

**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“**

**НАУЧНИ
ТРУДОВЕ
тот 37, кн. 5, 2010**

Химия

**УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“**

**UNIVERSITY OF PLOVDIV „PAISII HILENDARSKI“ – BULGARIA
SCIENTIFIC PAPERS – CHEMISTRY
VOL. 37, BOOK 5, 2010**

Редакционна колегия:

Председател: проф. дхн Георги Андреев

Членове: доц. д-р Мария Стоянова

доц. д-р Стела Статкова-Абегхе

ISSN 0204-5346

СЪДЪРЖАНИЕ

За проф. Атанас Венков 7

**6-ENDO vs. 5-EXO ЕЛЕКТРОФИЛНА ЦИКЛИЗАЦИЯ НА
ФОСФОРИЛИРАНИ 2-ХЛОРО-1,3-АЛКАДИЕНИ
ОБЗОР**

Валерий Христов 9

**COMPLEX FORMATION AND
LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN THE
NIOBIUM(V) – 4-NITROCATECHOL –
THIAZOLYL BLUE TETRAZOLIUM SYSTEM**

*Petya Racheva, Vanya Lekova, Teodora Stefanova,
Atanas Dimitrov and Kiril Gavazov.....* 33

**DETERMINATION OF MOLYBDENUM
WITH TRIPHENYLtetrazolium
CHLORIDE IN PLANT SAMPLES**

D. Kostova..... 43

**A COMPARATIVE ANALYSIS FOR
A CONTENT OF MANGANESE IN PLANTS**

D. Kostova..... 49

**VIBRATION SPECTRA OF 2-[(TRICHLOROACETYL)
AMINO]BENZAMIDE AND A PARTIAL ASSIGNMENT
OF THE VIBRATIONAL BANDS**

P. N. Penchev and J. S. Petrov 55

**COMPARATIVE SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF
THIN FILMS AND TARGETS FROM NLO MATERIALS
DEPOSITED BY PULSED LASER DEPOSITION**

P. Penchev, R. Bakalska, S. Sotirov, M. Todorova, V. Serbezov 59

**OPTICAL AND AFM MICROSCOPY STUDING
OF THIN NLO ORGANIC FILMS DEPOSITED
BY PULSED LASER DEPOSITION**

*M. Draganov, R. Bakalska, S. Sotirov, E. Penchev,
M. Todorova, V. Serbezov* 65

**RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF SOME
NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

Vessela Kancheva, Adriana Slavova-Kazakova 71

**PREDICTION OF α,β -UNSATURATED
ALDEHYDES FROM STRUCTURE FOR
ACUTE AQUATIC TOXICITY**

Yana K. Koleva 79

**СПЕКТРАЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА
НЯКОИ ХАЛОГЕННИ ПРОИЗВОДНИ
НА НИТРОСУЛФОНИ**

C. Иванова 85

**SYNTHESIS OF 6-ETHANIMIDOYL-
5H-DIBENZO[a,c][7]ANNULENE-5,7(6H)-DIONE**

Marin Marinov, Neyko Stoyanov 89

**НОВ Рb(II)-ОТПЕЧАТАН ПОЛИМЕТАКРИЛАТЕН
СОРБЕНТ: СИНТЕЗ, ИЗПИТАНИЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ**

*Христина Петрова, Иванка Дакова,
Ирина Караджосва, Валери Даков, Георги Георгиев* 93

**ПРИЛОЖЕНИЕ НА МИКРОФОТОГРАФСКИ
МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА СТРУКТУРАТА И
СТАБИЛНОСТТА НА ЕМУЛСИОННИ СИСТЕМИ**

Ивелина Василева 103

**SOAP BUBBLE ELASTICITY: ANALYSIS AND
CORRELATION WITH FOAM STABILITY**

*Stoyan I. Karakashev, Roumen Tsekov,
Emil D. Manev and Anh V. Nguyen..... 109*

**VITAMIN CONTENT AND FATTY
ACIDS COMPOSITION OF RAINBOW
TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

Stancheva M., Dobreva D., Merdzhanova A., Galunska B..... 117

**ORGANOCHLORINE POLLUTANTS
IN BLUEFISH (POMATOMUS SALTATRIX)
FROM BULGARIAN BLACK SEA COAST**

*Mona Stancheva, Tomislav Rizov,
Lubomir Makedonski, Stanislava Georgieva 125*

**ЛИПИДЕН ПРОФИЛ НА БИОМАСА ОТ ЩАМ
SPOROBOLOMYCES SALMONICOLOR AL1**

С. Димитрова, К. Павлова, Л. Луканов..... 131

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БИОЛОГИЧНОАКТИВНИ
ВЕЩЕСТВА В ЕКСТРАКТИ ОТ FOLIA BETULAE**

*С. Димитрова, В. Андонова, П. Пенева,
Д. Пенков, М. Касърова, Л. Луканов 137*

**ЛИПИДЕН СЪСТАВ НА СЕМЕНА
ОТ MADIA SATIVA L.**

*Г. Антова, М. Златанов, М. Ангелова-Ромова,
Т. Ненкова, Е. Иванова, М. Марчева, С. Кирилова..... 143*

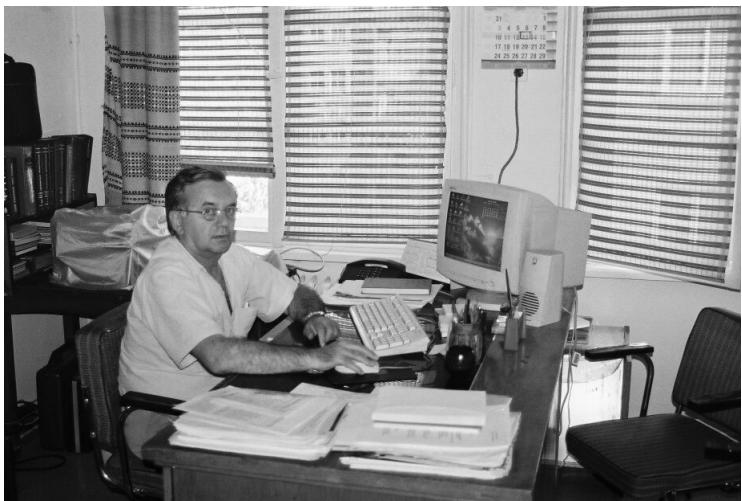
**ЛИПИДЕН СЪСТАВ И ФИЗИКОХИМИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ
НА СЕМЕНА ОТ САФЛОР (CARTHAMUS TINCTORIUS L.)**

*М. Златанов, Г. Антова, М. Ангелова-Ромова, Б. Дамянова,
С. Момчилова, И. Мареков, М. Марчева, О. Тенева 149*

**ЕКСЕРГОЕКОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ НА ПРОЦЕСИТЕ
НА ПРЕРАБОТВАНЕ НА ЦИНКОВИ КЕКОВЕ
ОТ ПРОИЗВОДСТВО НА ЦИНК**

Г. Патронов, Сн. Магаева..... 155

Проф. дхн Атанас Венков – 70-години от рождениято



Проф. Атанас Венков е роден на 15 ноември 1940 г. в гр. Свиленград. През 1966 г. завърши специалност Химия в Пловдивски университет „Паисий Хиландарски“, където същата година е избран за асистент в катедрата по Органична химия.

В катедрата започва работа под ръководството на тогавашния ѝ ръководител проф. Гълъбов в областта на

природните съединения, като изследва алкалоидното съдържание на поредица лечебни растения. В периода 1966 – 1972 е съавтор на 11 научни публикации.

През 1974 г. катедрата е оглавена от проф. дхн Н. Моллов, който променя научното направление. Така младият Венков започва изследвания върху синтез на изохинолинови съединения чрез реакция на вътрешномолекулно алфа-амидоалкилиране, а през 1978 г. успешно защитава докторска дисертация по тази тематика.

След избирането му за доцент през 1982 г., Венков чете лекции по дисциплината „Теоретични основи на органичната химия“ и продължава изследванията си върху приложение и свойства на ацилиминиеви реагенти. Работи съвместно с проф. Моллов и ръководената от него група в „Лаборатория по биологично активни вещества“ към БАН-Пловдив.

Научните приноси на проф. Венков са предимно върху изследване на реакцията на амидоалкилиране и приложение на N-ацилиминиевите реагенти за синтез на N-хетероциклически съединения, с което защитава дисертация за доктор на химическите науки през 1997 г., а на следващата година е избран за професор по органична химия. Разработките имат теоретични и приложни приноси в областта на органичния синтез и изследване хода на органични реакции главно с образуване на нова въглерод-въглеродна връзка и научно-приложно значение поради биологичната активност на някои от получаваните вещества като алкалоиди, лекарствени вещества и химически средства за растителна защита. Разработен е вътрешно молекулен вариант на реакцията на алфа-амидоалкилиране на ароматни съединения чрез използването на подходящо построени имини и ацил халогениди, признат в международната литература.

През деветдесетте години, след оттеглянето на проф. Моллов, проф. Венков оглавява катедрата по Органична химия и създава научна група, привличайки свои студенти и дипломанти. В периода 1987 – 2003 г. той е научен ръководител на четирима редовни и двама свободни докторанти. В последст-

вие под неговото ръководство са защитени три докторски дисертации и се обучават много студенти.

Като дългогодишен преподавател проф. Венков разработва лекции по Органична химия и Органичен синтез, както и лекции и упражнения по Химия на лекарствените вещества, която се изучава като основна дисциплина във въведената от него през 2003 г. магистърска програма „Медицинска химия“.

В периода 1981 – 1986 г. е ръководител на Базата за технологично развитие към Химически комбинат „Агрия“ – Пловдив. Като резултат от натрупаните познания и опит върху свойствата и отнасянията на използваните N-ацилиминиеви реагенти е разработена подобрена технология за промишлено получаване на широко използвани в земеделието хербициди до етап промишлено внедряване. Значителен брой нови производни, около 100 нови изохинолинови и нециклични амиди, са изпитани за пестицидна и фармакологична активност от френската фирма Рон-Пуленк, Бьорингер – Германия и SpeChem – Чехия, като получените резултати показват много добра активност като хербициди и инсектициди.

В резултат на повече от 35 години предана работа в ПУ „П. Хилендарски“, Атанас Венков е автор на 106 публикации, от тях в списания с импакт фактор 74 (с общ импакт фактор 64.85), цитирани над 250 пъти от български и чуждестранни автори. Част от приложните изследвания са защитени с патентно право в 14 авторски свидетелства.

Внезапната кончина на професор Венков (на 20.07.2003 г. на път за работа) не слага край на творческите му търсения. Създадената от него научна група продължава и развива идеите за синтез на нови хетероцикли съединения. По мнение на университетското ръководство, тази Група по Органичен синтез е най-успешната и продуктивна млада научна група в Химическия факултет. Към началото на 2011 година в групата по Органичен синтез работят двама доценти, трима доктори, четирима докторанти и дипломанти.

6-ENDO vs. 5-EXO ЕЛЕКТРОФИЛНА ЦИКЛИЗАЦИЯ НА ФОСФОРИЛИРАНИ 2-ХЛОРО-1,3-АЛКАДИЕНИ

ОБЗОР

Валерий Христов

Катедра по органична химия и технология

Факултет по природни науки

Шуменски университет „Епископ Константин Преславски“

Шумен 9712, ул. „Университетска“ 115, E-Mail: vchristo@shu-bg.net

ABSTRACT

As a part of our long-standing programme on the cyclization reactions of functionalized dienes we were preparing and studying the phosphorylated 2-chloro-1,3-alkadienes **1** in electrophilic cyclization reactions. The electrophilic cyclization of a variety of 2-chloro-1,3-alkadienephosphonic derivatives such as chlorides, esters, acids, phosphane oxides, amido-esters, 1,3,2-dioxaphospholanes, benzo [d]-1,3,2-dioxaphospholanes and oxiranes to the heterocyclic systems and received our considerable attention due to its synthetic utility and remarkable regioselectivity. We found that depending on the structure of the starting 1,3-alkadiene as well as the type of the electrophilic reagent, the reactions proceed with 6-*endo* or/and 5-*exo* cyclization of the dienic system bearing phosphoryl group ($O=P-C=C-C=C$) to give different heterocyclic compounds in most cases. It should be pointed out that conceptually there exist two distinct modes of cyclization of the phosphorylated 2-chloro-1,3-alkadienes **1** if the electrophile attacks preferable the C^3-C^4 double bond, which seems likely. It is evident that these pathways are closely connected with intramolecular participation of the phosphoryl group as internal nucleophile in the final step of the heterocyclization.

Key words: *Phosphorylated 2-chloro-1,3-alkadienes, synthesis, electrophilic cyclization, 6-endo cyclization, 5-exo cyclization.*

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните десетилетия изследванията в областта на органичната химия се характеризират с бързото развитие на т. нар. хетероатомна химия, т. е. химията на съединенията, съдържащи нетрадиционни химични елементи като B, Si, P, S, Se и др. Органофосфорните съединения години наред продължават да са обект на непрекъснати изследвания както поради многообразните им и важни приложения, така и поради богатия фундаментален принос към органичната химия, свързан с участието им в най-различни превръщания [1-5]. Особено внимание се отделя на

влиянието на фосфорния атом върху реакционната способност на тези съединения, а от там и за определяне на техните специфични отнасяния. Добър пример в това отношение са ненаситените органофосфорни съединения. Тези съединения са особено интересни като обекти за изучаване влиянието на фосфорната функция на реакционната им способност и направлението на реакцията на сложните връзки. Трябва да се отбележи, че наред с класическите свойства, характерни за сложни връзки, установено е, че ненаситените фосфорни съединения, притежават и редица свойства, водещи до наблюдаване на нови и интересни химични преходи.

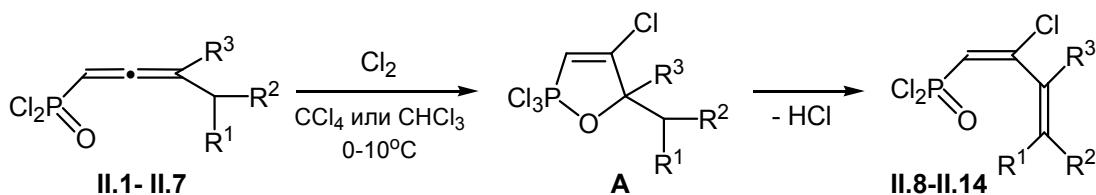
Всичко това прави изследванията на Р-функционализираните 1,3-диени и по-точно създаването на удобни и селективни методи за техния синтез и изучаването на реакциите им на циклизация при взаимодействие с електрофилни реагенти, особено интересна и актуална задача. Взаимното влияние на двета фрагмента – 1,3-диеновата система от двойни връзки и Р-функционална група – правят фосфор-съдържащите 1,3-диени интересни субстрати за изследване на реакциите на електрофилна циклизация с оглед проучване на възможностите и ограниченията на протичащата циклизация. Тези изследвания биха дали възможност, от една страна – за разширяване на синтетичния потенциал на тези реакции, от друга – за получаване на различни типове функционално заместени циклени съединения, и от трета гледна точка – способстват за разбиране същността на реакциите, предизвикани от електрофилна атака по двойни връзки.

Целта на изследванията, описани в този обзор, бе да се синтезират чрез създаването и използването на удобен и високо региоселективен метод разнообразни производни на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини, които да бъдат изследвани в реакции с електрофилни реагенти.

1. СИНТЕЗ И СТРУКТУРА НА ПРОИЗВОДНИ НА 2-ХЛОРО-1,3-АЛКАДИЕНФОСФОНОВИ КИСЕЛИНИ

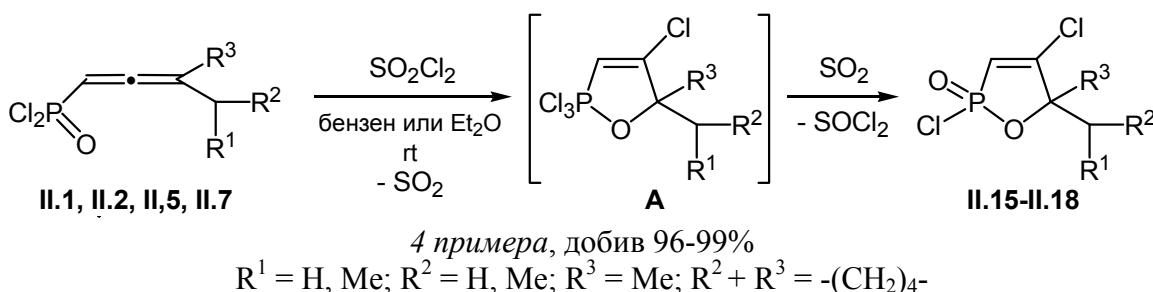
В изпълнение на горепосочената цел, ние използвахме един високо селективен метод за получаване на фосфорилирани 1,3-алкадиени [6,7]. Същността на този метод се състои в създаване на 1,3-диенфосфонатната система от двойни връзки и получаване на съответните дихлориди на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите киселини, които са използвани като прекурсори на другите производни на тези киселини и на самите тях.

Като изходни съединения при този метод използвахме получените в резултат на [2,3]-сигматропна прегрупировка на съответните заместени пропаргил дихлорофосфити дихлориди на аленифосфонови киселини, съдържащи дизаместен C^3 -атом на алениновата система. Ние установихме [6,7], че хлорирането на аленифосфоновите дихлориди **П.1-П.7** протича с хетероциклизаця на аленифосфонатната система от двойни връзки и междуинно образуване на 2,2,2,4-тетрахлоро-2,5-дихидро-1,2-оксафосфолите **A**, които при съхраняване или при нагряване лесно елиминират хлороводород с отваряне на пръстена и получаване на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите дихлориди **П.8-П.14**.



7 примера, добив 87-96%
 $R^1 = H, Me; R^2 = H, Me, Et; R^3 = Me, Et, Pr, iPr; R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

С оглед доказване междинното образуване на цикличните тетрахлорооксафосфоли **A**, ние изследвахме реакцията на аленфосфоновите дихлориди **II.1**, **II.2**, **II.5** и **II.7** със сулфурил хлорид, вместо с хлор, като установихме [6,7], че също протича с циклизация, при което направо и с количествени добиви се получават 2,4-дихлоро-2,5-дихидро-1,2-оксафолите **II.15-II.18**. Вероятно, в условията на реакцията продуктите **A** бързо реагират с отделящия се при дисоциацията на сулфурил хлорид серен диоксид с получаване на цикличните хлориди с тетракоординиран фосфор **II.15-II.18**. Отделящият се при реакцията тионил хлорид е изолиран препарativно и идентифициран чрез физични константи и спектрално.

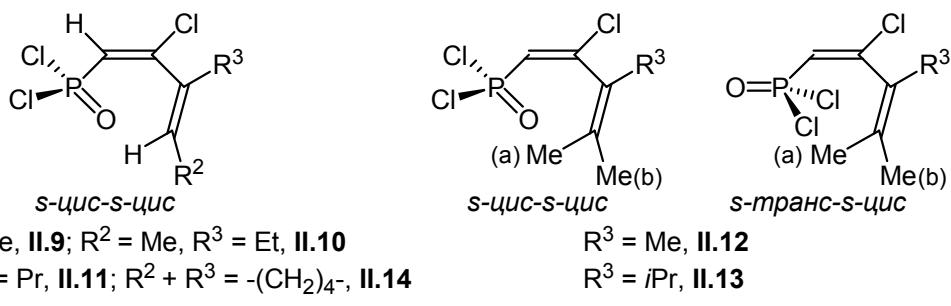


Получаването на дихлорооксафолите **II.15-II.18** представлява косвено доказателство за образуването в междинния стадий на цикличните тетрахлорооксафосфоли **A** при хлорирането с газообразен хлор на аленфосфоновите дихлориди **II.1-II.7**.

Междинното образуване на цикличните тетрахлорооксафосфоли **A** при хлориране на аленфосфоновите дихлориди **II.1-II.7** предопределя геометричната структура на получаващите се 1,3-диенфосфонови дихлориди **II.8-II.14**. Те съдържат фосфонатна група и хлорен атом в *транс* положение по отношение на C¹-C²-двойната връзка, т. е. 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонатите **II.8-II.14** имат (1*E*)-конфигурация. Анализът на техните ¹H ЯМР-спектри показва [6,7], че съединенията с различни заместители при C⁴-атома на диеновата система **II.9**, **II.10** и **II.11** представляват смес от два диастереомера в съотношение (1*E*, 3*Z*) : (1*E*, 3*E*) = 3 : 1.

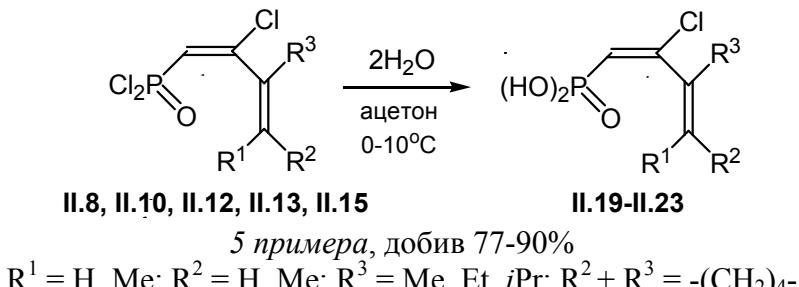
За определяне на предпочитените конформации относно =C²-C³= и =P-C¹= връзките на синтезираните 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонати **II.9-II.14** проведохме ¹H ЯМР-спектрални изследвания с използване на лантаниден отместващ реагент – комплекса на европий с хептафлуородиметилоктандион (фодий) [8]. Конформационният анализ на 1,3-диенфосфоновите дихлориди **II.9-II.11** и **II.14**, съдържащи водороден атом при C⁴-атома, е проведен чрез сравняване на стойностите на лантанидените отмествания на сигналите на протоните при C¹- и C⁴-атомите на 1,3-диеновата система. Определянето на предпочитените конформа-

ции на диенфосфоновите дихлориди **II.12** и **II.13**, притежаващи две метилови групи при C⁴-атома, е извършено чрез сравняване на лантанидните отмествания на сигналите на протоните на метиловите групи и на заместителя R³.

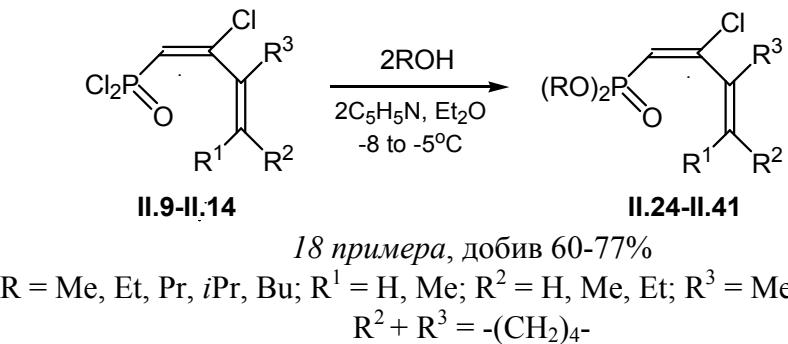


Получените резултати показват [8], че във всички случаи предпочетената конформация на 1,3-диеновата система е *s-cis*. Ориентацията на фосфорилната група зависи от пространствени фактори, а именно от обема на заместителите при крайния въглероден атом на 1,3-диеновата система от двойни връзки.

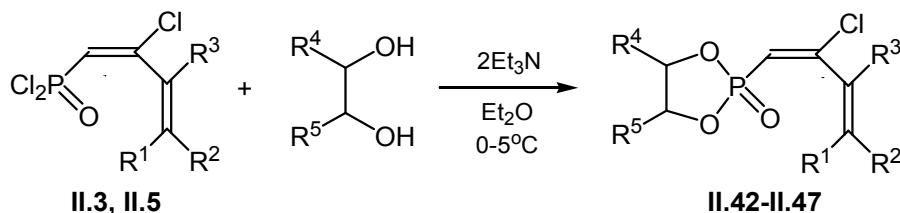
Получените от нас дихлориди **II.8-II.14** използвахме като изходни вещества за синтез на редица други производни на тези киселини, а и на самите киселини. Така например [9], хидролизата на диеновите дихлориди **II.8**, **II.10**, **II.12**, **II.13** и **II.15** в ацетон води до получаването на киселините **II.19-II.23**.



Реакцията на дихлоридите **II.9-II.14** с алкохол протича със заместване на двета хлорни атома с алкоокси-групи и образуване на съответните диалкилови естери [6,7] **II.24-II.41**. Анализът на ¹H ЯМР-спектрите на естерите, съдържащи различни заместители при C⁴-атома на 1,3-диеновата система, показва, че представляват смес от два диастереомера (1E, 3Z) и (1E, 3E) в същото съотношение (3 : 1), както при съответните им дихлориди, което е указание за това, че по време на тяхното получаване не се засяга 1,3-диеновата система, т. е. не се извършва изменение на конфигурацията [6].

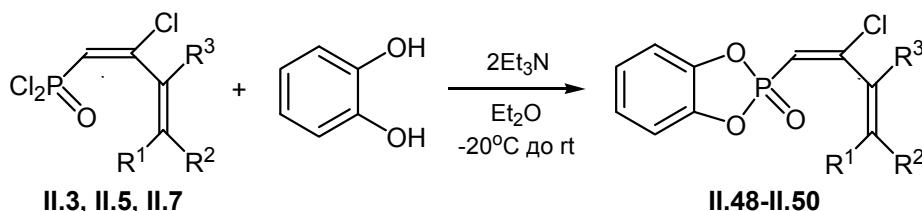


Образуване на петчленен хетеропръстен и синтезиране на 1,3,2-диоксафосфоланите **II.42-II.47** осъществихме при взаимодействие на 1,3-диенфосфоновите дихлориди **II.3** и **II.5** с алкандиоли [10].



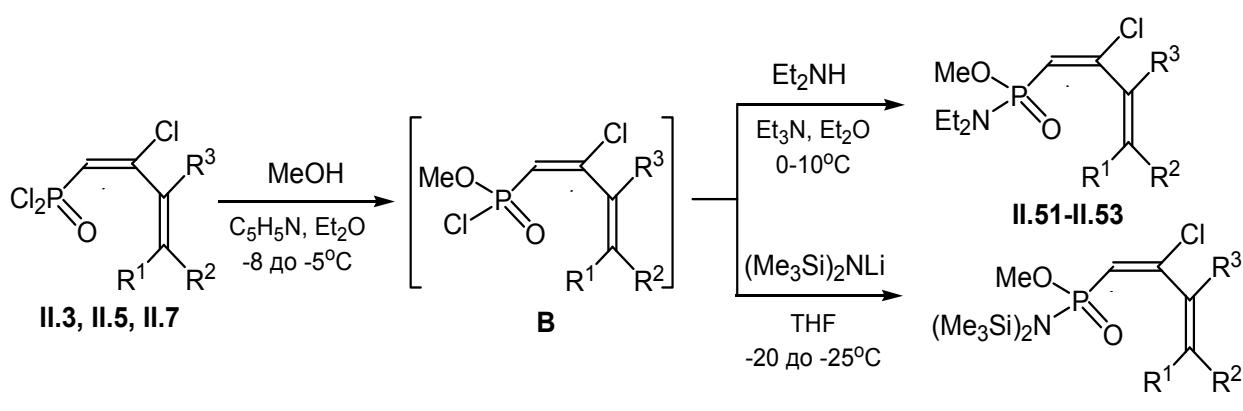
6 примера, добив 68-76%
 $\text{R}^1 = \text{H, Me}; \text{R}^2 = \text{Me}; \text{R}^3 = \text{Me, Et}; \text{R}^4 = \text{H, Me}; \text{R}^5 = \text{H, Me}$

Аналогично, реакцията на дихлоридите **II.3**, **II.5** и **II.7** с пирокатехол води до получаване на бензо[d]-2-(2-хлоро-1,3-алкадиенил)-1,3,2-диоксафосфоланите [11] **II.48-II.50**.



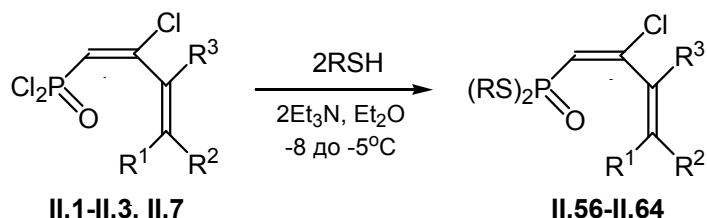
3 примера, добив 49-51%
 $\text{R}^1 = \text{H, Me}; \text{R}^2 = \text{Me}; \text{R}^3 = \text{Me, Et}; \text{R}^2 + \text{R}^3 = -(\text{CH}_2)_4-$

Взаимодействие на диенфосфоновите дихлориди **II.3**, **II.5** и **II.7** с един мол метанол вероятно протича с междуинно образуване на естер-хлоридите **B**, които по-нататък чрез заместване на хлорния атом при обработка с диетиламин или с литиев бис(триметилсилил) амид води до получаване на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите амидоестери [12] **II.51-II.55**.



5 примера, добив 46-54%
 $\text{R}^1 = \text{H, Me}; \text{R}^2 = \text{Me}; \text{R}^3 = \text{Me, Et}; \text{R}^2 + \text{R}^3 = -(\text{CH}_2)_4-$

Ние установихме, че реакцията на дихлоридите **II.1-II.3** и **II.7** с меркаптанни води до образуване на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите тиоестери [13,14] **II.56-II.64**.

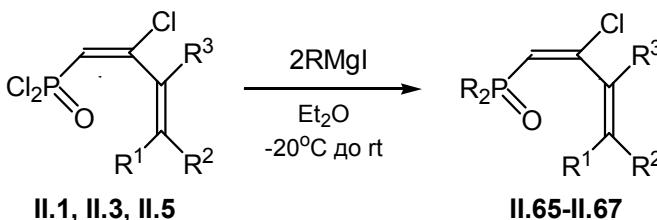


9 примера, добив 61-75%

$R = Et, Pr, iPr, iBu; R^1 = H; R^2 = H, Me; R^3 = Me, Et; R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

Интересно е да отбележим, че за разлика от другите производни на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини, при тиоестерите с различни заместители при C^4 -атома на диеновата система не се запазва съотношението между двета диастереомера както при изходните дихлориди **II.2** и **II.3**. Различието в съотношението на диастереомерите на тиоестерите **II.58** и **II.59** [$(1E, 3Z) : (1E, 3E) = 2 : 1$] от една страна, и на тиоестера **II.60** [$(1E, 3Z) : (1E, 3E) = 4.5 : 1$] от друга, вероятно е обусловено от стерични фактори [13].

Взаимодействието на диенфосфоновите дихлориди **II.1**, **II.3** и **II.5** с алкилмагнезиеви йодиди (реактив на Гриняр) протича с образуване на трудно достъпните в синтетично отношение 2-хлоро-1,3-алкадиенил фосфин оксидите [15] **II.65-II.67**.



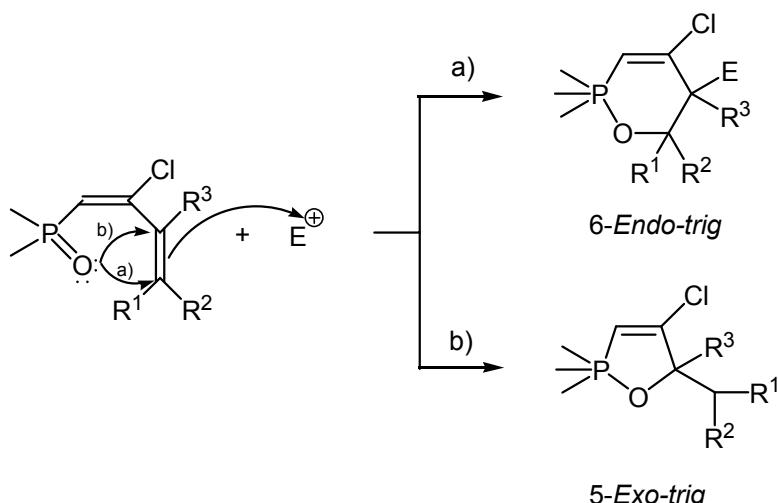
3 примера, добив 38-43%

$R = Me, Et; R^1 = H, Me; R^2 = Me; R^3 = Me, Et; R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

2. РЕАКЦИИ НА ЕЛЕКТРОФИЛНА 6-ENDO И/ИЛИ 5-EXO ЦИКЛИЗАЦИЯ НА ФОСФОРИЛИРАНИ 2-ХЛОРО-1,3-АЛКАДИЕНИ

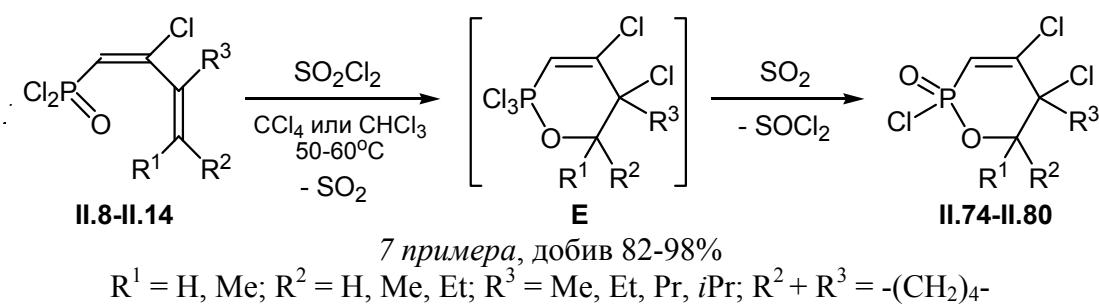
За изследване реакциите на електрофилна циклизация използвахме както различни електрофилни реагенти, така и получените от нас разнообразни производни на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини за субстрати с оглед на това да установим както възможностите и ограниченията за протичане на циклизация, така и факторите, от които зависи осъществяването на *6-endo-trig* и/или *5-exo-trig* циклизация [16]. От най-общи теоретични представи е ясно, че атаката на електрофила би се осъществила по отдалечената от фосфорилната група двойна връзка. Вътрешният нуклеофил (фосфорилната група) има следната дилема: или да атакува C^4 -атома на междинно образуваща се цикличен ониев и/или ациклен карбениев юон с осъществяване на 1,2-оксафосфининовата *6-endo-trig* циклизация и/или атака на C^3 -атома с последваща 1,2-оксафосфолова *5-exo-trig* циклизация, т. е. конкретната цел на тези изследвания е да се изучат както възможностите и ограниченията за протичане на циклизация на 1,3-диенфосфонатната система

от двойни връзки, така и факторите, от които зависи типа циклизация съгласно правилата на Baldwin [17] за образуване на пръстенни системи.

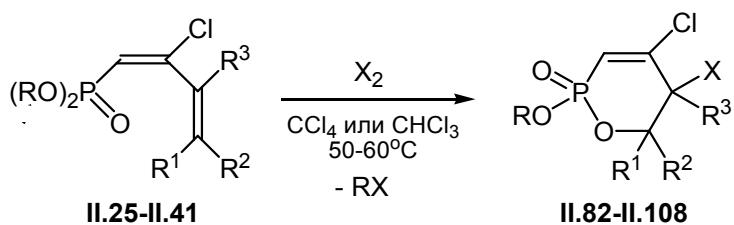


2.1. ХАЛОГЕНИРАНЕ

Както е известно от литературата [18], хлорирането на дихлорида на 2-хлоро-3-метил-1,3-бутадиенфосфоновата киселина **II.8** с хлор протича с получаване на сложна смес от продукти в резултат на присъединяване и следващо елиминиране на хлороводород. Ние установихме [19], че взаимодействието на сулфурил хлорид със същия дихлорид **II.8**, в който C⁴-атомът е първичен, също води до образуване на смес, но от хетероциклични съединения, т. е. осъществява се хетероциклизація в две направления с получаване на смес от шестчленния 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксид **II.74** и петчленния 2,5-дихидро-1,2-оксафосфол 2-оксид **II.81** в съотношение 3 : 1. Реакциите на дихлоридите **II.9-II.14**, съдържащи три- или тетразаместена C³-C⁴-двойна връзка, с този реагент протичат високо региоселективно като дават, с много високи добиви, само шестчленни продукти, производни на 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинина **II.75-II.80**.



Халогенирането на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери **II.25-II.41**, заместени при C³- и C⁴-атомите на 1,3-диеновата система от двойни връзки с различни алкилови групи, във всички останали случаи, протича високо региоселективно с формиране само на шестчленните 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксиidi **II.82-II.108** с добри до много добри добиви [20-22].



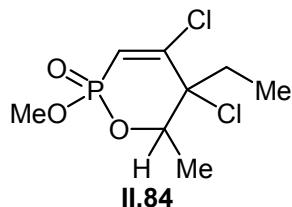
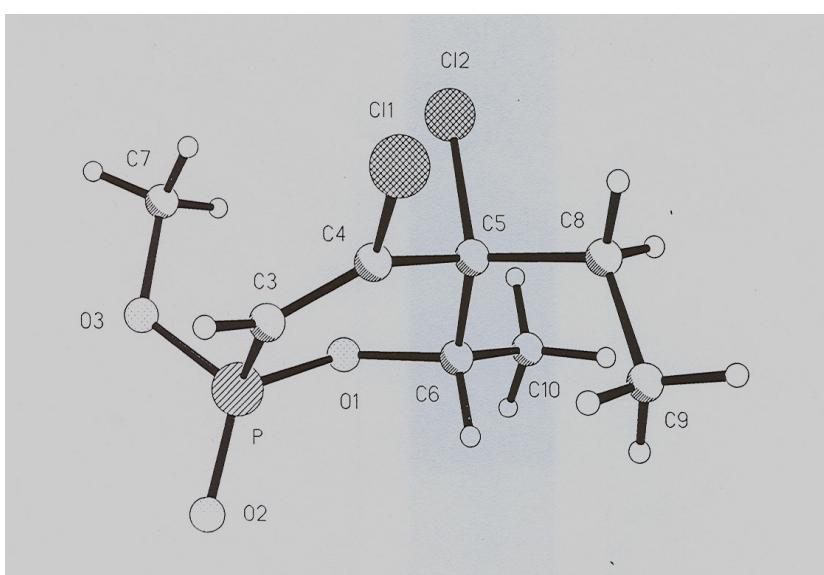
27 примера, добив 67-89%

$R = Me, Et, Pr, iPr, Bu; R^1 = H, Me; R^2 = H, Me, Et; R^3 = Me, Et, Pr, iPr;$
 $R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$; $X = Cl, Br$

В 1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектрите се наблюдава разцепване на сигналите на отделните фрагменти, което очевидно е указание [21,22], че те представляват смеси от диастереомери (хиралност на C^5 - и Р- (П.89-П.93, П.104) или C^5 -, C^6 - и Р-атомите (П.82-П.88, П.94-П.98, П.100-П.103 и П.105-П.108). Чрез колонно хроматографско изследване на продукта от взаимодействието на естера П.27 с хлор бяха изолирани [22] в чист вид два диастереомера с тотален добив 74% (П.84 α – 16% и П.84 β – 58%). 1H ЯМР-данните показват [22], че при единия от изомерите П.84 β се наблюдава нееквивалентност (диастереотопия) на метиленовите прото-ни на етиловата група при C^5 -атома на пръстена (δ_A 1.91 м. ч., δ_B 2.50 м. ч.), а при другия диастереомер П.84 α такава нееквивалентност не се наблюдава.

Образуващият се при халогениране на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфининов пръстен е енергетически стабилен. Това се потвърждава от химичното отместване на ^{31}P (δ 6.10-8.12 м. ч. спрямо 85% H_3PO_4), което се доближава до отместването на съединения с отворена верига и е указание за отсъствие на напрежение в шестчленния пръстен [20-22].

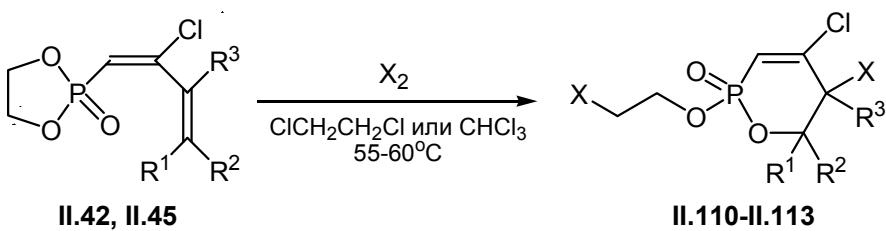
Получената чрез рентгеноструктурен анализ молекулна структура на 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксида П.84 (Фиг. 4) показва, че конформаци-ята на пръстена е *плик* като C^6 -атомът е извън равнината на пръстена [8].



Фигура 1. Молекулна структура на 4,5-дихлоро-5-етил-6-метил-2-метокси-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксида П.84.

Халогенирането на 1,3,2-диоксафосфоланите П.42 и П.45 също протича региоселективно с шестчленна хетероциклизация [10], съпроводена с отваряне

на 1,3,2-диоксафолановия пръстен и присъединяване на халоген към етоксигрупата, водеща до получаване с много добри добиви на 2-(2-халогеноетокси)-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.110-II.113**.



