτυωμάτων αυξάνεται καθώς αυξάνει η πυκνότητα των σταυροδεσμών. Αυτό εξηγείται με την εισαγωγή νέων μοντέλων δόνησης που δημιουργούνται λόγω επιπρόσθετων σταυροδεσμών.

Η σταθερά του Grüneisen ελαττώνεται γραμμικά με την πυκνότητα των σταυροδεσμών. Η τιμή της σταθεράς δε διαφέρει πολύ από τις αντίστοιχες σταθερές άλλων πολυμερών.

### **Εισαγωγή**

Οι θερμομηχανικές ιδιότητες των διασταυρωμένων πολυμερών βρίσκονται σήμερα στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος και αποτελούν αντικείμενο μελέτης πολλών Εργαστηρίων<sup>1-6</sup>. Ειδικότερα ο Hartmann και οι συνεργάτες του<sup>4,5</sup> παρουσιάζουν συνέχεια αποτελέσματα που σχολιάζονται με βάση την προσθετικότητα διαφόρων ιδιοτήτων. Τα αποτελέσματα όμως αυτά αναφέρονται σε δείγματα μιας μόνο τιμής της πυκνότητας των σταυροδεσμών και επί πλέον τα πολυμερή βρίσκονται στην υαλώδη κατάσταση. Επειδή μέχρι στιγμής δε βρέθηκαν στη βιβλιογραφία εργασίες που αναφέρονται στην εξάρτηση ορισμένων θερμομηχα-

νικών ιδιοτήτων και της σταθεράς του Grüneisen από την πυκνότητα των σταυροδεσμών σε ελαστικά κόμμεα (rubbers), γι' αυτό πραγματοποιήθηκε αυτή η εργασία.

Σαν υλικό χρησιμοποιήθηκε η πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (Polydimethylsiloxane, PDMS), η δε εισαγωγή των σταυροδεσμών έγινε με  $\gamma$  ακτινοβολία από πηγή  $\text{Co}^{60}$ . Λεπτομέρειες για τη διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων και το χαρακτηρισμό τους αναφέρονται σε προηγούμενες δημοσιεύσεις<sup>7,8</sup>.

Οι λόγοι της εκλογής του PDMS σαν υλικό για τη μελέτη ήταν:

α) Οι σταυροδεσμοί που δημιουργούνται με την ακτινοβολία  $\gamma$  είναι απλοί γιατί γίνονται χωρίς την εισαγωγή επιπρόσθετων ατόμων ή ομάδων, γεγονός που διευκολύνει πολύ στην εξήγηση των αποτελεσμάτων.

β) Σκοπός μας ήταν να μελετηθούν οι ιδιότητες ενός συστήματος που να βρίσκεται στην κομμώδη κατάσταση και να είναι άμορφο στη θερμοκρασία που εξετάζεται.

γ) Η δομική μονάδα (monomer unit) του PDMS ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-$ ) που επαναλαμβάνεται είναι σχετικά απλή, σημαντικό για την απλοποίηση ορισμένων υπολογισμών.

Για να γίνουν οι μετρήσεις που χρειάζονταν εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές: Απορρόφηση υπερήχων (US), μη ελαστική σκέδαση του φωτός (Brillouin), διαφορική θερμιδομετρία (DSC) κλπ. Οι μετρήσεις έγιναν σε διάφορα μέρη:

Η ακτινοβολία των δειγμάτων στο πανεπιστήμιο του Salford και στο πυρηνικό κέντρο ερευνών των Σκωτσέζικων πανεπιστημίων (East Kilbride).

Οι US μετρήσεις στα Παν/μια της Glasgow και του Strathclyde.

Οι Brillouin και DSC μετρήσεις στο Παν/μιο του Manchester.

## Πειραματικό μέρος

### α) Παρασκευή και χαρακτηρισμός των δειγμάτων.

Το PDMS που χρησιμοποιήθηκε παραχωρήθηκε ευγενώς από την ICI Ltd (S273-11/1). Το μοριακό του βάρος  $M_n$  προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας δια πηκτής (GPC) και βρέθηκε  $7.7 \times 10^4$ , ο δε συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών  $M_w/M_n$  ήταν περίπου 1.06. Η ακτινοβολία των δειγμάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου αφού προηγήθηκε απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων. Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των σταυροδεσμών των δικτυωμάτων έγινε με βάση τη σχέση δόσης ακτινοβολίας - πυκνότητας σταυροδεσμών, όπως βελτιώθηκε με τη θεωρία του κορεσμού<sup>7,9</sup>.

### β) Τεχνική των μετρήσεων.

#### 1. Μετρήσεις δείκτη διάθλασης, συντελεστή θερμικής διαστολής και πυκνότητας.

Ο δείκτης διάθλασης όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με το διαθλασίμετρο

του Abbé σε θερμοκρασία δωματίου. Παρ' όλο που ο δ.δ μεταβάλλεται λίγο με την πυκνότητα των σταυροδεσμών, η μεταβολή αυτή πάθησε υπόψη στον υπολογισμό της ταχύτητας διάδοσης του ήχου.

Οι μετρήσεις του συντελεστή της θερμικής διαστολής (σθδ) έγιναν με διαστελλόμετρο Hg, ενώ οι μετρήσεις της πυκνότητας έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου ( $20 \pm 1$  °C) ζυγίζοντας το δείγμα πρώτα στον αέρα και μετά βυθισμένο σε αλκοόλη. Για όλες τις τιμές της πυκνότητας των σταυροδεσμών παρατηρήθηκε κανονική θερμική συμπεριφορά. Η σχέση ειδικού όγκου - θερμοκρασίας ήταν γραμμική και από την κλίση της ευθείας υπολογίστηκε ο σθδ. Η ακρίβεια των μετρήσεων της πυκνότητας ήταν  $\pm 10^{-4}$  g/cm<sup>3</sup> και του δ.δ.  $\pm 0.0005$ .

## 2. DSC μετρήσεις.

Οι DSC μετρήσεις έγιναν με θερμιδόμετρο Perkin-Elmer DSC-2 και ταχύτητα θέρμανσης 10 °C/min. Το βάρος των δειγμάτων ήταν της τάξης των 50mg και το διάστημα θέρμανσης από τους 20°C μέχρι τους 150°C. Η ειδική θερμότητα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας Σάπφειρο για τη βαθμονόμηση, όπως περιγράφεται στις οδηγίες χρήσης της διάταξης. Η ακρίβεια των μετρήσεων ήταν  $\pm 0.02$  J/g K.

## 3. US μετρήσεις.

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές ανάλογα με την περιοχή συχνότητας. Λεπτομέρειες των τεχνικών αυτών αναφέρονται αλλού. Η ταχύτητα διάδοσης του ήχου μετρήθηκε σ' ένα ευρύ φάσμα συχνοτήτων από 5 MHz μέχρι 700 MHz. Για πολλά δείγματα μετρήθηκε επίσης και ο συντελεστής απορρόφησης του ήχου.

## 4. Μετρήσεις Brillouin.

Οι μετρήσεις αυτές έγιναν χρησιμοποιώντας συμβολόμετρο Fabry-Perot τριπλής διάβασης με Laser ιόντων αργού και μήκος κύματος 5145 Å. Η προσπίπτουσα ισχύς της δέσμης ήταν περίπου 100 mW και δεν παρατηρήθηκε τοπική θέρμανση των δειγμάτων.

Η μετατόπιση Brillouin ( $\nu_B$ ) συνδέεται με την ταχύτητα διάδοσης του ήχου ( $\nu$ ) με τη γνωστή σχέση:

$$\nu = \frac{\nu_B \lambda_0}{2n \sin(\theta/2)}$$

όπου  $\lambda_0$  είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο κενό, n είναι δ.δ. και  $\theta$  η γωνία σκέδασης.

### Αποτελέσματα - Σχόλια

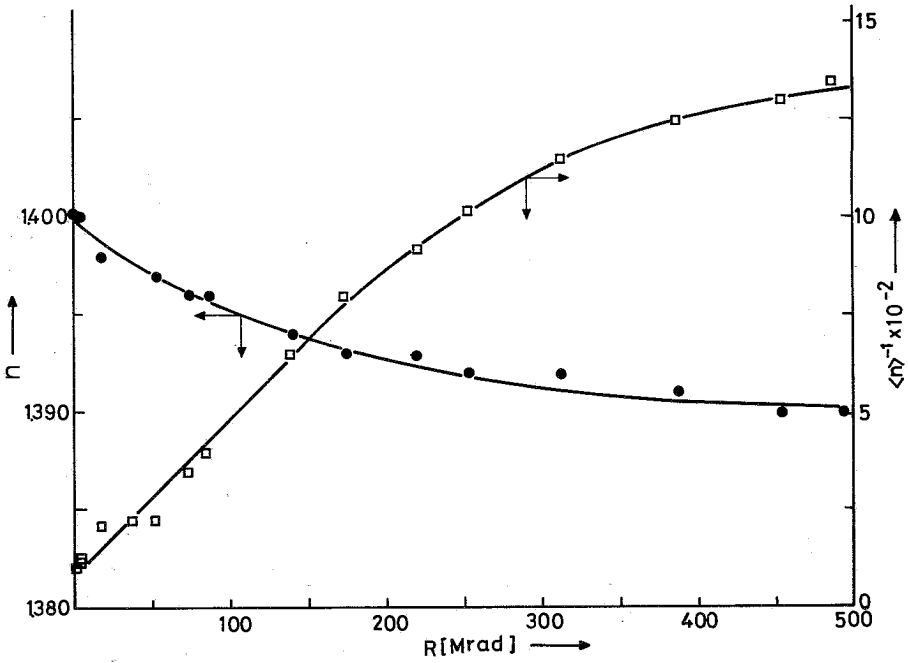
#### 1. Μετρήσεις δ.δ. πυκνότητας και συντελεστή θερμικής διαστολής.

