

VOLUME 1
NEW SERIES

MAY - AUGUST
1972

NUMBERS 3-4

ΧΗΜΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ
CHIMIKA CHRONIKA

PUBLISHED BY
THE SCIENTIFIC COMMITTEE
OF THE GREEK CHEMISTS ASSOCIATION

ATHINAI

HELLAS

X H M I K A X P O N I K A C H I M I K A C H R O N I K A

SCIENTIFIC COMMITTEE OF THE GREEK CHEMISTS ASSOCIATION

J. KANDILIS, *President, Greek Chemists Association*

G. COUMOULOS
A. DERLERES
D. JANNAKOUDAKIS
D. KATAKIS
C. SANDRIS
D. THEODOROPOULOS
Th. TSATSAS

EDITORIAL BOARD

G. COUMOULOS, *Editor*
P. DIMOTAKIS, *Associate Editor*

Ch. JORDANIDES
G. LEFCADITIS
G. MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU
J. NIKOKAVOURAS
J. TSANGARIS

Published Bimonthly

Correspondence, submission of papers, subscriptions, renewals and changes of address should be sent to:

CHIMIKA CHRONIKA, 27, Kaningos str. Athens

Subscription rates: 300 drs per year: Hellas & Cyprus
\$15 (U.S. dollars) per year: other countries
500 drs per year for Corporations

Étude Physicochimique et
Immunologique des Liaisons de l'Acide Niflumique-¹⁴C
(acide trifluorométhyl-3-phényl-amino-2-nicotinique)
avec des Différentes Protéines

Ch. T. PLESSAS

*Laboratoire du métabolisme des médicaments, Université de Genève
Directeur Prof. B. Glasson*

(Received 4-7-72)

Dans une série d'expériences, nous avons étudié les liaisons de l'acide niflumique-¹⁴C avec des protéines dans différentes conditions expérimentales. Nous avons trouvé que l'acide niflumique se lie totalement aux protéines plasmatiques de différentes espèces. Les expériences faites *in vitro* ont montré que l'acide se lie avec la préalbumine, l'albumine, l' α_1 -lipoprotéine et l' α_2 -lipoprotéine. Nous avons trouvé que 10mg d'albumine et d' α -globulines seaturent avec 77 μ g et 85 μ g d'acide niflumique respectivement. Le pH modifie le taux de liaison. Pour un pH de 7,4 ce taux montre un maximum. La constante d'équilibre de l'acide niflumique avec l'albumine est égale à $0,65 \times 10^6$ L/Mol, tandis que le nombre maximum des sites des liaisons est de 2.

The binding of niflumic-¹⁴C acid with plasma proteins under different conditions *in vitro* was studied. It was found that the niflumic acid is completely bound with plasma proteins from different species of animals. Immunological study has shown that the niflumic acid binds with prealbumin, albumin, α_1 -lipoprotein, α_2 -lipoprotein. A 10mg quantity of albumin and α -globulin is saturated with 77 μ g and 85 μ g of niflumic acid respectively. The pH modifies the percentage of binding which is maximized at a pH of 7.4. In the case of albumin it was found that $K = 0.65 \times 10^6$ L/M and that the maximum number of the binding sites is equal to 2.

Introduction

Le rôle des protéines plasmatiques dans le transport du médicament se relève de plus en plus déterminant pour expliquer les modalités de son action. Dès lors les phénomènes de transport du médicament administré sont importante à connaître. Après résorption, les médicaments sont, en effet, transportés dans le sang sous forme libre ou liée aux protéines plasmatiques. Le complexe médicament-protéine joue un rôle dans l'activité pharmacologique du médicament, son excrétion, sa concentration dans les différents tissus, sa toxicité et influence, également, la vitesse de pénétration des médicaments à travers les membranes biologiques.

Dans ce travail nous étudions et discutons les liaisons protéiniques de l'acide niflumique (acide trifluorométhyl-3-phényl-amino-2-nicotinique). Son métabolisme a été étudié par plusieurs chercheurs chez différentes espèces animales.^{1,2}

Matériel — Méthodes — Techniques

L'acide niflumique marqué au carboxyle a été synthétisé³ à partir de l'acide nicotinique-¹⁴C. Il avait une activité spécifique de l'ordre de 16mC/mM et une pureté radiochimique supérieure à 99,9%.

L'acide niflumique non marqué nous a été fournis par les Laboratoires UPSA, Gennevillières, France.

L'albumine humaine ainsi que les α -, β -, γ -globulines (albumin human, fraction V 94%, Pentex HMO262; α -globulin human, fraction IV 95%, Pentex HM4062; β -globulin human, fraction II 95%, Pentex HM7062; γ -globulin human, fraction II 95% Pentex HM9722) étaient électrophorétiquement pures. Une dialyse préalable n'a pas modifié les résultats obtenus.

Le sang de différentes espèces animales a été prélevé par ponction cardiaque et la séparation du sérum par centrifugation. Le sérum humain nous a été fourni par la Banque de Transfusion de l'Hôpital Cantonal, Genève.

Le taux de liaison protéinique a été déterminé qualitativement et quantitativement par filtration sur gel Séphadex et par dialyse en équilibre.

Pour la filtration sur gel Séphadex, on a utilisé une colonne K 9/30 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Upsala, Suède) d'un diamètre de 0,9cm et d'une longueur de 30cm. Le volume intérieur du tube est de 19ml et la quantité approximative du Séphadex G-25 sec est de 5g. Le Séphadex était équilibré avec un tampon phosphate M/15 à pH 7,4. Ce même tampon a servi comme éluant. L'éluat était collecté par des fractions de 2ml et dans chaque fraction on a mesuré la radioactivité et le taux des protéines.

Le sac de dialyse est préparé d'une membrane Visking (Visking Dialyserschlauch Type 20/32 ex Serva) d'un diamètre de 16mm et d'une épaisseur de 0,02mm. Avant l'emploi, on lave la membrane dans une solution d'EDTA 10^{-2} à 10^{-3} M pendant une heure et ensuite on rince avec de l'eau distillée. Dans le sac, on met 1ml de sérum ou d'une solution de fractions protéiniques, 4ml de tampon et on le place dans un tube contenant 50ml de tampon. A cause d'une éventuelle prolifération de microorganismes, on travaille à 4°C. Le temps nécessaire pour l'établissement de l'équilibre est de 24 heures. Une fois l'équilibre établi, on mesure la radioactivité de deux phases en scintillation liquide.

L'influence de la concentration du médicament sur le taux de ses liaisons avec l'albumine et les α -globulines humaines a été étudié par dialyse en équilibre. Pour cela 10mg de fraction protéinique préalablement dissous dans 1ml de tampon ont été incubés pendant 4h à 37°C avec différentes quantités d'acide niflumique. Ensuite on a procédé à la dialyse.

Le calcul de la constante d'équilibre du médicament avec l'albumine humaine a été étudié en utilisant l'équation de Klotz⁴ $r/(A) = Kn - Kr$ (r : moles médicament liés/moles protéines totales, (A) : concentration du médicament non lié, n : nombre maximum des sites des liaisons) et en admettant que chaque site n'est pas influencée par l'occupation des autres sites et que chacun a la même affinité pour l'ion A. Cette équation est une droite dans le plan des axes rectangulaires $r/(A)$ et r . Par extrapolation vers l'axe $r/(A)$ on obtient la valeur de Kn et vers l'axe de r , la valeur de n .

Pour l'étude de l'influence du pH sur le taux de liaison, on a employé le tampon phosphate d'après Sörensen⁵ et le tampon borate d'après Johnson et Lindsay⁶ (acide citrique, acide borique, acide diéthylbarbiturique, potassium dihydrogenophosphate, soude caustique). La méthode employée est celle de la dialyse en équilibre dans les conditions déjà citées.

Le nombre total de protéines sériques qui se lient avec le produit, a été démontré par immunoelectrophorèse. La technique employée a été celle décrite par Scheidegger⁶ et modifiée par Plessas.⁷ 2ml d'une solution 1,5% d'agar-agar dans un tampon Veronal à pH 8,6 ont été mis sur chaque lame porte-objets (76 X 26mm). Après refroidissement de la gélose, on fait une fente et deux trous. Dans chaque trou on met 1 μ l de sérum. L'intensité du courant est de 3,5mA par lame. 2 heures sont nécessaires pour une migration électrophorétique sur une longueur de 6cm. Une fois l'électrophorèse terminée, on verse dans la fente 0,03ml d'antisérum et on place les lames en chambre humide. Après une diffusion d'antisérum de 12 à 24 heures, on rince les lames et ensuite on les sèche. La coloration des lames a été faite dans une solution d'Amidoschwarz B.

L'autoradiographie des lames électrophorétiques a été effectuée avec des films «Kodak» Kodirex, dans des conditions décrites par le fabricant. Le temps d'exposition varie entre 2 et 6 semaines.

La radioactivité a été mesurée par scintillation liquide (Beckman LS 200B), avec le mélange scintillant: ESLA (80g naphtalène, 4g PPO, 50mg POPOP dans 1 litre de xylène-dioxane-éthanol V/V/V 5/5/3).

Le taux de protéines a été mesuré par la méthode de Biuret.

Résultats

1. Taux de liaison *in vitro*

Nous avons incubé des quantités croissantes d'acide niflumique avec du plasma de différentes espèces animales. Après incubation (4h à 37°C) 1ml du produit a été mis sur une colonne Séphadex et des fractions de 2ml ont été recueillies. Dans chaque fraction nous avons mesuré la radioactivité et le taux de protéines. Le tableau No. 1 donne ces résultats. Nous constatons que:

a) La quasi-totalité de l'acide niflumique est liée aux protéines plasmatiques, sauf lors des incubations avec 500 et 1000 μ g d'acide, conditions dans lesquelles le seuil de saturation est atteint; ce dernier se situe aux environs de 200 μ g d'acide niflumique. Ce taux a été obtenu pour un plasma de rat d'une concentration en protéines de l'ordre de 4g%.

b) L'origine du plasma ne joue pas de rôle sur le degré de liaison.

Tableau I. — Taux de liaison *in vitro* de l'acide niflumique-¹⁴C

Espèce	Taux de protéines g%	Acide niflumique incubé A μ g	Acide niflumique lié B μ g	B/A %
Rat	5,8	16	15,2	94,9
Rat	5,8	24	23	95,4
Rat	4,0	518	195	37,6
Rat	4,0	1018	220	21,6
Plasma	6,3	69	67	97,6
humain	6,3	119	116	97,7
	6,3	219	214	97,6
Lapin		26	25,5	98
Cobay		26	25,5	98
Versatol	6,9	9	8,6	95,2

2. Liaisons de l'acide niflumique avec l'albumine humaine

On a mesuré l'influence de la concentration de l'acide niflumique, du pH et de la nature du tampon sur le degré de liaison. Ces mesures permettent de calculer le nombre maximum de sites des liaisons ainsi que la constante d'équilibre. La figure No. 1 et le tableau No. II montrent l'influence de la concentration de l'acide sur le taux de liaison. Nous constatons que la quantité d'acide liée augmente avec la quantité mise en incubation jusqu'à la saturation qui se situe vers 80 μ g d'acide pour 10mg d'albumine.

Tableau II — Concentration de l'acide niflumique lié, incubé, non lié par rapport à l'albumine humaine (10mg) et valeurs de (A), de r et de r/(A)

Acide niflumique incubé μ g	Acide niflumique lié μ g	(A) $\times 10^{-6}$ Mol/L	r	r/(A) $\times 10^6$ L/Mol
20	14,8	0,33	0,36	1,09
45	30,8	0,91	0,75	0,82
60,3	37,2	1,49	0,91	0,61
85	49,8	2,27	1,22	0,54
110,3	60,2	3,23	1,47	0,46
165	63,1	6,56	1,54	0,23
205	74	8,44	1,81	0,21
310,3	77,2	15,02	1,89	0,13

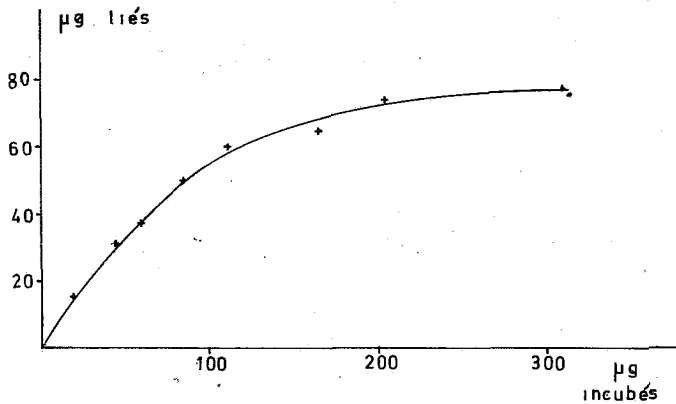


Fig. 1: Relation entre l'acide niflumique lié et incubé Tampon phosphate à pH 7,4. Albumine humaine: 10mg. Incubation: 4 h à 37°C. Dialyse en équilibre: 24 h.

A partir des résultats du tableau No. II, on établit la relation entre r et $r/(A)$ (figure No. 2). Par extrapolation, on a calculé que $n=2$, $Kn=1,29 \times 10^6$ d'où $K=0,65 \times 10^6$ L/Mol.

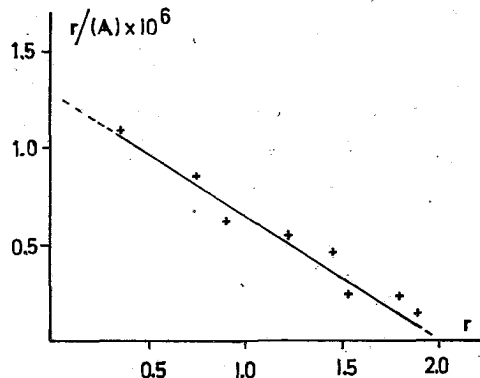


Fig. 2: Relation entre r et $r/(A)$

L'étude de l'influence du pH et de la nature du tampon sur le degré de liaison a démontré une grande variation du taux avec un maximum pour un pH de 7,4 (fig. No. 3). Les deux courbes obtenues sont semblables tant dans leur forme que dans leurs taux de liaison. La nature des tampons employés ne joue pas un grand rôle en ce qui concerne le taux de liaison.

3. Liaisons de l'acide niflumique avec les α -globulines

On a étudié l'influence de la concentration de l'acide et du pH sur le degré de liaison. Les conditions étaient les mêmes que dans le cas de l'albumine. La figure No. 4 donne la relation entre acide niflumique lié et incubé, tandis que la figure No. 5 l'influence du pH sur le degré de liaison.

Nous constatons que la quantité d'acide liée augmente avec la quantité mise en incubation. La saturation de 10mg d' α -globulines se situe aux environs de 85µg d'acide niflumique, et que l'influence du pH sur le taux de liaison est moins nette avec, également, un maximum à pH 7,4.

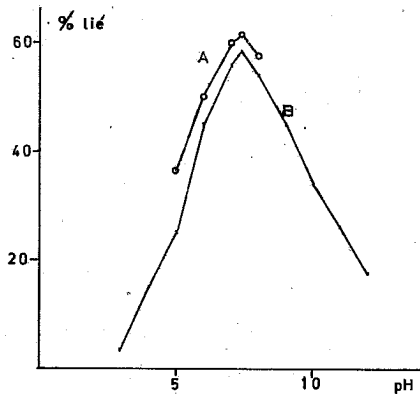


Fig. 3: Variation du degré de liaison en fonction du pH.
A. Tampon phosphate, B. Tampon borate.
Albumine 10 mg, Acide niflumique: 55 μ g.
Dialyse en équilibre: 24 h.
Incubation: 4 h. à 37°C.

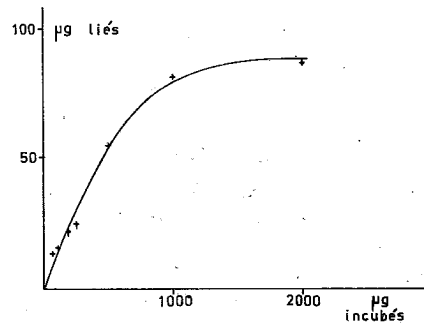


Fig. 4: Relation entre l'acide niflumique lié et incubé.
Tampon phosphate à pH 7,4.
 α -globulines: 10 mg.
Incubation: 4 h. à 37°C.
Dialyse en équilibre: 24 h.

4. Liaisons de l'acide niflumique avec les θ - et γ -globulines

Dans le cas des θ - et γ -globulines, le taux de liaison est de l'ordre de 2% pour les θ -globulines et de l'ordre de 0,5% pour les γ -globulines.

Ces faibles taux indiquent que ces deux fractions ne se lient pas avec l'acide niflumique.

5. Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse suivie d'autoradiographie (fig. No. 6) a démontré que l'acide niflumique se lie avec la préalbumine, l'albumine et les α_1 - et α_2 -lipoprotéines.

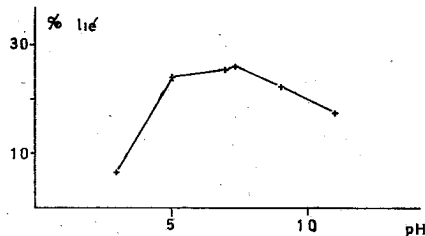


Fig. 5: Influence du pH sur le taux de liaison
Tampon borate. α -globulines: 10 mg.
Acide niflumique: 55 μ g.
Dialyse en équilibre: 24 h.

Discussion

Dans nos expériences, soit avec du plasma, soit avec des fractions protéiniques nous avons maintenu la concentration constante en protéine et fait varier la concentra-

tion de l'acide niflumique. Nous avons constaté que le taux de liaison diminue lorsque la concentration en acide augmente. La quantité de l'acide liée augmente jusqu'à l'atteinte d'un seuil de saturation. Davison et Smith⁹ ont constaté avec les salicylates cette diminution du degré de liaison avec l'augmentation de la concentration.

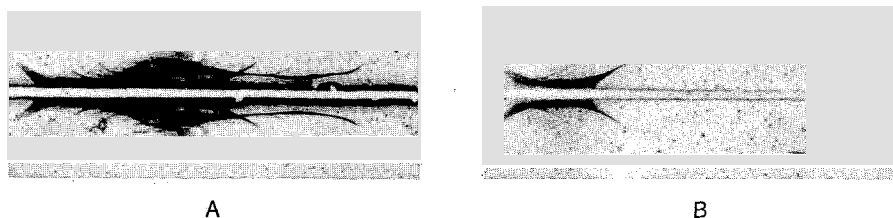


Fig. 6: Immunoélectrophorèse (A) suivie d'auto-radiographie (B) de sérum humain préalablement incubé avec de l'acide niflumique-¹⁴C.

En général, le seuil de saturation est difficilement atteint, même si nous employons un large éventail de concentrations. L'apparition d'un plateau est déjà signalée dans la bibliographie^{9,10} pour d'autres produits.

Pour l'expression et le calcul par extrapolation de K et n, nous avons choisi comme axes $r/(A)$ et r au lieu de $1/r$ et $1/(A)$; dans ce dernier cas, une légère erreur de $1/n$ pendant l'extrapolation donne une grande variation dans l'estimation de n.

Dans le cas de l'acide niflumique, la fonction $r/(A) = f(r)$ est linéaire. Pour les salicylates et leurs dérivés, les courbes montrent l'existence de deux sites des liaisons avec deux types d'interaction médicament-protéines.

Dans nos expériences avec un tampon borate, nous constatons une variation du taux de liaison, et un maximum pour un pH de 7,4. A pH 3, ce taux est très bas: 6,5% et à pH 12:18%. L'influence du pH sur le degré de liaison n'est pas toujours la même. Dans le cas des ions chlorures (Carr¹¹), l'augmentation du pH provoque une diminution du degré de liaison, fait qui est le plus fréquent et qui s'explique par l'accentuation du caractère cationique de la protéine dans des conditions de pH de plus en plus acide. Nous rencontrons également cette augmentation du taux de liaison entre un pH de 6,4 et 7,6, comme dans nos expériences, dans le cas de liaisons avec d'autres anions¹² (methylorange). La même influence du pH se trouve chez les sulfonamides.¹³ Nous pouvons en donner une explication: ces produits sont des électrolytes relativement faibles, et quand le pH augmente, il se produit une augmentation de la concentration de la forme anionique. Les observations faites d'autre part sur les changements de structure des protéines ont démontré l'apparition d'autres groupes lorsque la valeur du pH est proche de 7. L'apparition de nouveaux groupes et l'augmentation de la concentration de la forme anionique de l'acide peut donner l'explication du maximum du degré de la liaison à pH 7,4. En ce qui concerne la nature du tampon, nous constatons que le degré ne change pas dans les tampons employés, borate et phosphate, qui sont d'ailleurs avec le tampon glycinate, les tampons le moins interférant dans les liaisons protéiniques des ions.

L'influence du pH sur le degré de liaison des α -globulines est moins nette que dans le cas de l'albumine. Nous constatons également un maximum à pH 7,4.

L'immunoélectrophorèse a démontré que l'acide niflumique se lie avec la préalbumine (albumine riche en tryptophane), l'albumine, l' α_1 -lipoprotéine et l' α_2 -lipoprotéine. Clausen,¹⁴ à l'aide de l'immunoélectrophorèse, trouve que la Lederkyn se lie à la préalbumine, à l'albumine, à l' α -glycoprotéine et à l' α_2 -macroglobuline, tandis que Benakis et al.¹⁵ trouvent que le doxium se lie avec 9 protéines.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Φυσικοχημική και ανοσολογική μελέτη τῆς συνδέσεως τοῦ νιφλιμικοῦ ὀξέος μετὰ διαφόρων πρωτεϊνῶν

Εἰς σειρὰν πειραμάτων *in vitro* ἐμελετήθη ἡ σύνδεσις τοῦ νιφλιμικοῦ ὀξέος, ἐπισημανθέντος διὰ ^{14}C εἰς τὸ καρβοξύλιον, μὲ διαφόρους πρωτεΐνας. Εὐρέθη ὅτι τὸ νιφλιμικὸν ὀξύ ἐνοῦται πλήρως μετὰ τῶν πρωτεϊνῶν τοῦ πλάσματος διαφόρων εἰδῶν ζῶων. Ἀνοσολογικὴ μελέτη ἔδειξεν ὅτι τὸ νιφλιμικὸν ὀξύ ἐνοῦται μετὰ τῆς προαλβουμίνης, τῆς ἀλβουμίνης, τῆς α₁-λιποπρωτεΐνης καὶ τῆς α₂-λιποπρωτεΐνης. Ποσότητες 10 mg ἀλβουμίνης καὶ α-σφαιρινῶν κορέννυνται μετὰ 77μg καὶ 85μg ἀντιστοιχῶς νιφλιμικοῦ ὀξέος. Τὸ pH μεταβάλλει τὸ ποσοστὸν συνδέσεως καὶ τοῦτο λαμβάνει μεγίστην τιμὴν εἰς pH 7.4. Ἡ σταθερὰ χημικῆς ἰσορροπίας τοῦ νιφλιμικοῦ ὀξέος μετὰ τῆς ἀλβουμίνης εὐρέθη ἴση πρὸς $0,65 \times 10^6$ L/M, ἐνῶ ὁ μέγιστος ἀριθμὸς θέσεων συνδέσεως εὐρέθη ἴσος πρὸς 2.