4 примера, добив 70-73%

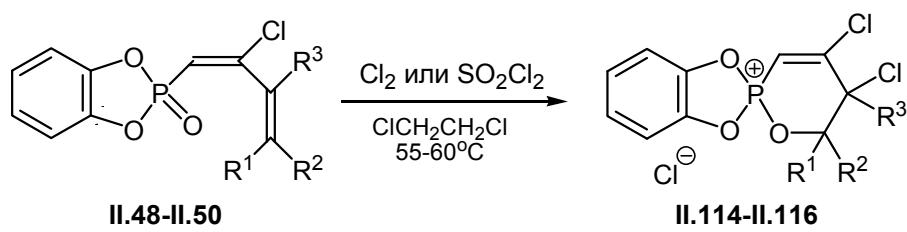
$R^1 = H, Me; R^2 = Me; R^3 = Me, Et; X = Cl, Br$

Интерес представляваха за нас изследванията на взаимодействието на хлор или сулфурил хлорид с бензо [d]-1,3,2-диоксафоланите **II.48-II.50**, тъй като, ако и в този случай протича електрофилна хетероциклизація на 1,3-алкадиен-фосфонатната система от двойни връзки, то тя би протекла по един от следните два начини [8]:

(i) разкъсване на една от C-O-връзките, отваряне на бензо [d]-1,3,2-диоксафолановия пръстен и присъединяване на хлорен атом към бензеновото ядро както протича халогенирането на 1,3,2-диоксафоланите **II.42** и **II.45**; или

(ii) образуване на стабилни фосфониеви соли както при хлорирането на диялкил (2-хлоро-1,3-алкадиенил) фосфин оксидите **II.65-II.67** (виж по-нататък).

Проведените експериментални изследвания показваха, че хлорирането на бензо [d]-1,3,2-диоксафоланите **II.48-II.50** протича региоселективно по втория начин с образуване на трициклените **II.114** и **II.115** или тетрацикления **II.116** фосфониеви хлориди [11].



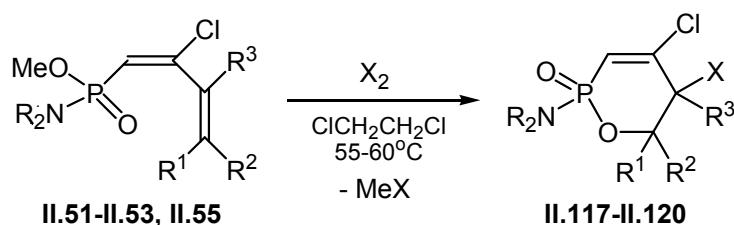
3 примера, добив 49-53%

$R^1 = H, Me; R^2 = Me; R^3 = Me, Et; R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

Образуването на шестатомните циклични фосфониеви соли **II.114-II.116** при хлориране на бензо [d]-1,3,2-диоксафоланите **II.48-II.50** потвърждава предположението, че хетероциклизаціята на производни на 2-хлоро-1,3-алкадиен-фосфонови киселини с електрофилни реагенти вероятно се осъществява чрез междуинно формиране на фосфониеви интермедиати [8].

Изследвахме халогенирането на 1,3-алкадиенфосфоновите амидоестери **II.51-II.53** и **II.55** като намерихме [12], че независимо от вида на заместителя в амидо-группата, във всички случаи протича само шестчленна хетероциклизація

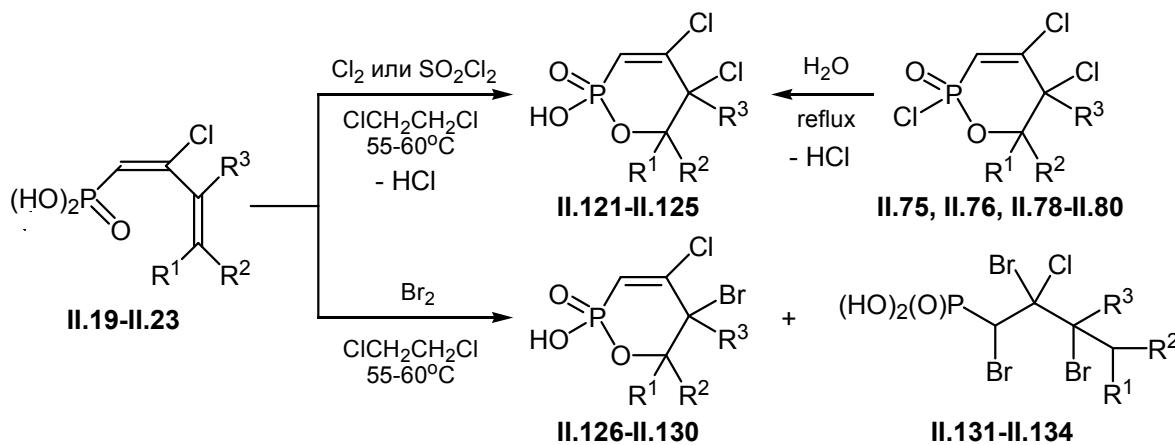
и изолиране с добри добиви като бели кристали на 2-амидо-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.117-II.120**.



4 примера, добив 48-56%

$R = \text{Et, Me}_3\text{Si; } R^1 = \text{H, Me; } R^2 = \text{Me; } R^3 = \text{Me, Et; } R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$, $X = \text{Cl, Br}$

С оглед изследване влиянието на дихидроксифосфорилната групировка $[(\text{HO})_2\text{P}(\text{O})]$ върху електрофилната циклизация на 2-хлоро-1,3-алкадиен-фосфоновите киселини **II.19-II.23**, изучихме реакцията на тяхното халогениране. Експерименталните данни показват [9], че независимо от вида на халогена, основното направление на реакцията е циклизацията на 1,3-диенфосфонатната система, протичаща с образуване на шестатомни хетеропръстенни съединения. При хлориране изолирахме с добри до много добри добиви само кристалните 2-хидрокси-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксиди **II.121-II.125**. Същите хетероциклени съединения получихме и при насрещен синтез чрез хидролиза на съответните 2,4,5-трихлоро-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинините **II.75, II.76** и **II.78-II.80**, синтезирани чрез реакция на диеновите дихлориди **II.9, II.10** и **II.12-II.14** със сулфурил хлорид [9]. От друга страна, бромирането на диенфосфоновите киселини **II.19-II.22** води до образуване с добри добиви на смес от цикличните 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксиди **II.126-II.129** и 2-хлоро-1,2,3-трибromoалканфосфоновите киселини **II.131-II.134** в съотношение приблизително 2 : 1 [9].



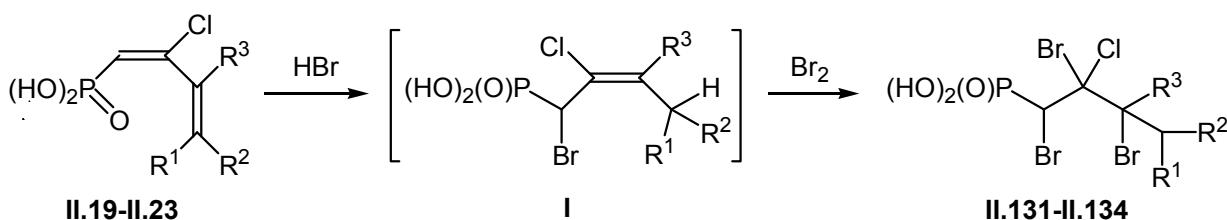
10 примера, добив 70-84% ($X = \text{Cl}$), добив 47-58% ($X = \text{Br}$)

II.126-II.130 : II.131-II.134 = ~2 : 1

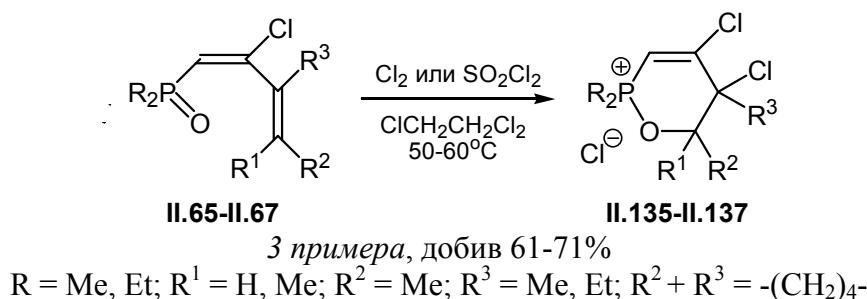
$R^1 = \text{H, Me; } R^2 = \text{Me; } R^3 = \text{Me, Et, iPr; } R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

Образуването на алканфосфоновите киселини **II.131-II.134** би могло да се обясни [9] с протичането на реакция на присъединяване на бромоводород, отделящ се при реакцията на циклизация, към 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите

киселини **II.19-II.23** в 4,1-положение с междинно образуване на адуктите **I**, последвана от присъединяване на бром до продуктите **II.131-II.134**.



Както вече бе отбелязано, електрофилната хетероциклизаия на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонати под действие на халогени протича вероятно чрез междинно образуване на квазифосфониеви интермедиати, които търсят процес аналогичен на втория стадий на реакцията на Арбузов, водещ до получаване на съединения с тетракоординиран фосфор [8]. Третичните 2-хлоро-1,3-алкадиенил фосфин оксиди **II.65-II.67**, в сравнение с другите производни на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите киселини, са по-трудно достъпни в синтетично отношение съединения. Да се изучи тяхното хлориране е твърде интересно, тъй като, ако се извърши циклизация, това би довело до образуване на циклични фосфониеви соли поради невъзможността за протичане именно на процес подобен на втория стадий на реакцията на Арбузов. Действително, при хлориране на 1,3-алкадиенил фосфин оксидите **II.65-II.67** се осъществява циклизация [15] с образуване на 2,2-диалкил-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин-2-ониевите хлориди **II.135-II.137**.



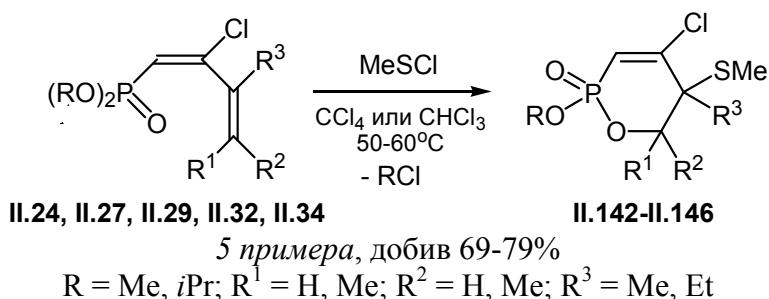
Получаването на цикличните шестатомни фосфониевите хлориди **II.135-II.137** при хлориране на 2-хлоро-1,3-алкадиенил фосфин оксидите **II.65-II.67** е още едно потвърждение за образуването в междинния стадий на съединения с квазифосфониева структура при халогенирането на производните на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини, едва след което се извърши процес от Арбузовски тип след атака на халогенидния анион, елиминиране на алкил халогенид и получаване на съединения с тетракоординиран фосфорен атом [8,15].

2.2. СУЛФЕНИЛИРАНЕ

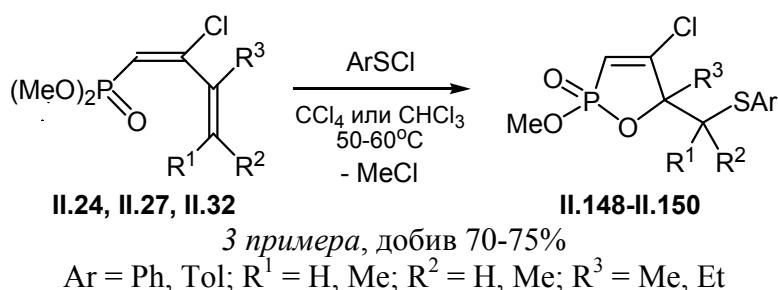
Изследванията, които проведохме върху реакциите на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонати със сулфениил хлориди, показваха [8,16,23,24,26,27], че протичат във всички случаи хемоселективно с атака на реагента само по C^3-C^4 -двойната връзка на 1,3-диеновата система от двойни връзки, след което водят до осъществяване на различни хетероциклизаии и съответно до различни цик-

лични продукти в зависимост от вида на въглеводородния остатък в сулфенил хлорида и заместителите при C³-C⁴-двойната връзка.

Реакцията на метансулфенил хлорид с 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери **II.24**, **II.27**, **II.29**, **II.32** и **II.34** се осъществява региоселективно с шестатомна хетероциклизация [23] и образуване с много добри добиви на 5-метилтио-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.142-II.146**.

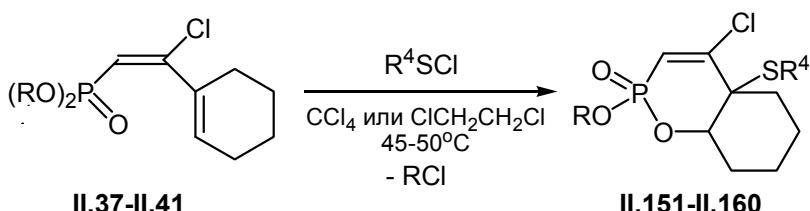


От друга страна, в противоположност на горните резултати, реакцията на 1,3-алкадиенфосфоновите естери **П.24**, **П.27** и **П.32** с арен(бенzen и *p*-толуен)сулфенил хлориди се извършва само с петчленна циклизация [23] и изолиране с много добри добиви на производните на 2,5-дихидро-1,2-оксафосфола **П.148-П.150**.



Образуването на шестчленни *endo-trig* продукти при реакцията на метан-суlfенил хлорид с 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонатите вероятно е облагодетелствано от предпочитената *s-cis* конформация на 1,3-диеновата система от двойни вързки. Ариловият заместител при серния атом на суlfенил хлоридите навярно предизвиква известни пространствени затруднения за реализиране на *s-cis* конформация и взаимодействието вероятно се осъществява от реакционна *s-транс* конформация на изходните диенфосфонати, в резултат на което се извършва петчленна *exo-trig* хетероциклизация [23].

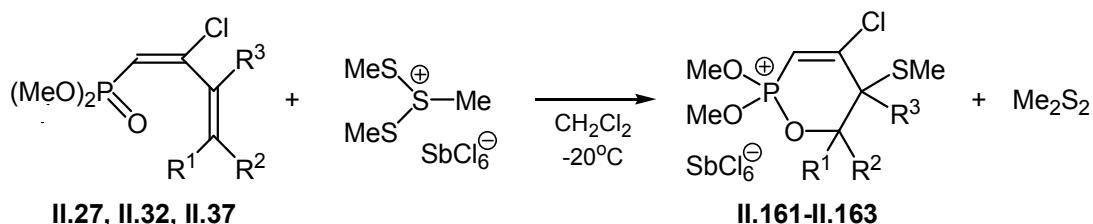
Изследванията, които проведохме върху реакцията на 2-хлоро-2-(1-циклохексенил)етенфосфонатите **П.37-П.41**, в които C³-C⁴-двойната връзка е включена в циклохексенов пръстен, с алкан- и аренсуlfенил хлориди показаха [24], че независимо от вида на въглеводородния заместител при серния атом на реагента, във всички случаи, се осъществява само шестатомна *endo-trig* хетероциклизация на 1,3-алкадиен-фосфонатната система от двойни връзки с образуване с високи добиви само на 4a-тио-4a,5,6,7,8,8a-хексахидро-2H-1,2-бензоксафосфинин 2-оксидите **П.151-П.160**.



10 примера, добив 70-78%
R = Me, Et, Pr, iPr, Bu; R⁴ = Me, iPr, Ph, Tol

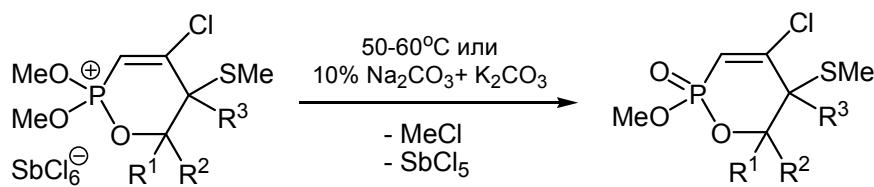
Получаването само на шестчленните бициклини съединения **II.151-II.160**, независимо от природата на заместителя в сулфенил хлорида, би могло да се обясни от една страна, със стабилността на *s-cis* конформацията на 1,3-диеновата система при изходните 2-хлоро-2-(1-циклохексенил)етенфосфонати **II.37-II.41** (въртенето около C²-C³-връзката е затруднено поради по-малко подвижния, в сравнение с алкиловите групи, обемист циклохексенов пръстен), и от друга – с вероятно по-голямата стабилност на преходното състояние на образуване на кондензираната бициклическа (пространствено по-изгодна) структура при шестчленната *6-endo-trig* циклизация в сравнение със спираловата структура при евентуалната петатомна *5-exo-trig* циклизация [24].

2-Хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери **I.27**, **I.32** и **I.37** съдържат като вътрешен нуклеофил фосфонатната група и от тази гледна точка са удобни субстрати за изследване на реакцията на сулфеноциклизаця под действие на известния в литературата [25] сулфенилиращ реагент метил диметилтио сулфониев хексахлороантимонат (MDTSAN). Ние установихме [26], че реакцията на фосфонатите **I.27**, **I.32** и **I.37** с MDTSAN протича високо хемо- и региоселективно с получаване само на 2,2-диметокси-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин-2-ониевите хексахлороантимонати **II.161-II.163**.



3 примера, добив 64-67%
R¹ = H, Me; R² = Me; R³ = Me, Et; R² + R³ = -(CH₂)₄-

Нагряването на 1,2-оксафосфининониевите хексахлороантимонати **II.161-II.163** при температура 50-60°C или алкална среда води [26] до разпадане на фосфониевите соли с елиминиране на метил хлорид и антимонов пентахлорид като се образуват 2-метокси-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.143**, **II.145** и **II.151**.

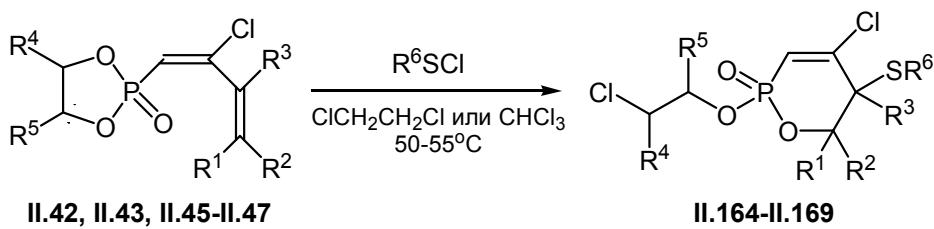


при обработка с Na₂CO₃+K₂CO₃: 66-69%
при нагряване: 44-48%

Известната ниска нуклеофилност на аниона SbCl_6^{\ominus} силно възпрепятства атаката върху метокси-групата и по този начин е възможно изолирането на цикличните фосфониеви соли **II.161-II.163**. Такава атака, подобна на втория стадий на прегрупировката на Арбузов, се осъществява при нагряване или в алкална среда след разпадане на комплексния анион SbCl_6^{\ominus} до хлориден анион Cl^{\ominus} , който атакува метокси-групата със следващо елиминиране на метил хлорид води до образуване на 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите [26] **II.143**, **II.145** и **II.151**.

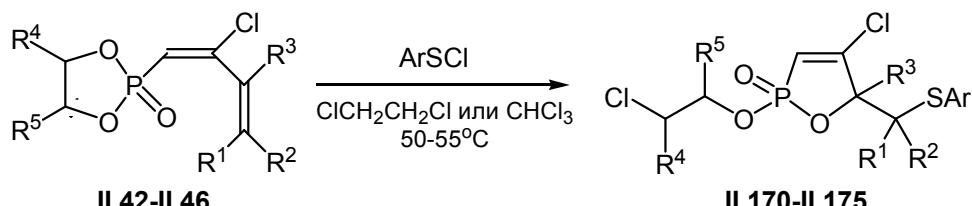
Изолирането на цикличните фосфониеви хексахлороантимонати **II.161-II.163** потвърждава за пореден път допускането, че хетероциклизаията на производните на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите киселини под действие на електрофилни реагенти е много вероятно да протича чрез междинно образуване на циклични фосфониеви интермедиати [8,16].

Взаимодействието на сулфенил хлориди с 1,3,2-диоксафосфоланите **II.42-II.47** се осъществява [27], подобно на реакцията на естерите на същите киселини, с хемоселективна атака на реагента по C^3-C^4 -двойната връзка, след което в зависимост от вида на въглеводородния заместител в сулфенил хлорида противча 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфининова или 2,5-дихидро-1,2-оксафосфолова хетероциклизаия. Реакцията на 1,3-диенфосфонатните 1,3,2-диоксафосфолани **II.42**, **II.43** и **II.45-II.47** с алкансулфенил хлориди протича региоселективно с шестчленна хетероциклизаия [27] и получаване с добри добиви на 2-хлороалкокси-5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.164-II.169**.



6 примера, добив 52-57%
 $\text{R}^1 = \text{H, Me}; \text{R}^2 = \text{Me}; \text{R}^3 = \text{Me, Et}; \text{R}^4 = \text{H, Me}; \text{R}^5 = \text{H, Me}; \text{R}^6 = \text{Me, iPr}$

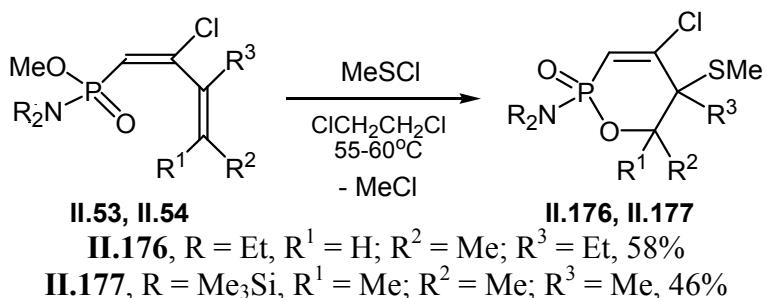
От друга страна, когато в реакцията участва аренсулфенил хлорид се извършва петатомна циклизация [27] с изолиране на 2-хлороалкокси-2,5-дихидро-1,2-оксафосфол 2-оксидите **II.170-II.175**.



6 примера, добив 50-54%
 $\text{R}^1 = \text{H, Me}; \text{R}^2 = \text{Me}; \text{R}^3 = \text{Me, Et}; \text{R}^4 = \text{H, Me}; \text{R}^5 = \text{H, Me}; \text{Ar} = \text{Ph, Tol}$

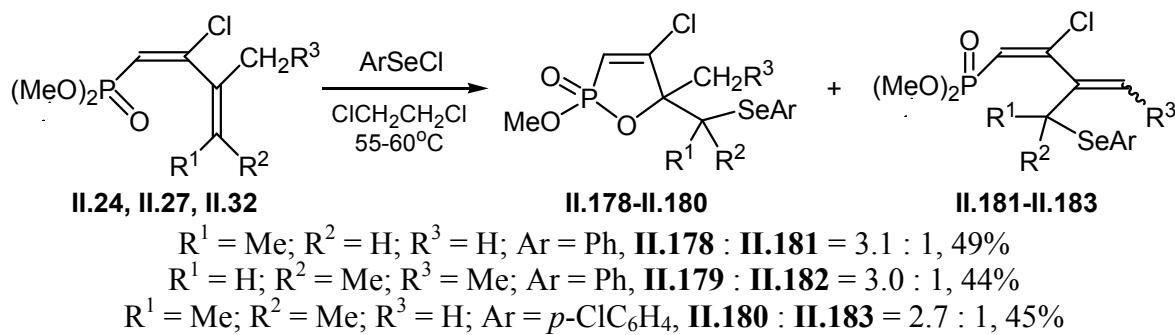
Горните резултати показват [27], че реакциите на 1,3,2-диоксафоланите **П.42-П.47** се извършват в зависимост от природата на заместителя при серния атом на реагента с шест- или петатомна хетероциклизация, съпроводена с отваряне на диоксафолановия пръстен след нуклеофилна атака на хлоридния анион. Необходимо е да отбележим, че когато заместителите в диоксафолановия цикъл R^4 и R^5 са различни, отварянето на пръстена се извършва след нуклеофилна атака върху по-малко заместения въглероден атом. Например, 1,2-оксафосфинините **П.165** и **П.168** и 1,2-оксафосфолите **П.171** и **П.175** са синтезирани от диоксафоланите **П.43** или **П.46** чрез разкъсване на $\text{CH}_2\text{-O}$ -връзката, а не на MeCH-O -връзката. Този факт би могъл да се обясни от една страна с влиянието на метиловия заместител върху поляризацията на връзката и/или с пространственото пречене на същия заместител върху реакционния център в MeCH-O -връзката, което прави по-трудна нуклеофилната атака на хлоридния анион.

Сулфенилирането на амидоестерите **II.53** и **II.54** се осъществява само с шестатомна хетероциклизация, независимо от вида на заместителя в амидо-групата, с образуване на 2-амидо-5,6-дихидро-2Н-1,2-оксафосфинин 2-оксидите **II.176** и **II.177**, които изолирахме с добри добиви като бели кристални вещества [12].



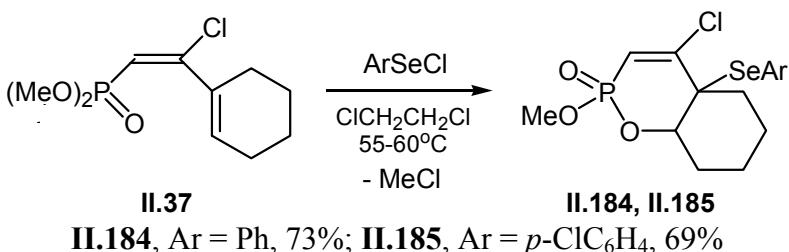
2.3. СЕЛЕНЕНИИЛИРАНЕ

Имайки предвид, че селенениил хлоридите са аналоги на сулфениил хлоридите, изглежда основателно да се очаква, че взаимодействието им с 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери също би се осъществило с хетероциклизация на 1,3-диенфосфонатната система от двойни връзки. Това предположение се оказа частично вярно, тъй като ние установихме [28], че реакцията на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите естери **II.24**, **II.27** и **II.32** със селенениил хлориди се извършва с образуване на смес от 5-арилселеноалкил-2,5-дихидро-1,2-оксафосфол 2-оксидите **II.178-II.180** и 3-арилселено-алкил-1,3-алкадиенфосфоновите естери **II.181-II.183** в съотношение $2.7 \div 3.1 : 1$.

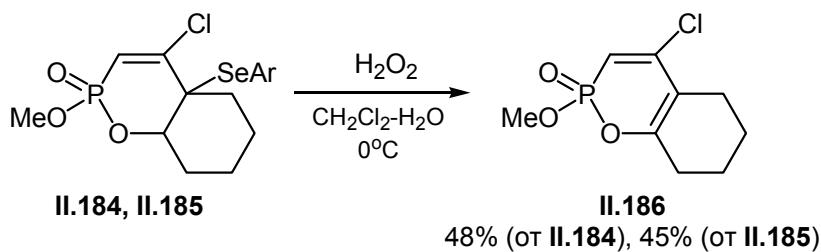


Както бе отбелязано, конфигурацията на C¹-C²-двойната връзка в изходните диенфосфонати **II.24**, **II.27** и **II.32** е (1E). Реакцията им със селенениил хлориди протича със запазване на (1E)-конфигурацията. Въпреки очакването, че олефиновият протон на C⁴-атома в (1E, 3E)-изомера на 1,3-диенфосфоната **II.182** би трябвало да се наблюдава в ¹H ЯМР-спектъра в по-слабо поле в сравнение с аналогичния протон на (1E, 3Z)-изомера, на базата само на химическото отместяване на този протон (*m*, δ 5.78 м. ч.) бе невъзможно да се определи дали 2-хлоро-3-(1-фенилселеноетил)-1,3-пентадиенфосфоната **II.182** е (1E, 3Z)-, (1E, 3E)-изомер или смес от двата изомера [28].

Взаимодействието между селенениил хлориди и 2-хлоро-2-(1-циклохексенил)-етенфосфоновия естер **II.37**, в който C³-C⁴-двойната връзка е включена в циклохексенов цикъл, дава само бициклените хексахидро-2*H*-1,2-бензоксаффинин 2-оксиidi **II.184** и **II.185**, които с много добри добиви са изолирани чрез прекристализация [28].

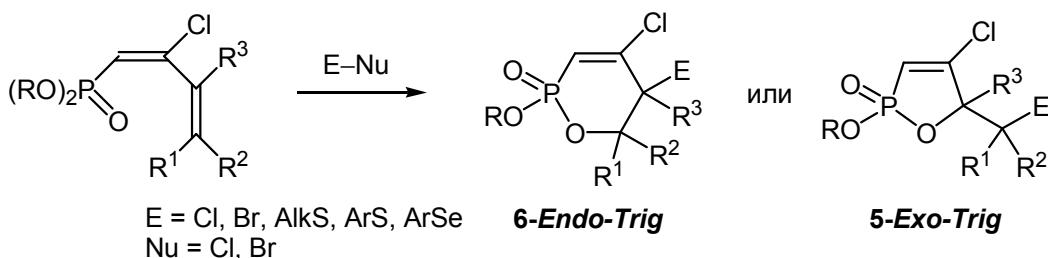


Използвайки методът на Sharpless [29] за *син*-елиминиране на сelenооксиди, ние установихме, че обработката на 4a-арилселено-заместените бициклени съединения **II.184** и **II.185** с водороден пероксид в CH₂Cl₂-H₂O се извършва с отделяне на арилселено-групата и получаване на 5,6,7,8-тетрахидро-2*H*-1,2-бензоксаффинин 2-оксида **II.186**, който е изолиран чрез препаративна TLC с добри добиви.



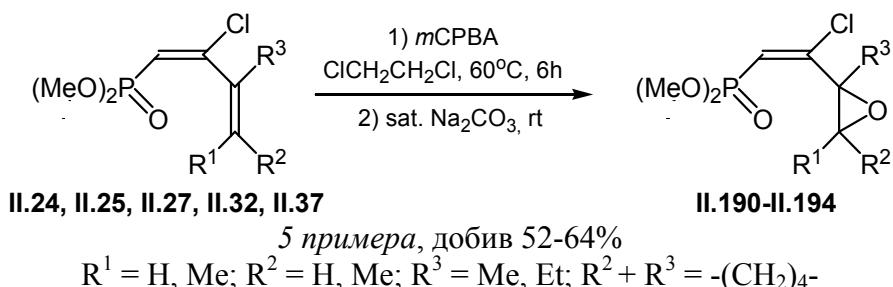
Необходимо е да отбележим, че независимо от съществената аналогия между селенениил и сулфениил хлоридите, взаимодействието на сулфениил хлориди с диенфосфоновите естери не дава серни аналоги на 3-арилселеноалкил-1,3-алкадиенфосфонатите **II.181-II.183**. Едно възможно обяснение на този факт се състои в различната стабилност на еписеленоониевите и еписулфониевите йони [30-32]. Въпреки, че сярата и селена притежават почти еднаква електроотрицателност (S 2.44 и Se 2.48) [33], селенът има по-голям ковалентен радиус (1.16 Å) [33] от сярата (1.02 Å) [34], което прави по-слаба C-Se-връзката в междинните еписеленоониеви йони и води до тяхното по-лесно разкъсване с образуване на ациклини карбениеви йони, които вероятно са предшественици на продуктите с отворена верига [28] **II.181-II.183**.

Обобщавайки, резултатите от проведените от нас реакции на производни на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини с електрофилни реагенти показват [8,16], че основното направление на реакциите е циклизация на диенфосфонатната система от двойни връзки като в зависимост от вида на електрофила и вида на заместителите при C⁴-атома се осъществява 1,2-оксафосфининовата *6-endo-trig* или 1,2-оксафосфоловата *5-exo-trig* циклизация съгласно правилата на Baldwin [17] за образуване на пръстенни системи.



2.4. ЕПОКСИДИРАНЕ НА 2-ХЛОРО-1,3-АЛКАДИЕНФОСФОНОВИ ЕСТЕРИ И ЦИКЛИЗАЦИЯ В КИСЕЛА СРЕДА

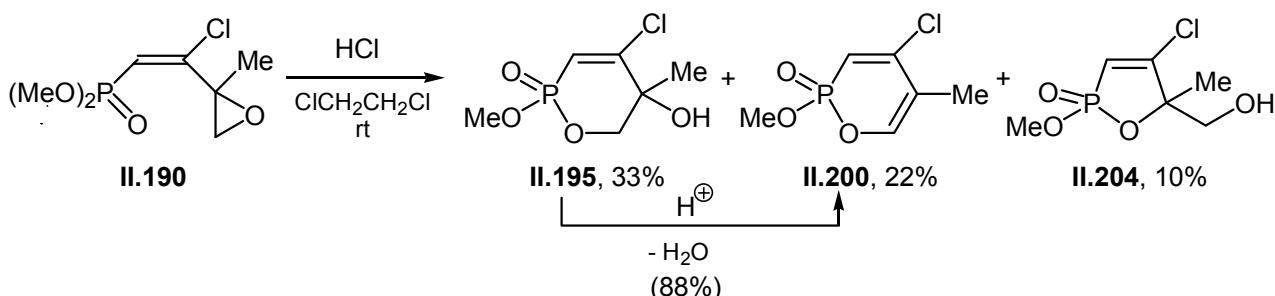
Реакцията на диметиловите естери на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите киселини **II.24**, **II.25**, **II.27**, **II.32** и **II.37** с *m*-CPBA се осъществява по C³-C⁴-двойната връзка на 1,3-алкадиеновата система и образуване с добри добиви на 2-хлоро-2-оксирианилетенфосфоновите естери [35] **II.190-II.194**.



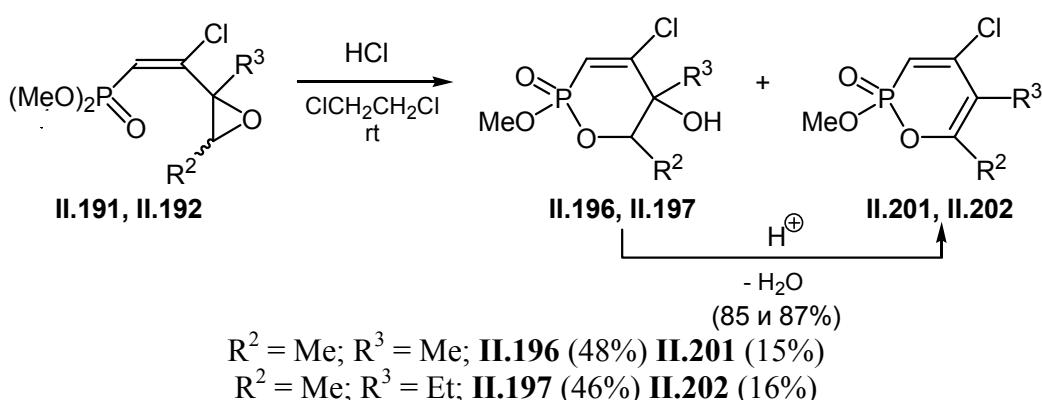
Изходните 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови естери **II.25** и **II.27** съществуват под формата на два π -диастереоизомера като съотношението между тях е $(1E, 3Z) : (1E, 3E) = 3 : 1$ (по ^1H ЯМР-данни). Анализът на ^1H и ^{13}C ЯМР-спектрите на синтезираните от тях 2-хлоро-2-оксиранилetenфосфонати **II.191** и **II.192** показва, че съотношението на диастереомерите се запазва, т. е. епоксидирането на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонатните естери е високо стереоселективна реакция [35].

Изследвайки реакциите на синтезираните 2-хлоро-2-оксирианил-етенфосфонови естери **П.190–П.194** в кисела среда, ние установихме, че, във всички случаи, се извършва отваряне на оксирановия пръстен и в зависимост от броя на заместителите при C³-атома на пръстена протичат реакции с образуване на различни хетероциклени съединения [35]. Така например, при отварянето на пръстена в 2-хлоро-2-(2-метилоксирианил)етенфосфоната **П.190**, притежаващ първичен C³-атом, се извършват следните три процеса: (i) шестчленна *endo*-хетероциклиизация и образуване на 5,6-дихидро-2H-1,2-оксафосфинин 2-оксида **П.195** с добив 33%;

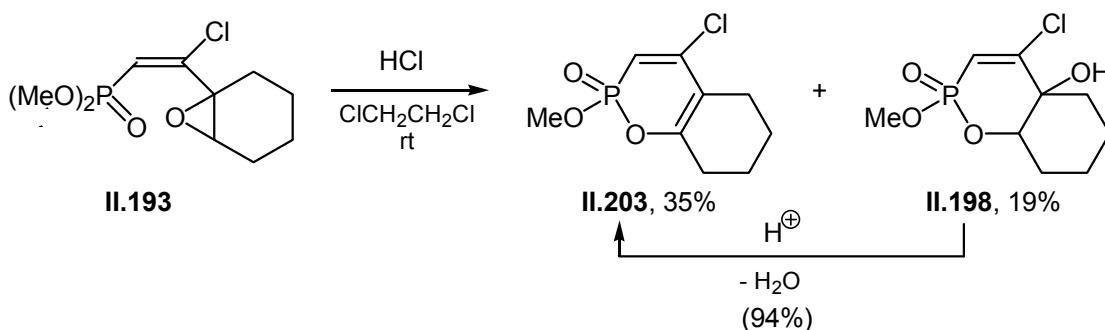
(ii) петчленна *exo*-хетероциклизаия и получаване с добив 10% на 2,5-дихидро-1,2-оксафосфол 2-оксида **II.204**; и (iii) дехидратация на полученото шестатомно съединение **II.195** до 1,2-оксафосфинин 2-оксида **II.200** с добив 22% [35].



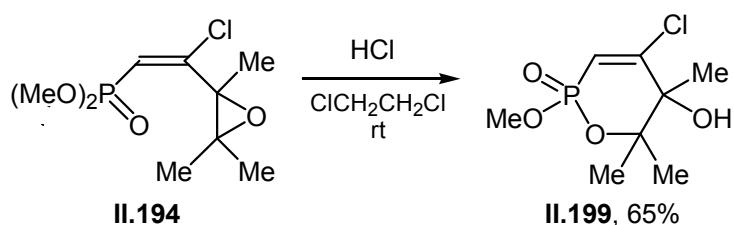
Отварянето на оксирановия пръстен във фосфорилираните оксириани **II.191** и **II.192**, съдържащи вторичен C³-атом, е съпроводено само с шестатомна *endo*-хетероциклизаия с образуване на смес от дихидрооксафосфинините **II.196** и **II.197** и оксафосфинините **II.201** и **II.202** в съотношение приблизително 3 : 1 [35].



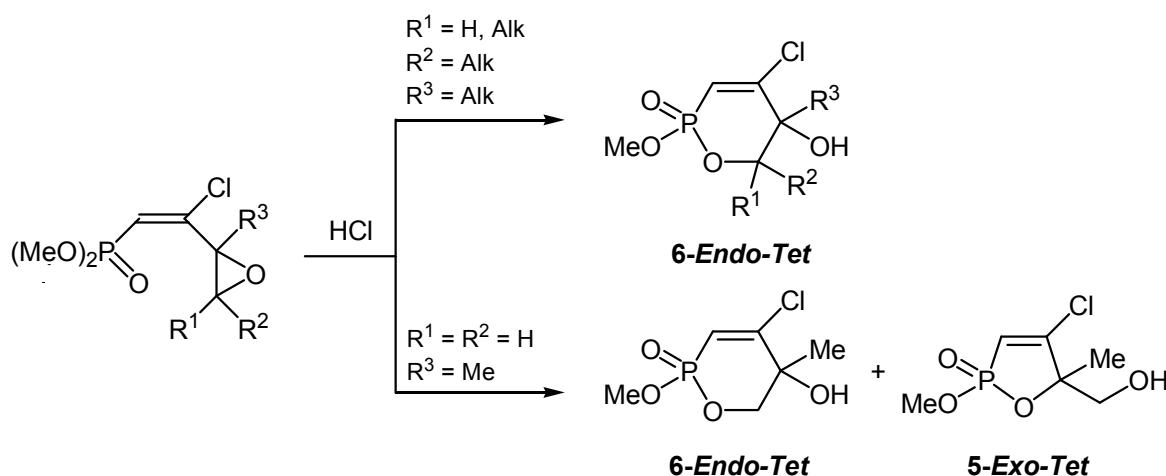
Реакцията на отваряне на пръстена в 2-хлоро-2-(7-окса-бицило [4,1,0]хепт-1-ил)етенфосфоновия естер **II.193**, който съдържа също вторичен въглероден атом в оксирановия пръстен, но той е включен и в циклохексилов остатък, протича по малко по-различен начин.Осъществява се също само шестчленна *endo*-хетероциклизаия с образуване на смес от 4a,5,6,7,8,8a-хексахидро-2*H*-1,2-бензоксафосфинин 2-оксида **II.198** и 5,6,7,8-тетрахидро-2*H*-1,2-бензоксафосфинин 2-оксида **II.203**, но съотношението между тях е 1 : 1.8, т. е. реакцията на дехидратация се извършва в по-голяма степен, което се потвърждава и от почти количествения добив при провеждане на същата реакция след изолиране на продуктите [35].



Отварянето на оксирановия и затваряне на дихидрооксаффининовия пръстен се наблюдава и при обработка със солна киселина на триметилоксиранил-etenофосфоната **II.194**, притежаващ третичен C³-атом. Из реакционната смес се изолира с добив 65% само 5,6-дихидро-2*H*-1,2-оксаффинин 2-оксида [35] **II.199**.