Στον πίνακα I φαίνονται οι τιμές των παραπάνω μεγεθών μαζί με την πυκνότητα των σταυροδεσμών  $\langle n \rangle^{-1}$  που αντιστοιχούν σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας R.  $\langle n \rangle$  είναι κατά μέσο όρο ο αριθμός των μονομερών μονάδων μεταξύ δύο διαδοχικών σταυροδεσμών.

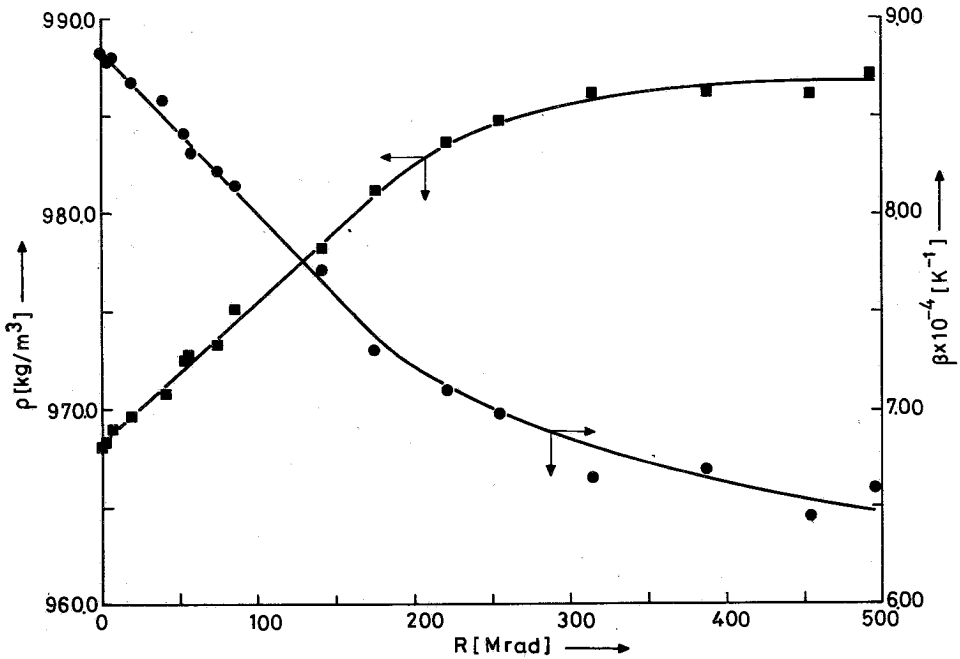
ΠΙΝΑΚΑΣ I. Δόση ακτινοβολίας (R), πυκνότητα σταυροδεσμών  $\langle n \rangle^{-1}$ , δ, διάθλασης (n), πυκνότητα ( $\rho$ ) και συντελεστής θερμικής διαστολής ( $\beta$ ).

Δείγμα	R Mrad	$\langle n \rangle^{-1} \times 10^{-2}$	n	$\rho$ kg/m <sup>3</sup>	$\beta \times 10^{-4}$ K <sup>-1</sup>
A0	0	—	1.402	968.0	8.82
A1	4.5	0.80	1.400	968.5	8.78
A2	7.0	1.20	1.400	968.9	8.80
B1	21	1.52	1.398	969.3	8.67
A3	36	2.14	1.399	970.8	8.58
A4	54	2.60	1.397	972.5	8.42
B2	57	2.60	1.397	972.4	8.33
B3	72	3.55	1.396	973.3	8.22
A5	84	4.00	1.396	975.1	8.16
A6	140	6.48	1.394	978.2	7.70
B4	175	8.03	1.393	981.2	7.30
B5	220	9.33	1.393	983.8	7.10
B6	255	10.21	1.392	984.6	6.98
B7	314	11.50	1.392	986.1	6.65
B8	382	12.48	1.391	986.3	6.70
B9	455	13.00	1.390	986.3	6.45
B10	496	13.52	1.390	987.1	6.59

Μολονότι τ' αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιούνται βοηθητικά για τον υπολογισμό άλλων μεγεθών, εν τούτοις μπορούν να βγούν μερικά πολύ χρήσιμα συμπεράσματα και από αυτές τις μετρήσεις. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 1 και 2, η εξάρτηση των n,  $\rho$  και  $\beta$  από τη δόση της ακτινοβολίας είναι εκθετική. Το γεγονός αυτό ενισχύει τη θεωρία του κορεσμού όσον αφορά το σχηματισμό των σταυροδεσμών<sup>7,9</sup>.



ΣΧΗΜΑ 1. Μεταβολή του δείκτη διάθλασης ( $n$ ) και της πυκνότητας των σταυροδεσμών  $\langle n \rangle^{-1}$  συναρτήσει της δόσης της ακτινοβολίας ( $R$ ).



ΣΧΗΜΑ 2. Μεταβολή της πυκνότητας ( $\rho$ ) και του συντελεστή θερμικής διαστολής ( $\beta$ ) συναρτήσει της δόσης της ακτινοβολίας ( $R$ ).

Αντίθετα, η εξάρτηση των παραπάνω μεγεθών από την πυκνότητα των σταυροδεσμών είναι γραμμική μέσα στα όρια των πειραματικών σφαλμάτων. Από την παρατήρηση αυτή βγαίνει το πολύ σπουδαίο συμπέρασμα ότι η εξάρτηση πολλών ιδιοτήτων των δικτυωμάτων από την ακτινοβολία διέπεται από τον ίδιο νόμο.

Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρακτικά για τον υπολογισμό της πυκνότητας των σταυροδεσμών. Έτσι αν προηγηθεί μια κατάλληλη βαθμονόμηση, καθένα από τα παραπάνω μεγέθη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα δείκτης της πυκνότητας των σταυροδεσμών.

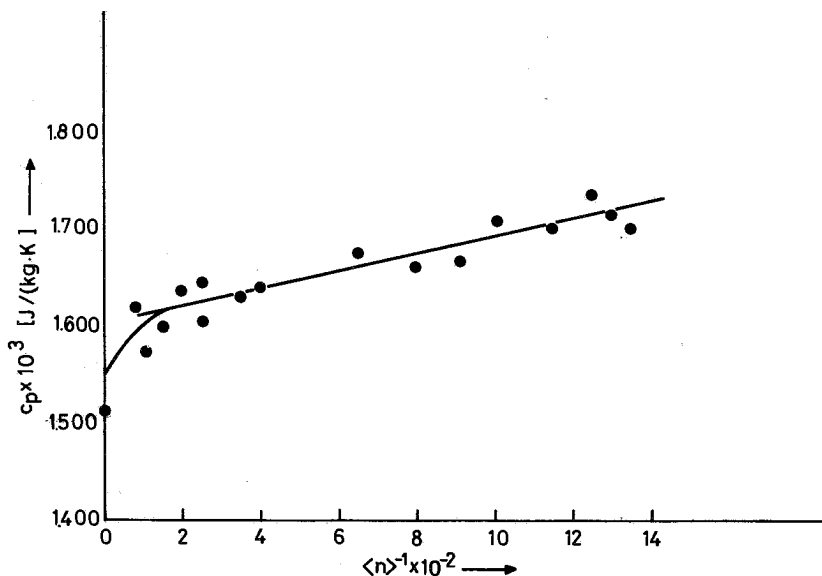
## 2. Μετρήσεις της ειδικής θερμότητας $c_p$ .

Η εξάρτηση της ειδικής θερμότητας από τη θερμοκρασία στο διάστημα από  $20^{\circ}\text{C}$  μέχρι  $150^{\circ}\text{C}$  είναι γραμμική για όλα τα δείγματα. Αυτό ήταν κάτι που αναμενόταν, καθότι στο θερμοκρασιακό αυτό διάστημα το υλικό βρίσκεται σίγουρα στην κομμώδη κατάσταση και επομένως δεν υπάρχει καμμία περιοχή απορρόφησης. Οι τιμές της ειδικής θερμότητας  $c_p$  για τη θερμοκρασία δωματίου ( $20^{\circ}\text{C}$ ) και του μεγέθους  $\Delta c_p = dc_p/dT$  φαίνονται στον πίνακα II.

ΠΙΝΑΚΑΣ II. Ειδικές θερμότητες και ταχύτητες διάδοσης του ήχου στους  $20^{\circ}\text{C}$ .

