

3/76

CMCRCZ 5 (3), 221-284 (1976)

ΧΗΜΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

ΝΕΑ ΣΕΙΡΑ

CHIMIKA CHRONIKA

NEW SERIES

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

CHIMIKA CHRONIKA / NEW SERIES

Published by the Greek Chemists' Association
27, Kaningos Street, Athens (147), Greece

MANAGING COMMITTEE

Elected members

VASILIOS M. KAPOULAS
THEMISTOKLES COURCOULAS
GEORGE MAKRIS
ALEXIS STASSINOPOULOS
STELIOS HADJYANNAKOS

Ex-officio members

THEODORE ARGIRIOU
General Secretary of the G. C. Association
ARIS KALLIPOLITES
Treasurer of the G. C. Association

EDITOR - IN - CHIEF

V.M. KAPOULAS
Biochemistry, University of Athens

ASSISTANT EDITOR

C.A. DEMOPOULOS
Biochemistry, University of Athens

CONTRIBUTING EDITORS

TH. HADJIOANNOU
Analytical Chemistry, University of Athens
D. KATAKIS
Inorganic Chemistry, University of Athens
C.N. POLYDOROPOULOS
Physical / Quantum Chemistry, Univ. Ioannina
K. SANDRIS
Organic Chemistry, Tech. Univ. Athens
G.A. VARVOGLIS
Organic Chemistry, Athens

EDITORIAL ADVISORY BOARD

N. ALEXANDROU
Organic Chemistry, University of Salonica
G.D. COUMOULOS
Physical Chemistry, Athens
I. DILARIS - PAPANIMITRIOU
Organic Chemistry, University of Athens
N.A. ECONOMOU
Physics, University of Salonica
T. FOTAKIS
Organic Chemistry, CHROPI, Piraeus

S. FILIANOS

Pharmacognosy, University of Athens
D.S. GALANOS
Food Chemistry, University of Athens
A.G. GALINOS
Inorganic Chemistry, University of Patras
P. GEORGACOPOULOS
Pharmaceutical Technology, Univ. of Salonica
N. HADJICHRISTIDIS
Polymer Chemistry, University of Athens
E. HADJOUDIS
Photochemistry, C.N.R. "Democritos"
E. KAMPOURIS
Polymer Chemistry, Tech. Univ. Athens
M. I. KARAYANNIS
Analytical Chemistry, University of Athens
TH. G. KOUYOYMZELIS
Nuclear Physics, Tech. Univ. Athens
G. MANOUSSAKIS
Inorganic Chemistry, University of Salonica
I. MARANGOSIS
Chemical Mechanics, Tech. Univ. Athens
I. NIKOKAVOURAS
Photochemistry, C.N.R. "Democritos"
G. PAPAGEORGIOU
Biophysics, C.N.R. "Democritos"
G. SKALOS
Microanalysis, Tech. Univ. Athens
A. STAVROPOULOS
Industrial Technology, G.S.I.S., Piraeus
I. M. TSANGARIS
Biophysical Chemistry, Athens
G. TSATSARONIS
Food Chemistry / Technology, Univ. Salonica
G. VALCANAS
Organic Chemistry, Tech. Univ. Athens.
G.S. VASILIKIOTIS
Analytical Chemistry, Univ. Salonica
E.K. VOUDOURIS
Food Technology, University of Athens
I. VOURVIDOU-FOTAKI
Organic Chemistry, University of Athens
I. V. YANNAS
Mechanical Engineering, M. I. T., USA.

Correspondence, submission of papers, subscriptions, renewals and changes of address should be sent to Chimika Chronika, New Series, 27 Kaningos street, Athens 147, Greece. Subscriptions are taken by volume at 300 drachmas for members and 500 drachmas for Corporations in Greece and 15 U.S. dollars to all other countries except Cyprus, where subscriptions are made on request. Printed in Greece by Boukouris' Grafics.

Υπεύθυνος συμφώνως τῷ νόμῳ: Βασίλ. Καπούλας, Παπαδιαμάντη 25, Παιδ. Ψυχικό, Ἀθήνηαι.
Υπεύθυνος Τυπογραφείου: Α. Μπούκουρης, Ποταμοῦ καὶ Αὔγης (17° χλμ. Ἐθν. Ὁδοῦ Ἀθηνῶν - Λαμίας), Νέα Κηφισιά.

CONTENTS

Chemiluminescence of a luminol-fluoresceine amide (<i>in English</i>) by J. Nikokavouras, C. Papadopoulos, A. Perry and G. Vassilopoulos	223
Structure-activity relationship and species variation of prostaglandin E ₁ homologues on platelet function "in vitro" (<i>in English</i>) by S.E. Papaioannou, E.R. Waskawic and R.N. Saunders	231
Quantitative determination of monensin in feeds by thin-layer chromatography and direct scanning spectrodensitometry (<i>in English</i>) by D. Ch. Koufidis	239
Polarographic behavior of Triphenylarsin oxide in water-methanol and methanol solutions (<i>in German</i>) by D. Jannakoudakis, P.G. Mavridis and J. Markopoulos	249
Polarographic behavior of Triphenylarsin oxide and of benzoic acid in DMSO, DMF and in their aqueous mixtures (<i>in German</i>) by D. Jannakoudakis, J. Markopoulos and P.G. Mavridis	263
SHORT PAPERS	
The chlorinolysis of petroleum asphaltenes (<i>in English</i>) by S.E. Moschopedis and J.G. Speight	275

CHEMILUMINESCENCE OF A LUMINOL-FLUORESCÉINE AMIDE

J. NIKOKAVOURAS, C. PAPADOPOULOS, A. PERRY AND G. VASSILOPOULOS
Department of Chemistry, Nuclear Research Center "Demokritos", Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece.

(Received November 27, 1975),

Summary

The amides resulting from condensation between fluoresceine and luminol and fluoresceine and aniline were synthesized and their chemiluminescence was studied in order to investigate the possibility of excitation energy transfer via an amide bridge in chemiluminescence. The light-reaction's quantum yield is reported, together with the chemiluminescence spectrum and the fluorescence spectra of reactants and products. Light emission in this reaction results from de-excitation of the substituted 3-aminophthalate ion produced in the course of the light-reaction, indicating that there is no energy transfer to the fluoresceine moiety.

Key words: Chemiluminescence, Luminol.

Introduction

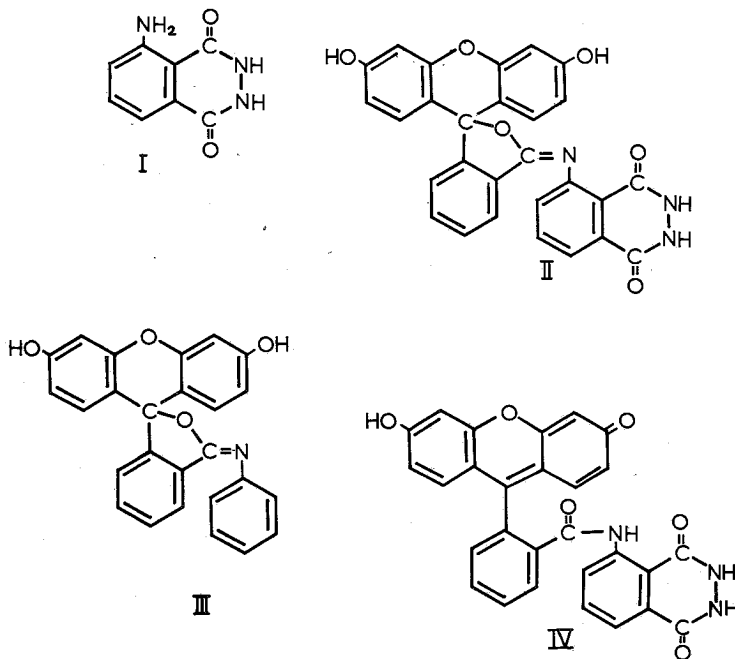
Luminol (3-aminophthalhydrazide) chemiluminescence has been extensively studied in over 500 publications during the last 50 years and although new highly efficient light-reactions have been discovered, this reaction still remains one of the few highly efficient non-biological chemiluminescent systems known.

The reaction's product is in this case electronically excited 3-aminophthalate ion. De-excitation of this species in protic media gives rise to light emission with λ_{max} in the region of 430nm. If, however, another fluorescent species is present in the solution, intermolecular energy transfer can compete with the light-emitting de-excitation of the 3-aminophthalate resulting in emission of light whose spectral distribution is that of the energy-acceptor's fluorescence, provided of course that the excitation energy profiles of donor and acceptor in the medium are compatible.

Intramolecular energy transfer is also possible in a chemiluminescent system as it has been shown by White *et al*² who have prepared and studied substituted hydrazides. The energy generating hydrazide was in this case connected with a strongly fluorescent moiety such as 9,10-diphenylanthracene via a methylene bridge. In order to investigate the transfer of energy via an amide bridge, the strongly chemiluminescent hydrazide luminol (I) was in the present work condensed with the highly fluorescent fluoresceine, yielding (II) which in the alkaline solutions required for the light-reaction should be visualized as a luminol-uranin amide (IV). It should be noted that the hydrazide portion will also acquire the form of luminol di-enolate which is the structure required for the chemiluminescent reaction.

Results and Discussion

Attempts to prepare the fluorescein acyl chloride so that the reaction with luminol's $-NH_2$ group would give (IV) failed as reaction with thionyl chloride resulted in multiple chlorination at various sites of the molecule. As such behaviour has been reported in the past with other similar chlorinating agents, further attempts on this route were discouraged. Direct condensation, however, between luminol and fluorescein in the presence of acetic acid proceeded smoothly in *N,N'*-dimethylformamide and (II) was obtained in good yield. The fluorescein anilide (III) was synthesized following the method of O. Fischer and E. Hepp,³ by heating together fluorescein and aniline hydrochloride in aniline. This method, unfortunately, could not be applied in the synthesis of (II) as luminol which is the amine in this case is a very high-melting solid.



The purpose of synthesizing the anilide (III) was the need of a blank in our chemiluminescence measurements. Although associated with lower quantum yields, fluorescein, is also chemiluminescent^{4,5} under the conditions of the luminol light-reaction and (III) might also be chemiluminescent. As compounds (II) and (III) are identical except that compound (III) lacks the energy generating hydrazide moiety responsible for the chemiluminescence of luminol, the light emission of the luminol fluorescein amide due solely to the luminol light-reaction should be calculated differentially taking into account the chemiluminescence of (III) under identical conditions. In practice, however, matters were simplified when the chemiluminescence of (III) was found negligible in comparison to that of (II).

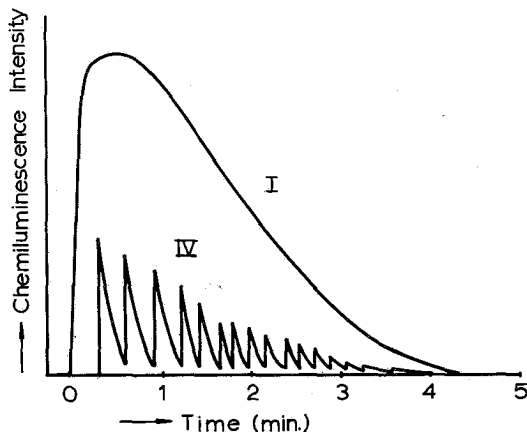


FIG. 1. Light intensity-time diagrams of the hemin-catalysed reactions of (I) and (IV) under optimum conditions for (IV) chemiluminescence. Each burst of light in (IV) is due to addition of hemin solution.

Regarding the fluorescence of (II), it should be noted that (a) its intensity is very low and (b) its spectral distribution is that of the separate luminol and fluoresceine moieties and this is true for structure (II) as well as structure (IV) (Solution in aqueous sodium hydroxide, Fig. 2a1). The overall low fluorescence efficiency of the luminol-fluoresceine amide is most intriguing if one considers that the two moieties retain their spectral characteristics while especially in structure (II) the rigidity of the molecule is much enhanced, thus reducing the possibility of de-excitation through internal conversion. Furthermore, the fluorescence of the luminol moiety is not seriously affected in aliphatic acyl derivatives, although the chemiluminescence efficiency is much reduced.⁷ With the luminol acyl derivatives, energy transfer from the excited aminophthalate donor towards the fluorescence acceptor moiety should, from the photophysical point of view be even more permissible, as the substantial overlap between the aminophthalate emission and the fluoresceine excitation spectra is increased on acylation due to a shift of the aminophthalate fluorescence maximum towards longer wavelengths.

The chemiluminescence quantum yield of (IV) was obtained in the present work for two light-reactions, i.e. ozonization of a 10^{-5} M solution of (IV) in 0.01N sodium hydroxide in the presence of hydrogen peroxide and the hemin-catalyzed reaction of the same solution in the presence of hydrogen peroxide. The concentration of hydrogen peroxide required was determined by conducting a large number of experiments with different hydrogen peroxide concentrations and integrating the intensity-time diagrams thus recorded; the optimum concentration giving rise to the largest light-sum was 6.5×10^{-2} M for both types of reaction as well as for reaction in the absence of ozone or hemin. The maximum chemiluminescence quantum yields were 1.5×10^{-4} for the ozonization reaction, 2.0×10^{-4} for the hemin catalyzed reaction and 1.2×10^{-4} Einstein \cdot mole⁻¹, for the reaction in the absence of ozone or hemin. As a reaction is characterized as strongly chemiluminescent⁸ if its quantum yield is higher than 10^{-5} Einstein \cdot mole⁻¹. (IV) is undoubtedly a strongly chemiluminescent compound. The quantum yield of the luminol (I) hemin catalysed reaction measured under precisely the same conditions was found equal to 5.4×10^{-3} Einstein \cdot mole⁻¹.

The weaker chemiluminescence of (IV) versus (I) should be attributed to (a) the fact that acylation of the $-\text{NH}_2$ group of (I) results in reduced chemiluminescence efficiency⁷ and (b) the almost non-existent fluorescence of (IV) as well as of the substituted aminophthalate produced from the light-reaction, giving rise to a high rate of internal conversion. Thus, even if a high rate of energy transfer to the fluoresceine moiety was found, the chemiluminescence quantum yield of (IV) ought still to be lower than that of (I).

A most interesting aspect of the intensity-time diagram of the (IV) light reaction is shown in Fig. 1. Unlike the intensity time diagram of (I) common with the majority of known hydrazide chemiluminescent reactions, addition of hemin to (IV) results in a flash of light which is repeated on further addition of hemin. The fast light build-up and decay as well as the larger amount of hemin required by (IV) seems to indicate that in this case, the fluoresceine moiety scavenges most of the HO_2 radicals required for the first step of the hydrazide^{1b,c} decomposition. This is further supported by the 1:6500 molar proportion of H_2O_2 required, versus 1:80-100 adequate for the chemiluminescent reaction of (I).

Information regarding the emitting species in the (IV) light reaction can be obtained from Fig. 2 where the fluorescence and chemiluminescence spectra are shown. The fluorescence spectra of (IV) are shown in Fig. 2a where a2 is the fluorescence spectrum of the (IV) aqueous alkaline solution just prior to the addition of hemin and a1 is the fluorescence spectrum of the spent reaction mixture at the end of the light reaction. Spectrum a2 consists of the emission of luminol at about 430 and fluoresceine at about 520nm. respectively, which appear independent and unaffected by the fact that the emitting species are integral parts of one molecule. It should be reminded here, however, that this statement is true for the position of the bands and not the intensity which is greatly reduced. In spectrum a1 the fluorescence of the fluoresceine moiety has remained unaltered, but the emission band with λ_{max} at 430nm has increased in intensity as the hydrazide has now been replaced by the phthalate ion, which in alkaline media has the same emission spectrum and higher efficiency.⁹ The chemiluminescence spectrum as the reaction proceeds, shown in b, consists, on the other hand, of only one band, the one arising from aminophthalate emission and is the same as that of the luminol light reaction. As there is no contribution whatsoever, from the fluoresceine moiety, it is obvious that emission during the chemiluminescent reaction of (IV) comes solely from the hydrazide moiety and that intramolecular energy transfer via the amide bridge cannot take place.

Experimental

(a) Synthesis of (II).

Glacial acetic acid (0.36g.) was added to a solution of fluoresceine (2g., 6.0 mmole) in a few ml. of anhydrous N,N -dimethylformamide and the mixture was heated under reflux. 3-Aminophthalhydrazide (2.1g., 12 mmole) was then added to the boiling mixture in small portions and the resulting mixture was heated under reflux for 10 hrs. The mixture was allowed to cool, the dark red precipitate was separated by filtration and was washed many times with water followed by 1% ammonium bicarbonate (6×50 ml.). The precipitate was then dissolved in aqueous NaOH and was precipitated as a colloid on neutralization with hydrochloric acid. This was separated by centrifuging and the process was repeated three times. This purification process followed by recrystallization from ethanol ensured complete

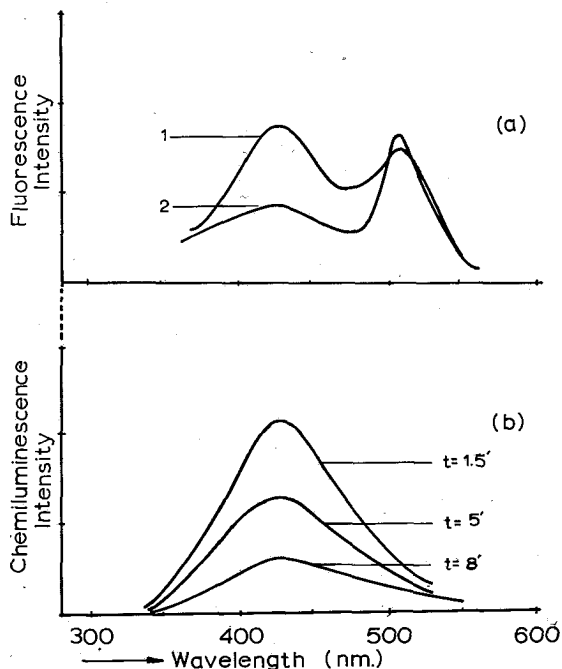


FIG. 2. (a) Fluorescence spectra of the reaction mixture of the hemin-catalysed reaction of (IV) before (2) and after the light reaction (1). Excitation λ_{\max} 355nm. (b) Chemiluminescence spectra of (IV) as the reaction proceeds.

removal of unreacted luminol and fluoresceine as verified by T.L.C. on cellulose (Merck, 5716) (eluent 0.1N NaOH). Illumination of the T.L.C. plate with strong U.V. light revealed one spot (R_f 0.42) plus negligible contamination by a yellow fluorescing product at R_f 0.56. The product was free of luminol and fluoresceine at R_f 0.63 and 0.82 respectively. Infrared absorption (KBr) at 1725cm^{-1} (Amide I Band) of the hydrazide C=O, O-H at 3420cm^{-1} and N-H at 3200cm^{-1} (bonded). Visible absorption λ_{\max} 500nm., $\epsilon=3800$ (solution in 0.01N NaOH). Yield: 1.9 g., 64%. Found: C, 68.35; H, 3.30; N, 8.65%. $\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6$ requires: C, 68.43; H, 3.46; N, 8.55%. Attempts to run a mass spectrum failed due to the very low volatility of the compound.

(b) Chemiluminescence Experiments

(i) Ozone production: A conventional Siemens-type ozonizer was employed^{1a} giving a 0.26% ozone-air mixture^{5c} at a flow rate of 340 ml. min.^{-1}

(ii) Chemiluminescence Quantum Yields: The experiments were carried out with samples 25 ml., 10^{-5} M of (II) or (III), in aqueous NaOH 0.01N. The reaction vessel (pyrex glass) was securely positioned in front of an E.M.I. 9514B photomultiplier tube, fed with 900 V and connected with a VARIAN F 80 x-y recorder. The apparatus was housed in a specially constructed light-proof dark chamber with suitable inlets for gasses and liquids. In the ozonization experiments,

ozone was bubbled through the reaction mixture and the intensity-time diagrams of the light reaction were obtained for different H_2O_2 -concentrations. In the hemin-catalysed experiments the hemin chloride solution, (0.001% in aqueous 0.01 NaOH) was added dropwise to the reaction mixture through which air was bubbled to ensure complete and rapid mixing, with simultaneous recording of the intensity time diagrams at various initial H_2O_2 -concentrations. The light intensity-time diagrams thus recorded were integrated with the aid of a very accurate planimeter and the integrals, proportional to the light sums of the reactions were compared with the integral recorded during the Standard Luminol Light Reaction⁶ employing the same geometry. In the latter case, the photomultiplier was again fed with 900V, but the recorder's sensitivity was reduced by a known factor on account of the higher light intensities involved. Corrections due to the photomultiplier's spectral response were unnecessary as both the chemiluminescence of luminol and of (II) fall in the same region of maximum spectral response of the S-11 photocathode. As the absolute quantum yield of the Luminol Standard is precisely known, the chemiluminescence quantum yield of (II) could be easily calculated.