Bibliographie

1. A. Benakis, M. Strolin, B. Glasson, *11ème Congrès International de Chimie Pharmaceutique, Münster* (1968).
2. J.R. Boissier, J. Fichelle-Pagny, Z. Horakowa, *Thérapie XXII*, 157 (1967).
3. C. Colombini, G. Deganello, A. Benakis, M. Strolin, *Helv. Chim. Acta* **52**, 312 (1969).
4. I.M. Klotz, *The proteins. 1st. ed. Vol. I Part B p. 727*, Academic Press, N.Y. (1954).
5. Johnson and Lindsay, *Analyst*, **64**, 490 (1939).
6. J.J. Scheidegger, *Int. Archs Allergy* **7**, 103 (1955).
7. C.T. Plessas, *Thèse No. 1490*, Université de Genève (1969).
8. C. Davison, P. Smith, *J. Pharmac. Exptl. Therap.* **133**, 161 (1961).
9. H. Fraenkel-Conrat, M. Cooper, *J. Biol. Chem.* **154**, 239 (1944).
10. G.E. Perlmann, *J. Biol. Chem.* **137**, 707 (1941).
11. C.W. Carr, *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 549 (1953).
12. F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1246 (1951).
13. B.D. Davis, *J. Clin. Invest.* **22**, 753 (1943).
14. J. Clausen, *J. Pharmac. Exptl. Therap.* **153**, 167 (1966).
15. A. Benakis, A. Millot, C.T. Plessas, B. Glasson, *XIe Congrès International de Thérapeutique, Barcelone* (1971).

Halogen Ring Monosubstituted Benzoic Acid Hydrazides as Ligands-I Preparation and Interpretation of Infra-red Spectra

G.E. MANOUSSAKIS, D.A. HARISTOS and C.E. YOURI
Laboratory of Inorganic Chemistry, University of Thessaloniki, Greece

(Received 5-7-72)

Ortho-, meta- and para-halogen (F-, Cl-, Br- and I-) monosubstituted benzoic acid hydrazides were prepared and studied. The discussion of the i.r. spectra leads to the conclusion that the influence of halogen atoms on the donor properties of hydrazides are not significant but they favour additional possibilities for intra- and inter-molecular hydrogen bonding.

Introduction

It is known that the coordination ability of hydrazides and therefore the formation of coordination compounds with metals depends on the donor properties of the hydrazides. For this purpose, in recent years, considerable interest has been paid in the relative donor properties of oxygen and nitrogen atoms of simple benzoic acid hydrazides or their ring substituted products^{1,2}. The donor properties of ring substituted benzoic acid hydrazides should depend on the nature and the position of the substituents.

The halogen ring substituted products are more interesting because of the strong -I inductive effect which is induced by the halogen atoms. From this point of view it seems to be worth the contribution of this paper which deals with the preparation and study of twelve halogen ring monosubstituted benzoic acid hydrazides (HBAH) namely: Fluoro-, chloro-, bromo- and iodo- derivatives in ortho-, meta- and para-position. The prepared HBAH are to be used as ligands for the formation of a series of new coordination compounds as well as for the investigation of the mechanism of some important inorganic redox reactions.

As far as we know systematic work on i.r. spectral data of hydrazides has been done by Prevorsek³ on some aliphatic and aromatic hydrazides of carboxylic acids, by Arnold and Schiele⁴ on ring substituted benzoic acid hydrazides with p-NO₂, 3,4-OCH₂O-, o-OCH₃, p-OH and p-NH₂ substituents. Also Titov et al^{5,6} examined the i.r. spectra and reactivity of 18 aliphatic and aromatic hydrazides, among them the m-Cl, p-Cl and p-Br derivatives. Therefore the investigation of the i.r. spectra of the prepared HBAH seems to be useful.

Experimental

Measurements. The i.r. spectra (KBr discs) were recorded on a Perkin-Elmer Infrared spectrophotometer 257. The MW determination was carried on a Perkin-Elmer Molecular weight apparatus model 115, osmometrically.

Preparation. The reagents employed in the preparation were analytical grade and used without further purification.

The preparation of halogen ring mono substituted benzoic acid hydrazides were carried out according to the following general method.

In a 250 ml round bottomed flask, equipped with a reflux condenser, the corresponding benzoic acid (≈ 30 mmoles) was mixed with absolute ethyl alcohol (≈ 1000 mmoles) and 2 ml sulfuric acid 95%.¹⁴ The mixture was refluxed for a certain period of time about 18, 14 and 8 hours for o-, m- and p- substituted products respectively. The produced ethyl ester was separated as an oil by addition of a sufficient quantity of water to obtain full separation.

Diethylether was used further for extraction. The ester produced was obtained by distillation and was further diluted with 50 ml absolute ethyl alcohol. In this solution ≈ 7 ml (≈ 150 mmoles) hydrazine hydrate, $H_2NNH_2 \cdot H_2O$, (100%) were added and the mixture was refluxed for 5-7 hours. The solution was condensed and cooled; after recrystallisation from hot water, needle-like white crystals of hydrazides were obtained.

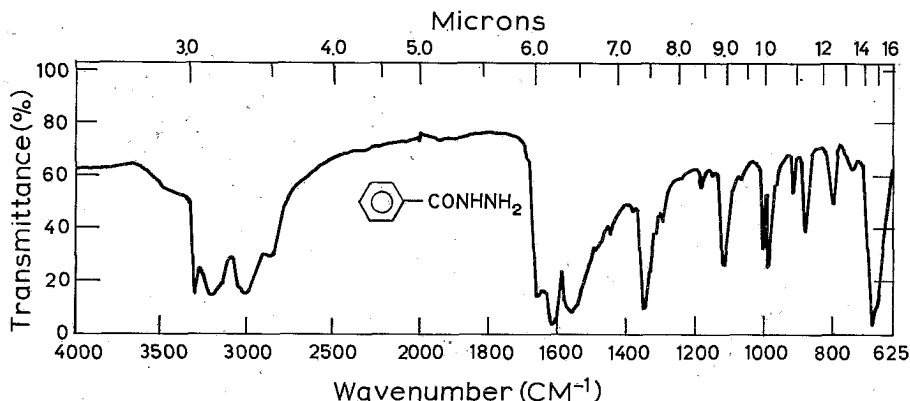
The yields and analytical results of the obtained hydrazides are tabulated in Table 1.

Discussion

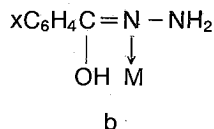
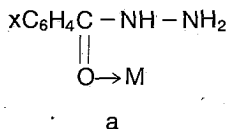
From the prepared twelve HBAH the ortho-, meta- and para-, fluoro and iodo compounds are new. The rest of them are known compounds prepared by several authors, namely: o-Br (7a), m-Br (7b), p-Br (7c), o-Cl (7d), m-Cl (7e) and p-Cl (7f).

The process of preparation in this work for the known and new derivatives is an improved method in comparison to those described by the above mentioned authors. The method used is generally applicable at least for HBAH.

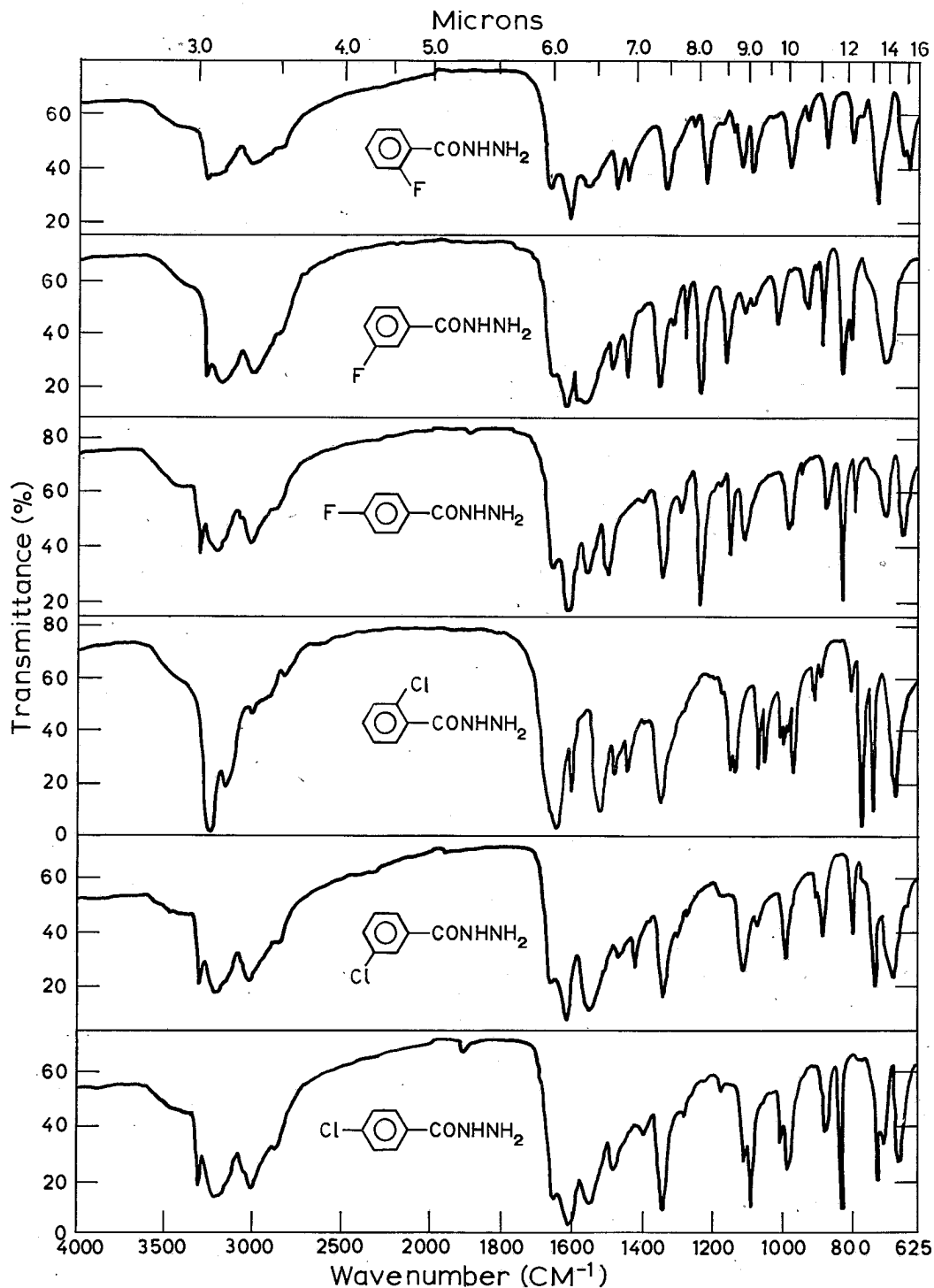
The compounds produced were identified by elemental analysis and their i.r. spectra. The yield (Table 1) increases according to series ortho-, meta-, para-. The very low yield of o-I derivative may be due to a steric effect.

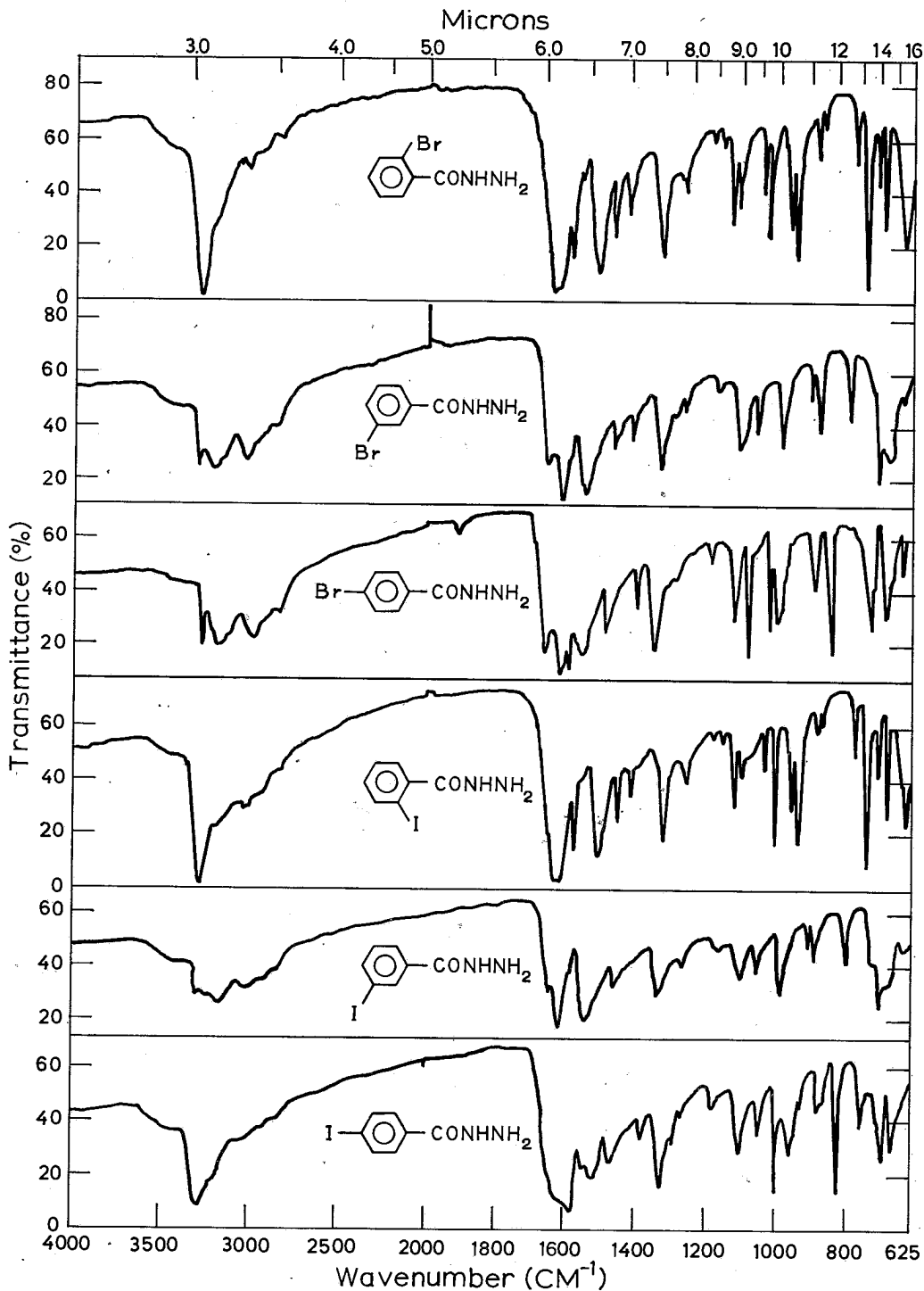


Taking into consideration that coordination of hydrazides should occur through one of the structures (a) or (b), it is obvious that



the ionic character of C-O bond which is associated with the position of C=O band in the i.r. spectrum, will be very interesting. The position of the carbonyl band (Amide I)⁸ depends upon the electron withdrawing ability of the halogen atom and the degree of hydrogen bonding.

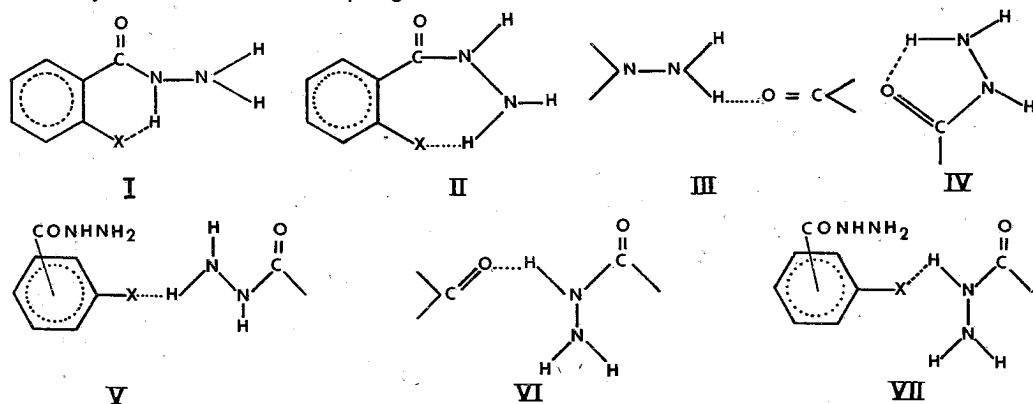




Two bands of different strength, which should be assigned to C=O bond vibration, appeared in the 1610-1670 cm^{-1} region. This is in agreement with Paul et al.¹ The carbonyl frequencies in the i.r. spectra of the studied compounds should be higher than those of the parent hydrazide and the shifts should be associated to the dipole moment of the C-X bond.^{8,9} but the $\nu(\text{C}=\text{O})$ in the spectra of HBAH remain almost stationary.

Except of Amide I bands a coupling of vibration $\delta(\text{N-H})$ and $\nu(\text{C-N})$ produces two clusters of bands which are characterized as Amide II and Amide III bands.⁹ The Amide II bands are displayed around 1550 cm^{-1} and Amide III observed in the 1320-1350 cm^{-1} region. This is in agreement with other authors' research on certain ring substituted benzoic acid hydrazides.^{3,10,11,12} The position of the Amide II and III bands in the spectra of the examined HBAH remain almost unchanged. The interpretation of bands around 1500-1650 cm^{-1} should be done very carefully, because the substituted aromatic ring⁴ also absorbs in this region.

The infrared spectra of HBAH in the 3200-3310 cm^{-1} region show generally a sharp band at 3300 cm^{-1} and a second broad one at 3200 cm^{-1} . The first of them is assigned to asymmetric N-H vibration, $\nu_{as}(\text{NH}_2)$, and the second one to symmetric, $\nu_s(\text{NH}_2)$ vibration. The band which is assigned to $\nu_s(\text{NH}_2)$ vibration is gradually weakened from fluoro to iodo hydrazides in the spectra of all o-derivatives. This may be possibly assigned to a steric effect. Also in o-derivatives the band in the 2800-3000 cm^{-1} region, which is due to N-H bond vibration of amide group, gradually becomes weaker from F to I derivatives. Possibly this is due to the coupling of structure I.



The band corresponding to $\delta(\text{NH}_2)$ which should have appeared in this region is usually less strong.³

The existence of hydrogen bonds in hydrazides but not in halogen derivatives, has been shown by other authors either by deuteration of the amino group hydrogen or by application of the equation:

$$\nu_s = 345,5 + 0,876 \nu_{as}$$

Table 1. — Analytical data for the prepared new benzoic acid hydrazides

Hydrazides (%)	Yield (%)	m.p. (°C)	% C		% H		% N		Mol. Calcd.	Weight Found
			Calcd.	Found	Calcd.	Found	Calcd.	Found		
o-FBAH	14	72-73	54.54	54.82	4.54	4.93	18.18	18.41	154.1	154.6
m-FBAH	18	138.5-139	54.54	54.24	4.54	4.32	18.18	18.65	154.1	154.6
p-FBAH	20	159.5-161	54.54	54.71	4.54	4.73	18.18	18.04	154.1	168.7
o-IBA	6	194-195	32.06	31.33	2.67	2.74	10.68	10.44	262.1	240.1
m-IBA	36	145-146	32.06	31.72	2.67	2.75	10.68	10.70	262.1	270.8
p-IBA	42	164-165	32.06	29.72	2.67	2.72	10.68	10.02	262.1	278.6

which has been suggested by Belammy and Williams.¹³ This equation is valid with an average of $\pm 4.8 \text{ cm}^{-1}$ in aminocompounds with no hydrogen bond. Application of this equation in our results gave a difference of $\pm 30 \text{ cm}^{-1}$, which gives evidence of the existence of hydrogen bonds. The obtained data concerning the series of o-, m- and p- derivatives are not regular. The obtained results and the data of literature lead to the conclusion that the equation suggested by Belammy and Williams for aminocompounds is not applicable in the case of hydrazides.

In the examined HBAH the form of hydrogen bonding which may be responsible for the weakening of $\nu_{\text{S}}(\text{NH}_2)$ band is shown in structures I, II, III and IV

In addition to the above mentioned coupling some more hydrogen bonds are possibly formed according to the structures V-VII. Structures V and VII are more pronounced in the case of p-derivatives. This phenomenon is confirmed as well, by the obtained higher molecular weight values for all p-derivatives (fluoro-, chloro-, bromo- and iodo-).

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Άλογονομένα μονοπαράγωγα του υδραζιδίου του βενζοϊκού οξέος ως ligands

Παρασκευή των υδραζιδίων και έρμηνεία των φασμάτων υπερύθρου αυτών

Η παρούσα έργασία άφορά εις την παρασκευήν και μελέτην των όρθο- μετα- και παρα-άλογονομένων (F, Cl, Br και I) μονοπαραγώγων του υδραζιδίου του βενζοϊκού οξέος.

Σκοπός τής μελέτης των παρασκευασθέντων υδραζιδίων είναι ή χρησιμοποίησις αυτών ως ligands δια τον σχηματισμόν συμπλόκων καθώς και ή διερεύνησις ώρισμένων άνοργάνων συστημάτων οξειδοαναγωγής.

Μελετάται, δια φασμάτων i.r., ή επίδρασις του -I έπαγωγικού φαινομένου (λόγω τής παρουσίας του άλογόνου) επί τής πολικότητας των δεσμών και κατ' έπέκτασιν ή ικανότης των υδραζιδίων προς συναρμογήν, δεδομένου ότι δύνανται να δράσουν ως ligands δια των δομών (a), ή (b). Το συμπέρασμα έκ τής μελέτης αυτής είναι ότι ή παρουσία των άλογόνων ως ύποκαταστατών δέν επηρεάζει σημαντικώς τήν δράσιν των υδραζιδίων ως δοτών εύνοει όμως τήν δημιουργίαν προσθέτων δεσμών ύδρογόνου.

Έκ τής θέσεως, εις τα φάσματα i.r., των πλέον χαρακτηριστικων ζωνων άπορροφήσεως ήτοι: $\nu_{\text{AS}}(\text{NH}_2)$, $\nu_{\text{S}}(\text{NH}_2)$, Amide I, II και III καθώς επίσης και δι' έφαρμογής τής σχέσεως των Bellamy και Williams δεικνύεται ή ύπαρξις ενδο- και διαμοριακών δεσμών ύδρογόνου (δομαι I-VII).

Η μη κανονική εμφάνισις ώρισμένων ζωνων άπορροφήσεως, εις μερικας περιπτώσεις έρμηνεύεται είτε δια τής στερεοχημικής παρεμποδίσεως είτε δια τής δημιουργίας δεσμών ύδρογόνου.

Bibliography

1. R. Paul and S. Chadha, *Spectrochim. Acta* **23A**, 1249 (1967).
2. A. Ahmed and N. Chaudhyri, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **33**, 189 (1971).
3. D. Prevorsek, *Bull. Soc. Chim. France* 795 (1958).
4. G. Arnold and C. Schiele, *Z. Naturforschg.* **23b**, 1192 (1968).
5. E. Titov, A. Grekov, V. Rybachenko and V. Shevchenko, *Teor. Exsp. Khim.* **4** (6), 742 (1968).
6. E. Titov, N. Korzhenevskaya, V. Rybachenko, *Ukr. Khim Zh.* **34** (12), 1253 (1968).
7. Beilstein **9**: (a) 349; (b) 351; (c) 354; (d) II 223; (e) 339; (f) 341.
8. T. Miyazawa, T. Shimanouchi and S. Mizushima, *J. Chem. Phys.* **24**, 408 (1956).
- 8a. N. Alexandrou and G. Vasilikiotis, *Spectrochim. Acta* **23A**, 677 (1966).
9. P. Frazer and W. Price, *Nature* **170**, 490 (1952).
10. M. Machima, *Bull. Chem. Soc. Japan* **35**, 1882 (1962).
11. M. Machima, *Bull. Chem. Soc. Japan* **35**, 2020 (1962).
12. J. Jensen, *Acta Chem. Scand.* **10**, 667 (1956).
13. L. Bellamy and R. Williams, *Spectrochim. Acta* **9**, 341 (1957).
14. L. Vanino, "*Handbuch der präparativen Chemie*" Dritte, Neubearbeitete auflage s. 571 Verlag von Ferdinand, Stuttgart 1937.

Synthesis and Facile Ring-opening of 5, 6-Dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one and its Quaternary Halide*

G. TSATSAS and E. COSTAKIS**

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, University of Athens,
Athens, Greece

(Received 6-7-72)

The synthesis of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one (3) from the 1, 2, 3, 4-tetrahydro-2-oxopyrimido [2, 1-b] thiazol-5-ium chloride (2), and the observed facile ring-opening reaction which occurs when 2 and 3 are treated with amines or alcohols to form amides or esters (6-10) has been reported. The unusual ease of the ring-opening of 2 and 3 is discussed.