Δείγμα	$c_p \times 10^3$ J/kg K	$\Delta c_p$ J/kg K <sup>2</sup>	$v(\text{US})$ m/s	$v(\text{Brillouin})$ m/s
A0	1.515	1.16	980	1010
A1	1.621	3.27	1030	1021
A2	1.576	2.32	1029	1034
B1	1.600	1.96	1035	1013
A3	1.634	3.10	1040	1037
A4	1.617	2.76	1038	1025
B2	1.644	3.27	1035	1047
B3	1.626	4.01	1033	1042
A5	1.640	4.05	1030	1039
A6	1.671	3.50	1030	1034
B4	1.602	4.14	1037	1046
B5	1.670	1.27	1038	1029
B6	1.716	2.31	1046	1050
B7	1.703	3.36	1042	1024
B8	1.735	4.12	1037	1048
B9	1.715	1.75	1032	1039
B10	1.700	4.18	1035	1042

Η μεταβολή της ειδικής θερμότητας συναρτήσει της πυκνότητας των σταυροδεσμών φαίνεται πιο καθαρά στο σχήμα 3.



ΣΧΗΜΑ 3. Η ειδική θερμότητα ( $c_p$ ) σε συνάρτηση της πυκνότητας των σταυροδεσμών  $\langle n \rangle^{-1}$ .

Σχεδόν σ'ολόκληρο το διάστημα, η αύξηση της ειδικής θερμότητας είναι γραμμική. Μια μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στα αρχικά στάδια της δημιουργίας του τρισδιάστατου πλέγματος που δεν υπακούει στο γραμμικό νόμο. Η αύξηση αυτή της ειδικής θερμότητας στο σύνολό της μπορεί να οφείλεται στην ελάττωση του ελεύθερου ειδικού όγκου που είναι επακόλουθο της δημιουργίας των σταυροδεσμών<sup>10</sup>.

Μια νέα εξήγηση που φαίνεται επίσης πολύ πιθανή και που συμπληρώνει την προηγούμενη είναι η εξής: Με την εισαγωγή των σταυροδεσμών αλλάζει η δυναμική κατάσταση των μακρομορίων· έτσι εισάγονται νέες καταστάσεις (modes) ιδιοδονήσεων ενδομοριακές (intramolecular), ενδομοναδιακές (intraunit) και διαμοριακές (intermolecular), οι οποίες προστιθέμενες στις ήδη υπάρχουσες, συντελούν στην αύξηση της ειδικής θερμότητας. Μια ένδειξη για την εμφάνιση νέων ενδομοναδιακών δονήσεων αποτελεί το γεγονός της αύξησης της κορυφής στα  $910\text{cm}^{-1}$  στο υπέρυθρο φάσμα με τη δόση της ακτινοβολίας, που παρατηρήθηκε παλαιότερα<sup>9</sup>.

Το μέγεθος  $\Delta c_p$  δε φαίνεται να μεταβάλλεται με την πυκνότητα των σταυροδεσμών μέσα στα όρια των πειραματικών σφαλμάτων.

Η τιμή  $c_p = 1515$  J/kg K για το αρχικό δείγμα βρίσκεται σε συμφωνία μ'αυτές που έχουν δημοσιευτεί για το ίδιο υλικό αλλά διαφορετικού μοριακού βάρους<sup>11</sup>.



### 3. Μετρήσεις ταχύτητας διάδοσης του ήχου.

Η εξάρτηση της ταχύτητας διάδοσης του ήχου από την πυκνότητα των σταυροδεσμών φαίνεται επίσης στον πίνακα II. Οι δυο ομάδες δεδομένων πάρθηκαν ενδεικτικά και αντιστοιχούν σε συχνότητες 5 MHz (Ultrasonics) και 5 GHz (Hypersonics) η μικρότερη και η μεγαλύτερη αντίστοιχα που χρησιμοποιήθηκαν. Για όλες τις συχνότητες η ταχύτητα φτάνει πολύ γρήγορα μια οριακή τιμή πάνω από 10 Mrad περίπου. Έτσι φαίνεται ότι η ταχύτητα διάδοσης του ήχου δε μεταβάλλεται με την πυκνότητα των σταυροδεσμών. Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων οι οριακές αυτές τιμές βρέθηκαν  $1030 \pm 10 \text{ ms}^{-1}$  (5 MHz) και  $1040 \pm 20 \text{ ms}^{-1}$  (5 GHz), που μπορούν να θεωρηθούν ίσες μέσα στα όρια των πειραματικών σφαλμάτων.

### Η σταθερά Grüneisen

Η σύνδεση των μηχανικών και των θερμικών ιδιοτήτων των κρυσταλλικών στερεών γίνεται μέσω της σταθεράς του Grüneisen  $\gamma$ . Γενικές γνώσεις για την παράμετρο αυτή δίνονται από τον Slater<sup>12</sup> και για τα ημικρυσταλλικά και υαλώδη πολυμερή από τους Wada<sup>1</sup>, Hartmann<sup>4,5</sup> και άλλους.

Παρακάτω δίνεται μια πολύ σύντομη εισαγωγή της σταθεράς Grüneisen. Αν υποθέσουμε ότι το μέτρο ελαστικότητας όγκου (Bulk modulus)  $B$  εξαρτάται μόνο από τον όγκο, η σταθερά Grüneisen μπορεί να προσδιοριστεί ή από μετρήσεις θερμοκρασίας από τη σχέση:

$$\gamma_T = - \frac{1}{2\beta} \left( \frac{\partial \ln B}{\partial \ln T} \right)_P \quad (2)$$

ή από μετρήσεις πίεσης από τη σχέση:

$$\gamma_P = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial B}{\partial P} \right)_T \quad (3)$$

όπου  $\beta$  είναι ο θερμικός συντελεστής διαστολής.

Για ένα τέλειο κρυσταλλικό σώμα είναι  $\gamma_T = \gamma_P = \gamma$ .

Στην περίπτωση των πολυμερών τα πράγματα δεν είναι τόσο απλά όσο στα κανονικά κρυσταλλικά στερεά. Υπάρχουν βασικές διαφορές που προκύπτουν κυρίως από την πολυπλοκότητα της μονομερούς ομάδας και τη μεγάλη ανισοτροπία του πεδίου των δυνάμεων στα πολυμερή.

Από άποψη χαρακτηριστικών κινήσεων στα πολυμερή ξεχωρίζουμε τις ενδομοναδιακές και τις δονήσεις σκελετού (skeletal). Οι δεύτερες μπορούν να διακριθούν πάλι σε ενδομοριακές και διαμοριακές. Γενικά, οι δονήσεις του σκελετού συνδέονται με τη σταθερά του Grüneisen  $\bar{\gamma}$ , ενώ οι διαμοριακές μόνο με τη σταθερά  $\gamma_T$ .

Η σταθερά  $\bar{\gamma}$  που εμπεριέχει όλα τα είδη των δονήσεων μπορεί επίσης να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$\bar{\gamma} = \frac{\beta B}{\rho c_P} \quad (4)$$

Από τη γενική σχέση μεταξύ των μέτρων ελαστικότητας:

$$M = B + 4/3G \tag{5}$$

επειδή  $G \ll M, B$  και  $M = \rho v^2$ , για το PDMS στην κομμωδή κατάσταση προκύπτει για τη σταθερά  $\bar{\gamma}$  με πολύ καλή προσέγγιση η σχέση:

$$\bar{\gamma} = \frac{\beta v^2}{c_p} \tag{6}$$

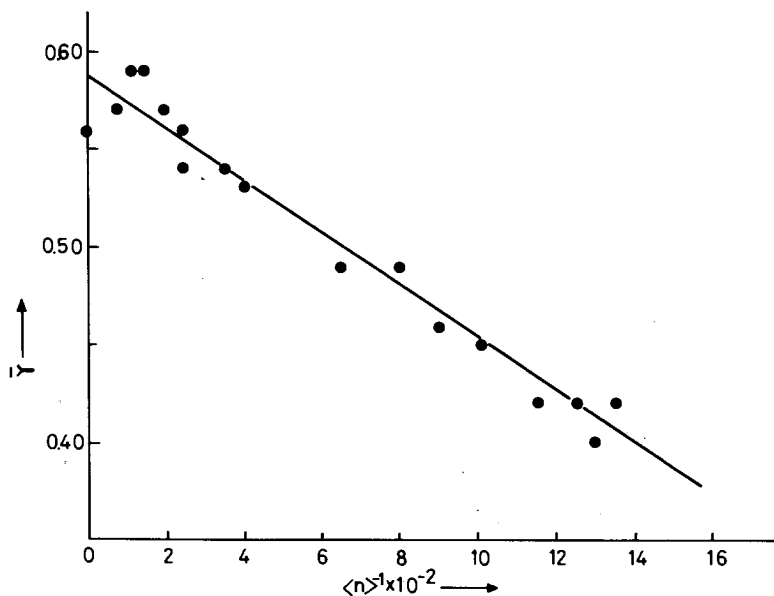
Τιμές του  $\bar{\gamma}$  που προκύπτουν από τη σχέση 6, χρησιμοποιώντας τα γνωστά πλέον μεγέθη του δευτέρου μέλους, φαίνονται στον πίνακα III και γραφικά στο σχήμα 4.