(iii) Chemiluminescence Spectra. These were obtained with the aid of an AMINCO-BOWMAN spectrophotofluorometer with the excitation source off. Wide slits and fast scanings were set while the most flat section of the intensity time diagram was employed.

(c) Spectra:

Excitation and fluorescence spectra were run on an AMINCO-BOWMAN spectrophotofluorometer. Absorption spectra were run on a CARY 14 spectrophotometer and Infrared spectra on a PERKIN-ELMER 521 Instrument.

Acknowledgements

The authors wish to thank the N.R.C. "Demokritos" Analytical Laboratory for the elemental analyses and Mrs. E. Sekeri-Papazoglou for technical assistance.

Περίληψη

Χημικαταύγεια άμιδίων Φλουορεσκείνης - Λουμινόλης.

Περιγράφεται ή σύνθεσις τών άμιδίων τά όποία προκύπτουν άπό συμπύκνωσις Φλουορεσκείνης με Λουμινόλην και Φλουορεσκείνης με Άνιλίνην. Μελετάται έν συνεχεία ή χημικαταύγεια τών ένώσεων αυτών με σκοπόν τήν διερεύνησιν τής δυνατότητος ένδομοριακής μεταφοράς ένεργείας διεγέρσεως μέσω άμιδικής γεφύρας μετά χημικήν διεγερσιν. Άνακοινοϋται ή φωτονιακή άπόδοσις τής χημικαταύγειας άντιδράσεως καθώς και τά φάσματα χημικαταύγειας και φθορισμού προϊόντων και άντιδρώντων. Η χημικαταύγεις έκπομπή κατ' αυτήν τήν αντίδρασιν προκύπτει άπό άποδιέγερσιν του ύποκατεστημένου 3-άμινοφθαλικου ιόντος τó όποϊον παράγεται κατá τήν αντίδρασιν και δέν διαπιστοϋται μεταφορά ένεργείας διεγέρσεως πρós τήν Φλουορεσκείνην.

References and Notes

- 1 (a) Bersis, D.S. and Nikokavouras, J.: *Z. Physik. Chem. N.F.* **62**, 152, (1968).
(b) Nikokavouras, J., Mantaka, A.E., Marketos, D.G., Rakintzis, N.Th. and Vassilopoulos, G.: *Z. Physik. Chem. N.F.* **78**, 76, (1972).
(c) Mantaka, A.E., Marketos, D.G., Rakintzis, N.Th. Vassilopoulos, G. and Nikokavouras, J.: *Z. Physik. Chem. N.F.* **85**, 106, (1973).
- 2 Roswell, D.F., Paul, V. and White, E.H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4855, (1970).
- 3 Fischer, O. and Hepp, E.: *Ber.* **26**, 2236, (1893).
- 4 (b) Kamiya, I. and Kawai, S.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 1287, 1647 (1966).
- 5 (a) Nikokavouras, J. and Vassilopoulos, G.: *Z. Physik. Chem. N.F.* **85**, 205, (1973).
(b) Nikokavouras, J. and Vassilopoulos, G.: *Z. Physik. Chem. N.F.* **89**, 181, (1974).
- 6 (c) Nikokavouras, J., Vassilopoulos, G. and Perry, A.: *Chimika Chronika, New Series*, **4**, 23, (1975).
- 7 (a) Lee, J., Wesley, A.S., Ferguson, J.F. and Seliger, H.H.: "Biochemiluminescence in Progress", p. 35. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, (1966).
(b) Lee, J. and Seliger, H.H.: *Photochem. and Photobiol.* **15**, 227, (1972).
- 8 Omote, Y., Miyake, T., Ohmori, S. and Sugiyama, N.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 932, (1966) and **40**, 899, (1967).
- 9 McCapra, F.: *Quart. Rev.* **20**, 465, (1966).
- 9 Seliger, H.H.: "Light and Life", p. 200. J. Hopkins Press, (1961).

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP AND SPECIES VARIATION OF PROSTAGLANDIN E₁ HOMOLOGUES ON PLATELET FUNCTION *IN VITRO*

S. E. PAPAIOANNOU, E.R. WASKAWIC, AND R. N. SAUNDERS

Searle Laboratories, P.O. Box 5110, Chicago, Illinois 60680

(Received January 15, 1975)

Summary

Prostaglandin E₁ (PGE₁) has been indicated as a potential pharmacological agent for the prevention of blood platelet aggregation in lung-heart bypass devices and post-operative microthrombi formation. Using a turbidometric assay prostaglandin E₁ (PGE₁), 20-methyl-PGE₁, (d1)-20-methyl-PGE₁ (d1)-20-ethyl-PGE₁ and (d1)-20-propyl-PGE₁ have been found to display inhibitory activity against ADP-induced platelet aggregation in platelet-rich rat plasma. The relative potencies of these compounds based on dose-response comparisons using PGE₁ as the standard inhibitory agent, were found to be 1.0, 4.0, 1.6, 1.3, and 0.16 respectively. The inhibitory effect of PGE₁ and 20-methyl-PGE₁ on ADP-induced platelet aggregation was found to display a dose-response relationship on platelets obtained from various mammalian species. The activity of PGE₁ for the species studied was determined to be, in decreasing order: dog, rhesus monkey, rat, human and pig. In these studies, 20-methyl-PGE₁ was observed to possess inhibitory activity from 1.8 to 22.5 times greater than PGE₁, depending on the species tested.

Key words: Prostaglandin E₁, Homologues, Platelet Aggregation, structure-activity relationships, mammalian species.

Introduction

Because of the high potency of prostaglandins in variety of biological systems, many synthetic analogues have been studied for the determination of their biological activity profiles.¹⁻⁴

PGE₁ has been the most thoroughly studied prostaglandin *in vitro* and *in vivo*. Apart from the potent inhibitory activity on platelet aggregation, PGE₁ also shows other activities *in vivo*.⁵ Carlson *et al.*⁶ observed that, at infusion rates adequate for showing the pharmacological effect of PGE₁ on platelets in human volunteers, severe side effects were encountered. It is possible that other prostaglandins with longer half-lives and less pronounced side effects, i.e. separation of activities, may be useful as antithrombotic agents. With this in mind, we have tested several PGE₁ homologues and compared their *in vitro* antiaggregating activities.

Animal models for *in vivo* studies are necessary before prostaglandins may be evaluated clinically. A determination of the comparative efficacies of prostaglandins in different animal species is necessary for the design of studies of experimental thrombotic disease states in the most appropriate animal model, prior to investigations in humans. Kloeze⁷ has studied several prostaglandin analogues for inhibition of platelet aggregation in rat, pig, and human platelet-rich plasma (PRP), while Kinlough-Rathbone *et al.*⁸ have studied the effects of PGE₁ on the

platelet function of pigs and rabbits *in vitro* and *in vivo*. Mason and Read⁹ have extensively studied platelet aggregation at 25° C in the plasma of 12 mammalian species. Aggregation at 25°C, however, is quite different from that at 37°C and not representative of *in vivo* situations. As no comparative study of PGE₁ homologues has been published, especially with the most active 20-methyl-PGE₁⁽²⁾ in different animal species, we report here our results of such a study.

Materials and Methods

Reagents

Isotonic saline was adjusted to pH 7.3 with 0.1 N NaOH. Adenosine diphosphate (ADP) was obtained from General Biochemicals Co., Ohio and a stock solution (10 mg/ml) in saline was stored in aliquots at -20°C. One aliquot of this stock solution was thawed and kept on ice during one day's experiments. The biosynthetic¹ prostaglandins, PGE₁ and 20-methyl-PGE₁ were kindly supplied by Unilever Research Laboratorium, Vlaardigen, while the synthetic prostaglandins, (dl)-20-methyl-PGE₁, (dl)-20-ethyl-PGE₁, and (dl)-20-propyl-PGE₁ were kindly provided by Dr. Masateru Miyano of Searle Laboratories. The purity of each prostaglandin was over 95%. The prostaglandins were dissolved in isosaline 0.02 M CaCl₂ solution, aliquoted and stored at -20°C. All glass surfaces which would contact platelets were siliconized.

Methods

1). *Blood collecting and preparation of platelet-rich plasma (PRP)*

Human subjects and animals were fasted overnight, and the following morning (day of the experiment) blood was collected, discarding the first one ml after a clean venepuncture. The blood was drawn into vessels containing 3.8% sodium citrate in water (w/v) until the volume of blood was nine times the volume of anti-coagulant, and PRP prepared by centrifugation at room temperature as described below.

Male Sprague-Dawley rats were anesthetized with ether and blood collected by cannulation of the abdominal aorta. For one PRP preparation, the pooled citrated blood from five animals was subjected to centrifugation at 200 G for twenty minutes, and the upper layer was collected.

Each of three male mongrel dogs was separately bled from the jugular vein and PRP prepared by centrifugation at 100 G for sixteen minutes.

Two male pigs were bled from the jugular vein. Each pig was separately bled once of 27 ml blood, and the PRP was prepared by centrifugation of the citrated blood at 175 G for sixteen minutes.

Each of twelve male rhesus monkeys anesthetized with Sernalyn, was bled of 4.5 ml blood from the saphenous vein and the PRP was prepared by centrifugation of the pooled citrated blood at 175 G for sixteen minutes.

Two normal human donors, one male and one female, both nonsmokers, had taken no medication for at least one week before bleeding. Blood was drawn by the two syringe technique from the antecubital vein, and centrifugation (following citration) was performed at 100 G for sixteen minutes.

The PRP preparations were stored at room temperature and used within five hours after centrifugation.

2). *Platelet aggregation procedure*

The turbidometric method originally developed by Born¹⁰ and O'Brien¹¹ was used with a smaller volume of plasma per sample assayed, and performed on an Aggregometer^R (Chronolog Corporation, Broomall, Pa.). The PRP was adjusted to standard platelet counts by dilution with platelet poor plasma, according to the instrument instruction manual. Enough PRP was prepared for the assay of all PGE₁ homologues in triplicate by one PRP preparation, in one day. At 37°C, 0.5ml of PRP was mixed inside the Aggregometer^R cell with 0.05 ml of saline containing 1 μmoles of CaCl₂ to correct for the overdose of citration, followed one minute later, by the addition of 0.5 μg ADP in 0.05 ml. The turbidity change was recorded and the maximum decrease in optical density, ΔOD control, was calculated. This value was assumed to represent one hundred percent of ADP-induced platelet aggregation, which is reversible at this standard concentration of ADP (ie. 1 μg/ml PRP).

Addition of serial dilutions of each prostaglandin in isosaline-CaCl₂ in place of isosaline-control solution resulted in inhibition of platelet aggregation as was observed by reduced changes in maximal optical densities, ΔOD, due to inhibition of platelet aggregation. The response expressed as percent inhibition of the standard ADP-induced platelet aggregation was calculated by the formula: $100(\Delta OD \text{ control} - \Delta OD) / \Delta OD \text{ control}$. Dose response curves were drawn for each prostaglandin by plotting the mean percent inhibition of standard ADP-induced aggregation, versus the logarithm of prostaglandin dose. From the linear parts of the dose-response curves, ED₅₀, the prostaglandin mean dose which reduced the response of the standard ADP dose (1 mg/ml PRP) by one half, was determined and the potency of each prostaglandin relative to PGE₁ was calculated from the ration of ED₅₀ for PGE₁ over that for each of the other prostaglandin homologues.

Results

1). *Effects of PGE₁ homologues on rat platelets*

Typical dose-response curves for PGE₁ and 20-mwthyl-PGE₁ are shown in Figure 1.

The mean ED₅₀ values calculated were 0.024 and 0.006 μg/ml PRP respectively i.e. the relative potency for 20-methyl-PGE₁ is 4.0. The variability of response at one dose and with the same PRP preparation was less than fifteen percent.

On the basis of the dose-response for the other PGE₁ homologues the results in Table I were calculated. The two most active prostaglandin homologues, i.e. PGE₁ and 20-methyl-PGE₁, were then selected for study in several species.

2). *Comparative effect of PGE₁ and 20-methyl-PGE₁ on aggregation inhibition of platelets from different animal species.*

The standard ADP dose (1 μg/ml PRP) resulted in a reversible aggregation in PRP preparations from all species studied, although the degree of maximum aggregation and the rate of disaggregation showed minor differences among the species tested.

Animals from each species studied were bled once or more, and the dose-response curves for PGE₁ and 20-methyl-PGE₁ were drawn. The calculated mean ED₅₀ values, and the relative potencies for 20-methyl-PGE₁ are presented in Table II.

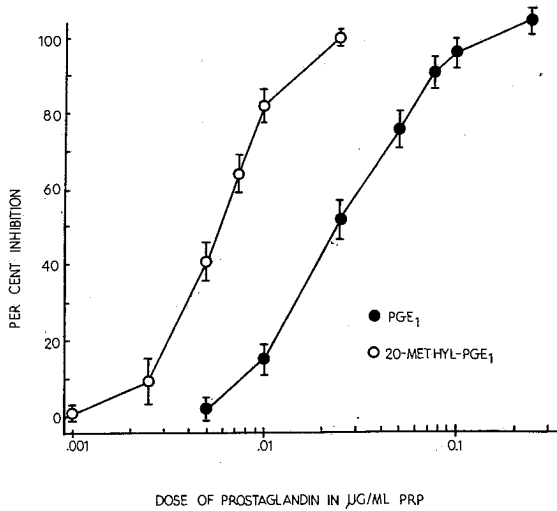


FIG. 1 Dose-response curves of PGE_1 and 20-methyl- PGE_1 inhibition of ADP-induced platelet aggregation in rat PRP. Triplicate determinations were performed for each dose.

TABLE I. Platelet Aggregation Inhibition Effect of PGE_1 Homologues on Rat PRP

Prostaglandin homologue	ED ₅₀ (µg/ml PRP)	Relative Potency
PGE_1 , biosynthetic	0.024	1.0 (reference)
20-methyl- PGE_1 , biosynthetic	0.006	4.0
(dl)-20-methyl- PGE_1 , synthetic	0.015	1.6
(dl)-20-ethyl- PGE_1 , synthetic	0.018	1.3
(dl)-20-propyl- PGE_1 , synthetic	0.15	0.16

ED₅₀ represents the mean dose which reduced the response of the standard ADP dose (1 µg/ml PRP) by one half.

$$\text{Relative Potency} = \frac{\text{ED}_{50} \text{ for } PGE_1}{\text{ED}_{50} \text{ for each homologue}}$$

The assay for each dose was repeated three times, with response variation comparable to that of Fig. 1. (i.e. less than 15%).

The variability of response from the same dose and PRP preparation was again less than fifteen percent, but a higher variation with different PRP preparations from the same animal, and species is reflected in the differences of ED₅₀ values in Table II. Pooling of citrated blood from several animals, as in the rat and monkey experiments, results in less variability of ED₅₀, than when each individual sample of PRP is tested separately.

The relative potency values for 20-methyl- PGE_1 within one species vary less widely than the ED₅₀ values of either prostaglandin, indicating that the effect of lengthening the ω -chain of PGE_1 by one methylene group enhanced inhibitory activity in all species herein studied.

TABLE II. Species variation of the inhibitory effect on platelet aggregation by PGE₁ and 20-methyl-PGE₁

Species	Animal No.	PRP No.	ED ₅₀ (μ g/ml PRP)		Relative Potency of 20-methyl-PGE ₁
			PGE ₁	20-methyl-PGE ₁	
Rat	Pool from five animals	1	0.034	0.0088	3.9
		2	0.021	0.0060	3.5
		3	0.024	0.0060	4.0
Pig	I II	1	0.12	0.041	2.9
		2	0.12	0.040	3.0
Dog	I II III	1	0.0006	0.00030	2.0
		2	0.0013	0.00024	5.4
		3	0.0035	0.00190	1.8
Rhesus Monkey	Pool from twelve animals	1	0.019	0.0045	4.2
		2	0.027	0.0045	6.0
Human	I (male)	1	0.017	0.0010	17.0
		2	0.060	0.0033	18.2
	II (female)	1	0.090	0.0040	22.5
		2	0.060	0.0034	17.6

ED₅₀ and Relative Potency for 20-methyl-PGE₁ are as defined in Table I.

Discussion

The dose-response curves of PGE₁ homologues for each species are parallel, but the slope of the straight line portion of these curves does change from one species to the other. This fact limits the validity of ED₅₀ as an absolute criterion for platelet sensitivity to prostaglandins, when different species are compared.

The relative potencies of ω -homo-PGE₁ (i.e. 20-methyl-PGE₁) and ω -nor-PGE₁ in rat PRP have been found to be 380% and 50% of PGE₁ by Kloeze.² Our data on 20-methyl-PGE₁ (Table I) closely agree with above results. Furthermore, we have found that the biosynthetic (1)-20-methyl-PGE₁ is more than twice as active as the racemic (synthetic) (d1)-20-methyl-PGE₁, suggesting that only the stereoisomer resulting from biosynthesis is active in inhibiting ADP-induced platelet aggregation. We conclude that the relative potency of inhibition is maximal for the PGE₁ homologue containing nine carbon atoms in the ω -side chain (i.e. 20-methyl-PGE₁) and that the potency decreases with decrease in this number of carbon atoms (towards PGE₁ and ω -nor-PGE₁) or increase (towards 20-ethyl-, and 20-propyl-PGE₁). This structure-activity relationship may also be maintained in other species, because as may be seen in Table II, 20-methyl-PGE₁ is consistently more active than PGE₁ in the five species studied.

Although the dose-response curves are not parallel among the species of Table II, the ED₅₀ values suggest that the sensitivity of platelets to PGE₁ increases in the following order of species: pig, human, rat, rhesus monkey, and dog. In the case of 20-methyl-PGE₁, the above order of sensitivity is as follows: pig, rat, human, rhesus monkey, and dog. Interestingly enough the relative potency of 20-methyl-PGE₁ in human PRP is much higher than in the other species PRP.

These results are in general agreement with those of Kloeze.⁷ Using his data we have estimated PGE₁ ED₅₀ values of 0.15, 0.02, and 0.015 for porcine, human, and rat PRP. The recording of reversible aggregation by the standard dose of ADP used in this study (i.e. 1 µg/ml PRP) varied slightly among species. One of the differences noted is that the rate of disaggregation of porcine PRP was lower than in the other species.

ADP is the final common pathway of irreversible platelet aggregation *in vivo*. *In vitro* inhibition of ADP-induced platelet aggregation by PGE₁, although a simplification of the *in vivo* phenomena, has been shown^{6,12} to parallel the effects of PGE₁ infusion in human volunteers and in rabbits, when the short half-life of PGE₁ *in vivo* is taken into consideration. As shown by Mills and Smith,¹³ and Haslam¹⁴ PGE₁ inhibits platelet aggregation by its effect on the adenylyl cyclase/cyclic AMP system.

Pharmacologically, it is not clear if *in vitro* studies as reported here are relevant to the pathogenesis or treatment of thrombotic disease states, but the ability of PGE₁ homologues to exert profound effects on platelets, *in vitro* and *in vivo*, necessitated more detailed structure-activity studies in the hope of designing a useful pharmacological agent.

Stibbe *et al.*¹⁵ have shown that PGE₁ has prevented thrombocytopenia in human heparinized blood circulating in heart-lung machine *in vitro*. Our interest in studying PGE₁ homologues as potential antiaggregating agents in heart-lung bypass devices and post-operative microthrombi formation *in vivo*, required the selection of appropriate species for experimental studies. From our results it seems that, among the species studied, the rhesus monkey is the animal model of choice for *in vivo* evaluation of prosthetic materials. Comparative blood coagulation and fibrinolysis studies¹⁶ also indicate closer similarity of primates to humans than other species in these respects. The dog would appear to be next in preference, although our *in vitro* studies indicate this species, to be more sensitive to PGE₁ and 20-methyl-PGE₁. The pig is the least sensitive species studied here. Indeed, heart-lung bypass studies^{17,18} in this species have proven very difficult.

Περίληψις

Σχέσις μεταξύ δομής και δράσεως ομολόγων τής προσταγλανδίνης E₁ επί των ιδιοτήτων των αιμοπεταλίων διαφόρων θηλαστικῶν *in vitro*.

Ἡ προσταγλανδίνη E₁ (PGE₁) ἐνδέχεται νὰ παρουσιάσῃ προστατευτικὴν φαρμακολογικὴν ἐνέργειαν διὰ τὰς περιπτώσεις συναθροίσεως τῶν αιμοπεταλίων εἰς μηχανὰς ἐξωσωματικῆς κυκλοφορίας τοῦ αἵματος καὶ κατὰ τὸν μετεγγειρητικὸν σχηματισμὸν μικροθρόμβων.