Introduction

The synthesis of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one (3) by reaction of 2-aminothiazole with ethyl acrylate has been reported.¹ We wish to report a new procedure for the synthesis of this dihydro-derivative (3) from the corresponding quaternary halide (2), which can be readily prepared by fusion of 2-(3-chloropropionyl) aminothiazole (1).² We also describe here the details of the synthesis and spectral characteristics of the quaternary halide (2) and dihydro-derivative (3) and the observed facile ring-opening which occurs when (2) and (3) are treated with amines or alcohols.

Treatment of 1, 2, 3, 4-tetrahydro-2-oxopyrimido [2, 1-b] thiazol-5-ium chloride (2) with equimolar KBH_4 in refluxing methanol, resulted in the isolation of a halogen-free compound. The spectra (nmr, ir and uv) and the elementary analysis confirm the proposed structure (3). Sample of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one was prepared for comparison by a previously published method.¹

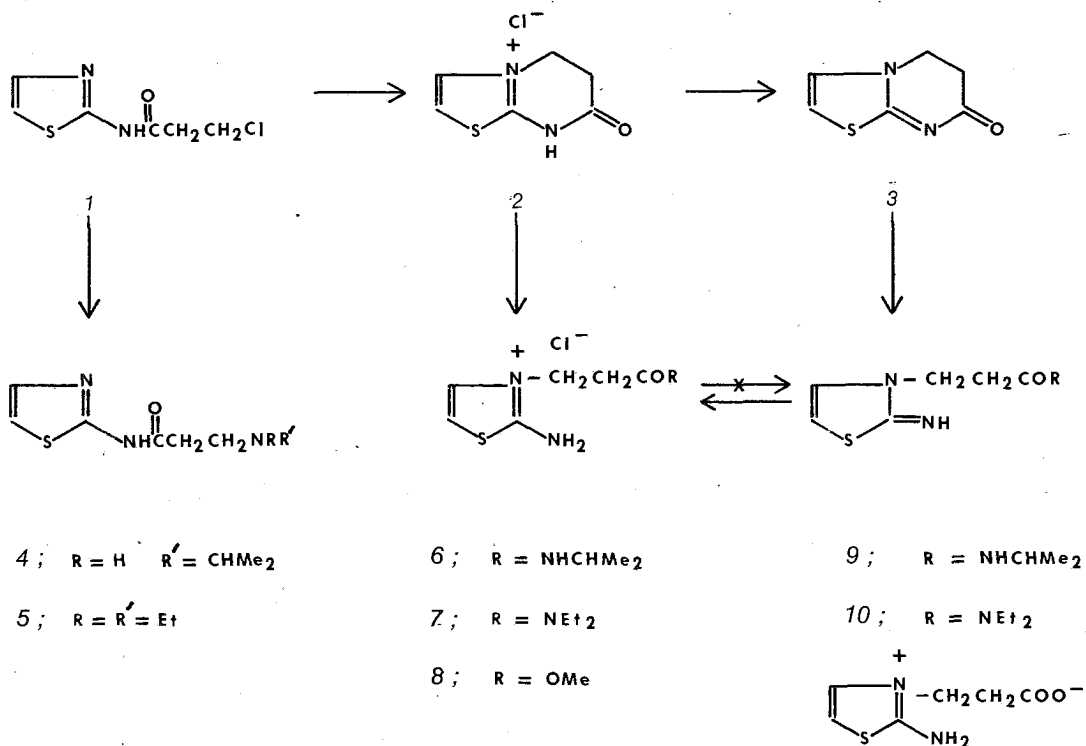
Treatment of quaternary halide (2) with iso-propylamine under experimental conditions, gave a crystalline product the elementary analysis of which confirms the formula $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$. The ^1H nmr spectrum was consistent with the structure 6: δ (DMSO - d_6) 1.00(6H,d, - CHMe_2), 2.57(2H,t, - CH_2CO -), 3.78(1H,m, - NHCHMe_2), 4.32(2H,t, = NCH_2 -), 6.96 and 7.30 (both 1H,d, thiazole protons), 8.20 (1H,d, - CONHCHMe_2), 10.02(2H,s, - NH_2).

Addition of deuterium oxide resulted in the slow disappearance of the doublet centred at δ 3.78 ppm, and the immediate disappearance of the singlet at δ 10.02 ppm. Attempts to isolate the free base 10 from this salt were unsuccessful. A similar reaction between 2 and diethylamine gave compound 7. Heating 2 in methanol gave the ester 8. Analogous reactions have been reported previously for benzothiazolium analog.³ Refluxing of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one with 80% iso-propylamine led to a semi-solid product for which t.l.c. analysis showed to be a binary mixture. Treatment of this

* This investigation was supported by a research grant of NATO (SA.5.2. 05b.[507/500]).

** Thanks are due to Mr. M. Kazanis for his experimental assistance.

mixture with ether, resulted in the isolation of the free base 9 as main component and the amino acid 11 as minor component. The structural assignments are based on the nmr spectral data. The nmr spectrum of 9 exhibited at δ (CCl_4) 1.10 (6H, d, $-\text{CHMe}_2$), 2.50 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.95 (3H, m, $=\text{NCH}_2-$, $-\text{CHMe}_2$), 5.75 and 6.52 (both 1H, d, thiazoline protons), 6.26 (1H, broad, $=\text{NH}$), 6.98 (1H, d, $-\text{CONHCHMe}_2$). The spectrum in deuterium oxide exhibited a similar pattern (with little differences due to solvent effects) for two thiazoline ring protons, typical two-triplet A_2X_2 system, and isopropyl protons, with disappearance of the signal at δ 6.26 and 6.98 ppm. We could readily convert 9 into 6 with saturated anhydrous hydrogen chloride in ether.

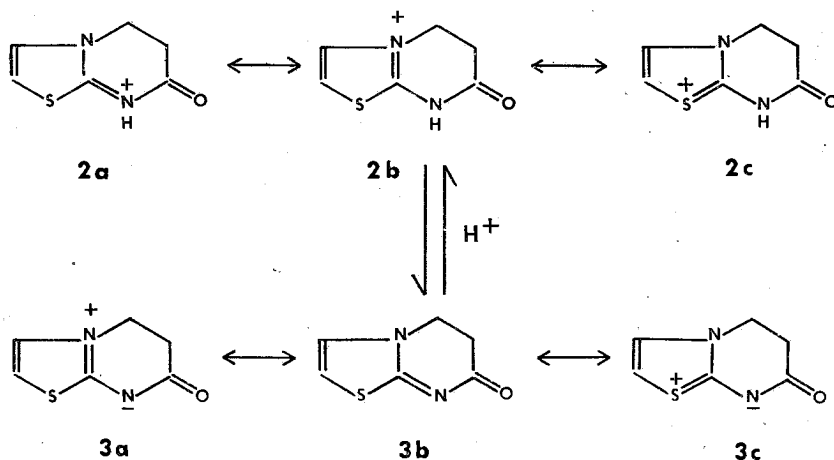


The structure of 11 was assigned in the light of the spectra of the corresponding protonated derivatives (6-8). The nmr spectrum in deuterium oxide revealed the presence, for ring protons, a thiazole pattern (δ 6.82 and 7.16 ppm, both 1H, d). Hurd and Hayao¹ prepared this compound (11) by reaction of 2-aminothiazole either with propionolactone or 3-bromopropionic acid, and assigned the same structure by uv spectra.

A similar reaction between 3 and diethylamine gave the corresponding thiazole derivatives 10 and 11.

The precursor haloamide (1), by treating with iso-propylamine or diethylamine in refluxing ethanol, led exclusively to the corresponding 2-(3-alkylaminopropionyl) aminothiazoles (4 and 5), which the spectra (see Experimental section) are useful in distinguishing between the structures of 2- and 3-derivatives of 2-aminothiazole.

The unusual ease of the ring opening of the quaternary halide (2) and dihydro-derivative (3) under such mild hydrolytic conditions can be explained through the resonance forms a, b and c.



A resonance form having the positive charge on the amide nitrogen, would result in the amide carbonyl being more electrophilic, facilitating hydrolysis.³

Experimental

Melting points were determined in a Büchi capillary melting point apparatus and are uncorrected. Nmr spectra were determined on a Varian Associates A-60 instrument using TMS as internal or external standard. Ir spectra were recorded on a Perkin-Elmer Model 521 Spectrophotometer, and uv spectra in 1-cm solution cells on a Beckmann DK-1 spectrophotometer. Thin layer chromatography (tlc) was performed on silica gel plates using CHCl₃ as eluent, and iodine vapor as the visual aid.

2-(3-Chloropropionyl)aminothiazole (1). A solution of 3-chloropropionyl chloride (14g, 0.11 mole) in 25ml of anhydrous ether was added dropwise with vigorous stirring to a mixture of 10g (0.10mole) of 2-aminothiazole in 100ml CHCl₃ and 11.7g (0.11mole) of sodium carbonate in 75ml of water. Stirring was continued 30min after completion of the addition. The solid was removed by filtration and washed with water. Recrystallization from ethanol to give 15.2g (80%) of the product. mp. (partial) 175-176°, resolidification and decomposition 265° (lit.² yield 35%, mp 176-177°); uv λ_{\max} (ethanol) 271m μ (ϵ 9100); ir (KBr) 1682cm⁻¹ (amide I band); nmr δ (DMSO-d₆) 2.95 (2H, t, -COCH₂-), 3.88 (2H, t, -CH₂Cl), 7.12 and 7.42 (both 1H, d, thiazole protons), 9.66 (1H, broad, -NHCO-).

Anal. Calcd. for C₆H₇ClN₂OS: C, 37.80; H, 3.70; N, 14.70.

Found: C, 37.68; H, 3.54; N, 14.72.

1, 2, 3, 4-Tetrahydro-2-oxypyrimido [2, 1-b] thiazol-5-ium chloride (2), was prepared from *2-(3-chloropropionyl) aminothiazole (1)*, using conditions similar to those of Werbel and Battaglia² Mp 285-287° (dec), (lit.^{1,2} mp 280° and 279-282); uv λ_{\max} (water) 299m μ (ϵ 12580); ir (KBr) 1710cm⁻¹ (amide I band); nmr δ (D₂O), 3.20 (2H, t, -COCH₂-), 4.72 (2H, t, -NCH₂-), 7.58 and 7.76 (both 1H, d; thiazole protons).

Anal. Calcd. for C₆H₇ClN₂OS: C, 37.80; H, 3.70; N, 14.70.

Found: C, 37.71; H, 3.49; N, 14.58.

5, 6-Dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one (3). To a stirred suspension of the quaternary halid (2) (19g, 0.1mole) in 250ml methanol was added KBH₄ (5.4g, 0.1mole) in small portions at room temperature. The mixture was refluxed with stirring 2hrs, after completion of the addition. After cooling, 25ml of water was added and the mixture was evaporated under reduced pressure at a bath temperature not higher than 40°. The residue was taken up in chloroform, decolorized with charcoal, and filtered. The chloroform solution upon concentration under reduced pressure afforded 11.2g (\approx 73%) of the product, mp 200-205°. The analytical sample was recrystallized

from ethanol, mp 205-206°; uv λ_{\max} (water) 300m μ (ϵ 15500); ir (KBr) 1632cm⁻¹ (amide I band); nmr δ (D₂O), 2.75 (2H, t, -COCH₂-), 4.28 (2H, t, =NCH₂-), 6.92 and 7.22 (both 1H, d, thiazole protons).

Anal. Calcd. for C₆H₆N₂OS: C, 46.73; H, 3.92; N, 18.17.

Found: C, 46.75; H, 4.05; N, 18.26.

Sample of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one (3), was prepared for comparison from 2-aminothiazole (5g, 0.05mole) and ethyl acrylate (5g, 0.05mole) according to the procedure of Hurd and Hayao¹; gave 1.5g (\approx 10%), mp 205-206° (lit.¹ mp 195-197°).

2-Amino-3- [2-(iso-propylaminocarbonyl)ethyl] thiazolium chloride (6). To a suspension of the 1, 2, 3, 4-tetrahydro-2-oxopyrimido [2, 1-b] thiazol-5-ium chloride (2) (3.8g, 0.02mole) in 50ml ethanol was added 8ml iso-propylamine and the mixture was heated under reflux for 5hrs. The mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was recrystallized twice from ethanol-ether, to give 3g (60%) of the product, mp 152-153°; uv λ_{\max} (water) 255m μ (ϵ 6570); ir :KBr) 1635cm⁻¹ (amide I band).

Anal. Calcd. for C₉H₁₆ClN₃OS: C, 43.28; H, 6.46; N, 16.83.

Found: C, 43.17; H, 6.36; N, 17.00.

2-Amino-3- [2-(diethylaminocarbonyl)ethyl] thiazolium chloride (7). Using conditions similar to those described above for iso-propylamide (6), 3.8g (0.02mole) quaternary halide (2) and 8ml diethylamine, afforded 1.9g (36%) of the product, mp 139-140° (ethanol-ether); uv λ_{\max} (water) 256m μ (ϵ 6650); ir (KBr) 1632cm⁻¹ (amide I band); nmr δ (DMSO-d₆), 1.18 (6H, t, -NCH₂CH₃), 2.78 (2H, t, -CH₂CO-), 3.12 (4H, q, -NCH₂CH₃), 4.26 (2H, t, =NCH₂-), 6.98 and 7.42 (both 1H, d, thiazole protons), 9.61 (2H, broad, -NH₂).

Anal. Calcd. for C₁₀H₁₈ClN₃OS: C, 45.53; H, 6.88; N, 15.93.

Found: C, 45.48; H, 6.93; N, 15.83.

2-Amino-3- [(2-methoxycarbonyl)ethyl] thiazolium chloride (8). A solution of the 1, 2, 3, 4-tetrahydro-2-oxopyrimido [2, 1-b] thiazol-5-ium chloride (2) (3.8g, 0.02mole) in 50ml methanol was heated under reflux for 5hrs. The mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was recrystallized three times from ethanol-ether to give 2.7g (63%) of the product, mp 131-132°; uv λ_{\max} (water) 254m μ (ϵ 6700); ir (KBr) 1728cm⁻¹ (C=O); nmr δ (DMSO-d₆), 2.82 (2H, t, -CH₂CO-), 3.58 (3H, s, -CH₃), 4.31 (2H, t, =NCH₂-), 6.95 and 7.38 (both 1H, d, thiazole protons), 10.12 (2H, broad, -NH₂).

Anal. Calcd. for C₇H₁₁ClN₂O₂S: C, 37.75; H, 4.98; N, 12.58.

Found: C, 37.64; H, 5.05; N, 12.47.

2-Imino-3-[2-(iso-propylaminocarbonyl)ethyl] thiazoline (9), and 2-amino-3-(2-carboxyethyl) thiazolium betaine hydrate (11). A solution of 5, 6-dihydro-7H-thiazolo [3, 2-a] pyrimidin-7-one (3) (3.08g, 0.02mole) in 50ml iso-propylamine (80%) was heated under reflux for 6hrs. The mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was triturated with ether and filtered. The ether solution was evaporated to yield 3.6g (\approx 84%) of the product, 9, mp 72-75°. The analytical sample was recrystallized from ether-n-pentane, mp 78-79°; uv λ_{\max} (water) 254m μ (ϵ 6550); ir (KBr) 1632cm⁻¹ (amide I band).

Anal. Calcd. for C₉H₁₅N₃OS: C, 50.68; H, 7.09; N, 19.70.

Found: C, 50.52; H, 7.05; N, 19.57.

The solid which was separated by filtration of ether was recrystallized from water to give a pure sample of 2-amino-3-(2-carboxyethyl) thiazolium betaine hydrate (11), mp 170° (dec); nmr δ (D₂O), 2.66 (2H, t, -CH₂CO-), 4.21 (2H, t, =NCH₂-), 6.82 and 7.16 (both 1H, d, thiazole protons).

Anal. Calcd. for C₆H₁₀N₂O₃S: C, 37.87; H, 5.30; N, 14.74.

Found: C, 37.88; H, 5.29; N, 14.85.

A small amount of 9 was converted into its hydrochloride salt (6) by treatment of an ether solution with a saturated solution of anhydrous hydrogen chloride in ether.

Sample of 11 was prepared for comparison from 2-aminothiazole and 3-bromopropionic acid in the presence of an equivalent quantity of aqueous sodium hydroxide according to the procedure of Hurd and Hayao.¹

2-Imino-3- [2-(diethylaminocarbonyl)ethyl] thiazoline (10) and 2-amino-3-(2-carboxyethyl) thiazolium betaine hydrate (11). Using conditions similar to those described above for the iso-

propylamino-derivative (9), 3.08g (0.02mole) tetrahydro-derivative (3) and 50ml diethylamine (80%) yielded 3g (66%) of 10 as an oil; $\nu \lambda_{\max}$ (water) 254 μ m (ϵ 6570); ν (film) 1630 cm^{-1} (amide I band); nmr δ (CCl_4), 1.08 (6H, t, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.65 (2H, t, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.29 (4H, q, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 3.95 (2H, t, $=\text{NCH}_2-$), 5.89 (1H, broad, $=\text{NH}$), 5.56 and 6.58 (both 1H, d, thiazoline protons).

Aso afforded a pure sample of 11, mp. 170° (dec).

For elemental analysis, a small amount of 10 was converted into its hydrochloride salt (7).

2-(3-iso-Propylaminopropionyl) aminothiazole (4). A solution of 2-(3-chloropropionyl) aminothiazole (1) (3.8g, 0.02mole) and 8ml iso-propylamine in 60ml ethanol was heated under reflux for 3hrs. The mixture was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was triturated with a solution of 2.76g (0.02mole) of potassium carbonate in a small volume of water and extracted with chloroform. The chloroform extracts were evaporated at reduced pressure. Recrystallization of the residue from ether-ether petroleum gave 3.6g (\approx 86%) of the product, mp 79-80°: $\nu \lambda_{\max}$ (water) 270 μ m (ϵ 9200); ν (KBr) 1688 cm^{-1} (amide I band); nmr δ (CCl_4), 1.12 (6H, d, $-\text{CHMe}_2$), 2.45-3.08 (7H, m, $-\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}$), 6.83 and 7.33 (both 1H, d, thiazole protons).

Anal. Calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$: C, 50.68; H, 7.09; N, 19.70

Found: C, 50.48; H, 7.05; N, 19.51.

A small amount of 4 was converted into its hydrochloride salt by treatment of an ether solution with a saturated solution of anhydrous hydrogen chloride in ether. Recrystallization from ethanolether gave a pure sample; mp 225-226°.

2-(3-Diethylaminopropionyl)aminothiazole (5). Using conditions similar to those described above for 4, 3.8g (0.02mole) of the 2-(3-chloropropionyl)aminothiazole (1) and 8ml diethylamine yielded 3.7g (\approx 81%) of the product, mp 53-55°. The analytical sample was recrystallized from ether-ether petroleum, mp 56-57°: $\nu \lambda_{\max}$ (water) 269 μ m (ϵ 9640); ν (KBr) 1675 cm^{-1} (amide I band) nmr δ (CCl_4) 1.10 (6H, t, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.45 (1H, s, $-\text{NHCO}-$), 2.55-2.94 (8H, m, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2-$), 6.82 and 7.30 (both 1H, d, thiazole protons).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$: C, 52.84; H, 7.54; N, 18.48.

Found: C, 52.76; H, 7.40; N, 18.56.

A small amount of 5 was converted into its hydrochloride salt by treatment of an ether solution with a saturated solution of anhydrous hydrogen chloride in ether. Recrystallization from ethanol-ether gave a pure sample, mp 154-155°.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Σύνθεσις καὶ εὐκόλος σχάσις τοῦ δακτύλου τῆς 5, 6-διυδρο-7H-θειαζολο-(3,2- α) πυριμιδιν-7-ονης ὡς καὶ τοῦ τεταρτοταγοῦς αὐτῆς ἄλατος

Εἰς τὴν παροῦσαν ἐργασίαν μελετᾶται ἀπ' ἑνὸς ἢ συνθεσις τῆς 5, 6-διυδρο-7H-θειαζολο-[3, 2- α] πυριμιδιν-7-ονης (3) ἐκ τοῦ ἀντιστοίχου τεταρτοταγοῦς ἄλατος (2), τὸ ὁποῖον λαμβάνεται εὐκόλως διὰ τήξεως τοῦ 2-(3-χλωροπροπιονυλο)αμινοθειαζολίου (1), ἀπ' ἑτέρου ἢ ἐπίδρασις ἀμινῶν ἢ ἀλκοολῶν ἐπὶ τῶν ἑτεροκυκλικῶν τούτων πυρήνων.

Ἡ μέθοδος συνθέσεως, ἡ ὁποία συνίσταται εἰς τὴν ἐπίδρασιν KBH_4 ἐπὶ τοῦ τεταρτοταγοῦς ἄλατος 2 ἐντὸς μεθανόλης, ὑπερτερεῖ, ὡς πρὸς τὴν ἀπόδοσιν, ἐναντι παλαιότερας μεθόδου, ἡ ὁποία συνίσταται εἰς τὴν ἀπ' εὐθείας ἐπίδρασιν ἀκυρλικοῦ αἰθυλεστερος ἐπὶ τοῦ 2-αμινοθειαζολίου.

Ἡ ἐπίδρασις ἀμινῶν ἢ ἀλκοολῶν ἐπὶ τῶν ἑτεροκυκλικῶν πυρήνων 2 καὶ 3 ὠδήγησεν εἰς τὸν σχηματισμὸν νέων ἀμιδίων καὶ ἐστέρων (6-10) τῶν ὁποίων ἡ δομὴ καθωρίσθη φασματοσκοπικῶς.

Ἡ εὐκόλος σχάσις τοῦ δακτύλου εἰς τὸν ἀμιδικὸν ἢ ἱμιδικὸν δεσμὸν, ἀποδίδεται εἰς μίαν ἐνδιάμεσον πρωτονιωμένην μορφήν συντονισμοῦ εἰς τὴν ὁποίαν τὸ θετικὸν φορτίον εὐρίσκεται ἐπὶ τοῦ ἀμιδικοῦ ἀζώτου.

References

1. C. Hurd and S. Hayao, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 117 (1955).
2. L. Werbel and J. Battaglia, *J. Med. Chem.*, **14**, 11 (1971).
3. K. Weinhardt and J. Neumeyer, *J. Org. Chem.*, **35**, 1176 (1970).

Μελέτη διὰ τοῦ Παραγωγογράφου τοῦ Βρωμιούχου N-βουτυλο-σκοπολαμμωνίου καὶ Μείγματος αὐτοῦ μετὰ Νοβαλγίνης

Γ. ΜΑΡΓΩΜΕΝΟΥ - ΛΕΩΝΙΔΟΠΟΥΛΟΥ καὶ Κ.Γ. ΜΑΚΡΗ

¹Εργαστήριον Φυσικῆς Ε.Μ. Πολυτεχνείου,
²Επιστημονικὸν Γραφεῖον Φαρμακευτικῶν Μελετῶν Ἰδρύματι Διάκου 38, Ἀθήναι

(Received 7-7-72)

Study by derivatograph of N-butyl scopolammonium bromide and its mixture with novalgin

The stability of (B) N-butyl scopolammonium bromide and the quantitative composition of (C) Buscopan compositum [mixture of the (B) with (A) novalgin] were examined by derivatograph. From the derivatograms which have been taken, the following conclusions have been drawn: a. If the (B) stays in a damp and warm place for about three months, it decomposes, losing weight up to 130°C 13.8% instead of 2.4% of the non decomposed sample. b. From the derivatogram of the mixture, its percent content in (A) and (B) can be calculated. This is particularly important for the separation of the mixture which cannot be achieved by other methods.