Η ακρίβεια προσδιορισμού του  $\bar{\gamma}$ , λόγω των πειραματικών σφαλμάτων των μετρήσεων των άλλων μεγεθών και διαφορών προσεγγίσεων που χρησιμοποιήθηκαν, είναι της τάξης του 20%.

Σα γενικό συμπέρασμα προκύπτει από τους υπολογισμούς, ότι η σταθερά Grüneisen μικραίνει καθώς αυξάνεται η πυκνότητα των σταυροδεσμών του πλέγματος. Παρά το μεγάλο λάθος που υπεισέρχεται στους υπολογισμούς, μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι η εξάρτηση του  $\bar{\gamma}$  από το βαθμό διασταύρωσης (πυκνότητα σταυροδεσμών) του πλέγματος είναι γραμμική.

ΠΙΝΑΚΑΣ III. Τιμές της σταθεράς  $\bar{\gamma}$ , όπως υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές υ από τις US και Brillouin μετρήσεις.

Δείγμα	$\bar{\gamma}(US)$	$\gamma(Brillouin)$
A0	0.56	0.59
A1	0.57	0.56
A2	0.59	0.59
B1	0.59	0.56
A3	0.57	0.56
A4	0.56	0.54
B2	0.54	0.55
B3	0.54	0.54
A5	0.53	0.53
A6	0.49	0.49
B4	0.49	0.49
B5	0.46	0.45
B6	0.45	0.44
B7	0.42	0.40
B8	0.42	0.42
B9	0.40	0.40
B10	0.42	0.41



ΣΧΗΜΑ 4. Μεταβολή της σταθεράς Grüneisen  $\bar{\gamma}$  συναρτήσει του βαθμού διασταύρωσης του πλέγματος  $\langle n \rangle^{-1}$ .

Το σπουδαίο αυτό αποτέλεσμα που προέκυψε για πρώτη φορά για το PDMS πρέπει να ελεγχθεί εξετάζοντας και άλλα παρόμοια συστήματα, όπως το φυσικό ελαστικό κόμμι και άλλα.

Οι τιμές του  $\bar{\gamma}$  για το PDMS είναι της ίδιας τάξης με αυτές που έχουν δημοσιευτεί για άλλα πολυμερή<sup>1-6</sup>.

### Συμπεράσματα

Τα κυριώτερα συμπεράσματα της εργασίας αυτής είναι:

α) Ορισμένα χαρακτηριστικά μεγέθη του πλέγματος όπως ο δείκτης διάθλασης, η πυκνότητα και συντελεστής θερμικής διαστολής εξαρτώνται εκθετικά από τη δόση της ακτιβολίας.

β) Η ταχύτητα διάδοσης του ήχου δεν εξαρτάται σχεδόν καθόλου από την πυκνότητα των σταυροδεσμών.

Η ορισμένη εξάρτηση μερικών χαρακτηριστικών μεγεθών μπορεί ύστερα από κατάλληλη βαθμονόμηση να αποτελέσει τη βάση νέας μεθόδου για τη μέτρηση της πυκνότητας των σταυροδεσμών των πολυμερών.

γ) Η σταθερά του Grüneisen  $\bar{\gamma}$  ελαττώνεται γραμμικά καθώς αυξάνει η πυκνότητα των σταυροδεσμών.

---

## Summary

*Relation between Grüneisen constant and crosslink density of polymer networks.*

In this work the thermomechanical properties of Polydimethylsiloxane (PDMS) networks in the rubbery state are reported. The networks with different crosslink densities were formed by  $\gamma$ -radiation using  $\text{Co}^{60}$  sources.

The thermal and mechanical properties are connected by using the Grüneisen constant known from the solid state Physics.

In particular, the following measurements were made:

Specific heat measurements by the Differential Scanning Calorimetry method. Sound velocity measurements by Ultrasonic and Inelastic Light Scattering (Brillouin) methods.

In addition, the density, the refractive index and the thermal expansion coefficient have been measured.

Sound speeds are not sensitive to crosslink density but specific heat is: the specific heat of the networks increases linearly with the crosslink density. This is explained by the introduction of new vibrational modes due to new links.

The Grüneisen constant decreases linearly with the crosslink density. The values of the constant are very close to others reported for other polymeric systems.

---

## Βιβλιογραφία

1. Y. Wada, A. Itani, T. Nishi and S. Nagai: *J. Pol. Sci.* **7(A-2)**, 201 (1969).
2. R.W. Warfield: *Die Macromol. Chem.* **175**, 3285 (1974).
3. E. Kato: *J. Chem. Phys.* **73(3)**, 1020 (1980).
4. B. Hartmann and G. Lee: *J. Pol. Sci. (pol. Physics Ed.)* **20**, 1269 (1982).
5. B. Hartmann, G. Lee and M. Long: *J. Appl. Pol. Sci.* **27**, 289 (1982).
6. S. Kondo and T. Igarashi: *Polymer* **24**, 221 (1983).
7. C.G. Delides and I.W. Shepherd: *Radiat. Phys. Chem.* **10**, 379 (1977).
8. C.G. Delides and I.W. Shepherd: *Polymer* **18**, 97 (1977).
9. C.G. Delides and B.W. Cook: *Radiat. Phys. Chem.* **15**, 547 (1980).
10. P. Mason: *Rubber Chem. Techn.* **39**, 408 (1966).
11. Yu.K. Godovskii, V. Yu. Levin, G.L. Slonimskii, A.A. Zhdanov and K.A. Andrianov: *Vysokomol. Soyed A* **11(11)**, 2444 (1979).
12. J.C. Slater: "Introduction to Chemical Physics", Mc Graw-Hill, N. York (1939) Chap. 14.

## Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς όλα τα Ιδρύματα (Παν/μια Manchester,

Salford, Glasgow και Strathclyde) για την άδεια ώστε να χρησιμοποιηθούν οι απαραίτητες διατάξεις για τις μετρήσεις. Ευχαριστίες εκφράζονται και προς το πυρηνικό κέντρο ερευνών των σκωτσέζικων Παν/μίων για τη βοήθεια στην ακτινοβολία των δειγμάτων. Επίσης ευχαριστώ τους Δρα. R. Pethrick από το Παν/μιο του Strathclyde και Δρα Β. Hartmann από το τμήμα Φυσικής του Κέντρου Έρευνας επιφανειακών όπλων Ναυτικού (Maryland USA) για την ανταλλαγή απόψεων πάνω στο θέμα.

## A NEW SYNTHESIS OF I,I DIACYLOXY IODOBENZENES AND SOME MIXED I,I DIACYLOXY IODOBENZENES

S. SPYROUDIS

*Laboratory of Organic Chemistry, University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece.*

(Received January 13, 1984)

### Summary

A new simple synthesis of I,I diacyloxy iodobenzenes from sodium carboxylates and I,I bis (trifluoroacetoxy) iodobenzene is reported. Using the same reaction I,I trifluoroacetoxy-acyloxy iodobenzenes are isolated for the first time. The spectral data and some chemical properties of these new compounds are briefly discussed.

**Key-Words:** I,I Bis (trifluoroacetoxy) iodobenzene. Sodium carboxylates.

### Introduction

I,I diacyloxy iodoarenes  $\text{ArI(OCOR)}_2$ , abbreviated DIA, constitute a well known class of compounds the chemistry of which has been recently reviewed<sup>1</sup>. A number of methods for the preparation of these compounds has been developed<sup>2-7</sup>. The use of each method depends mainly upon the nature of the acyloxy groups and the substituents on the aromatic ring.

In continuation of the interest in our laboratory for the chemistry of I,I diacyloxy iodoarenes it is now reported a simple method for the preparation of I,I diacyloxy iodobenzenes, abbreviated DIB, from the easily available<sup>8</sup> I,I bis (trifluoroacetoxy) iodobenzene, abbreviated TIB. This method involves the addition of two mol of the sodium salt of the appropriate acid to a stirred solution of one mol of TIB in dry acetonitrile, according to the reaction:

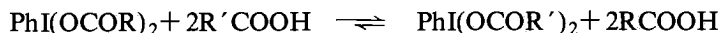


R = -CH<sub>3</sub> (a), -Ph (b), p-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (c), -CH=CHPh (trans) (d),  
n-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>- (e), 2,4,6,tri Me-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>- (f).

The reaction is carried out at r.t. and the DIB formed is usually precipitated and filtered off. The advantage of the method is its simplicity and the mild conditions under which the reaction takes place. The yields are generally good and

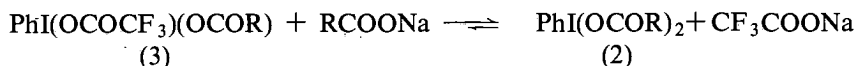
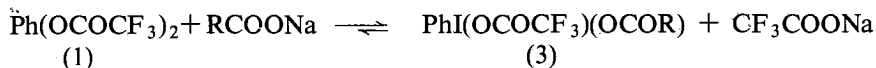
this method may be the method of choice for the preparation of various DIB.