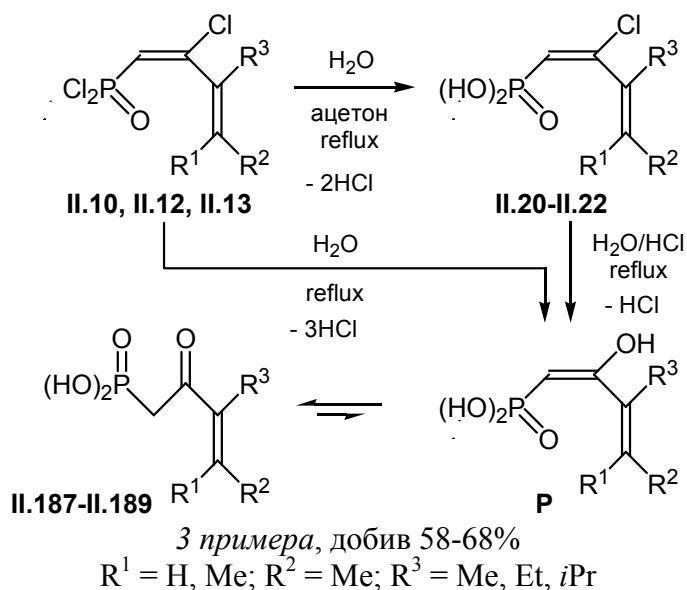


Изследваните от нас реакции на отваряне на оксирановия пръстен в синтезираните 2-хлоро-2-оксириленфосфонати **II.190-II.194** притежават значителен синтетичен потенциал и са източник на хетероциклени съединения [35]. Очевидно е, че в хода на реакциите се създават условия за конкуренция между двета типа циклизации – 1,2-оксаффининова *6-endo-tet* и 1,2-оксафофолова *5-exo-tet*. Променяйки заместителите при C³-атома на оксирановия цикъл в изходните оксириленфосфонати **II.190-II.194** става възможно насочването на цикличните реакции към осъществяване на *6-endo-tet* или *6-endo-tet* и *5-exo-tet* циклизации.



3. СИНТЕЗ И РЕАКЦИИ НА ХИДРОЛИРА, ХИДРАТАЦИЯ И КЕТАЛИЗАЦИЯ НА ФОСФОРИЛИРАНИ 1,3-ЕНИНИ

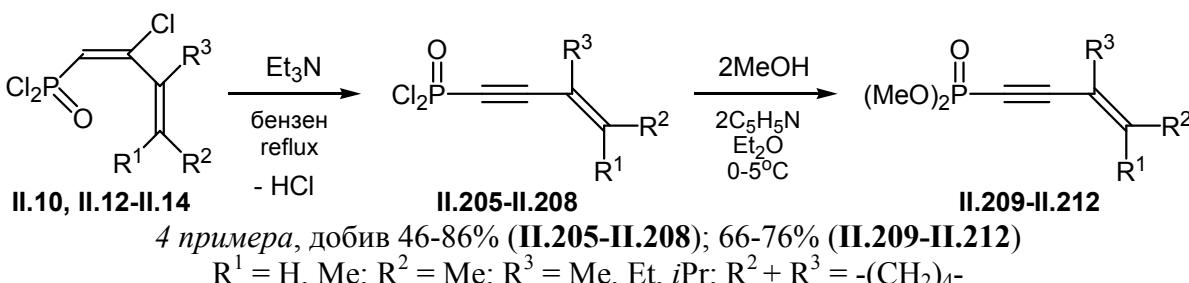
Както отбелязахме, 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите киселини се получават при хидролиза на съответните дихлориди в ацетон [9]. Обработката на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфоновите дихлориди **II.10**, **II.12** и **II.13** с вода при кипене предизвиква хидролиза както на двата хлорни атома при фосфора, така и на олефиновия хлорен атом с образуване на 2-оксо-3-алкенфосфоновите киселини **II.187-II.189** с добри добиви [36].



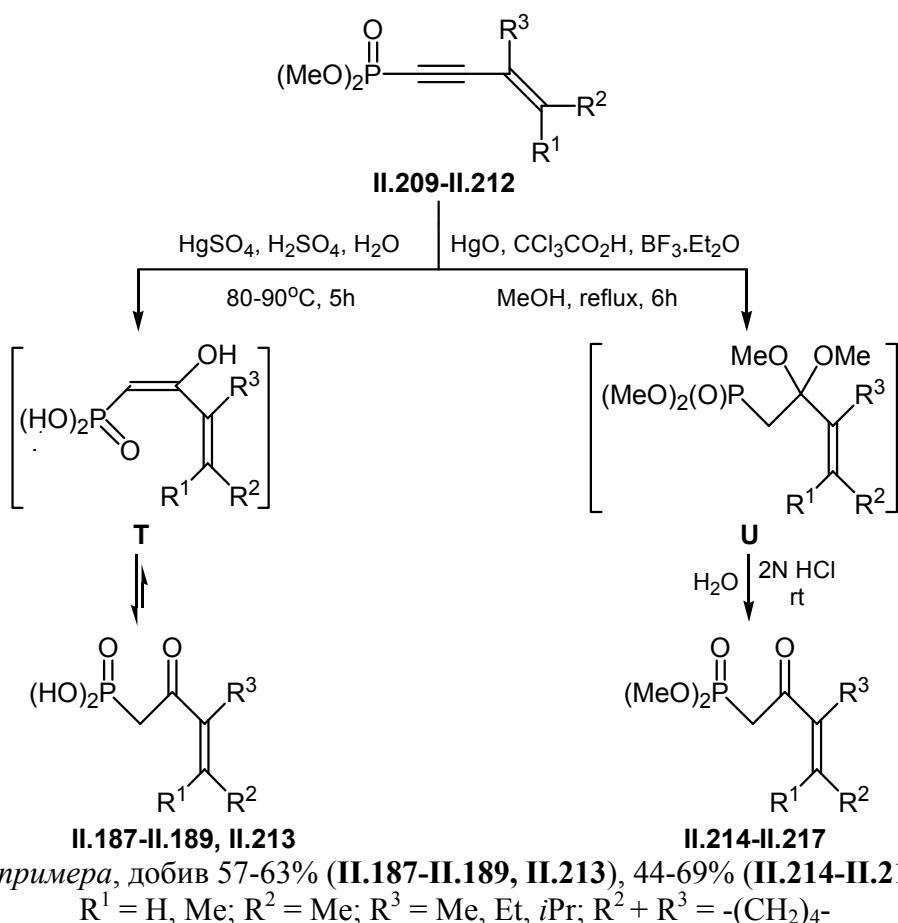
От друга страна, кипенето на самите киселини **II.20-II.22** с вода в присъствие на катализитично количество разредена солна киселина дава същите 2-оксо-3-алкенфосфонови киселини **II.187-II.189**. Механизмът на образуване на 2-оксо-3-алкенфосфоновите киселини **II.187-II.189** вероятно включва нуклеофилно заместване на хлорните атоми при фосфорния атом и при C^2 -атома на 1,3-диеновата система с хидрокси-групи и междуинно образуване на 2-хидрокси-1,3-алкадиен-фосфоновите киселини **P**, които лесно търпят оксо-енолна тавтомерия до фосфорилираните α,β -ненаситените кетони [36].

Като пример за синтетично приложение на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонатите за получаване на ациклини съединения с интересна структура, освен за образуване на хетероциклини съединения, ние изследвахме превръщането им във фосфорилирани 1,3-алкенини и изследване на техните реакции на хидратация и кетализация.

Използвайки дихлоридите на 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонови киселини **II.10, II.12-II.14** като изходни вещества, ние синтезирахме диметиловите естери на 3-алкен-1-инфосфоновите киселини **II.209-II.212** чрез елиминиране на хлоро-водород под действие на триетил амин при кипене в бензен с образуване с много добри добиви на съответните дихлориди **II.205-II.208**. Следващата реакция с метанол в присъствие на пиридин дава също с много добри добиви естерите [8] **II.209-II.212**.



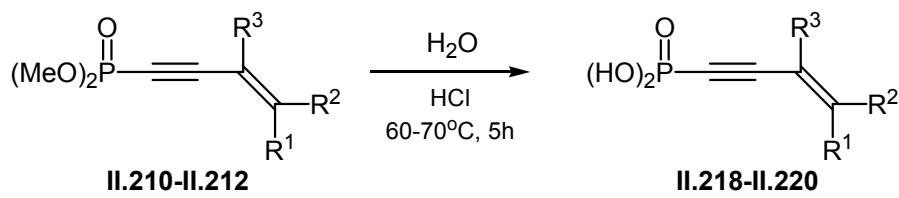
Получените в препаративни количества 3-алкен-1-инфосфонови диметилови естери **II.209-II.212** ни позволиха да изследваме техните реакции на хидратация и кетализация. При обработка на енините **II.209-II.212** с вода в присъствие на катализатор смес от живачен сулфат и сярна киселина, наред с хидратиране на тройната връзка, се осъществява и хидролиза на фосфонатната група до междинно образуване на фосфорилираните 1,3-алкадиен-2-оли **T**, които лесно тавтомеризират до очакваните 2-оксо-3-алкенфосфонови киселини **II.187-II.189, II.213** с добри добиви [37].



В търсенето на подходящи условия за хидратация на фосфорилираните 1,3-енини **II.209-II.212** без протичане на хидролиза на фосфонатната група, използвахме живачен катализатор в силно кисела, но безводна среда. Взаимодействието с метанол при кипене с използването като катализатор на смес от живачен оксид, трихлорооцетна киселина и борен трифлуорид етерат води до кетализация на 1,3-енинфосфонатите **II.209-II.212**, при което се формират фосфорилираните кетали **U**. Хидролизата на кеталите **U** лесно се извършва в присъствие на разредена солна киселина при стайна температура като се получават с добри до много добри добиви диметиловите естери на 2-оксо-3-алкенфосфоновите киселини [38] **II.214-II.217**.

От друга страна, реакцията на 3-алкен-1-инфосфоновите естери **II.210-II.212** с вода в присъствие само на солна киселина води до протичане на хидро-

лиза с формиране на съответните 1,3-енинфосфонови киселини **II.218-II.220**, т. е. хидратация в отсъствие на живачен катализатор не се осъществява [38].



3 примера, добив 53-60%
 $R^1 = H, Me; R^2 = Me; R^3 = Me, iPr; R^2 + R^3 = -(CH_2)_4-$

Получените експериментални резултати показват, че от една страна, 2-хлоро-1,3-алкадиенфосфонатите са удобни синтони на фосфорилирани 1,3-енини, чиито реакции на хидратация и кетализация, катализирани от живачни съединения, представляват удобен синтетичен подход към фосфорилираните 3-алкен-2-они. В отсъствие на живачни съединения, хидратация на тройната връзка не се осъществява, а протича хидролиза на фосфонатната част. Чрез горните реакции е осъществен един интересен синтетичен преход между фосфорилирани съединения: от 1,3-алкадиени през 1,3-алкенини до 3-алкен-2-они [38].

Благодарност. Настоящата работа е част от научно-изследователски проекти № 9702/2008, № РД-05-241/2009 и № РД-05-367/2010, финансиирани от фонд „Научни изследвания“ на Шуменския университет „Епископ Константин Преславски“.

ЛИТЕРАТУРА

1. Emsley, J.; Hall, D. *The Chemistry of Phosphorus*, Harper and Pow: London, **1976**.
2. Quin, L. D. *The Heterocyclic Chemistry of Phosphorus*, Wiley-Interscience: New York, **1981**.
3. Корбридж, Д. *Фосфор*, Мир: Москва, **1982**.
4. Часть 10. Соединения фосфора в *Общая органическая химия*, под ред. Д. Бартона, В. Д. Оллиса, т. 4, Химия: Москва, **1983**, с. 595-718.
5. Часть 10. Соединения фосфора в *Общая органическая химия*, под ред. Д. Бартона, В. Д. Оллиса, т. 5, Химия: Москва, **1983**, с. 16-129.
6. Ангелов, Х. М.; Христов, В. Х. *Докл. БАН* **1981**, 34, 67-69.
7. Ангелов, Х. М.; Христов, В. Х.; Ионин, Б. И. *ЖОХ* **1981**, 51, 1230-1235.
8. Христов, В. Х. *Дисертация (дхн)*, ШУ „Епископ Константин Преславски“, Шумен, **2006**.
9. Christov, V. Ch.; V. M. Aladinova, V. M. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1997**, 131, 59-69.
10. Christov, V. Ch.; Angelov, Ch. M. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* **1988**, 41, 73-76.
11. Christov, V. Ch. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1998**, 134/135, 373-379.
12. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1998**, 141, 79-88.

13. Ангелов, Х. М.; Христов, В. Х. *ЖОХ* **1981**, *51*, 1511-1517.
14. Christov, V. Ch.; Nikolov, N.; Angelov, Ch. M.; Dimitrova, L. *Proceeding, IVth International Symposium of Plant Growth Regulators*, Pamporovo **1987**, 362-365.
15. Christov, V. Ch. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1998**, *133*, 221-227.
16. Христов, В. Х.; Ангелов, Х. М.; Петров, А. А. *Усп. химии* **1991**, *60*, 69-102.
17. Baldwin, J. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 734.
18. Шехаде, А. М.; Игнатьев, В. М.; Захаров, В. К.; Ионин, Б. И.; Петров, А. А. *ЖОХ* **1979**, *49*, 337.
19. Angelov, Ch. M.; Christov, V. Ch. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 359-360.
20. Ангелов, Х. М.; Христов, В. Х.; Ионин, Б. И.; Кирилов, М.; Петров, А. А. *ЖОХ* **1979**, *49*, 2381-2382.
21. Ангелов, Х. М.; Христов, В. Х.; Кирилов, М. *ЖОХ* **1982**, *52*, 181-185.
22. Angelov, Ch. M.; Christov, V. Ch.; J. Petrova, J.; Kirilov, M. *Phosphorus, Sulfur* **1983**, *17*, 37-45.
23. Angelov, Ch. M.; Christov, V. Ch. *Chemica Scripta* **1984**, *24*, 92-94.
24. Christov, V. Ch.; Angelov, Ch. M. *Phosphorus, Sulfur* **1988**, *40*, 155-159.
25. Capozzi, F.; Capozzi, G.; Menichetti, S. *Rev. on Heteroatom Chem.* **1988**, *1*, 178.
26. Christov, V. Ch.; Aladinova, V. M. *Sulfur Lett.* **2000**, *43*, 127-136.
27. Christov, V. Ch.; Angelov, Ch. M. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1992**, *68*, 223-226.
28. Christov, V. Ch. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1998**, *132*, 53-63.
29. Sharpless, K. B.; Gordon, K. M.; Lauer, R. F.; Patrick, D. W.; Singer, S. P.; Young, M. W. *Chem. Scripta* **1975**, *8A*, 9.
30. Brown, R. S.; Eyley, S. C.; Parsons, P. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 438.
31. Toshimitsu, A.; Aoai, T.; Owada, H. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5301.
32. Toshimitsu, A.; Hayashi, G.; Terao, K.; Uemura, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* **1988**, 2113.
33. Gordon, A. J.; Ford, R. A. *The Chemist's Companion*, John Wiley & Sons: New York, **1972**, p. 48.
34. *Encyclopedia of Chemical Technoloogy*, John Wiley & Sons: New York, **1968**, Vol. 17, p. 84.
35. Christov, V. Ch.; Aladinova, V. M. *Synth. Commun.* **2010**, in press.
36. Christov, V. Ch.; Aladinova, V. M. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1998**, *133*, 215-220.
37. Christov, V. Ch.; Prodanov, B. *Main Group Chemistry News (MGCN) Commun.* (<http://www.gbhap.com/physical/>) **1998**, 3 p.
38. Christov, V. Ch.; Aladinova, V. M.; Prodanov, B. *Phosphorus, Sulfur, Silicon* **1999**, *155*, 67-79.

COMPLEX FORMATION AND LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN THE NIOBIUM(V) – 4-NITROCATECHOL – THIAZOLYL BLUE TETRAZOLIUM SYSTEM

*Petya Racheva¹, Vanya Lekova², Teodora Stefanova²,
Atanas Dimitrov² and Kiril Gavazov^{2*}*

*1- Department of Chemistry and Biochemistry, Medical University Plovdiv,
15A Vassil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria*

*2- Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry,
University of Plovdiv „Paisii Hilendarski“,
24 Tsar Assen Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria,
E-mail: kgavazov@abv.bg

ABSTRACT

The complex formation and liquid-liquid extraction in the niobium(V) – 4-nitrocatechol (4-NC) – Thiazolyl Blue Tetrazolium (MTT) – water – organic solvent system was studied. Two ion-associated complexes with suggested formulae $(\text{MTT})_2[\text{NbO}(\text{OH})(4-\text{NC})_2]$ (**I**) and $(\text{MTT})_3[\text{NbO}(4-\text{NC})_3]$ (**II**) were detected in the organic phase after shaking at certain conditions. The second one has better analytical characteristics and could compete successfully with many species used for spectrophotometric and extraction-spectrophotometric determination of niobium(V). The optimum conditions for extraction of **II** were found: organic solvent – chloroform, extraction time – 3 min, acidity of the aqueous phase – 0.05–0.10 mol L⁻¹ H₂SO₄, concentration of 4-NC – 1.4×10^{-3} mol L⁻¹ and concentration of MTT – 2.4×10^{-4} mol L⁻¹. Under the specified conditions Beer's law is obeyed for Nb(V) concentrations ranging from 0.39 µg mL⁻¹ to 1.7 µg mL⁻¹ with molar absorptivity coefficient of $\epsilon_{410}=5.6 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹. Some key constants were determined: constant of association ($\log \beta = 13.2$), constant of distribution ($\log K_D = 0.82$), constant of extraction ($\log K_{\text{ex}} = 14.0$), recovery factor ($R=86.9\%$). The limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and Sandell's sensitivity (S) were calculated to be LOD=0.12 µg mL⁻¹ Nb(V), LOQ=0.39 µg mL⁻¹ Nb(V) and S=0.0017 µg cm⁻² Nb(V).

Key words: niobium, solvent extraction, spectrophotometry, tetrazolium salt, ion-associate

INTRODUCTION

Niobium is widely used for the fabrication of steels and superalloys, special materials for microelectronics and optics, superconductors, refractory materials and

catalysts [1-9]. As an important microalloying element in steels niobium can significantly affect the properties of the sample, such as the intensity at high temperature, the ability of tarnish-resistance and temper brittleness [6,7,9]. Niobium steels are valuable constructive materials for the chemical and nuclear industry, jet and rocket engines, gas pipelines and turbines [6-9]. Unalloyed niobium and some niobium alloys are important for the production of surgical instruments, medical devices (e.g. pacemakers), coins and jewelry. The reason for these applications is niobium's physiologically inertness and ability to be colored by anodisation [9,10].

In nature, niobium almost invariably occurs as complex oxide materials in association with tantalum. Columbite-tantalite minerals are usually found as accessory minerals in pegmatite intrusions, and in alkaline intrusive rocks [11-13]. It should be mentioned that the niobium content in geological samples is of particular interests to geochemists [14-16]. This element remains immobile during post-crystallization rock alternation involving hydrous fluids, and the precise determination of ratios such as Nb/U and Nb/Th can give valuable information for the processes taking place during the generation of continental crust from the mantle [16].

Several analytical methods have been used to determine Nb: spectrophotometry [9,17-37], high-performance liquid chromatography (HPLC) [6,14,15,38], atomic absorption spectrophotometry (AAS) [39], inductively coupled plasma (ICP) optical emission spectrometry (OES) [40], ICP mass spectrometry (MS) [41] and neutron activation analysis (NAA) [42]. The main disadvantage of AAS and OES is low sensitivity because of spectral interference or high background due to the matrix elements. The general disadvantage of ICP-MS and NAA is high cost.

The methods involving spectrophotometry are rather popular due to their simplicity, inexpensive instrumentation and easy automation [29,43]. These methods are often based on ion-association systems composed of intensively colored anionic chelate and bulky organic cation which makes the complex hydrophobic and easily extractable into organic solvents [9,29-36,43-50].

It is known that Nb(V) forms yellow anionic species with 4-nitrocatechol (4-NC) [32,44,45]. The cationic ion-pair reagent 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (Thiazolyl Blue Tetrazolium, MTT) is considered particularly prospective for liquid-liquid extraction (LLE)-spectrophotometric determination of such species because MTT^+ absorbs light in the same spectral region. The overlap between the absorption bands of MTT^+ and Nb(V) – 4-NC anionic chelate is expected to cause a promotion of the intensity of coloration.

In this paper we study the complex formation and LLE in the Nb(V) – (4-NC) – MTT – water – organic solvent system as a first step of its application for LLE-spectrophotometric determination of Nb(V).

EXPERIMENTAL

Reagents and apparatus

✓ A stock Nb(V) solution was prepared by dissolving of 0.2352 g of Nb_2O_5 (Fluka, p.a.) in 10 mL conc. H_2SO_4 in the presence of 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as described in [45,50]. After cooling, the obtained transparent substance was carefully collected into

a 100 mL calibrated flask and diluted to the mark with 10 mol L⁻¹ solution of H₂SO₄ [50]. A 1 mL aliquot of this solution was transferred into a 10 mL calibrated flask and diluted to the mark with 17 mol L⁻¹ solution of H₂SO₄. The concentration of the obtained working solution was 164.4 µg mL⁻¹ Nb(V).

- ✓ 4-NC (Fluka, p.a.), 1.0×10⁻² mol L⁻¹ aqueous solution.
- ✓ MTT, (Loba Feinchemie AG, for microscopy), 3×10⁻³ mol L⁻¹ aqueous solution.
- ✓ Chloroform, redistilled.
- ✓ A Camspec M508 UV/Vis spectrophotometer, equipped with 1 cm path-length cells.
- ✓ A HI 83140 pH meter (Italy) with a combined plastic electrode.

Procedure

The necessary amounts of Nb(V), H₂SO₄ to adjust the acidity of the aqueous medium, 4-NC and MTT were placed in separatory funnels, diluted to 10 mL with distilled water and extracted with 10 mL of organic solvent. The samples were shaken and after phase separation, the organic layer was filtered through a paper filter into a 1 cm cell. The absorbance was measured against a blank prepared in the same way.

For the determination of the distribution constant K_D the absorbance values obtained after single (A₁) and triple (A₃) extractions in the optimum conditions (Table 1) were compared: K_D=[Nb]_{org}/[Nb]_{aq}=A₁/(A₃-A₁). The organic extract (10 mL) after the single extraction was transferred through a paper filter into a 25 mL volumetric flask. It was diluted to volume with chloroform and then the absorbance (A₁) was measured against a blank. Under the same conditions another sample was extracted with three successive portions of chloroform. The volumes of these portions were 10, 7, and 7 mL respectively. The extracts were consecutively transferred through a paper filter into a 25 mL volumetric flask, and after dilution to volume with chloroform, the absorbance (A₃) was measured against a blank.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectral characteristic and optimum LLE-spectrophotometric conditions

Preliminary investigations showed that in sulfuric acid solutions Nb(V), 4-NC and MTT form easily extractable into organic solvents (chloroform, 1,2-dichloroethane, benzene, toluene and tetrachloromethane) intensively colored yellow species. Chloroform was chosen for further investigations because of its better performance. The main absorption maximum in this solvent is situated at 400-430 nm. Additional, very sharp maximum is recorded at about 560 nm. This maximum is improper for spectrophotometric measurements.

Other parameters concerning the extraction of Nb(V) were optimized: the acidity of aqueous phase (Fig. 1), the time of extraction (Fig. 2) and the concentrations of the reagents (Fig. 3). The optimum conditions are listed in Table 1.

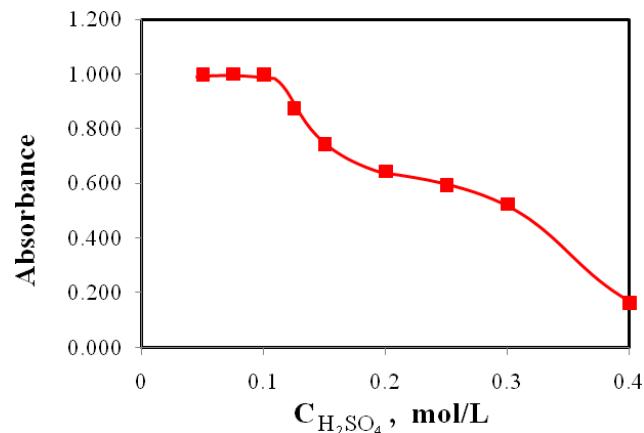


Figure 1. Absorbance of the extracted complex vs. concentration of H_2SO_4 plot.
 $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{4-NC} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{MTT} = 2.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

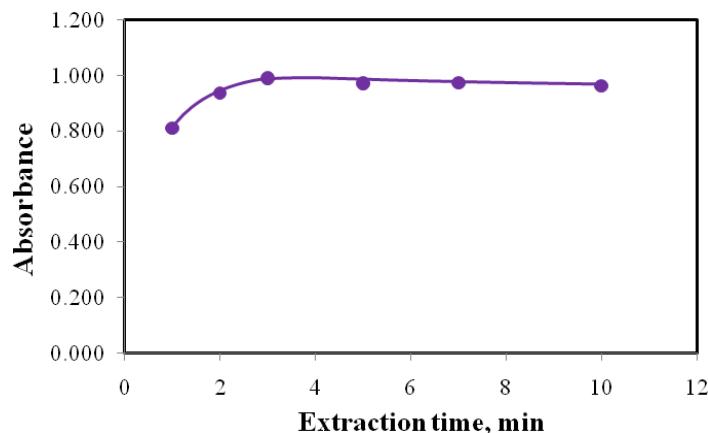


Figure 2. Absorbance of the extracted complex vs. extraction time plot.
 $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{4-NC} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{MTT} = 2.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

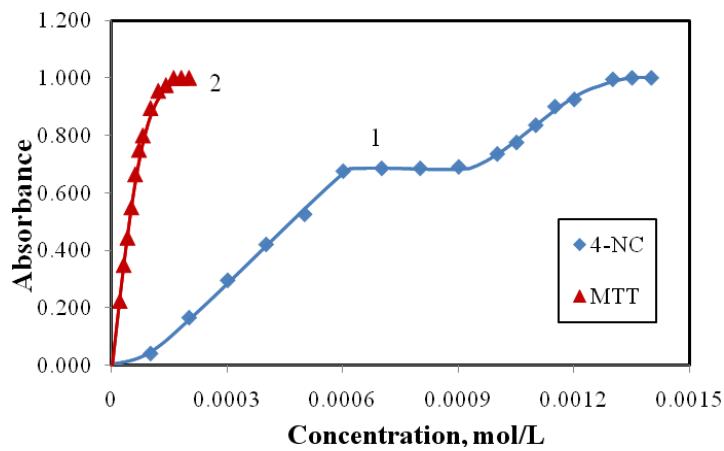


Figure 3. Absorbance of extracts of Nb(V) with 4-NC and MTT vs. concentration of the reagent plots:

- (1) 4-NC. $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{MTT} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$;
- (2) MTT. $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{4-NC} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

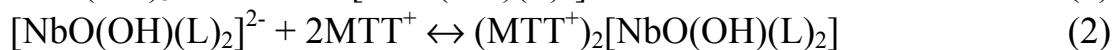
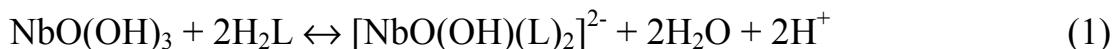
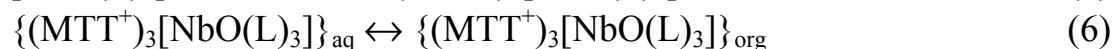
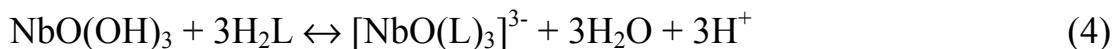
The complicated course of curve 1 is an indication for stepwise complex formation.

Table 1. Optimum conditions and analytical characteristics of the LLE-spectrophotometric determination of Nb(V) with 4-NC and MTT

Optimum Conditions	Analytical Characteristics
Organic solvent: Chloroform	Apparent molar absorptivity (ϵ'): $(5.6 \pm 0.2) \times 10^4$ L mol ⁻¹ cm ⁻¹
Absorbance maximum: 410 ± 5 nm	Adherence to Beer's law: $0.39 - 1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ Nb(V)
Extraction time: 3 min	Correlation coefficient: 0.9974
Acidity of aqueous phase: $0.05 - 0.10$ mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄	Sandell's sensitivity: $0.0017 \mu\text{g cm}^{-2}$
Concentration of 4-NC: 1.4×10^{-3} mol L ⁻¹	Limit of detection (LOD): $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ Nb(V)
Concentration of MTT: 2.4×10^{-4} mol L ⁻¹	Limit of quantification (LOQ): $0.39 \mu\text{g mL}^{-1}$ Nb(V)

Suggested formulae and equations

The complicated course of curve 1, Fig. 3 is a strong evidence for stepwise complex formation in the Nb(V) – 4-NC – MTT LLE-system. That is why Nb(V) to 4-NC and Nb(V) to MTT molar ratios were established by the equilibrium shift method [51] (Fig. 4). The results show that at least two different complexes are formed between Nb(V), 4-NC and MTT (with composition of 1:2:2 and 1:3:3, respectively). Suggested equations of complex formation and extraction, based on the mentioned molar ratios, data for the niobium state in sulfuric acid solutions [49,52], and our previous investigations on similar system [45] are presented in Scheme 1 and Scheme 2.

**Scheme 1.** Formation and extraction of the ternary complex of Nb(V) with 4-NC (H₂L) and MTT at deficiency of the reagents**Scheme 2.** Formation and extraction of the ternary complex of Nb(V) with 4-NC (H₂L) and MTT at the optimum extraction-spectrophotometric conditions

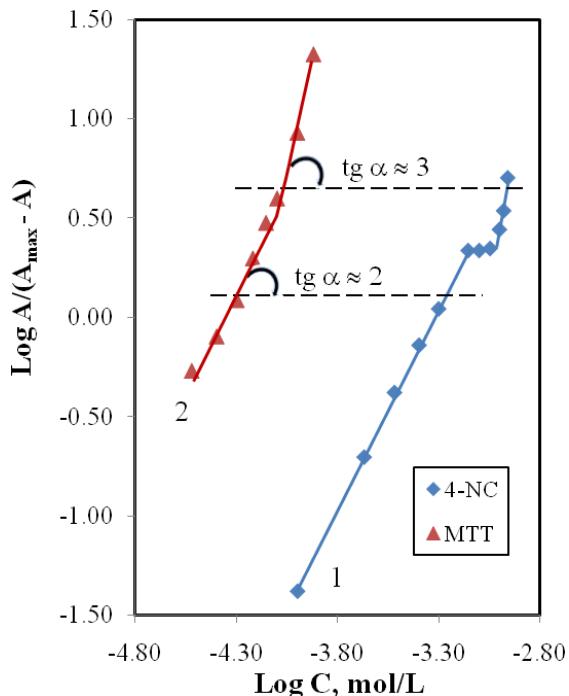


Figure 4. Determination of the 4-NC to Nb(V) molar ratios (curve 1) and MTT to Nb(V) molar ratios (curve 2) according to the equilibrium shift method: (1) $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{MTT} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (2) $C_{Nb(V)} = 1.77 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{4-NC} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Equilibrium constants and analytical characteristics

The complex with suggested formula $(\text{MTT}^+)_3[\text{NbO}(4-\text{NC})_3]$ (see Scheme 2), which is formed at the conditions presented in Table 1, has better characteristics. The equilibrium constants characterizing its formation and extraction were calculated as follows: the association constant β (eq. 5) by the method of Komar-Tolmachev [51]; the distribution constant K_D (eq. 6) by comparing the absorption for single extraction at the optimum conditions (A_1) to that for threefold extraction (A_3) in equal volumes (25 mL) $K_D = A_1/(A_3 - A_1)$; and the recovery factor R and extraction constant K_{Ex} from the equations $R\% = K_D 100/(K_D + 1)$ and $\text{Log } K_{Ex} = \text{Log } K_D + \text{Log } \beta$, respectively [46,47,49]. The obtained values are presented in Table 2.

Table 2. Values for the equilibrium constants characterizing LLE of Nb(V) with 4-NC and MTT

Equilibrium Constants	Nb(V) – 4-NC – MTT – Water – Chloroform
Log β	13.2 ± 0.9
Log K_D	0.82 ± 0.01
Log K_{Ex}	14.0 ± 0.9
Recovery	$(86.9 \pm 0.1)\%$

The Komar-Tolmachev method [51] also allows to calculate the true molar absorptivity (ϵ) of the complex: $\epsilon = (5.2 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. This value agrees well

with that obtained from Beer's law (ϵ') (Table 1) what is an indication for the lack of serious side-reactions [51]. Apparently only $(MTT^+)_3[NbO(4-NC)_3]$ is extracted at the specified in Table 1 conditions. The 4-NC to Nb molar ratio in this complex (3:1) is higher than that reported for other complexes with similar reagents (Table 3). This is the first reason for the significantly higher molar absorptivity achieved (Compare rows 3 and 9 in Table 3). The second reason is the ability of MTT⁺ to absorb light in the yellow range (Compare rows 7 and 9 in Table 3).

Many others analytical reagents for Nb(V), including 5,7-diido-8-hydroxyquinoline ($\epsilon'=4.853\times10^3$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [23], p-sulphobenzeneazo-4-(2,3-dihydroxypyridine) ($\epsilon'=5.218\times10^3$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [24], sulphochlorophenol S + laurilamine ($\epsilon'=1.8\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [25], thiocyanate + promazine hydrochloride ($\epsilon'=2.52\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [34], thiocyanate + tetraphenylarsonium chloride (or tetraphenylphosphonium chloride) ($\epsilon'=3.3\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [17], Xylenol Orange + 3-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-4-pyridone ($\epsilon'=3.72\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [18], PAR ($\epsilon'=3.76\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [19], 3-hydroxyflavone ($\epsilon'=4.088\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [20], tiazolylazo compounds + cetylpyridinium bromide $\{\epsilon'=(2.79-4.46)\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹ [27], 2,3-dihydroxynaphthalene + acetate ($\epsilon'=4.6\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [37], and N-cinamoyl-N-2,3-xylylhydroxylamine + thiocyanate ($\epsilon'=4.75\times10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) [36] are worse in term of sensitivity than these studied in this work. That is why the couple 4-NC – MTT could be recommended for LLE-spectrophotometric determination of niobium(V) after preliminary investigations on the interfering effect of the matrix components.

Table 3. Extraction-chromogenic systems for niobium involving ortho-polyphenols and tetrazolium salts.

No	Reagents	Solvent	Composition Nb:R ₁ :R ₂	Molar abs. (ϵ') [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]	Ref.
1	Catechol + Tetrazolium violet	CHCl ₃	1:2:1	0.57×10^4	31
2	Dihydroxynaphthalene + Tetrazolium violet	CHCl ₃	1:2:1	1.18×10^4	31
3	4-NC + Tetrazolium violet	C ₂ H ₄ Cl ₂	1:2:1	1.59×10^4	32
4	Pyrogallol + Tetrazolium violet	C ₂ H ₄ Cl ₂	1:2:1	0.649×10^4	32
5	Catechol + Triphenyltetrazolium chloride	CHCl ₃	1:2:1	1.60×10^4	48
6	3,5-dinitrocatechol + Triphenyltetrazolium chloride	CHCl ₃	1:2:2	2.48×10^4	45
7	4-NC + Blue Tetrazolium Chloride	CHCl ₃	1:3:1.5	4.6×10^4	45
8	4-NC + MTT	CHCl ₃	1:2:2	3.9×10^4	This work
9	4-NC + MTT	CHCl ₃	1:3:3	5.6×10^4	This work

CONCLUSION

Nb(V), 4-NC and MTT form well extractable into chloroform ion-association complexes with suggested formulae $(MTT^+)_2[NbO(OH)(4-NC)_2]$ and $(MTT^+)_3[NbO(4-NC)_3]$. The second one has better characteristics and could compete successfully with many species used for spectrophotometric and LLE-spectrophotometric determination of niobium(V).

REFERENCES

1. M. T. Tanvir, Y. Aoki, H. Habazaki, *Appl. Sur. Sci.*, **255**, 8383 (2009).
2. H. Smogor, T. Cardinal, V. Jubera, E. Fargin, J. J. Videau, S. Gomez, R. Grodsky, T. Denton, M. Couzi, M. Dussauze, *J. Solid State Chem.*, **182**, 1351 (2009).
3. A. M. R. Galletti, G. Pampaloni, *Coordin. Chem. Rev.*, **254**, 525 (2010).
4. A. Godeke, A. Ouden, A. Nijhuis, H.H.J. Kate, *Cryogenics*, **48**, 308 (2008).
5. M.E. Campderros, J. Marchese, *Hydrometallurgy*, **61**, 89 (2001).
6. Li Dongling, Hu Xiaoyan, Wang Haizhou, *Talanta*, **63**, 233 (2004).
7. H. Najafi, J. Rassizadehghani, S. Asgari, *Mater. Sci. Eng., A* **486**, 1 (2008).
8. M. Sankar, Y. Satish Reddy, R.G. Baligidad, *Trans. Indian Inst.Met.*, **62**, 135 (2009).
9. I. M. Gibalo, in: A.P. Vinogradov (ed.), *Analiticheskaya khimiya niobiya i tantala*, Nauka, Moscow, 1967.
10. M. A. B. Gomes, S. Onofre, S. Juanto, L. O. S. Bulhões, J. *Appl. Electrochem.*, **21**, 1023 (1991).
11. O. M. El Hussaini, *Trans. Nonferr. Met. Soc. China*, **19**, 474 (2009).
12. A. Y. Barkov, R. F. Martin, Y. P. Men'shikov, Y. E. Savchenko, Y. Thibault, K. V. O. Laajoki, *Contrib. Mineral. Petrol.*, **138**, 229 (2000).
13. R. H. Mitchell, B. A. Kjarsgaard, *Contrib. Mineral. Petrol.*, **144**, 93 (2002).
14. N. Vachirapatama, P. Doble, P. R. Haddad, *Anal. Chim. Acta*, **409**, 35 (2000).
15. N. Vachirapatama, M. Macka, B. Paull, C. Münker, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. Sec. A*, **850**, 257 (1999).
16. J. Wade, B. J. Wood, *Nature*, **409**, 75 (2001).
17. B. Tamhina, A.G. Ivšić, A. Bartolinčić, *Croatica Chim. Acta*, **73**, 57 (2000).
18. A. G. Ivšić, N. Galić, V. Tomišić, *J. Solution Chem.*, **39**, 149 (2009).
19. P. Pakalns, A.B. Ivanfy, *Anal. Chim. Acta*, **41**, 139 (1968).
20. A. K. Chhakkar, L. R. Kakkar, *Mikrochim. Acta*, **117**, 137 (1995).
21. B. V. Agarwala, A. K. Dey, *Mikrochim. Acta*, **5**, 664 (1969).
22. Kh. D. Nagiev, *Zh. Anal. Khim.* **59**, 1033 (2004).
23. Y. Sharma, *Monatshefte für Chemie*, **113**, 307 (1982).
24. Y. Sharma, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **306**, 401 (1981).
25. N. Ivanov, R. Borissova, E. Veselinova, *Z. Anal. Chem.*, **280**, 223 (1976).
26. A. K. Chhakkar, L. R. Kakkar, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **351**, 720 (1995).
27. Alaa S. Amin, *Microchem. J.*, **65**, 261 (2000).

28. R. Lobinski, Z. Marczenko, *Anal. Chim. Acta*, 226, 281 (1989).
29. Z. Marczenko, M. Balcerzak, *Metod'y spektrofptmetrii v UF i vidimoj oblastyah v neorganicheskoy analize*, BINOM, Laboratiriya znaniya, Moscow, 2007.
30. A. Alexandrov, A. Dimitrov, S. Kostova, *Nauchni Tr. Plovdiv Univ. Khim.*, 24, 67 (1986).
31. S. Kostova, A. Alexandrov, S. Statkova, *Nauchni Tr. Plovdiv Univ. Khim.*, 27, 53 (1989).
32. S. Kostova, A. Alexandrov, I. Ilieva, *Nauchni Tr. Plovdiv Univ. Khim.*, 27, 67 (1989).
33. D. T. Bums, P. Pornsinlapatip, *Anal. Lett.*, 33, 1433 (2000).
34. M. Tarasiewicz, W. Misiuk, H. Puzanowska-Tarasiewicz, *Microchem. J.*, 37, 36 (1988).
35. N.A. Verdizade, T.D. Amrahov, *Zh. Anal. Khim.*, 44, 671 (1989).
36. S. Inoue, O. Mishima, Q.B. Zhang, H. Minami, M. Uto, *Anal. Lett.*, 34, 2465 (2001).
37. P. K. Tarafder, R. K. Mondal, S. Chattopadhyaya, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 54, 231 (2009).
38. G. Li, Q. Wei, Q. Hu, Z. Huang, G. Yang, *Microchim. Acta*, 158, 95 (2007).
39. K. Patel, S.K. Menon, Y. K. Agrawal, *Microchem. J.*, 53, 158 (1996).
40. L. Z. Ling, W. W. Yang, *Metall. Anal. (Chin.)*, 5, 48 (1996).
41. X. J. Yang, C. Pin, *Anal. Chim. Acta*, 458, 375 (2002).
42. N. R. Das, S. N. Bhattacharyya, *J. Radioanal. Chem.*, 68, 75 (1982).
43. T. P. Rao, M. L. P. Reddy, A. R. Pillai, *Talanta*, 46, 765 (1998).
44. K. B. Gavazov, A. N. Dimitrov, V. D. Lekova, *Uspekhi Khimii*, 76, 187 (2007).
45. V. Lekova, P. Racheva, K. Stojnova, A. Dimitrov, K. Gavazov, *Chemija*, 21, 106 (2010).
46. P. V. Racheva, K. B. Gavazov, V. D. Lekova, A. N. Dimitrov, *Zh. Anal. Khim.*, 65, 25 (2010).
47. M. Kamburova, D. Kostova, *Chemija*, 19, 13 (2008).
48. A. Alexandrov, S. Kostova, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 83, 247 (1984).
49. A. Alexandrov, S. Kostova, O. Navratil, *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, 50, 2369 (1985).
50. A. Alexandrov, S. Kostova, *Nauchni Tr. Plovdiv Univ. Khim.*, 24, 53 (1986).
51. M. I. Bulatov, I. P. Kalinkin, *Practicheskoe rukovodstvo po photocolorimetriceskim i spectrophotometricheskim metodam analysa*, Leningrad, 1976.
52. E. A. Mazurenko, B. I. Nabivanets, *Zh. Neorg. Khim.*, 14, 3286 (1969).