Τῇ βοήθειᾳ θολοφασματομετρικῶν μετρήσεων οἱ προσταγλανδίνες E₁ (PGE₁), 20-μέθυλο-PGE₁, (dl)-20-μέθυλο-PGE₁, (dl)-20-αἰθυλο-PGE₁, καὶ (dl)-20-πρόπυλο-PGE₁, διεπιστώθη ὅτι παρεμποδίζουν τὴν διὰ διφωσφορικῆς ἀδενοσίνης (ADP) συνάθροισιν τῶν αιμοπεταλίων εἰς ἐμπλουτισμένον εἰς αιμοπετάλια πλάσμα ἀρουραίου. Αἱ σχετικαὶ δραστηκότητες τῶν ἀνωτέρω προσταγλανδινῶν, καθορισθεῖσαι ἐπὶ τῇ βάσει συσχέτισεως δόσεως - ἀποτελέσματος, διὰ χρησιμοποίησεως τῆς PGE₁ ὡς μονάδος, προσδιορίσθησαν ἀντιστοίχως ὡς: 1.0, 4.0, 1.6, 1.3, 0.16.

Ἡ παρεμποδιστικὴ δράσις τῶν PGE₁ καὶ 20-μέθυλο-PGE₁ εἰς τὴν διὰ διφωσφορικῆς ἀδενοσίνης συνάθροισιν τῶν αιμοπεταλίων ἐκ διαφόρων

θηλαστικῶν, εὐρέθῃ ἀνάλογος τῆς δόσεως τῶν ἐνώσεων τούτων. Ἡ ἐπίδρασις τῆς PGE₁ ἐπὶ τῶν αἱμοπεταλίων τῶν θηλαστικῶν τῆς παρουσίας ἐργασίας, διεπιστώθη ὅτι μειοῦται κατὰ τὴν ἀκόλουθον σειρὰν θηλαστικῶν: σκύλος, πίθηκος, ῥέζους, ἀρουραῖος, ἄνθρωπος, χοῖρος. Ἡ παρεμποδιστικὴ δράσις τῆς 20-μέθυλο-PGE₁ εὐρέθῃ μεγαλυτέρα τῆς PGE₁ κατὰ 1.8 ἕως 22.5 φορές, ἐξαρτωμένης ἐκ τοῦ εἴδους τοῦ μελετηθέντος θηλαστικοῦ.

References and Notes

- 1 Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H., Pabon H.J.J. and Van-Dorp, D.A.: Biologically active prostaglandins from some new oddnumbered essential fatty acids. *Recueil des Travaux Chimiques de Pays-Bas* 87, 461, 1968.
- 2 Kloeze, J.: Relationship between chemical structure and platelet aggregation activity of prostaglandins. *Biochemica et Biophysica Acta* 187, 285, 1969.
- 3 Kloeze, J.: Prostaglandins and platelet aggregation *in vivo*. I. Influence of PGE₁ and ω-homo-PGE₁ on transient thrombocytopenia and of PGE₁ on the LD₅₀ of ADP. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 23, 286, 1970.
- 4 Honstra, G.: Degree and duration of prostaglandin E₁-induced inhibition of platelet aggregation in the rat. *European Journal of Pharmacology* 15, 343, 1971.
- 5 Weeks, J.R. Sekhar, N.C. and Ducharme, D.W.: Relative activity of prostaglandins E₁, A₁, E₂ and A₂ on lipolysis, platelet aggregation, smooth muscle and the cardiovascular system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 21, 103, 1969.
- 6 Carlson, L.A. Irion, E. and Oro, L.: Effect of infusion of prostaglandin E₁ on the aggregation of blood platelets in man. *Life Sciences* 7, 85, 1968.
- 7 Kloeze J.: Influence of prostaglandin E₁ on platelet adhesiveness and platelet aggregation. In: *Prostaglandins Nobel Symposium No. 2*. S. Bergström and B. Samuelson (Eds.) Stockholm, Almqvist and Wiksell. 1967, p. 241.
- 8 Kinlough-Rathbone, R.L., Packham, M.A. and Mustard, J.F.: The effect of prostaglandin E₁ on platelet function *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Haematology* 19, 559, 1970.
- 9 Mason, R.G. and Read, M.S.: Platelet response to six agglutinating agents: Species similarities and differences. *Experimental and Molecular Pathology* 6, 370, 1967.
- 10 Born, G.V.R.: Quantitative investigations into aggregation of blood platelets. *Journal of Physiology (London)* 162, 67, 1962.
- 11 O'Brien, J.R.: Platelet aggregation, Part II. Some results from a new method of study. *Journal of Clinical Pathology* 15, 452, 1962.
- 12 Bousser, M-G.: Prostaglandin E₁ and platelets. *Biomedicine* 18, 95, 1973.
- 13 Mills, D.C.B. and Smith, J.B.: The influence of platelet aggregation on drugs, that affect the accumulation of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in platelets. *Biochemical Journal* 121, 185, 1971.
- 14 Haslam, R.J.: Interaction of pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase. *Series Haematologica* 6, 333, 1973.
- 15 Stibbe, J., Ong, G.L., Ten Hoor, F., Nauta, J., Van Der Plas, P.M., Vergroesen, A.J., De Jong, D. and Krenning-Douma, E.: Influence of prostaglandin E₁ on platelet decrease in heart-lung machine. *Haemostasis* 2, 294, 1974.
- 16 Mason, R.G. and Read, M.S.: Some species difference in fibrinolysis and blood coagulation. *Journal of Biomedical Material Research* 5, 121, 1971.
- 17 Swan, H. and Piermattei, D.L.: Technical aspects of cardiac transplantation in the pig. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 61, 710, 1971.
- 18 Swan, H. and Meagher, D.N.: Total body bypass in miniature pigs. Postperfusion pulmonary hypertension. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 61, 957, 1971.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF MONENSIN IN FEEDS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND DIRECT SCANNING SPECTRODENSITOMETRY.

DIMITRIS CH. KOUFIDIS*

Laboratory of Nutrition. Director: Prof. Dr. V. Vassilopoulos. Faculty of Veterinary Medicine. University of Thessaloniki. Thessaloniki, Greece.

(Received July 6, 1976)

Summary

Quantitation of Monensin, an antibiotic used as anticoccidial and improving feed efficiency factor, can be accomplished *in situ* by densitometric scanning using the reflectance technique, after spraying with vanillin color reagent. The technique described was successfully applied to analysis of feeds fortified with Monensin. The method is sensitive and reproducible. As low as 30 ppm of Monensin can be measured.

Key words: Monensin, Feeds, TLC, Direct Scanning Spectrodensitometry.

Introduction

The control of coccidiosis in animals is a serious problem particular in the poultry industry. Monensin, previously referred to as Monensic acid, is a member of a family of antibiotics which possesses anticoccidial activity in chickens,¹ calves² and lambs.³

Monensin is the major factor of a group of closely related, biologically active compounds produced by a strain of *Streptomyces cinnamonensis*.^{4,5,6}

The molecular formula of Monensin was determined to be C₃₆H₆₂O₁₁ by mass spectrometry. Fig. I shows a planar representation of the structure.⁷

Several methods of analysis have been employed for the determination of Monensin in feeds. Kline *et al.*⁸ proposed a microbiological assay. Kavanagh and Willis⁹ developed an automated photometric microbiological assay in poultry rations. Golab *et al.* employed a colorimetric method.¹⁰ Breunig and Kline¹¹ described a microbiological assay of Monensin in chicken rations. Donoho and Kline¹² developed a semi-quantitative thin layer bioautographic procedure for the determination of Monensin residue in chick tissues.

Although the colorimetric method is simple, sensitive and reproducible, it has not been definitely established whether the color reaction does or does not occur with Monensin degradation or metabolic products;¹⁰ that is of great importance in the case of examination of aged feeds.

Furthermore, the bioautographic thin layer chromatography (TLC) may be the method that permits the detection of the antibiotal action of this compound at low levels, but, unfortunately, its application to make quantitative determination

*Chemist.

is rather difficult. On the other hand the chemical detection of Monensin on TL chromatograms provides no information about the biological activity, but it differentiates the degradation or metabolic products and permits the quantitation by direct densitometry.¹³

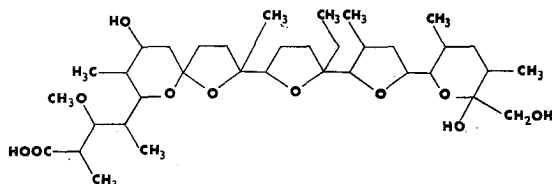


FIG. 1. Structure of Monensin.

In direct densitometry, the reports about the relationship between absorbance and the concentration, i.e. the weight of the compound spotted, vary. If the Lambert-Beer law were always obeyed, one could expect a linear relationship between the logarithm of the concentration applied and the logarithm of the integrated absorbance (or fluorescence). Unfortunately, most often this is not the case, because the optical phenomenon of the propagation of the light in a high scattering medium is quite different from that of the propagation in a clear solution. The behavior of light when it falls on an absorbing substance distributed on the surface of the layer is more than complex.

The complicate mathematical treatment of these effects, which have been studied in detail by several authors,^{14,15,16,17,18,19,20,21,22} with the help of the Kubelka-Munk theory,^{15,16} requires a certain mathematical background that is hardly acceptable for daily analysis, as performed by the average laboratory personnel.

An empirical approach to quantitation requires the plotting of calibration curves. For a single compound and for each plate, several known quantities of standards have to be run and measured to obtain the curve in the desired range.

Experimental

Instruments

The instrument used in this work was the Schöffel Spectrodensitometer Model SD-3000, double beam, that utilizes as light source a 200-watt Xenon-Mercury lamp. The radiated light passes through the entrance slit of the monochromator, which has a linearly calibrated wavelength selector dial, enabling the user to select monochromatic light in the range of 200-700 nm.

The, by the TLC plate, scattered light can be detected by photomultipliers either directly from underneath the plate (transmittance measurements) or above the plate at 45° to the incident light (reflectance measurements).

The instrument included also a Density Computer, Model SDC-300 with 100mV chart recorder and Disc Integrator.

Reagents and Materials

a. Acetone, n-Hexane, Chloroform, Methanol, Carbon tetrachloride. All analytical grade reagents.

b. Spray reagent. Dissolve 3.0 gr. vanillin A.R. in 50 ml absolute methanol, add 1 ml concentrated H_2SO_4 with swirling and dilute to 100 ml with methanol. Mix well and store in the dark. Prepare fresh daily.

c. Monensin standard solution. Accurately weigh enough Monensin sodium salt (Elanco Analytical Laboratory, Lilly Research Center) into 100 ml vol. flask to give concentration of 1,6 mg/ml. Dilute to the volume with absolute methanol. Store at 5° C; discard after two weeks.

d. Silica gel G, for TLC, Merck, or equivalent.

e. Silica gel 60, for column chromatography, 70-230 mesh, activated, Merck, or equivalent.

Preparation of the plates

TLC plates (250 μ) were prepared by mixing 30 g. Silica gel G with 65 ml H_2O . The slurry was spread over five 20×20 cm glass plates using the CAMAG automatic TLC coater. They were left in position for 15 min. to allow the layer to set and then were placed in a drying oven at 110° C for 1 hour. The dried plates were scored into 10 mm lanes to facilitate double beam operation and were stored to the desiccator cabinet until use.

Application of the sample

A methanolic solution of Monensin was prepared at concentration of 1,6 mg/ml and the other solutions were prepared by dilution. Using a Hamilton microsyringe (10 μ l), samples of 3 μ l of the above solutions were spotted to the plate on alternate lanes. The solutions should be dropped a little at a time and dried between each application with a current of air. Great care must be taken not to damage the surface of the layer. The spots must be completely dry before the plate is put into the development chamber.

Chromatography

The plate was developed in a equilibrated chamber, filled with carbon tetrachloride-methanol (80:20 v/v), until the solvent front reached a high of 17 cm. The plate was removed and dried with an air drier.

Visualization of the spots

After drying, the developed plate was evenly sprayed with the vanillin spray reagent and heated for 5 min. in an oven at 110° C. Monensin gives an intense red spot with $R_f = 0.5$. Test sensitivity of the system is ca 0.5 μ g/spot.

Densitometry

The plate was allowed for 30 min in the dark at room temperature in order to equilibrated and then was scanned at wavelength of maximal absorption (500 nm) in both reflectance and transmittance mode (Monochromator slit 0,5 mm, image slit 1.0 mm scan speed 10 cm/min, recorder chart speed 3 cm/min, range 0.4-1 O.D. units.

Determination of Monensin in Feeds.

Extraction

20 gr. finally ground sample were weighted into 250 ml. flat bottom, glass stoppered flask and shaken with 100 ml acetone in wrist action shaker overnight;

then 50 ml of extract were pipetted into 50 ml centrifuge bottle and centrifuged at 3000 c/min for 10 min. The supernatant fluid was transferred into 50 ml round bottom, ground joint flask and evaporated to dryness by rotary vacuum evaporation.

Purification

Silica gel chromatographic columns were prepared by placing a ball of glass wool, loosely, in the bottom of a 18×300 mm chromatography tube and adding n-hexane until the column is ca ½ full; then were added 3 gr (4 cm section) silica gel 60, for column chromatography, 70-230 mesh (Merck), under stirring with a glass rod to eliminate air bubbles, and 2 cm of anhydrous sodium sulphate to the top of silica gel. The hexane was drained to the top of Na₂SO₄. The extraction residue was then applied to the column by dissolving in two 10 ml portions of n-hexane. The column was developed with 100 ml chloroform and the Monensin was eluted from the column with 50 ml chloroform-methanol (95:5 v/v), collected in 100 ml round bottom, ground joint flask.

The Monensin eluate was evaporated to dryness by rotary vacuum evaporation and the residue was transferred to 5 ml vial with n-hexane. After evaporation of the hexane under stream of N₂, the residue was redissolved in exactly 1 ml methanol. The vial was sealed with Teflon screw-cap and shaken vigorously in order to dissolve the residue.

TLC Chromatography

Portions (3 µl) of the sample were applied, in duplicate, to silica gel TLC plates, along with the appropriate standards, and the plate was developed, sprayed and evaluated according to the prementioned procedure.

Results and discussion

The first step in the present investigation was to establish whether the measurements must be carry out by transmittance or reflectance mode.

TABLE I. Reflectance versus Transmittance

Sample weight (in µg)	Reflectance (Integrator units)	Transmittance
0.6	75	50
1.2	124	88
1.6	153	120
2.0	208	144
2.4	251	180
3.2	293	213
4.0	325	240
4.8	345	255

Table I indicates that reflectance mode is more sensitive than transmittance. Figure 2 shows both response curves obtained by reflectance and transmittance as well.

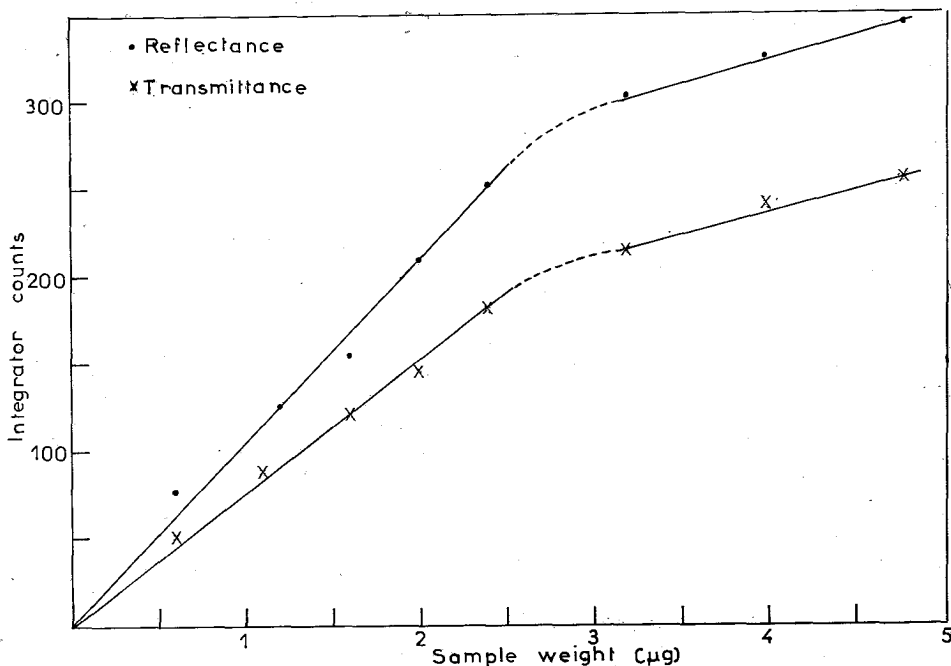


FIG. 2. Response curves for Monensin. Wavelength 500 nm, monochromator slit 0.5 mm, image slit 1 mm, range 0.4-1 O.D. units.

Figure 3 shows a densitometric scanning of monensin standard. The reflectance curve showed a greater response than the transmittance and the linear response range was for both nearly the same (up to 2.5 μg). Above this limit the curves flattened out. Although transmittance measurements may be theoretically superior,¹³ use of reflectance in the present study was found more advantageous because of the greater response and the lower background fluctuations produced by stray light on, probably, unevenly coated plates. "Oversaturation" of the spot causes the flattening of the curves. By these conditions the optimal working range was 0.6-2.5 $\mu\text{g}/\text{spot}$.

The second step was to define the reproducibility of multiple scans of a single spot as well as the reproducibility of multiple scans of several spots of the same concentration. This was done for levels of concentration in the optimal working range with the solutions adjusted so that all samples were applied in 3 μl volumes. Tables II and III summarise the results. On the other hand, as shown in Table II, the stability of the spot color intensity was excellent during a period of 3 hours at least, a period sufficient to scan, in triplicate, three plates with eight samples on each.

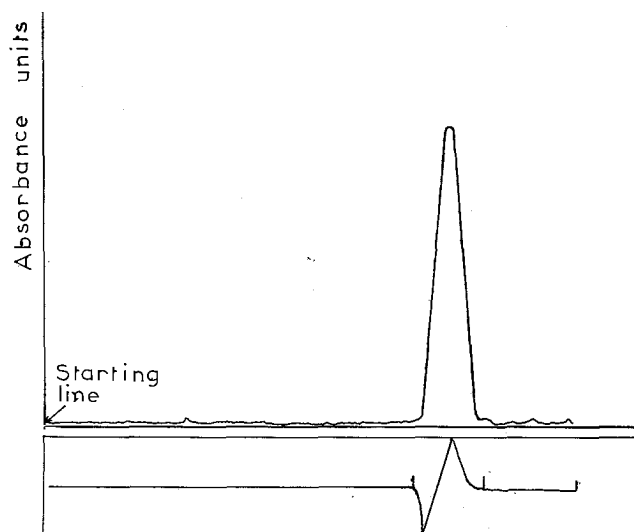


FIG. 3. Densitometric scanning by reflectance mode of Monensin (1.5 μg).

TABLE II. Reproducibility of scanning of the same spot

Sample weight (in μg)	Number of scans	Mean Integrator counts	Standard Deviation	Relative Standard Deviation %
0.6	5	38	1.3	3.5
1.2	5	80	0.7	0.9
1.6	5	101	1.8	1.8
2.4	5	151	1.0	0.7

TABLE III. Reproducibility of scanning of the same quantity

Plate	Sample weight (in μg)	Number of spots	Mean Integrator counts	Standard Deviation	Relative Standard Deviation %
1	0.6	8	50	5.6	11.2
2	1.2	8	128	3.5	2.8
3	2.4	8	211	2.3	1.1

Following the above described procedure we assayed 25 laboratory samples fortified with Monensin in the recommended feeding levels of 30-130 ppm. Among these samples 12 were originated from chicken rations and 13 from feed concentrates for ruminants. Table IV shows the precision and accuracy data of the method. According to this procedure we also analysed 5 samples of commercial type chicken rations containing Monensin.

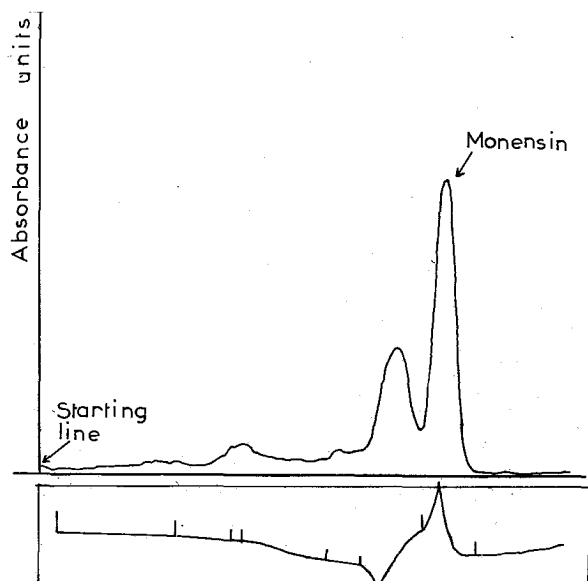


FIG. 4. Densitometric scanning by reflectance mode of a Monensin contained extract.

TABLE IV. Precision and accuracy data for the TLC determination of Monensin by reflectance densitometry.