Διὰ τοῦ παραγωγογράφου ἠρευνήθησαν: α. ἡ σταθερότης τοῦ (B) βρωμιούχου N-βουτυλο-σκοπολαμμωνίου καὶ β. ἡ ποσοτικὴ σύστασις τοῦ (Γ) Buscopan compositum μείγματος τῆς (A) νοβαλγίνης καὶ τοῦ (B). Ἐκ τῶν ληφθέντων παραγωγογραφήματων συνάγονται τὰ ἀκόλουθα: 1. ὅτι τὸ (B) μετὰ παραμονὴν εἰς θερμὸν καὶ ὑγρὸν χώρον ὑφίσταται ἀπώλειαν βάρους ἕως 130°C 13.8% ἔναντι 2.4% τῆς μὴ ἀλλοιωθείσης οὐσίας καὶ 2. ὅτι ἐκ τοῦ παραγωγογραφήματος τοῦ (Γ) δύναται νὰ ὑπολογισθῇ ἡ ἐπὶ τοῖς % σύνθεσις αὐτοῦ εἰς (A) καὶ (B). Τοῦτο ἔχει ἰδιαιτέραν σημασίαν διὰ τὸν διαχωρισμὸν τοῦ (Γ) ὅστις δὲν ἐπιτυγχάνεται δι' ἄλλων μεθόδων.

Εἰσαγωγή

Κατὰ τὰ τελευταῖα ἔτη εὐρίσκει συνεχῶς αὐξανομένην ἐφαρμογὴν ἡ μέθοδος τῆς συνθέτου θερμικῆς ἀναλύσεως διὰ τοῦ Παραγωγογράφου (Derivatograph) τῆς ὁποίας τὰ ἀποτελέσματα εἶναι ἀναπαραγωγικά.^{1,2}

Διὰ τῆς θερμικῆς ἀναλύσεως παρέχονται αἱ κάτωθι δυνατότητες:

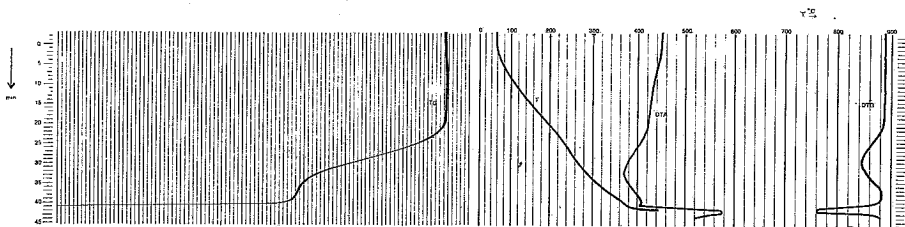
1. Ὁ προσδιορισμὸς ποσοῦ μικροτέρου τοῦ 0.5% ἰσομεροῦς εἰς ἄλλο.³
2. Ἡ χαρακτηριστικότης τῶν καμπυλῶν, τὰς ὁποίας δίδει ἐκάστη οὐσία.⁴
3. Ὁ ποσοτικὸς προσδιορισμὸς τῆς μεταβολῆς τοῦ θερμικοῦ περιεχομένου ὡς καὶ τῆς ταχύτητος μεταβολῆς βάρους ἐκ τῆς ἀναλογίας τῶν ἐμβαδῶν τῶν ἐπιφανειῶν τῶν τεταγμένων τῶν καμπυλῶν αὐτῶν πρὸς τὸ μέγεθος τῶν φαινομένων.^{5,6,7}

Ἡ καθαρότης τῶν ὑπὸ μελέτην οὐσιῶν τῆς (A) νοβαλγίνης καὶ (B) βρωμιούχου N-βουτυλο-σκοπολαμμωνίου (ὡς καὶ ὄλων τῶν οὐσιῶν), τῶν παρασκευαζομένων συνθετικῶς καὶ χρησιμοποιουμένων ὡς φαρμάκων, δίδεται ἀπὸ τὰ συνοδεύοντα ταῦτα

δελτία ταυτότητας. Όμως προκειμένου περί του μείγματος τούτων χρησιμοποιούμενου ως φάρμακον, με την ονομασίαν (Γ) Buscopan compositum δέν έχει καταστή εφικτός ό ποσοτικός προσδιορισμός αναλύσεως του μείγματος των δύο συστατικών διά χημικής μεθόδου και διά χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος. Τό παραγωγογράφημα σχ. 5 διά συγκρίσεως πρὸς τὰ τῶν συστατικῶν του δεικνύει τὸν ποσοτικὸν ἔλεγχον τοῦ (Γ). Ἐπίσης διά τοῦ παραγωγογράφου ἐλέγχεται ἡ σταθερότης τοῦ (Β). Ὡς γνωστὸν τὰ φάρμακα ὑφίστανται ἀλλοιώσεις, λόγω τῆς ἐπιδράσεως φυσικῶν παραγόντων ὡς π.χ. τῆς ὑγρασίας, θερμοκρασίας, pH, ὀξυγόνου τῆς ἀτμοσφαιρας, μικροβιακῆς δράσεως. Τό παραγωγογράφημα σχ. 4 δεικνύει τὴν εἰκόνα τοῦ ἀλλοιωθέντος δείγματος, ἐνῶ τό σχ. 3 τοῦ μὴ ἀλλοιωθέντος τοιοῦτου.

Πειραματικὸν μέρος

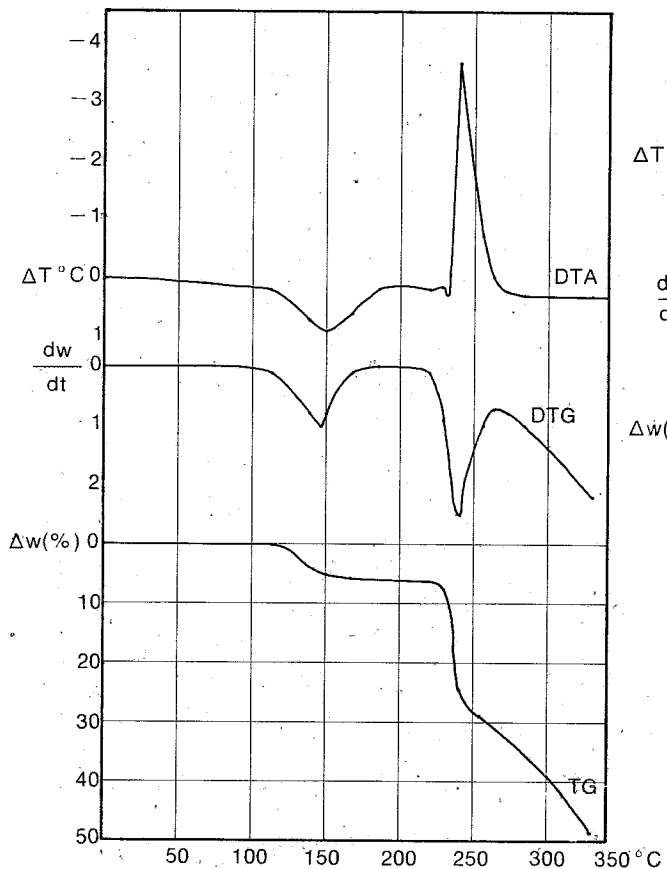
Όλοι αἱ κατωτέρω ἀναγραφόμενα πειραματικά μετρήσεις ἐλήφθησαν εἰς τὸν Παραγωγογράφον No. 879644 (Derivatograph System F. Paulik, J. Paulik, L. Erdey). Αἱ θερμικαὶ διεργασίαι ἐγένοντο εἰς τὴν ἀτμόσφαιραν καὶ τὴν ἀτμοσφαιρικὴν πίεσιν τοῦ Ἐργαστηρίου ἐντὸς χωνευτηρίων ἐκ λευκοχρύσου. Αἱ παράμετροι, ὡς ἡ ἐκλογή τοῦ καταλλήλου χωρητικότητος χωνευτηρίου ἐκ λευκοχρύσου ἐκ τῆς σειρᾶς τῶν 50mg ἕως 5g, ἄτινα συνοδεύουν τὴν συσκευὴν, ἡ ποσότης τοῦ χρησιμοποιηθησομένου δείγματος τῆς οὐσίας, ἡ ταχύτης ἀνυψώσεως τῆς θερμοκρασίας, ἡ εὐαισθησία διά τὴν μεταβολὴν βάρους, διά τὴν διαφορικὴν μεταβολὴν βάρους καὶ τὴν μεταβολὴν τοῦ θερμικοῦ περιεχομένου, ἐπελέγησαν τοιαῦτα ὥστε τὰ ἀποτελέσματα τῶν πειραματικῶν μετρήσεων νὰ πλησιάζουν κατὰ τὸ δυνατόν πρὸς τὰ βιβλιογραφικὰ δεδομένα π.χ. τὸ σημεῖον τήξεως. Τοῦτο διότι αἱ πειραματικά συνθήκαι συσχετίζονται στενῶτα μετὰ τὴν κινητικὴν τῶν φυσικῶν καὶ χημικῶν μετατροπῶν τῶν ἐκδηλουμένων κατὰ τὴν θέρμανσιν τῆς οὐσίας, παρατηρουμένης πολλακίς διαφορᾶς θερμοκρασίας πλεόν τῶν 100°C κατὰ τὴν ἐκδήλωσιν τοῦ ἴδιου φαινομένου τῆς αὐτῆς οὐσίας ὑπὸ διαφορετικὰς πειραματικὰς συνθήκας.⁸



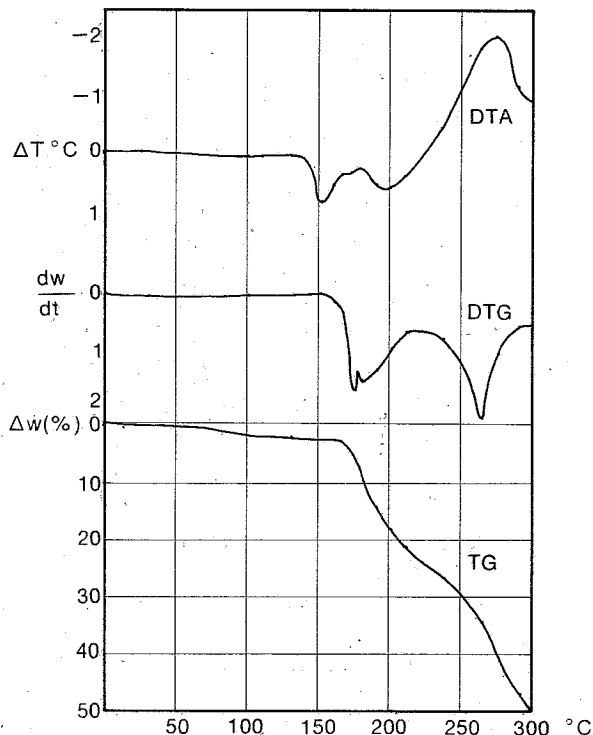
Σχ. 1. Παραγωγογράφημα νοβαλγίνης ὡς ἐλήφθη ὑπὸ τῆς συσκευῆς μετὰ τυχούσας παραμέτρους (The derivatogram of novalgin as it was recorded by chancy parameters)

Τὰ κύρια χαρακτηριστικὰ τῶν δραστικῶν οὐσιῶν, τῶν ὁποίων ἐλήφθησαν τὰ διαγράμματα ἔχουν ὡς κάτωθι:

- (Α) 1-φαινυλο-2,3-διμεθυλο-5-πυραζολόνη-4-μεθυλαμινοσουλφονικὸν νάτριον, κρυσταλλωθεῖσα μετὰ ἐν μόνιον ὕδατος (κοινὰ ὀνομασίαι: νοβαλγίνη, μεθαμπυρόνη κλπ.)· ΜΒ. 351.36 ($C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$). Περιοχὴ σημείου τήξεως εἰς τριχοειδὲς σωληνάριον ληφθεῖσα ἐκ τῆς βιβλιογραφίας 217°-221° C μετὰ ἀρχομένην διάσπασιν, ὑπὸ τὸ μικροσκόπιον 224°-228° C μετὰ ἀρχομένην διάσπασιν.⁹ Περιοχὴ σημείου τήξεως εὐρεθεῖσα παρ' ἡμῶν εἰς τριχοειδὲς σωληνάριον 222°-226° C.
- (Β) Βρωμιούχον Ν-βουτυλο-σκοπολαμῶνιον (Buscopan)· Μ.Β. 440.4 ($C_{21}H_{30}BrNO_4$). Σημεῖον τήξεως ληφθὲν ἐκ τῆς βιβλιογραφίας 142°-144° C.¹⁰ Εὐρεθὲν παρ' ἡμῶν εἰς τριχοειδὲς σωληνάριον 147°-151° C.
Διά τὴν οὐσίαν (Β) ἐλήφθησαν δύο παραγωγογράφηματα (σχ. 3 καὶ σχ. 4). Τὸ παραγωγογράφημα σχ. 3 ἐλήφθη εὐθὺς ὡς μᾶς ἐχορηγήθη ἡ οὐσία, τὸ δὲ παραγωγογράφημα σχ. 4 μετὰ πάροδον περιπίου 3 μηνῶν καὶ παραμονὴν τῆς ἰδίας οὐσίας εἰς θερμὸν καὶ ὑγρὸν χώρον.
- (Γ) Μεῖγμα (Buscopan compositum) ἐξ 26.4mg τῆς οὐσίας (Α) καὶ 1mg τῆς οὐσίας (Β). Τοῦτο φέρεται ὡς ἰδιοσκεύασμα, συνδυάζον τὴν ἀναλγητικὴν δρᾶσιν τῆς (Α) καὶ τὴν σπασμολυτικὴν τῆς (Β). Παραγωγογράφημα τοῦ μείγματος παριστᾷ τὸ σχ. 5.



Σχ. 2. Διάγραμμα νοβαλγίνης με επιλεγείσας παραμέτρους
(The diagram of novalgin when the parameters were selected)



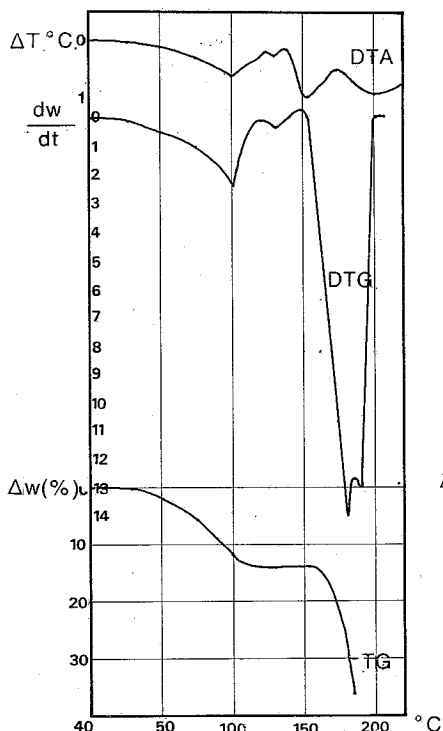
Σχ. 3. Διάγραμμα θρωμιούχου N-βουτυλοσκοπολαμμωνίου (The diagram of N-butylscopolammonium bromide)

Διά την ουσίαν (A) εκτός του παραγωγογράφηματος του ληφθέντος κατόπιν καταλλήλου επιλογής των παραμέτρων (σχ. 2) ελήφθη και έτερον παραγωγογράφημα (σχ. 1) με τυχούσας παραμέτρους, αναφερομένας εις τον πίνακα I. Ός δεικνύει το σχ. 1 ή απομάκρυνσις του κρυσταλλικού ύδατος γίνεται εις 200°-330°C με άπώλειαν θάρους 5.5%. Το παραγωγογράφημα σχ. 1 δίδεται όπως άπετυπώθη υπό του παραγωγογράφου. Όλα τα υπόλοιπα παραγωγογράφηματα μετεφέρθησαν εκ του καταγραφικού χάρτου τής συσκευής με συντεταγμένας, θερμοκρασίαν και επί τοις εκατόν μεταβολήν θάρους, μεταβολήν θερμικού περιεχομένου και ταχύτητα μεταβολής θάρους.

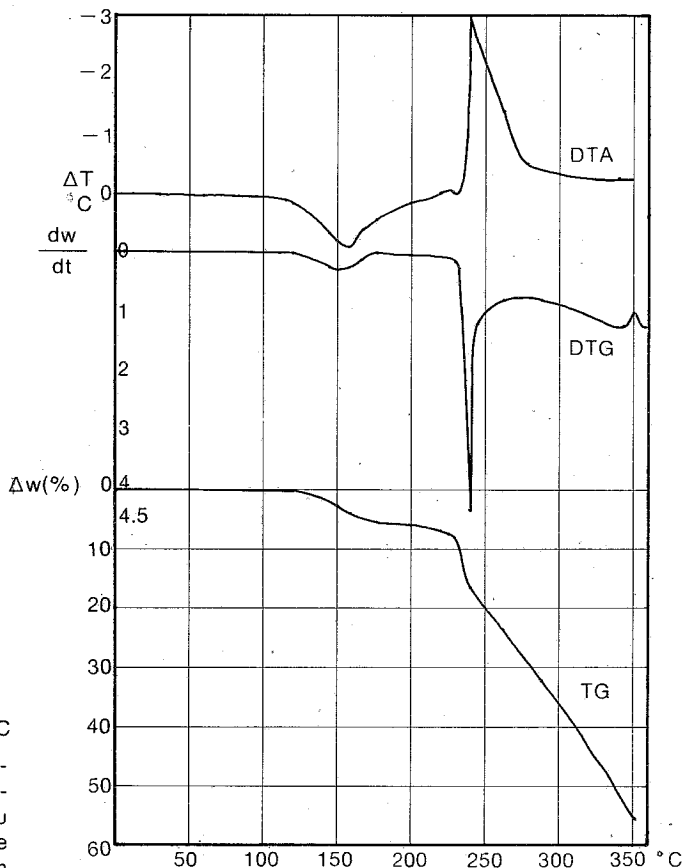
Αί παράμετροι των πειραματικών μετρήσεων δι' όλα τα δείγματα αναγράφονται εις τον ακόλουθον πίνακα:

Πίναξ I.

Αύξ. Άριθμός Παραγωγογράφηματος	Ποσότης ουσίας εις mg	Ταχύτης άνουψώ- σεως θερμοκρ.	Εύαισθησία		
			TG εις mg	DTA	DTG
1	1390	9°/min.	200	1/30	1/30
2	199	6°/min.	100	1/20	1/20
3	250	6°/min.	200	1,20	1,20
4	248	6°/min.	100	1/20	1/20
5	230	6°/min.	200	1/20	1/20



Σχ. 4. Διάγραμμα θρωμιούχου N-βουτυλο-σκοπολαμμωνίου μετά παραμονήν του επί τρίμηνον περίπου εις ύγρον και θερμόν χώρον (The diagram of N-butyl scopolamonium bromide after its stay for about three months in a warm and damp place)



Σχ. 5. Διάγραμμα του μείγματος (Buscopan compositum) (The diagram of the mixture, Buscopan compositum)

Αποτελέσματα — Συζήτηση — Συμπεράσματα

Το διάγραμμα σχ. 2 δεικνύει ότι η ενδοθερμική κορυφή εις τους 150°C αντιστοιχεί εις την μεταβολήν του θερμικού περιεχομένου κατά την απομάκρυνσιν του κρυσταλλικού ύδατος με άπώλειαν βάρους της ουσίας 5.6% και μεγίστην ταχύτητα άπωλείας εις τους 146°C. Έν συνεχεία η ενδοθερμική κορυφή εις τους 232°C, η όποία αντιστοιχεί εις τó σημείον τήξεως της ουσίας, εύρίσκειται εις καλήν συμφωνίαν με τó αναγραφόμενον εις την βιβλιογραφίαν.⁹ Εις την περιοχόν του σημείου τήξεως αρχίζει εξώθερμος μεταβολή με κορυφήν εις τους 240°C και με σύγχρονον άπώλειαν βάρους. Η ταχύτης μεταβολής του βάρους άποκτά την μεγίστην τιμήν επίσης εις τους 240°C. Η μεταβολή αύτη αντιστοιχεί εις όξειδωτικήν διάσπασιν της ουσίας. Η διάσπασις αύτη συνεχίζεται, μειουμένου διαρκώς του βάρους, μέχρι πλήρους άπανθρακώσεως ταύτης.

Το διάγραμμα σχ. 3 δεικνύει ότι ή (B) έως τους 130°C χάνει 2.4% του βάρους της. Κατά την άπώλειαν αύτην του βάρους δέν παρουσιάζονται κορυφαί εις την DTA και DTG, δείγμα ότι δέν μεταβάλλεται τó θερμικόν περιεχόμενον και ότι ή ταχύτης μεταβολής του βάρους είναι, περίπου, ή αύτη διά την περιοχόν από 50° έως 130°C. Η ενδοθερμική κορυφή εις τους 150°C αντιστοιχεί εις τó σημείον τήξεως της ουσίας, τούτο δε συμφωνεί και με την βιβλιογραφίαν.¹⁰ Έν συνεχεία ή διάσπασις της ουσίας ή άρχομένη εις τους 167°C και συνεχιζόμενη μέχρι τους 220°C παρουσιάζει δύο κοιλίας κύματος. Αύται αντιστοιχοϋν εις δύο διαδοχικάς αντιδράσεις διασπάσεως της ουσίας, με μερικήν κάλυψιν. Της μιås αντιδράσεως ή μεγίστη ταχύτης διασπάσεως είναι εις τους 175°C και της έτέρας εις τους 180°C. Η δε συνολική άπώλεια βάρους άνέρχεται εις 22.5%.

Ἡ μία ἀντίδρασις ὀφείλεται, πιθανόν, εἰς διάσπασιν τοῦ τεταρτοταγοῦς βρωμιούχου ἁλατος τοῦ ἄμμωνίου εἰς τριτοταγῆ ἀμίνην καὶ ἄλκυλοβρωμίδιον, ὅπερ ἀποστάζει. Ἡ ἑτέρα ἀντίδρασις ἐνδεχομένως ὀφείλεται εἰς διάσπασιν παραγώγου τοῦ τροπανίου. Ὁ πλήρης ποσοτικὸς προσδιορισμὸς τῶν ἐκλυομένων ἀερίων δὲν κατέστη δυνατός, λόγω μὴ διαθέσεως τοῦ τελευταίου τύπου παραγωγογράφου.¹¹ Εἰς τοὺς 220°C ἄρχεται ἡ ὀξειδωτικὴ διάσπασις τῆς οὐσίας μὲ μεγίστην ταχύτητα τοῦ ὀξειδουμένου προϊόντος εἰς 264°C. Ἡ ἀπόσταξις τοῦ ὀξειδουμένου προϊόντος συνεχίζεται μέχρι πλήρους ρητινοποίησης τοῦ ὑπολείμματος.

Τὸ διάγραμμα σχ. 4 δεικνύει ὅτι ἡ (B) ἕως τοὺς 120°C χάνει 12.8% τοῦ βάρους τῆς, μὲ μεγίστην ταχύτητα εἰς τοὺς 100°C καὶ μὲ ἐνδοθερμικὴν κορυφὴν εἰς τὴν ἰδίαν θερμοκρασίαν τῶν 100°C. Ἡ ἀπώλεια αὕτη ἀντιστοιχεῖ εἰς τὸ ἀπορροφηθὲν ποσὸν ὕγρασιος. Ἐν συνεχείᾳ παρουσιάζεται ἐνδοθερμικὴ κορυφὴ εἰς τοὺς 130°C μὲ μεγίστην ταχύτητα μεταβολῆς βάρους ἐπίσης εἰς τοὺς 130°C καὶ ἀπώλειαν βάρους 1%. Ὡς εἶναι γνωστὸν οἱ ὀργανικοὶ ἐστέρες παρουσιάζουν ὕγρασιος διασπῶνται βραδέως εἰς τὰ συστατικά των. Οὕτω τὸ βρωμιούχον N-βουτυλο-σκοπολαμμώνιον παρουσιάζει τῆς ἀπορροφηθείσης ὕγρασιος διασπᾶται εἰς τὴν ἀντίστοιχον ἀλκοόλην καὶ τὸ τροπικὸν ὀξύ. Τὸ ὀξύ τοῦτο τήκεται εἰς 117°-118°C ὑπὸ ταυτόχρονον διάσπασιν.¹² Ἐπομένως τὸ 1% ἀντιστοιχεῖ εἰς ἀπώλειαν ἐκ τῶν προϊόντων διασπάσεως τοῦ ὀξέος. Εἰς τὴν περιοχὴν αὕτην τῶν θερμοκρασιῶν, ὡς πρὸς τὴν μεταβολὴν τοῦ βάρους καὶ τὴν ταχύτητα τῆς μεταβολῆς τούτου, δὲν παρέχεται πλήρης ἀκρίβεια λόγω τῆς μερικῆς καλύψεως εἰς τὰς μεταβολὰς κατὰ τὴν ἀπομάκρυνσιν τῆς ὕγρασιος καὶ τῶν προϊόντων διασπάσεως τοῦ ὀξέος.