The only limitation of the method is that DIB with acyloxy groups from acids stronger than trifluoroacetic cannot be prepared. But in that case these DIB can be prepared by the "exchange" reaction<sup>6</sup>:



where R'COOH is a stronger acid than RCOOH. On the other hand few carboxylic acids are stronger than trifluoroacetic. That was one reason for the selection of TIB as reactant the other being the fact that the sodium trifluoroacetate formed during the reaction is soluble in acetonitrile and thus the separation of the products becomes very simple.

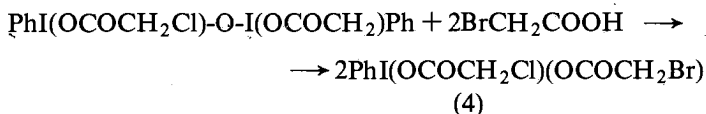
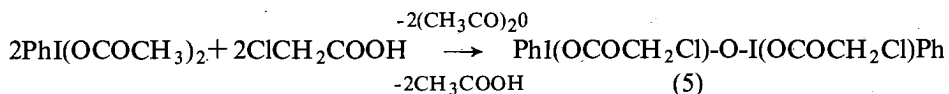
As for the mechanism of the reaction it may be either an S<sub>N</sub>1-like or S<sub>N</sub>2-like nucleophilic substitution at iodine, in two steps.



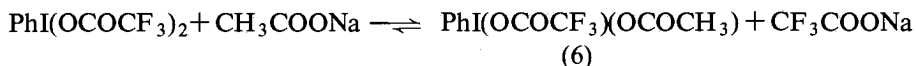
In most cases the insolubility of the DIB formed, whereas TIB is soluble in acetonitrile, shifts the equilibrium even faster towards its formation.

The first step of the reaction involves the formation of PhI(OCOCF<sub>3</sub>)(OCOR) (3), the so called mixed I,I diacyloxy iodobenzene. Such compounds are not known in the literature with one exception; Merkushev et al<sup>9</sup> reported in 1973 the preparation of the stable PhI(OCOCH<sub>2</sub>Cl)(OCOCH<sub>2</sub>Br) (4) by careful sequential

addition of the two different acids to PhI(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.



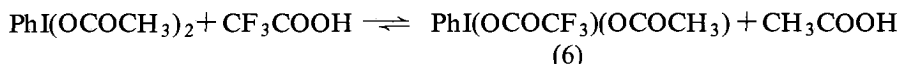
The prospect to isolate stable mixed DIB with a trifluoroacetate and another acyloxy group led to the addition of one mol of anhydrous sodium acetate to one mol of TIB in acetonitrile.



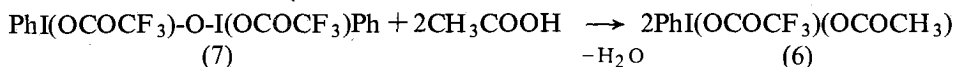
The reaction was monitored by the complete disappearance of the insoluble sodium acetate (5-10 minutes). The solvent was removed in vacuum, the residue

was triturated with  $\text{CHCl}_3$  and the insoluble in  $\text{CHCl}_3$  sodium trifluoroacetate was filtered off. From the chloroformic solution white crystals m.p. 127-129 °C were isolated. This compound proved to be I,I-trifluoroacetoxy-acetoxy iodobenzene (6) by its spectral data and by elemental analysis.

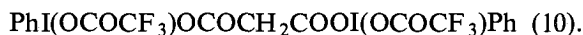
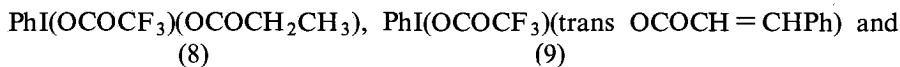
The synthesis of  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)(\text{OCOCH}_3)$  (6) was effected also with other methods, to exclude the possibility that the compound isolated was an equimolecular mixture of TIB and  $\text{PhI}(\text{OCOCH}_3)_2$ . Thus (6) was prepared by careful addition of one mol of trifluoroacetic acid to one mol of  $\text{PhI}(\text{OCOCH}_3)_2$ .



Moreover (6) was later prepared<sup>10</sup> from  $\mu$ -oxo-difluoroacetate di phenyl di iodine (7) and acetic acid.



Thus after the structure of (6) was established, the process was repeated with the sodium salts of a series of carboxylic acids. In some cases, although the mixed DIB was the major product, either it was not crystallisable or it was contaminated with TIB and the corresponding DIB. Beyond any doubt the following mixed DIB were isolated in crystalline form and in very pure condition.



Although spectral data show the preparation of the mixed  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)(\text{OCOPh})$  (11) and  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)(\text{OCOCH}_2\text{Ph})$  (12) these compounds are unstable and cannot be isolated in pure condition.

The salts  $p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-COONa}$  and  $n\text{-C}_{15}\text{H}_{31}\text{COONa}$  gave only the DIB (2b) and (2e), because of the great insolubility of the latter.

The isolated mixed DIB (6), (8), (9) and (10) were fairly stable at room temperature in the absence of light but after 2-3 weeks tended to decompose. It is possible that the stability of mixed DIB depends largely upon the nature of the acyloxy groups. It is known<sup>11</sup> that the nature of the acyloxy groups in DIB affects their crystalline structure. In some cases the two different acyloxy groups cannot "cooperate" to form a stable crystalline mixed DIB. That was confirmed by the fact that these DIB could not also be prepared by using the  $\mu$ -compound method<sup>10</sup> e.g.

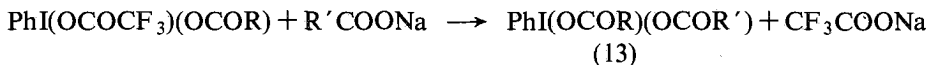


In these cases mixed DIB are formed but they have the tendency in solution to disproportionate into TIB and the corresponding DIB.





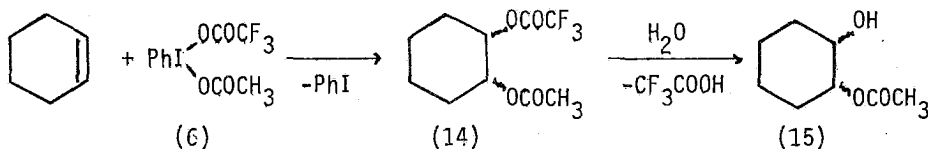
Many attempts to replace the trifluoroacetoxy group in a mixed DIB with another acyloxy group have failed.



The reaction proceeds and (13) with no doubt is the major product but it is contaminated with small amounts of other DIB e.g. TIB,  $\text{PhI}(\text{OCOR})_2$ ,  $\text{PhI}(\text{OCOR}')$ ,  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)(\text{OCOR}')$ , which are impossible to remove.

The spectral data of the mixed DIB are similar to those of DIB. The carbonyl stretching band of the trifluoroacetoxy group appears at  $1705\text{ cm}^{-1}$  ( $25\text{-}30\text{ cm}^{-1}$  lower than the highest band of the same group in TIB), whereas the other carbonyl group appears at  $1650\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ . The n.m.r. spectra show the expected peaks. In m.s. no molecular ions are detected. The main fragment is always iodobenzene (204).  $\text{PhI}^+\text{OCOCF}_3$  (317),  $\text{RCOOH}^+$  and  $\text{I}^+$  (127) are other minor fragments.

Mixed DIB have oxidation properties as all DIB. Their reactivity lies between that of TIB and that of the corresponding DIB. Their most interesting reaction is acetoxylation. Thus  $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)(\text{OCOCH}_3)$  (6) reacts with acetophenone to give a mixture of the esters  $\text{PhCOCH}_2\text{OCOCF}_3$  and  $\text{PhCOCH}_2\text{OCOCH}_3$ , as monitored by their n.m.r. spectra. (6) reacts with cyclohexene at room temperature to form a mixture of cis-trans 1-trifluoroacetoxy 2-acetoxy cyclohexane (14) which cannot be isolated but during the work up hydrolyses to cis-trans 2-acetoxy cyclohexanol (15).



The reaction is a chemical proof of the existence of mixed DIB.

So mixed DIB can be used in one pot synthesis of mixed esters of 1,2 diols. The practical aspects of this reaction are under further investigation.

## Experimental

I.r spectra were recorded with a Perkin-Elmer 297 spectrometer (Nujol mulls). Mass spectra were obtained from a Hitachi-Perkin Elmer RMU-6L (single focusing) spectrometer at 70 eV.  $^1\text{H}$  N.m.r. (60 MHz,  $\text{Me}_4\text{Si}$  internal standard) were recorded on a Varian A-60 A spectrometer.

TIB was prepared by the standard procedure<sup>8</sup>. The sodium salts of acids prepared from the corresponding acids and ethanolic solution of sodium hydroxide. Acetonitrile was dried over molecular sieves (type 3A).