Monensin taken (in ppm)	No. of detns.	Mean Monensin found (in ppm)	Standard deviation	Relative Standard deviation %	Mean error	Relative error %
30	6	28	1.61	5.75	-2	6.6
50	7	49	5.35	10.90	-1	2.0
90	6	85	6.77	7.96	-5	5.5
130	6	128	2.72	2.12	-2	1.5
				Mean 6.70		Mean 3.9

The purification of the extracts by the modified method of Donoho¹² was essential to remove interference substances such as lipids, causing a serious background shift of the base line during the densitometric scanning. Figure 4 shows a densitometric scanning of a feed extract, contained Monensin.

From table IV one could say that the recovery of Monensin by the method described was found to be quite satisfactory (mean value 96,1% in the range 30-130 ppm). Golab e.a.¹⁰ reported a recovery of 118,9 gr/lb from a theoretical concentration of 110 gr/lb, whereas Kline e.a.⁸ a mean value of 87,3%.

By the method described as low as 30 ppm of Monensin could be measured. Modifications of the weight extracted and the volume applied to the plate should improve markedly this limit.

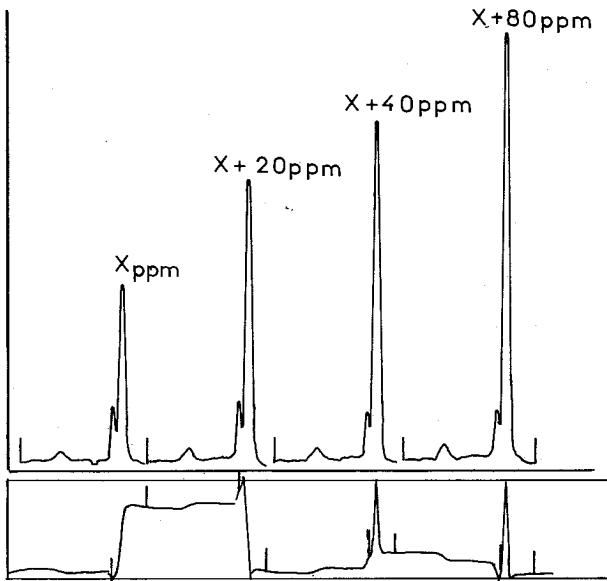


FIG. 5. Densitometric scanning by the method of additions.

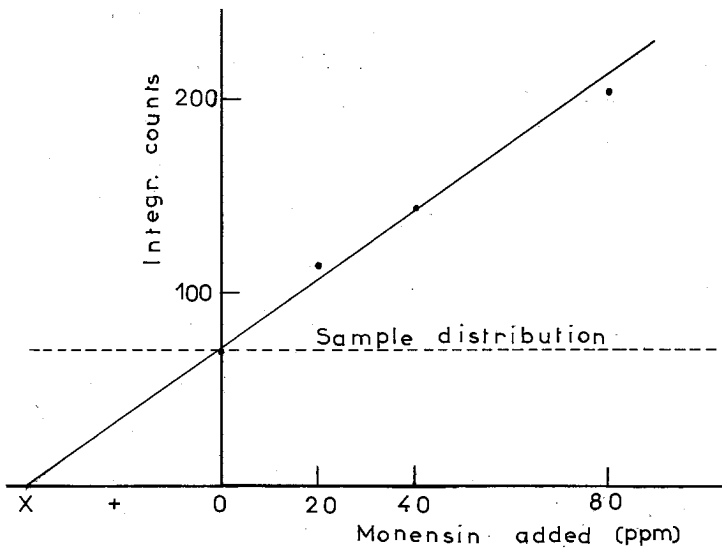


FIG. 6. Method of additions. Calibration graph.

The method of standard additions may be applied as a means of increasing accuracy. Figure 5 shows the densitometric scanning of feed extracts in which 0,20,40 and 80 ppm were added. Figure 6 shows the calibration graph for this procedure.

Περίληψις

Ποσοτικός προσδιορισμός μονενσίνης εις ζωοτροφάς δια τής χρωματογραφίας επί λεπτής στιβάδος και τής απ' εϋθείας φωτομετρήσεως επί τής πλακός.

Ἡ μονενσίνη εἶναι μέλος τάξεως ἀντιβιοτικῶν, τὰ ὁποῖα παρουσιάζουν ἀντιογκιδιοστατικὴν δρᾶσιν εἰς τὰ ὀρνίθια, μόσχους καὶ ἄμνους. Ἡ εἰκὼν 1 δεικνύει τὸν συντακτικὸν τύπον τῆς ἐνώσεως.

Μεταξὺ τῶν διαφόρων μεθόδων αἱ ὁποῖαι προετάθησαν διὰ τὸν προσδιορισμὸν τῆς μονενσίνης εἰς τὰς ζωοτροφάς, συγκαταλέγονται μικροβιολογικαὶ^{8,9,11} καὶ φωτομετρικαὶ^{9,10} ὡς καὶ μία βιοαυτογραφικὴ ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος.¹²

Αἱ μικροβιολογικαὶ μέθοδοι μειονεκτοῦν λόγῳ τῆς δυσχεροῦς ἐφαρμογῆς τῶν διὰ ποσοτικὸν προσδιορισμὸν, ἐνῶ ἡ χρωματομετρικὴ παρέχει θετικὰ ἀποτελέσματα καὶ διὰ τὰ προϊόντα ἀποικοδομήσεως ἢ μεταβολισμοῦ τῆς προκειμένης ἐνώσεως.¹⁰ Τοῦτο εἶναι μεγίστης σημασίας προκειμένου περὶ ἐξετάσεως ζωοτροφῶν, διατηρηθεισῶν ἐπὶ μακρόν.

Τὰ μειονεκτήματα αὐτὰ αἴρονται διὰ τῆς χρησιμοποίησεως, ὡς μεθόδου προσδιορισμοῦ, τῆς χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος καὶ τῆς απ' εϋθείας μετρήσεως τῆς ὀπτικῆς πυκνότητος τῶν κηλίδων τῆς μονενσίνης ἐπὶ τοῦ χρωματογραφήματος, ἀφοῦ καταστοῦν ὄραται διὰ ψεκασμοῦ μὲ ὄξινον, διὰ H_2SO_4 , μεθανολικὸν διάλυμα βανιλίνης.

Διὰ τὴν μέτρησιν τῆς ὀπτικῆς πυκνότητος τῶν κηλίδων ἐχρησιμοποιήθη τὸ Spectrodensitometer Schoeffel SD-3000, διπλῆς δέσμη, τὸ ὁποῖον ἦτο συνδεδεμένον μετὰ διατάξεως μετρήσεως τῆς ὀπτικῆς πυκνότητος (Density Computer SDC-300).

Τὸ ὄργανον ἐπιτρέπει μετρήσεις ἀποσβέσεως εἴτε κατόπιν ἀνακλάσεως τοῦ φωτὸς (Reflectance mode), εἴτε κατόπιν διελεύσεώς του διὰ μέσου τῆς δεδομένης κηλίδος τοῦ χρωματογραφήματος (Transmittance mode).

Εἰς τὰς ἡμετέρας μετρήσεις ἐπελέγη ἡ μέτρησις ἀποσβέσεως τοῦ φωτὸς κατόπιν ἀνακλάσεως. Τὸ χρησιμοποιηθὲν χρωματογραφικὸν σύστημα ἦτο: Πλάκες TLC ἐκ silica gel πάχους 250 μ. Ὑγρὸν ἀναπτύξεως μίγμα τετραχλωράνθρακος - μεθανόλης (80:20). Ἐμφάνισις κατόπιν ψεκασμοῦ διὰ τοῦ μεθανολικοῦ διαλύματος βανιλίνης καὶ θερμάνσεως εἰς 110° C ἐπὶ 5 λεπτά. Ὑπὸ τὰς συνθήκας αὐτὰς ἡ μονενσίνη δίδει ἐρυθρὰς κηλίδας $R_F = 0,5$. Ὁριον ἀνιχνεύσεως 0,5 μg/κηλίδα.

Ἡ φωτομέτρησις διεξήχθη ὑπὸ τὰς ἐξῆς συνθήκας: μῆκος κύματος 500 nm, σχισμὴ μονοχρωμάτορος 0,5 mm πάχος φωτεινῆς δέσμη 1,0 mm, ταχύτης σαρώσεως τῆς TLC πλακός 10 cm/Min., ταχύτης καταγραφῆς 3 cm/min., εὐαίσθησις 0,4-1 O.D. UNITS.

Ἡ εἰκὼν 3 δεικνύει τυπικὰς καμπύλας ἀναφορᾶς. Περιοχὴ γραμμικότητος 0,6-2,5 μg μονενσίνης/κηλίδα.

Ἡ ἐπαναληψιμότης τῶν μετρήσεων ἐμφαίνεται εἰς τοὺς Πίνακας II καὶ III.

Διὰ τὴν ἀνάλυσιν ζωοτροφῶν προηγεῖται ἐκχύλισ δι' ἀκετόνης καὶ ἐπακολουθεῖ ἀπομάκρυνσις τῶν παρενοχλοῦσῶν οὐσιῶν διὰ χρωματογραφίας στήλης. Τὸ ἐκχύλισμα, μετὰ προηγούμενην συμπύκνωσιν, χρωματογραφεῖται ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος καὶ φωτομετρεῖται.

Δια τῆς μεθόδου αὐτῆς ἐξητάσθησαν 25 δείγματα, τεχνητῶς ἐπιβαρυνθέντα δια μονενσίνης καὶ δια περιοχὴν συγκεντρώσεως ταύτης 30-130 ppm. Ὁ Πίναξ IV δεικνύει τὴν ἐπαναληψιμότητα καὶ ἀκρίβειαν τῆς μεθόδου.

References and Notes

- 1 Shumard, R.F. and Callender, M.E.: "Monensin, a New Active Compound, VI. Anticoccidial Activity", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.369 (1967).
- 2 Fitzgerald, R.R. and Mansfield, M.E.: "Efficacy of Monensin against Bovine Coccidiosis in young Holdstein Frisian Calves", *J. Protozool.* **20**, 121 (1973).
- 3 Bergstrom, P.C. and Maki, L.R.: "Cocciostatic Action of Monensin Fed to Lambs; Body weight Gains and Feed Conversion Efficacy". *Am. J. Vet. Res.* **37**, 79 (1976).
- 4 Haney, M.E. Jr. and Hoehn, M.M.: "Monensin, a New Biologically Active Compound, I. Discovery and Isolation", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.349 (1967).
- 5 Stark, W.W., Knox, N.G., Westhead, J.E.: "Monensin, a New Biologically Active Compound, II. Fermentation Studies", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.353 (1967).
- 6 Gorman, M., Chamberlin, J.W. and Hamill, R.L.: "Monensin, a New Biologically Active Compound, V. Compounds Related to Monensin", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.363 (1967).
- 7 Agtarap, A. and Chamberlin, J.W.: "Monensin, a New Biologically Active Compound, IV. Chemistry", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.359 (1967).
- 8 Kline, R.M., Stricker, R.E., Coffman, J.D., Bikin, H. and Rathmacher R.F.: "Determination of Monensin by Microbiological Plate Assay", *J.A.O.A.C.* **53**, 49 (1970).
- 9 Kavanagh, F.W. and Willis, M.: "Automated Photometric Microbiological Assay for Monensin in Poultry Rations", *J.A.O.A.C.* **55**, 114 (1972).
- 10 Golab, T., Barton, S.J., and Scroggs, R.E.: "Colorimetric Determination of Monensin", *J.A.O.A.C.* **56**, 171 (1973).
- 11 Breunig, L., Kline, R.: "Microbiological Assay of Monensin in Chicken Rations", *J.A.O.A.C.* **55**, 718 (1972).
- 12 Donoho, A.L. and Kline, R.M.: "Thin-Layer Bioautographic Assay of Monensin in Chicken Tissues", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.763 (1967).
- 13 Touchstone, J.C., Levin, S.S., Muravec, T.: "Spectrodensitometry of Thin-Layer Chromatograms" in Touchstone, J.C. *"Quantitative Thin Layer Chromatography"*, Wiley Interscience, N.York, (1973).
- 14 Lefar, S.M. and Lewis, D.: "Thin-Layer Densitometry", *Anal. Chem.* **42**, 79, (1970).
- 15 Kubelka, P. and Munk, F.Z.: *Tech. Physik* **12**, 593 (1931).
- 16 Kubelka, P.: *J. Opt. Soc. Am.* **38**, 448 (1948).
- 17 Goldman, J. and Goodall, R.R.J.: *Chromatog.* **32**, 24 (1968).
- 18 Frei, R.W. in *"Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods"*, Niederweiser, A. and Pataki, G., Ann Arbor Sci. Mich. 1971.
- 19 Grimm, W.: "Grundlagen zur Rationellen Anwendung der Quantitativen Dünnschicht Chromatographie", *J. Chromatog.* **89**, 39 (1974).
- 20 Ebel, S. and Kussmaul, H.: "Quantitative Dünnschicht-Chromatographie", *Z. Anal. Chem.* **269**, 10 (1974).
- 21 Novacek, V. "Quantitative Analysis of Thin-Layer Chromatograms". *American Laboratory*, 1969, reprinted by Schöffel Instr. Corp. N. Jersey USA.
- 22 Novacek, V. "Errors in Quantitative Analysis of Thin-Layer Chromatograms", *American Laboratory* **85**, 1973, reprinted by Schöffel Instr. Corp. N. Jersey USA.
- 23 AOAC. *"Official Methods of Analysis"*, p.809, 12 th Edit. (1975).
- 24 Stahl, E.: *"Thin-Layer Chromatography"*, 2ond Edit. Springer Verlag, Berlin, (1969).
- 25 Wagman, G.H. and Weinstein, M.J.: *Chromatography of Antibiotics*, p.120. Elsevier Sci. Publ. Co. N. York (1975).

POLAROGRAPHISCHES VERHALTEN VON TRIPHENYLARSINOXID IN WASSER-METHANOL-UND METHANOL-LÖSUNGEN.

D. JANNAKOUDAKIS, P.G. MAVRIDIS und J. MARKOPOULOS
Physikalisch-Chemisches Laboratorium der Universität Thessaloniki
(Erhalten am 30 Oktober 1975)

Zusammenfassung

Es wurde das polarographische Verhalten des Triphenylarsinoxids (TAsO) in Wasser-Methanol- und Methanol-Lösungen bei Abwesenheit und Anwesenheit von Protonendonatoren untersucht.

Es wurde bewiesen, dass das TAsO, sowohl in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen als auch in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen bei Anwesenheit von Benzoesäure, durch Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen zu dem entsprechenden Triphenylarsin reduziert wird. Es wurde das verschiedenartige polarographische Verhalten des TAsO in Methanol-Lösungen bei Abwesenheit von Protonendonatoren festgestellt. In diesem Fall wird der oben genannte Depolarisator durch die Aufnahme von zwei Elektronen und die Abspaltung einer Phenylgruppe zum entsprechenden Anion reduziert.

Die Tatsache, dass das TAsO in den oben genannten Lösungs-Systemen bei Anwesenheit von Protonen polarographisch zum entsprechenden Triphenylarsin reduziert wird, wurde auch auf rein chemischem Weg durch die Reduktion des TAsO mit Natriumamalgam als Reduktionsmittel in Methanol bewiesen. Das Reduktionsprodukt konnte in der Tat durch IR-Spektroskopie als Triphenylarsin identifiziert werden.

Einleitung

In einer früheren Arbeit¹ über die Wirkung des Triphenylphosphinoxids (TPO), des Tri-*n*-octylphosphinoxids (TOPO) und des Triphenylarsinoxids (TAsO) auf die polarographische Reduktion des Nitroäthans in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen (pH = 2,2 10% v/v in MeOH), haben wir festgestellt, dass das TAsO ein eigenartiges polarographisches Verhalten zeigt. Unter kleinen Konzentrationen wirkt es als ein starker Inhibitor; es wird jedoch gleichzeitig an der Hg-Tropf-Elektrode reduziert. Seine polarographische Reduktion ist bei Abwesenheit anderer Depolarisatoren und bei Anwesenheit von TPO diffusionsbedingt.

Die beobachtete Welle des TAsO wurde seiner möglichen Reduktion, in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen (pH = 2,2), zu dem entsprechenden Triphenylarsin zugeschrieben.

Auf Grund dieses eigenartigen Verhaltens, erschien uns sinnvoll das polarographische Verhalten des TAsO in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen ausführlich zu untersuchen.

Experimentelles und Ergebnisse

Die polarographischen Kurven wurden mit dem Polarographen "Polariter PO4" der Firma Radiometer aufgenommen. Die Lösungen, wie auch die polarographische Messzelle wurden bei 25°C thermostatiert. Die Entlüftung der zur Messung bestimmten Lösungen erfolgte durch Durchleiten von reinem Stickstoff (7 Minuten). Um eventuelle Konzentrationsänderungen zu vermeiden wurde der Stickstoff vorher durch eine thermostatierte Waschflasche geleitet, die jeweils die zur Messung bestimmte Lösung enthielt. Das TAsO, Reinheitsgrad "purum" (Schmp. 195,5-196° C), wurde von der Fa. Fluka A.G. bezogen. Als Grundelektrolyte (10^{-1} M) wurden LiCl Reinheitsgrad "purum wasserfrei" der Firma Merck, KCl derselben Firma "pro analysi", $(C_2H_5)_4NJ$ der Fa. Fluka Reinheitsgrad "puriss" genommen sowie die Puffer-Systeme folgender Zusammensetzung:

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| a) HCl | pH = 2,2 |
| b) HCl + KCl | pH von 2,2 bis 2,45 |
| c) $CH_3COOH + CH_3COONa$ | pH von 4,89 bis 6,70 |
| d) $H_3BO_3 + NaOH + KCl$ | pH von 8,3 bis 9,36 |
| e) NaOH | pH = 12,9 |

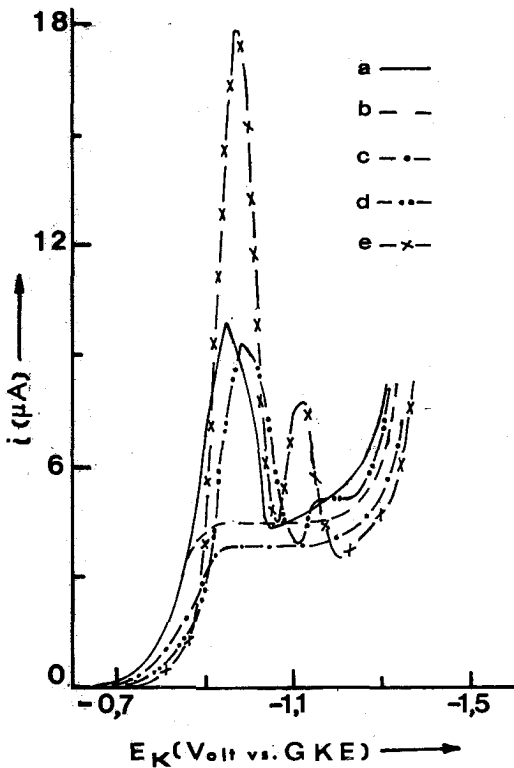


Abb. 1. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) bei pH 2,2 in gepufferten (0,01 N HCl + 0,09 N KCl) Wasser-Methanol-Lösungen a) 10%, b) 20%, c) 40%, d) 50%, e) 80% v/v H_2O

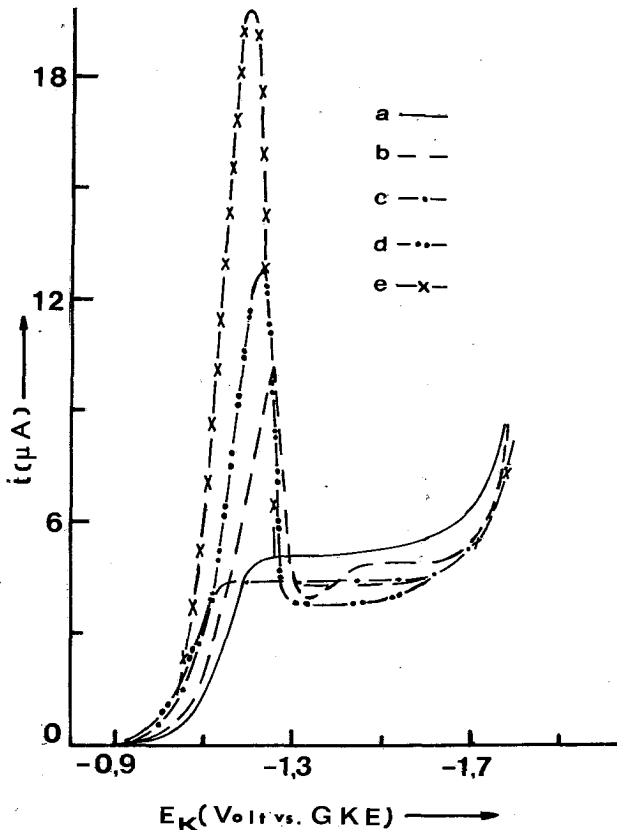


Abb. 2. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in gepufferten ($0,05N$ $\text{CH}_3\text{COOH} + 0,05N$ CH_3COONa) Wasser-Methanol-Lösungen a) 10%, b) 20%, c) 40%, d) 50%, e) 80% v/v H_2O .