DETERMINATION OF MOLYBDENUM WITH TRIPHENYLtetrazolium CHLORIDE IN PLANT SAMPLES

D. Kostova

Agricultural University – Plovdiv

Laboratory Complex

12, Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

An analysis for molybdenum content by variants of lettuce samples was carried out using an extraction-spectrophotometric method with Triphenyl-tetrazolium chloride.

The influence of fertilization has been studied upon the content of molybdenum in black lettuce. Nitrogen sources – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ have been used. The soil treating on plants is carried out with 150 mg N kg^{-1} soil and 300 mg N kg^{-1} soil.

It can be seen a decrease in concentration of molybdenum in black lettuce in mineral fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ with 1 mg kg^{-1} Mo introduced in soil, with the increase of the fertilization norm of nitrogen in soil.

Key words: molybdenum(VI), triphenyltetrazolium chloride, spectrophotometry, plants

INTRODUCTION

It has been established that molybdenum takes part in fixing and assimilation of the atmospheric nitrogen. Molybdenum also affects the biochemical processes and chemical composition of plants. It is known that micro-amounts of molybdenum favorably affect plant development. Low levels cause some functional diseases in the plants. The interest in molybdenum has increased recently. Molybdenum toxicity can rarely be observed in plants but the excess of this element causes illness in humans and animals. For this reason the molybdenum content in the crop production should be controlled [1-3].

In literature there are lots of data about the influence of molybdenum content in plants. With betterment of molybdenum feeding-up in plants sets in positive changes in the content of chlorophyll and carotene. The intensity of photosynthesis reinforces. On condition of molybdenum scarcity he synthesization of amino acids upsets, which reflects on quality and quantity of yield [4].

The objective of this study is to determine the molybdenum content using a new extraction – spectrophotometric method with Triphenyltetrazolium chloride in plant samples. To explore the influence of the mineral fertilization with molybdenum upon the assimilation of molybdenum on plants of black lettuce.

MATERIAL AND METHODS

Soil samples from a layer of 0 – 20 cm deep were taken for agronomical analysis and analyzed for: mineral nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$) 1.2 mg kg^{-1} soil ; mobile P_2O_5 and K_2O respectively 16.8 mg and 18.8 mg kg^{-1} soil by the method of Egner-Rhiem [9].

The crops were grown on a highly leached meadow-cinnamonic soil with comparatively light mechanical composition, a humus content of 1.6 % (by Tjurin) and neutral soil reaction pH 7-7.1 (potentiometrically) in aqueous extract.

A soil treating on plants of sort black lettuce has been carried out. Nitrogen sources – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ have been used. The soil treating on plants is carried out with 150 mg N kg^{-1} soil (N_1) and 300 mg N kg^{-1} soil (N_2). Molybdenum at dose of 1 mg kg^{-1} soil was applied like ammonium molybdate.

An analysis for molybdenum content in lettuce samples was carried out by using a new extraction-spectrophotometric method with Triphenyltetrazolium chloride [5]. All measurements were carried out in 1-cm quartz cells with measurement at 250 nm on UV-VIS spectrophotometer.

A wet burning of the plant samples was carried out and a mixture of sulfuric and nitric acids used for the oxidation of the organic substance. A portion of 2 g of air dry plant material was placed into a Kjeldahl flask and moistened with 4 mL distilled water. 5 mL conc. sulfuric acid and 10 mL conc. nitric acid were added. The flask was slightly heated to avoid splashing of the solution, decomposition and fuming away of nitric acid. When all the organic material was oxidized, the solution was heated at a higher temperature for 10 min [8]. After cooling, the solution was diluted with water and filtered. It was transferred into a volumetric flask of 50 mL and diluted up to the mark with distilled water. Aliquote parts of this solution were taken for analysis.

In separatory funnel of 100 mL the following solutions were introduced: 0.5 mL phosphoric acid $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, 0.5 mL triphenyltetrazolium chloride $1.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, aliquote of the prepared solution of plant sample. The mixture was diluted up to a volume of the aqueous phase of 10 mL with distilled water and extracted with 3 mL of 1,2-dichloroethane for 30 sec. The organic phase was filtered through a dry paper into a 1 cm cuvette and the absorbance was measured at 250 nm. A blank was run in parallel in the absence of plant sample. A calibration graph was constructed with standards similarly treated.

RESULTS AND DISCUSSION

Molybdenum(VI) forms an ion-pair with Triphenyltetrazolium chloride [5]. The studies showed that the ion associate is better dissolved in 1,2-dichloroethane. Beer's law is obeyed in the range of $0.5 - 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ molybdenum(VI). The molar absorptivity of the ion-pair is $1 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. This method is applied in the present research for determination of microquantities of molybdenum in plant material.

The microelement molybdenum exerts influence on the normal development and nutritious qualities of the black lettuce. In conjunction with the mineral fertilization with the three nitrogen fertilizers $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ it has been done a treating with molybdenum soil feeding-up with 1 mg Mo introduced like ammonium molybdate in kg soil. Complete information about the molybdenum content in soils and plants is needed to study its importance and to establish the need for molybdenum in fertilizers.

The fertilization brought considerable changes in the molybdenum content of lettuce plant material. The experimental data for content of molybdenum in a black lettuce cultivar in mineral fertilization and treating with molybdenum soil feeding-up are stated on Table 1.

The experimental data Table 1 show that the content of molybdenum in the plant mass stays the same 16.8 mg kg^{-1} in mineral fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in different levels of nitrogen in soil $N_1 - 150 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil and $N_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil (variants 3 and 5). In fertilization with $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (variants 11 and 13) in different levels of nitrogen in soil the content of molybdenum is almost equal 16.00 mg kg^{-1} and respectively 15.8 mg kg^{-1} . The experimental data show that the content of molybdenum in black lettuce increases at about three times in fertilization with NH_4NO_3 ($N_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil).

Consequently the mineral fertilization with NH_4NO_3 contributes to the better extraction of molybdenum in the plant mass. In control ($\text{N}_0\text{P}_0\text{K}_0$) the content of molybdenum is low 14.7 mg kg^{-1} .

Table 1. Content of molybdenum in black lettuce (fertilization with 1 mg Mo kg^{-1} soil)

N	Variants	Fertilizer	Mo, mg kg^{-1} TTC method	Reliab. $P=99\%$	RSD* %	Mo, mg kg^{-1} TV** method [7]
1	$\text{N}_0\text{P}_0\text{K}_0$ (control)		14.7	a	1.4	15.2
2	$\text{N}_0\text{P}_1\text{K}_1$ (background)		14.0	d	2.0	14.6
3	$\text{N}_1 + \text{background}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16.8	d	1.8	16.2
4	$\text{N}_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31.5	d	1.6	31.0
5	$\text{N}_2 + \text{background}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16.8	a	1.5	16.0
6	$\text{N}_2 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	19.5	f	1.9	19.9
7	$\text{N}_1 + \text{background}$	NH_4NO_3	18.0	c	1.5	18.7
8	$\text{N}_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	NH_4NO_3	8.7	d	2.3	9.3
9	$\text{N}_2 + \text{background}$	NH_4NO_3	55.5	c	1.4	55.0
10	$\text{N}_2 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	NH_4NO_3	24.3	b	1.9	25.0
11	$\text{N}_1 + \text{background}$	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	16.0	b	1.9	16.4
12	$\text{N}_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	44.8	c	1.2	44.2
13	$\text{N}_2 + \text{background}$	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	15.8	c	1.6	16.5
14	$\text{N}_2 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	14.7	c	1.5	15.0

*Relative Standard Deviation for TTC method ($n = 6$)

**Tetrazolium violet (TV)

a, b, c, A degree of reliability

Indices:

$\text{N}_1 - 150 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil

$\text{N}_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil

$\text{P}_1 - 150 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ kg}^{-1}$ soil introduced like double superphosphate

$\text{K}_1 - 150 \text{ mg K}_2\text{O kg}^{-1}$ soil introduced like potassium sulphate

The obtained results from the study in connection with the developed method by us for determination of molybdenum with Triphenyltetrazolium chloride are worked with a computer programme for multispecified comparative analysis in Duncan's method [6].

It can be seen a decrease in concentration of molybdenum in black lettuce in mineral fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ with 1 mg Mo kg^{-1} introduced in soil, with the increase of the fertilization norm of nitrogen in soil. In $N_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$ (variant 4) fertilized with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ molybdenum is 31.5 mg kg^{-1} , where as in $N_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ (variant 6) the concentration of molybdenum decreases to 19.5 mg kg^{-1} (Fig.1). Hence the high content of nitrogen in soil decreases the quantity of the assimilated molybdenum by plants.

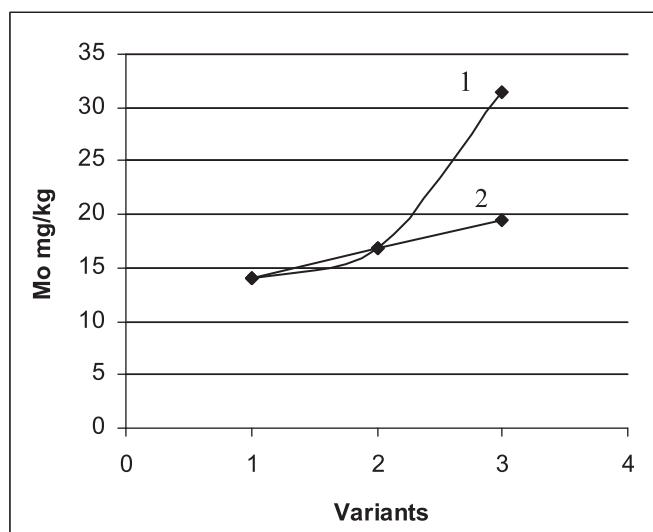


Figure 1. Content of Mo in black lettuce in different levels of fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 1 \text{ mg Mo}$: 1— $\text{N}_1 150 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil; 2— $\text{N}_2 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil. Variants: 1— $\text{N}_0\text{P}_1\text{K}_1$ (background); 2— $\text{N} + \text{background}$; 3— $\text{N} + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$

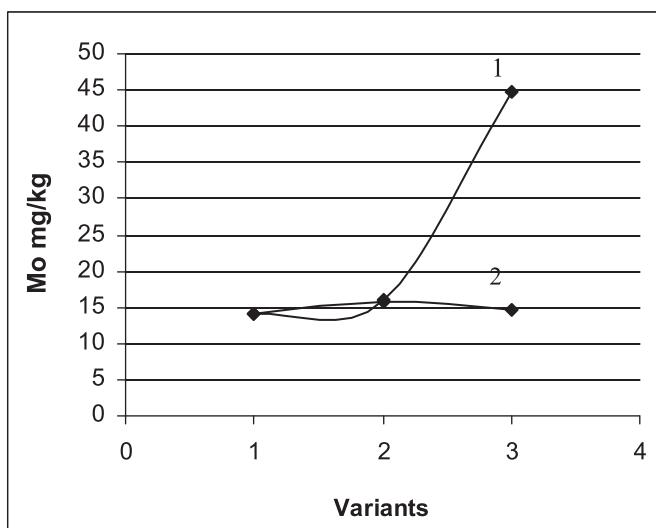


Figure 2. Content of Mo in black lettuce in different levels of fertilization with $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 1 \text{ mg Mo}$: 1— $\text{N}_1 150 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil; 2— $\text{N}_2 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil. Variants: 1— $\text{N}_0\text{P}_1\text{K}_1$ (background); 2— $\text{N} + \text{background}$; 3— $\text{N} + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$

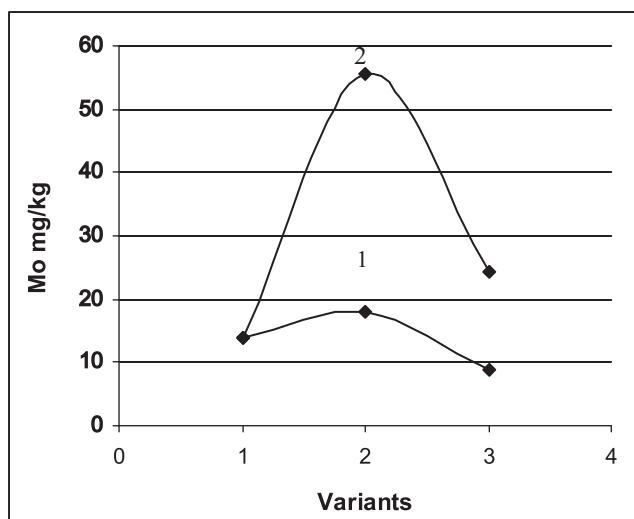


Figure 3. Content of Mo in black lettuce in different levels of fertilization with $\text{NH}_4\text{NO}_3 + 1 \text{ mg Mo}$: 1 – $N_1 150 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil; 2 – $N_2 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil. Variants: 1 – $N_0\text{P}_1\text{K}_1$ (background); 2 – N + background; 3 – N + background + 1 mg Mo

A similar subordination can be seen in variants 12 and 14 fertilized with $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. In $N_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$ the content of molybdenum is 44.8 mg kg^{-1} . With increase of the fertilization norm of nitrogen in soil in $N_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$, the content of molybdenum decreases to 14.7 mg kg^{-1} (Fig. 2). Hence nitrogen introduced in soil in the form of $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ exerts the same influence on the accumulation of molybdenum by plants.

There is one exception and this is the fertilization with NH_4NO_3 , that has a reverse influence upon the accumulation of molybdenum in black lettuce (Fig. 3). In fertilization with $N_1 + \text{background} + 1 \text{ mg Mo}$ (variant 8) the content of molybdenum in the plant mass is 8.7 mg kg^{-1} dry mass. The concentration of molybdenum increases three times to 24.3 mg kg^{-1} (variant 10), if we increase the fertilization norm of nitrogen to $N_2 - 300 \text{ mg N kg}^{-1}$ soil. Data from the mineral fertilization and treating with 1 mg Mo kg^{-1} soil show a positive influence of the added molybdenum in soil, if we only fertilize with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

To check the method that we propose, a parallel determination of molybdenum content was carried out by the method with Tetrazolium violet (TV) [7].

The experimental data (Table 1) by both methods show that the proposed method with Triphenyltetrazolium chloride can be successfully used for determination of microquantities of molybdenum in plant material.

CONCLUSIONS

Plants accumulate more molybdenum in additional bringing in soil of this microelement in the form of ammonium salt together with the base fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

An exception can be discerned in fertilization with NH_4NO_3 . The additional addition of molybdenum in soil causes its decrease in the content in plant mass. Maybe this is due to the high nitrogen content in these variants of fertilization.

In mixed soil fertilization with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ with 1 mg Mo, the less content of nitrogen in nutrient medium helps the better extraction of molybdenum in the plant mass.

REFERENCES

1. Kania K., Pytlakowska. K., Spectrophotometric determination of molybdenum in vegetable material, food and a pharmaceutical compound, Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny, 2000, 51, 2, 135.
2. Maslowska J., Janiak J., The biological role of molybdenum and analytical methods for its determination in foodstuffs, Zeszyty Naukowe Politechniki Lodzkiej, Technologia i Chemia Spozywcza, 1993, 50, 85.
3. ZaiJun Li, Pan JiaoMai, Jian Tang, Spectrophotometric determination of trace molybdenum in plants and seeds with 3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl-flurone, Analyst, 2001, 126, 7, 1154.
4. Shkolnik M., The physiological role of the microelements in plants, Nauka, Leningrad, 1970.
5. Kostova D., Triphenyltetrazolium chloride as a new analytical reagent for molybdenum(VI): application to plant analysis, Jour. of Analyt. Chem., in press.
6. Leclerge L., Leonard W. H., Clark A. G., Field plot technique, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minesota, 1989, 155-157.
7. Kamburova M., Kostova D., Tetrazolium violet – a new spectrophotometric reagent for molybdenum determination, Chemija, 2008, 19, 2, 13.
8. Vazhenin, I., Methods for Determination of Microelements in Soils, Plants and Waters, Kolos, Moscow, 1974.
9. Gorbanov S., Velchev V., Matev I., Tanev Z., Rachovski G., Tomov T., Guidance on laboratory exercices connected with Agrochemistry, Sofia, 1990.

A COMPARATIVE ANALYSIS FOR A CONTENT OF MANGANESE IN PLANTS

D. Kostova
Agricultural University – Plovdiv
12, Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

A certain research has been carried out for the content of manganese in leaf mass of eggplant under the influence of soil fertilization and leaf fertilization. In connection with this aspect some leaf fertilizers have been tested, such as: Fitona, Hortigrow, Agroleaf, Kristalon.

A new extraction – spectrophotometric method for the determination of manganese with Methylene Blue in plant material was used. The method is simple and rapid with satisfactory results and good reproducibility.

The content of manganese is higher in leaf mass of eggplant in the treatment of plants with the leaf fertilizer Kristalon – 138.6 mg kg^{-1} Mn. By all means this is due to the fact that the leaf fertilizer Kristalon comprises in its composition 0.04% Mn. The effect of the leaf feeding-up takes place much promptly in comparison to the soil fertilization.

The content of microelement manganese in leaf mass of eggplant was determined in mixed fertilization (soil and leaf). The experimental data show that the highest is the content of Mn 142.2 mg kg^{-1} in fertilization with $\text{N}_{24}\text{P}_{12}\text{K}_{12}$ and leaf fertilizer Kristalon.

Keywords: manganese, methylene blue, spectrophotometry, plants, leaf fertilization.

INTRODUCTION

In the conditions of intensive farming, the problem of trace elements in the soil-plant system attained significant importance. In the process of feeding-up of plants ten of the most important elements are comprised, and manganese is between them.

Manganese is important for the synthesis of the organic substance in plants and the metabolism of a number of nutrient elements in a plant organism. Manganese takes part in a number of important physiological and biological processes – in the nitrogen metabolism, photosynthesis, breathing the needed oxidation-reduction conditions in the cell [1, 2].

Manganese is an element which is important for the nitrogen metabolism in plants. Manganese insufficiency leads to a considerable accumulation of nitrates,

disturbance in the protein synthesis in plants and illness to some plants [3–5]. Also the manganese insufficiency causes a decrease in Ca and Mg contents in plants [6]. The optimal content of manganese, its critical level and toxic concentration at which the growth is depressed and the yield decreased, have been established for a great number of crops [7].

Various methods for determination of manganese have been published. Analyses with some reagents are used [8–14].

The objectivity of this study is to clarify the opportunity for using Methylene Blue [15] as a reagent for determination of micro quantities of manganese in plant samples. To explore the influence of the mineral fertilization and leaf fertilizers upon the assimilation of manganese in leaf mass of eggplants.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in ten variants: non fertilized, soil fertilization, leaf fertilization and mixed fertilization (soil with leaf).

Variants of the experiment:

1. Control – non fertilized
2. Soil fertilization N₂₄P₁₂K₁₂
3. Leaf fertilization Fitona
4. Leaf fertilization Hortigrow
5. Leaf fertilization Agroleaf
6. Leaf fertilization Kristalon
7. N₂₄P₁₂K₁₂ + Fitona
8. N₂₄P₁₂K₁₂ + Hortigrow
9. N₂₄P₁₂K₁₂ + Agroleaf
10. N₂₄P₁₂K₁₂ + Kristalon

An analysis for manganese content by variants were carried out using a new extraction-spectrophotometric method with Methylene Blue (MB) [15]. Manganese(VII) forms an ion-association complex with triphenylmethane dye MB. The molar absorptivity of the ion-association complex is $(1 \pm 0,08) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 245 nm. The system obeys Beer's law in the range $1.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} - 5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Mn(VII). A rapid and selective extractive-photometric method for determination of manganese in plants was developed. The determination was carried out without preliminary separation of manganese.

Apparatus – Spectrophotometer UV–VIS with 1-cm light path quartz cells.

Procedure – A wet burning of the plant sample was carried out in which a mixture of sulphuric and nitric acids was used for the oxidation of the organic substance. A portion of 2 g of air-dry plant material was placed into a Kjeldal flask and moistened with 4 ml distilled water. 5 mL conc. sulphuric acid and 10 mL conc. nitric acid

were added. The flask was slightly heated. If the oxidation of the organic substance was not completed, HNO_3 was added and heated again. When all the organic material was oxidized, the solution was heated at a higher temperature for 10 min [16]. After cooling the solution was diluted with water and filtered. Portions of 3 mL conc. H_2SO_4 , 2 mL conc. H_3PO_4 and 0,1 g potassium periodate were added for oxidation Mn(II) to Mn(VII). It was heated to boiling point and the temperature was maintained for 10 min [17]. After cooling the solution was diluted with water and filtered. It was transferred into a volumetric flask of 50 mL and diluted to the mark with distilled water. Aliquot parts of this solution were taken for analysis.

In separately funnel of 100 mL are introduced the solutions: 4 mL of 1.2 mol L^{-1} HCl , 0.5 mL of 1×10^{-2} mol L^{-1} Methylene Blue, and aliquot part of the plant sample solution, 2 mL of each – saturated solutions of ascorbic acid and tartaric acid (to mask the interfering ions). It is diluted up to a volume of the aqueous phase of 12 mL with distilled water and extracted with 3 mL 1,2 dichloroethane for 5 s. The organic layer is then transferred through paper filter into a 1 cm cuvette and photometered on spectrophotometer at 245 nm against the pure solvent. A blank is run parallel in the absence of plant sample. A standard curve was used for determination of manganese.

RESULTS AND DISCUSSION

A certain research has been carried out for the content of manganese in leaf mass of eggplant under the influence of soil fertilization and leaf fertilization Table 1. In connection with this aspect some leaf fertilizers have been tested, such as: Fitona, Hortigrow, Agroleaf, Kristalon. Manganese in some plant samples is determined with a new extraction-spectrophotometric method with Methylene Blue [15].

As we can discern from Fig. 1 the content of manganese is higher in leaf mass of eggplant in the treatment of plants with the leaf fertilizer Kristalon – 138.6 mg kg^{-1} Mn. By all means this is due to the fact that the leaf fertilizer Kristalon comprises in its composition 0.04% Mn. Content of manganese in leaf mass of eggplant samples increases consequently in the line of the used leaf-fertilizers Hortigrow, Agroleaf, Fitona and Kristalon.

The leaf feeding-up is due to the ability of leaves and stems to absorb the nutritious elements taken in them in the form of certain solutions. The effect of the leaf feeding-up takes place much promptly in comparison to the soil fertilization. It is also very important to mention that the physiological diseases of plants caused by deficiency or scarcity of a given element can be avoided.

Table 1. Content of manganese in leaf mass of eggplant samples in mineral fertilization and leaf treating

Nº	Variants	Mn, mg kg^{-1} MB method	RSD* %	Mn, mg kg^{-1} AAS
1	Control – non fertilized	97.8	1.6	97.5
2	$\text{N}_{24}\text{P}_{12}\text{K}_{12}$	128.8	1.2	128.2
3	Fitona	108.8	1.5	109.3

4	Hortigrow	79.6	2.1	79.1
5	Agroleaf	97.8	1.9	98.2
6	Kristalon	138.6	1.3	139.0
7	$N_{24}P_{12}K_{12}$ + Fitona	112.4	1.7	111.9
8	$N_{24}P_{12}K_{12}$ + Hortigrow	135.6	1.4	135.2
9	$N_{24}P_{12}K_{12}$ + Agroleaf	99.5	2.2	99.8
10	$N_{24}P_{12}K_{12}$ + Kristalon	142.2	1.5	141.8

* Relative Standard Deviation for MB method (based on 5 determination)

In order to study the influence of different kinds of fertilization, the content of microelement manganese in leaf mass of eggplant was determined in mixed fertilization (soil $N_{24}P_{12}K_{12}$ + leaf). The experimental data Fig. 2 show that the highest is the content of Mn 135.6 mg kg^{-1} in leaf mass of eggplant in fertilization with $N_{24}P_{12}K_{12}$ and leaf fertilizer Hortigrow (variant 1) and respectively 142.2 mg kg^{-1} Mn in fertilization with $N_{24}P_{12}K_{12}$ and leaf fertilizer Kristalon (variant 4).

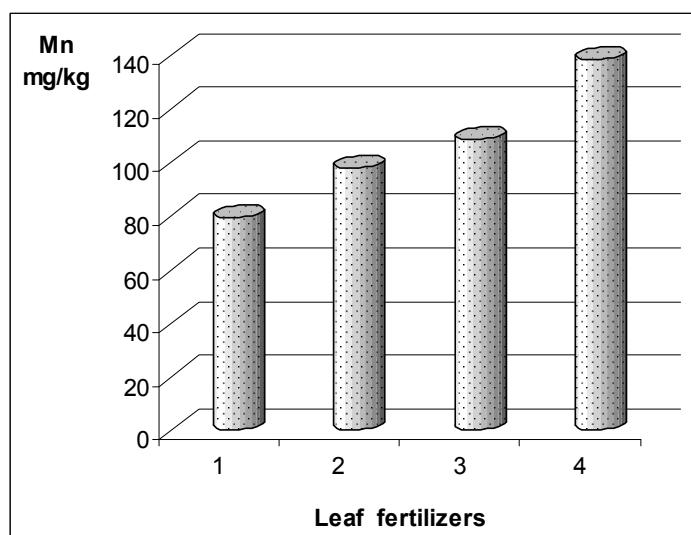


Figure 1. Content of Mn in leaf mass of eggplant in fertilization with leaf fertilizers:
1 – Hortigrow, 2 – Agroleaf, 3 – Fitona, 4 – Kristalon

From fig. 2 it can be discerned that in mixed fertilization the content of manganese does not increase consequently in the line Hortigrow, Agroleaf, Fitona, Kristalon as in the leaf fertilization. This all indicates that soil fertilization with nitrogen, phosphorus and potassium ($N_{24}P_{12}K_{12}$) influences the accumulation of manganese in leaf mass of eggplant.

The experimental data show that in the two variants of fertilization – leaf and mixed fertilization, the content of manganese is highest in the leaf-fertilizer Kristalon.

The accuracy of the method was checked up using atomic-absorption method. The experimental data (Table 1) show a good agreement between the results obtained by the two methods.

The experimental data by both methods show that the proposed extraction-photometric method with Methylene Blue can be successfully used for determination of microquantities of manganese in plant material. This is an extremely simple and direct extraction for determination of microquantities of manganese.

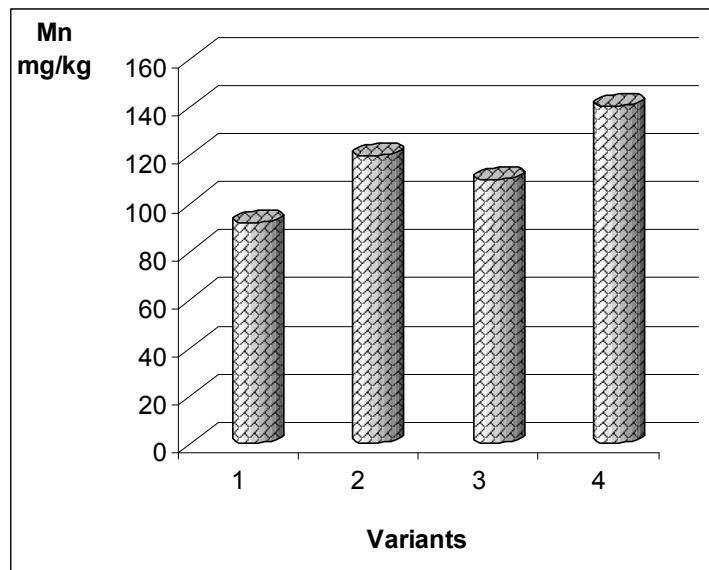


Figure 2. Content of Mn in leaf mass of eggplant in mixed fertilization (soil and leaf);

Variants: 1 – $N_{24}P_{12}K_{12}$ + Hortigrow

2 – $N_{24}P_{12}K_{12}$ + Agroleaf

3 – $N_{24}P_{12}K_{12}$ + Fitona

4 – $N_{24}P_{12}K_{12}$ + Kristalon

CONCLUSION

A new extraction – spectrophotometric method for the determination of manganese with Methylene Blue in plant material was used. The method is simple and rapid with satisfactory results and good reproducibility.

Manganese is determined in leaf mass of eggplant under the influence of soil fertilization and leaf fertilization. The content of manganese is higher in leaf mass of eggplant in the treatment of plants with the leaf fertilizer Kristalon – 138.6 mg kg^{-1} Mn. By all means this is due to the fact that the leaf fertilizer Kristalon comprises in its composition 0.04% Mn.

The content of microelement manganese in leaf mass of eggplant was determined in mixed fertilization (soil and leaf). The experimental data show that the highest is the content of Mn 142.2 mg kg^{-1} in fertilization with $N_{24}P_{12}K_{12}$ and leaf fertilizer Kristalon.

REFERENCES

1. Sidorovitch E., G. Rupasova, J. Zubkova, V. Ignatenko, T. Kuharenik, The physiological fundamentals of plant nutrition, *Agrochemistry*, 6, 72 (1987).
2. Udintseva E., J. Hodorovski, A. Zulikova, The entering of Mn ⁵⁴ into plants from different soils, *Agrochemistry*, 9, 119 (1981).
3. Nicholas D., Minor mineral nutrients, *Ann. Rev. Plant Phisiol.*, 12 (1961).
4. Bergmann W., P. Neubert, *Pflanzendiagnose und Pflanzenanalyse*, Jena (1976).
5. Heintze S., Manganese deficiency in peas and other crops in relation to the availability of soil manganese, *J. Agr. Sci.*, 36 (1966).
6. Shkolnik M., Trace elements in life of the plants, Leningrad (1974).
7. Potatueva J., O. Tardjimanian, *Agrochemistry*, 4, 95 (1990).
8. Kadobayashi H, T. Nakamori, T. Yamaguchi, Y. Fujita, *Chemistry Letters*, 33, 5, 610 (2004).
9. Tarafder P., *Chem. Anal.* 49, 2, 251 (2004).
10. Shar G., *J. Chem. Soc. Pakistan*, 25, 1, 28 (2003).
11. Balogh I., *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 4, 709 (2003).
12. Alkan M., *J. Trace and Microprobe Tech.* 21, 3, 479 (2003).
13. Winkler W., *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 6, 934 (2003).
14. Biswas P., *J. Indian Chem. Soc.* 80, 3, 195 (2003).
15. Kostova D., A scientific conferense with an international partnership „Food Science, Engineering and Technologies 2010“, Plovdiv, Scientific Works, Vol. LVII, Issue 2, 124 – 129 (2010).
16. Vazhenin I., Methods for Determination of Trace Elements in Soils, Plants and Waters, Kolos, Moscow (1974).
17. Sandell E., Colorimetric determination of Traces of Metals, 3rd Ed., Inter-science, New York (1959).

VIBRATION SPECTRA OF 2-[(TRICHLOROACETYL) AMINO]BENZAMIDE AND A PARTIAL ASSIGNMENT OF THE VIBRATIONAL BANDS

P.N. Penchev and J. S. Petrov

*University of Plovdiv, Chemical Faculty, 24 Tsar Assen St., 4000 Plovdiv;
plamen@uni-plovdiv.bg; petrov@uni-plovdiv.bg*

ABSTRACT

The FTIR Absorbance, FTIR ATR, DRIFT and Raman spectra of 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide have been registered in solid state at resolution of 1 cm^{-1} . Quantum chemistry calculations were performed by using the Gaussian 98, Revision A.7. For the geometry optimization and vibrational spectra prediction the B3LYP density functional with 6-31G(d) basis set was used. A partial assignments of vibrational bands is given. FTIR Absorbance, FTIR ATR, DRIFT and Raman spectra of 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide **1** are given as a Supplementary Material in JCAMP-DX format, version 4.24.

Keywords: FTIR; Raman Spectroscopy; 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide

INTRODUCTION

Number of representatives of 2,4(1H,3H)-quinazolinediones have shown a wide spectrum of biological activities. Developed by us method for the synthesis of 3-substituted 2,4(1H,3H)-quinazolinediones includes intramolecular cyclization of 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamides [1]. In the course of elucidation of this interaction, a necessity of study arises concerning the influence of N-(un)substituted benzamido group on the proceeding of the reaction. For this purpose an appropriate for investigation chemical structure is 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide.

EXPERIMENTAL

The FTIR Absorbance, FTIR ATR, DRIFT and Raman spectra of 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide **1** have been registered in solid phase at resolution of 1 cm^{-1} . The three types of IR spectra were recorded on a VERTEX 70 (Bruker, Germany). The used ATR accessory is MIRacleTM (ZnSe crystal, produced by PIKE Technologies, Inc), and the Diffuse Reflection Accessory is Praying MantisTM (produced by Harrick Scientific Products, Inc.). The Raman spectrum is measured on RAM II (Bruker, Germany) with a focused laser beam of 100 mW power of Nd: YAG laser (1064 nm).

Quantum chemistry calculations were performed by using the Gaussian 98, Revision A.7 [2]. For the geometry optimization and vibrational spectra prediction the B3LYP density functional with 6-31G(d) basis set was used.

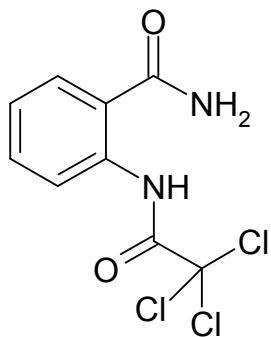


Figure 1. Chemical structure of **1**.

RESULTS AND DISCUSSION

The registered FTIR and Raman spectra are given in Fig. 2.

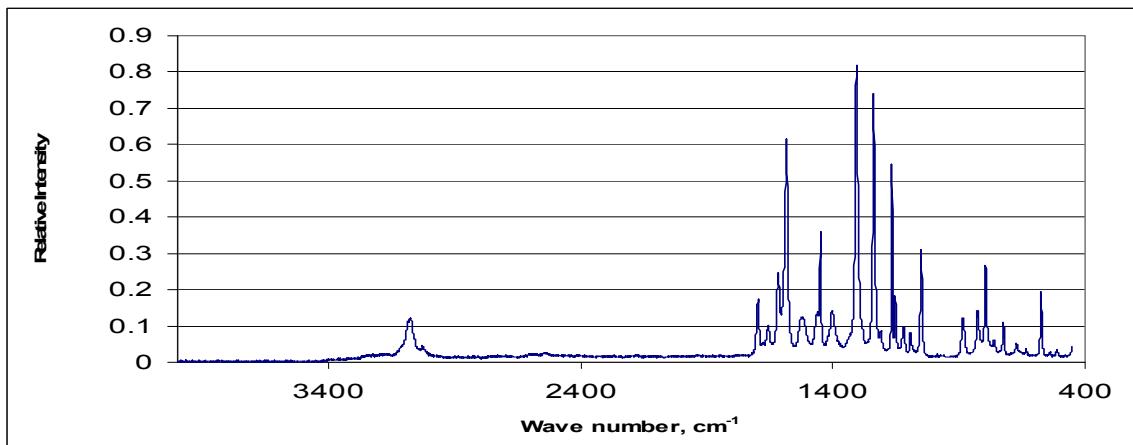
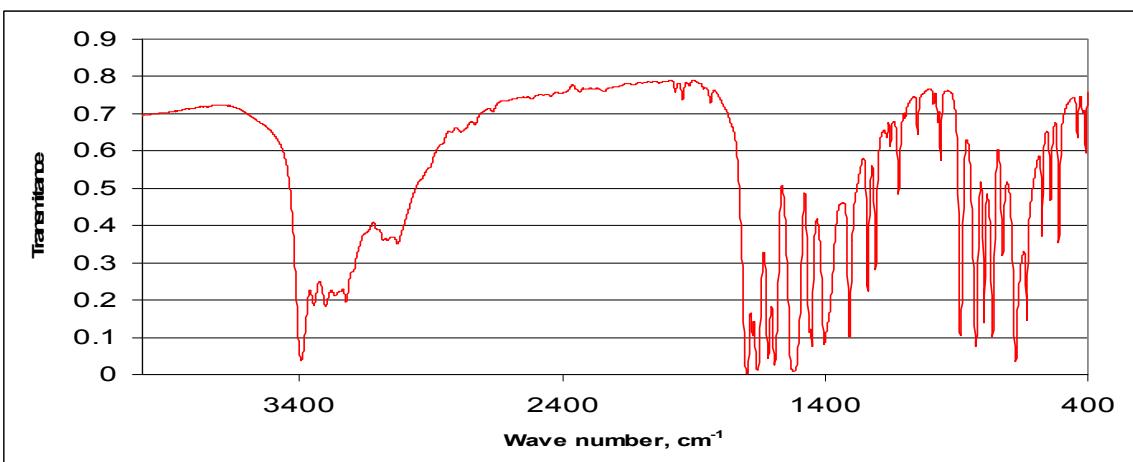


Figure 2. The infrared and Raman spectra of **1**.

The comparison of vibrational spectra of **1** with those of N-(4-chlorobenzyl)-2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide and the performed quantum chemistry calculations permit an assignment for some of the spectral bands of **1**. The proposed assignments are the following: valence $\nu_{as}(\text{NH}_2) = 3395 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_s(\text{NH}_2) = 3302 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{NH}) = 3224 \text{ cm}^{-1}$. Stretching C-H vibrations in benzene ring are 3106 cm^{-1} , 3084 cm^{-1} , 3067 cm^{-1} and 3028 cm^{-1} . Stretching carbonyl vibrations are 1698 cm^{-1} (trichloroacetamido group) and 1657 cm^{-1} . Benzene ring vibrations are: 1584 cm^{-1} (8a) 1307 cm^{-1} (14) and 1048 cm^{-1} (18a), and C-H out-of-plane bending of the benzene ring is at 763 cm^{-1} (ortho substituted benzene).

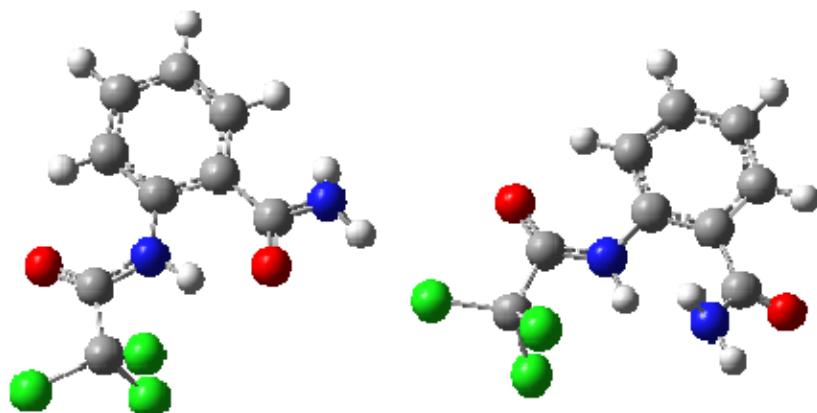


Figure 3. The conformers of **1** optimized by quantum chemistry calculations.

There appear 5 bands and a shoulder in the N-H stretching region of the IR spectrum. The quantum chemical calculations show the existence of two stable conformers – one with a hydrogen bond between N-H and C=O, the other with a hydrogen bond between N-H and the nitrogen of the NH₂, see Fig.3. The three bands given above correspond to the second structure. The position of the others is 3347 cm^{-1} , 3266 cm^{-1} and 3195 cm^{-1} (shoulder). The weak band at 1677 cm^{-1} supports the presence of a second conformer: it can be assigned to the C=O stretching mode of benzamido group.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

FTIR Absorbance, FTIR ATR, DRIFT and Raman spectra of 2-[(trichloroacetyl)amino]benzamide **1** are given as a Supplementary Material in JCAMP-DX format, version 4.24 at <http://www.kosnos.com/spectroscopy/iris>.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support by the University of Plovdiv Research Fund (Project RNI 09-HF-002). We are grateful to Prof. George Andreev for useful discussion and comments on this manuscript.

REFERENCES

1. Petrov J. S., Andreev G. N.; Synthesis of 2,4(1*H*,3*H*)-quinazolinedione and 3-substituted 2,4(1*H*,3*H*)-quinazolinediones. *Org. Prep. Proced. Int.*, 37 (2005) 560-565.
2. Gaussian 98, Revision A.7, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.

COMPARATIVE SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF THIN FILMS AND TARGETS FROM NLO MATERIALS DEPOSITED BY PULSED LASER DEPOSITION

P. Penchev¹, R. Bakalska¹, S. Sotirov², M. Todorova¹, V. Serbezov²

¹*University of Plovdiv, Chemical Faculty, 24 Tsar Assen St., 4000 Plovdiv,*

²*University of Plovdiv, Dept. of Experimental Physics, Faculty of Physics
office@biocoats.com*

ABSTRACT

Organic dyes such as styrylquinolinium salts are new promising materials for photonic applications. Comparative FTIR spectroscopic analysis on thin films and targets from three new organic compounds, *i. e.* E-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-vinyl)-1-octylquinolinium iodide (**1**), (E)-1-ethyl-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)-vinyl)quinolinium bromide (**2**), and 4-{(E)-2-[4-(dimethylamino)naphthalen-1-yl]-ethenyl}-1-methylquinolinium iodide (**3**) deposited by means of Pulsed Laser Deposition (PLD) technique using high power UV Nitrogen laser are described. The thin films are deposited on substrates KBr, 316L SS alloy and aluminium foil. The organic materials are synthesized by Knoevenagel condensation. The thickness of the deposited films ranges from 80 to 300 nm as measured by interferometric method. The targets are formed by a moulding press. Characterization of the films and targets by FTIR spectroscopy showed a small difference between the deposited films and the native materials/targets, and their structure and composition depend on technological parameters.