Ἡ ἐνδοθερμικὴ κορυφὴ εἰς τοὺς 153°C ἀντιστοιχεῖ εἰς τὸ σημεῖον τήξεως τῆς οὐσίας. Τοῦτο συμφωνεῖ περίπου μὲ τὸ τῆς βιβλιογραφίας.¹⁰ Ἐκ τούτου δεικνύεται, πιθανόν, ὅτι ἡ οὐσία, ἐκτὸς τοῦ ἐλαχίστου ποσοστοῦ τοῦ ἐστέρος, τὸ ὅποιον διεσπᾶσθη καὶ τῆς ἀπορροφήσεως τῆς ὕγρασιος, οὐδεμίαν ἄλλην μεταβολὴν ὑπέστη, λόγω τῶν συνθηκῶν, μέχρι τῆς θερμοκρασίας ταύτης. Ἐν συνεχείᾳ ἀπὸ τοὺς 153°C ἀρχίζει ἡ διάσπασις τοῦ δειγματος, μὲ μεγίστην ταχύτητα ἀπομάκρυνσεως τοῦ διασπῶμένου προϊόντος εἰς τοὺς 180°C καὶ ἀπώλειαν βάρους κατὰ πολὺ μεγαλύτεραν, τῆς ἀπὸ τὸ μὴ ὑποστάν. τὴν ἐπίδρασιν τῆς θερμότητος καὶ τῆς ὕγρασιος κατὰ τὴν παραμονήν, δείγμα. σχ. 3. Ἡ κατὰ πολὺ μεγαλύτερα ἀπώλεια βάρους δεικνύεται καὶ ἐκ τοῦ ἐμβαδοῦ τῆς διαφορικῆς μεταβολῆς βάρους, τὸ ὅποιον εἶναι ἀσυγκρίτως μεγαλύτερον τοῦ ἀντιστοίχου τοῦ σχ. 3. Ἐπίσης δεικνύονται καὶ ἐδῶ δύο κοιλίαι κύματος μὴ γενόμενα ἀντιληπταὶ εἰς τὴν μεταβολὴν TG. Αἱ κοιλίαι αὗται ἀντιστοιχοῦν εἰς τὰς δύο διαδοχικὰς ἀντιδράσεις διασπάσεως τῆς οὐσίας, μὲ μερικὴν κάλυψιν. Κατὰ τὰς ἀντιδράσεις ταύτας δὲν παρατηρεῖται ἐξώθερμος μεταβολὴ τοῦ θερμικοῦ περιεχομένου. Ἐπομένως κατὰ τὴν διάσπασιν ἡ οὐσία ἀποστάζει ἄνευ ὀξειδώσεως.

Τὸ διάγραμμα σχ. 5 δεικνύει ὅτι ἡ ἐνδοθερμικὴ κορυφὴ εἰς τοὺς 158°C ἀντιστοιχεῖ εἰς τὴν μεταβολὴν τοῦ θερμικοῦ περιεχομένου κατὰ τὴν ἀπομάκρυνσιν τοῦ κρυσταλλικοῦ ὕδατος. Ἡ ἀπώλεια βάρους τῆς οὐσίας ἢ ἀντιστοιχοῦσα εἰς τὴν μεταβολὴν ταύτην εἶναι 5.2%. Διὰ συγκρίσεως μὲ τὴν ἀντίστοιχον μεταβολὴν εἰς τὴν (A), σχ. 2, συμπεραίνεται πλήρως ἡ σύστασις τῆς (Γ). Ἐπίσης τὸ ἐμβαδὸν τῆς διαφορικῆς μεταβολῆς βάρους κατὰ τὴν ἀπομάκρυνσιν τοῦ κρυσταλλικοῦ ὕδατος εἶναι κατὰ πολὺ μικρότερον τοῦ ἀντιστοίχου τοῦ σχ. 2, λόγω τοῦ ἐπὶ πλέον βάρους τῆς (B) οὐσίας, σχ. 3. Ἐκ τῆς ἐλαττώσεως τοῦ βάρους εἰς τὸ μείγμα κατὰ 1.68% ἀπὸ 167°-220°C, ἐνῶ τῆς (A), σχ. 2, εἰς τὴν ἰδίαν ἀνύψωσιν τῆς θερμοκρασίας ἀπώλεια βάρους 0.92% καὶ τῆς (B), σχ. 3, ἀπώλεια βάρους 21.6%, ὑπολογίζεται περίπου ἡ ἀναλογία τῶν δύο συστατικῶν εἰς τὸ μείγμα. Ἐν συνεχείᾳ ἡ ἐνδοθερμικὴ κορυφὴ εἰς τοὺς 230°C, ἢ ἀντιστοιχοῦσα εἰς τὸ σημεῖον τήξεως ἐμφανίζεται πεπλάτυσμένη, μὲ σαφῆ τὴν ἐπίδρασιν τῆς ὀξειδωτικῆς διασπάσεως τῆς (B). Κατὰ τὴν ὀξειδωτικὴν διάσπασιν ἀπὸ 220°-262°C ἐμφανίζεται ἀπώλεια βάρους εἰς τὴν (A) σχ. 2, 24.7%, εἰς τὴν (B) σχ. 3, 11.5% καὶ εἰς τὸ μείγμα σχ. 5, 16.5%. Ἐξ αὐτοῦ συνάγεται ὅτι εἰς τὴν περιοχὴν αὕτην τῶν θερμοκρασιῶν ἡ ἀπώλεια βάρους τοῦ μείγματος εἶναι πολὺ μικρότερα ἀπὸ τὴν ἀντιστοιχοῦσαν κεχωρισμένως εἰς τὰ συστατικά. Τοῦτο δύναται νὰ ἐξηγηθῆ ἐκ τῆς θερμικῆς ἀλληλεπιδράσεως τῶν συστατικῶν καὶ τοῦ διαφορετικοῦ μηχανισμοῦ ὀξειδωτικῆς διασπάσεως τοῦ μείγματος τούτων.

Εύχαριστίαι

Αι μετρήσεις δια του Παραγωγογράφου έγινοντο εις τὸ Ἐργαστήριον Κοιτασματολογίας του Ε.Μ. Πολυτεχνείου ὑπὸ τὴν διεύθυνσιν του καθηγητου Ι. Παπασταματίου, τὸν ὁποιον εὐχαριστοῦμεν θερμῶς. Ἐπίσης ἐκφράζονται εὐχαριστίαι εις τὸν ἐπιμελητὴν του ἰδίου Ἐργαστηρίου κ. Κ. Θεοδωρατόν δια τὴν βοήθειαν, τὴν ὁποιαν μᾶς παρέσχε κατὰ τὴν ἐκτέλεσιν τῶν μετρήσεων. Τέλος εὐχαριστοῦμεν τὴν φαρμακευτικὴν βιομηχανίαν Norma Hellas A.E. δια τὴν χορήγησιν τῶν οὐσιῶν, αἵτινες ἐχρησιμοποιεήθησαν εις τὴν παροῦσαν ἔρευναν.

Βιβλιογραφία

1. F. Paulik, J. Paulik, L. Erdey, *Z. anal. Chem.* **160**, 241 (1958).
2. F. Paulik, J. Paulik, L. Erdey, *Talanta* **13**, 1405 (1966).
3. L.M. Brancone, H.J. Ferrari, *Microchem. J.* **10**, 370 (1966).
4. G. Liptay, Atlas of thermoanalytical curves, *Akademiai Kiado*, Budapest (1971).
5. B.R. Currel, *Thermal Analysis*, Vol. 2, 1185 Edit. R. Schwenker, P. Garn, London (1969).
6. R. Tsuchiya, Y. Kaji, A. Uehara, E. Kyuno, *Bul. Chem. Soc. Jap.* **47**, 1881 (1969).
7. W.L. de Keyser, *Nature* **172**, 364 (1953).
8. J. Paulik, F. Paulik, L. Erdey, *Anal. Chim. Acta* **34**, 419 (1966).
9. Österreichisches Arzneibuch II band, 9 ausgabe, 1044 Wien (1960).
10. A. Boeringer, E. Boeringer, J. Liebrecht, I. Liebrecht, *Brit. pat.* **708,370** May 5, 1954 CA **49**, 11031 (1955).
11. F. Paulik, J. Paulik, *Thermochim. Acta* **3**, 17 (1971).
12. H.L. Holmes, *The alkaloids Vol. 1*, 274 Edit. R.H.F. Manske, H.L. Holmes, Acad. Press (1950).

Zur Addition von 1-Naphthylisocyanat an 4-Hydroxycumarin

A. METALLIDIS

Aus dem Laboratorium für Organische Chemie der Universität Patras, Griechenland

(Received 14-7-72)

Bei der Umsetzung von 4-Hydroxycumarin bzw. ihr Derivaten mit 1-Naphthylisocyanat erhält man 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxycumarinen, in guten Ausbeuten, 4-Hydroxycarbostryl reagiert mit 1-Naphthylisocyanat zu 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-chinolin im Gegensatz zu Phenylisocyanat welches 2,4-Dioxo-3,3-bis-(carboxanilido)-1,2,3,4-tetrahydrochinolin liefert.

Treatment of 1-Naphthylisocyanate with 4-hydroxycoumarin and 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dehydro-chinolin provided 3-carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxycoumarin and 3-carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dehydrochinolin respectively. Instead, the reaction of phenylisocyanate with 4-hydroxy-2-oxo-1, 2-dehydrochinolin gives, according to an earlier report, 2, 4-Dioxo-3, 3-bis-(carboxyanilido)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-chinolin derivatives.

Einleitung

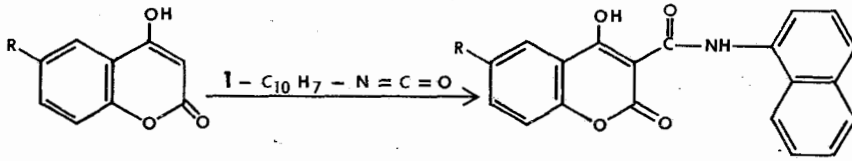
Das erstmals von R. Anschütz¹ synthetisierte 4-Hydroxycumarin hat in den letzten Jahren als Ausgangsstoff zur Herstellung einiger Anticoagulantia und rodenticider Wirkstoffe eine gewisse Bedeutung erlangt.

4-Hydroxycumarin, das als Ausgangsstoff für die Synthesen solcher Arzneimittel dient, war bisher relativ schwer zugänglich. E. Ziegler und H. Junek² erarbeiteten die letzten Jahre ein neues Verfahren, das 3-substituierte 4-Hydroxycumarinderivaten in guten Ausbeuten liefert. D. Molho³ synthetisierte 3-Carboxanilido-4-hydroxycumarinderivaten, die, nach dem selben Autor, als ausgezeichnete Bactericide und Fungicide verwendet werden. Die von uns⁴ durchgeführte Synthese, durch Addition von Phenylisocyanat an 4-Hydroxycumarin, lieferte in guter Ausbeute (80% d. Th.) 3-Carboxanilido-4-hydroxycumarinderivaten.

Da wir uns interessierten 3-Carboxy-substituierte-4-hydroxycumarine zu synthetisieren, um später ihre bactericide bzw. fungicide Eigenschaften zu untersuchen, setzten wir 4-Hydroxycumarine mit 1-Naphthylisocyanat bzw. 1, 5-Naphthylidiisocyanat um.

4-Hydroxycumarin 1 reagiert mit 1-Naphthylisocyanat im Molverhältnis 1:1, wobei 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxycumarin 3 entsteht. Unter denselben Bedingungen erhält man aus 6-Phenyl-4-hydroxycumarin 2 das 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-6-phenyl-cumarin 4. Auch 5, 6-Benzo-4-hydroxycumarin 5 bildet durch eine glatte Additionsreaktion mit 1-Naphthylisocyanat das 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-5, 6-benzocumarin 6. Durch Umsetzung von 4-Hydroxycumarin mit 1, 5-Naphthylidiisocyanat im Molverhältnis 2:1 entseht in glatter Reaktion 1,5-Dicarboxy-(N-a-naphthylamido)-3, 3'-bis-(4-hydroxymumarin) 7.

Formelbild I

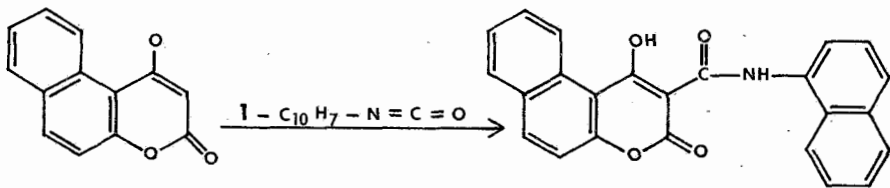


1 R = H

3 R = H

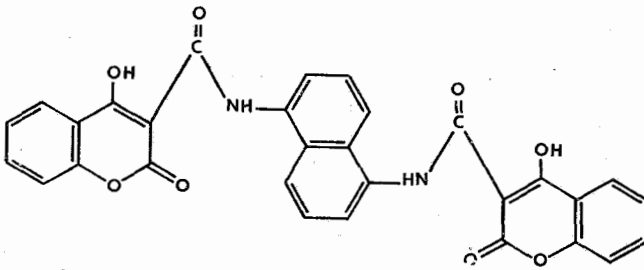
2 R = C₆H₅

4 R = C₆H₅



5

6



7

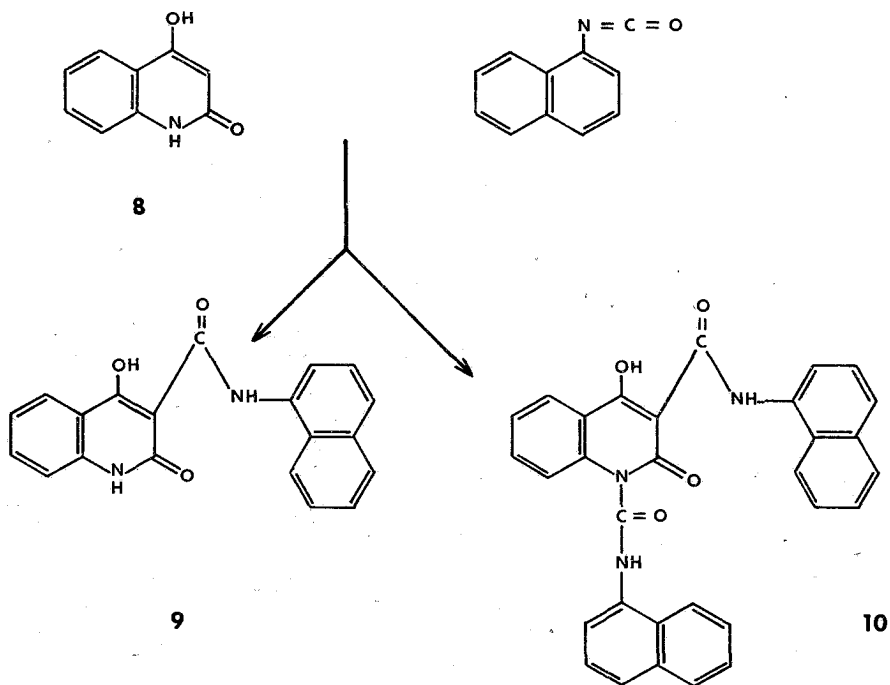
Bei der Umsetzung von 4-Hydroxycarbostryl 8 mit 1-Naphthylisocyanat im Bombenrohr bei 180° erhält man nach der Aufarbeitung, als Hauptprodukt das 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1, 2-dihydrochinolin 9 und aus der äth. Mutterlauge von 9 ein Nebenprodukt (5%), welches auf Grund seiner Analyse und IR-Spektrums die Struktur eines 1, 3-Dicarboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1, 2-dihydro-chinolins 10 aufweist.

Experimentelles

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Verbindungen 3, 4, 6, 7

Zu 2g 4-Hydroxycumarin bzw. ihr Derivaten gibt man 6,5 ml 1-Naphthylisocyanat und erhitzt 30 Min. auf 170° zum Sieden. Das abgekühlte Umsetzungsprodukt wird mit abs. Äther angerieben und aus Dioxan bzw. Butanol umkristallisiert.

Formelbild II



1. 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxycumarin (3)

Ausb. 3,7 g (90% d. Th.), Schmp. 183-185°

$C_{20}H_{13}NO_4$ Ber. C 72,50 H 3,95 N 4,23
Gef. C 72,61 H 3,72 N 4,08

2. 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-6-phenylcumarin (4).

Ausb. 3,2 g (93% d. Th.), Schmp. 170°

$C_{26}H_{17}NO_4$ Ber. C 76,65 H 4,20 N 3,44
Gef. C 76,43 H 4,32 N 3,51

3. 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-5, 6-benzocumarin (6).

Ausb. 1,6 g (89% d. Th.), Schmp. 177-179°

$C_{24}H_{15}NO_4$ Ber. C 75,58 H 3,97 N 3,67
Gef. C 75,43 H 3,72 N 3,59

4. 1,5-Dicarboxy-(N-a-naphthylamido)-3,3'-bis-(4-hydroxycumarin) (7).

Ausb. 2 g (60% d. Th.), Schmp. 240°

$C_{30}H_{20}N_2O_8$ Ber. C 67,16 H 3,76 N 6,22
Gef. C 67,03 H 3,57 N 5,31

5. 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-chinolin (9).

3 g 4-Hydroxycarbostryl und 6,5 ml 1-Naphthylisocyanat werden in einem Bombenrohr 10 Stdn. auf 210° erhitzt. Nach dem Erkalten nimmt man den Inhalt des Rohres in Äther auf und saugt ab. Aus Butanol umkristallisiert; Schmp. 265°; Ausb. 5 g (80% d.Th.).

$C_{20}H_{14}N_2O_3$ Ber. C 72,73 H 4,27 N 8,48
Gef. C 72,67 H 4,19 N 8,27

6. 1,3-Dicarboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-chinolin (10).

Die äth. Mutterlauge von 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydro-chinolin (9) wird abgedunstet und der gelbe Rückstand aus eine Mischung von Benzol: Petroläther umkristallisiert. Schm. 110°; Ausb. 0,5 g (5% d. Th.).

C ₃₁ H ₂₁ N ₃ O ₄	Ber. C 74,54	H 4,24	N 8,41
	Gef. C 74,31	H 4,13	N 8,57

Diskussion der Ergebnisse

An Hand der durchgeführten Analysen und der IR-spektroskopischen Befunde wurden die Strukturen der dargestellten Additionsprodukte bestätigt. So finden sich für 3 (in KBr) bei 3000-2600cm⁻¹ und 1900cm⁻¹ NH bzw. assoziierte OH-Schwingungen, bei 1680cm⁻¹ absorbiert die C=O Gruppe, während bei 1600 und 1550cm⁻¹ die C=C-Doppelbindung und der Aromat aufscheinen. Das Auftreten einer starken Wasserstoffbrücke zwischen OH- und Carboxy-(N-a-naphthylamido)-gruppe, welche das IR-Spektrum anzeigt, ist anscheinend auch der Grund für die sehr geringe Laugenlöslichkeit der dargestellten Produkte.

Die Struktur von 3-Carboxy-(N-a-naphthylamido)-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydrochinolin 9 kommt im IR-Spektrum zum Ausdruck durch die Absorption der NH bzw. OH-assoziierte Bande bei 3260-3020cm⁻¹, die Carbonylbände bei 1639cm⁻¹ und die des Aromats bei 1550cm⁻¹. Die schwere Laugenlöslichkeit der Verbindung ist auf Grund der gebildeten Wasserstoffbrücke zwischen der benachbarten OH- und Carboxy-gruppe zurückzuführen.

Das IR-Spektrum der Verbindung 10 zeigt eine assoziierte NH bzw. OH- Bande bei 3500-3020cm⁻¹, ihr Carbonylbände absorbiert bei 1630cm⁻¹ der aromt bei 1540cm⁻¹ und schliesslich das charakteristische Strukturelement >N-C-NH-R bei 1740cm⁻¹.



Es soll hier betont werden, dass man bei der Umsetzung von 4-Hydroxycarbostyryl mit 1-Naphthylisocyanat fast ausschliesslich 3-monosubstituierte 4-Hydroxycarbostyryle erhält. Das geschieht im Gegensatz zu den des Phenylisocyanats, wobei es sich ausschliesslich 2,4-Dioxo-3,3-bis-(carboxanilido)-1,2,3,4-tetrahydrochinoline⁵ bilden. Diese Erscheinung lässt sich wahrscheinlich durch die Stereochemie des 1-Naphthylisocyanats erklären.

Der Nationalen Griechischen Forschungsstiftung bin ich für die Förderung der Arbeit, Herrn Prof. D. Theodoropoulos für wertvolle Diskussionen zu grossem Dank verpflichtet.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Ἀντιδράσεις προσθήκης τοῦ 1-ναφθυλοϊσοκυανικοῦ ἐστέρος ἐπὶ τῶν 4-ὑδροξυκουμαρινῶν

Δι' ἐπιδράσεως 1-ναφθυλοϊσοκυανικοῦ ἐστέρος ἐπὶ τῶν 4-ὑδροξυκουμαρινῶν λαμβάνονται 3-καρβοξυ-(N-a-ναφθυλαμιδο)-4-ὑδροξυκουμαρίνη εἰς καλὴν ἀπόδοσιν. Ἡ 4-ὑδροξυ-2-οξο-1,2-διῦδρο-κινολίνη ἀντιδρᾷ μετὰ τοῦ 1-ναφθυλοϊσοκυανικοῦ ἐστέρος παρέχουσα τὴν 3-καρβοξυ-(N-a-ναφθυλαμιδο)-4-ὑδροξυ-2-οξο-1,2-διῦδρο-κινολίνη ἐν ἀντιθέσει πρὸς τὸν ἰσοκυανικὸν φαινυλεστερά, ὅστις δίδει 2,4-διοξο-3,3-δις-(καρβοξυανιλιδο)-1, 2, 3, 4-τετραῦδροκινολίνη.

Literatur

1. R. Anschütz, R. Anspach, R. Fresenius und R. Claus, *Ann. Chem.* **367**, 196 (1909).
2. E. Ziegler und H. Juneck, *Mh. Chem.* **96**, 29 (1955).
3. D. Molho, *Französ. Pat.* 1 216 966, April 1960; *Chem. Abstr.* **55**, 17656 (1961).
4. A. Metallidis, H. Juneck und E. Ziegler, *Mh. Chem.* **101**, 88 (1970).
5. E. Ziegler, H. Juneck, A. Metallidis und H. Binder, *Mh. Chem.* **98**, 2242 (1967).