Das Methanol "puriss p.a. absolut und acetonfrei" wurde von der Fa Fluka A.G. bezogen. Vor jedem Gebrauch wurde es an einer Säule destilliert. Es wurde schliesslich die Fraktion K.p. $64,7^\circ\text{C}$ (760 mmHg) verwendet, nachdem sie vorher für zwei Tage über Molekularsieben (4\AA) gestanden hatte. Die Molekularsiebe wurden immer vor ihrem Gebrauch bei 300°C , für einen Tag aktiviert.

Als Inhibitor wurde TOPO der Firma Merck, Reinheitsgrad "zur Extraktionsanalyse" genommen.

Alle Potentialangaben beziehen sich auf die wässrige gesättigte KCl-Kalomel-Elektrode (G.K.E.) und bei einer Temperatur von 25°C .

In Abb. 1 wird als Beispiel die Gestalt der aufgenommenen polarographischen Kurven des TAsO in Wasser-Methanol-Lösungen und bei einem Wassergehalt von 10% bis 80% v/v, im Puffer-System $0,01$ N HCl - $0,09$ N KCl ($\text{pH} = 2,2$ im System 80% v/v H_2O) gegeben.

Wir stellen fest, dass die Mehrzahl der oben genannten Kurven charakteristische Maxima aufweisen, ausser in dem Fall, bei dem der Wasser-Gehalt der Lösung 20% und 40% v/v beträgt. Bei einem grösseren Wasser-Gehalt (80% v/v) haben wir zwei

charakteristische Maxima. Diese Reduktionswellen des TAsO sind diffusionsbedingt und liegen bei einem Potential-Wert von ungefähr -0,9 Volt.

Wellen ähnlicher Gestalt mit charakteristischen Maxima bekommen wir bei der polarographischen Reduktion des TAsO in Wasser-Methanol-Lösungen bei einem Wasser-Gehalt von 10% bis 80% v/v im Puffer-System 0,05N CH_3COOH + 0,05 N CH_3COONa (pH = 5,09 im System 80% v/v H_2O). In Abb. 2 wird als Vergleich die Gestalt der polarographischen Wellen des TAsO im oben genannten System wiedergegeben.

In dem Fall, bei dem der Wasser-Gehalt der Lösung 10% und 40% v/v entspricht, verschwinden die Maxima vollständig. Bei einem höheren Wasser-Gehalt (80% v/v) wird nur das zweite Maximum völlig unterdrückt. Auch diese Reduktionswellen des TAsO sind diffusionsbedingt und liegen bei einem Potential-Wert von ungefähr -1,1 Volt. Diese Wellen sind also im Vergleich zu den entsprechenden Reduktionswellen des TAsO in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen (pH = 2,2) zu negativeren Potential-Werten verschoben. Diese Verschiebung gehorcht in befriedigender Weise der Gleichung $E_{1/2} = E^\circ - 0,06\text{pH}$.

Auf Grund der Tatsache, dass das TAsO in DMF-Lösungen²⁻⁵ durch Aufnahme von zwei Elektronen reduziert wird, und an Hand eigener polarographischen Messungen im selben Lösungsmittel berechneten wir den Diffusionskoeffizienten von TAsO in DMF und fanden den Wert $D = 0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. An Hand dieses Wertes und durch Heranziehen der entsprechenden Viskositätskoeffizienten fanden wir für den Diffusionskoeffizienten des TAsO in Wasser-Methanol-Lösungen (10% v/v H_2O) den Wert $D = 0,47 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Durch Einsetzen dieses Diffusionskoeffizienten in der Ilkovic-Gleichung berechneten wir

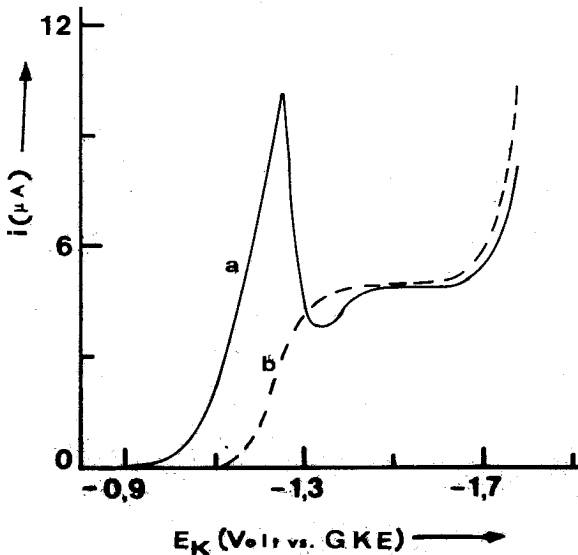


Abb. 3. Strom-Spannungs Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in einer Wasser-Methanol-Lösung von 20% v/v H_2O bei Anwesenheit des Puffer-Systems 0,05N CH_3COOH + 0,05N CH_3COONa . a) ohne TOPO, b) mit 0,2% TOPO.

die Anzahl der Elektronen und fanden, dass das TAsO in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen durch die Aufnahme von zwei Elektronen reduziert wird.

Bei der Zugabe von TOPO (0,2%) werden die Maxima in Abb. 2 völlig unterdrückt. In Abb. 3 wird als Beispiel die Wirkung des TOPO⁶ auf die polarographischen Kurven des TAsO bei einem Wasser-Gehalt von 20% v/v dargestellt.

Ausser der Unterdrückung des Maximum stellen wir auch eine Verschiebung der Welle zu einem negativeren Potential-Wert fest.

Bei der Untersuchung des TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Wasser-Methanol-Lösungen, immer bei einem konstanten Wasser-Gehalt (40% v/v) und bei Anwesenheit verschiedener Puffer-Systemen, beobachten wir eine deutliche Verschiebung der Reduktionswelle des TAsO zu negativeren Potential-Werten (Abb. 4)

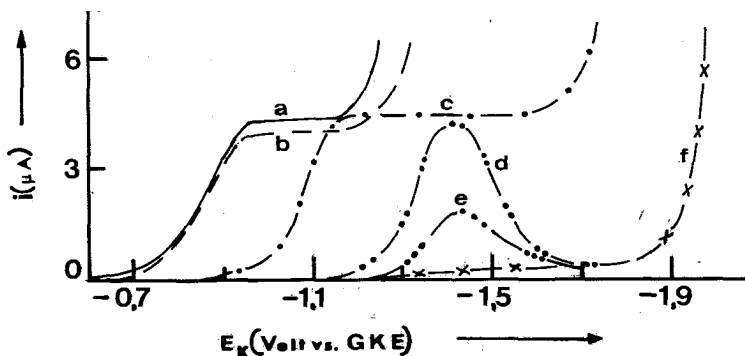


Abb. 4. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Wasser-Methanol-Lösungen (40% v/v H_2O) bei Anwesenheit verschiedener Puffer-Systemen a) pH = 1,5, b) pH=2,39, c) pH=5,93, d) pH=8,96, e) pH=9,36, f) pH=12,9.

Wir stellen auch fest, dass ausser der Verschiebung des Halbstufenpotentials zu negativeren Potential-Werten eine deutliche Verminderung der Diffusionsstromstärke der Reduktionswelle des TAsO zu beobachten ist. Bei dem pH-Wert von 12,9 verschwindet sogar die ganze Reduktionswelle des TAsO. Diese Tatsache beweist, dass für die Reduktion des TAsO in den oben genannten Systemen die unbedingte Anwesenheit von Protonen nötig ist.

Wenn die Anzahl der Protonen in der Lösung ausreichend ist, wird der Depolarisator vollständig reduziert, und deswegen behält auch die Diffusionsstromstärke der Wellen im sauren Bereich einen konstanten Wert.

Die Tatsache, dass das TAsO in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen durch die Aufnahme von zwei Elektronen und Protonen reduziert wird, wird auch durch die Untersuchung dieses Depolarisators in Methanol-Lösungen in Anwesenheit von Benzoesäure unterstützt. In Abb. 5 werden die polarographischen Kurven des TAsO in Methanol-Lösungen bei Anwesenheit von Benzoesäure und mit LiCl als Grundelektrolyt dargestellt.

Bei Anwesenheit von Benzoesäure treten charakteristische Reduktionswellen bei einem Halbstufenpotential von ungefähr -1,1 Volt (Abb. 5) auf. Durch Erhöhung der Konzentration der Benzoesäure in der Lösung erscheinen polarographische Maxima, deren Höhe mit der Konzentration der Benzoesäure in der Lösung steigt.

Ferner beobachten wir eine lineare Abhängigkeit der Diffusionsstromstärke von der Benzoesäurekonzentration. Diese Stromstärke erreicht, wie aus Abb. 5 hervorgeht, ihren höchsten Wert in dem Fall, in dem das Verhältnis des Depolarisators zur Benzoesäure 1:2 entspricht. Jedes Molekel TAsO wird also durch die Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen reduziert. Eine weitere Erhöhung der Benzoesäurekonzentration ruft keine Änderung in der Höhe der Reduktionswellen hervor (Abb. 5, Kurve e).

Die oben erwähnten Feststellungen werden deutlicher, wenn wir die elektrochemische Reduktion in Anwesenheit von TOPO (0,2%) durchführen, weil bei der Zugabe von TOPO die Wellen in eine normale Form ohne Maxima übergehen (Abb. 6).

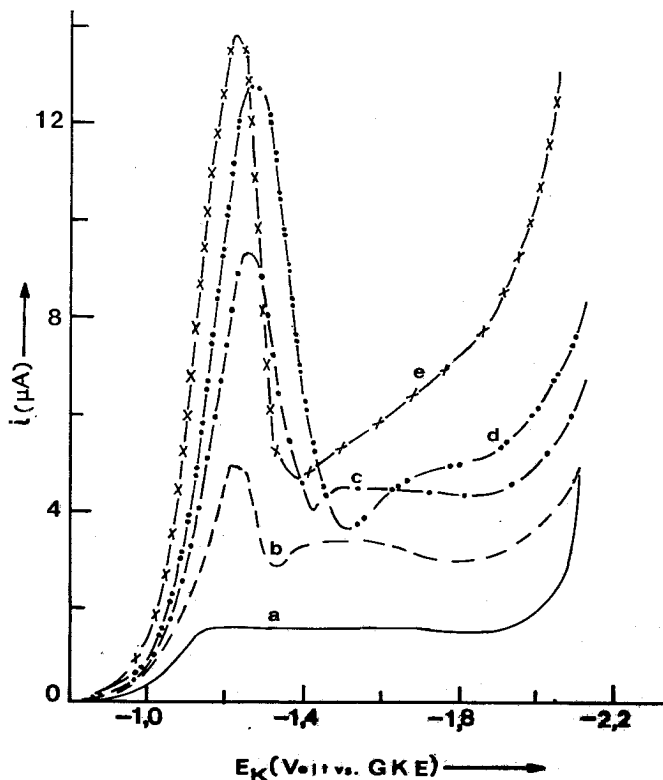


Abb. 5. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Methanol bei Anwesenheit von a) $5 \cdot 10^{-4}$ M b) $1 \cdot 10^{-3}$ M, c) $1,5 \cdot 10^{-3}$ M, d) $2 \cdot 10^{-3}$ M, e) $4 \cdot 10^{-3}$ M Benzoesäure. Grundlektrolyt LiCl (10^{-1} M).

Wie aus Abb. 6 zu sehen ist, behält die Diffusionsstromstärke in beiden Fällen bei Anwesenheit von TOPO einen konstanten Wert. Gleichzeitig ist eine Verschiebung der Wellen zu negativeren Potential-Werten zu bemerken. Wir stellen also fest, dass bei kleinen Säurekonzentrationen die Höhe der Reduktionswelle von der Benzoesäurekonzentration in der Lösung abhängig ist; dagegen bei grösseren Säurekonzentrationen hängt die Höhe der Reduktionswelle von der Konzentration des Depolarisators ab und ist diffusionsbedingt.

Ferner wurden die polarographischen Kurven des TAsO in Wasser-Methanol-Lösungen (20% v/v H₂O) bei Anwesenheit von Benzoesäure und mit demselben Grundelektrolyten aufgenommen (Abb. 7). Wir stellen fest, dass bei grösseren Benzoesäurekonzentrationen als die zweifache Konzentration des Depolarisators keine Änderung in der Höhe der Reduktionswellen zu beobachten ist.

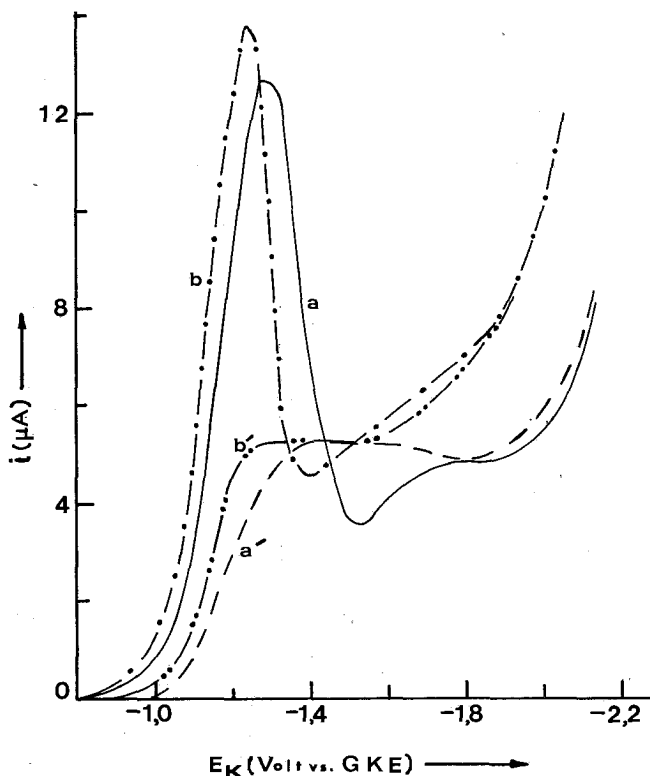


Abb. 6. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Methanol bei verschiedenen Benzoesäurekonzentrationen in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von TOPO (0,2%) a) $2 \cdot 10^{-3}$ M Benzoesäure ohne TOPO, a') mit TOPO, b) $4 \cdot 10^{-3}$ M Benzoesäure ohne TOPO, b') mit TOPO.

Auch aus der Höhe dieser Reduktionswellen ist also zu erkennen, dass das TAsO durch die Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen reduziert wird. Bei grösseren Benzoesäurekonzentrationen ist ferner die Erscheinung einer zweiten Reduktionswelle bei einem Halbstufenpotential von ungefähr -1,7 Volt zu beobachten. Diese Welle entspricht der Wasserstoffabscheidung des Überschusses der Benzoesäure in der Lösung. Bei der Aufnahme der Reduktionswelle von Benzoesäure in Abwesenheit jedes anderen Depolarisators mit LiCl als Grundelektrolyt in Methanol-Lösungen, sowohl bei Abwesenheit als auch bei Anwesenheit von Wasser (20% v/v) ist in der Tat eine deutliche Welle der Benzoesäure in Abwesenheit von Wasser zu erkennen, was in reinem Methanol nicht zu beobachten ist.⁷ Diese Wellen werden zum Vergleich in Abb. 8 wiedergegeben.

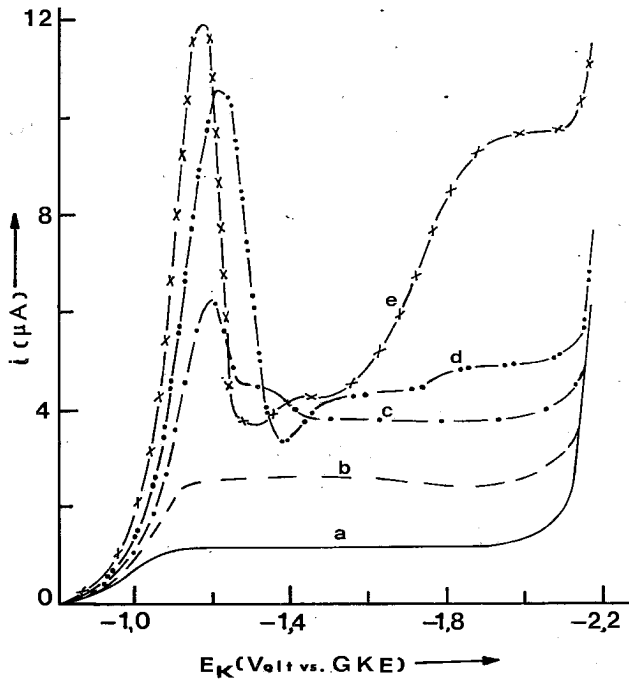


Abb. 7. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Wasser-Methanol-Lösungen (20% v/v H_2O) bei Anwesenheit von Benzoesäure verschiedener Konzentrationen a) $5 \cdot 10^{-4}$ M, b) $1 \cdot 10^{-3}$ M, c) $1,5 \cdot 10^{-3}$ M, d) $2 \cdot 10^{-3}$ M, e) $4 \cdot 10^{-3}$ M Benzoesäure. Grundlektrolyt LiCl (10^{-1} M).

Durch Vergleichen der Höhen der entsprechenden Reduktionswellen, sowohl in Wasser-Methanol-Lösungen (20% v/v H_2O) in Anwesenheit von Benzoesäure als auch in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen, wird noch einmal unsere Annahme, dass das TAsO in gepufferten Systemen durch die Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen reduziert wird, bestätigt.

Diese Tatsache wird noch einmal durch die Aufnahme der Reduktionswellen des TAsO in Wasser-Methanol-Lösungen (20% v/v H_2O) bei Anwesenheit von KCl als Grundlektrolyt unterstützt (Abb. 9).

Wir stellen wiederum fest, dass bei einer höheren Benzoesäurekonzentration als die zweifache Konzentration des TAsO die Höhe der Reduktionswellen unverändert bleibt; sogar bei der zehnfachen Säurekonzentration als diejenige des Depolarisators behält die Höhe der Wellen ihren konstanten Wert.

Auf Grund der bisherigen polarographischen Untersuchung des TAsO, sowohl in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen als auch in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen in Anwesenheit von Benzoesäure ist das verschiedenartige polarographische Verhalten des TAsO im Gegensatz zum TOPO und TPO deutlich zu erkennen. Sowohl TOPO als auch TPO werden an der Hg-Tropf-Elektrode in den oben genannten Lösungs-Systemen nicht reduziert.¹ Dieses verschiedenartige Verhalten des TAsO ist vorwiegend auf die grössere Polarität der Bindung AS—O — im Gegensatz zur Bindung P—O —, wegen der geringeren $p_{\pi}-d_{\pi}$ Überlappung des Sauerstoffs und des Arsens, zurückzuführen.

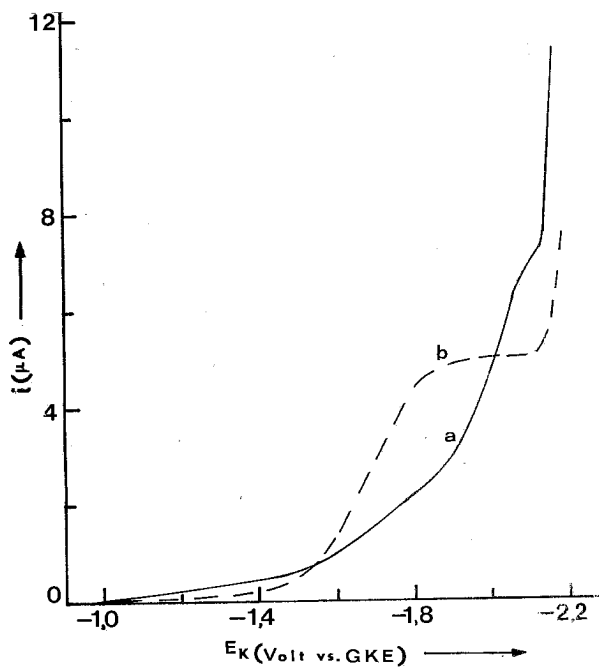


Abb. 8. Strom-Spannungs-Kurven von Benzoesäure ($2 \cdot 10^{-3}$ M) in a) Methanol, b) Methanol-Lösung (20% v/v H_2O). Grundlektrolyt LiCl (10^{-1} M).