Keywords: FTIR, Organic Non-linear Optic Dyes, Pulsed Laser Deposition

INTRODUCTION

Organic non-linear optical (NLO) materials vary from polymers to molecular crystals to liquid crystals to organometallic compounds and new hybrid organic/inorganic nanocomposites. Organic NLO devices usually are used as bulk or as thin films structures. Thin films of organic NLO dyes are extremely useful for creating of a surface for photonics applications that can be used as fast optical switches, modulators, devices for frequency mixing processes, sensors, integrated optical circuits for telecommunication and medium for optical computing [1,2]. Relatively low-cost preparation of organic NLO dyes, as well as their active optical properties have stimulated researcher for studying and synthesis of new organic NLO dyes. The styryl dyes with quinoline nucleus were applied to various sensitive materials such as sensitizers or desensitizers formerly. With the development of new technologies the

researchers have found a new application of styrylquinoline dyes to electroluminescence and photochromism [3,4] as well as in the field of medication [5,6].

Classical technologies for deposition these materials as thin films are deep coatings, spin coatings, Langmuir–Blogett method, Molecular Beam Epitaxy and drop-casting technique [7-9]. Advantages and disadvantages are both intrinsic for such of techniques. One disadvantage is the impossibility to deposit thin films with homogeneous and smooth surface without substantial damage of various substrates such as metals, ceramics and organics.

The aim of this work is to study the chemical composition of the surface of the substrates and targets obtained by Pulsed Laser Deposition technique used for preparation of thin films onto KBr, 316L SS alloy and aluminium foil substrates composed by new styrylquinolinium dyes with larger conjugated systems (naphthalene tail with different electron donor group). Comparative FTIR spectroscopic analysis were done for investigation the congruence between chemical structures of thin films and the targets of native material.

EXPERIMENTAL DETAILS

1. NLO organic dyes synthesis

The styrylquinolinium dyes (1) – (3) were synthesized by Knoevenagel condensation of 4-hydroxy- or 4-N,N-dimethylaminonaphthaldehyde and the respective quaternary lepidinium salts in the presence of basic catalyst piperidine. Fig.1 shows the chemical structure of the investigated compounds. The synthesis of merocyanine dyes (1) – (3) was described in ref. [10]. Polycrystalline samples of dyes (1) – (3) suitable for deposition by the PLD technique were obtained after recrystallization from methanol. The synthesized dyes (1) – (3) and their structures and purity were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and UV–Vis spectroscopies, elemental analysis and melting points [10]. The melting points for the target dyes were sharp which indicates a high level of purity and a crystalline phase of the resulting salts.

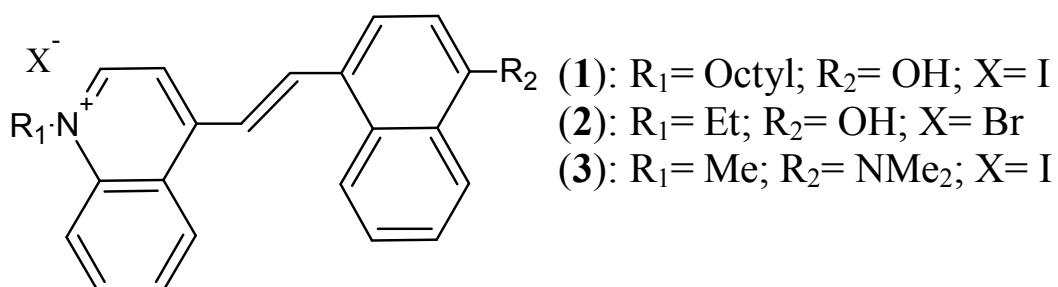


Figure 1. Chemical structure of the investigated compounds.

2. Pulsed Laser Deposition of NLO organic dyes

Experimental setup used for the thin films deposition is typical for PLD technique and is similar with that described beforehand [11]. The organic NLO thin films were deposited in vacuum of 10^{-3} to 10^{-5} Torr produced by a standard rotary pump and diffusion pump. Lambda Physic EMG 102 laser is used as UV TEA N_2

laser with energy per pulse up to 8 mJ, pulse duration 6 ns and repetition rate up to 120 Hz. The angle between focusing laser beam and target is 45°. Short focus of 60 mm meniscus quartz lens were used for focusing laser beam. The distance Substrate–Target (S-T) was varied from 2 cm to 8 cm. The dimensions of substrates for KBr, SS316 L and aluminum foil vary from 2 cm² to several dm². The usual distance S-T was 4.5 cm. The target holders is rotated by high speed mini motors mounted inside of vacuum chamber. The single Target is mounted on a regulated high speed motor (up to 3000 rev/s). The Target material consists of one of the styrylquinolinium dyes (**1**) – (**3**) for coatings. The Target diameter is 12 mm. The laser beam area at the focus is typically 2×10^{-3} cm² to 2×10^{-2} cm² and typical laser energy density (so called *fluence*) vary from 3.5 J/cm² to 0.35 J/cm². The typical repetition rate of laser pulses is 20 Hz. The rate of coatings' growth at this laser parameters is 0.1 – 0.2 nm/s. The vacuum chamber has been cleaned by means of argon plasma before any deposition process. The experiments were carried out at room temperature.

3. Spectral Measurements

Transmittance and Attenuated Total Reflection (ATR) Fourier Transform Infrared IR spectra were recorded with an IR spectrophotometer VERTEX 70 FT-IR spectrometer (Bruker Optics). The used ATR accessory is MIRacle™ with a one-reflection ZnSe element (Pike). Thin films onto KBr plate were analyzed with absorbance spectra and the depositions onto 316L SS alloy and aluminium foil by ATR spectra.

RESULTS AND DISCUSSION

The spectral analysis of the materials deposited by means of PLD on various substrates is based on comparison of the spectral bands of the obtained thin films with those of the native materials in a region where most of the uncharacteristic fundamental vibrations appear. For this study the 1700 – 600 cm⁻¹ spectral interval is selected as it includes the finger print region and the area of the aromatic ring vibration. The spectral analysis will be illustrated with the detail comparison of two spectra of merocyanine dye (**1**).

The 1700–600 cm⁻¹ region of the IR spectrum of dye (**1**) deposited onto KBr plate is shown in Fig. 2 together with the spectrum of a drop of dye (**1**) methanol solution dried onto AgCl plate. It can be seen that the two spectral curves look pretty similar and the bands of dye (**1**) at 1559 cm⁻¹, 1340 cm⁻¹, 1278 cm⁻¹ and 957 cm⁻¹ are preserved in the spectrum of the thin film. On the other side, some of the bands are shifted up to 10 cm⁻¹ which is to be expected as the compound is embedded into the crystal structure of KBr. The strong bands of this type are 1225 cm⁻¹ (shifted to 1216 cm⁻¹) and 750 cm⁻¹ (shifted to 760 cm⁻¹). The interaction of the deposited dye with the substrate is also a reason for widening of most of the bands. In this case two or three bands close in the compounds spectrum can appear as one (usually unsymmetrical) band in the thin film spectrum. In Fig. 2 these are 1595 cm⁻¹ and 1559 cm⁻¹ couple, 1363 cm⁻¹ and 1340 cm⁻¹ couple and 771 cm⁻¹, 761 cm⁻¹ and 750 cm⁻¹ triad.

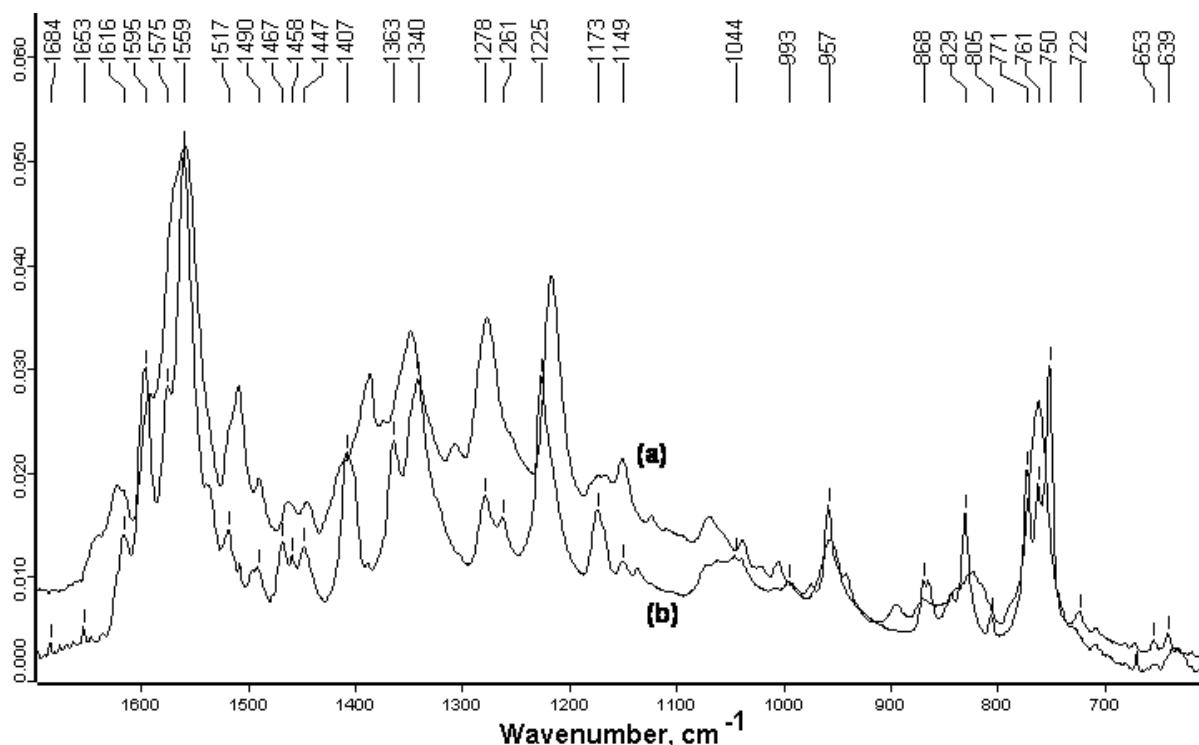


Figure 2. IR Absorbance spectra of dye (**1**); (a) is the spectrum of thin film (the substrate is a KBr plate), and (b) –that of a drop of dye (**1**)'s methanol solution dried onto AgCl plate.

There are two bands in the spectrum of the deposited compound that cannot be explained as a result of deposition – these are the strong 1508 cm^{-1} band and the 1149 cm^{-1} band. The only explanation is that a partial degradation of the deposited compound happens.

As a whole, the high laser fluence (3.5 J/cm^2) used for dye (**1**) deposition had not decomposed heavily the target material. The high fluence shortened the deposition process thus decreasing its cost but it appeared inappropriate for the two other dyes. Thin films of Dye (**2**) and Dye (**3**) deposited on all types of substrates by this high fluence have FTIR spectra which include bands not present in the target compound and which cannot be explained with the peak's shift discussed above. That is why, the laser fluence was reduced to 0.35 J/cm^2 and the FTIR spectra of the newly obtained thin films were registered and analyzed in a manner described above.

It appeared that the substrate did not influence the quality (expressed mainly as an absence of chemical degradation) of the deposited material and the only factors which determine the dye's chemical degradation by the deposition process are the laser fluence and the chemical structure of the dye. The relation between dye's chemical structure and the decomposition rate cannot be comprehended using only our data and is a matter of future studies.

In Table 1 the quality of the deposited materials is given. Usually, several spots in the deposited thin film were measured and it appeared that they had given similar FTIR spectra.

Table 1. The chemical quality of the obtained thin films of dyes (1) – (3).

Target	Substrate	Laser fluence [J/cm ²]	Thin film spectroscopic characterization
Dye (1)	KBr 316L SS alloy aluminium foil	3.5	Material is deposited with a little decomposition of dye (1)
Dye (2)	KBr 316L SS alloy aluminium foil KBr	3.5	Material is deposited with a partial decomposition of dye (2)
Dye (2)	316L SS alloy aluminium foil KBr	0.35	Deposited material is virtually not chemically changed
Dye (3)	316L SS alloy aluminium foil	3.5	Material is deposited with a vast decomposition of dye (3)
Dye (3)	KBr 316L SS alloy aluminium foil	0.35	Material is deposited with a little decomposition of dye (3)

CONCLUSIONS

We have successfully demonstrated the application of PLD method using high power TEA N₂ laser ($\lambda = 337.1$ nm) for deposition of thin films of new styrylquinolinium dyes with larger conjugated systems and molecular weight from 300–550 g/mol. The pressed micro crystals targets from complex organic NLO dyes are suitable for PLD process at vacuum in range 10⁻² mbar to 10⁻³ mbar. Despite the fact, that the higher laser fluence is more costly efficient, it is better to use mild laser fluence in order to avoid target decomposition. As future experiments we need more detailed analysis concerning the UV laser beam interaction with organic target. This first successful study of new laser deposition conditions allow the possibilities for the processing of new class nanocomposites as styrylquinolinium dyes - inorganic nanocoatings with large photonics applications.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support by the University of Plovdiv Research Fund (Project RNI 09-HF-002). All experiments of PLD were done with a kind cooperation of MultiCoats Ltd. (<http://www.biocoats.com>).

REFERENCES

1. Chemla, D.S., J. Zyss, Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals, Academic Press, Ontario, (1987).
2. Trager, F. (Ed.), Handbook of Lasers and Optics, Springer Science&Business Media, LLC New York, (2007).
3. Makoto M., T. Hisato, T. Hiromitsu, W. Osamu, M. Tomohiko, T. Seiji, Jpn Kokai Tokkyo Koho Jpn, 260, 566 (2000) [Chem. Abstr. (2000), 133, 244894].
4. Spalletti A., *Photochem. Photobiol. Sci.* 3(7), 695-699, (2004).
5. Burdujan R., J. d'Angelo, D. Desmaele, F. Zouhiri, P. Tauc, J.-C. Brochon, C. Auclair, J.-F. Mouscadet, P. Pernot, F. Tfibel, M. Enescu, M.-P. Fontaine-Aupart, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, 3797-3804, (2001).
6. Wang, M., M. Gao, K. D. Miller, G. W. Sledge, G. D. Hutchins, Q-H. Zheng, *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2300-2306, (2009).
7. Pitt, C. W., *J. Non-Cryst. Solids*, 47, 159-162, (1983).
8. Sanches, C., B. Lebeau, F. Chaput, J. P. Boilot, *Adv. Mater.*, 15, 1969-1994, (2003).
9. Quintel, A., F. Budde, P. Rechsteiner, K. Thoma, A. Zayatsb. J. Hulliger, *J. Mater. Chem.*, 10, 27-30, (2000).
10. Bakalska, R., M. Todorova, T. Kolev, Synthesis of new merocyanine dyes as potential NLO materials, 8^{-TH} Scientific chemical conference of University of Plovdiv, 18-19 june 2010, Koprivchtitsa.
11. Serbezov,V., St. Benacka, D. Hadgiev, P. Atanasov, N. Elektronov, V. Smatko, V. Stribik, N. Vassilev, *J. Appl. Phys.* 67, 6953 -6957, (1990).

OPTICAL AND AFM MICROSCOPY STUDYING OF THIN NLO ORGANIC FILMS DEPOSITED BY PULSED LASER DEPOSITION

*M. Draganov¹, R. Bakalska², S. Sotirov³, E. Penchev³,
M. Todorova², V. Serbezov³*

¹University of Plovdiv, Department of Developmental Biology

²University of Plovdiv, Department of Organic Chemistry

*³University of Plovdiv, Department of Experimental Physics, 24 Tzar Assen,
4000 Plovdiv, office@biocoats.com*

ABSTRACT

Bright field microscopy, Fluorescence microscopy and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis of thin films from styrylquinolinium salts deposited by means of Pulsed Laser Deposition (PLD) technique, using high power UV Nitrogen laser are described. The thin films are deposited onto substrates from KBr, 316L SS alloy, optical glass and aluminium foil. The organic dyes: E-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)vinyl)-1-octylquinolinium iodide (**1**), (E)-1-ethyl-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)vinyl)quinolinium bromide (**2**), and 4-{(E)-2-[4-(dimethylamino)naphthalen-1-yl]ethenyl}-1-methylquinolinium iodide (**3**) are synthesized by Knoevenagel condensation. The thickness of the deposited films ranges between 80 – 300 nm, measured by interferometric method. Morphology and topology of deposited thin films in accordance with technological regimes and the type of substrates are discussed.

Keywords: Bright field microscopy, Fluorescence microscopy, AFM, morphology, PLD.

INTRODUCTION

Organic Non Linear Optical (NLO) thin films with preliminary designed properties and structure are very attractive in recent years for applications in various fields of science and industry including optoelectronics, lasers, optical recording and processing and sensors. The phenomena of Nonlinear Optics can be summarized as strongly interaction of electromagnetic field of laser light with the materials and observation of qualitative alteration in the propagation properties of the incoming light, such as frequency, phase and polarization. This applications of organic NLO materials as thin film, require high quality of the obtained films in relation to their functionality and their morphology (well-ordered films consisting of molecules of organic compounds with preliminary designed properties), topology, homogeneity (carefully aligned to each other and onto substrate) and thickness uniformity. The films have to

exhibit high stability without mechanical, thermal and chemical stress including solvent exposure and good adhesion onto substrate. Thin films of complex organic materials have been processed by means of conventional non-vacuum techniques, such as dip coating, spin coating, spray coating, electrochemical deposition, Langmuir–Blogett method usually and vacuum methods such as electron beam evaporation, thermally assisted vacuum evaporation, organic molecular beam epitaxy [1-4]. The preparation of thin films from single bulk complex organic target– polymers was first shown by Hansen and Robitaille in 1988 [5]. Recently developed laser based methods, such as Pulsed Laser Deposition (PLD) and Matrix Assisted Laser Evaporation (MA-PLE) showed good results for deposition complex organic materials, including polymers, biopolymers, proteins and living cells, also [6,7].

Three new organic compounds, from merocyanine dyes group E-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)vinyl)-1-octylquinolinium iodide (**1**), (E)-1-ethyl-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)vinyl)quinolinium bromide (**2**), and 4-{(E)-2-[4-(dimethylamino)naphthalen-1-yl]ethenyl}-1-methylquinolinium iodide (**3**) have been synthesized by means of Knoevenagel condensation. The styrylquinolinium dyes with larger conjugated systems (naphthalene tail with different electron donor group) showed big potential as NLO materials [8].

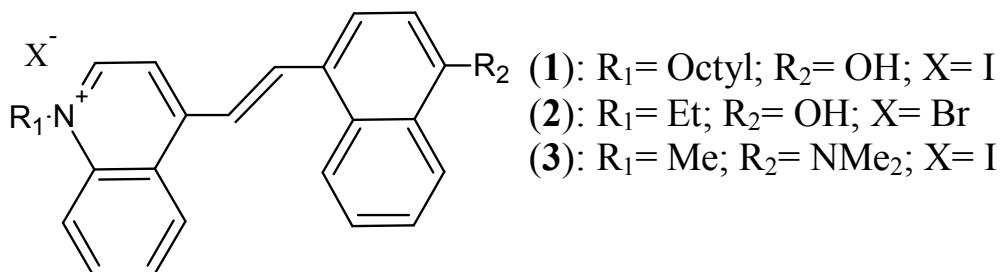


Figure 1. Chemical structure of the investigated compounds

The present work focuses on study by means of optical, optical fluorescent and AFM the ability of PLD to provide thin films from this new styrylquinolinium dyes with good quality in respect to their potential applications as NLO organic materials on different type of substrates.

EXPERIMENTAL

Pulsed Laser Deposition of NLO organic dyes

The experimental set-up used for thin films deposition is typical for PLD technique and is similar with [9]. The technological parameters of process deposition, by means of high power UV N₂ laser onto substrates from KBr, NaCl mono crystals, 316L SS alloy, optical glass – K5 and Al foil are described in [10]. The laser energy density has been selected from 350 mJ/cm² to 3.5 J/cm² in accordance with absorption spectrum spectra and chemical structures of deposited dyes. All experiments have been carried out at room temperature and vacuum of 10⁻³ mbar. The substrates have been cleaned in an ultrasound bath with pure acetone and ethanol, before deposition process and dried by means of technical nitrogen. The single bulk dyes targets

have been prepared with the aid of hydraulic press – (Perkins Elmer with diameter 1.2 cm and thickness from 0.3 cm to 0.5 cm). The choice of substrates is in accordance with the possible applications in field of NLO devices, as fast optical switches in waveguides systems, SGH (second generation harmonic) devices for lasers, rapid optical deflectors and as well as for the future developments of new organic/inorganic optical nanocomposites.

Bright field and Fluorescence microscopy measurements

An optical study was performed by means of Bright field/ Fluorescence microscopy Nikon Eclipse 80i with maximum magnification 400X and four standard filters, in the case of Fluorescent mode. Each Nikon triple band fluorescence set is optimized for use with DAPI [Ex (excitation filter) 340-380; DM (dichroic mirror) 400; BA (barrier filter) 435-485] and FITC (Ex 465-495; DM 505; BA 515-555) in combination with either TRITC (Ex 540/25; DM 565; BA 605/55) or Texas Red (Ex 540-580; DM 595; BA 600-660) probes. The microscopic images were performed by DS Camera Control Unit DS-U2 and DS camera Head DS-Fi 1 with use of imaging software NIS-Elements F 2.30.

AFM measurements

AFM study in the present work was performed by means of Veeco DI Nanoscope MultiMode V system (contact mode) with scan size: 10 μm x 10 μm along XY axis and vertical range Z axis – of 2.5 μm .

RESULTS AND DISCUSSION

An optical and optical fluorescent study was performed of thin films of the investigated new styrylquinolinium dyes (1) – (3) deposited onto substrates from KBr, 316L SS alloy, optical glass and aluminum foil.

The surface quality of dye (1), as thin film with thickness 180 nm onto samples from stainless steel 316L are shown on Fig.2.

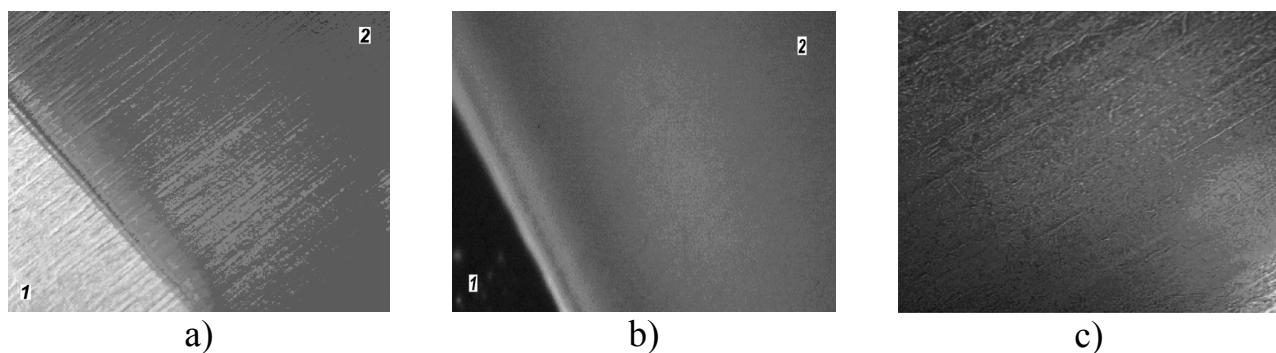


Figure 2. Bright field and fluorescence micrographs of dye (1) as thin film onto samples from stainless steel 316L: a) 100X; b) 200X by filter Texas Red; c) 200X by filter DAPI.

On the micrographs with digit 1 was marked the substrate, with 2 – thin film.

The images showed a very good homogeneity of thin films on surface area of 6 cm² without defects and any cracks. The surface quality of dye (2) as thin films with a thickness of 260 nm onto samples – substrates from KBr mono crystals are shown on Fig.3.

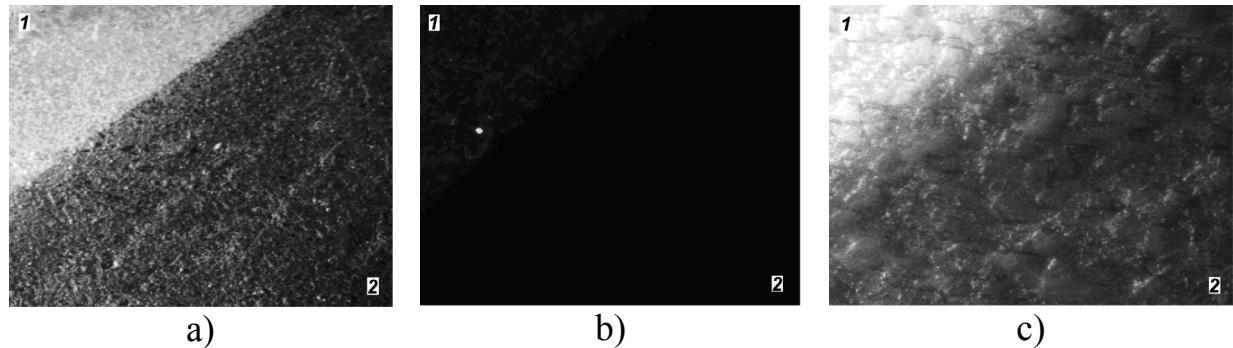


Figure 3. Bright field and fluorescence micrographs of dye (2) as thin film onto substrate KBr; a) 100X; b) 200X by filter DAPI; c) 400X. On the micrographs with digit 1 was marked the substrate, with 2 – thin film.

The microscopy images from Fig.3 showed that the quality of thin films concerning topology and homogeneity followed surface quality of the substrates. The thickness of films is 150 nm.

Bright field and fluorescence images of dye (3) deposited on glass substrates are shown on Fig.4.

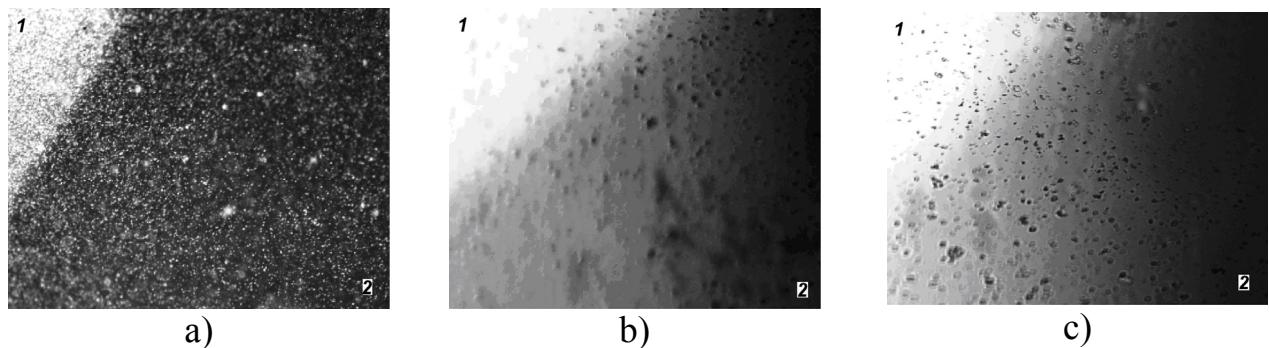


Figure 4. Bright field and fluorescence micrographs of dye (3) as thin films onto glass substrate; a) 40X; b) 100X; c) 200X. On the micrographs with digit 1 was marked the substrate, with 2 – thin film.

Thin films from dye (3) are with thickness of 85 nm and showed a good adhesion onto substrates. The films are transparent in the visible spectrum. The droplets onto surface of films which are typical for PLD methods are no observed.

AFM is exceptionally useful tool for studying surfaces because it may provide real volumetric film morphology and nanostructures. Fig.5 and Fig.6 show the ability of AFM to visualize and characterize surfaces of studying styrylquinolinium dyes – dye (1) deposited by means of PLD on glass substrates and aluminium foils with thickness 220 nm, respectively.

The surface topology showed a different mechanism of the growing of deposited films in relation to substrates nature. The film is extremely uniform with deviation no more than 20 nm for glass substrate. The film deposited onto aluminum foil showed a deviation more than 30 nm and priority preference for growing in vertical axis. The crystal structure of aluminum foil defines the direction of deposited film, most probably.

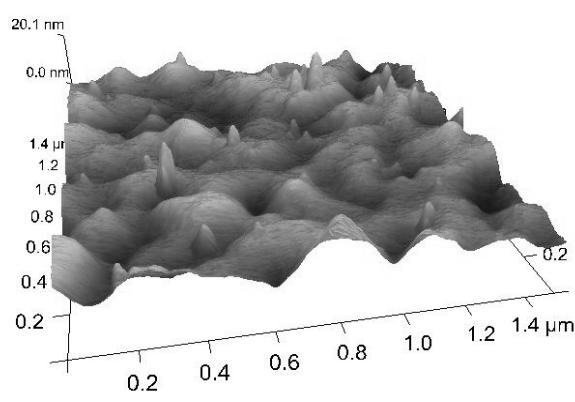


Figure 5. AFM 3D image of a surface of the thin film of dye (1) deposited by means of PLD on glass substrates

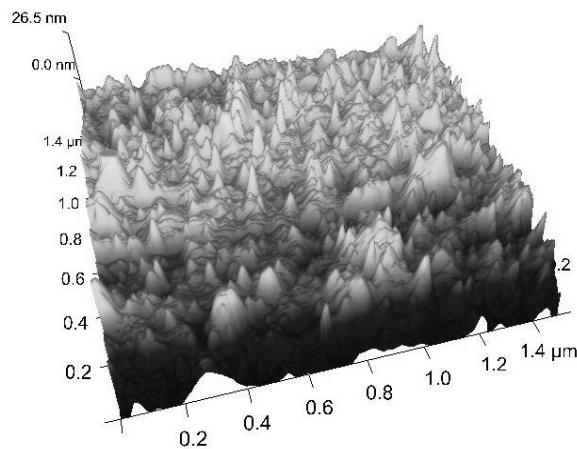


Figure 6. AFM 3D image of a surface of the thin film of dye (1) deposited by means of PLD on aluminium foils

X and Y axes are graduated in μm and show the area of the scanned sample. Z axis is graduated in nm and shows the roughness of the sample.

CONCLUSION

We have demonstrated successful deposition of thin films from styrylquinolinium dyes with larger conjugated systems by means of PLD technique using high power UV N_2 laser. The films are in highly ordered and uniform morphology with layered structure in which the organic molecules stand nearly vertical in the case of metal (aluminum foil) substrates and planar for in the case of dielectric substrates, such as optical glass and mono crystals from KBr and NaCl. The films are homogeneous and without any cracks and droplets on the surfaces. The laser energy density used in this work varies from 350 mJ/cm^2 to 3.5 J/cm^2 and laser repetition rate up to 20 Hz, respectively. The pressed micro crystal targets from complex organic NLO dyes are suitable for a PLD process at vacuum conditions in range 10^{-2} mbar to 10^{-3} mbar , as well. The films are amorphous and their surface morphology is characterized by small particles (with a dimensions about 20 – 30 nm) and roughness not more than 40 nm which is still enough and compatible for NLO applications. These first studies of the new deposition conditions have allowed for a future preparation of films with preliminary determinate properties and opened interesting possibilities to compose new styrylquinolinium dyes – inorganic nanocomposites for direct photonics applications.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the financial support by the University of Plovdiv Research Fund. All experiments of PLD were done by kind cooperation of MultiCoats Ltd. Bulgaria (www.biocoats.com).

REFERENCES

1. Robert Eason (Ed) „Pulsed Laser Deposition of thin films“, Willy&Sons Inc. Publication, New Jersey, US, 2007...
2. Pitt, C. W., *J. Non-Cryst. Solids*, 47, 159-162 (1983).
3. Sanches, C., B. Lebeau, F. Chaput, J. P. Boilot, *Adv. Mater.*, 15, 1969-1994 (2003).
4. Quintel, A., F. Budde, P. Rechsteiner, K. Thoma, A. Zayatsb. J. Hulliger, *J. Mater. Chem.*, 10, 27-30 (2000).
5. Hansen, S. G., T. E. Robitaille, *Appl. Phys. Lett.*, 52, 81 (1988).
6. Nishio, S., T. Chiba, A. Matsuzaki, H. Sato, *J. Appl. Phys.*, 79, 7198 (1996).
7. Fitz-Gerals, J. M., G. Jennings, R. Jonson, C. L. Fraser, *Appl. Phys. A, Materials Science&Processing*, 80, 1109 (2005).
8. Bakalska, R., M. Todorova, T. Kolev, Synthesis of new merocyanine dyes as potential NLO materials, 8TH Scientific chemical conference of University of Plovdiv, 18-19 June 2010, Koprivchtitsa (to be published).
9. Serbezov,V., St. Benacka, D. Hadgiev, P. Atanasov, N. Elektronov, V. Smatko, V. Stribik, N. Vassilev, *J. Appl. Phys.* 67, 6953–6957 (1990).
10. Penchev, P., R. Bakalska, M.Todorova, S. Sotirov, V. Serbezov, „Comparative spectroscopic analysis of thin films and targets from NLO materials deposited by PLD“, 8-th Scientific chemical conference of University of Plovdiv, 18–19 June 2010, Koprivchtitsa (to be published).

RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF SOME NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Vessela Kancheva, Adriana Slavova-Kazakova

*"Laboratory Lipid Chemistry, Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia 1113, Bulgaria;
E-mail: vedeka@abv.bg*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the capacity of 12 new synthesized biologically active compounds from colleagues of the New Delhi University, India, with anti-inflammatory and anticancer activity, as radical scavengers. These compounds are: (1) 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one; (2) 6,7,-dihydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one; (3) 7,8-dihydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one; (4) ethyl-3-(7,8-dihydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl) propanoate; (5) ethyl-3-(6,7-dihydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)propanoate; (6) 7,8-dihydroxy-4-methyl-2H-chroman-2-thione; (7) 5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-chroman-4-one; (8) 5-hydroxy-3,7,8-trimethoxy-2-methyl-4H-chromen-4-one; (9) 6-allyl-5,7-dihydroxy-2-methyl-4H-chromen-4-one; (10) (*E*)-3-(3-isopropoxybuta)-1,3-dienyl)benzene-1,2-diol; (11) 4-(3-methylbut-2-2nyl)-6-(prop-1-en-2-yl) benzene-1,3-diol; (12) 5-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-methylene-2H-chromen-7-ol. The quantitative evaluation of the compounds, i. e. radical scavenging activity (%RSA) was determined as %RSA=(Abs₍₀₎-Abs_(t)/Abs₍₀₎)x100,%. The study was made on physiological temperature (37°C) and the results obtained were compared with those of standard and known inhibitors: e.g. caffeic acid (CA), DL- α -tocopherol (TOH), gallic acid (GA) and butylated hydroxytoluene (BHT) at the same experimental conditions. Lipinski's Rule of Five was used for explaining their pharmacokinetic behavior.

Key words: radical scavenging activity, DPPH test, biologically active compounds, Lipinski's Rule of Five

INTRODUCTION

The human body is constantly subjected to a significant oxidation stress as a result of the disbalance between antioxidative protective systems and the formation of strong oxidizing substances, including free radicals [1]. Free radical formation process results in damage and death of cells, accelerates the aging and initiates many diseases, such as – cardio-vascular, cancer, Parkinson disease etc. [2]. In this respect the medical treatment of most of them includes formulations based on a combination of traditional drugs with targeted functionality and different antioxidants [3]. The activity of antioxidants depends on complex factors including: the nature of antioxidants, the conditions of oxidation, the properties of the oxidizing substrate and the stage of oxidation [4,5].

There are a lot of papers in the literature in which the authors discussed the antioxidant activity of studied compounds on the base of experimental data of radical scavenging activity towards DPPH radical. It must be noted that the radical scavenging activity differ significantly from the chain breaking antioxidant activity. Radical scavenging activity towards DPPH radical gives us only information about the H-donating capacity of the studied compounds and some preliminary information for their possibility to be used as antioxidants. The antioxidant activity is the capacity of the compound to short the oxidation chain length as a result of its reaction with peroxy radicals. For that reason we mean as antioxidant activity the chain breaking activity of the compounds.

The aim of this study was to determine the capacity of 12 new synthesized biologically active compounds from colleagues of the New Delhi University, India, with anti-inflammatory and anticancer activity, as radical scavengers. The quantitative evaluation of the compounds, i.e. radical scavenging activity (%RSA). The study was made on physiological temperature (37°C) and the results obtained were compared with those of standard and known inhibitors: e.g. caffeic acid (CA), DL- α -tocopherol (TOH), gallic acid (GA) and butylated hydroquinone (BHT) at the same experimental conditions. Lipinski's Rule of Five was used for explaining their pharmacokinetic behavior.

EXPERIMENTAL

Standard antioxidants: DL- α -Tocopherol (TOH), butylated hydroxytoluene (BHT), caffeic acid (CA) and gallic acid (GA) were obtained from E. Merck (Darmstadt, Germany). New biologically active compounds were synthesized and characterized from our colleagues of New Delhi University, India according to [6]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (approximately 90%) was from Sigma Chemical Co. Solvents used were with a highest quality (HPLC grade) available from Merck (Darmstadt, Germany).

Estimation of radical scavenging activity (%RSA) by rapid DPPH radical test The radical scavenging activity (%RSA) of phenolic compounds (AH) under study was based on the rapid DPPH test of Nenadis and Tsirimou [7]. We used acetone as solvent according to Yordanov [8] and Kancheva *et al.* [9]. The decrease in the absorption at 516-517nm of the DPPH radical solution in acetone after addition of the AH was measured in a glass cuvette (1cm long), automatically. The UV-Vis spectral measurements were performed on Perkin Elmer Lambda 16 UV-Vis spectrophotometer, equipped with a HAAKE FE 2 thermostat (precision 1°C). Kinetics of the absorbance decrease was monitored at a concentration expressed as the number of antioxidant moles per mole of DPPH ($[\text{AH}]/[\text{DPPH}] = 0.25$) during 20 minutes after starting time ($t = 0\text{min}$). The activity of all studied compounds to scavenge free radicals (DPPH) was obtained as percent radical scavenging activity (%RSA). The latest was calculated from the absorbance at the start (0) and after some reaction time (t) and expressed as

$$\% \text{RSA} = [\text{Abs}_{(0)} - \text{Abs}_{(t)} / \text{Abs}_{(0)}] \times 100, \% \quad (1)$$

Absorbance values were corrected for radical decay using blank solutions. All tests were performed in duplicate at 37°C .

Lipinski's Rule of Five

Lipinski's rule [10-12] says that, in general, an orally active drug has no more than one violation of the following criteria:

- ✓ No more than 5 hydrogen bond donators (nitrogen or oxygen atoms with one or more hydrogen atoms)
- ✓ No more than 10 hydrogen bond acceptors (nitrogen or oxygen atoms)
- ✓ A molecular weight under 500 dalton
- ✓ An octanol-water partition coefficient, log P of less than 5

To evaluate the drug-likeness better, the rules have spawned many extensions, for example one from a study by Ghose *et al.* in the year 1999 [10]:

- ✓ Partition coefficient, log P in -0.4 to +5.6 range
- ✓ Molar refractivity from 40 to 130
- ✓ Molecular weight from 160 to 480 dalton
- ✓ Number of atoms from 20 to 70.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 presents structure of all new compounds and standard antioxidants in this study.