Über die Autoxydation von Hydrochinon in Alkalischen Lösungen Mittels Luftsauerstoff

SPYRIDON PARASKEWAS

Laboratorium für Organische Chemie der Universität Athen

(Received 17-7-72)

Bei der Aufnahme von E.S.R.-Spektren des Hydrochinons in verschiedenen alkalischen Lösungen wurde die bekannte Änderung der Lösungsfarbe von hellgelb zu dunkelrot beobachtet. Eine Bearbeitung der Lösung, um die für die rote Farbe schuldige Substanz zu identifizieren zeigte dass sie aus dem Alkalimetallsalz $M_2C_6H_2O_4$ des 2,5-Dihydroxybenzochinons (1,4) besteht, welcher durch weitere Bearbeitung mit HCl das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) gab. Die Verbindung wurde durch I.R.-Spektren im Vergleich zu authentischer Substanz sowie durch eine Elementaranalyse bestimmt. Viele Methoden für die Herstellung der Verbindung sind in der Fachliteratur beschrieben, aber eine solche durch Autoxydation des Hydrochinons in alkalischen Lösungen mittels Luftsauerstoff ist bis jetzt noch nicht erwähnt. Nach unseren Versuchen haben wir gezeigt, dass die Autoxydation desto schneller läuft je konzentrierter die alkalische Lösungen sind. Die Reaktion läuft unter Entstehung von freien Radikalen ab, deren Spektren innerhalb von 16 Stunden beobachtet haben. In weiteren Versuchen mit Alkalikarbonatlösungen, bekamen wir Huminsäuren, deren genaue Struktur noch nicht bekannt ist.

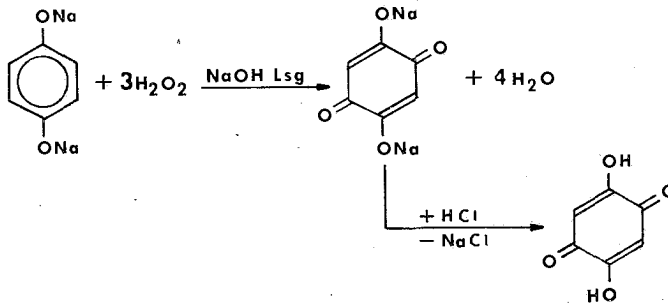
While taking E.P.R. spectra of alkali solutions of hydroquinone, we observed the well known change in color from light yellow to deep red-brown. Further treatment of the red-brown solution with n-propanol and ethyl acetate, showed that it contained the dipotassium salt (disodium) of 2,5-dihydroxy-benzoquinone (1,4) ($M_2C_6H_2O_4$). When treated with hydrochloric acid, this salt liberates the free 2,5-dihydroxy-benzoquinone (1,4), which was identified by elemental analysis and I.R. spectra. These experiments show that, in alkaline solutions, the autoxidation of hydroquinone is fast. The detection of free-radicals over an observation period of 16 hrs suggests that the reaction proceeds by a free-radical mechanism. When alkali carbonate is used instead of alkali, humic acids of unknown structure are formed.

Bei der Aufnahme von E.S.R.-Spektren des Hydrochinons in verschiedenen alkalischen Lösungen wurde die bekannte Änderung der Lösungsfarbe von hellgelb zu dunkelrot beobachtet. Um die für die rote Farbe schuldige Substanz zu identifizieren, wurde es bei der weiteren Bearbeitung der Lösung gezeigt, dass sie aus dem Alkalisalz ($M_2C_6H_2O_4$, M = Alkalimetall) des 2,5-Dihydroxy-benzochinons-(1,4) hauptsächlich besteht. Eine weitere Einwirkung von HCl gab das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4). Die Verbindung wurde durch I.R.-Spektren im Vergleich zu authentischer Substanz, sowie durch eine Elementaranalyse identifiziert.

Die Verbindung wurde bereit mehrfach hergestellt und beschrieben. So soll sie sich nach Mylius¹ und Kehrman² bei der Hydrolyse von 2,5-Diaminochinon, oder bei der

Hydrolyse von Diiminoresorcin,³ oder von 2-Hydroxy-5-Anilinchinon und von den entsprechenden Produkten bilden.⁴ Nach Scholl und Dahl⁵ wurde durch Einwirkung von 4 Mol Kaliumferricyanid auf 1 Mol Purpurin in verdünnter Kalilauge bei 15°C hergestellt.

In jüngster Zeit erhielten allerdings Brecht und Rogers⁶ das 2,5-Dihydroxybenzochinon (1,4) bei der Oxydation von Salicylsäure in einer 25% NaOH-Lösung nach Zugabe von kleinen H₂O₂-Portionen innerhalb von drei Tagen. Eine gute Herstellungsmethode beschreiben Jones und Shonle,⁷ die die oben genannte Verbindung durch Bearbeitung des Hydrochinons in konz. NaOH-Lösung nach Zugabe von konz. H₂O₂ (30%) bei einer Temperatur von 50°C erhielten. Zuerst entsteht ein orangeroter Niederschlag des Na₂C₆H₂O₄-Salzes, der durch weitere Bearbeitung mit HCl gelbe Kristalle von 2,5-Dihydroxybenzochinon (1,4) gab (Schmp. 212°-214°). Die Reaktion läuft nach dem Schema:



Eine Herstellung der Verbindung durch Autoxydation des Hydrochinons in alkalischen Lösungen mittels Luftsauerstoff ist bis jetzt in der Fachliteratur noch nicht beschrieben.

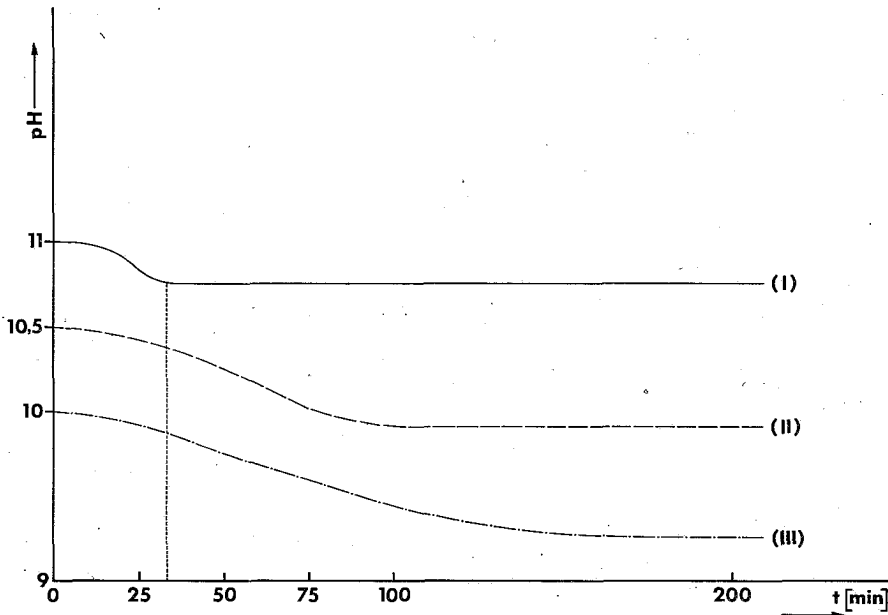


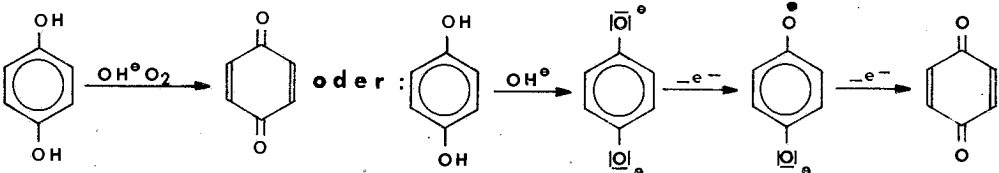
Abb. 1. — pH-Messungen bei verschiedenen alkalischen Lösungen

Herstellung und Reaktionsverlauf

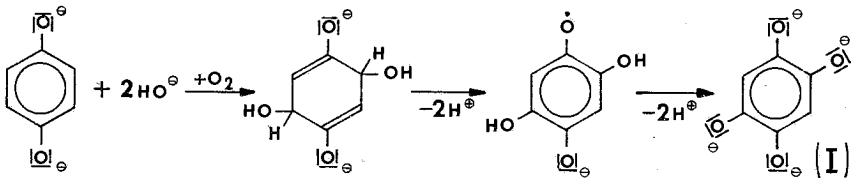
Bei der Autoxydation von Hydrochinon in verschiedenen wässrigen alkalischen Lösungen wie NaOH, KOH, K_2CO_3 mittels Luftsauerstoff erhielten wir das selbe Produkt. Die Ausbeute an 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) war grösser, wenn das Hydrochinon mit hochkonzentrierten KOH und NaOH, sowie K_2CO_3 Lösungen in Berührung kam.

Nach unseren Beobachtungen läuft die Autoxydation desto schneller je konzentrierter die wässrigen Lösungen sind pH-Messungen haben es gezeigt (Abb. 1). Eine K_2CO_3 -Lösung mit anfänglichen pH=11 stabilisiert sich innerhalb 35min und läuft dann parallel zur t-Achse, im Gegensatz zu verdünnteren K_2CO_3 -Lösungen (II) und (III).

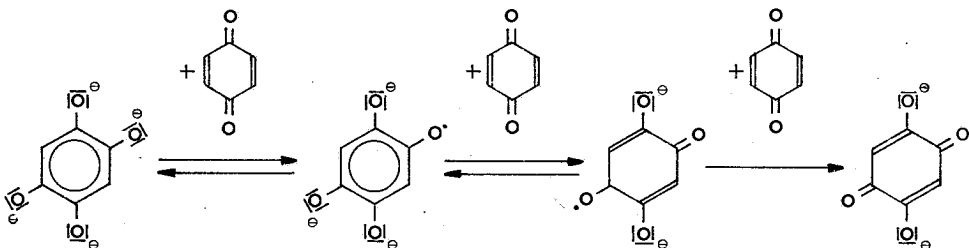
Nach eine Arbeit von Ashwort und Dixon,⁸ welche die E.S.R.-Spektren von Semi-quinonen in hochkonzentrierten alkalischen Lösungen untersucht haben, können wir eine analog verlaufende Reaktion für die Herstellung von 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) unter Entstehung von freien Radikalen zur Diskussion stellen. Ein Beweis dafür sind die erhaltenen E.S.R.-Spektren während der Ablauf der Reaktion, die innerhalb von 16 Stunden beobachtet wurde. Zuerst oxydiert sich Hydrochinon in alkalischem Medium mit Luftsauerstoff bei Zimmertemperatur zu p-Benzochinon:



Diese Reaktion ist der erste Schritt für die Entstehung von 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4). Das entstehende p-Benzochinon erkennt man sehr leicht an seiner gelben Farbe, sowie an dem entsprechenden Maximum (bei etwa 575 μ m) seines UV-Sichtbaren Spektrums. Gleichzeitig läuft eine parallele Reaktion:



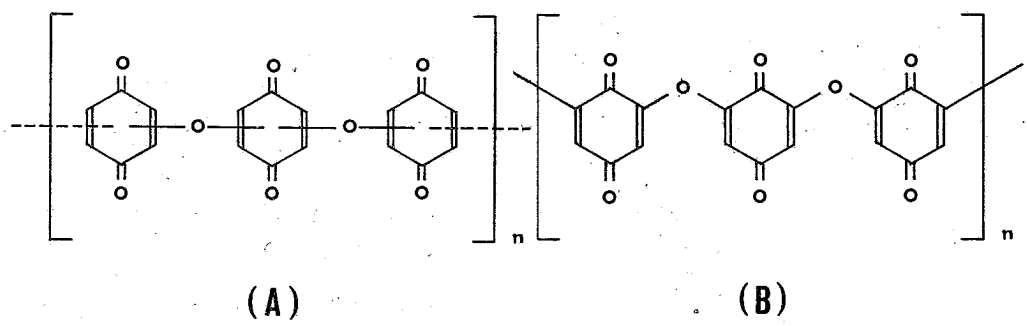
Das p-Benzochinon wirkt auf I ein, und schliesslich entsteht 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4)



Diese Reaktionen decken sich mit unserer bisherigen Erfahrungen über die Entstehung von freien Radikalen in alkalischen Lösungen zusammen. Bei der reversiblen Oxydation des Hydrochinons zu Chinon tritt als Zwischenprodukt ein radikalisches Semichinon auf.⁹ Dieses Radikal kann in Form seines Anions verhältnismässig stabil sein, sodass es bei hinreichend hohen pH-Werten (wie es in unseren Versuchen der Fall ist) in merklicher Menge im Gleichgewicht mit Hydrochinon existiert.

In weiteren Versuchen mit anderen alkalischen Lösungen (Tab. 1, 2) ist es uns nicht gelungen, das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) herzustellen. Dazu bekamen wir Huminsäuren, deren Elementaranalysen, sowie die charakteristische braunschwarze Farbe mit den Ergebnissen von Eller und Koch¹⁰ übereinstimmen. Diese Herstellungsmethode ist seit langem bekannt und ist sehr charakteristisch und einfach.

Die genaue Struktur der Huminsäuren ist noch nicht bekannt, besonderes wenn diese aus Hydrochinon hergestellt sind. Verschiedene Strukturen sind vorgeschlagen, wie:



Wir nehmen an, dass die Struktur (A) wahrscheinlicher als (B) ist. Eine I.R.-spektroskopische Untersuchung zeigte keine -C-O-C- Äthergruppe deren Absorption für die Struktur (B) sehr charakteristisch sein müsste. Die Ausbeute an Huminsäure war grösser beim Behandeln mit wässrigen Alkalikarbonatlösungen als mit wässrigen Erdalkalihydroxydlösungen.

2gr. Hydrochinon gelöst in 100ccm Lösung von:		
Wässrige Lösung von:	Produkt	Ausbeute
20% Na ₂ CO ₃	Huminsäure	80%
20% K ₂ CO ₃	Huminsäure	85%
20% Li ₂ CO ₃	Huminsäure	60%

Tab. 1

2 gr Hydrochinon gelöst in 100ccm Lösung von:		
Wässrige Lösung von:	Produkt	Ausbeute
20% Ba(OH) ₂	Huminsäure	20%
20% Sr(OH) ₂	Huminsäure	20%
20% Ca(OH) ₂	Huminsäure	12%

Tab. 2

Eigenschaften und spektroskopische Untersuchungen

Die hergestellte Verbindung hat eine gelbe Farbe. Bei der Schmelzpunktbestimmung, haben wir beobachtet, dass sie oberhalb von 170°C sublimiert und weiter auf den noch kälteren Fläche des Schmelzpunktröhrchens als eine orangerote Substanz kondensiert. Obwohl in der Literatur über zwei Modifikationen — eine stabile und eine metastabile — erwähnt ist, Brecht und Rogers⁶ sowie andere Autoren erwähnen dafür gar nichts. Ausserdem scheint es, dass die orangerote Modifikation die stabilere gegenüber der gelben sein muss. Als Beweis dafür gilt es, dass die gelbe Substanz, in Alkohol sowie in Aceton mit orangeroter Farbe sich löst. Um eine bessere Auskunft über die zwei Modifikationen zu erhalten, haben wir eine I.R.-Spektroskopische Untersuchung durchgeführt. Die zwei I.R.-Spektren, die in KBr-Pillen aufgenommen wurden, sind in der Abb. 2 angegeben. Unsere Substanz erhält ein chinoides System, sowie einen typischen p-dihydro-

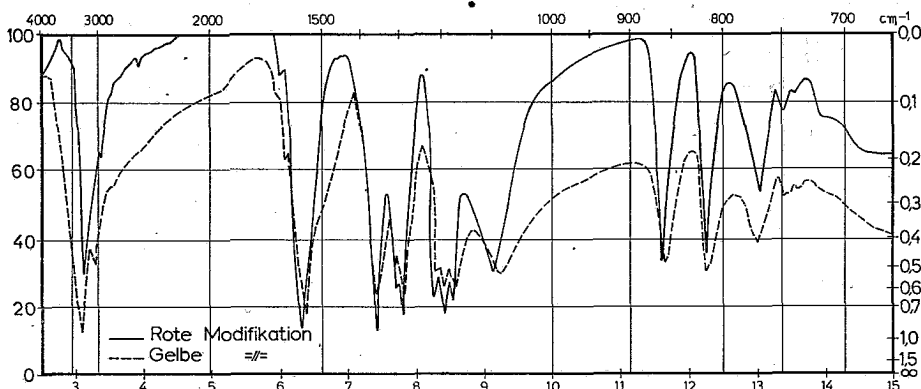


Abb. 2: I.R.-Spektrum des 2,5-Dihydroxy-benzochinons (1,4)

xyaromatischen Charakter. Beim ersten Blick scheinen die zwei Spektren identisch zu sein. Nun aus dem Absorptionsbereich der OH-Valenzschwingung tritt ein gewisser Unterschied vor, weil Intensität und Lage der OH-Schwingung für die zwei Modifikationen verschieden sind. Die orangerote Modifikation zeigt eine starke OH-Valenzschwingung, die bei 3200cm^{-1} liegt. Wir nehmen an, dass eine intermolekulare H-Bindung mit einer C=O Gruppe vorhanden ist, sodass die Formel nach Abb. 2a vorkommt. Ausserdem die Lage der C=O Gruppe, die bei 1699cm^{-1} , unterstützt unsere Vermutungen. Eine schwache Frequenz bei 2600cm^{-1} ist charakteristisch für Verbindungen mit chelierter Hydroxylgruppe.¹¹ Für die gelbe Modifikation die Verschiebung der Lage der OH-Valenzschwingung, lies uns vermuten, dass Assoziationskräfte zwischen der OH- und der C=O-Gruppe vortreten.

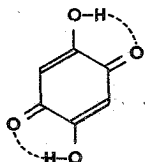


Abb. 2a

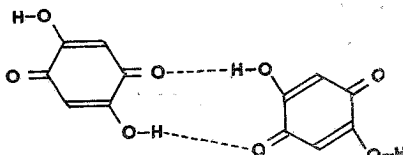


Abb. 2b

Eine spektroskopische Untersuchung der zwei Modifikationen im UV-sichtbarem Bereich, gab uns nicht die erwünschte Konsequenzen. Die Untersuchungen setzen sich fort.

Die Reaktion des Hydrochinons in alkalischen Lösungen mittels Luftsauerstoff, die innerhalb 16 Stunden verfolgt wurde, verursacht starke E.S.R. Signale. Die am Anfang der Reaktion beobachtete gelbe Farbe bedeutet, dass ein echtes Semichinon vorliegt. Eine starke Hyperfeinstruktur (H.F.S.) muss von der Phenylringprotonen herrühren. Man beobachtet eine 5-Linien H.F.S., die bei der Alkalimetallverbindungen auftritt (Abb. 3a). Am Ende der Reaktion zeigt die auftretende braunrote Farbe schwache E.S.R. Signale (Abb. 3b) sowie eine Abdämpfung der Intensität.¹²

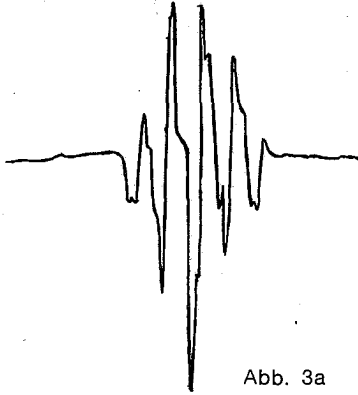


Abb. 3a

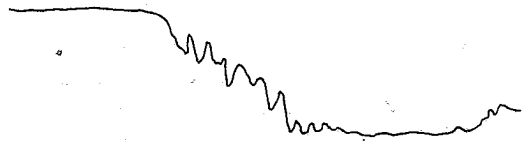


Abb. 3b

Beschreibung der Versuche

Versuch 1. Hydrochinon und festes KOH (Bzw. NaOH) werden in einem weithalsigen Erlenmeyerkolben miteinander gemischt, mit CCl_4 übergossen und etwa einen Monat an die freie Luft stehen gelassen. Anschliessend bleibt eine schlammartige rotbraune Substanz übrig, die auf verschiedene Oberflächeteilen eine goldene Farbe zeigt.

Die Verwendung der I.R.-Spektroskopie erlaubt uns die goldene Farbe dem Chinhydron zuzuschreiben. Die schlammartige Substanz wird in Wasser mit rubinrote Farbe gelöst und die Lösung mit einer Mischung aus Essigester und n-Propanol (Vol. 1:1) in einem Scheidetricher extrahiert. Es scheiden sich zwei Schichten aus. Die obere hat die rubinrote Farbe und die untere ist ölartig mit einer dunkelbraunen Farbe. Die rubinrote Schicht wird unter Vakuum konzentriert, wobei ein ziegelroter Niederschlag, der durch weitere Bearbeitung mit verd. HCl, das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) ausscheidet:

Anal: Ber. C = 51,42% O = 45,72% H = 2,86%

Gef. C = 51,22% O = 45,52% H = 3,26% Ausbeute 65%

Die ölartige Substanz wird mit HCl bearbeitet. Es fällt ein brauner flockiger Niederschlag aus, der als Huminsäure bestimmt ist.¹⁰

Versuch 2. Ein Teil der schlammartigen rotbraunen Substanz wird mit Dimethylformamid bearbeitet. Es fällt ein brauner Niederschlag aus, der durch Filtration abgetrennt wird. Eine Untersuchung des Produktes zeigt, dass es sich um Huminsäure handelt.¹⁰ Das Filtrat wird unter Vakuum konzentriert und wieder derselbe, ziegelroter Niederschlag wie im Versuch 1 erhalten, der mit verd. HCl das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) erneut gibt. Ausbeute 65%.

Weitere Versuche mit NaOH, Na_2CO_3 , K_2CO_3 , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, $\text{Sr}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, werden wie bei den Versuchen 1 und 2 durchgeführt.

Ausbeute: NaOH 65%, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 10%, $\text{Sr}(\text{OH})_2$ 7%.

Für: Na_2CO_3 , K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ist es uns nicht gelungen, das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (1,4) herzustellen. Das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hydrolysiert sich sehr schwer und die Huminsäureausbeute ist auch wenig.

Die E.S.R.-Spektren wurden mit einem VARIAN Apparat, Model "Fieldial-Mark I.U.-4502 E.P.R." aufgenommen. Die I.R.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER Apparat, Model 137 Infracord ebenfalls aufgenommen. Die pH-Werte wurden mit einem METROHM Apparat, Model E396B gemessen.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Περὶ τῆς αὐτοξειδώσεως τῆς ὑδροκινόνης ἐκ τοῦ ἀτμοσφαιρικοῦ ἀέρος ἐντὸς ἀλκαλικῶν διαλυμάτων

Κατὰ τὴν λήψιν φασμάτων ἠλεκτροπαραμαγνητικοῦ συντονισμοῦ τῆς ὑδροκινόνης εἰς διάφορα ἀλκαλικά διαλύματα, παρατηρήθη ἡ γνωστὴ ἀλλαγὴ τοῦ χρώματος τοῦ διαλύματος ἀπὸ τοῦ ἀνοικτοῦ κιτρίνου, πρὸς βαθὺ καστανέρυθρον.

Μία περαιτέρω κατεργασία τοῦ διαλύματος πρὸς παραλαβὴν καὶ ταυτοποίησιν τοῦ καστανέρυθρου προϊόντος ἀπέδειξεν ὅτι τοῦτο, ἀποτελεῖται ἐκ τοῦ μετ' ἀλκαλιμετάλλου ἄλατος $M_2C_6H_2O_4$ τῆς 2,5-διϋδροξυβενζοκινόνης (1,4), τὸ ὁποῖον ἐν συνεχείᾳ διὰ κατεργασίας μεθ' ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος δίδει τὴν 2,5-διϋδροξυβενζοκινόνην (1,4).

Ἡ ταυτοποίησις τῆς ἐνώσεως ἐγένετο βάσει στοιχειακῆς ἀναλύσεως, ὡς καὶ δι' ὑπερύθρου φάσματος ἐν συγκρίσει πρὸς πρότυπον τοιαύτην. Ἄρκεται μέθοδοι παρασκευῆς ἀναφέρονται εἰς τὴν βιβλιογραφίαν, πλην ὅμως οὐδεμία τοιαύτη εἶναι γνωστὴ ἐκ τῆς αὐτοξειδώσεως τῆς ὑδροκινόνης διὰ τοῦ ἀτμοσφαιρικοῦ ὀξυγόνου καὶ μόνον, ἐντὸς ἀλκαλικῶν διαλυμάτων.