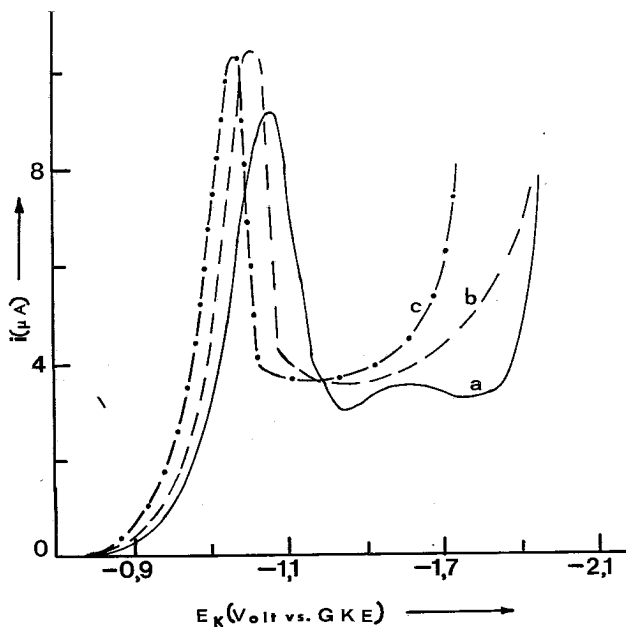
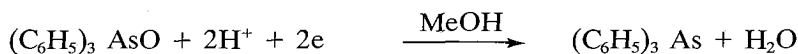


Abb. 9. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in Methanol-Lösungen (20% v/v H_2O) bei verschiedenen Benzoesäurekonzentrationen a) $2 \cdot 10^{-3}$ M, b) $4 \cdot 10^{-3}$ M, c) $1 \cdot 10^{-2}$ M Benzoesäure. Grundlektrolyt KCl (10^{-1} M).

Diese Tatsache hat zur Folge, dass die Bindungsenergie zwischen Arsen und Sauerstoff kleiner ist als diejenige zwischen Phosphor und Sauerstoff. Auf Grund dieser Feststellung und unserer oben erwähnten polarographischen Ergebnissen kommen wir zu der Behauptung, dass in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen in Anwesenheit ausreichender Protonen eine Brechung der As-O Bindung und eine Reduktion des TAsO zum entsprechenden Triphenylarsin nach dem allgemeinen Schema:



stattfindet.

In reinem Methanol mit $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ als Grundelektrolyt, der wegen seines negativeren Abscheidungspotentials die mögliche Aufnahme einer Reduktionswelle des TAsO bei negativeren Potential-Werten als -2,0 Volt erlaubt, beobachten wir in Abwesenheit von Protonen die Erscheinung einer Reduktionswelle des Depolarisators bei einem Halbstufenpotential von ungefähr -2,1 Volt. In Abb. 10 werden als Beispiel diese polarographischen Kurven wiedergegeben.

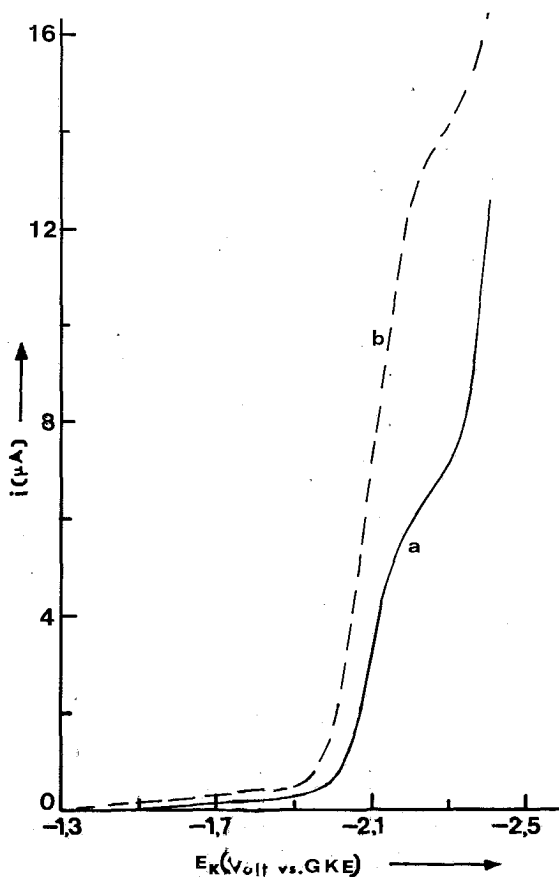
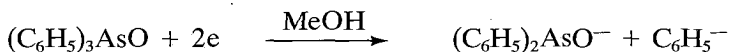


Abb. 10. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO in Methanol bei verschiedenen Konzentrationen a) $1 \cdot 10^{-3}$ M, b) $2 \cdot 10^{-3}$ M TAsO. Grundelektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-1} M).

Die Höhe dieser Reduktionswellen steigt mit der Konzentration des Depolarisators und ist auch diffusionsbedingt. Durch Einsetzen des von uns berechneten Diffusionskoeffizienten des TAsO in reinem Methanol, $D=0,67 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, in die Ilkovic-Gleichung finden wir, dass die Zahl, der bei dieser Reduktion aufgenommenen Elektronen zwei ist. Diese Reduktion ist völlig verschieden von der bisherigen Reduktion des Depolarisators in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen in Anwesenheit von Protonen und mit LiCl und KCl als Grundelektrolyte. Diese Reduktionswellen entsprechen der Reduktion der Phenyl-Gruppe nach dem allgemeinen Schema:



und werden auch bei anderen Arbeiten²⁻⁵ in DMF-Lösungen und beim entsprechenden Potential erwähnt.

Um gleichzeitig beide Reduktionsarten des TAsO, sowohl der As-O Gruppe als auch der Phenyl-Gruppe, polarographisch zu erfassen, haben wir die oben genannten Reduktionswellen in Anwesenheit von Benzoesäure aufgenommen (Abb. 11).

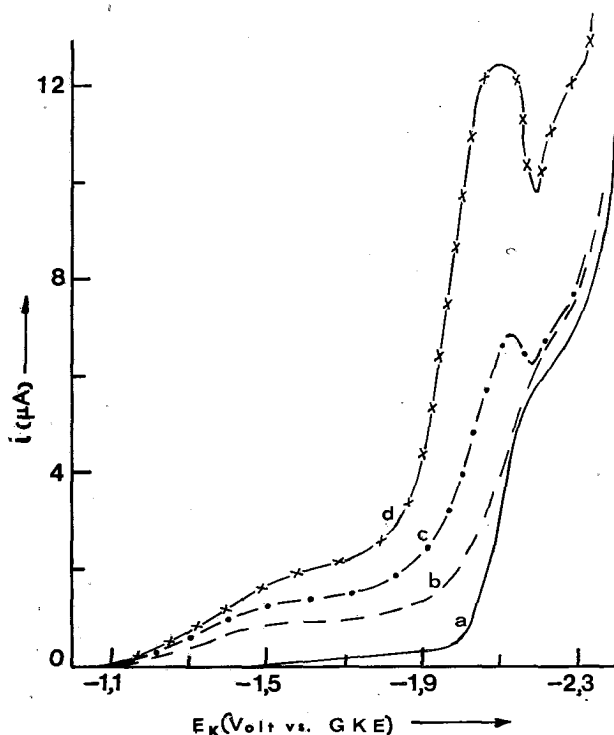


Abb. 11. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in Methanol bei Anwesenheit von Benzoesäure a) ohne, b) mit $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ c) $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, d) $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Benzoesäure. Grundelektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-1} M).

Wir stellen in der Tat fest, dass in Anwesenheit von Benzoesäure die Erscheinung von zwei Reduktionswellen des Depolarisators zu erkennen ist. Die erste Reduktionswelle entspricht der Reduktion des Depolarisators zum entsprechenden Triphenylarsin und liegt im erwarteten Potentialbereich. Die Höhe dieser Welle ist kleiner als die Höhe, die wir bei einer zweifachen Benzoesäure-Konzentration — als diejenige des TAsO — erwarten würden; das wird einer partiellen Aufnahme der Protonen der Säure vom $(C_2H_5)_4NI$ zugeschrieben. Die zweite Reduktionswelle entspricht der Reduktion der Phenyl-Gruppe und erscheint auch im erwarteten Halbstufenpotential. Bei grösseren Benzoesäure-Konzentrationen erscheint zwischen diesen beiden Wellen auch eine dritte Reduktionswelle, die der Wasserstoffabscheidung der Säure entspricht. Wie aus Abb. 11 zu ersehen ist, kann bei höheren Säurekonzentrationen die Reduktionswelle der Phenyl-Gruppe nicht deutlich ausgebildet werden; das beruht darauf, dass das Wasserstoffabscheidungspotential der Säure ungefähr im selben Potentialbereich mit dem Halbstufenpotential der Phenyl-Gruppe-Reduktion liegt.

Wir kommen also zu dem Entschluss, dass das TAsO in Methanol-Lösungen bei Abwesenheit von Protonendonatoren nicht zum Triphenylarsin reduziert wird, sondern nur eine Phenyl-Gruppe-Reduktion eingeht. Jedoch bei Anwesenheit von Protonen und mit dem entsprechenden Grundelektrolyten $(C_2H_5)_4NI$ bekommen wir sowohl die Reduktion zum Triphenylarsin als auch die Reduktion der Phenyl-Gruppe.

Die Tatsache, dass das TAsO in Methanol— und Wasser-Methanol-Lösungen bei Anwesenheit eines Protonendonators durch die Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen polarographisch zum entsprechenden Triphenylarsin reduziert wird, konnten wir auch durch eine Reduktion des TAsO auf rein chemischem Weg beweisen. Die Reduktion wird in Methanol mit Natriumamalgam als Reduktionsmittel und bei Anwesenheit von Benzoesäure durchgeführt. Die Benzoesäure wird zugesetzt um ähnliche Bedingungen wie bei der Polarographie herzustellen. Für diese Reduktion wurde ein Amalgam mit 1% Natrium⁸ bei 60ml Hg, hergestellt. Unter ständigem Rühren und Durchleiten von reinem Stickstoff werden dem Amalgam mit einem speziellen Trichter tropfweise 50ml einer Methanol-Lösung, die 0,4gr TAsO und 0,6gr Benzoesäure enthält, zugesetzt. Die Reaktion verläuft bei Zimmertemperatur für eine Dauer von 3Stunden und unter ständigem Rühren und Durchleiten von reinem Stickstoff. Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung, die über dem Quecksilber liegt, abgetrennt und bei 0°C abgekühlt. Der bei der Kühlung gebildete amorphe Niederschlag wird wiederum in reinem Methanol gelöst. Die neue Lösung wird wegen ihrer Trübung filtriert und mit verdünnter HCl-Säure der Anfangskonzentration 37% bearbeitet. Diese Bearbeitung wird unternommen um das eventuell gebildete Triphenylarsin, das im Wasser und HCl-Säure unlöslich ist, als Niederschlag zu gewinnen und die Nebenprodukte in Lösung zu halten. Die neue saure Lösung, die eine grosse Trübung aufweist, wird für zwei Tage bei 0°C gekühlt. Die kristalline Substanz, die wir durch diese Weise bekommen, trocknen wir in einem Trockenexsiccator und identifizieren sie weiter. Es wurde ein Schmelzpunkt von 59°C gefunden. Dieser Schmelzpunkt stimmt mit dem Schmelzpunkt von Triphenylarsin völlig überein (58-59° C).⁹ Auch durch die vergleichende Aufnahme der IR-Spektren in Nujol, sowohl dieser Substanz als auch des Triphenylarsins, konnten wir deutlich diese Substanz in der Tat als Triphenylarsin identifizieren.

Abstract

Polarographic behavior of Triphenylarsin oxide in water-methanol and methanol solutions.

The polarographic behavior of triphenylarsin oxide (TAsO) is studied in water-methanol solutions in the presence and absence of proton donors.

It is proved that TAsO is reduced to the corresponding triphenylarsine in acidic buffer water-methanol solutions as well as in methanol solutions, by taking up two electrons and two protons, in presence of benzoic acid.

It is established the different polarographic behavior of TAsO in methanol solutions in the absence of proton donors. In that case, the depolarizer is reduced, by taking up two electrons, to an anion by splitting off a phenyl group from the molecule.

The polarographic reduction of TAsO in the presence of proton donors and in water-methanol and methanol solutions to the corresponding arsine was verified by chemical means. So, infrared spectroscopic analysis of the obtained product from the reduction of TAsO in methanol using sodium amalgam as a reducing agent was identified as triphenylarsine.

Key words: Polarography, triphenylarsin oxide, triphenylarsine, half-wave potential, inhibition, electroreduction.

Abbreviations: TAsO: Triphenylarsin oxid. TPO: Triphenylphosphin oxid. TOPO: Tri-n-octylphosphin oxide. GKE: Gesättigte Kalomel Elektrode.

Περίληψις

Πολαρογραφική συμπεριφορά του τριφαινυλοαρσινοξειδίου εντός ύδατομεθανολικών και μεθανολικών διαλυμάτων

Μελετάται η πολαρογραφική συμπεριφορά του τριφαινυλοαρσινοξειδίου (TAsO) εντός ύδατομεθανολικών και μεθανολικών διαλυμάτων παρουσία και απουσία δότου πρωτονίων. Αποδεικνύεται ότι το TAsO ανάγεται, τόσο εντός όξινων ρυθμιστικών ύδατομεθανολικών διαλυμάτων, όσο και εντός μεθανολικών διαλυμάτων παρουσία βενζοϊκού όξέος, δια προσλήψεως δύο ηλεκτρονίων και δύο πρωτονίων προς την αντίστοιχον τριφαινυλαρσίνη. Διαπιστούται η διάφορος πολαρογραφική συμπεριφορά του TAsO εντός μεθανόλης απουσία δότου πρωτονίων. Είς την περίπτωση αυτήν ο εν λόγω αποπολωτής ανάγεται δια προσλήψεως δύο ηλεκτρονίων και αποσπάσεως μιᾶς φαινυλικῆς ομάδος προς τὸ αντίστοιχον ἀνιόν.

Τὸ γεγονός ὅτι τὸ TAsO ἀνάγεται πολαρογραφικῶς παρουσία πρωτονίων και εντός τῶν ἐν λόγω διαλυτικῶν μέσων προς τὴν ἀντίστοιχον τριφαινυλαρσίνη, ἀποδεικνύεται και δια χημικῆς ὁδοῦ, ἥτοι δια χρησιμοποίησεως ὡς ἀναγωγικοῦ μέσου ἀμαλγάματος νατρίου εντός μεθανόλης. Αποδεικνύεται φασματοσκοπικῶς (IR) ὅτι τὸ προκύπτον προϊόν τῆς ἀναγωγῆς τοῦ TAsO εἶναι πράγματι ἡ τριφαινυλαρσίνη.

Literatur

- 1 Jannakoudakis, D., Mavridis, P.G., und N. Missaelidis, N.: *Sci. Annals, Fac. Phys. & Mathem.*, Univ. Thessaloniki, 13, 97 (1973).
- 2 Matschiner, H., Tzschach, A. and A. Steinert.: *Z. anorg. allg. Chem.* 373, 237 (1970).

- 3 Wawzonek, S. and Wagenknecht, J.H.: *Polarography* 1964, p. 1035.
- 4 Kargin, YU. M., Semakhina, N.I., Chernokal'Skii, B.D., Gel' fond, A.S. and Kamai, G.KH.: Translation from *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, No 11, 2488 (1970).
- 5 Dessy, R.E., Chivers, T. and Kitching, W.: *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 467 (1966).
- 6 Jannakoudakis, D., Mavridis, P.G. and Stalidis, G.: *Chimika Chronika, New Series*, 3, 1 (1974).
- 7 Jannakoudakis, D., Wildenau, A. and Holleck, L.: *J. Electroanal. Chem.* 15, 83 (1967).
- 8 Vogel: *Text-Book of pract. org. chem.* Third Edition p. 194.
- 9 Schumann, H., Koepf, H. and Schmidt, M.: *Z. anorg. allg. Chem.* 331, 200 (1964).

POLAROGRAPHISCHES VERHALTEN VON TRIPHENYLARSINOXID UND BENZOESÄURE IN DIMETHYLSULFOXID, DIMETHYLFORMAMID UND DEREN GEMISCHEN MIT WASSER

D. JANNAKOUDAKIS, J. MARKOPOULOS und P. G. MAVRIDIS
Physikalisch-Chemisches Laboratorium der Universität Thessaloniki
(Erhalten am 3 November 1975)

Zusammenfassung

Es wurde das polarographische Verhalten des Systems Triphenylarsinoxid (TAsO)-Benzoessäure in DMSO- und DMF-Lösungen bei Anwesenheit und Abwesenheit von Wasser untersucht.

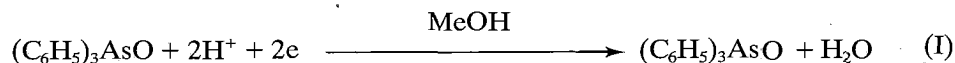
Es wurde ein ähnliches polarographisches Verhalten des TAsO in diesen beiden Lösungsmitteln festgestellt. Sowohl in DMSO- als auch in DMF-Lösungen konnte eine Reduktion des oben genannten Depolarisators zum entsprechenden Triphenylarsin nicht festgestellt werden. In diesem Fall wird das TAsO durch die Aufnahme von zwei Elektronen und die Abspaltung einer Phenylgruppe zum entsprechenden Anion reduziert.

Die Zugabe von Wasser, sowohl in DMSO als auch in DMF, erleichtert nur diese Reduktion des Depolarisators und ruft eine kleine Verschiebung der Reduktionswellen zu positiveren Potentialwerten hervor.

Es wurde ferner bewiesen, dass die Benzoessäure in den oben genannten Lösungsmitteln nicht zu einer Reduktion des TAsO zum Triphenylarsin führen kann; in diesem Fall haben wir die Erscheinung von zwei Reduktionswellen. Die erste Welle entspricht der Wasserstoffabscheidung der Säure, was durch die Aufnahme der polarographischen Wellen der Benzoessäure bei Abwesenheit jedes anderen Depolarisators bewiesen wurde. Die zweite Reduktionswelle entspricht der Reduktion des TAsO zum entsprechenden Anion und erscheint im erwarteten Potentialbereich.

Einleitung

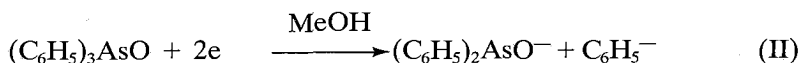
In einer früheren Arbeit¹ haben wir festgestellt, dass das Triphenylarsinoxid (TAsO), sowohl in sauren gepufferten Wasser-Methanol-Lösungen als auch in Methanol- und Wasser-Methanol-Lösungen bei Anwesenheit von Benzoessäure, polarographisch zum entsprechenden Triphenylarsin bei einem Potentialwert von ungefähr -1 Volt reduziert wird.



Diese Tatsache konnten wir auch durch eine Reduktion des TAsO auf rein chemischem Weg beweisen. Die Reduktion des TAsO zum Triphenylarsin wurde fast quantitativ mit Natriumamalgam als Reduktionsmittel und bei ähnlichen Bedingungen wie bei der Polarographie durchgeführt.

Es wurde ferner bewiesen, dass bei Abwesenheit von Protonendonatoren in Methanol-Lösungen keine Reduktion des TAsO zum Triphenylarsin stattfindet. In

diesem Fall wird der oben genannte Depolarisator bei viel negativeren Potentialwerten, von ungefähr -2,1 Volt, durch die Aufnahme von zwei Elektronen und die Abspaltung einer Phenylgruppe zum entsprechenden Anion nach dem allgemeinen Schema:



reduziert.

Um den Einfluss des Lösungsmittels und der Benzoesäure auf die elektrochemische Reduktion des TAsO festzustellen, erschien uns sinnvoll im Rahmen dieser Arbeit das polarographische Verhalten des Systems TAsO-Benzoesäure in DMSO- und DMF-Lösungen bei Anwesenheit und Abwesenheit von Wasser zu untersuchen.

Experimentelles und Ergebnisse

Der experimentelle Teil dieser Untersuchung wird in einer vorigen Arbeit¹ ausführlich beschrieben.

Das Dimethylsulfoxid (DMSO), Reinheitsgrad "zur Synthese", wurde von der Firma Merck bezogen. Vor seinem Gebrauch wurde es am Rückfluss 8 Stunden lang über Calciumoxid erhitzt und an einer Säule unter Vakuum destilliert. Es wurde schliesslich die Fraktion K.p. 60°C (5mmHg) verwendet.