*Typical procedure for the preparation of DIB.*

1320 mg (3 mmol) of TIB were dissolved in dry acetonitrile (20 ml) and to the stirred solution 6 mmol of the sodium salt of the corresponding acid were added. After the complete disappearance of the sodium salt (5-10 min) the clear solution was evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with an excess of warm  $\text{CHCl}_3$ . The insoluble sodium trifluoroacetate was filtered off and DIB was crystallised from the chloroformic solution after the addition of hexane. In cases where DIB was relatively insoluble in acetonitrile, the insoluble portion was removed by filtration and the work up continued as before in the solution.

The following DIB were isolated:

2a yield 87%. m.p. 154-157 $^{\circ}\text{C}$ , lit<sup>2</sup>. m.p. 158 $^{\circ}\text{C}$ .

2b yield 68% m.p. 158-160 $^{\circ}\text{C}$ , lit<sup>12</sup>. m.p. 158-160 $^{\circ}\text{C}$ .

2c yield 92% m.p. 219-220 $^{\circ}\text{C}$ . i.r.  $\nu_{\text{CO}}$  1660  $\text{cm}^{-1}$ . (Found: C, 44,64, H, 2,35; N, 5,08.  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}_4$  requires C, 44,77; H, 2,42; N, 5,22%)

2d yield 46%. m.p. 152-154 $^{\circ}\text{C}$ . i.r.  $\nu_{\text{CO}}$  1650  $\text{cm}^{-1}$ . (Found: C, 57,39; H, 3,81.  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{IO}_4$  requires C, 57,84; H, 3,84%)

2e yield 42%, m.p. 79-80 $^{\circ}\text{C}$ . i.r.  $\nu_{\text{CO}}$  1660  $\text{cm}^{-1}$ . (Found: C, 63,35; H, 8,95.  $\text{C}_{38}\text{H}_{67}\text{IO}_4$  requires C, 63,86; H, 9,38%)

2f yield 20%. m.p. 92-95 $^{\circ}\text{C}$  lit<sup>13</sup>. m.p. 93-96 $^{\circ}\text{C}$ .

*Typical procedure for the preparation of mixed DIB.*

1320 mg (3 mmol) of TIB were dissolved in dry acetonitrile (20 ml) and 3 mmol of the sodium salt of the corresponding acid was added to the stirred solution. After the disappearance of the sodium salt (5-10 min) the clear solution evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with  $\text{CHCl}_3$ . Hexane was added to the chloroformic solution and the mixture was kept at -10 $^{\circ}\text{C}$  for 2-5 days during which time crystals were deposited. The mixed DIB were pure enough and needed no further recrystallization.

The following mixed DIB were isolated:

(6) yield 73%. m.p. 127-129 $^{\circ}\text{C}$ . i.r.  $\nu_{\text{CF}_3\text{CO}}$  1705  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_3\text{CO}}$  1670  $\text{cm}^{-1}$ . n.m.r.  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 2,02 (3H,s), 7,22-7,97 (5H, m). m/z 317 (5), 204 (100), 127(20), 77(65). (Found: C, 31,46; H, 2,03.  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{F}_3\text{IO}_4$  requires C, 31,93; H, 2,14%)

(8) yield 64%. m.p. 93%. i.r.  $\nu_{\text{CF}_3\text{CO}}$  1705  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}}$  1670  $\text{cm}^{-1}$ . n.m.r.  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1,15(3H,t), 2,40 (2H,q), 7,25-7,94 (5H,m). m/z 317 (3) 204 (100), 127 (35), 77(85), 69(64). (Found: C, 33,65; H, 2,31;  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{IO}_4$  requires C, 33,87; H, 2,58%)

(9) yield 28%. m.p. 92-94 $^{\circ}\text{C}$ . i.r.  $\nu_{\text{CF}_3\text{CO}}$  1710  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{PhCH}=\text{CHCO}}$  1650  $\text{cm}^{-1}$ . n.m.r.  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 6,43 (1H,d, J 16 Hz), 7,26-8,38 (11H,m). m/z 204 (100), 147 (8) 131 (15), 127 (90), 103 (24), 77 (95), 69 (45). Found: C, 43,82; H, 2,48  $\text{C}_{17}\text{H}^-$  requires C, 43,96; H, 2,58%)

(10) yield 22%. m.p. 110-111°C. i.r.  $\nu_{\text{CF}_3\text{CO}}$  1710  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{-CH}_2\text{CO}}$  1670  $\text{cm}^{-1}$ . n.m.r.  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 3,47 (2H,s), 7,24-7,95 (10H,m). m/z 403 (traces), 317 (8), 254 (5), 204 (100), 190 (15), 127 (85), 77 (90), 69 (75). (Found: C, 30,76; H, 1,67.  $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{F}_6\text{I}_2\text{O}_8$  requires C, 30,98; H, 1,63%).

#### Reaction of (6) with cyclohexene.

750 mg (2 mmol) of (6) were dissolved in cyclohexene (4 ml). After the complete reaction of (6), monitored by t.l.c., the solution evaporated under reduced pressure. The mixture shows two carbonyls in i.r. (1795 and 1760  $\text{cm}^{-1}$ ). It was chromatographed on column (silica gel,  $\text{CHCl}_3$ —hexane) and after PhI the only isolable product in high yield was cis-trans 2-acetoxy cyclohexanol, (15).i.r. 3500-3350  $\text{cm}^{-1}$ , 1760  $\text{cm}^{-1}$ . The latter was hydrolysed with sodium hydroxide to cis-trans 1,2-cyclohexanediol.

### Περίληψη

Μιά νέα σύνθεση I,I διακυλοξυ ιωδοβενζολίων και μερικών μικτών I,I διακυλοξυ ιωδοβενζολίων.

Αναφέρεται μια απλή σύνθεση I,I διακυλοξυ ιωδοβενζολίων από άλατα με νάτριο καρβοξυλικών οξέων και I,I διτριφθορακετοξυ ιωδοβενζόλιο. Με την ίδια αντίδραση απομονώνονται μικτά I τριφθορακετοξυ I ακυλοξυ ιωδοβενζόλια. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα και μερικές χημικές ιδιότητες αυτών των νέων ενώσεων εξετάζονται με συντομία.

### References

1. A.Varvoglis: *Chem. Soc. Rev.* **10**, 337 (1981).
2. K.Pausacker: *J. Chem. Soc.* 107 (1953)
3. M.Schmeisser, K.Dahmen and P.Sartori: *Chem. Ber.* **100**,1633 (1967) and **103**,307 (1970).
4. D.Banks: *Chem. Rev.* **66**, 243 (1966).
5. B.Karele and O.Neilands: *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis, Kim, Ser.* 587 (1970) *Chem. Abstr.* **74**, 42033 (1971).
6. E.Merkushev, A.Novikov, T.Kogai and V.Gluskova: *Zh. Org. Khim.* **8**, 436 (1970).
7. I.Maletina, V.Orda and L.Yagupolskii: *Zh. Org. Khim.* **10**, 294 (1974).
8. S.Spyroudis and A.Varvoglis: *Synthesis* 445 (1975).
9. E.Merkushev, T.Kogai, L.Polyakova and A.Novikov: *Zh. Org. Khim.* **9**, 1077 (1973).
10. J.Gallos: Thesis to be submitted to the University of Thessaloniki.

11. a.N.Alcock, R.Countryman, S.Esperas and J.Sawyer: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 854 (1979). b.C.Lee, T.Mac, W.Li and J.Kirner: *Acta Cryst. B* 33,1620 (1977). c. G.Stergiudis, S.Kokkou, A.Bozopoulos and P.Rentzeperis: to be published in *Acta Cryst.*
12. D.Hay, C.Stirling and G.Williams: *J.Chem. Soc.* 1475 (1956).
13. E.Malamidou, E.Micromastoras and A.Varvoglis: *Chimika Chronika, New Series* 6,493 (1977).

## COPPER COMPLEXES OF PYRIDINE-2-THIOL

P. KARAGIANNIDIS

*Department of Inorganic Chemistry, University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece*

(Received September 15, 1983)

Abbreviations:

$\text{Cu}(\text{Py}2\text{SH})_2\text{NO}_3$  Bis(pyridine-2-thiol) Copper (I) nitrate

$\text{Cu}(\text{Py}2\text{SH})_3\text{NO}_3$  Tris(pyridine-2-thiol) Copper (I) nitrate

$\text{Cu}(\text{Py}2\text{SH})_3(\text{NO}_3)_2$  Tris(pyridine-2-thiol) Copper (II) nitrate

### Introduction

There has been considerable interest during the past few years in complexes between pyridine-2-thiol and transition metals<sup>1-10</sup> stemming from the similarity of this ligand with thiolated nucleosides<sup>4</sup>. The existence of pyridine-2-thiol (py2SH) in tautomers indicates different potential bonding forms since coordination may occur either through the nitrogen or sulfur atoms or through both. Indeed, reported data<sup>3-10</sup> indicate that the mode of ligation with transition metals depends on the central atom. Wilkinson and coworkers<sup>2</sup> have amply demonstrated that in the case of Ru(II) the py2SH ligand is bidentate, coordinating through both nitrogen and sulfur atoms whereas in the case of some divalent metals of the first transition series coordination occurs only through the sulfur atom<sup>4</sup>. The behaviour of py2SH as monodentate ligand was also confirmed by a recent study<sup>11</sup> of the crystal structure of the  $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{py}2\text{SH})_3\text{NO}_3$  complex. It was found that there is little interaction between the metal ion and the nitrogen atom the bonding occurs through the sulfur atom.