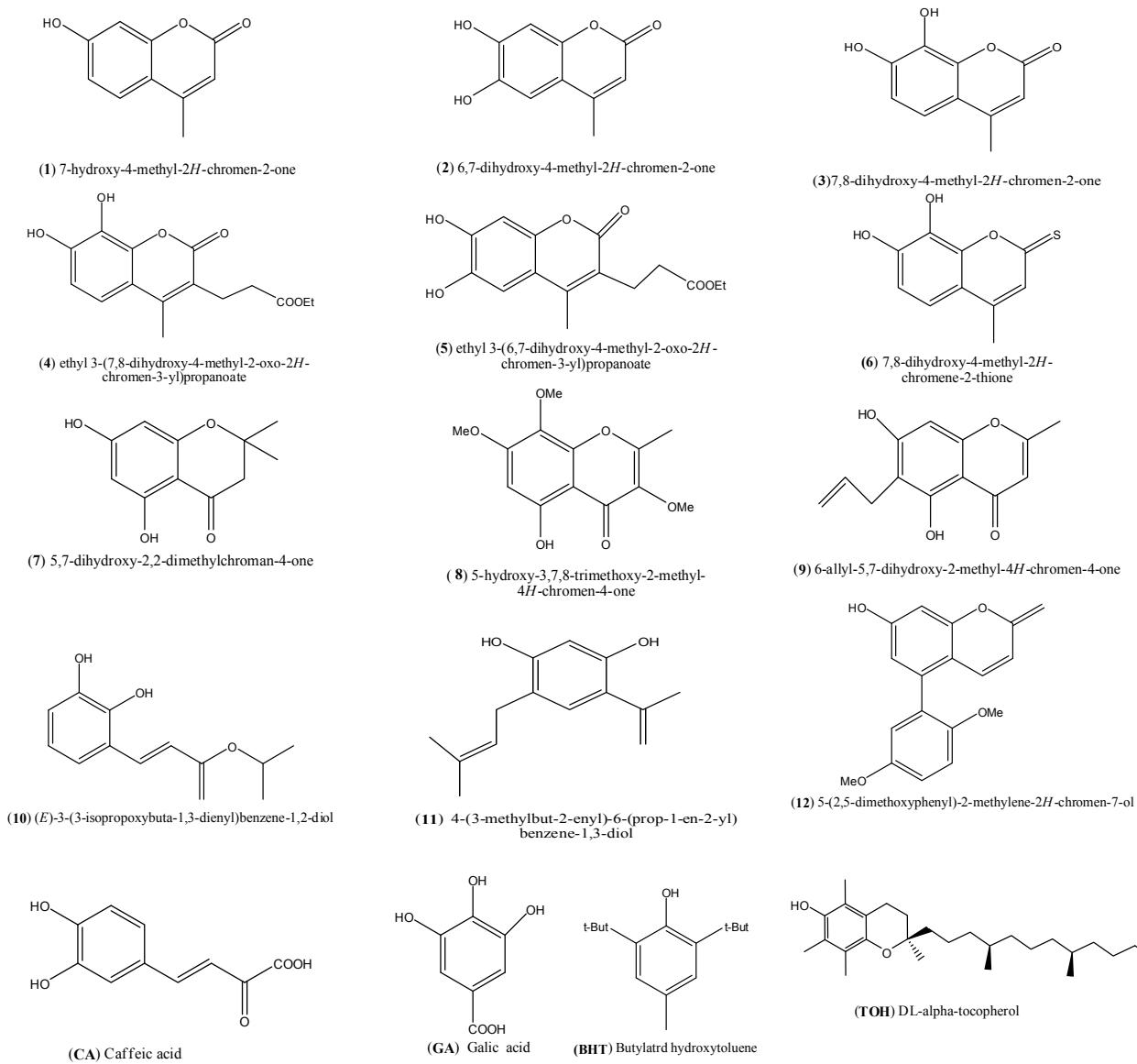


Figure 1. Structures of new biologically active compounds (1-12) and of standard antioxidant: CA, GA, BHT, TOH

Radical scavenging activity (%RSA) of new biologically active compounds

DPPH rapid test gives information about the H - donating capacity of the phenolic compounds towards free (DPPH) radicals:



It must be noted that it is not an antioxidant activity, only antiradical activity.

Comparable analysis for the radical scavenging activity (%RSA) of new compounds and standard antioxidants

Radical scavenging activity as %RSA was calculated according equation (1) and for all studied compounds and standard antioxidants are shown at Figure 2.

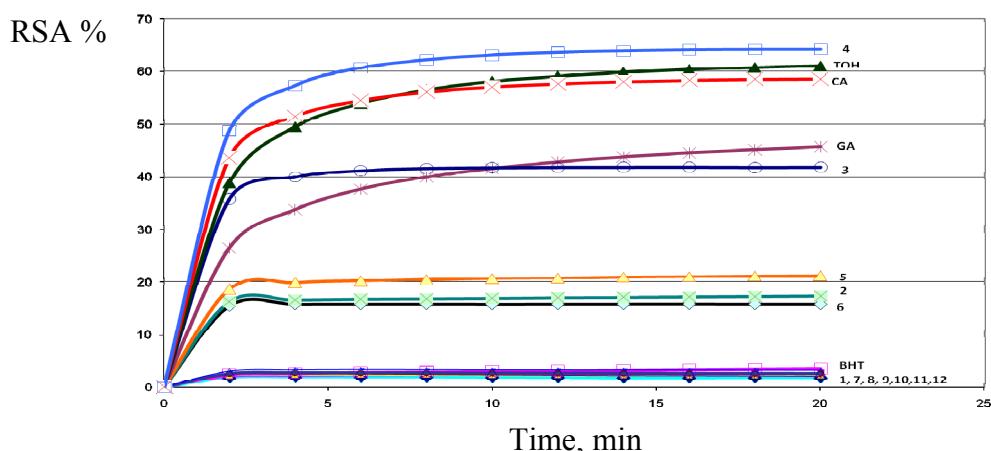


Figure 2. %RSA towards DPPH radical of all compounds under study

On the base of these results all studied compounds are grouped into 3 main groups:

Group A: Compounds with strong activity (%RSA > 40%)

Compound **4** demonstrated the strongest RSA comparable with those of the most powerful antioxidants TOH and CA. Compound **3** also showed strong RSA, similar with the activity of GA, but lower than those of compound **4**, TOH and CA.

Group B: Compounds with moderate activity (15% < RSA < 40%)

Compounds **5**, **2** and **6** are in this group and their activity is almost 2-fold lower than activity of compound **3** and GA and 3-fold lower than activity of compound **4** and of TOH and CA.

Group C: Compounds with weak activity (RSA < 15%)

In this group are compounds **1,7-11**. However their activity is closed to the activity of BHT.

It has been found for the first time that the radical scavenging activity decreases in the following sequences depending on the time of contact between DPPH radical and studied compounds:

a) At the maximal reaction time t = 20min:

4 (64,2%) > TOH (61,1%) > CA (58,6%) > GA (45,7%) > **3** (41,8%) > **5** (21,2%) > **2** (17,3%) > **6** (15,8%) >> BHT (3,6%) ≈ **7** (3,4%) > **9** (2,7%) = **11** (2,7%) ≈ **10** (2,6%) > **1** (2,2%) ≈ **12** (2,1%) > **8** (1,8%)

These results demonstrated how important it is to monitor not only the absorbance decrease at the fixed time ($t=10$ min, or $t=20$ min), but to follow the kinetics of this process. We can see also for the standard antioxidants with known activity that depending on the reaction time they showed different activity: a) at reaction time of $t = 2$ min: CA (43,7%) > TOH (38,8%) > GA (26,5%) >> BHT (2,5%); b) at reaction time of $t = 8$ min: CA (56,2%) ≈ TOH (56,6%) > GA (39,9%) >> BHT (3,0%); c) at reaction time of $t = 10$ min: TOH (58,1%) ≈ CA (57,1%) > GA (41,6%) >> BHT (3,1%); d) at reaction time of $t = 20$ min: TOH (61,1%) > CA (58,6%) > GA (45,7%) >> BHT (3,6%).

It is evident that for the reaction time $t < 4$ min, CA showed a higher activity than TOH; for the reaction time of $6 \text{ min} < t < 8$ min %RSA of CA and TOH are almost the same; and for reaction time $10 \text{ min} < t < 20$ min %RSA of TOH is higher than those of CA.

The results obtained demonstrated that if we have no data about the kinetics of this process different results may be obtained depending on the different reaction time.

Lipinski's Rule of Five

Table 1 presents the data obtained for all the coumarins of the present study.

Table 1. Lipinski's Rule of Five main parameters

Structures	Lipinski Rule of Five	Structures	Lipinski Rule of Five	Structures	Lipinski Rule of Five
	<u>miLogP</u> 1.887 natoms 13 MW 176.171 nON 3 nOHNH 1		<u>miLogP</u> 1.553 natoms 19 MW 266.249 nON 6 nOHNH 1		<u>miLogP</u> 2.805 natoms 15 MW 208.257 nON 3 nOHNH 2
	<u>miLogP</u> 1.398 natoms 14 MW 192.17 nON 4 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 2.464 natoms 17 MW 232.235 nON 4 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 1.953 natoms 21 MW 292.287 nON 6 nOHNH 2
	<u>miLogP</u> 1.627 natoms 14 MW 192.17 nON 4 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 3.387 natoms 16 MW 220.268 nON 3 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 2.182 natoms 21 MW 292.287 nON 6 nOHNH 2
	<u>miLogP</u> 1.969 natoms 14 MW 208.238 nON 3 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 4.357 natoms 16 MW 218.296 nON 2 nOHNH 2		<u>miLogP</u> 3.995 natoms 22 MW 296.322 nON 4 nOHNH 1

It could be seen that all compounds of the present study are in agreement with the *Lipinski's Rule of Five*.

CONCLUSIONS

In this study we found for the first time the new order of the radical scavenging activity of all compounds under study at physiological temperature (37°C). New order of radical scavenging activity was obtained ($t=10$ min) and three main groups were found depending from their radical scavenging activity: Group A: Compounds with strong activity (%RSA > 40%): **4** (63.1%) > TOH (58.1%) > CA (57.1%) > GA = **3** (41.7%); Group B: Compounds with moderate activity (15% <%RSA < 40%): **5** (20.7%) > **2** (16.9%) > **6** (15.8%) and Group C: Compounds with weak activity (%RSA<15%): BHT (3.6%) ≈ **7** (3.4%) > **9** (2.8%) = **11** (2.7%) > **10** (2.4%) = **1** (2.3%) = **12** (2.3%) > **8** (1.8%).

The main conclusion is that all compounds under study are effective as scavengers of free radicals. However, other studies are in progress about their ability to stop the degradation process of lipid autoxidation, i.e. their chain-breaking antioxidant activity.

It could be seen that all compounds of the present study are in agreement with the *Lipinski's Rule of Five*, which is of importance for further development of drugs based upon these substances, and their analogs.

REFERENCES

1. O. Potterat: *Antioxidants and Free Radical Scavengers of Natural Origin*, Current Organic Chemistry, 1, 1997, 415–440.
2. F. Shahidi: *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS, Press, Champaign, Illinois, USA, 1999.
3. E. B. Burlakova: *Bioantioxidants. Molecular cell biophysics*, Russ. Chem. J., 51, 2007, 3–12.
4. V. D. Kancheva: *Phenolic antioxidants – radical scavenging and chain breaking activities. Comparative study*. Eur J lipid Sci Technol., 111, 2009, 1072–1089.
5. V. D. Kancheva, *Phenolic antioxidants of natural origin – structure activity relationship and their beneficial effect on human health*. In: „*Phytochemicals and Human Health: Pharmacological and Molecular Aspects*“, Nova Science, USA, Ed. A. Farooqui, 2011, in press.
6. V. D. Kancheva, L. Saso, P. V. Boranova, M. K. Pandey Sh. Malhorta, J. T. Nechev, A. K. Prasad, M. B. Georgieva, A. L. DePass, V. S. Parmar: *Structure-activity relationship of some dihydroxy coumarins. Correlation between experimental and theoretical data and synergistic effect*. BIOCHIMIE, 92, 2010, 1089 – 1100.
7. N. Nenadis, M. Tsimidou: *Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl – 2 picrylhydrazyl (DPPH) tests*. J. Am. Oil Chem. Soc., 79, 2002, 1191–1195.

8. N. Yordanov: *Is our knowledge about the chemical and the physical properties of DPPH enough to consider it as a primary standard for quantitative EPR spectrometry.* Appl. Magn. Reson. 10 (1996) 339 – 350.
9. V. D. Kancheva, P. V. Boranova, J. T. Nechev, I. I. Manolov: *Structure-activity relationships of new 4-hydroxy – bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants.* BIOCHIMIE, 92, 2010, 1138 – 1146.
10. A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski: *A knowledge-B\based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery.* J. Combin. Chem., 1, 1999, 55 – 68.
11. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* Adv. Drug Del. Rev., 23, 1997, 3–25.
12. T. I. Oprea, A. M. Davis, S. J. Teague, P. D. Leeson: *Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective.* J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41, 2001, 1308–1315.

PREDICTION OF α,β -UNSATURATED ALDEHYDES FROM STRUCTURE FOR ACUTE AQUATIC TOXICITY

Yana K. Koleva

*Department of Organic Chemistry, University „Prof. Assen Zlatarov“,
1 Prof. Yakimov str., 8010 Bourgas, Bulgaria*

E-mail address: ykoleva@btu.bg

ABSTRACT

Chemical category formation and the use of read-across to fill data gaps are seen as crucial methods for the risk assessment of chemicals under the REACH legislation. Such methods are especially important if the goal of reducing the number of experimental animals used in toxicological testing is going to be met. One of the crucial steps in the development of a chemical category is the definition of the applicability domain of the category in terms of the types of chemicals that should be included in the category. The aim of this study was to form a “category” of α,β -unsaturated aldehydes, assumed to act by a common mechanism of action (Michael-type nucleophilic addition). This toxicologically and mechanistically important category was formed on the premise of quantitative structure-activity relationships. The acute aquatic toxicities to *Pimephales promelas* of compounds within the category were obtained in an effort to investigate approaches for read-across. The results indicate that a category for prediction can be formed that allows structural information and boundaries to be elucidated.

Keywords: Acute aquatic toxicity, α,β -unsaturated aldehydes, Michael-type nucleophilic addition, electrophilicity index

INTRODUCTION

There is an increased interest in predicting toxicological effects from chemical structure for many reasons. For new chemicals this will optimize the product development process by eliminating toxic compounds early. For existing compounds, these approaches enable the prioritization of potentially harmful compounds [1]. The formation of toxicological and chemical reactivity domains, and (quantitative) structure-activity relationships (SARs and QSARs) will decrease costs and reduce animal testing for chemical risk assessment. In the framework of the new European Union (EU) regulation Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), risk assessment of industrial chemicals is a very important issue in the upcoming decade [2].

The use of computational ‘*in silico*’ techniques to predict toxicity varies in sophistication from the relatively simplistic approach of forming chemical groupings

(category formation) to the more complex development of SARs (qualitative identification of chemical (sub-)structures with the potential of being reactive or toxic) and QSARs (quantitative prediction of relative reactivity or toxicity). There is a rich diversity of *in silico* techniques, however, it is generally acknowledged that a mechanistic basis to developing models allows for easier interpretation and provides greater confidence to the user [3].

Recently, there has been a growth of interest in forming groups of compounds (called categories) with common structural features presumed to be associated with a common mechanism of action [4]. Such groupings can be achieved by consideration of close structural analogs or can be formed using knowledge of the chemistry underpinning the mechanistic basis. If a robust grouping or category can be formed, interpolation of effects can take place – a process called “read-across” [5].

The aim of this study was to determine the usefulness and domain of applicability of electrophilicity index (ω) of α,β -unsaturated aldehydes in predicting the toxicity within the Michael addition mechanism for acute aquatic toxicity using read-across.

MATERIALS AND METHODS

A listing of α,β -unsaturated aldehydes considered in the present study for which are given Name, found experimental values for acute aquatic toxicity in *Pimephales promelas*, electrophilicity index (ω), and known or predicted mechanism are provided. Read-across predictions of the chemicals are presented in Table 1.

Acute aquatic toxicity data. The 96h fathead minnow (*Pimephales promelas*) mortality (LC_{50}) data were extracted from the US EPA MED-Duluth Fathead Minnow Database [6]. The lethal concentration was expressed in mmol/l, and the values were then expressed as - log (1/ LC_{50}).

EcoSAR software. EcoSAR is a user-friendly computer programme developed and routinely applied by the US EPA for predicting aquatic toxicity to fish, daphnids and algae [7]. This software was used for grouping of the chemicals.

Log P. Data for the logarithm of the 1-octanol-water partition coefficient (log P) were obtained from the KOWWIN software [8]. Where possible measured log P values were verified and used in preference to calculated values.

Excess toxicity. Aldehydes are compounds of special interest as they are often found to have toxicity in excess of baseline. This property - excess toxicity - was used to define the reactive toxicity of these chemicals [9]. The nonpolar narcosis baseline QSAR model for the fish *Pimephales promelas* is [10]:

$$\log(1/LC_{50}) = 0.87 \log P - 1.76 \quad (1)$$

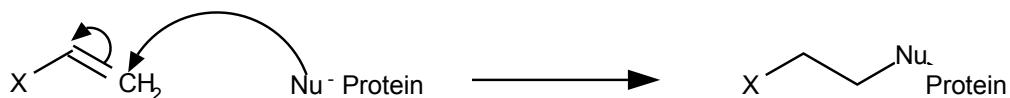
where $n=70$, $R^2 = 0.95$, $q^2 = 0.94$

and the extent of excess toxicity was determined as the toxic ratio (TR), which was calculated by the following equation [11]:

$$TR = \log (1/LC_{50})_{exp} - \log (1/LC_{50})_{calc} \quad (2)$$

Mechanistic category. Reactive electrophilic chemicals fall naturally into several mechanistic domains based on classic organic reaction chemistry. The major

domains are Michael type acceptor, S_NAr, S_N1, S_N2, Schiff base formation, and acyl transfer [12]. Of these, Michael type addition is proving to be important in toxicity and is well-studied. The basic criteria for a compound to be a Michael type acceptor is summarized in Scheme 1.



Characteristic: double or triple bond where X = electron withdrawing substituent.

Scheme 1. Michael-type addition reaction

Computational chemical calculation. All calculation on chemical structure were performed using the Gaussian03 package of programs utilizing the B3LYP/6-31G(d) level of theory [13].

Electrophilicity index (ω). The global electrophilicity parameter (ω) was then calculated for each optimized chemicals as shown by eqs 3–5. The index is derived from chemical potential (μ) and chemical hardness (η), which in turn have been shown to be related to the energies of the highest molecular orbital and the lowest unoccupied orbital (eqs 4 and 5) [14]:

$$\text{Electrophilicity index } (\omega) = \mu^2 / 2\eta \quad (3)$$

in which

$$\mu = (E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}})/2 \quad (4)$$

$$\eta = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} \quad (5)$$

where E_{HOMO} and E_{LUMO} are the one-electron energies of the highest occupied and lowest unoccupied molecular orbitals respectively.

Mechanism-based read-across predictions. Read-across predictions for the chemicals were made using the following methodologies (Table 1) [4, 15].

RESULTS AND DISCUSSION

α,β -Unsaturated aldehydes belong to the Michael type acceptor mechanistic domain. These compounds are a group that contains a number of relatively reactive organic compounds that are characterized by the presence of a polarized carbon-oxygen double bond. Those that possess a double bond between carbons 2 and 3 (α and β) are conjugated with the carbonyl group, the β -carbon is positively polarized and become the preferred site of nucleophilic attack. These chemicals often contain specific structural fragments responsible for their mechanism of action [12]. There are several modes of action for acute aquatic toxicity. For the reactive mode(s) of toxic action, where toxicity is observed to be in excess of narcosis, the mechanism is reaction chemistry-based, involving covalent modification of proteins [6]. The excess toxicity of these compounds is demonstrated clearly in Figure 1 where toxicity is observed to be not related to hydrophobicity and clearly in excess of baseline toxicity.

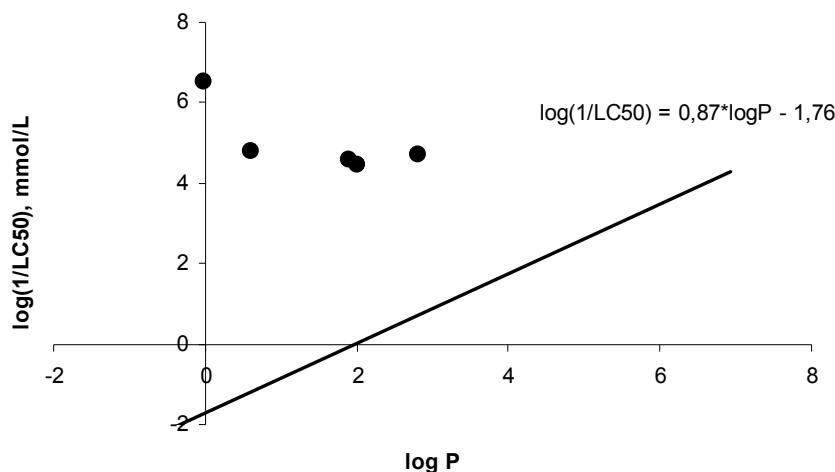


Figure 1. Plot of toxicity to *Pimephales promelas* vs $\log P$ for α,β -unsaturated aldehydes showing baseline toxicity. Baseline (non-polar) model ($\log(1/\text{LC}_{50})=0.87\log P - 1.76$) – —, α,β -unsaturated aldehydes (excess toxicity) – ●

According to McFarland (1970) [16], toxicity is the result of the penetration of a toxicant into the biophases and the interaction of the toxicant with the site of action, but key to the use of computational methods is the ability to group chemicals by mechanistic domains and then to model the key molecular events leading to a toxic effect [17]. In terms of acute aquatic toxicity, it is understood that chemicals as Michael acceptors in which chemical reactivity are the key events leading to a response. A recent study has proposed the utility of an electrophilicity index (ω) to predict the rates of Michael addition reactions within similar chemical classes [14].

In this study, the mechanistically relevant electrophilicity index (ω) was used to rank chemicals in the mechanistic domain based on their electrophilicity, with the rationale being that chemicals that have similar ω values should have approximately similar acute toxic potentials (Table 1). The electrophilic ranking of the chemicals in the Table 1 reveals the ability of ω to offer the expected ordering in terms of electrophilicity of series of related chemicals (within the Michael acceptor domain). The range of electrophilic index (ω) of Michael acceptor mechanistic domain is from 2.252 to 1.187.

Table 1. Experimental and predicted values of α,β -unsaturated aldehydes for Michael addition domain.

No	Name	Chemical category	Known or predicted mechanism of action	Exp. $\log(1/\text{LC}_{50})$, [mmol/l]	Pred. $\log(1/\text{LC}_{50})$, [mmol/l]	TR	ω , [eV]
1	3-Phenyl-2-propenal	Aldehydes	Michael addition	1.59	NP	1.70	2.252
2	3-(2-Methoxyphenyl)-2-propenal	Aldehydes	Pred. Michael addition		1.532		1.924
3	2-Propenal	Aldehydes	Michael addition	3.518	1.741	5.29	1.843

4	2-Methyl-2-propenal	Aldehydes	Pred. Michael addition		2.251		1.706
5	2-Butenal	Aldehydes	Michael addition	1.81	1.485	3.05	1.658
6	2-Hexyl-3-phenyl- 2-propenal	Aldehydes	Pred. Michael addition		1.481		1.635
7	2-(Phenylmethylene) heptanal	Aldehydes	Pred. Michael addition		1.480		1.629
8	2-Methyl-3-phenyl- 2-propenal	Aldehydes	Pred. Michael addition		1.476		1.608
9	3-(4-(Dimethylamino) phenyl)-2-propenal	Aldehydes	Michael addition	1.473	1.664	1.49	1.590
10	(1,3,3-Trimethylindolin- 2-ylidene) acetaldehyde	Aldehydes	Michael addition	1.71	NP	1.03	1.187

In the present work, we use a selected series of Michael acceptors, which toxicity were predicted by the read-across methodology. Read-across has been suggested as a useful method for making toxicological predictions within a given mechanism of action for a particular endpoint [15]. This methodology relies on the principle that similar chemicals should have similar toxic effects for a given endpoint, with predictions being made by selecting a number of close ‘neighbors’ (whose activity is known) and then making an averaged (or weighted average) prediction.

Mechanism-based read-across of Michael acceptor mechanistic domain by electrophilic index (ω) for acute toxicity prediction were possible for 8 (measured and nonmeasured) of the 10 chemicals in the study. It is clear that the LC₅₀ prediction by electrophilic index for the majority of the chemicals are in relatively good agreement with experimentally observed values for Michael acceptor mechanistic domain.

CONCLUSION

The formation of a category (or class) of chemicals allowing for read-across to occur is simple but an extremely transparent and powerful technique for filling data gaps in toxicological databases. α,β -Unsaturated aldehydes are in the Michael-type mechanistic domain and has demonstrated that the electrophilic index (ω) can be used to rank a series of direct-acting Michael acceptors. The study has also demonstrated the ability of ω to be used, within carefully considered mechanistic applicability domains, to perform mechanism-based read-across to predict acute aquatic toxicity (LC₅₀) values.

REFERENCES

1. Cronin, M. T. D., and D.J. Livingstone, *Predicting Chemical Toxicity and Fate*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004.
2. Schaafsma, G., et al., *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 2009, 53, 70-80.
3. Freidig, A.P, J.L.M. Hermens, *Quant. Struct. Act. Rel.*, 2001, 19, 547-553.
4. Koleva, Y. K., J. C. Madden, M.T.D. Cronin, *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21, 2300-2312.
5. Diderich, R., Tools for category formation and read-across overview of the OECD (Q)SAR application toolbox. In *In Silico Toxicology: Principles and Applications*, Cronin, M. T. D.; Madden, J. C., Eds. RSC: Cambridge, 2010.
6. Russom, C. L., S.P Bradbury, S. J. Broderius, D. E. Hammermeister, and R. A. Drummond, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, 16, 948–967.
7. EPA website: <http://www.epa.gov/oppt/newchems/tools/21ecosar.htm>
8. US EPA, KOWWIN; software available at
<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.htm>
9. Lipnick, R. L., *Science of the Total Environment*, 1991, 109, 131–153.
10. Schultz, T. W., G. D. Sinks, and A. P. Bearden, QSAR in aquatic toxicology: A mechanism of action approach comparing toxic potency to *Pimephales promelas*, *Tetrahymena pyriformis*, and *Vibrio fischeri*. In *Comparative QSAR* (Devillers, J., Ed.) 51-109, Taylor and Francis, New York, 1998.
11. Nendza, M., and M. Müller, *SAR and QSAR in Environmental Research*, 2007, 18, 155–168.
12. Roberts, D. W., G. Patlewicz, P. S. Kern, F. Gerberick, I. Kimber, R. J. Dearman, C. A. Ryan, D. A. Basketter, A. O. Aptula, *Chemical Research in Toxicology*, 2007, 20, 1019-1030.
13. Frisch, M., et al., *Gaussian03*, Revision B.04, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2003.
14. Domingo, L. R., et al., *Tetrahedron*, 2004, 60, 6585-6591.
15. Roberts, D., et al., *Chemical Research in Toxicology*, 2007, 20, 44-60.
16. McFarland, J. W., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1970, 13(6), 1192-1196.
17. Schultz, T. W., et al., *SAR QSAR Environ. Res.*, 2006, 17, 413-428.

СПЕКТРАЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА НЯКОИ ХАЛОГЕННИ ПРОИЗВОДНИ НА НИТРОСУЛФОНИ

C. Иванова

Университет „Проф.д-р Асен Златаров“

8010 Бургас, бул. Проф. Якимов

e-mail: viperorg@abv.bg

ABSTRACT

Sulfinic acids are known to possess unique properties as nucleophiles that cause facile nucleophilic addition interactions with compounds, possessing active carbon-carbon double bonds. As a results from the nucleophilic addition of arenesulfinic acids to 1-methoxy-4-(2-bromo-2-nitroethenyl)benzene of nitrosulfone have been prepared. Stereoisomers is traced stok recived sulfones and has been shown that electronic transitions occur with the preparation of sulfonyl group.

Keywords: *nitrosulfones, synthesis, structure*

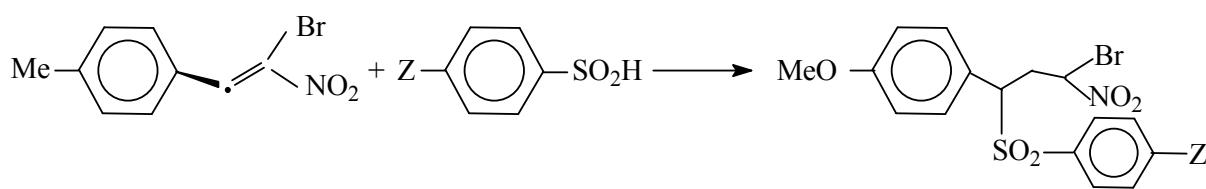
ВЪВЕДЕНИЕ

Разработването на достъпни методи за получаване на полифункционални сулфони е въпрос от първостепенно практическо и теоретическо значение. Предлаганите синтетични подходи са многостадийни, с голяма продължителност и разход на реагенти и разтворители [1]. Полифункционалните сулфони са голяма група органични съединения и са интересни обекти за изследване, тъй като се дискутират въпроси от теоретичната органична химия, свързани със структурата, влиянието на електронни ефекти върху реакционната им способност. Наличието на различни по характер функционални групи предоставя редица синтетични възможности.

С настоящата работа се разширява групата на синтезираните арилнитросулфони с цел задълбочаване на изследванията върху взаимовръзката структура-свойства-области на приложение.

ДИСКУСИЯ

В резултат на нуклеофилно присъединяване на аренсульфинови киселини към 1-метокси-4-(2-брому-2-нитроетенил)бензен е получена серия от бромни производни на нитросулфони.



Z: Ph(1); 4-MeC₆H₄(2); 4-ClC₆H₄(3); 4-BrC₆H₄(4); 4-JC₆H₄(5);
4-NO₂C₆H₄(6); C₁₀H₇(7); 4-AcNHC₆H₄(8).

Нитросулфоните са получени чрез смесване на еквимолни количества от изходните реагенти при стайна температура с различна продължителност на време. Синтезираните съединения са бели кристални вещества и са стабилни при продължително съхраняване. Добре се разтварят в етанол, ацетон, хлороформ, неразтворими са във вода и петролев етер. Индивидуалността на съединенията е потвърдена чрез тънкослойна хроматография, а структурата – с инструментални методи.

В ИЧ-спектри на бромосулфоните се наблюдават интензивни ивици на поглъщане за нитро- и сулфонилна група. Асиметрични и симетрични валентни трептения за нитрогрупа се проявяват в областите 1560–1550, 1370–1350 cm⁻¹, а ивиците за асиметрични и симетрични трептения за сулфонилна група се наблюдават при 1310–1300 и 1140–1130 cm⁻¹. Тези ивици са с висока интензивност, тъй като сулфофенилната група не се разполага в една равнина с останалите заместители. При 3100–3000 cm⁻¹ са регистрирани ивици на поглъщане, отговарящи на валентни C-H арил трептения. В тази област се наблюдава характерен триплет с намаляващ интензитет на ивиците с по-висока честота, тъй като в молекулите на изследваните съединения има монозаместениベンzenови ядра. Ивици на поглъщане за монозаместеноベンzenово ядро се наблюдават при 720–700 cm⁻¹, а за p-дизаместване – 810 cm⁻¹. В областта 850–840 cm⁻¹ е регистрирана характеристична ивица за валентно C-N трептение. Валентни трептения за връзка C-Br се наблюдават при 640–650 cm⁻¹. Наличието на халогенен атом на α-място спрямо нитрогрупата не влияе на положението на характеристичните ивици за нитро- и сулфофенилна групи. При 1090 cm⁻¹ се проявява средна по интензитет ивица на поглъщане, характеризираща валентните S-арил трептения. Присъствие на метокси група в p-позиция наベンzenовото ядро се доказва с характеристична ивица за валентни трептения на CH₃ група във Ph-OCH₃ при 2840 cm⁻¹ и валентни асиметрични и симетрични трептения (=C-O-C) в областите 1275 и 1025 cm⁻¹. В областта 810–790 cm⁻¹ се наблюдават ивици, характеризиращи деформационни C-H трептения за три съседни водородни атома в нафталинсулфонилната група. Въвеждането на халогенен атом във фенилсулфонилната група води до поява на характеристична ивица в интервал 800–610 cm⁻¹. В областта 1720–1520 cm⁻¹ се наблюдават две ивици, характерни за врорични амиди.

В ¹H-ЯМР спектрите на синтезираните съединения се наблюдава ароматен мултиплет в интервал 7.20–7.75 ppm. Сигналите за метинови протони се регистрират в интервал 5.15–5.18, съответно 6.18–6.20 ppm. Във всички случаи интегралната крича отчита наличие на един протон. Химичното отместяване на протоните на метиловата група наベンzenовите ядра е при 2.42 ppm (синглет) и не

влияят съществено върху положението на ароматния мултиплет. От проведените изследвания става ясно, че получените съединения са смес от две изомерни форми, като преобладаващи са threo-изомерите.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изходните сулфинови киселини и 1-метокси-4-(2-брому-2-нитроетенил)-бенzen са получени по описани методики [1,2].

ИЧ- и ^1H -ЯМР спектрите са снети съответно на Perkin-Elmer FTIR-1750 (таблетки от KBr) и Bruker 350 MHz (стандарт TMC и разтворител деутериран хлорохорм).

Синтез на нитросулфони 1-8. Към 1- метокси-4-(2-брому-2-нитроетенил)-бенzen (0.1 mol), разтворени в 20 ml етанол, се прибавя еквимолно количество от съответната сулфина киселина. Реакционната смес престоява 12ч, след което получените кристали се филтратват и прекристализират от толуен/диоксан.

Избрани данни на получените съединения

1. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1550, 1360 (NO_2); 1300, 1130 (SO_2); 720 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 810 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.20-7.70 (m, 9H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.41 (s, CH_3).

2. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1550, 1360 (NO_2); 1305, 1130 (SO_2); 710 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 810 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.25-7.72 (m, 8H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.18 (d, 1H, CH); 2.41 (s, CH_3).

3. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1560, 1365 (NO_2); 1305, 1135 (SO_2); 720 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 800 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.22-7.70 (m, 8H, Ar-H); 5.16 (d, 1H, CH); 6.18 (d, 1H, CH); 2.40 (s, CH_3).

4. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1555, 1360 (NO_2); 1300, 1130 (SO_2); 7.20 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 810 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.25-7.72 (m, 8H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.41 (s, CH_3).

5. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1550, 1360 (NO_2); 1300, 1135 (SO_2); 710 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 805 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H - ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.20-7.71 (m, 8H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.40 (s, CH_3).

6. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1560, 1360 (NO_2); 1300, 1130 (SO_2); 710 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 805 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.25-7.70 (m, 8H, Ar-H); 5.16 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.40 (s, CH_3).

7. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1560, 1360 (NO_2); 1310, 1135 (SO_2); 710 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 810 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.25-7.72 (m, 11H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.41 (s, CH_3).

8. ИЧС (ν , cm^{-1} , KBr): 1550, 1360 (NO_2); 1305, 1330 (SO_2); 705 ($\delta_{\text{Ar-H}}$); 805 ($\delta_{\text{Ar-H}}^{\text{p-дизам}}$). ^1H -ЯМР (δ , ppm, CDCl_3/TMC): 7.25-7.70 (m, 8H, Ar-H); 5.15 (d, 1H, CH); 6.20 (d, 1H, CH); 2.41 (s, CH_3).

ЛИТЕРАТУРА

1. S.Patai ,The chemistry of Sulfinic acids,esters and their derivatives, 1990,
John Wiley&Sons.
2. Perekalin V.V., E.S.Lipina, V.M.Berestovitskaya, D.A.Efremov, Nitroalkenes. Conjugated Nitrocompounds, London, 1994, John Wiley&Sons.

SYNTHESIS OF 6-ETHANIMIDOYL-5H-DIBENZO[a,c][7]ANNULENE-5,7(6H)-DIONE

Marin Marinov¹, Neyko Stoyanov²

¹*Faculty of Chemistry, University of Plovdiv,
24, Tzar Assen Street, 4000 Plovdiv*

²*University of Rousse – Branch Razgrad,
3, Aprilsko Vastanie Avenue, 7200 Razgrad*

ABSTRACT

A new method for synthesis of 6-ethanimidoyl-5H-dibenzo[a,c][7]annulene-5,7(6H)-dione is presented. The product is obtained from 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cyclohepten by applying of the Bucherer-Lieb method for synthesis of hydantoins.

The photochemical characteristics established for the compound make potentially it a source in preparation of photoprotectors.

Keywords: photoprotectors, 6-ethanimidoyl-5H-dibenzo[a,c][7]annulene-5,7(6H)-dione

INTRODUCTION

The method for synthesis of 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene is developed by us and it is patented [1]. The imine is its first derivative.

There are various organic compounds which are used as UV photoprotectors [2]. p-Aminobenzoates, salicylates, cinnamates, pyrones, benzimidazoles, carbazoles, naphthosulfonates and derivatives of quinones are used for this purpose.

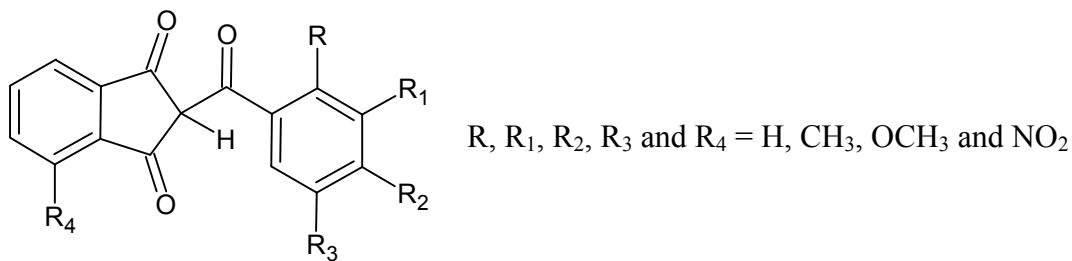


Figure 1. Benzoyl-1*H*-indene-1,3(2*H*)-diones.

There are 2-substituted benzoyl-1*H*-indene-1,3(2*H*)-diones (Fig. 1) which have photoprotection properties [3]. Major shortcomings of these compounds are their relatively low photostability, as well as the difficult synthesis in industrial conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Recently we showed [4] that irradiation of solutions of 2-acetyl-1,3-indandione, leads to intramolecular proton transfer in the singlet excited state in the molecule. This fact is also observed in 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene.

The structure of 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene is confirmed by spectral data (IR, NMR). Quantum-chemical calculations give preference to tautomeric form **c** (Fig. 2).

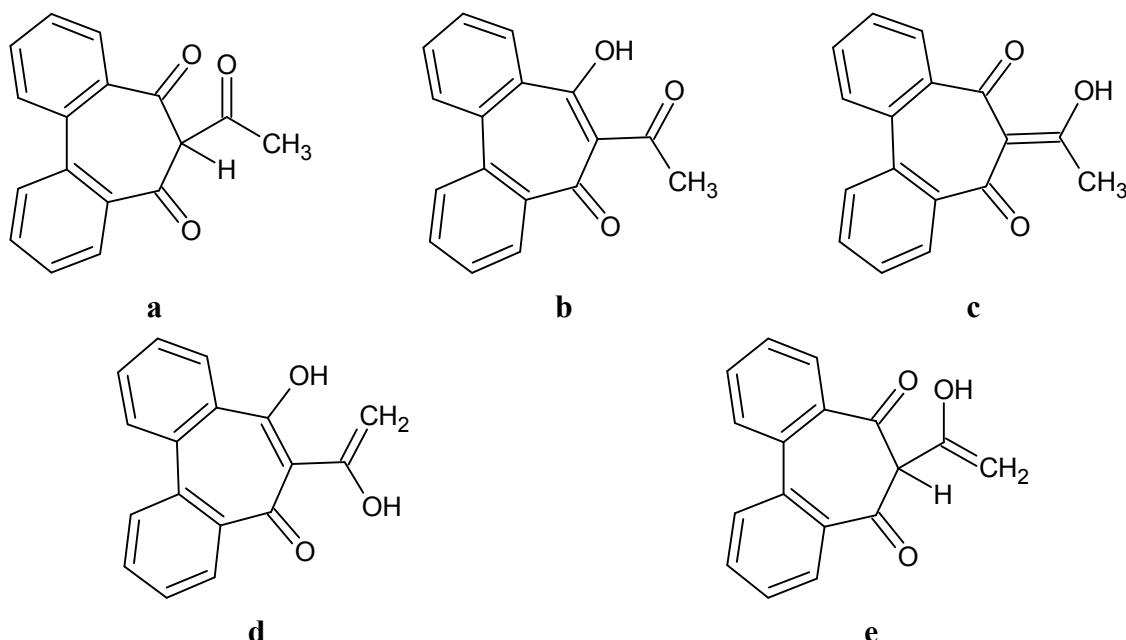


Figure 2. Tautomeric forms of 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene.

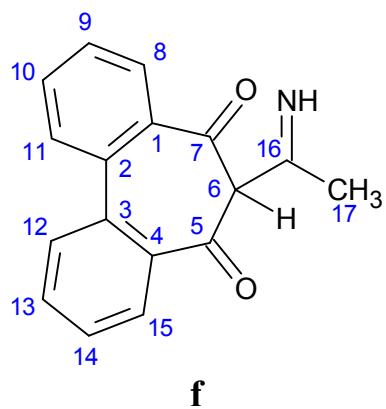
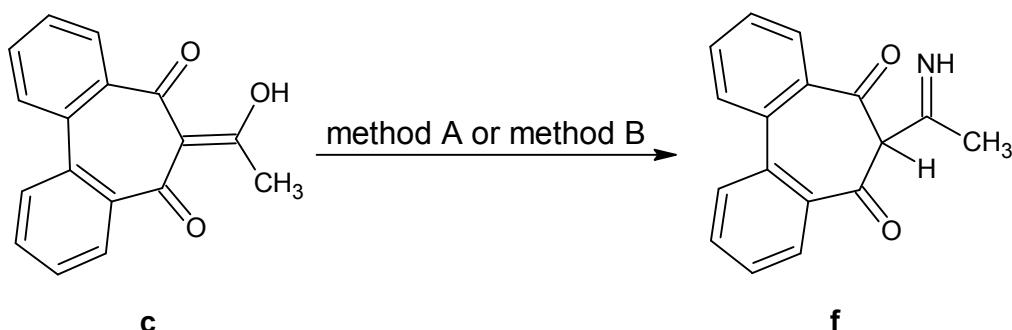


Figure 3. 6-Ethanimidoyl-5H-dibenzo[a,c][7]annulene-5,7(6H)-dione.

Using the classical Bucherer-Lieb method for obtaining of hydantoins [5] we were able to obtain the relevant imine **f** (Fig. 3). The synthesis of the compound was conducted according to scheme 1.

The product has good photochemical stability, as well as UV absorption in the 290-335 nm range. This fact makes it suitable for preparing of photoprotectors. In this case the protective effect probably refers to photoisomerization processes, which lead to the obtaining of dissociated products with unestablished further effect. The absorption and fluorescent characteristics of the product are better than those published for 2-acetyl-1,3-indandione [6].