Ἐκ τῶν γενομένων πειραμάτων ἀπεδείχθη ὅτι, ἡ αὐτοξειδῶσις χωρεῖ ταχύτερον εἰς πυκνά ἀλκαλικά διαλύματα, ὡς καὶ τὸ ὅτι ἡ ἀντίδρασις χωρεῖ διὰ τῶν ἐνδιαμέσως σχηματιζομένων ἐλευθέρων ριζῶν.

Διὰ τὴν προτεινομένην πορείαν τῆς ἀντιδράσεως συνηγορεῖ ἡ ἀνίχνευσις τῶν ἐλευθέρων ριζῶν κατὰ τὴν διάρκειαν 16ωρου παρατηρήσεως.

Ἄξιον ἰδιαίτερας προσοχῆς εἶναι ὅτι, κατὰ τὴν χρησιμοποίησιν διαλυμάτων τῶν ἀνθρακικῶν ἀλάτων τῶν ἀλκαλιῶν λαμβάνονται χουμικά ὀξέα, τοῦ μορίου τῶν ὁποίων ἡ χημικὴ σύνταξις δὲν εἶναι ἐπακριβῶς γνωστὴ, ἰδίᾳ εἰς τὴν περίπτωσιν τοῦ σχηματισμοῦ αὐτῶν ἐκ τῆς ὑδροκινόνης.

Literatur

1. F. Mylius, *Ber.* **18**, 463 (1885).
F. Kehrman, *Ber.* **23**, 1264 (1890).
2. F. Kehrman, H. Praeger, *Ber.* **40**, 1234 (1907).
3. R. Nietzki, F. Schmidt, *Ber.* **21**, 2374 (1888).
4. F. Kehrman, G. Bahatryan, *Ber.* **31**, 2399 (1898).
5. R. Scholl, P. Dahll, *Ber.* **57**, 82 (1924).
6. R. Brecht, W. Rogers, *J. Am. pharm. Assoc.* **29**, 178 (1940).
7. R. Jones, H. Shonle, *J. Am. chem. Soc.* **67**, 1034 (1945).
8. P. Ashwort, W. Dixon, *Chem. Comm.* 1150 (1971).
9. M. Eigen, P. Matthies, *Chem. Ber.* **94**, 3309 (1961).
10. F. Eller, M. Koch, *Ber.* **63**, 1469 (1920).
11. W. Brauch, *Nature* **177**, 671 (1956).
12. B.C. Reitz, F. Dravnicks, J.E. Wertz, *J. Chem. Phys.* **33**, 1880 (1960).
J.R. Bolton, A. Carrington, J. Dos. Santos-Weiga, *Mol. Phys.* **5**, 465 (1962).

Complex Formation and Kinetics in the Reaction Between Cr^{2+} (aq) and Isonicotinic Acid

D. KATAKIS and E. VRACHNOU-ASTRA

*University of Athens, Laboratory of Inorganic Chemistry,
Navarinou 13a, and
Nuclear Research Center "Democritos",
Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece.*

(Received 3-8-72)

It is found that the reaction between Cr^{2+} (aq) and isonicotinic acid proceeds through formation of an intermediate complex, which reacts further by a bimolecular reaction or decomposes back to the original species. The rates of formation and further reaction of the complex, as well as its formation constant and spectrum were determined in $2M \text{HClO}_4$ by a combination of spectrophotometric measurements, potentiometric analysis and chromatography. At low hydrogen ion concentrations there is a drastic change in the spectrum of the reaction mixture and an acceleration of the reaction. It is concluded that in the first stage of the reaction there is a partial transfer of an electron from chromous to isonicotinic acid and it is suggested that this transfer is more extensive if the complex formed is not protonated. The non-protonated form is also kinetically more reactive.

Introduction

Aqueous chromous ion reacts with N-alkylpyridinium ions to yield 1,1'-dialkyl-1,1',4,4'-tetrahydrodipyridyls.¹ A dimeric species, probably 6,6'-tetrahydrobipyridyl, is also formed in the reaction of Cr^{2+} (aq) with nicotinamide salts.²

The aim of this work is to study the mechanism of the reaction of Cr^{2+} (aq) in perchloric acid media, with 4-pyridine-carboxylic acid (isonicotinic, abbreviated in this paper as INA).

The system chosen allows investigation of several aspects of the interaction between reducing metal ions and organic molecules. One such aspect is the extent of ion-radical formation. It is known³ that simple free radicals can be formed by reduction of pyridine derivatives, and it is of interest to see how the metal ion affects their formation and subsequent reactions and how the metal ion itself is affected. Evidence for a radical-like intermediate was obtained previously using chromous and maleic acid.⁴ The relative easiness by which the pyridine ring is reduced should offer a good chance for a clear characterization of a similar intermediate in the case of isonicotinic acid.

Pyridine derivatives have been used as ligands of Co(III) ⁵ and Ru(III) ⁶ in studies of reduction by chromous ion. In order to obtain a better understanding of the role these ligands play in the electron transfer process it is necessary, in our opinion, to examine their behavior towards Cr^{2+} (aq), in the absence of the oxidizing metal ion center.

Isonicotinic acid can also be viewed as a simple model of biologically important ligands containing heterocyclic rings and carboxylate groups. In undertaking the present investigation it was therefore hoped that some basic aspects of the interaction of the metal ions with such systems might be revealed.

It is conceivable that under the mild biological conditions such aspects are not obvious, and that under the strongly acidic and reducing conditions of our experiments they would be "magnified" and become prevalent, so that their study would be facilitated.

Experimental

Materials: Chromium (VI) trioxide is added to an aqueous perchloric acid solution and it is reduced to the monomeric $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ by hydrogen peroxide. Excess peroxide is destroyed by bringing the solution to boil under reflux. Chromic is subsequently reduced electrolytically to Cr(II) on a mercury cathode. The anode region, containing perchloric acid, is separated from the cathode region by sintered glass.

The experiments were conducted in an argon atmosphere. Traces of oxygen were removed from the blanketing gas by passing through successive traps containing $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ or $\text{V}^{2+}(\text{aq})$ and Zn amalgam. All other reagents were of analytical grade. Isonicotinic and nicotinic acids were obtained from Koch-Light Labs.

Reaction mixtures: A known volume of the metal ion solution is added to a known volume of deaerated solution of the organic acid, in a spectrophotometer cell under a stream of argon. The cells are closed tightly and are further sealed with paraffine. Spectra were taken using a Cary 14 spectrophotometer.

Analysis: Determination of the fairly strong reducing species remaining in the solution at various times was done by quenching with excess Fe(III) and titrating the Fe(II) produced potentiometrically with 0.02M Ce(IV).

The Dowex-50W resin used for chromatographic separation of the chromium species was purified by the following procedure. The resin is mixed thoroughly with 3M HCl and rinsed with water to pH 5. Then it is treated with warm ($\sim 80^\circ\text{C}$) NaOH 0.8M and H_2O_2 (without removing the NaOH) until it is bleached. The rinsing is repeated and finally the hydrogen form is obtained by washing 2-3 times with 2M HClO_4 . The resin treated in this way was stored in 0.1M HClO_4 . On elution it does not give impurities absorbing in the visible or the near UV.

Results

Preliminary observations: Upon mixing the solutions of $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ and isonicotinic acid (INA) in excess, there is a change in color from light blue to orange. The spectrum of the mixture changes with time (Fig. 1), until finally, after a few days, it becomes identical to that of the monomer $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$. It is noteworthy that the absorption around 400nm reaches a maximum value and then decreases steadily to the value for $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$. The maximum around 580 nm becomes detectable only at relatively longer times. Throughout the reaction the contribution of $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ to the absorption is negligible.

At lower hydrogen ion concentrations the absorption in the visible is more intense and a new maximum appears at about 530 nm decreasing rapidly with time (Fig. 2). Moreover, the final product does not have the spectrum of the $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$ monomer. A more absorbing species seems to be present.

Under the conditions of our experiments nicotinic acid did not react with $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$.

Ion exchange separation: Separation of the chromium-containing products was performed at various times after mixing. In strongly acidic solutions, the only Cr(III) species detected was the aqueous monomer. Chromatographic separation was also done after exposing the reaction mixture to air. Since oxidation of $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ by air yields $(\text{CrOCr})^{4+}$, the amount of the dimer formed can be used to obtain a rough estimate of unreacted Cr(II). Thus, it is found that considerable chromous is left, well after the maximum absorption is

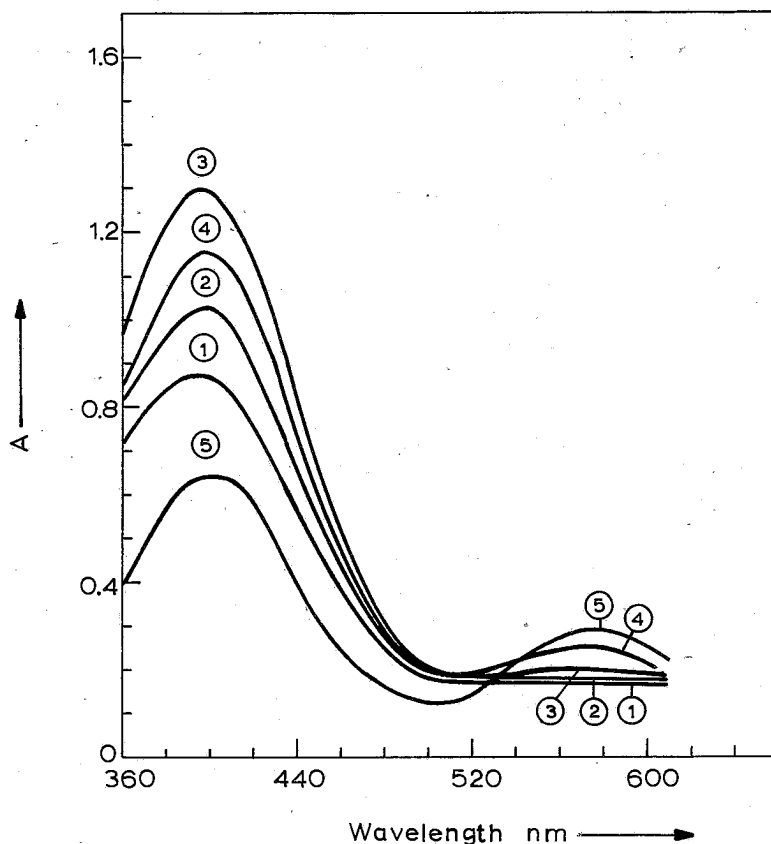


Fig. 1. Reaction of $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ with isonicotinic acid in 2 M HClO_4 . $[\text{Cr}^{2+}]_0 = 6 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{INA}]_0 = 0.031\text{ M}$, 5 cm path. Spectra were taken at different times after mixing: (1) 15 min, (2) 18 min, (3) 34 min, (4) 2 hrs and 12 min, (5) 13 hrs and 42 min.

reached and that some chromous persists even several days after mixing. There was no indication, however, of other Cr(III) species. There was no indication in particular of any stable or inert complex between Cr(III) and INA, or the products of reduction of INA.

Kinetics: The course of the reaction was followed both spectrophotometrically and by determination of Cr(II) at different times. The chromatographic results indicate that the increased absorption at 400 nm is rather due to an easily oxidizable intermediate and not to a Cr(III) complex. It is, therefore, very likely that the Fe(III)-Ce(IV) method of analysis measures not only $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$, but also any other chromium species capable of reducing Fe(III). Accordingly, the analytically determined concentration is represented by [Red] rather than by $[\text{Cr}^{2+}]$.

For times longer than the time required to reach maximum absorption, the data for [Red] vs. time fit kinetics pseudo-second order in [Red] (Fig. 3).

Similar results are obtained from the spectrophotometric data. Since in strongly acidic solutions only monomeric $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$ is formed and $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ does not absorb appreciably, the absorbance observed at different times is the sum of the absorbance due to $\text{Cr}^{3+}(\text{aq})$ and of the absorbance due to the intermediate species.

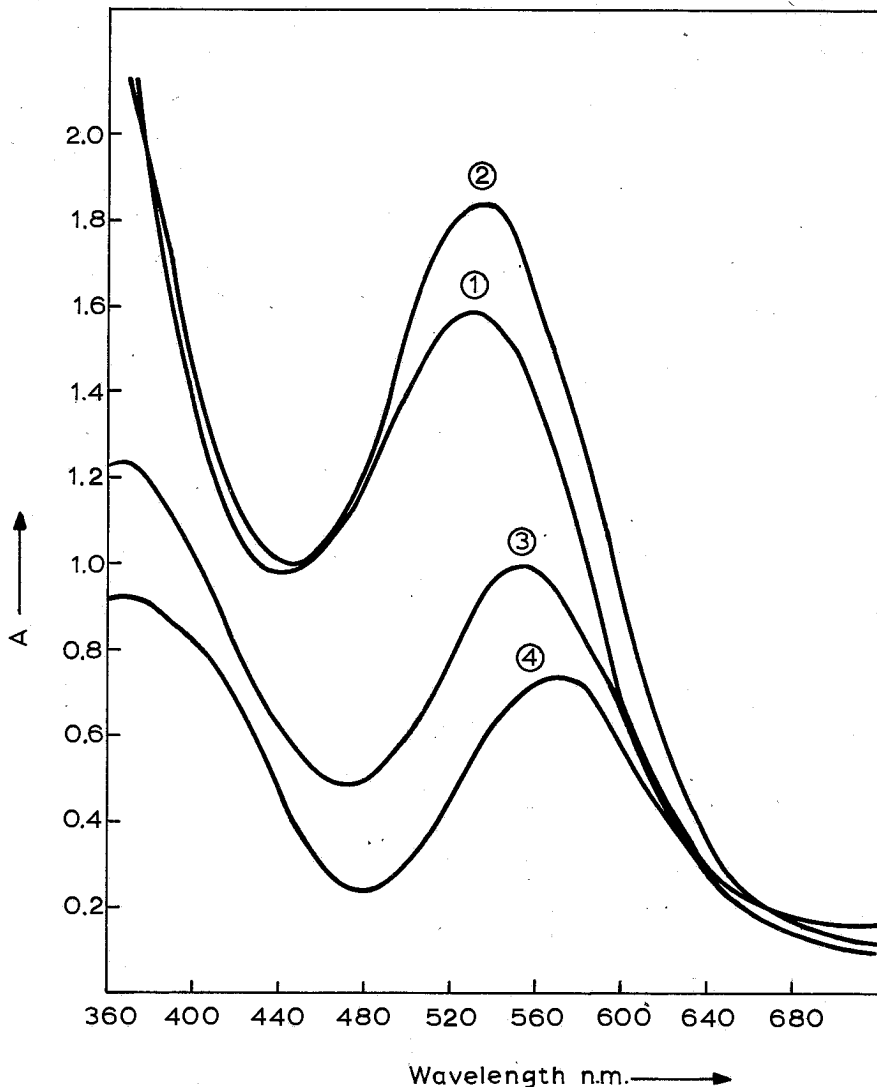


Fig. 2. Reaction of $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ with isonicotinic acid in 0.03 M HClO_4 . $[\text{Cr}^{2+}]_0 = 7 \times 10^{-3} \text{ M}$. $[\text{INA}]_0 = 0.04 \text{ M}$, 5 cm cell. Spectra were taken at different times after mixing: (1) 1 min, (2) 27 min, (3) 1 hr 30 min, (4) 4 hrs 30 min.

$$A_{\text{obs}} = A_{\text{Cr}^{3+}} + A_{\text{int}}$$

A_{int} can therefore be calculated from the measured quantities and the known⁸ values for $\epsilon_{\text{Cr}^{3+}}$, using the equation:

$$A_{\text{int}} = A_{\text{obs}} - \epsilon_{\text{Cr}^{3+}} ([\text{Cr}^{2+}]_0 - [\text{Red}])$$

Fig. 4 is a plot of $\frac{1}{A_{\text{int}}}$ vs. time, at two wavelengths. Similar lines are obtained at other wavelengths. The straight lines are consistent with the second order plot obtained independently from the data of the potentiometric titration.

Results similar to those depicted in Fig. 4 were also obtained with other INA and HClO_4 concentrations. The results are summarized in Table I, which includes the slopes and the intercepts of the corresponding straight lines.

The data in Table I and Fig. 4 reveal that for a given HClO_4 concentration the slope is independent of $[\text{INA}]_0$ and $[\text{Cr}^{2+}]_0$, whereas the intercept is larger at lower $[\text{INA}]_0$ and lower $[\text{Cr}^{2+}]_0$. On the contrary, the slope is strongly affected by the HClO_4 concentration; in fact, the results indicate a term proportional to $[\text{H}^+]^{-2}$.

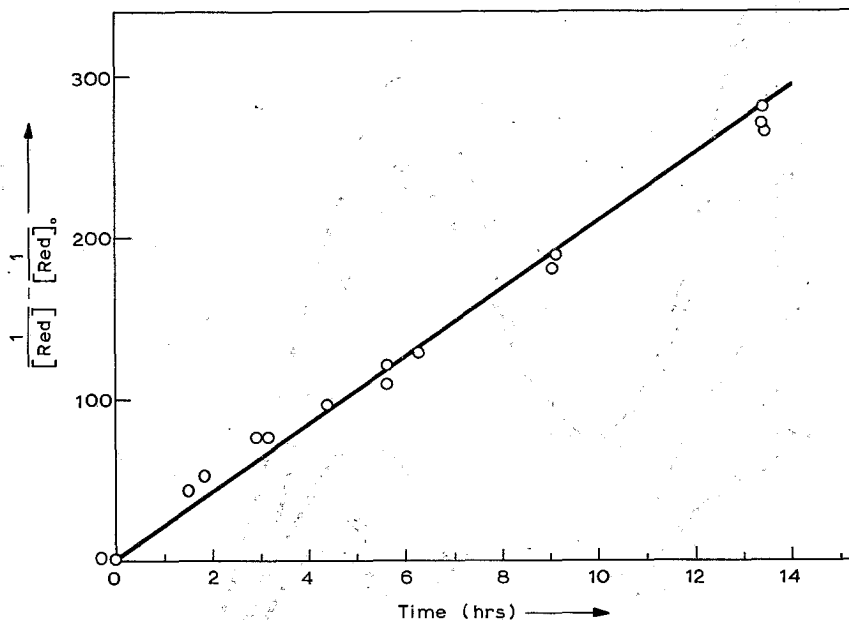


Fig. 3. Pseudo-second order plot for the second stage of the Cr^{2+} - INA reaction. $[\text{Red}]$ = all species reducing $\text{Fe}(\text{III})$; $[\text{Cr}^{2+}]_0 = 6 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{INA}]_0 = 0.031 \text{ M}$; $[\text{HClO}_4]_0 = 2 \text{ M}$.

Table I. — Effect of $[\text{INA}]$ and $[\text{HClO}_4]$ on the slopes and intercepts

of the $\frac{1}{A_{\text{int}}}$ vs. time lines (400 nm)

	$[\text{Cr}^{2+}]_0$ ($\text{M} \times 10^3$)	$[\text{INA}]_0$ ($\text{M} \times 10^2$)	$[\text{HClO}_4]_0$	Intercept	Slope
Run 1	3.7	1.0	1.2	12	2
Run 2	8.6	5.0	1.2	1	2
Run 3	7.1	3.6	0.71	2	34

The kinetics of formation of the intermediate were studied by the method of initial rates. From the data obtained potentiometrically it is found that in a mixture containing 0.03 M INA and 2 M HClO_4 , the reaction is initially first order in $[\text{Cr}^{2+}]$, with a pseudo-first order rate constant of $k = 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Discussion

Mechanism. It is suggested that the first stage in the reaction involves formation of a complex between Cr^{2+} and INA, resulting in increased absorption around 400 nm. During the second stage, the equilibrium:



has already been established and the complex intermediate reacts further according to the equation:



In strongly acidic solutions the only chromium product in (2) is $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. By $\text{Cr} - \text{INA}$ we symbolize the intermediate complex, to be specified further on the basis of the evidence obtained. At equilibrium:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{Cr} - \text{INA}]}{[\text{Cr}^{2+}] [\text{INA}]} \quad (3)$$

and in excess INA:

$$[\text{Cr} - \text{INA}] = K' [\text{Cr}^{2+}] \quad (4)$$

where $K' = K [\text{INA}]$.

The potentiometrically determined reductant is given by the equation:

$$[\text{Red}] = [\text{Cr}^{2+}] + [\text{Cr} - \text{INA}] = \left(1 + \frac{1}{K'}\right) [\text{Cr} - \text{INA}] \quad (5)$$

After the establishment of the equilibrium, reaction (2) is the rate determining step and the rate law derived gives:

$$\frac{1}{[\text{Cr} - \text{INA}]} - \frac{1}{[\text{Cr} - \text{INA}]_0} = k_2 t \quad (6)$$

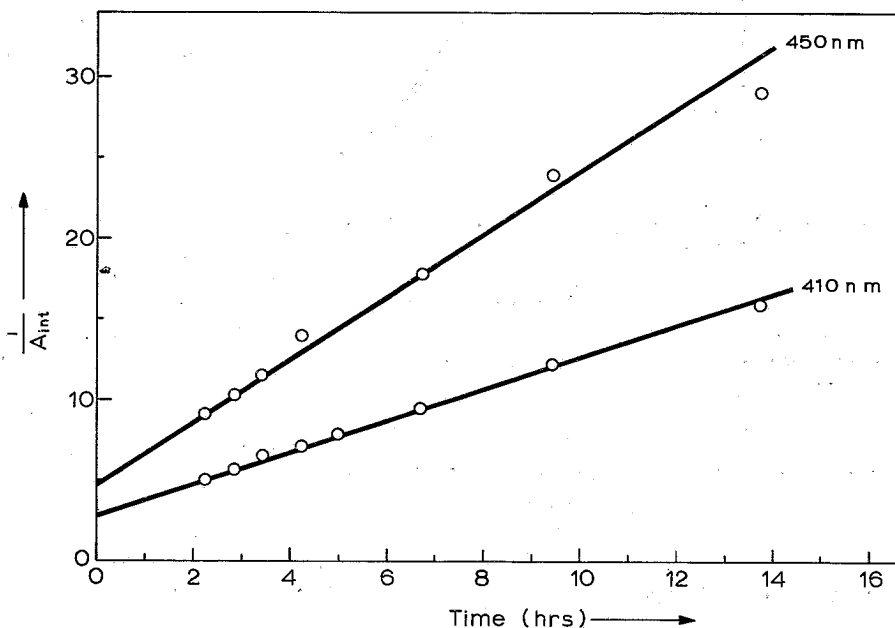


Fig. 4. Pseudo-second order plot of the absorbance due to the intermediate formed in the reaction between $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ and INA. $[\text{Cr}^{2+}]_0 = 6 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{INA}]_0 = 0.031 \text{ M}$; $[\text{HClO}_4]_0 = 2 \text{ M}$; 1 cm path.