The versatility of the py2SH ligand, can be exploited by preparing new complexes. In this work we report the preparation and characterization of three new complexes of copper with py2SH.

### Experimental

#### *Physical Measurements*

Ir spectra were obtained in the region  $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$  on a Perkin-Elmer 467

spectrophotometer using KBr discs or nujol mulls. Electronic spectra in nujol mulls were recorded on a Cary 17 spectrophotometer. Magnetic susceptibility measurements were taken employing the Faraday technique at different magnetic field strengths.  $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$  was used as the calibrant. Diamagnetic corrections were made using Pascal's constants. Thermogravimetric studies were carried out on a Perkin-Elmer TG-2 thermobalance. Conductivity measurements in DMF were made using a Radiometer conductivity bridge (Model RC 216 B2). Chemical analyses for C, H and N were performed on a Perkin-Elmer 240-B Elemental Analyser.

#### *Preparation of the complexes*

##### i. Preparation of the complex $[\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_2]\text{NO}_3$ (A)

This complex was prepared by dissolving 1 mmol of copper(II) nitrate in a small volume (15 ml) of water. Then, 2 mmol of py2SH dissolved in the minimum volume (15 ml) of ethanol were added. The product was removed by filtration, washed with a small volume of cold ethanol and was vacuum dried at room temperature. Yield 70%.

##### ii. Preparation of the complex $[\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_3]\text{NO}_3$ (B)

This compound was obtained by the addition of 5 mmol of py2SH in ethanol to a solution of copper (II) nitrate (1 mmol) in water (15 ml). The resultant solution was filtered and the filtrate was allowed to stand for about 24 hrs in the refrigerator until the precipitation of crystalline product seemed to be complete. The yellow crystals were removed by filtration, washed with a small amount of cold ethanol and finally dried at room temperature. Yield 55%.

This complex was also prepared by treating the previous product complex A with an excess of pyridine-2-thiol in solution. The addition of an excess of pyridine-2-thiol (more than 3:1 stoichiometry) always resulted in the formation of complex B.

##### iii. Preparation of the complex $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{py}2\text{SH})_3](\text{NO}_3)_2$ (C)

Preparation of this compound was achieved by following the procedure used for complex B. After mixing the reactants and filtering to remove any undesirable by-products, the filtrate was treated with an aqueous solution of copper(II) nitrate until the colour became dark green. Then the reaction mixture was allowed to stand for fifteen minutes at room temperature. After removing the solid by-products by filtration the filtrate was allowed to stand for two days by which time the green complex C was separated. The separation could be speeded up by adding diethylether ( $\text{Et}_2\text{O}$ ). The green solid was filtered off, washed with EtOH and then with  $\text{Et}_2\text{O}$ . Finally it was dried under vacuum. Yield 50%.

## **Results and discussion**

The reaction of pyridine-2-thiol with Cu(II) nitrate gives more products than it

was previously thought. Thus, following the previously reported procedure for preparing complex B, a new complex corresponding to the formula  $\text{Cu}(\text{py2SH})_2\text{NO}_3$  was isolated at the initial steps of the reaction. The new complex is a yellow solid with a melting point  $22^\circ\text{C}$  less than that of complex B. Complex A is insoluble in ethanol and its dissolution in this solvent is achieved only in the presence of excess of py2SH.

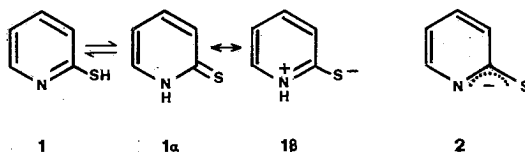
The excess of ligand in a reaction mixture comprising py2SH and  $[\text{Cu}(\text{py2SH})_2]\text{NO}_3$  results in the quantitative formation of complex B,  $\text{Cu}(\text{py2SH})_3\text{NO}_3$ . Any inhibition of the reaction by undesirable by-products is prevented by filtering the reaction mixture soon after the mixing of the reactants. Precipitation proceeds slowly and complex B is obtained as a crystalline solid after a few days.

Totally different product is obtained when the addition of py2SH is followed by an excess of  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Thus, dissolution of complex A in the ethanol-py2SH mixture and treatment with an aqueous solution of  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  changes the colour of the solution to dark green. After two days a green solid is separated having the stoichiometry  $[\text{Cu}(\text{py2SH})_2](\text{NO}_3)_2$ .

Attempts were made to prepare a fourth complex having the formula  $\text{Cu}(\text{py2SH})\text{NO}_3$  by changing the ligand-to-metal ratio. However, the only products isolated were complexes A and B.

Complexes A and B are air-stable solids, insoluble in a wide range of solvents including carbon tetrachloride, benzene, toluene, nitromethane, acetonitrile, acetone, methanol and dimethyl sulfoxide. They are slightly soluble in dimethyl formamide. The third complex C is a light hygroscopic polymer insoluble in both polar and non polar solvents. It is insoluble even in dimethyl formamide. The poor solubility of these compounds prevented molecular weight determination and other measurements in solution. Nevertheless the calculated and observed analytical data for the complexes show excellent agreement (Table I).

The formation of three complexes from the same ligand-metal ion pair may be related to the structure of pyridine-2-thiol. The ligand can exist in two tautomeric forms<sup>10-13</sup> in a thione-thiol equilibrium:



Coordination might involve either form. Ligation can be achieved through either the sulfur or the nitrogen atom. In the deprotonated form 2 both atoms could be coordination sites. Evidence on the mode of coordination in the new complexes A, B, C may be sought from the ir spectra.

The most important bands in the ir spectra of the ligand and the complexes are tabulated in Table II. The spectra of the complexes in KBr discs do not contain the  $\nu(\text{SH})$  band in the  $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$  region<sup>14-16</sup>. The presence of medium broad bands at  $3440\text{ cm}^{-1}$  and  $3110\text{ cm}^{-1}$  due to the  $\nu(\text{NH})$  of uncoordinated NH group<sup>16,17</sup>, as well as the characteristic four thioamide bands, indicate that the thione form predominates in the complexes.

TABLE I. Analytical data and other physical properties.

Compound	Colour	Analysis (%)				$\Delta_M$	
		Cu	C	H	N	( $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ )	M.p./ $^{\circ}\text{C}$
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_2\text{NO}_3$	yellow	17,80(18,26) <sup>a</sup>	34,14(34,52)	2,84(2,89)	12,06(12,09)	72	86
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_3\text{NO}_3$	yellow	13,15(13,84)	39,00(39,24)	3,10(3,29)	11,90(12,20)	84	108
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_3(\text{NO}_3)_2$	dark green	12,40(12,19)	34,54(34,57)	2,60(2,88)	13,05(13,43)	-	decomp.

a. Theoretical values are in parentheses

TABLE II. Most Significant Infrared Absorption Bands ( $\text{cm}^{-1}$ )

Compound	$\nu(\text{N-H})$	Thioamide I	Thioamide II	Thioamide III	Thioamide IV	$\nu(\text{M-S})$
py2SH	3180 br	1460 s	1275 s	990 s	870 m	-
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_2\text{NO}_3$	3160 m 3420 w	1455 s	1265 s	970 s	820 m	330 w
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_3\text{NO}_3$	3180 m	1455 s	1270 s	960 s	820 m	330 m
$\text{Cu}(\text{py}2\text{SH})_3(\text{NO}_3)_2$	3100 m 3480 m	1435 s	1260 vs	940 s	820 w	360 m



Although four thioamide bands usually appear in the ir spectra, those showing the most significant changes upon complexation are III and IV. Thioamide bands I and II have a predominant contribution from  $\nu(\text{C} \cdots \text{N}) + \delta(\text{CH})$  and  $\nu(\text{C} \cdots \text{S})$ , respectively. These bands appear unchanged at the same wavenumbers as the ligand. Thioamide bands III and IV have a major contribution from  $\nu(\text{C} \cdots \text{N})$  and undergo negative shifts in comparison to the absorption of the ligand.

Two medium intensity bands at  $630 \text{ cm}^{-1}$  and  $600 \text{ cm}^{-1}$  appeared. These bands should be connected with the  $\nu(\text{C}-\text{S})$  band of the free ligand that occurs at  $610 \text{ cm}^{-1}$  which disappears upon complexation. The ir spectra of complex A did not reveal any bands that could be assigned to  $(\text{Cu}-\text{N})$  stretching vibrations and no other evidence for the existence of  $(\text{Cu}-\text{N})$  bond could be found. Apparently, coordination takes place via the sulfur atoms. This is supported by the presence of a band at  $330 \text{ cm}^{-1}$  which is assigned to the  $\nu(\text{Cu}-\text{S})$  vibration<sup>18</sup>. The ir spectra of complex B was similar to that of complex A.