Scheme 1. *Synthesis of 6-ethanimidoyl-5H-dibenzo[*a,c*][7]annulene-5,7(6*H*)-dione (**f**).*

EXPERIMENTAL

I. Instrumentation and methods

All chemicals used are purchased from Merck and Fluka.

The melting points are determined with a Koffler apparatus.

The elemental analysis data are obtained with an automatic analyzer Carlo Erba 1106.

The purity of the compounds is checked by thin layer chromatography on Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.2 mm Merck plates.

IR spectra are taken on a 1600 FTIR Perkin-Elmer spectrometer in KBr discs.

NMR spectra are taken on a Bruker DRX-250 spectrometer.

The initial 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene (**c**) is synthesized on the basis of reference [1].

II. Synthesis of 6-ethanimidoyl-5H-dibenzo[*a,c*][7]annulene-5,7(6*H*)-dione

II.1. Method A

0.1 mole of 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene (**c**), 0.1 mole of NaCN and 0.3 mole of (NH₄)₂CO₃ are dissolved in 52 ml of 96% C₂H₅OH and 50 ml of water. The reaction mixture is heated while stirring at 45-50 °C for an hour and then refluxed for 3 hours. The solution is concentrated to about two thirds of its volume and, after cooling, is acidified with concentrated HCl to pH 5-6. The mixture is left overnight in a refrigerator for crystallization.

The resulting 6-ethanimidoyl-5H-dibenzo[a,c][7]annulene-5,7(6*H*)-dione (**f**) is recrystallised from ethanol/water.

Yield: 68 %.

M.p.: 145-146 °C.

Rf (ethyl acetate : petroleum ether = 1 : 2) = 0.78.

Rf (chloroform : methanol = 10 : 1) = 0.43.

Elemental analysis data, anal. calcd. (found) / %: C – 77.55 (77.41); H – 4.98 (4.93); N – 5.32 (5.27).

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{NH} = 3314, 3187; ν_{C=O} = 1687; ν_{C=N} = 1634; ν_{arom.} = 3065, 1523; ν_{CH₃} = 2936; ν_{o-disub. core} = 733.

¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm): δ_{CH₃} – 2.53; δ_{arom.} – 7.42-7.69; δ_{CH} – 8.9; δ_{NH} – 9.86.

II.2. Method B

0.1 mole of 6-acetyl-5,7-dioxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[a,c]-cycloheptene (**c**), 0.22 mole of NaCN, 0.15 mole (NH₄)₂CO₃, 200 ml of C₂H₅OH and 200 ml of aqueous ammonia are heated in an autoclave at 120 °C for 2 hours. The resulting product (**f**) is filtered, washed with water and diethyl ether and recrystallised from ethanol/water.

Yield: 56 %.

The physicochemical parameters and spectral data of thus obtained compound are identical with those of the product synthesized by method A.

REFERENCES

1. N. Stoyanov, V. Enchev, S. Minchev, Patent R. B, № 10136/03.07.1997 (in Bulgarian).
2. B. Johnson, J. Soc. Cosmet. Chem., 29 (1978) 4.
3. N. Sofroniev, I. Petkov, S. Minchev, C. R. Acad. Bulg. Sci., 45 (1992) 51.
4. V. Enchev, S. Bakalova, G. Ivanova, N. Stoyanov, Chem. Phys. Lett., 314 (1999) 234.
5. H. Bucherer, V. Lieb, J. Prakt. Chem., 5 (1934) 141.
6. A. Ahmedova, V. Mantareva, V. Enchev, M. Mitewa, Int. J. Cosm. Sci., 24 (2002) 103.

НОВ Pb(II)-ОТПЕЧАТАН ПОЛИМЕТАКРИЛАТЕН СОРБЕНТ: СИНТЕЗ, ИЗПИТАНИЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ

*Христина Петрова¹, Иванка Дакова¹, Ирина Караджосова¹,
Валери Даков², Георги Георгиев¹*

*¹Химически факултет, Софийски университет,
бул. „Дж. Баучер“ 1, София 1164*

*²Лесотехнически университет,
бул. „Кл. Охридски“ 10, София 1756*

ABSTRACT

Ion-imprinted polymer (IIP) particles are prepared by copolymerization of methacrylic acid as functional monomer, trimethylopropane trimethacrylate as crosslinking agent and 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile as initiator in the presence of a Pb(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol (Pb(II)-PAR) complex, and PAR only. A batch procedure is used for the determination of the characteristics of the Pb(II) solid phase extraction from the IIP produced. The optimal pH value for the quantitative preconcentration is 8, and full desorption is achieved by 1M HNO₃. The selectivity coefficients ($S_{\text{Pb}/\text{Me}}$) for Me = Cu(II), Ni(II), Cd(II) are 18.8, 70.0 and 23.3, respectively. It is established that Pb(II)-PAR IIPs can be used repeatedly without a considerable adsorption capacity loss. The determination of Pb(II) ions in mineral and sea waters shows that the interfering matrix does not influence the preconcentration and selectivity values of the Pb(II)-PAR IIPs.

Keywords: Solid phase extraction; Ion-imprinted polymer; Lead; Preconcentration

УВОД

Оловото е един от най-токсичните елементи за хората и животните [1]. Тъй като концентрациите на олово в проби от околната среда обикновено са пониски от границите на откриване на директните инструментални методи и има матрични пречения, се налага използването на процедура за предварително разделяне и концентриране преди определянето му. Най-често за тази цел се използва твърдофазна екстракция, тъй като се характеризира с минимална консумация на разтворители и реактиви, възможност за изследване на различни по обем пробы, висок фактор на концентриране, бързина и простота на изпълнение и голямо разнообразие от сорбенти [2]. Освен това чрез насочен синтез могат да бъдат получени сорбенти, даващи възможност за селективна екстракция на аналитите.

Молекулното (в частност йонното) отпечатване е нова, достъпна и лесна за изпълнение техника, чрез която се синтезират полимерни гелове, съдържащи в структурата си специфични по геометрия и функционалност кухини, които могат да бъдат заети преимуществено от отпечатаната молекула (йон) [3]. Чрез нея се въвежда памет в полимерната матрица, което от своя страна дава възможност за постигане на селективност при разделянето на сложни смеси. Известни са редица изследвания върху синтеза на йон-отпечатани полимери (ЙОП) и използването им за селективна твърдофазна екстракция на Cu(II) [4], Ni(II) [5], Cd(II) [6], Hg(II) [7], Zn(II) [8], UO_2^{2+} [9], Pb(II) [10 – 13] и др.

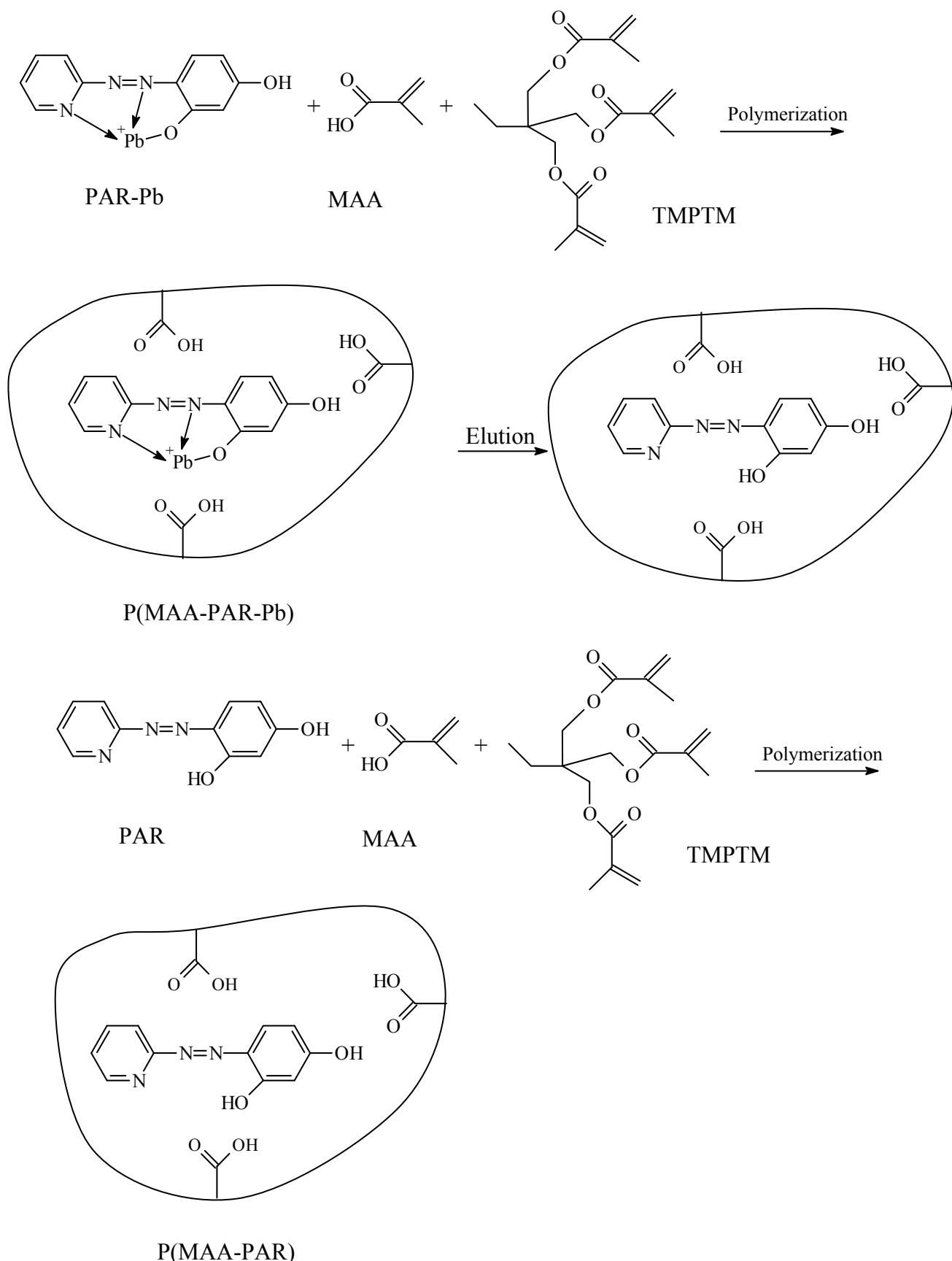
Цел на настоящото изследване е синтез на Pb(II) отпечатан съполимер на базата на метакрилова киселина (МАА) като функционални мономери, триметилолпропан триметакрилат (TMPTM) като омрежващ агент и 4-(2-пиридиазо)-резорцинол (PAR) като специфичен за Pb(II) лиганд, който ще се използва за селективно отделяне и концентриране на олово от природни води.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Апаратура: Електротермичен атомноабсорбционен спектрометър (ETAAS) Perkin Elmer спектрометър, модел Zeeman 3030 с графитна кювета HGA-600; Сканиращ електронен микроскоп (SEM, JEOL JSM-5500, Tokyo, Japan); pH-метър (Hanna Instrumenta, Португалия).

Реактиви: метакрилова киселина (МАА), триметилолпропан триметакрилат (TMPTMA), 4-(2-пиридиазо)-резорцинол (PAR), 2,2'-азо-бис-изобутиронитрил (AIBN), ацетонитрил, стандартни разтвори на Pb, Cu, Cd, Ni с концентрация 1000 ppm (Merck, Germany).

Синтез на Pb(II)-отпечатан и не-отпечатан съполимерни гелове: Pb(II) отпечатания и контролния съполимери са синтезирани по методика, описана по-рано от Dakova et al. [14]. Схематично синтезът е представен на Фиг. 1. Като шаблонни молекули са използвани комплекс на PAR с Pb(II) за отпечатания съполимерен гел, и само PAR – за контролния съполимер. Съполимерите са получени чрез утайтелна и омрежителна съполимеризация, като функционалният мономер (МАА – 0.182 mM), омрежващия агент (TMPTM – 0.298 mM), комплекса на PAR с Pb(II) (0.038 mM) и инициатора (AIBN – 5.6 mg) се разтварят в 8 mL безводен ацетонитрил в стъклена ампула. Разтворът се насища в продължение на 15 min със сух азот, след което ампулата се заварява. Съполимеризацията се провежда във водна баня при температура 60° C в продължение на 24 h. Микросферите се отделят чрез центрофугиране (3000 rpm) в продължение на 5 min. Контролният неотпечатан съполимерен гел е синтезиран по същия начин, но в отсъствие на Pb (II) (P(MAA-PAR)).



Фигура 1. Схема за получаване на $Pb(II)$ -отпечатан ($P(MAA\text{-}PAR\text{-}Pb)$) и контролен ($P(MAA\text{-}PAR)$) съполимери.

Микросферите се промиват двукратно с ацетонитрил за отстраняване на нереагираните мономери. Pb(II) се елюира от Pb-отпечатаната съполимерна мрежа с 2 M HNO₃ в продължение на 2 часа и при непрекъснато разбъркване. По аналогичен начин се обработва и контролния съполимер. Получените съполимери се сушат под вакуум в продължение на 1 денонощие. Добивите варират между 80 % и 88 %.

Твърдофазна екстракция на Pb(II): Към 25 mg сорбент се прибавят 200 μL разтвор на Pb(II) с концентрация 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ и буферен разтвор до обем 10 mL. Разбърква се в продължение на 30 min, след което се центрофугира, отделя се ефлуата, а съполимера се промива с дестилирана вода. Адсорбираните върху полимерния гел оловни йони се елюират с 2 mL 1 M HNO₃ при непрекъснато разбъркване в продължение на 30 min. След центрофугиране съдържанието на Pb(II) се определя в елуата чрез ETAAS измервания. Оптималните апаратурни параметри са описани от Dakova et al. [15]. По същия начин се анализира и съдържанието на олово и в ефлуата. Преди следваща употреба сорбентът се промива първоначално с дестилирана вода, а след това с буферния разтвор, който ще се използва за провеждане на сорбцията.

Анализ на изкуствена смес Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II): Към 25 mg сорбент се прибавят 200 μL разтвор на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II) с концентрация на всеки от изброените елементи 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ и буферен разтвор с pH 8 до обем 10 mL. Разбърква се в продължение на 30 min, след което се центрофугира, отделя се ефлуата, а съполимера се промива с дестилирана вода. Адсорбираните върху полимерния гел йони се елюират с 2 mL 1 M HNO₃ при непрекъснато разбъркване в продължение на 30 min. След центрофугиране съдържанието на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II) се определя в елуата чрез ETAAS измервания. По същия начин се анализира и съдържанието им и в ефлуата.

Сорбционни характеристики:

Степен на сорбция (E %)

$$E \% = [(A_i - A_{eff}) / A_i] \cdot 100 \quad (1)$$

където A_i – количество на метален йон в изходния разтвор в μg , а A_{eff} – количество на метален йон в ефлуата в μg .

Степен на елюиране (R %)

$$R \% = [A_{el} / A_s] \cdot 100 \quad (2)$$

където A_s – сорбирано върху микрочастиците количество на метален йон в μg , а A_{el} – количество на метален йон в елуата в μg .

Коефициент на разпределение (D)

$$D = (A_i - A_{eff}) / A_{eff} \quad (3)$$

Коефициент на селективност ($S_{Pb/Me}$)

$$S_{Pb/Me} = D_{Pb} / D_{Me} \quad (4)$$

където D_{Pb} и D_{Me} са коефициентите на разпределение на Pb(II), Cd(II), Cu(II) и Ni(II), съответно.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От електронно-микроскопските изследвания на Pb(II)-отпечатания и контролния съполимерни гелове е установено, че формата на получените частици е сферична, а средният им размер е 330 ± 10 нм. Средноквадратичното отклонение на диаметъра на микросферите е $\sigma = 3.16$, което дава основание да се приеме, че имаме монодисперсно разпределението по размер на частиците.

Влияние на pH върху сорбцията на Pb(II)

В Таблица 1 са представени pH-зависимостите на степените на сорбция (E) на Pb(II) при твърдофазната му екстракция със синтезираните съполимерните гелове. Изследванията са направени в статичен режим. От таблицата се вижда, че степените на сорбция на Pb(II) при екстракцията му с изследваните съполимери нарастват с увеличаване на pH. Този ефект може да бъде обяснен с неспецифичното взаимодействие между оловните йони и депротонираните карбоксилни групи, присъстващи в матрицата и на двета съполимера. Известно е, че полиметакриловата киселина е слаба киселина (pK_a стойността и варира между 6 и 7), а омрежването води до допълнително намаляване на силата на поликиселините [16]. Тъй като с увеличаване на pH степента на депротониране на карбоксилните групи постепенно нараства, това води до увеличаване на степените на сорбция на оловните катиони върху двета сорбента. Разликата, която се наблюдава между двета сорбента е, че контролният съполимерен гел не е така ефективен, както олово-отпечатания. Докато при използване на P(MAA-PAR-Pb) се постига количествена сорбция ($E > 95\%$) при $pH \geq 8$, при контролния съполимер не се достига количествена сорбция дори при високи стойности на pH. Вероятно това се дължи на различната конфигурация на молекулите на PAR, която се получава при имобилизирането им в полимерната мрежа.

Таблица 1. pH зависимост на степените на сорбция (E) на Pb(II) при твърдофазната му екстракция със съполимерните гелове (25 mg сорбент, $20 \mu g L^{-1}$ Pb(II), елюент $2 mL 1 M HNO_3$).

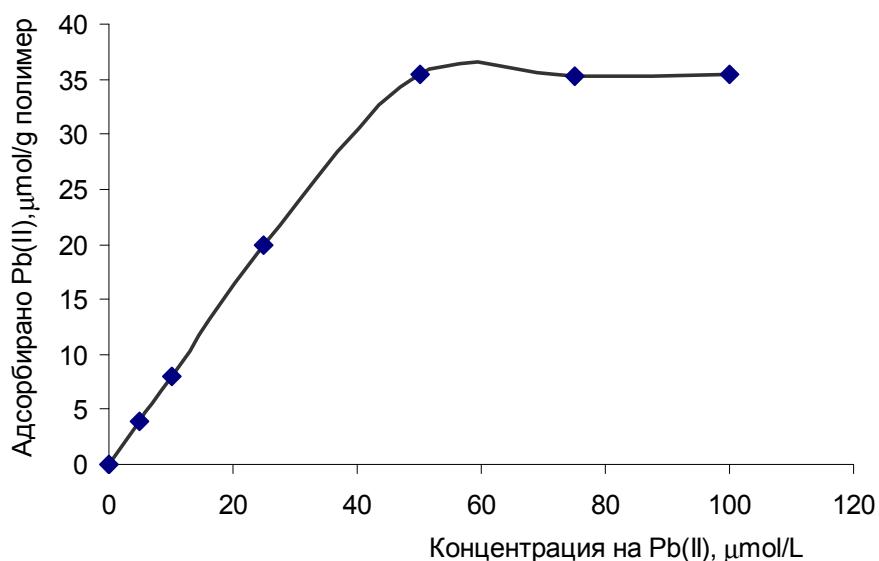
Полимерен гел	E (%)					
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
P(MAA-PAR-Pb)	9±5	55±3	76±3	98±1	>99	>99
P(MAA-PAR)	10±5	38±4	58±3	55±3	48±3	46±3

В P(MAA-PAR-Pb) са имобилизиирани комплекси на PAR с Pb(II) (Фиг. 1), а в P(MAA-PAR) – само молекули PAR. След елуиране на оловните йони от P(MAA-PAR-Pb) в структурата на полимерната мрежа остават кухини, които им съответстват по размер, а конфигурацията на PAR се запазва такава каквато е била в комплекса. В контролния съполимер, в който са имобилизиирани само молекули на PAR, последните са частично блокирани (Фиг. 1), в резултат на което, степените на сорбция на Pb(II) са по-ниски.

Капацитет на сорбентите

Капацитетът на полимерния гел е важен фактор за определяне на количеството на сорбента, необходимо за екстракция на изследвания метален йон от разтвора. Капацитетът се определя при оптималната стойност на pH (в случая pH 8) и се представя в $\mu\text{mol Pb(II)} \text{ g}^{-1}$ сух съполимер.

Адсорбцията на Pb(II) върху микросферите от P(MAA-PAR-Pb) е изследвана в статичен режим. На Фиг. 2 е представена зависимостта на адсорбираното количество Pb(II) върху 1 g от полимерния гел от концентрацията на изходните разтвори на Pb(II). Вижда се, че количеството на оловните иони адсорбирани върху P(MAA-PAR-Pb) се увеличава с нарастване на изходната концентрация на Pb(II), докато се стигне до „насищане“, в резултат на което в зависимостта се наблюдава „плато“. Установените стойности на „насищане“ определят капацитета на сорбента. Максималният адсорбционен капацитет за Pb(II), определен от направените експерименти, е $35,5 \mu\text{mol g}^{-1}$. По аналогичен начин е определен и капацитета на контролния съполимер – $27.6 \mu\text{mol g}^{-1}$.

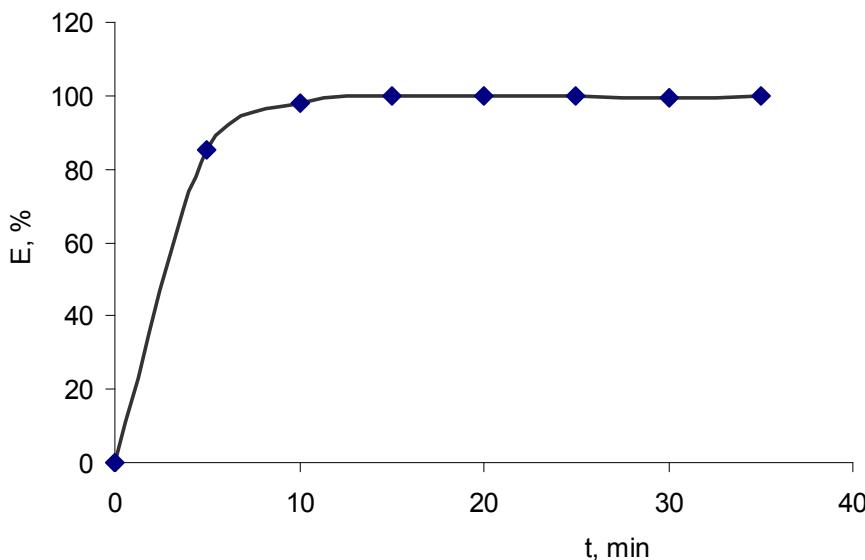


Фигура 2. Адсорбционна изотерма на Pb(II) върху P(MAA-PAR-Pb);
25 mg P(MAA-PAR-Pb); pH 8; 2 mL 1 M HNO_3 като елюент; $T = 25^\circ\text{C}$.

Кинетика на сорбция и десорбция

За определяне на кинетиката на сорбция Pb(II) върху P(MAA-PAR-Pb) са проведени експерименти в статичен режим при оптималната стойност на pH – 8, като времето за сорбция е варирано от 5 до 40 min. Получените резултати са представени на Фиг. 3. От нея се вижда, че с увеличаване на времето на сорбция процентът на адсорбираното олово се увеличава. За количествена сорбция ($> 95\%$) се оказва, че са необходими 10 min за контакт между P(MAA-PAR-Pb) и изследвания разтвор, съдържащ Pb(II).

Кинетиката на десорбция на Pb(II) от P(MAA-PAR-Pb) е изследвана във времевия интервал 5 – 40 min и е установено, че за достигане на количествена десорбция са необходими 10 min.



Фигура 3. Кинетика на сорбция на Pb(II) върху P(MAA-PAR-Pb).

25 mg P(MAA-PAR-Pb); pH 8; 10 mL разтвор на Pb(II)
с концентрация $20 \mu\text{g L}^{-1}$; 2 mL 1 M HNO_3 като елюент; $T = 25^\circ\text{C}$.

Сорбция на Pb(II) в присъствие на Cu(II), Ni(II) и Cd(II)

С цел доказване на селективността на синтезириания олово-отпечатан съполимерен гел е проведено изследване на сорбцията на Pb(II) в присъствие на Cu(II), Ni(II) и Cd(II). Експериментите са проведени в статичен режим по методиката описана в Експерименталната част. В Таблица 2 са представени получените степени на сорбция, коефициенти на разпределение и коефициенти на селективност на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II). От нея се вижда, че степента на сорбция и коефициента на разпределение на оловните йони върху P(MAA-PAR-Pb) са по-високи в сравнение с тези на другите изследвани катиони, а коефициентът на селективност на Pb(II) намалява в реда $\text{Ni(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Cu(II)}$. Получените по-високи стойности на степента на сорбция за оловните йони, могат да бъдат обяснени с ефекта на отпечатването им в съполимерната мрежа. Размерът на формирани „кухини“ в съполимерната мрежа се определя от размера на иона, използван като шаблон. В случая стойността на ионния радиус на Pb (II) (0.126 nm) е по-голяма от тази за Cu(II) – 0.080 nm, Cd(II) – 0.099 nm, Ni(II) – 0.074 nm [17] и вероятно по тази причина P(MAA-PAR-Pb) проявява по-голям афинитет към оловните йони в сравнение с останалите присъстващи в разтвора.

Таблица 2. Степени на сорбция (E), коефициенти на разпределение (D) и коефициенти на селективност ($S_{\text{Pb}/\text{Me}}$) на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II) върху P(MAA-PAR-Pb) (25 mg P(MAA-PAR-Pb); pH 8; елюент 2 mL 1 M HNO_3 ; $T = 25^\circ\text{C}$).

Метален ион	E (%)	D	$S_{\text{Pb}/\text{Me}}$
Pb(II)	98.0	49	
Cu(II)	72.1	2.6	18.8
Ni(II)	38.8	0.7	70
Cd(II)	68.3	2.1	23.3

Сравнение между селективностите на сорбция на Pb(II) върху P(MAA-PAR-Pb) и други сорбенти

За да се илюстрира по-голямата селективност на P(MAA-PAR-Pb), са изследвани и процесите на сорбция на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II) върху следните сорбенти: контролен съполимер P(MAA-PAR), поликарбоксилатен сорбент (P(COOH)), получен чрез съполимеризация на метакрилова киселина и ТМРТМ и хитозанови мембрани (съдържат –OH и –NH₂ функционални групи). Хитозановите мембрани са получени по методика описана от Dakova et al. [18]. В Таблица 3 са представени получените коефициенти на разпределение и коефициенти на селективност. От нея ясно се вижда, че Pb(II)-отпечатания съполимерен гел проявява по-висока селективност при сорбция на Pb(II) в сравнение с другите сорбенти.

Таблица 3. Коефициенти на разпределение (D) и коефициенти на селективност ($S_{Pb/Me}$) на Pb(II), Cu(II), Ni(II) и Cd(II) върху P(MAA-PAR-Pb), P(MAA-RAR), P(COOH) и хитозанова мембрана (25 mg сорбент, pH 8; 2 mL 1 M HNO₃ като елуент, $T = 25$ °C).

Метален йон	P(MAA-PAR-Pb)		P(MAA-PAR)		P(MAA)		Chitosan mem- brane	
	D	$S_{Pb/Me}$	D	$S_{Pb/Me}$	D	$S_{Pb/Me}$	D	$S_{Pb/Me}$
Pb(II)	49		1.2		19		49	
Cu(II)	2.6	18.8	0.9	1.3	9	2.1	99	0.5
Ni(II)	0.7	70	0.8	1.5	7.3	2.6	49	1
Cd(II)	2.1	23.3	1.1	1.1	19	1	19	2.5

Приложение на метода

Получените Pb(II)-отпечатан и контролен гелове са използвани за определяне на олово в природни води – минерална и морска вода. Предложена е следната методика: Приготвят се преби от по 50 mL морска вода от района на Бургас и минерална вода „Горна баня“, съответно. За да се изследва влиянието на матрицата, беше направена стандартна добавки от олово – 4 µg. Експериментите са проведени при pH 8.0-8.3 за морската вода (оригинално pH на морската вода) и pH 9.5-9.8 за минералната вода (оригинално pH на минералната вода) без буфериране. Пробата се прибавя към 50 mg сорбент. Разбърква се в продължение на 30 min, центрофугира се. Сорбентът се промива с дестилирана вода и адсорбираните оловни йони се елюират с 0.5 mL 1 M HNO₃ при непрекъснато разбъркване в продължение на 30 min. След центрофугиране съдържанието на Pb(II) се определя в елуата чрез ETAAS измервания. Преди следваща употреба сорбентът се промива с дестилирана вода. Получените резултати са представени в Таблица 4.

Установените проценти на сорбция на олово са 94.1 % за морската вода и 96.5 % за минералната вода, когато като сорбент използваме Pb(II) – отпечатания съполимер (P(MAA-PAR-Pb)), докато при контролния съполимер (P(MAA-PAR)) стойностите са съответно 51.4 % за морската вода и 96.5 % за минерал-

ната вода. Тези резултати още веднъж потвърждават по-добрите сорбционни свойства на Pb(II)-отпечатаните микрочастици, пред тези на неотпечатаните. Коефициентът на концентриране, намерен като отношение на обема на пробата взета за анализ към обема на елюата, е 100.

Таблица 4. Определяне на Pb(II) в минерална и морска вода по метода добавено/намерено (три паралелни определения) чрез ETAAS.

Проба	P(MAA-PAR-Pb)		P(MAA-PAR)	
	Pb(II) добавено $\mu\text{g L}^{-1}$	Pb(II) намерено (mean \pm s), $\mu\text{g L}^{-1}$	Pb(II) добавено $\mu\text{g L}^{-1}$	Pb(II) намерено (mean \pm s), $\mu\text{g L}^{-1}$
Морска вода	-	0.07 \pm 0.008	-	0.07 \pm 0.008
Морска вода	4.00	3.83 \pm 0.011	4.00	2.09 \pm 0.09
Минерална вода	-	0.05 \pm 0.008	-	0.05 \pm 0.008
Минерална вода	4.00	3.91 \pm 0.010	4.00	2.26 \pm 0.011

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата работа са синтезирани Pb(II)-отпечатани и контролни съполимерни гелове чрез утайтелна съполимеризация на метакрилова киселина и триметилолпропан триметакрилат в ацетонитрил. Показано е, че Pb(II)-отпечатаните микросфери са подходящи за селективна твърдофазна екстракция на олово от разредени разтвори при $\text{pH} \geq 8$. Предложена е процедура за разделяне и концентриране на Pb(II) в морски и минерални води.

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by Project DO-02-82/2008-UNION and Sofia University Scientific Foundation (Grant № 027/2010).

ЛИТЕРАТУРА

1. Benaroya RO, Tzin V, Tel-Or E.: Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. *Plant Physiol Bioch* 42:639–645, 2004
2. Camel V.: Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochim. Acta Part B* 58: 1177–1233, 2003
3. Haupt K.: Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst* 126: 747-756, 2001
4. Birlik E, Ersoz A, Denizli A, Say R. *Anal. Chim. Acta* 565: 145-152, 2006
5. Jiang N, Chang X, Zheng H, He Q, Hu Z.: Selective solid-phase extraction of nickel(II) using a surface-imprinted silica gel sorbent. *Anal. Chim. Acta* 577: 225–231, 2006
6. Singh D K, Mishra S.: Synthesis, characterization and removal of Cd(II) using Cd(II)-ion imprinted polymer. *J. Hazard. Mat.* 164: 1547–1551, 2009
7. Zhao J, Han B, Zhang Y, Wang D.: Synthesis of Zn(II) ion-imprinted solid-phase extraction material and its analytical application. *Anal. Chim. Acta* 603: 87–92, 2007

8. Ahmadi S J, Noori-Kalkhoran O, Shirvani-Arani S.: Synthesis and characterization of new ion-imprinted polymer for separation and preconcentration of uranyl (UO_2^{2+}) ions. *J. Hazard. Mat.* 175: 193–197, 2010
9. Chen AH, Yang CY, Chen CY, Chen CY.: The chemically crosslinked metal-complexed chitosans for comparative adsorptions of Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Pb(II) ions in aqueous medium. *J. Hazard. Mat.* 163(2-3): 1068-1075, 2009
10. Esen C, Andak M, Bereli N, Say RI, Henden E, Denizli A.: Highly selective ion-imprinted particles for solid-phase extraction of Pb^{2+} ions. *Mat. Sci. Eng. C*. 29(8): 2464-2470, 2009
11. Li CX, Gao J, Pan JM, Zhang ZL, Yan YS.: Synthesis, characterization, and adsorption performance of Pb(II)-imprinted polymer in nano-TiO₂ matrix. *J. Environm. Sci.* 21(12): 1722-1729, 2009
12. Zhu XB, Cui YM, Chang XJ, Zou XJ, Li ZH.: Selective solid-phase extraction of lead(II) from biological and natural water samples using surface-grafted lead(II)- imprinted polymers. *Microchim. Acta* 164(1): 125-132, 2009
13. Dakova I, Karadjova I, Georgieva V, Georgiev G.: Ion-imprinted polymethacrylic microbeads as new sorbent for preconcentration and speciation of mercury. *Talanta* 78: 523–529, 2009
14. Dakova I, Karadjova I, Georgieva V, Georgiev G.: Polycarboxylic microsphere polymer gel for solid phase extraction of trace elements. *Microchim Acta* 164: 55 –61, 2009
15. Miller ML.: *Encyclopedia of polymer science and technology*, vol. 1. Wiley, New York, 1964: 217
16. Lurje JJ.: *Handbook of Analytical Chemistry*, Chemistry, Moscow, 1989:310
17. Dakova I, Karadjova I, Georgieva V, Georgiev G.: Synthesis and characterization of the Hg(II)-ion imprinted microbeads and membranes for enrichment of inorganic Hg(II). *Ann. Univ. Sofia, Fac. Chim.*, accepted, 2010

ПРИЛОЖЕНИЕ НА МИКРОФОТОГРАФСКИ МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА СТРУКТУРАТА И СТАБИЛНОСТТА НА ЕМУЛСИОННИ СИСТЕМИ

Ивелина Василева
Университет по хранителни технологии,
4002 Пловдив, бул. „Марица“ №26

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the potential of microphotographic method for analysis the properties, microstructure and stability of colloidal systems. The proposed methodology analyses each of the processes – flocculation, coalescence and creaming (sedimentation). Use the fact that the proposed method can qualitatively and quantitatively assess the average particle size, droplet size distribution and microstructure of emulsion in a certain moment of its existence and the different heights of the volume of emulsion.

Keywords: *emulsion, flocculation, coalescence, creaming*

ВЪВЕДЕНИЕ

Структурата на колоидните системи е определяща за техните свойства и стабилност и има пряко отношение към много технологични процеси, свързани с тяхното производство, съхранение и приложение [1-3]. За да може да се прогнозира и оцени влиянието на факторите на околната среда като: температура, налягане, както и ролята на емулгатора и стабилизатора или смеси от тях, както и как влияят добавките във всяка фаза върху стабилността на емулсията е необходимо да се познава сруктурата на колоидните системи на микро ниво.

Емулсията е широко разпространена форма на колоидно дисперсните системи. Известно е, че тя е термодинамично неустойчива система, изградена от две течни фази. От момента на нейното образуване започва спонтанно разрушаване на емулсионната структура. Този процес е следствие от микроскопичните процеси, като флокулацията и коалесценцията, които от своя страна благоприятстват макроскопският процес на кремиране или седиментация. Информацията за микроструктурата позволява да се контролират тези процеси и правилно да се приложат необходимите стабилизатори и добавки, с цел въздействие върху емулсионните свойства и повишаване на стабилността на емулсията [1-3].



Фигура 1. Схема на процесите на дестабилизация на емулсионните системи

Основна цел на настоящата работа е да се проследят процесите, които протичат в емулсионните системи и водят до тяхното разрушаване във времето, с помощта на микроскопски метод за анализ на структурата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Методиката за изследване на процесите флокулация и коалесценция е демонстрирана, като е използвана моделна 5 % слънчогледово масло във вода (M/W) емулсия, стабилизирана с 1 % (тегл.) Tween 80. Пробите са взети от обема на емулсията, след като е отстранен „cream“ слоя, а долната част е хомогенизирана. Методиката за проследяване на кинетиката на процеса кремиране се прилага върху моделна 20 % M/W емулсия, чиято маслена фаза, представлява смес от маслиново – 49 % (обемни) и слънчогледово масло 51 % (обемни). Използваният емулгатор (Tween 80) е с концентрация 1.0 % (тегл.). За анализа са взети преби в различно време (0, 2, 4, 24 и 48 h), от положение 20, 40, 60 и 80 mm спрямо дъното на емулсията.

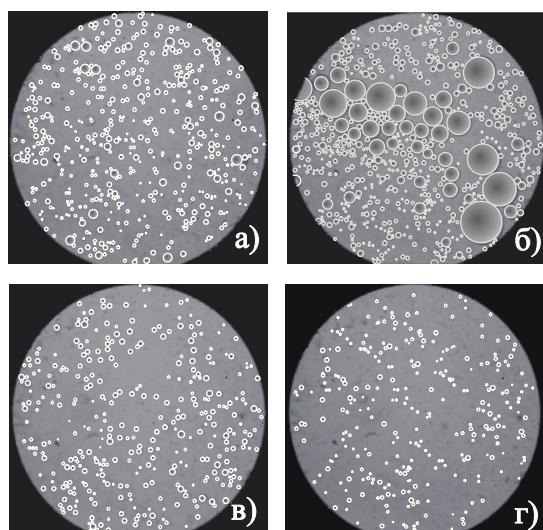
За всяка взета проба е извършен качествен и количествен анализ на микроструктурата и е проследена нейната промяна за период от 48 часа. За целта е приложен разработеният микрофотографски метод [4] и е анализирано количеството на маслената фаза в нея [5].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На фиг. 2 са показани по една от микрофотограмите, заснети при 600-кратно увеличение на микроскопа в началния момент на пригответяне на емулсията (0 h), след 4, 24 и 48 h. От тях се вижда, че след 4 h е настъпило уедряване и

групиране на частиците на дисперсната фаза във флокули, т.е. протекли са процеси на флокулация и коалесценция.

За период от 24 h на повърхността на емулсията, в резултат на кремирането, се образува по-концентриран „cream“-слой. Заедно с отстраняване на „cream“-слоя са отстранени и по-едрите капки и агрегати, които се виждат на фиг. 2 б и след 24 h вече са кремирали. Това се потвърждава и от микрофотограмите показвани на фиг. 2 в и 2 г, в които ясно се вижда монодисперсна емулсия.



Фигура 2. Микрофотограми на 5 % M/B емулсия заснети:

- а) непосредствено след нейното приготвяне, б) след 4 h,
в) след 24 h и г) след 48 h.

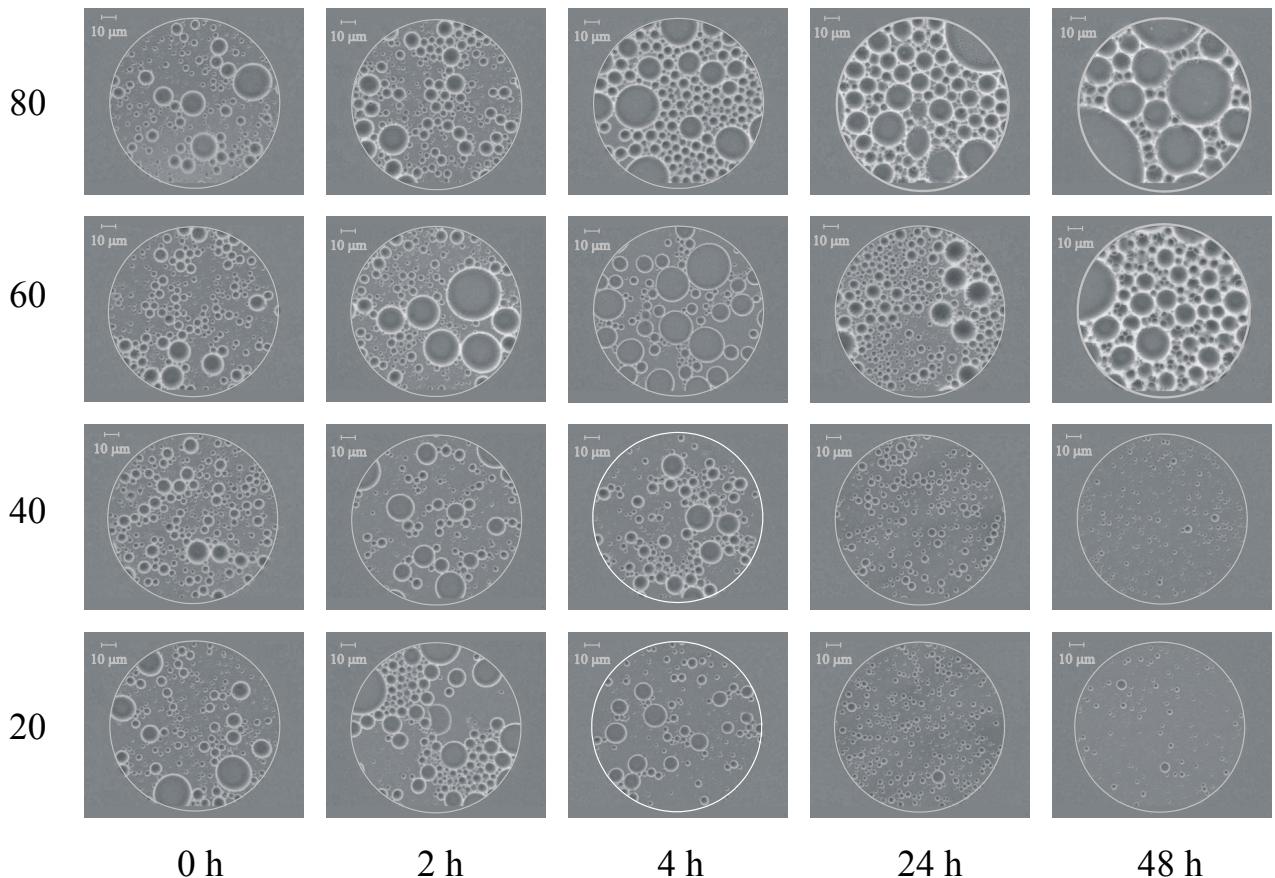
Микрофотограми, заснети при 1500–кратно увеличение, са използвани за по нататъшен количествен анализ.