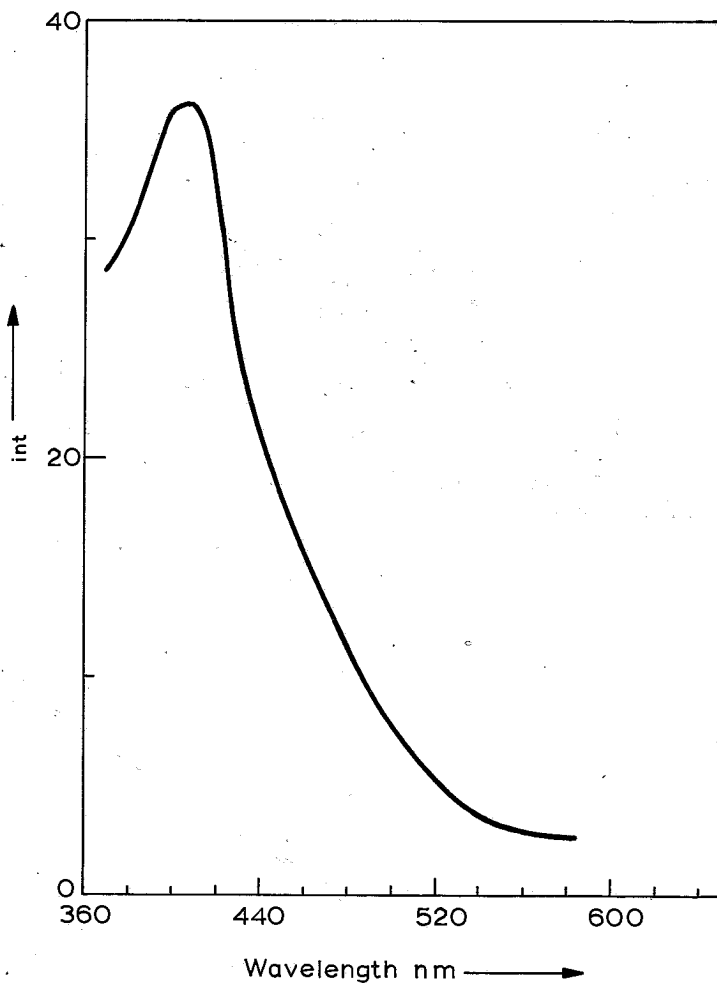


Fig. 5. Spectrum of the intermediate complex formed in the reaction between $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ and INA in 2 M HClO_4 .

Experimentally we determine the slope k' of the line:

$$\frac{1}{[\text{Red}]} - \frac{1}{[\text{Red}]_0} = k't \quad (7)$$

and the slope k'' and intercept $\frac{1}{(A_{\text{int}})_0}$ of the line:

$$\frac{1}{(A_{\text{int}})} = \frac{1}{(A_{\text{int}})_0} + k''t \quad (8)$$

Combination of (4) - (8) gives:

$$k' = \frac{k_2 K'}{1 + K'} \quad (9)$$

$$k'' = \frac{k_2}{\epsilon} \quad (10)$$

$$\frac{1}{(A_{\text{int}})_0} = \frac{1}{\epsilon K' [\text{Cr}^{2+}]_0} \quad (11)$$

Formation constant and spectrum of the intermediate complex

Equations (9), (10) and (11) can be used to calculate K' , k_2 and ϵ . At $[\text{HClO}_4]_0 = 2M$ and $[\text{INA}]_0 = 0.031M$, the values of K' and k_2 calculated from the data at various wavelengths are, within experimental error, the same, namely $K' = 1.8 \pm 0.1$ and $k_2 = (9 \pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. In this respect, the calculations are self-consistent. The spectrum of the intermediate is shown in Fig. 5.

From the experimentally determined pseudo-first order rate constant of formation it is found that $k_1 = 0.1 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and using equation (3) $K_{-1} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. The values obtained using the spectrophotometric data and the absorptivities of Fig. 5 are, within experimental error, the same. This provides additional support for the assumptions implied in the proposed mechanism.

On the structure of the intermediate complex

The first polarographic reduction potential of isonicotinic acid, relative to the saturated calomel electrode, is reported⁹ to be $-E_{1/2} = 0.90 \text{ V}$ in $\text{pH} = 1.85$ and $-E_{1/2} = 1.25 \text{ V}$ in $\text{pH} = 6.18$. Complete transfer of an electron from $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ to INA in one step is therefore thermodynamically unfavorable since the potential of the $\text{Cr}^{2+} - \text{Cr}^{3+}$ couple, relative to sce is only $E^\circ = 0.66 \text{ V}$. It should then be concluded that in the intermediate complex the transfer is incomplete and that the combined effect of two such transfers (reaction (2)) is necessary for net reaction. It is of interest in this respect that nicotinic acid, which is not reduced polarographically¹⁰, is not reduced by $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ either.

The other properties of the intermediate are also consistent with the idea of a partial electron transfer to the ligand. The spectrum in the visible is possibly due to $t_{2g} \rightarrow e_g$ multiplicity-allowed transitions. The partial transfer of the electron can be thought to cause an increase of the energy level of the antibonding e_g orbitals and a corresponding shift to shorter wavelengths.

The lability is also intermediate between that of Cr(II) and that of Cr(III) species.

Hydrogen ions compete with the metal ion for the carboxyl site, but they can also influence the reaction by adding on nitrogen. A detailed investigation of hydrogen ion dependence has not yet been done. From the results obtained so far, however, it seems that the non-protonated form is kinetically more reactive than the protonated one. In fact, the different spectra at $t \rightarrow \infty$ obtained at low and high acid suggest two distinct paths for the bimolecular reaction. Moreover, the appearance of the second peak in low acid and the increased absorption seem to imply that the ion-radical character of the intermediate complex is enhanced, or, in other terminology, that back-bonding is stronger.

Acknowledgment

The authors wish to thank Mrs S. Philipakopoulou for laboratory assistance and Mr. O. Kanaginis for performing some of the preliminary experiments.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Σχηματισμός συμπλόκου και κινητική εις την αντίδρασιν μεταξύ $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ και ισονικωτινικού οξέος

Εύρεθη ότι η αντίδρασις μεταξύ $\text{Cr}^{2+}(\text{aq})$ και ισονικωτινικού οξέος χωρεί μέσω σχηματισμού συμπλόκου, τὸ ὁποῖον ἀντιδρᾷ περαιτέρω διὰ διμοριακῆς ἀντιδράσεως ἢ ἀποσυντίθεται πρὸς τὰ

άρχικα συστατικά. Ήγένετο προσδιορισμός τών ταχυτήτων σχηματισμού και περαιτέρω αντίδρασης του συμπλόκου, ως επίσης και τής σταθερᾶς ἰσορροπίας και τοῦ φάσματος αὐτοῦ, διὰ συνδυασμοῦ φασματοφωτομετρικῶν μετρήσεων, ποτενσιομετρικῆς ἀναλύσεως και χρωματογραφίας. Εἰς σχετικῶς μικρὰς συγκεντρώσεις ὑδρογονιόντων παρατηρεῖται δραστικὴ μεταβολὴ τοῦ φάσματος τοῦ μίγματος ἀντιδράσεως και ἐπιτάχυνσις τῆς ἀντιδράσεως. Συνάγεται, ὅτι κατὰ τὴν πρώτην φάσιν τῆς ἀντιδράσεως γίνεται μερικὴ μεταφορὰ ἠλεκτρονίου ἐκ τοῦ ἰόντος δισθενοῦς χρωμίου πρὸς τὸ ἰσονικωτικὸν ὀξύ, φαίνεται, δέ, ὅτι ἡ μεταφορὰ αὕτη εἶναι πλέον ἐκτεταμένη, ὅταν τὸ σχηματιζόμενον σύμπλοκον δὲν εἶναι πρωτονιωμένον. Ἡ μὴ πρωτονιωμένη μορφή εἶναι ἐπίσης κινητικῶς πλέον ἐνεργός.

References

1. J.B. Conant and A.W. Sloan, *J. Am. Chem. Soc.* **45**, 2466 (1923).
2. K. Wallenfels and M. Gellrich, *Chem. Ber.* **92**, 1406 (1959).
3. (a) W.M. Schwarz, E.M. Kosower and I. Shain, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3164 (1961);
(b) E.M. Kosower and E.J. Poziomek, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5515 (1964);
(c) V. Kalyanaraman, C.N.R. Rao and M.V. George, *J. Chem. Soc. (B)* 2406 (1971).
4. A. Malliaris and D. Katakis, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3077 (1965).
5. (a) E.S. Gould and H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1318 (1964);
(b) F. Nordmeyer and H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4295 (1966); **90**, 1162 (1968).
6. R.G. Gaunter and H. Taube, *Inorg. Chem.* **9**, 2627 (1970).
7. Ph. Lykourazos, A. Kanellopoulos and D. Katakis, *J. Phys. Chem.* **72**, 2330 (1968).
8. R.C. Thompson and G. Gordon, *Inorg. Chem.* **5**, 562 (1966).
9. T.A. Mikhailova, N.I. Kudryashova and N.V. Khromov-Borisov, *Zh. Ob. Kh.* **39**, 26 (1969).
10. P.C. Tompkins and C.I.A. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **143**, 643 (1942).

Preparation and Controls of ^{99m}Tc -Sulfur Colloid for Liver Scanning

E. HIOTELLIS, C. DASSIOU and E. BELKAS
*N.R.C. "Democritos" Athens, Isotopes Production Division
and Biological-Chemical Divisions*

(Received 9-8-72)

A rapid technique for the preparation of ^{99m}Tc -sulfur colloid is described. The method has a high radioactivity purity yield, more than 99.8 percent. Also the particle size of the colloidal solution is within the 200-600m μ range. The quality is tested by liver scanning in rabbits.

Introduction

One of the most useful radioactive isotopes for labeling organic and inorganic compounds has proved to be ^{99m}Tc . It is characterized by short half life, low γ -energy (140 KeV), and absence of β particles.

These properties make ^{99m}Tc a quite suitable radioisotope for medicinal use. So a great many efforts have been made to prepare it in the most suitable form for administration to human beings.

Due to the continuously increasing demand for ^{99m}Tc in colloidal form in the hospitals of our country, we were obliged to look for a prompt method of preparing it.

Experimental

For the preparation of ^{99m}Tc -sulfur colloid several methods were developed; firstly¹ hydrogen sulfide was used, with satisfactory results, but the toxicity and the difficulty of using this gas, were problems to be faced.

In another method antimony² sulfide was used instead of H_2S . Recently ^{99m}Tc -sulfur colloid has been prepared by the use of sodium thiosulfate in acidic solution.^{3,4,5}

In our method, described below, we too make use of sodium thiosulfate.

Materials and methods

a) Reagents

The following solutions have been used:

1. Sodium perrhenate (NaReO_4), as a carrier 0.5%
2. Hydrochloric acid 1.5 N
3. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.8%
4. Gelatin 1.35%
5. Sodium citrate brought at pH 11 by NaOH

All solutions were made by the use of pyrogen free distilled water and were filtered through millipore filters. They were sterilized in an autoclave heated to 120°C for 30 min. Vessels were also sterilized.

b) Preparation of the colloid.

In a sealed vial, containing the gelatin and 1ml of sodium perrhenate solution, 4.5ml of sodium pertechnetate in saline solution are added. Sodium pertechnetate is obtained by elution of ^{99}Mo -generator with 0.9% sodium chloride.

The proper aliquots of sodium thiosulfate and hydrochloric acid are then added. The vial is heated in a boiling water bath for 10 min., shaken from time to time. Afterwards it is cooled under running water and 4ml of the above solution of sodium citrate (pH11) are added.

The final solution is of a bright brown colour and its pH = 5-5.5.

We came to use the above mentioned concentrations of the reagents after making a series of experiments in which we used several concentrations of gelatin, hydrochloric acid (0.5-2N), and sodium thiosulfate (0.8-2%).

The heating time was also varied from 5-15 min.

The best results were obtained with the above mentioned concentrations and heating time.

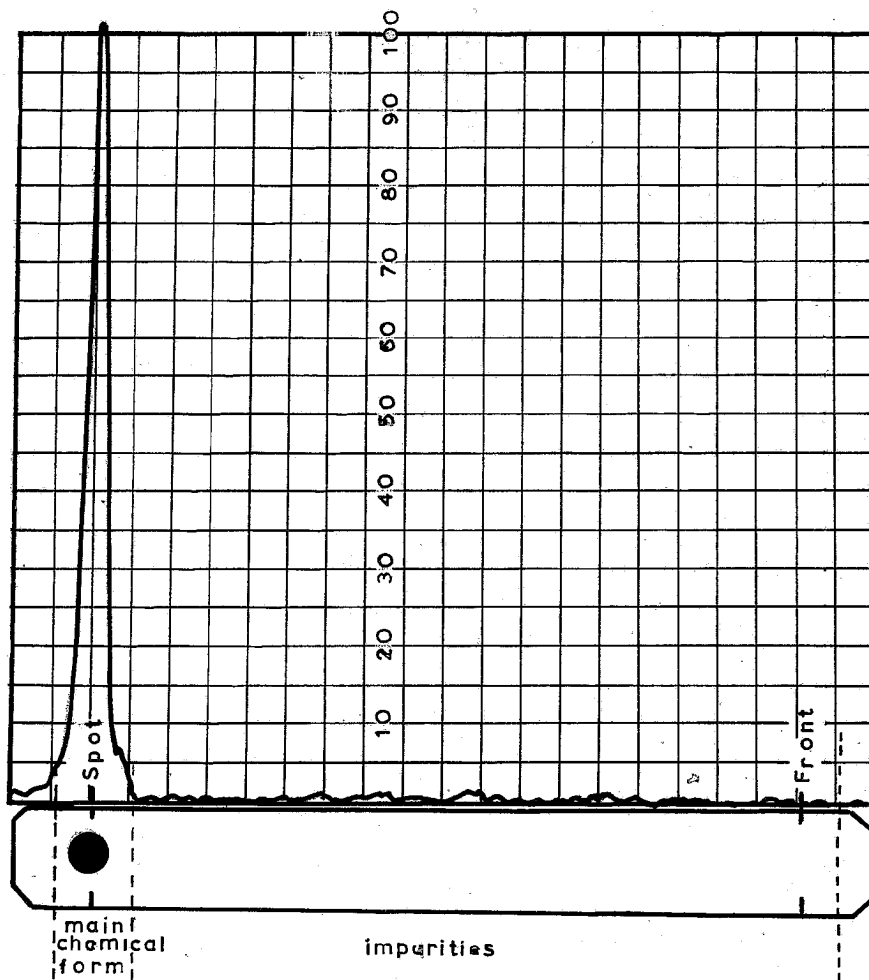


Fig. 1: Radiochemical purity control of ^{99m}Tc -sulfur colloid.

Radiochemistry: The descending paper chromatographic technique in methyl alcohol-water (85:15) on Whatman No. 1 and a running time of 2h is used for the radiochemical purity control. The expected Rf values are 0.00 for the main chemical form (^{99m}Tc - sulfur colloid) and 0.65-0.70 for the impurity ($^{99m}\text{TcO}_4$) if any.³

The chromatographic strip-paper is cut into two parts, one being the ^{99m}Tc -sulfur colloid initial spot extended 1cm from both sides of the center of the spot and the other being the impurities in the remaining part of the strip-paper extended 1cm beyond the liquid front (Fig. 1). These two pieces are measured with a single channel analyzer using a well-type NaI (TI) crystal and the percentage of ^{99m}Tc -sulfur colloid is then calculated. The radiochemical purity revealed is more than 99.8 percent.

Examination of the particle size

The examination of the particle size of ^{99m}Tc -sulfur colloid was done in two different ways:

a) By filtration through millipore filters of different porosities and b) by electron microscopy.

a) the filtration through millipore filters is based on the detection of the colloidal particles according to the porosity of the filters and the colloidal micelles. The millipore filters used were: 0.2μ , 0.45μ , 0.8μ and 1.2μ . An aliquot from the sample of ^{99m}Tc -sulfur colloid was obtained and measured on a γ -ray counter. After that, similar aliquots of the sample were passed through the millipore filters of the above mentioned porosities.

The results are shown in Table I.

Table I.

Size of Micelles	% of Micelles
I. 200 – 450 m μ	30%
II. 450 – 800m μ	30%
III. 800 – 1.200m μ	15%
IV. lower than 200m μ	25%

These results were obtained by the method mentioned above for the production of the ^{99m}Tc sulfur colloid. Quite similar results but with a lower percentage on the range between 200-800m μ were obtained using hydrochloric acid 2N.

b) The electron microscopy observations confirmed the results obtained by filtration (Fig. 2). It is very well shown that the most colloidal particles have a range of size between 200-600m μ .

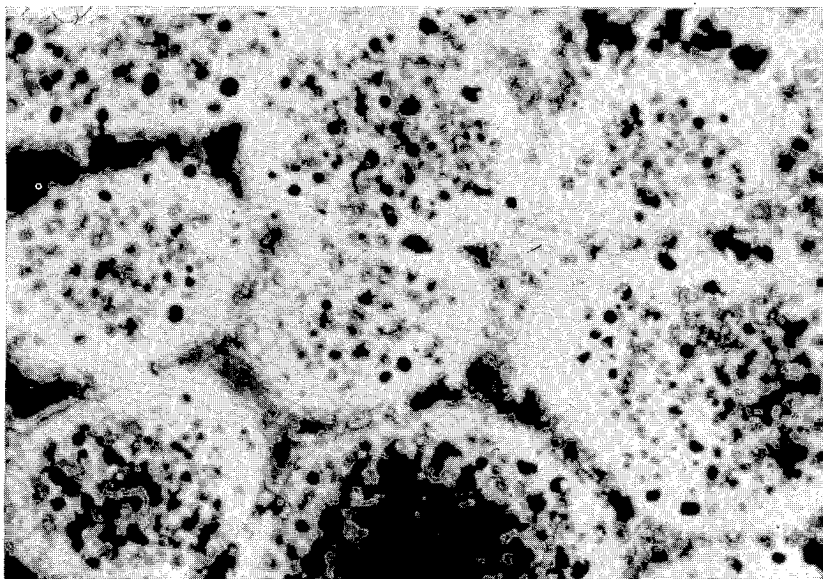


Fig. 2: Examination of ^{99m}Tc -sulfur colloid by electron microscope. Magnification $\times 45,000$.

Animal Scanning: After the confirmation of the particle size of ^{99m}Tc -sulfur colloid by the two above mentioned methods, we decided to test its quality by scanning it in animals. (The scannings were performed in the Anticancer Hospital of Athens, under the supervision of Dr. Vr. Samaras). We injected endovenously (in the ear vein) a certain dose of ^{99m}Tc -sulfur colloid in rabbits. After 30 min we took the whole body scanning of the animal. As it is shown in Fig. 3 an excellent liver scanning was obtained. No traces of ^{99m}Tc were found in the animal's lungs, or in other organs. An hour after the injection some traces of radioactivity began to be detected in the bladder.

The whole biological picture is in complete agreement with the radioanalytical chemical results.

The ^{99m}Tc -sulfur colloid is now produced regularly for the hospitals. The routine control of the particle size is done by filtration only, through the millipore filters.

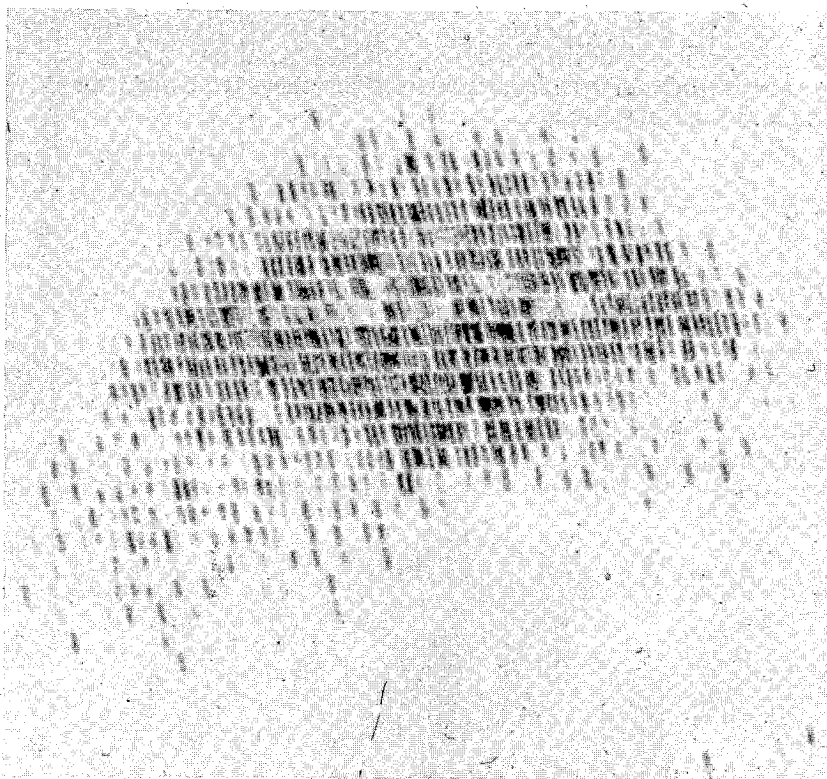


Fig. 3: Liver scanning on rabbit. On the left side some lines appear due to the presence of ^{99m}Tc in the bladder.

Conclusions

Our aim was to obtain a non-toxic product in high yield and with proper particle size for liver scanning. Indeed our yield has reached 99.5-99.7% in ^{99m}Tc -sulfur colloid. Examination of the particles' size by electron microscopy and ultrafiltration, has proved their size to be 200-600 μ .

This particle size makes ^{99m}Tc -sulfur colloid very suitable for liver scanning. This has also been confirmed by biological experiments in rabbits.

We have no knowledge of any complaint from the hospitals during a period of more than 6 months.

Acknowledgements

The authors wish to express their thanks to Mrs. E. Georgiadou for her very expert assistance. Thanks are also extended to Mr. B. Galatis, of the Lab. of Gen. Botany Univ. of Athens, for the electron microscopy measurements.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Παραγωγή και Έλεγχος Κολλοειδούς ^{99m}Tc -Θείου

Είς τήν παρούσαν έργασίαν περιγράφεται μέθοδος ταχείας παρασκευής κολλοειδοῦς διαλύματος ^{99m}Tc -θείου. Η έν λόγω μέθοδος έχει ύψηλήν ραδιενεργόν απόδοσιν. έγγίζουσα τά όρια του 99,9%. Το μέγεθος τών παραγομένων κολλοειδών μηκύλων κυμαίνεται μεταξύ τών 200-600mμ. Η ποιότης του παραγομένου κολλοειδοῦς διαλύματος του ^{99m}Tc -θείου έλέγχεται και διά σπινθηρογράφηματος ήπατος είς κονίκλους.

Bibliography

1. Harper, R.V., Lanthrop, K.A., Jiminez, F., FINK, R. and Gottshal, K.A. *Radiology* **85**, 101, (1965).
2. Garson, O.L., Palcos, M.C. and Radicella, R., *Int. J. of Appl. Radiat. Isotopes* **16**, 513. (1955).
3. Stern, H.S., McFee, S.G. and Subramanian, G., *J. Nucl. Medic.* **7**, 665 (1966).
4. Larson, Steven M. and Nelp, Will B., *J. Nucl. Medic.* **7**, 817 (1966).
5. Patton, D.D., Garcia, E.N. and Webber, N.M., *Am. J. Roentg.* **97**, 880 (1966).

TABLE OF CONTENTS

	Page
Ch. T. Plessas: <i>Étude Physicochimique et Immunologique des Liaisons de l'Acide Niflumique-¹⁴C (acide trifluorométhyl-3 phényl-amino-2-nicotique) avec des Différentes Protéines</i>	175
G.E. Manoussakis, D.A. Haristos and C.E. Youris: <i>Halogen Ring Monosubstituted Benzoic Acid Hydrazides as Ligands-I. Preparation and Interpretation of Infra-red Spectra</i>	182
G. Tsatsas and E. Costakis: <i>Synthesis and Facile Ring-opening of 5, 6-Dihydro-7H-thiazolo [3,2-a] pyrimidin-7-one and its Quaternary Halide</i>	188
Γ. Μαργωμένου - Λεωνιδοπούλου και Κ.Γ. Μακρή: <i>Μελέτη δια του Παραγωγογράφου του Βρωμιούχου Ν-βουτυλο-σκοπολαμμωνίου και Μείγματος αυτού μετά Νοβαλγίνης</i>	193
A. Metalidis: <i>Zur Addition von 1-Naphthylisocyanat an 4-Hydroxycumarin</i>	199
S. Paraskewas: <i>Über die Autoxydation von Hydrochinon in Alkalischen Losungen Mittels Luftsänerstoff</i>	203
D. Katakis and E. Vrachnou-Astra: <i>Complex Formation and Kinetics in the Reaction Between Cr²⁺ (aq) and Isonicotinic Acid</i>	210
E. Hiotellis, C. Dassiou and E. Belkas: <i>Preparation and Controls of ^{99m}Tc-Sulfur Colloid for Liver Scanning</i>	219