These observations are consistent with coordination to the metal through the sulfur atom<sup>19</sup>. Since the shifts induced upon coordination are all in the same direction the bonding pattern is deduced to be the same for the two complexes.

In addition to the bands due to the py2SH, both complexes A and B show the characteristic strong absorption at  $1360 \text{ cm}^{-1}$  due to the asymmetric  $\nu(\text{N}-\text{O})$  band of ionic nitrate. Two bands at  $830 \text{ cm}^{-1}$  and  $720 \text{ cm}^{-1}$  are associated with the out-of-plane deformation and the in-plane bend, respectively. These bands are typical of the nitrate ion and show that it is not coordinated<sup>20-24</sup>. The ir spectrum of complex C shows some notable characteristics not occurring in the previous two complexes. Thus, the strong band due to the nitrate in  $1360 \text{ cm}^{-1}$  is absent whereas two additional peaks appear at  $1460$  and  $1280 \text{ cm}^{-1}$ , indicating the presence of coordinated nitrate group<sup>23,24</sup>. Further evidence that the  $\text{NO}_3^-$  is not coordinated comes from conductivity measurements. The molar conductance of the complexes A and B in dimethyl formamide is  $72$  and  $84 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  at  $25^\circ \text{C}$  for  $10^{-3} \text{ M}$  solutions respectively, indicating that they are 1:1 electrolytes<sup>25</sup>.

The electronic spectra of complexes A and B are almost identical and are dominated by strong charge transfer bands near the visible region with maxima at  $25000$  and  $26300 \text{ cm}^{-1}$ . The electronic spectrum of complex Cu, is quite different from the other two complexes as expected. It is dominated by a single broad band (halfband width  $3000 \text{ cm}^{-1}$ ), with band maximum at  $14000 \text{ cm}^{-1}$ . This band is indicative of structural differences and possible different coordination number of the central atom in complex C. Despite the strong indications about the local symmetry of the copper ion, it would be presumptuous to assign the observed absorption to a specific transition.

Further evidence on the oxidation state of copper in complex C comes from magnetic susceptibility measurements. Complexes A and B are diamagnetic as expected for Cu(I) compounds whereas complex C is paramagnetic. The magnetic moment of this compound,  $\mu_{\text{eff}} = 1,84 \text{ B.M.}$ , falls within the range of square-planar copper (II) complexes<sup>26,27</sup>.

The insolubility of the complexes did not permit the determination of the relative molecular mass. However, the stoichiometry of these complexes is in

TABLE III. Thermogravimetric Analysis

Compound	Molecular Mass	Overall Mass	Stepped Mass Losses (%)		Probable Fragment
	M <sub>r</sub> (Calc)	Loss (%) (expt)(Calc)	(T/ <sup>o</sup> C)	(expt)(Calc)	
Cu(py2SH) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	347,88	77,5(77,1)	130-180	22,5(22,7)	pyridine
			180-250	21,8(22,7)	pyridine
			250-380	12,0(13,2)	NO <sub>2</sub>
			380-450	18,0(18,4)	S
Cu(py2SH) <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	459,05	82(82,7)	150-180	16,5(17,2)	pyridine
			180-250	40,5(41,4)	two pyridine , one S
			250-380	10,0(10,2)	NO <sub>2</sub>
			380-420	6,0(6,9)	S
Cu(py2SH) <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	521,05	85(84,7)	150-240	22,0(21,3)	pyridinethiol
			240-300	8,0(8,8)	NO <sub>2</sub>
			300-450	24,0(24,3)	NO <sub>2</sub> , pyridine
			450-560	14,0(15,2)	pyridine

excellent agreement with the proposed formulae. Further support comes from the results of the thermal analysis. The major features of the thermal decomposition of these complexes are summarized in Table III. The thermogravimetric curves have not shown any initial mass losses until 130 °C i.e. no trace of solvent retention. The thermal curves indicate a four-stage thermal decomposition for all complexes. The overall mass losses in the temperature range 130-800 °C show good agreement between the theoretical and the observed mass values thus confirming the compound stoichiometries. Subsequent heating of the decomposition products produces CuO.

Further investigations on the preparation and structure of such compounds with different anion, e.g. sulfate, perchlorate, halides are in progress.

---

## Abstract

### *Copper Complexes of pyridine-2-thiol*

The reaction of  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  with pyridine-2-thiol, (py2SH), is more complicated than was previously thought, resulting in three complexes having the formulae  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_2\text{NO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_3\text{NO}_3$ , and  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_3(\text{NO}_3)_2$ . In all cases the ligand is sulfur bonded. The complexes were characterized by chemical analyses, ir and visible spectra, thermogravimetric analyses, conductivity and magnetic data.

**Key words:** Copper complexes, pyridine-2-thiol, spectra, thermogravimetric analysis, conductivity and magnetic data.

## Περίληψη

### *Σύμπλοκα του χαλκού με πυριδινό-2-θειόλη*

Η αντίδραση του  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  με την πυριδινό-2-θειόλη, Py2SH, δίνει τρία διαφορετικά σύμπλοκα με τύπους  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_2\text{NO}_3$  (A),  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_3\text{NO}_3$  (B) και  $\text{Cu}(\text{py}_2\text{SH})_3(\text{NO}_3)_2$  (C). Όλα τα σύμπλοκα έχουν χαρακτηριστεί με χημική ανάλυση, θερμοσταθμική ανάλυση και από τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα.

Τα σύμπλοκα A και B είναι κίτρινα στερεά προϊόντα του Cu(I), διαμαγνητικά. Είναι ηλεκτρολύτες του τύπου 1:1.

Το σύμπλοκο C είναι πράσινο στερεό, παραμαγνητικό με μαγνητική ροπή  $\mu_{\text{eff}} = 1,84$  B.M. Αυτή η τιμή σε συνδυασμό με το ηλεκτρονικό φάσμα που εμφανίζει μία ταινία με  $\lambda_{\text{max}}$  στα 714 nm δείχνει ότι το σύμπλοκο C πρέπει να έχει επίπεδη τετραγωνική δομή.

---

## References

1. Gilbert, J.B. and Wilkinson, G.: *J.Chem. Soc.* (A) 1749 (1969).
2. Gilbert, J.B., Rose, D. and Wilkinson, G.: *J. Chem. Soc.* (A) 2765 (1970).

3. Fletcher, S.R. and Skapski, A.C.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 635 (1972).
4. Evans, I.P., and Wilkinson, G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 946 (1974).
5. Cotton, F.A., Fanwick, P.E. and Fitch, J.W.: *Inorg. Chem.* **17**, 3254 (1978).
6. Brown, Ch. K., Georgiou, D. and Wilkinson, G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 929 (1973).
7. Kennedy, B.P. and Lever, A.B.P.: *Can. J. Chem.*, **50**, 3488 (1972).
8. Lenhart, N. and Singer, H.: *Z. Naturforsch.* **30B**, 2845 (1975).
9. Le Borgne, G. et Grandjean, D.: *J. Organom. Chem.* **92**, 381 (1975).
10. Canty, A.J. and Marker, A.: *Austr. J. Chem.* **29**, 1383 (1976).
11. Kokkou, S.C., Fortier, S., Rentzeperis, P.J. and Karagiannidis, P.: *Acta Cryst.* **C39**, 178 (1983).
12. Penfold, B.R.: *Acta Cryst.*, **6**, 707 (1953).
13. Spiner, E.: *J. Chem. Soc.*, (A) 1237 (1960).
14. Rao, C.N.R. and Venkataraghavan, P.: *Spectrochim. Acta*, **18**, 541 (1962).
15. Raper, E.S. and Brooks, J.L.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39**, 2163 (1977).
16. Singh, B., Rukhaiyar, M.M.P. and Sinha, R.J.: *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39**, 29 (1977).
17. Preti, C. and Tosi, C.: *Can. J. Chem.* **55**, 1409 (1977).
18. Bellamy, L.J.: *The Infrared spectra of complex molecules*, J. Wiley, N.Y. 1966.
19. Raper, E.S. and Crackett, P.H.: *Inorg. Chim. Acta* **50**, 159 (1981).
20. Eilbeck, W.J., Holmes, F. and Underhill, A.E.: *J. Chem. Soc.*, 757 (1967).
21. Lever, A.B.P., Mantovani, E. and Ramaswamy, B.S.: *Can. J. Chem.* **49**, 1957 (1971).
22. Curtis, N.F. and Curtis, Yv.M.: *Inorg. Chem.* **4**, 804 (1965).
23. Nakamoto, K.: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 3rd Ed., J. Wiley, N.Y. 1977.
24. Merrell, Ph. H., Alyea, E.C. and Ecott, L.: *Inorg. Chim. Acta* **59**, 25 (1982).
25. Geary, W.J.: *Coord. Chem. Rev.* **7**, 81 (1971).
26. Figgis, B.N. and Harris, C.M.: *J. Chem. Soc.*, 855 (1959).
27. Sacconi, L., Giampolini, M. and Campigli, H.: *Inorg. Chem.* **4**, 407 (1965).