Das Dimethylformamid (DMF) Reinheitsgrad "RPE" der Fa. Carlo Erba wurde vor jedem Gebrauch an einer Säule unter Vakuum destilliert. Es wurde

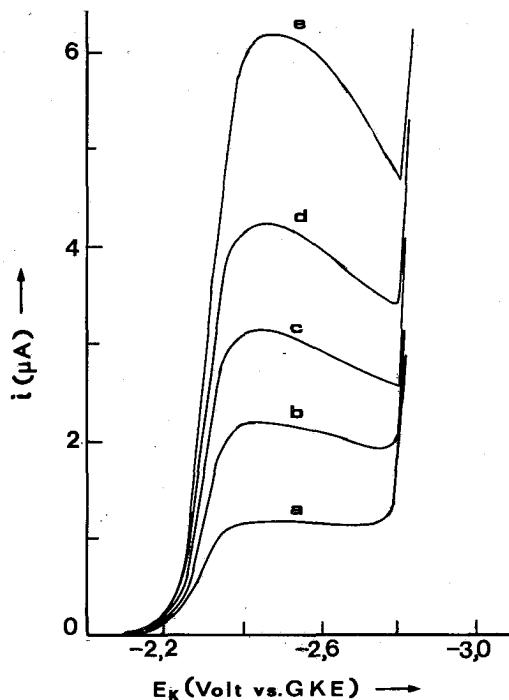


Abb. 1. Strom- Spannungs- Kurven von TAsO in DMSO a) $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, b) $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$, c) $1,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$, d) $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$, e) $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ TAsO. Grundelektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-4}M).

schliesslich die Fraktion K.p. 51,5°C verwendet, nachdem es vorher für zwei Tage über aktivierte Molekularsiebe (4 Å) gestanden hatte.

Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

In Abb. 1 werden die polarographischen Kurven des TAsO in DMSO mit $(C_2H_5)_4NI$ als Grundelektrolyten und bei verschiedenen Depolarisatorkonzentrationen wiedergegeben.

Wir stellen fest, dass das Halbstufenpotential der Reduktionswellen ungefähr bei einem Wert von -2,3 Volt liegt. Die Reduktion des TAsO in DMSO findet also, im Vergleich zu seiner Reduktion in sauren gepufferten Methanol-Lösungen, bei viel negativeren Potentialwerten statt. Das Reduktionspotential des TAsO in DMSO liegt wiederum sehr nah am entsprechenden Reduktionspotential des Depolarisators in Methanol-Lösungen bei Abwesenheit von Protonendonatoren (Gl. II). Wir kommen also zu dem Entschluss, dass in diesem Fall das TAsO nicht zum entsprechenden Triphenylarsin reduziert wird, sondern eine 2e-Reduktion zum entsprechenden Anion nach Gleichung II eingeht.

Die Tatsache, dass das TAsO in DMSO-Lösungen durch die Aufnahme von zwei Elektronen reduziert wird, geht auch aus der Ilkovic-Gleichung hervor. Auf Grund des Diffusionskoeffizienten des TAsO in Methanol¹ und der entsprechenden Viskositätskoeffizienten finden wir, dass der Diffusionskoeffizient des TAsO in DMSO den Wert $D = 0,19 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ haben muss. Mit diesem Wert und auf Grund unserer polarographischen Angaben berechneten wir die Zahl der aufgenommenen Elektronen bei der Reduktion des TAsO in DMSO und fanden den Wert $n = 2$.

Die Höhe der Reduktionswellen (Abb. 1) steigt mit der Konzentration des Depolarisators und ist völlig diffusionsbedingt. In Abb. 2 wird die Abhängigkeit der Stromstärke dieser Wellen von der Konzentration des Depolarisators wiedergegeben.

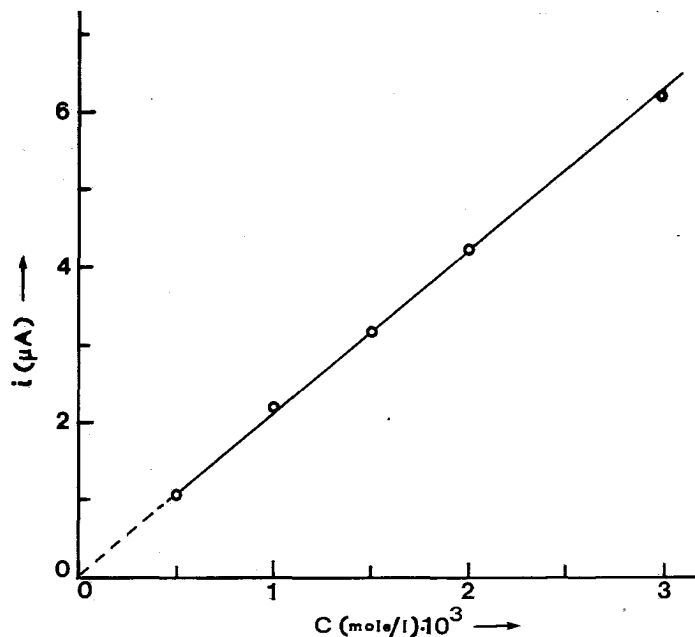


Abb. 2. Abhängigkeit der Diffusionsstromstärke von der Konzentration des TAsO in DMSO.

Die Zugabe von Wasser in DMSO ruft nur eine kleine Verschiebung dieser Wellen zu positiveren Potentialwerten hervor. In Abb. 3 werden als Beispiel die Reduktionswellen des TAsO ($1 \cdot 10^{-3}M$) in DMSO bei Abwesenheit und Anwesenheit von Wasser wiedergegeben.

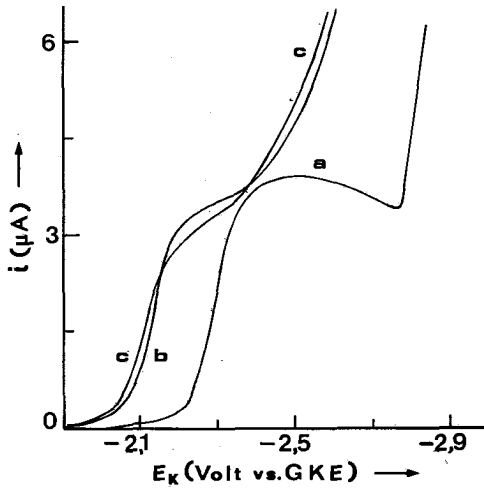


Abb. 3. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}M$) in DMSO-Lösungen bei Abwesenheit und Anwesenheit von Wasser a) 100% DMSO, b) 20% v/v H_2O , c) 40% v/v H_2O . Grundelektrolyt $(C_2H_5)_4NI$ ($10^{-1}M$).

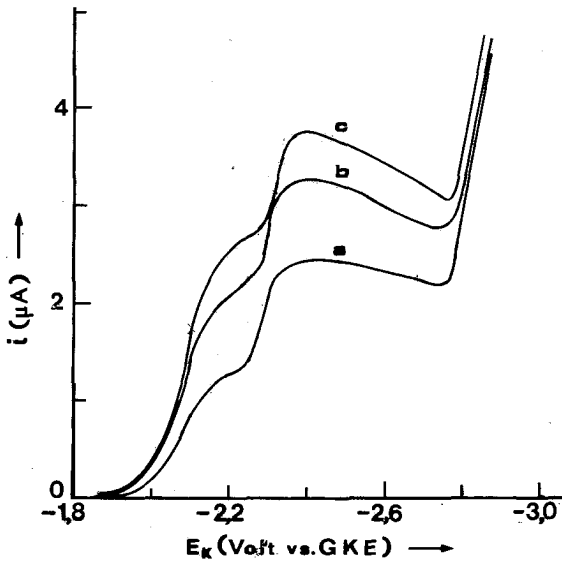


Abb. 4. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}M$) in DMSO bei Anwesenheit von Benzoesäure verschiedener Konzentrationen a) $1,10 \cdot 10^{-3}M$, b) $1,5 \cdot 10^{-3}M$, c) $2 \cdot 10^{-3}M$ Benzoesäure. Grundelektrolyt $(C_2H_5)_4NI$ ($10^{-1}M$).

Wir stellen fest, dass die Reduktion des TAsO bei einem negativeren Potentialwert als -2 Volt stattfindet. Die Verschiebung der Wellen, bei Anwesenheit von Wasser zu positiveren Potentialwerten beruht auf der Verminderung der inhibierenden Wirkung des Lösungsmittels² bei steigendem Wasser-Gehalt der Lösung. Diese inhibierende Wirkung des organischen Lösungsmittels ist um so kleiner je kleiner die Lösungsmittelkonzentration in der Lösung ist. Die Zugabe also von Wasser erleichtert nur die Reduktion des TAsO gemäss Gleichung II.

Bei Anwesenheit von Benzoesäure, immer bei konstanter TAsO-Konzentration, stellen wir in DMSO die Bildung von zwei Reduktionswellen fest. Die Höhe der ersten Welle ist proportional der Benzoesäurekonzentration in der Lösung, die Höhe jedoch der zweiten Welle behält, in befriedigender Weise, einen konstanten Wert (Abb. 4).

Die zweite Reduktionswelle entspricht also der Reduktion des TAsO zum entsprechenden Anion (Gl. II) und erscheint im erwarteten Potentialbereich. Die erste Reduktionswelle dagegen entspricht der Wasserstoffabscheidung der Benzoesäure, was auch in der Tat bei der Aufnahme der polarographischen Kurven von TAsO verschiedener Konzentrationen und bei Anwesenheit von Benzoesäure konstanter Konzentration zu sehen ist (Abb. 5).

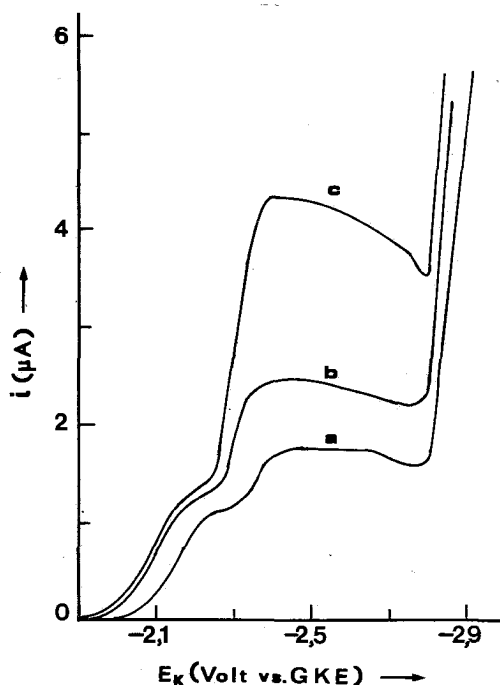


Abb. 5. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO in DMSO bei Anwesenheit von Benzoesäure konstanter Konzentration ($1 \cdot 10^{-3} M$) a) $5 \cdot 10^{-4} M$, b) $1 \cdot 10^{-3} M$, c) $2 \cdot 10^{-3} M$ TAsO. Grundlektrolyt $(C_2H_5)_4 NI$ ($10^{-1} M$).

Wir stellen in der Tat fest, dass die Höhe der ersten Reduktionswelle konstant bleibt, und dass die Höhe der zweiten Welle mit der TAsO-Konzentration in der Lösung proportional steigt.

Dass die erste Reduktionswelle, bei einem Potentialwert von ungefähr -2,1 Volt, tatsächlich der Wasserstoffabscheidung der Säure entspricht, wurde auch durch die Aufnahme der polarographischen Wellen der Benzoesäure bei Abwesenheit jedes anderen Depolarisators und mit $(C_2H_5)_4NI$ als Grundlektrolyt bewiesen (Abb. 6.).

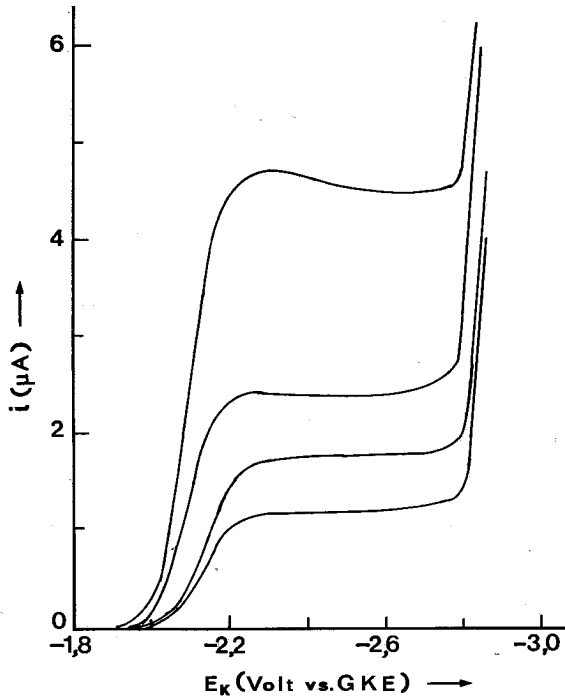


Abb. 6. Strom-Spannungs-Kurven von Benzoesäure in DMSO a) $1 \cdot 10^{-3}M$, b) $1,5 \cdot 10^{-3}M$, c) $2 \cdot 10^{-3}M$, d) $4 \cdot 10^{-3}M$ Benzoesäure. Grundlektrolyt $(C_2H_5)_4NI$ ($10^{-1}M$).

Wir stellen fest, dass die Höhe der Reduktionswellen mit der Konzentration der Säure steigt; die Höhe dieser Wellen ist in befriedigender Weise diffusionsbedingt.

Auf Grund der bisherigen Messungen kommen wir also zu dem Entschluss, dass die Benzoesäure in DMSO-Lösungen nicht zu einer Reduktion des TAsO zum Triphenylarsin führen kann; im Potentialbereich von ungefähr -1 Volt wurde bei Anwesenheit von Benzoesäure keine Welle, die der Reduktion zum Triphenylarsin entsprechen würde, festgestellt.

Es wurde weiter das polarographische Verhalten von TAsO und Benzoesäure in DMF-Lösungen mit $(C_2H_5)_4NI$ als Grundlektrolyt untersucht.

In Abb. 7 werden als Beispiel die polarographischen Kurven des TAsO in DMF mit $(C_2H_5)_4NI$ als Grundlektrolyt und bei verschiedenen Depolarisatorkonzentrationen wiedergegeben.

Wir stellen fest, dass die Höhe der Wellen proportional mit der TAsO-Konzentration in der Lösung steigt.

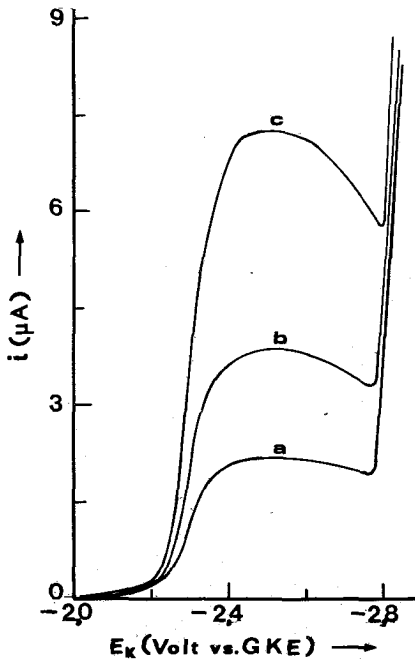


Abb. 7. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO verschiedener Konzentrationen in DMF a) $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, b) $1 \cdot 10^{-3}\text{M}$, c) $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ TAsO. Grundlektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-3}M).

Das Halbstufenpotential dieser Wellen, ungefähr bei einem Wert von -2,3 Volt, stimmt in befriedigender Weise mit dem von H. Matschiner, A. Tzschach und A. Steinert³ angegebenen Reduktionspotential des TAsO im selben Lösungsmittel überein (-2,330 Volt). Wie schon erwähnt, wurden in DMSO mit demselben Grundlektrolyten ähnliche Reduktionswellen des TAsO ungefähr beim selben Potential festgestellt.

Auf Grund der Literaturangaben³⁻⁶ und unserer eigenen Messungen kommen wir zum Entschluss, dass die Reduktion des TAsO in DMF durch die Aufnahme von zwei Elektronen gemäss Gleichung II stattfindet. In diesem Fall beträgt der Diffusionskoeffizient des TAsO in DMF $0,46 \cdot 10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$.

Bei Anwesenheit von Benzoesäure und immer bei derselben TAsO-Konzentration stellen wir in DMF die Bildung von zwei Reduktionswellen fest, was auch in DMSO-Lösungen der Fall war (Abb. 8.).

Auch in diesem Fall entspricht die zweite Welle der Reduktion der Phenyl-Gruppe (Gl. II), was auch bei den entsprechenden Reduktionswellen in DMSO festgestellt wurde, und erscheint auch im erwarteten Potentialbereich. Die erste Reduktionswelle entspricht auch in diesem Fall der Wasserstoffabscheidung der Benzoesäure, was wiederum durch die Aufnahme der polarographischen Kurven von TAsO verschiedener Konzentrationen und bei Anwesenheit von Benzoesäure konstanter Konzentration bewiesen wird (Abb. 9).

Wir stellen fest, dass die Höhe der ersten Welle konstant bleibt, und dass die Höhe der zweiten Reduktionswelle mit der TAsO-Konzentration in der Lösung proportional steigt.

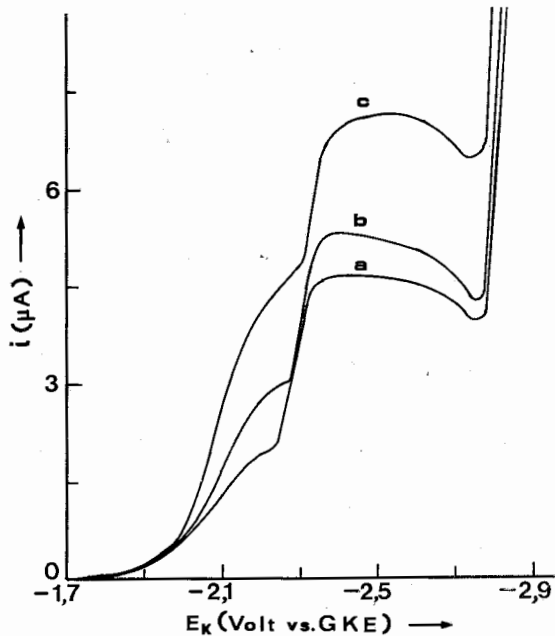


Abb. 8. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3}$ M) in DMF bei Anwesenheit von Benzoesäure verschiedener Konzentrationen a) $1 \cdot 10^{-3}$ M, b) $1,5 \cdot 10^{-3}$ M, c) $2 \cdot 10^{-3}$ M Benzoesäure. Grundelektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-1} M).

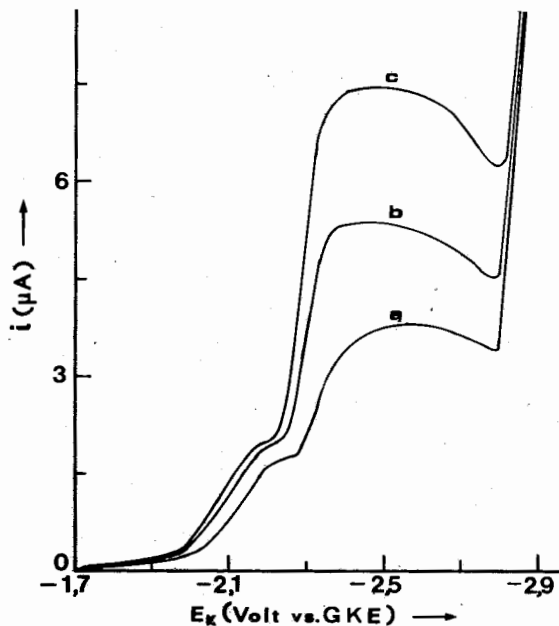


Abb. 9. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO in DMF bei Anwesenheit von Benzoesäure konstanter Konzentration ($1 \cdot 10^{-3}$ M) a) $5 \cdot 10^{-4}$ M, b) $1 \cdot 10^{-3}$ M, c) $2 \cdot 10^{-3}$ M TAsO. Grundelektrolyt $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ (10^{-1} M).

Die Aufnahme der polarographischen Wellen der Benzoesäure bei Abwesenheit jedes anderen Depolarisators und mit $(C_2H_5)_4NI$ als Grundelektrolyten ist auch ein Beweis dafür, dass die erste Reduktionswelle in Abb. 9, bei einem Potentialwert von ungefähr -2,1 Volt, der Wasserstoffabscheidung der Säure entspricht (Abb. 10).

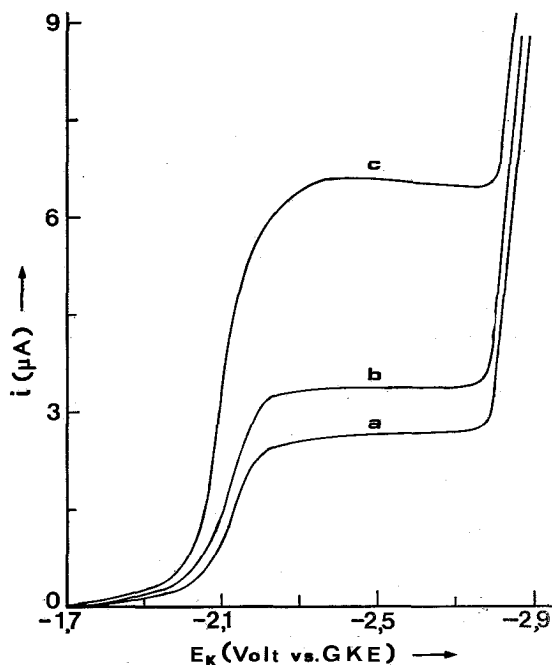


Abb. 10. Strom-Spannungs-Kurven von Benzoesäure in DMF a) $1,5 \cdot 10^{-3}M$, b) $2 \cdot 10^{-3}M$, c) $4 \cdot 10^{-3}M$ Benzoesäure, Grundelektrolyt $(C_2H_5)_4NI$ ($10^{-3}M$).

Wir stellen fest, dass die Höhe der Wellen mit der Konzentration der Säure steigt; die Höhe der Reduktionswellen ist in befriedigender Weise diffusionsbedingt.

Auch auf Grund dieser Messungen können wir also behaupten, dass die Benzoesäure in DMF-Lösungen, ähnlich wie in DMSO-Lösungen, nicht zu einer Reduktion des TAsO zum Triphenylarsin führen kann.

Die Zugabe von Wasser in DMF ruft auch in diesem Fall, ähnlich wie beim DMSO, nur eine kleine Verschiebung der Reduktionswellen zu positiveren Potentialwerten (Abb. 11).

Die Reduktion des TAsO findet also weiterhin bei einem negativeren Potentialwert als -2 Volt statt. Die Zugabe von Wasser erleichtert nur die Reduktion des TAsO zum entsprechenden Anion (Gl. II), was auch in den entsprechenden Wasser-DMSO-Lösungen festgestellt wurde.

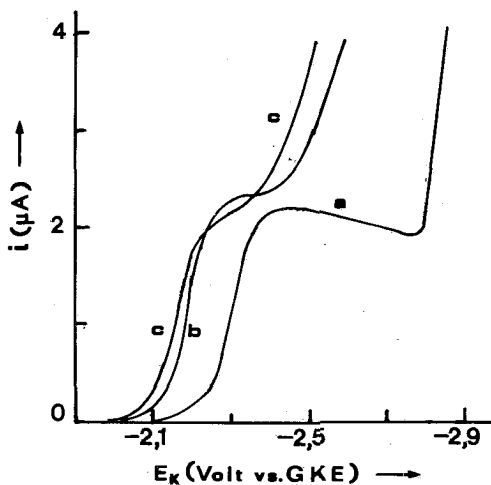


Abb. 11. Strom-Spannungs-Kurven von TAsO ($1 \cdot 10^{-3} \text{M}$) in DMF-Lösungen bei Abwesenheit und Anwesenheit von Wasser a) 100% DMF, b) 20% v/v H₂O, c) 40% v/v H₂O. Grundelektrolyt (C₂H₅)₄NI (10^{-3}M).

Abstract:

Polarographic behavior of triphenylarsinoxide and of benzoic acid in DMSO, DMF and in their aqueous mixtures.

The polarographic behavior of the system triphenylarsinoxide (TAsO)-benzoic acid is studied in DMSO and DMF solutions in the presence or absence of water.

A similar behavior of TAsO in these two solvents is observed. No reduction of the depolarizer in question to the corresponding triphenylarsine in DMSO as well as in DMF solutions has been detected. In that case the depolarizer is reduced to an anion, by taking up two electrons through splitting of a phenyl group from the molecule.

The addition of water into DMSO as well as DMF simply facilitates the above reduction of the depolarizer and causes a shift of the polarographic waves to more positive potentials.

It is further proved, that in the presence of benzoic acid in the above systems, no reduction of TAsO to the corresponding triphenylarsine takes place; in that case two reduction waves are observed. The first wave corresponds to the acid hydrogen deposition, which was proved by taking the polarographic waves of benzoic acid in the absence of any other depolarizer. The second wave refers to the reduction of TAsO to the corresponding anion and it is observed at the potential expected.

Key words: Polarographic, triphenylarsinoxide, benzoic acid, triphenylarsine, half-wave potential, electroreduction.

Abbreviations: TAsO: Triphenylarsinoxid. GKE: Gesättigte Kalomel Elektrode. DMSO: Dimethylsulfoxid. DMF: Dimethylformamid.

Περίληψις

Πολαρογραφική συμπεριφορά τοῦ τριφαινυλοαρσινοξειδίου καὶ τοῦ βενζοϊκοῦ ὀξέος ἐντὸς διμεθυλοσουλφοξειδίου, διμεθυλοφορμαμίδιου καὶ τῶν μιγμάτων αὐτῶν μέθ' ὕδατος

Μελετᾶται ἡ πολαρογραφικὴ συμπεριφορὰ τοῦ συστήματος τριφαινυλοαρσινοξειδίου (TAsO)-Βενζοϊκοῦ ὀξέος ἐντὸς DMSO καὶ DMF διαλυμάτων παρουσία καὶ ἀπουσία ὕδατος. Παρατηρεῖται ἡ αὐτὴ πολαρογραφικὴ συμπεριφορὰ τοῦ TAsO ἐντὸς τῶν δύο αὐτῶν διαλυτικῶν μέσων. Οὐδεμία ἀναγωγὴ τοῦ ἐν λόγῳ ἀποπολωτοῦ πρὸς τὴν ἀντίστοιχον τριφαινυλαρσίνην διεπιστώθη, τόσον ἐντὸς DMSO ὅσον καὶ ἐντὸς DMF. Εἰς τὴν περίπτωσιν αὐτὴν ὁ ἀποπολωτὴς ἀνάγεται διὰ προσλήψεως δύο ἠλεκτρονίων καὶ ἀποσπάσεως μιᾶς φαινυλικῆς ὁμάδος πρὸς τὸ ἀντίστοιχον ἀνιόν.

Ἡ προσθήκη ὕδατος τόσον ἐντὸς τοῦ DMSO ὅσον καὶ ἐντὸς DMF ἀπλῶς διευκολύνει τὴν ἐν λόγῳ ἀναγωγὴν τοῦ ἀποπολωτοῦ καὶ δημιουργεῖ μίαν μετατόπισιν τῶν πολαρογραφικῶν κυμάτων πρὸς θετικωτέρας τιμᾶς δυναμικοῦ.

Διαπιστοῦται περαιτέρω ὅτι ἡ προσθήκη βενζοϊκοῦ ὀξέος εἰς τὰ ἐν λόγῳ διαλυτικὰ συστήματα δὲν ὀδηγεῖ εἰς τὴν ἀναγωγὴν τοῦ TAsO πρὸς τὴν ἀντίστοιχον τριφαινυλαρσίνην. Εἰς τὴν περίπτωσιν αὐτὴν ἔχομεν τὴν δημιουργίαν δύο κυμάτων ἀναγωγῆς. Τὸ πρῶτον κῆμα ἀποδίδεται εἰς τὴν ἀπόθεσιν τοῦ ὕδρογόνου τοῦ ὀξέος. Τὸ δεῦτερον κῆμα ὀφείλεται εἰς τὴν ἀναγωγὴν τοῦ TAsO πρὸς τὸ ἀντίστοιχον ἀνιόν καὶ ἐμφανίζεται εἰς τὴν ἀναμενομένην περιοχὴν δυναμικοῦ.

Literatur

1. Jannakoudakis, D., Mavridis, P.G. und Markopoulos, J.: *Chimika Chronika New Series*, 5, 249 (1976).
2. Jannakoudakis, D.: *Chimika Chronika*, 30 A, 28 (1965).
3. Matschiner, H., Tzschach, A. und Steinert, A.: *Z. anorg. allg. Chem.* 373 237 (1970).
4. Wawzonek, S. and Wagenknecht, J.H.: *Polarography 1964*, p. 1035.
5. Kargin, YU. M., Semakhina, N.I., Chernokal'skii, B.D., Gel'Fond, A.S. and Kamai, G. Kh.: Translation from *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, No 11, 2488 (1970).
6. Dessy, R.E., Chivers, T. and Kitching, W.: *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 467 (1966).

Short Papers

Chimika Chronika, New Series, 5, 275-279 (1976)

THE CHLORINOLYSIS OF PETROLEUM ASPHALTENES

SPEROS E. MOSCHOPEDIS and JAMES G. SPEIGHT

*Fuel Sciences Division, Alberta Research Council, 11315 - 87 Avenue, Edmonton, Alberta T6G 2C2
Canada*

(Received March 3, 1976)

Summary

Thermal degradation of petroleum asphaltenes, or of chlorinated petroleum asphaltenes, in the presence of chlorine, affords significant amounts of carbon tetrachloride, hexachlorobenzene and other low molecular weight chlorinated hydrocarbons.

Introduction

The traditional uses of petroleum involve the production of a variety of grades of fuels and the derivation of chemicals from the oil during the refining operation. However, with the onset of the present "energy crisis," refinery operators are, of necessity, having to produce higher yields of gasolines and fuel oils at the expense of the petrochemicals, and it is quite conceivable that at some time in the future, a shortage of the chemicals normally derived from petroleum could become evident. In previous communications from these laboratories, we have indicated how the macrostructure of a petroleum asphaltene may be modified by simple chemical conversions such as oxidation,^{1,2} sulphonation and sulphomethylation,² halogenation^{3,4,5} and phosphorylation⁶ to mention only a few. The resulting products, in which the macrostructure of the asphaltene has generally been preserved, will be tested for a variety of uses, but, to date, our main tests have centred around the sulphonated and sulphomethylated materials and their derivatives which have satisfactorily undergone tests for drilling mud thinners giving results comparable to those obtained with commercial thinners.⁶ In addition, the ability of these materials to lower surface tension in aqueous solution indicates that these compounds may also find use as emulsifiers for the in situ recovery of the Athabasca bitumen.^{7,8} In fact, variations on this theme are multiple.

We now report preliminary investigations into the more complete degradation of asphaltenes to well-defined low molecular weight materials through the agency of high temperatures. More particularly, we describe the formation of low molecular weight chlorinated materials, including carbon tetrachloride, by chlorinolysis using a simple flow pyrolysis technique. We briefly note here that carbon tetrachloride is usually produced by chlorination of methane or carbon disulphide⁹ and that, at the beginning of the decade, use of carbon tetrachloride in Canada exceeded thirty-five million pounds** annually.¹⁰ We are therefore of the

* In the present circumstances, the authors consider this to be the wasteful use of a good fuel gas and of a good solvent.

** 1 pound = 0.4536 kg

opinion that alternate routes to materials of this type would be beneficial, especially when the precursor (asphaltenes) is considered useless (except as an on-site fuel) by many workers. Thus, the present communication relates to the role of petroleum asphaltenes as a raw petrochemical feedstock from which attempts to produce significant yields of well-defined chemicals are described.

Experimental

Asphaltenes were separated from Athabasca and chlorinated with elemental chlorine by procedures which have been described previously.^{3,11} Athabasca asphaltenes (5 g) were also chlorinated in a fluidized bed by passage of chlorine gas (50 to 70 cc/min) at room temperature for 2 hours. Initially the reaction was exothermic and precautions to control overheating were necessary. After passage of air to expel excess chlorine gas, the material was dried to constant weight in vacuo, and yielded 6.908 of a product containing 28.1% w/w of organically - bound chlorine. The asphaltenes (C, 79.7%; H, 8.1%; N, 1.2%; O, 3.5%; S, 7.5%) and the chloro-asphaltenes (C, 52.9%; H, 5.0%; N, 0.6%; O, 1.8%; S, 5.0%; Cl, 34.7%) were pyrolyzed in a conventional flow system at specified temperatures either in an atmosphere of dry nitrogen (150 ml/min) or chlorine (150 ml/min) until no further volatile material appeared to be evolved from the residue. Volatile products were collected in a series of traps maintained at room temperature, 0°C, and -78°C: After removal of chlorine, product compositions were estimated by gas-liquid chromatography and mass spectroscopy. Pyrolysis-gas chromatography was carried out by inserting the sample into a pyrolyzer attached to a Varian Aerograph gas chromatograph. The temperature of the pyrolyzer was raised from ambient to 500°C over 30 minutes and the products determined in the usual manner by comparison of the retention times with those of known materials.

Results

Exploratory experiments using a pyrolysis-gas chromatographic technique produced a variety of interesting well-defined products. Thus, thermal degradation of Athabasca asphaltenes resulted in the production of a considerable amount of gaseous material which contained minor amounts of hydrogen and carbon monoxide with some sulphur dioxide and carbon dioxide as the non-hydrocarbon material. The aliphatic hydrocarbon products ranged from methane to nonane as well as substantial amounts of isobutane; aromatics such as benzene, toluene, ethylbenzene and higher methylated benzenes were also present together with considerable amounts of ethylene. Pyrolysis of the chloro-asphaltenes under similar conditions also produced these same products, but in overall lesser quantities as significant proportions of olefins higher in the series than ethylene (propene to hexenes) were also present in the product mix. There was also some evidence of chloro-carbon formation insofar as methyl chloride, propyl chloride and butyl chloride occurred as trace amounts in the gaseous mix: Thermolysis of the asphaltenes and chloro-asphaltenes in an atmosphere of nitrogen in a silica tube afforded similar results. Again, normal paraffins (to C₁₂) were identified as the major products with, in the case of the chloromaterial, lesser amounts of olefins having up to eight carbon atoms per molecule; naphthalene and hexachlorobenzene were also identified as products of these reactions (Table I).

The thermal degradation of Athabasca asphaltenes and chloroasphaltenes in the presence of chlorine were also of interest insofar as the major identifiable product of the reactions was carbon tetrachloride (Table II). Thus, thermal

degradation of the asphaltenes in the presence of chlorine in a simple flow system produced a solid residue and a liquid product mix containing liquid chloro-carbons from carbon tetrachloride to chlorobutanes, which could be separated by distillation in vacuo, and a solid which collected in the colder parts of the pyrolysis tube. Mass spectroscopic analysis indicated the major component (>60%) of the residue to be tetrachloronaphthalene(s). Thermal degradation of the chloro-asphaltenes under similar conditions also yielded a solid residue and a liquid product mix which again contained substantial amounts of carbon tetrachloride, and other low boiling chlorocarbons up to the chlorobutanes. As before, a solid product was also isolated, which was shown by mass and infrared spectroscopy to be substantially pure (ca 80%) hexachlorobenzene.

Discussion

The results indicate that it is indeed possible to produce, and identify, well-defined compounds by thermal degradation of petroleum asphaltenes. It is worthy of comment at this point that whilst considerable portions of n-paraffins were produced during each pyrolysis, we do not feel that it is possible at this stage to comment on their exact mode of formation. We also note that, without exception, isobutane formation accompanied n-paraffin production, and we hope to elucidate the mechanisms by which these materials are produced by further work. We presume that free radical intermediates are involved as we have previously noted¹² that thermal degradation of chemically reduced asphaltenes affords higher yields of the lower molecular weight paraffins with a corresponding decrease in the higher molecular weight material.

Thermal degradation in the presence of chlorine afforded easily identifiable products. The production of carbon tetrachloride is most noteworthy as it perhaps affords an alternate route to this valuable chemical from what has been considered as undesirable materials by many in the industry. It also affords a use of the material precipitated during the deasphalting process when metal chlorides are employed as the precipitating agents.¹³ Carbon tetrachloride has also been produced during the chlorinolysis of coal^{14,15} and whilst the chlorinolysis of petroleum asphaltenes has been reported to produce hexachlorobenzene,¹⁶ we are of the opinion that the conditions employed were not conducive to the detection of carbon tetrachloride and the like.

The formation of tetrachloronaphthalene(s) during the thermal degradation may at first seem surprising but, after due consideration, explanations can be offered. The formation of naphthalene during the pyrolysis of a wide variety of aromatic, aliphatic and carbonaceous materials has been established in our laboratories,¹⁷ and one may assume formation of the tetrachloronaphthalene(s) by either of the following routes:

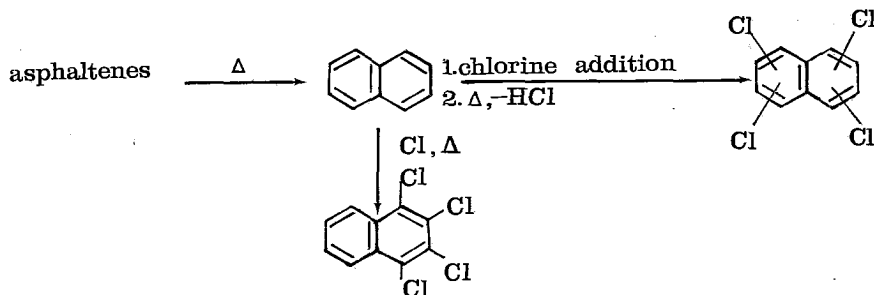


TABLE I. *Thermal degradation of asphaltenes in nitrogen*

Material	Temp. (°C)	Products, w/w % of C				Residue	
		n-Paraffins*	Oil	Olefins	Other**	(w/w%)	(%C1)
Asphaltenes (untreated)	350	3	38	trace	naphthalene, 2	42	0
Asphaltenes (chloro)	350	1	23	ca 0.5	hexachloro- benzene, 2	58	12
Asphaltenes (untreated)	500	5	40	trace	naphthalene, 2	41	0
Asphaltenes (chloro)	500	2	25	1	hexachloro- benzene, 2	54	10
Asphaltenes (untreated)	750	9	39	trace	naphthalene, 2	39	0
Asphaltenes (chloro)	750	5	24	3	hexachloro- benzene, 3	51	9

* Up to, and including C₁₂

** Identified by mass spectroscopy

TABLE II. *Thermal degradation of asphaltènes in chlorine*

Material	Temp. (°C)	Products w/w % of C			Residue	
		CCl ₄	Oil	Other	(w/w%)	(%C1)
Asphaltenes (untreated)	350	5	26	tetrachloronaphthalene*, 2	54	17
Asphaltenes (chloro)	350	6	23	hexachlorobenzene**, 3	72	31
Asphaltenes (untreated)	500	8	25	tetrachloronaphthalene*, 3	52	16
Asphaltenes (chloro)	500	10	21	hexachlorobenzene**, 4	70	31
Asphaltenes (untreated)	750	10	20	tetrachloronaphthalene*, 4	50	14
Asphaltenes (chloro)	750	12	22	hexachloronzene**, 4	68	28

* Identified by mass spectroscopy

** Identified by mass and infrared spectroscopy

If the mechanisms of formation of hexachlorobenzene and the tetrachloronaphthalene(s) involve similar pathways, the absence of any trichlorobenzene(s), tetrachlorobenzene(w) and other partially chlorinated benzenes in the hexachlorobenzene mix would tend to lend evidence to the occurrence of the four chlorine atoms in one ring.

Finally, we note that, even after correction for chlorine content, the presence of chlorine in the starting material or during the thermal degradation markedly increased the amount of residue. Presumably, the chlorine acts as a coupling agent and, hence, assists coke formation. Further work is proceeding when we hope to produce some indication of the mechanism of these reactions which hopefully will

lead to a better understanding of the processes involved and allow us to substantially increase the yields of the various products. In this latter respect we particularly look to reactions involving the use of higher pressures.

We thank Syncrude Canada Ltd. for gifts of dry bitumen.

Περίληψις

Χλωρινόλυσις Ἀσφαλτινῶν Πετρελαίου

Τετραχλωριούχος ἄνθραξ, ἑξαχλωριούχον βενζόλιον καὶ διάφοροι μικροῦ μοριακοῦ βάρους χλωριωμένοι ὑδρογονάνθρακες, ἐλήφθησαν εἰς ἱκανοποιητικὰς ἀποδόσεις διὰ πυρολύσεως τῶν ἀσφαλτινῶν καὶ χλωριωμένων ἀσφαλτινῶν πετρελαίου, παρουσία χλωρίου.

References and Notes

- 1 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G.: *Fuel*, **50**, 211 (1971)
- 2 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G. *Fuel*, **50**, 34 (1971)
- 3 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G. *Fuel*, **50**, 58 (1971)
- 4 Moschopedis S.E. and Speight, J.G. *Fuel*, **49**, 335 (1970)
- 5 Speight, J.G.: *Fuel*, **50**, 175 (1971)
- 6 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G.: *Am. Chem. Soc. Preprints, Div. Fuel Chem.*, **19** (2), 291 (1974)
- 7 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G.: *Fuel*, **53**, 21 (1974)
- 8 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G.: *Am. Chem. Soc. Preprints, Div. Fuel Chem.*, **19** (2), 192 (1974)
- 9 *Encyclopaedia of Chemical Technology*, **5**, 132 (1964)
- 10 *Statistics Canada Catalogues*, Queen's Printer, Ottawa, 1970-72
- 11 Speight, J.G.: *Fuel*, **49**, 76 (1970)
- 12 Speight, J.G.: *Fuel*, **52**, 300 (1973)
- 13 Moschopedis, S.E. and Speight, J.G.: *Fuel*, **53**, 222 (1974)
- 14 Boyk, S. and Haas, H.B.: *Ind. Eng. Chem.* **38**, 745 (1946).
- 15 Kung, F.E.: *Fuel*, **43**, 225 (1964)
- 16 Nellensteyn, F.J. and Dorleyn, J.: *Chem. Weekblad.*, **43**, 4 (1947)
- 17 Speight, J.G., unpublished data