Получените експериментални данни за средните стойности на радиуса (\bar{r}) и логаритъма от радиуса (\bar{l}), стандартните отклонения (s_l) и статистическите грешки на всички скаларни величини (табл. 1), носят информация както за микроструктурата на емулсията, така и за различните дестабилизиращи процеси, които са протекли до този момент. При изследване на микроструктурата след четвъртия час е установено увеличаване на средният размер на дисперсните частиците с 69 % (от 1.14 μm на 1.93 μm).

Таблица 1. Средни стойности на радиуса и логаритъма от радиуса, стандартните отклонения и грешки на 5 % M/B емулсия, стабилизирана с 1.0 % Tween 80

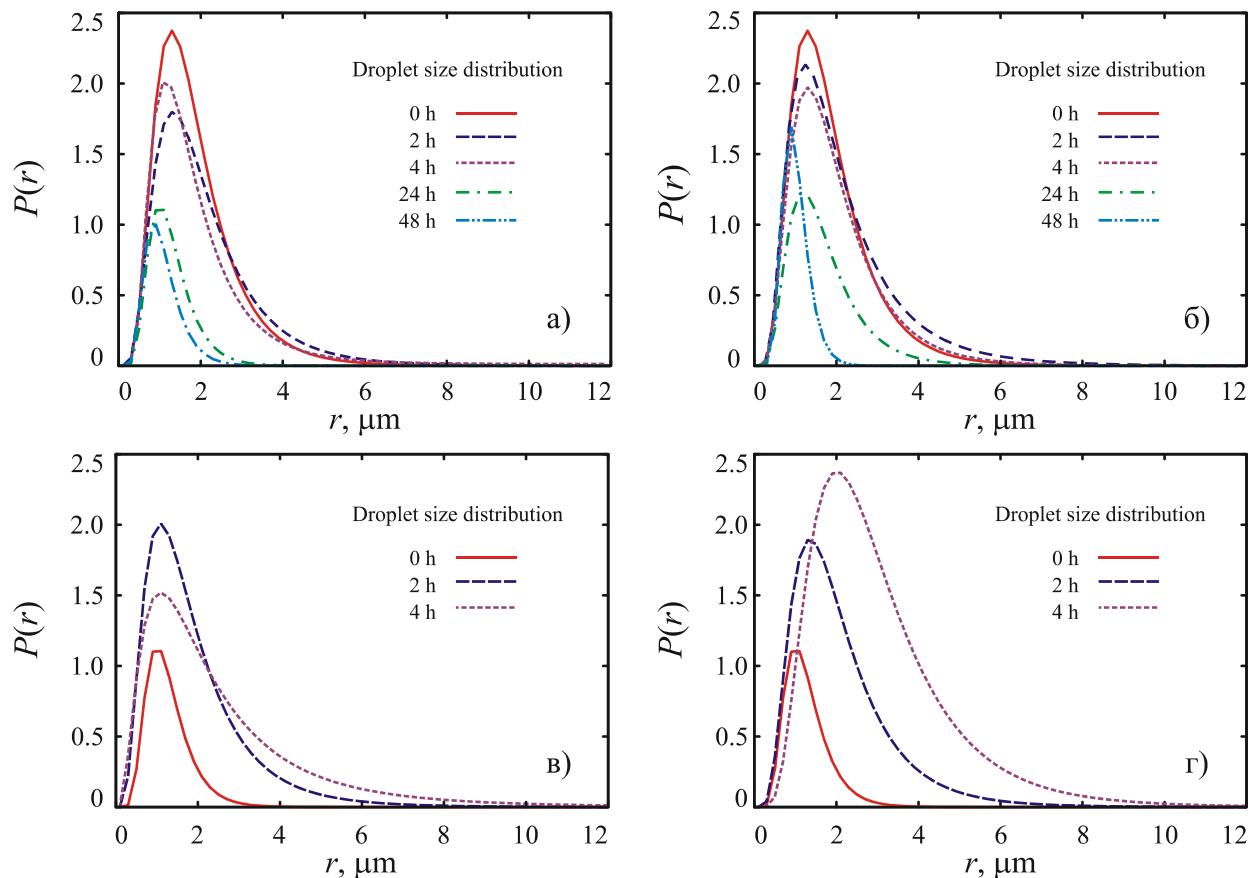
t, h	$\bar{r}, \mu\text{m}$	\bar{l}	s_l	стандартна грешка	брой анализирани частици
0	1.142	0.133	0.530	0.026	432
4	1.928	0.656	0.471	0.018	313
24	1.308	0.268	0.556	0.035	258
48	0.977	-0.023	0.308	0.025	336

След 48 часов период на съхранение, средният размер на останалите в обема на емулсията дисперсни частици, е намалял наполовина (с 50.8 %) – от 1.93 μm на 0.98 μm . Тези промени в размерите на дисперсните частици се дължат на протеклите в емулсионната система процеси на коалесценция и последвал процес на кремиране, които се ускоряват и с протичане на процеса флокулация (фиг. 2).



Фигура 3. Микрофотограми на 20 % M/V емулсия заснети при 1500-кратно увеличение на микроскопа. Пробите са взети на височина 20, 40, 60 и 80 mm спрямо дъното на емулсията, след 0, 2, 4, 24 и 48 h

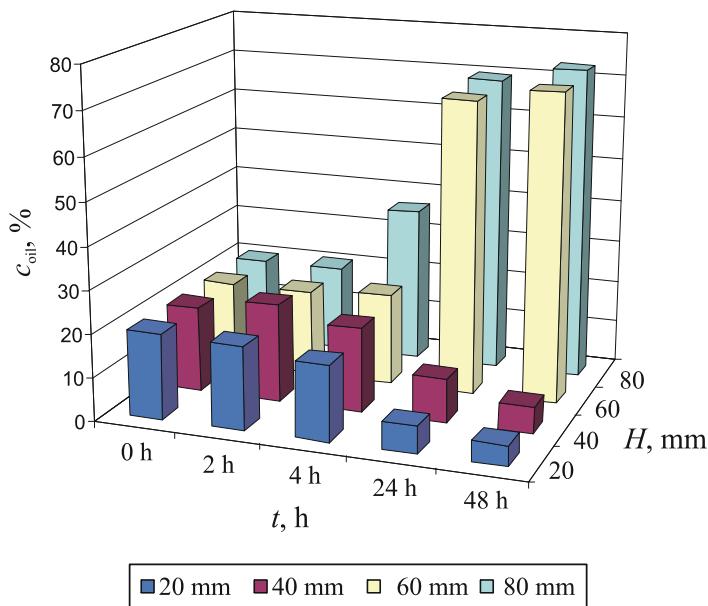
Един от основните показатели за формиране на оценка за кремиращата устойчивост е изменението на микроструктурата на емулсионните системи във вертикална позиция, по време на нейното съхранение. Затова беше изследвано, както качествено, така и количествено изменението на микроструктурата в продължение на 48 часа. С аналитични криви са представени логаритмично-нормалните разпределения на частиците по размер (фиг. 4), които дават зависимостта на плътност на разпределение на частиците по брой ($P(r)$) в зависимост от техния радиус (r).



Фигура 4. Аналитични криви на логаритмично-нормални разпределения на частиците по размер. Пробите от 20 % M/B емулсия са взети на височина а) 20 mm; б) 40 mm; в) 60 mm и г) 80 mm спрямо дъното на емулсията след 0, 2, 4, 24 и 48 h

Друг информативен показател е количеството маслена фаза в различни участъци на емулсията. Затова беше проследено изменението на концентрацията на маслената фаза във времето, като функция от височината на слоя, във вертикална позиция спрямо дъното на цилиндъра. Експерименталните резултати са представени в графичен вид на фиг. 5.

От графиката се вижда, че след 4^{-тия} час започва да протича процес на кремиране, вследствие, на който до 24^{-тия} час се образуват два слоя – по-богат и по-беден на дисперсни частици, разделени помежду си с граница на височина между 40 и 60 mm. Въпреки, че тази граница съществува още при 24^{-тия} час (фиг. 3 и фиг. 5), тя става забележима едва след 48^{-мия} час на височина 53 mm спрямо дъното на цилиндъра, в който е съхранявана изследваната емулсия. Следователно микрофотографският метод показва настъпилото разрушаване на дисперсната система, преди още то да е макроскопски забележимо.



Фигура 5. Разпределение на количеството маслена фаза на 20% M/B емулсия в различни нейни слоеве ($H = 20, 40, 60$ и 80 mm), пробы от които са взети в различно време (0, 2, 4, 24 и 48 h)

ИЗВОДИ

1. Доказано е, че микрофотографският анализ може да намери приложение при проследяване на динамиката на процесите свързани със стабилността на емулсиите. По този начин могат да се съпоставят различни емулсии по отношение на тяхната стабилност.
2. Показано е, че процесите флокулация и коалесценция ускоряват процеса кремиране и обратно. Скоростта на кремиране протича сравнително по-бързо поради повишения размер на дисперсните частици и/или образуване на агрегати.
3. Във вертикална позиция са установени връзки между динамиката на кремиране на дисперсните частици и изменение на количеството маслена фаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. J. McClements, Lipid-Based Emulsions and Emulsifiers., *Food Lipids*, (2002), Dekker, N. Y., 81-119
2. D. J. McClements, Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques, (2005), CRC Press, p. 595.
3. Morrison, I. D., S. Ross, Colloidal dispersions: Suspensions, emulsions, and foams, (2002), John Wiley&Sons, New York, p.656.
4. И. Василева, Д. Димитров, Й. Алексиева, Н. Раев, Полуавтоматизиран метод за анализ на микроструктурата на колоидни системи, Технически Университет – София, Филиал Пловдив, Международна научна конференция – техника, технологии и системи – ТЕХСИС`2009, Пловдив, 29–30 Май 2009, 389 ÷ 393.
5. Цв. Хаджийски, М. Перифанова-Немска, *Производство на растителни масла*, Макрос 2000, Пловдив, (1994), 155 стр.

SOAP BUBBLE ELASTICITY: ANALYSIS AND CORRELATION WITH FOAM STABILITY

Stoyan I. Karakashev^{1*}, Roumen Tsekov¹, Emil D. Manev¹
and Anh V. Nguyen²

¹Department of Physical Chemistry, Sofia University,
1 James Bourchier av., Sofia 1164, Bulgaria

²School of Chemical Engineering, The University of Queensland, Brisbane,
Queensland 4072, Australia

ABSTRACT

A correlation between the elastic modulus of soap bubble and the foam stability was found. A model system was chosen – a soap bubble stabilized by simple nonionic surfactant tetraethylene glycol octyl ether (C_8E_4) and 10^{-5} M NaCl.

The Elastic moduli were determined by periodical expansion and shrinking of foam bubbles with frequency of 0.1 Hz and volumetric amplitude of 2 mm³. The film tension was monitored via commercial profile analysis tensiometer (Sinterface Technologies, GmbH). The elastic moduli of foam bubbles versus surfactant concentration in the range of $2 \times 10^{-3} - 10^{-2}$ M were obtained. In addition, the theory of Lucassen and van den Tempel [1] for the elastic modulus of single liquid/air interface at given frequency was exploited as well. The bulk diffusion coefficient of the surfactant molecules is unknown parameter through the adsorption frequency in this theory. Hence, a fitting procedure (with one free parameter) was conducted matching experimental and theoretical data. The value of the bulk diffusion coefficient of C_8E_4 obtained was 5.1×10^{-11} m²/s, which is an order of magnitude lower value than what is expected for. The foam was generated by shaking method and left to decay. A correlation between the elastic modulus and foam life time upon surfactant concentration was found.

Key words: elastic modulus, Gibbs elasticity, foam films, soap bubble, adsorption frequency

INTRODUCTION

The studies on elastic moduli of adsorption layers on Air/Water interface originate from the pioneering works of Lucassen and van den Tempel [2, 3] (in Langmuir through), and Lunkenheimer et al. [4-10] (oscillating bubble method). The two approaches are in theoretical agreement. A good review on the basic methods for studying the rheology of adsorption layers can be found in Ref. [11]. The oscillating bubble method consists in the following: A small bubble is fixed at the tip of capillary, which is immersed in the surfactant solution and connected to a gas compartment. The latter is excited to harmonic oscillations by piezo-drive vibrating

with a given frequency and small amplitudes. The pressure in the gas compartment, the cross-sectional area and the amplitude of the bubble (variation of bubble length) are measured as a function of the excitation frequency. Hence, the phase shift between the excitation signal and the bubble response is measured at different frequencies. The elastic and the loss moduli can be determined by this procedure.

Other authors contributed later for advancing the theory and the experiment of the oscillation bubble method as well [12-18]. Wantke and Fruhner applied this method to determine the dilatational viscosity of the surfactant adsorption layer [19]. Kovalchuk et al. [20] performed detailed analysis indicating that the shape of the frequency – amplitude characteristics depends on the bubble volume and the surfactant concentration up to frequency of 400 Hz.

Meanwhile Bianco and Marmur [21] developed new experimental approach for measuring the Gibbs elasticity of oscillating soap bubble. This methodology is based on the determination of the film tension upon the expansion and shrinking of the soap bubble surface with a given low frequency. The methodology was advanced by Kovalchuk et al. [22]. The inhomogeneous distribution of the soap bubble liquid due to gravity was accounted for. In contrast to the numerous works on the visco-elastic moduli of single gas/liquid surface layers, the literature data on elasticity of soap bubbles remained scarce. In addition, open questions on the origin of the Gibbs elasticity of foam films remained as well. For example, it is not clear why the tension of thick foam films (~2–3 microns) varies upon the change of the film surface area with speed much lower than the speed of relaxation of the adsorption layer. Obviously the electrostatic disjoining pressure should not have any contribution at such high thickness. Hence, it should not be any depletion of surfactant molecules in such kind of foam films. Consequently the approach of Lucassen and van den Tempel could be applied. The present work is devoted to studying the elastic modulus of soap bubbles in a given surfactant concentration range and to study any possible correlation with the foam lifetime. The applicability of Lucassen and van den Tempel approach was critically evaluated.

EXPERIMENTAL

The elasticity of soap bubbles produced by aqueous solutions of C₈E₄ (produced by Sigma-Aldrich Ltd) in the concentration range of $2 \times 10^{-3} - 10^{-2}$ M and in the presence 10^{-5} M NaCl (produced by Sigma-Aldrich Ltd), was measured. The temperature during the experiment was kept constant at 25°C.

The surface tension isotherm was determined by the Harkins-Brown method [23].

All the measurements were obtained using a commercially available profile analysis tensiometer, (PAT 1 D module of Sinterface Technologies, Ltd., Germany) with a frequency of 0.1 Hz and amplitude of 2 mm³. The tensiometer consists of (1) a *mechanical unit* for creating and controlling the test fluid–liquid interface in a 2 cm x 2 cm x 2 cm cuvette made of optical grade silica, (2) an *optical unit* for monitoring the evolution of the interface profile and (3) a *computer* with the Sinterface software, PAT-1D and a data acquisition system for operating the instrument, storing the raw data for the interface profiles, and processing the data off-line. The mechanical unit has a water bath for controlling the temperature. The soap bubble is produced (see Fig.1) by a dual

tube – a narrower internal tube situated in a wider external tube. A syringe controls the surfactant solution flowing in the external tube, while air flows through the internal tube, controlled by another syringe. The two syringes are mounted on the panel of a motorized pump, controlled by the computer. Once formed, the soap bubble was illuminated, equilibrated and its image was captured by the CCD video camera, stored, and processed by the computer software. The edge (the interface profile) of the bubble was digitally identified with sub-pixel resolution and fitted with the numerical solution of the Young–Laplace equation, allowing the determination of the film tension, volume and area of the bubble. The cyclic time dependence of film tension was determined by changing the bubble volume as a sinusoidal function of time.

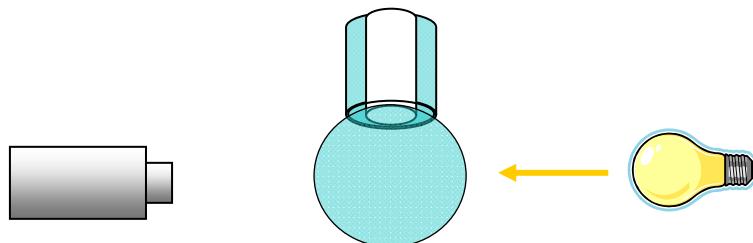


Figure 1. Sketch of the Profile analysis tensiometer system for studying elastic modulus of soap bubble (not to scale).

The shaking test method was used to determine the foam stability. It includes standartized (10-fold) shaking of flask of 50 ml volume, containing 20 ml of the studied solution. The time interval from the formation of foam to the appearance of free water surface is measured. This operation is repeated 10-times, and an average value of the foam decay time is obtained. This method is very simple to use and gives sufficiently good reproducibility. The surface tension isotherm was determined by the Harkins-Brown method [23].

RESULTS AND DISCUSSION

The surface tension isotherm (see Fig.2) of C_8E_4 was measured by Wilhelmi plate method.

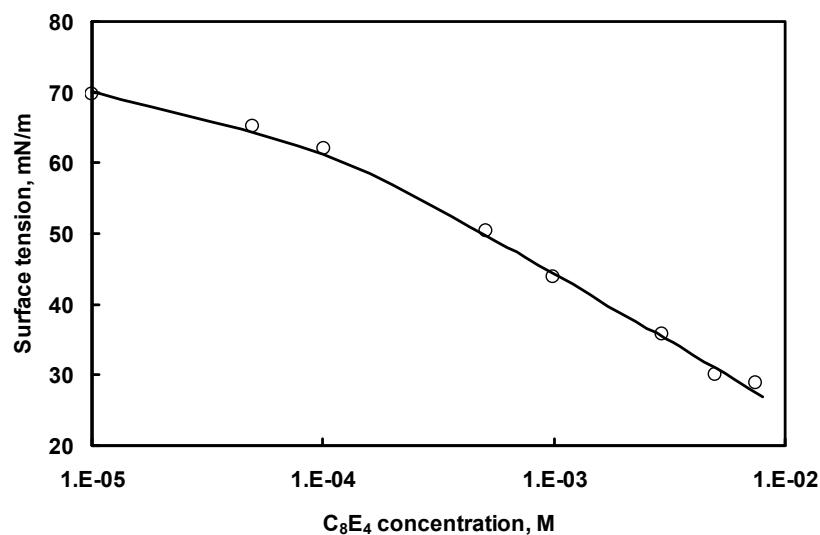


Figure 2. Surface tension isotherm of C_8E_4 – experimental (circles) and computed.

The experiments on expanding a soap bubble were conducted in the concentration range of 2×10^{-3} – 10^{-2} M C₈E₄. At lower surfactant concentrations the data were either or the soap bubbles were not stable. The film tension and the doubled surface tension values are presented in Fig.3.

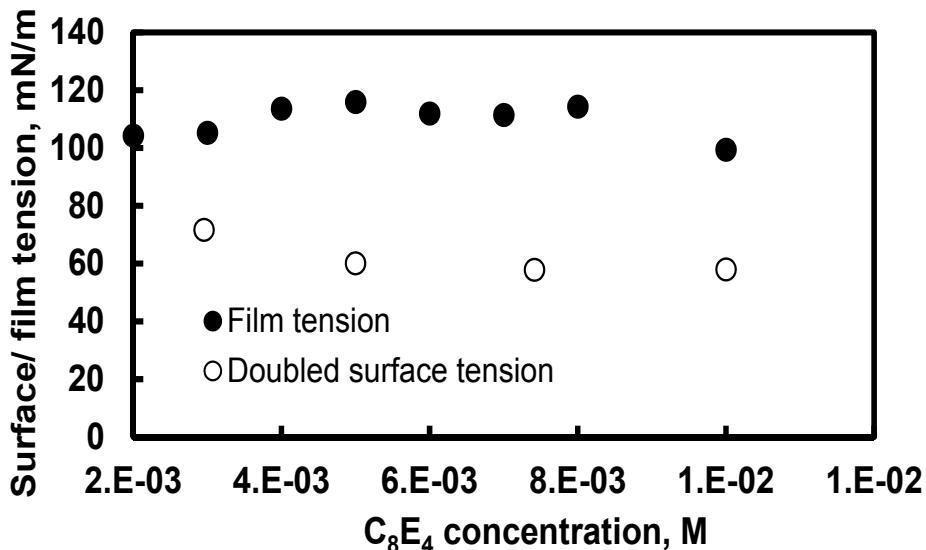


Figure 3. Film tension and surface tension (doubled value) isotherms of C₈E₄ aqueous solutions.

One can see that values of the film tension are larger than the doubled values of the surface tension. According to Refs. [21] and [22] the film tension is a function of the total area of the soap bubble. By the present experimental procedure conducted with the commercial Profile Analysis Tensiometer (PAT 1 D module of Sinterface Technologies, Ltd., Germany), expressed in periodical expansion and contraction of the soap bubble with frequency of 0.1 Hz, an average value of the film tension and Gibbs elasticity is produced.

These experimental data were processed with the Szyskowski-Langmuir equation of state:

$$\sigma = \sigma_0 - \Gamma_\infty RT \ln(1 + kc) \quad (1)$$

Fitting procedure with two matching parameters Γ_∞ and k was conducted via „Solver” option of Microsoft Excel. The theoretical curve is situated in Fig.1. The obtained values of the fitting parameters are $\Gamma_\infty = 3.42 \times 10^{-6}$ mol/m² and $k = 25$ m³/mol. Equation (1) is equivalent to the following equation of state:

$$\sigma = \sigma_0 + \Gamma_\infty RT \ln\left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_\infty}\right) \quad (2)$$

where Γ_∞ is the surfactant adsorption at CMC. Hence the Gibbs elasticity of the soap bubble can be calculated by the expression:

$$E_G = 2\epsilon_0 = -2\Gamma \frac{d\sigma}{d\Gamma} = \frac{2RT\Gamma_\infty\Gamma}{\Gamma_\infty - \Gamma} \quad (3)$$

Eq.(2)) can be transformed in the following expression:

$$\frac{2\epsilon}{E_G} = \frac{1}{\sqrt{1 + 2\sqrt{\omega_0/\omega} + 2\omega_0/\omega}} \quad (4)$$

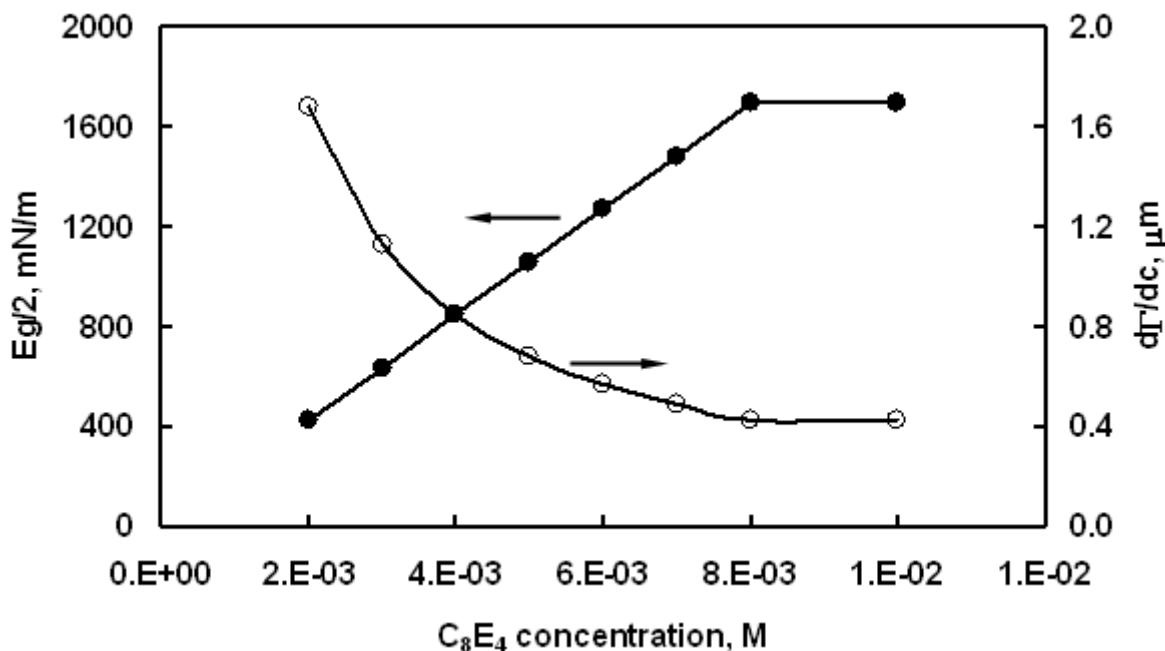


Figure 4. Gibbs elasticity of the single air/water surface $E_g/2$ and the adsorption length $d\Gamma/dc$ as a function of the surfactant concentration.

The values of the Gibbs elasticity of single air/liquid interface and the adsorption length, calculated from the surface tension isotherm using the model of Szyskowski-Langmuir are presented in Fig. 4. These values are utilized further in Eqs. (2) and (3) to calculate $2\varepsilon/E_G$.

The diffusion coefficient D (see Eq.(3)) of C_8E_4 molecules in the soap bubble is unknown parameter in Eq.(4). Hence the ratio $2\varepsilon/E_G$ and experimental data E_{exp}/E_G can adjusted by fitting of the unknown parameter the diffusion coefficient D .

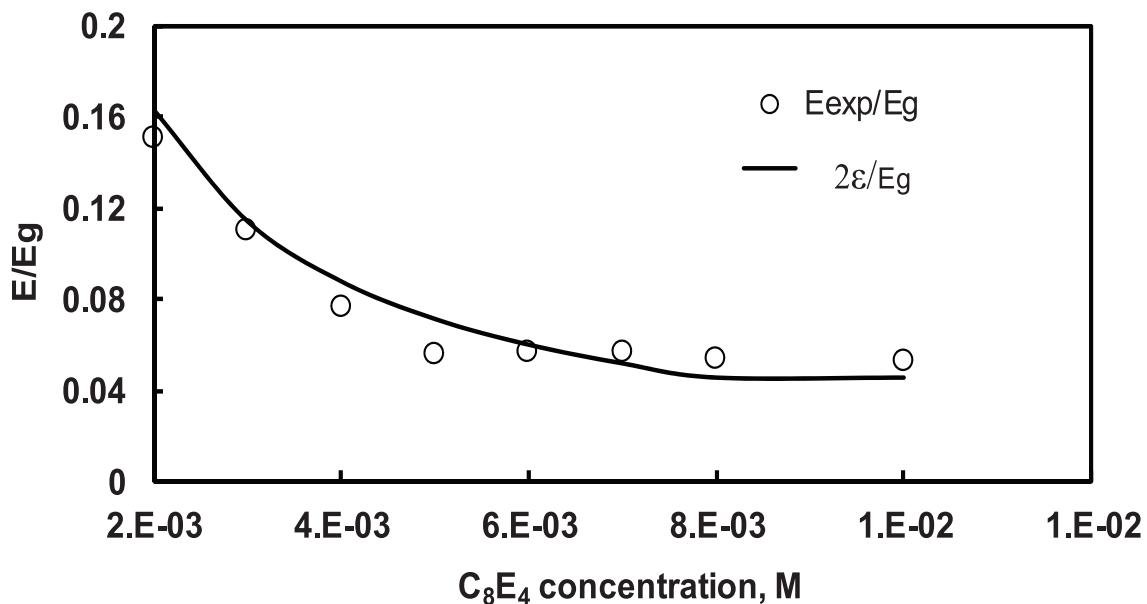


Figure 5. Experimental E_{exp}/E_g and theoretical $2\varepsilon/E_g$ (obtained by adjusting D) ratios versus C_8E_4 concentration.

The experimental E_{exp} / E_G and the theoretical $2\varepsilon / E_G$ ratios versus the surfactant concentration are presented in Fig.5. The fitting procedure gave a value of the bulk diffusion coefficient of $C_8E_4D = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, which is an order of magnitude lower, than what was expected for. Fig. 4 shows that the values of the elastic moduli are substantially lower than the values of the Gibbs elasticity obtained by the surface tension isotherm. In addition, the ratio E_{exp} / E_G decreases upon the increase of the C_8E_4 concentration until reaching plateau before the CMC. This result is in accord with Refs.[19, 24], reporting deviations of the values of elastic moduli from these ones of the Gibbs elasticity, when the model of Lucassen and van den Tempel is applied to bubbles oscillating with high frequency.

The values of the Gibbs elasticity and the Foam life-time versus C_8E_4 concentration is presented in Fig. 6.

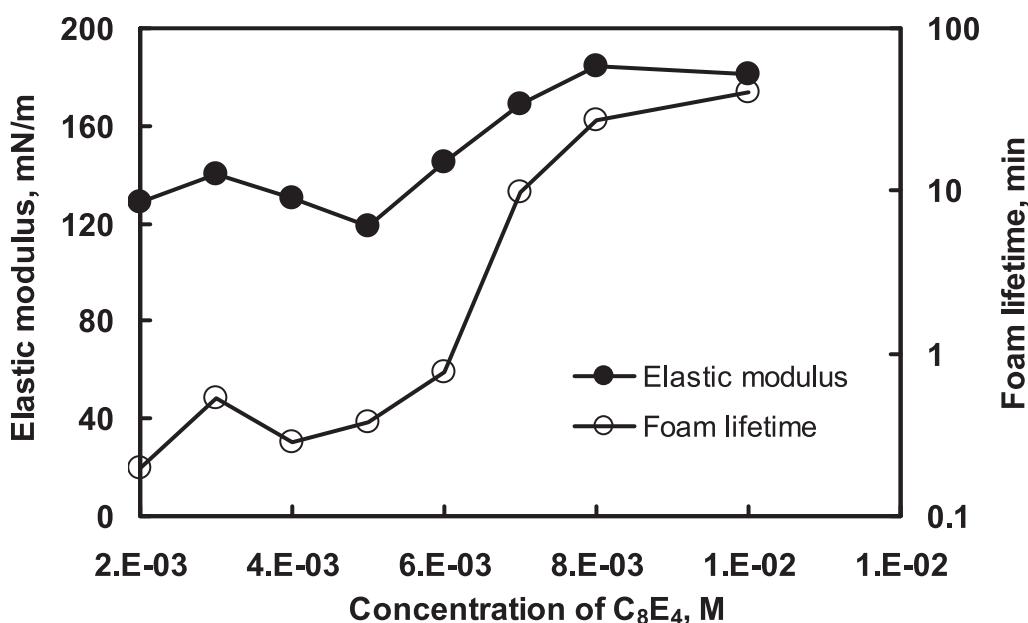


Figure 6. Gibbs elasticity and foam life-time as a function of C_8E_4 concentration

One can see clear correlation between the foam lifetime and the elastic modulus curves. It should be noted here that the elastic modulus values obtained by this method are averaged, due to the variable in time film thickness inhomogeneity over the soap bubble during its expansion and shrinking.

CONCLUSIONS

This paper is dedicated on studying the elasticity of soap bubbles. Although numerous works have been devoted to investigation the rheology of the surface adsorption layers, there are still obscure sides of their behavior. For example, it is not clear the origin of the surfactant depletion in thick foam films (in order of several microns), causing variation of the film tension at slow expansion or shrinking of the film surface. In addition, according to the literature data (e.g. Ref. [24]) the elastic modulus at high frequency of bubble oscillation is not equivalent to the Gibbs elasticity, calculated from the surfactant surface tension isotherm. In addition, the literature data on soap bubble surface rheology are very scarce. Our study showed

that the film tension values of soap bubbles prepared from C₈E₄ aqueous solutions are larger than the doubled values of the surface tension. The elastic moduli values were significantly lower than the values of the Gibbs elasticity, calculated by the surface tension isotherm. Our fit of the ratio $2\epsilon / E_G$, calculated with the model of Lucassen and van den Tempel (Eqs. (2) and (3)), and experimental data E_{exp} / E_G gave value of the bulk diffusion coefficient of the surfactant molecules $D = 5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, which significantly lower than what is expected for C₈E₄ molecules. All this indicates that there is an exchange of the surfactant molecules ($2\epsilon < E_g$) between the film surfaces and the bulk of the film, but it is impeded by some unknown factor. In addition, it is very possible increased viscous dissipation of the film liquid during the oscillation soap bubble oscillation as compared to the case of the surface of semi-infinite bulk phase (e.g. bubbles or drop). In addition, a strong correlation was found between the foam lifetime and the elastic modulus of soap bubbles. In short, the higher the elastic modulus, the longer living foam is.

Acknowledgment. Stoyan Karakashev thanks the EC/‘Marie Curie Actions’ for the financial support of the work through the DEFFED – Project No. 230626/2009.

REFERENCES

1. Lucassen, J., M. Van Den Tempel, Chem. Eng. Sci., 27 (6) (1972) 1283-1291.
2. Hansen, R. S., J. A. Mann, J. Appl. Phys., 35 (1) (1964) 152.
3. Hansen, R. S., J. Lucassen, R. L. Bendure, J. P. Bierwagen, J Colloid Interface Sci, 26 (1968) 198.
4. Kretzsch, G., K. Lunkenheimer, Berichte Der Bunsen-Gesellschaft Fur Physikalische Chemie, 74 (10) (1970) 1064-&.
5. Lunkenheimer, K., G. Kretzschmar, Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Leipzig, 256 (4) (1975) 593-605.
6. Wantke, K. D., R. Miller, K. Lunkenheimer, Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Leipzig, 261 (6) (1980) 1177-1190.
7. Lunkenheimer, K., C. Hartenstein, R. Miller, K. D. Wantke, Coll. Surf., 8 (3) (1984) 271-288.
8. Lunkenheimer, K., R. Miller, Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Leipzig, 265 (1) (1984) 71-80.
9. Malysa, K., K. Lunkenheimer, R. Miller, C. Hempt, Coll. Surf., 16 (1) (1985) 9-20.
10. Wantke, K. D., K. Lunkenheimer, C. Hempt, J Colloid Interface Sci, 159 (1) (1993) 28-36.
11. Miller, R., R. Wustneck, J. Kragel, G. Kretzschmar, Coll. Surf. A, 111 (1-2) (1996) 75-118.
12. Gottier, G. N., N. R. Amundson, R. W. Flumerfelt, J Colloid Interface Sci, 114 (1) (1986) 106-130.
13. Avramidis, K. S., T. S. Jiang, J Colloid Interface Sci, 147 (1) (1991) 262-273.
14. Johnson, D. O., K. J. Stebe, J Colloid Interface Sci, 168 (1) (1994) 21-31.
15. Warszynski, P., K. D. Wantke, H. Fruhner, Coll. Surf. A, 139 (2) (1998) 137-153.

16. Kovalchuk, V. I., E.K. Zholkovskij, J. Kragel, R. Miller, V. B. Fainerman, R. Wustneck, G. Loglio, S. S. Dukhin, *J Colloid Interface Sci*, 224 (2) (2000) 245-254.
17. Earnshaw, J. C., M. W. D. Grattan, K. Lunkenheimer, U. Rosenthal, *J Phys Chem B*, 104 (12) (2000) 2709-2713.
18. Zholkovskij, E.K., V.I. Kovalchuk, V.B. Fainerman, G. Loglio, J. Kragel, R. Miller, S. A. Zholob, S. S. Dukhin, *J Colloid Interface Sci*, 224 (1) (2000) 47-55.
19. Wantke, K. D., H. Fruhner, *J Colloid Interface Sci*, 237 (2) (2001) 185-199.
20. Kovalchuk, V. I., J. Kragel, A. V. Makievski, G. Loglio, F. Ravera, L. Liggieri, R. Miller, *J Colloid Interface Sci*, 252 (2) (2002) 433-442.
21. Bianco, H., A. Marmur, *J. Coll. Interface Sci.*, 158 (2) (1993) 295-302.
22. Kovalchuk, V. I., A. V. Makievski, J. Kragel, P. Pandolfini, G. Loglio, L. Liggieri, F. Ravera, R. Miller, *Coll. Surf. A*, 261 (1-3) (2005) 115-121.
23. Mori, Y. H., *Aiche Journal*, 36 (8) (1990) 1272-1274.
24. Ortegren, J., K. D. Wantke, H. Motschmann, H. Mohwald, *J Colloid Interface Sci*, 279 (1) (2004) 266-276.

VITAMIN CONTENT AND FATTY ACIDS COMPOSITION OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Stancheva M., Dobreva D., Merdzhanova A., Galunska B.
Medical University of Varna, 55 Marin Drinov St., 9000 Varna
didobreva@gmail.com

ABSTRACT

The aim of present study is to evaluate the composition and the content of fatty acids (FA) and fat soluble vitamins (A, E, D₃) in the edible tissue of farmed rainbow trout from the region of Central Bulgaria.

All-trans-retinol (vit. A), cholecalciferol (vit. D₃) and α-tocopherol (vit. E) were analyzed simultaneously using HPLC system with UV (vitamin A and D₃) and fluorescence detection (vitamin E). The sample preparation procedure includes saponification and liquid-liquid extraction of the unsaponifiable matter. Total lipids were extracted according to Bligh and Dyer method. Analysis of fatty acid methyl esters were performed using gas chromatography system with MS detection.

It was found that the lipid fraction contains substantial amounts of palmitic, palmitoleic, stearic, linolenic, arachidonic and docosahexaenoic fatty acids and fat-soluble vitamins. The retinol content in the fresh edible tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was 22.3±2.0 µg/100g; cholecalciferol – 6.0±0.29 µg/100g and α-tocopherol – 809.1± 56.0 µg/100g.

Linoleic acid (15.81%), docosahexaenoic acid (9.40%) and arachidonic acid (4.21%) were the most dominant polyunsaturated fatty acids, about 33% of total FA content. Palmitic acid (12.93%), tetracosanoic acid (3.76%) and oleic acid (3.57%) were found to be the dominant of the saturated and unsaturated FA in rainbow trout fillets.

Keywords: fat-soluble vitamins, PUFA, HPLC, GS/MS, trout

INTRODUCTION

Fish tissue is a good source of fats, proteins, vitamins and minerals and important component of balanced diet. Omega-3 and omega-6 fatty acids (FA), as well as fat-soluble vitamins are essential compounds of fish lipids and exclusively provided by the diet.

Being component of membrane lipids, the essential FAs maintain the integrity, flexibility and permeability of membranes, provide substrate for the biosynthesis of biologically active eicosanoids. It has been shown that omega-3 FAs exert antihypertensive, antiarrhythmic, antidepressive, and immunomodulatory effect. Acting as an-

tiatherogenic substances they can reduce the risk of ischemic heart disease. Along with omega-3 fatty acids, omega-6 fatty acids play a crucial role in brain function as well as normal growth and development. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs), stimulate skin and hair growth, regulate metabolism, and maintain bone and reproductive health.

The fat-soluble vitamins are essential nutrients controlling a diversity of biologically important processes in human body. Vitamin A, also called retinol, takes place in photoreception and regulates gene expression and cell division, bone growth, teeth development, reproduction etc. Vitamin D₃ (cholecalciferol) plays crucial role in the regulation of calcium – phosphate balance stimulating calcium absorption by the small intestine and thus regulating bone metabolism. The biologically active isomer of vitamin E – alpha-tocopherol (α-TP) acts as an antioxidant, protecting membrane structures, essential fatty acids, and vitamins A and C from oxidation.

Being one of the major sources of omega-3 PUFA and fat-soluble vitamins A, D₃ and E, fish production by fish farming attains great economical importance. On the other hand, the worldwide decline of ocean fisheries stocks has provided impetus for rapid growth in fish and shellfish farming, or aquaculture [1].

Due to its economical importance, one of the most widely farmed fish in our country is the rainbow trout. Home of this fish is North America, where it inhabits cold and clear freshwater ponds. Trout is the preferred fish species for breeding and consumption because of its rapid growth and rich and diverse composition of the meat [2]. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a predator with a varied diet – eats almost anything. Rainbows are not quite as piscivorous or aggressive as brown trout or lake trout (char). Larger fishes are active predators – they feed with fish including young brown trout, rainbow trout, shad and whitefish. They also eat small terrestrial animals that fall into the water.

Since the fish tissue is a valuable source of essential nutrients, a detailed analysis for evaluation the nutrient composition and content, and the effect of various factors (location, season of catch, water salinity, age, sex, part of the body, size and feeding) on fish lipids is needed.

The aim of present study is to evaluate the composition and the content of fatty acids (FA) and fat-soluble vitamins (A, E, D₃) in the edible tissue of farmed rainbow trout from the region of Central Bulgaria.

MATERIALS AND METHODS

Collection of fish species

Samples of rainbow trout fish species, caught from fish farm (Plovdiv region, Hvoyna village), which were fed on commercial feed mixtures, were purchased from Varna fish market during March 2010. Three specimens of trout with average length of 21-28 cm and weight of 300 ± 30 g (three years old) were used as raw material for FA and vitamin analysis. Biological characteristics of fish species were determined and noted.

FA ANALYSIS

Lipid extraction

Prior to analysis, the head, tail, fins, and viscera of the fish were removed. The edible tissue was filleted with the skin left on and homogenized. Aliquots of freshly prepared homogenate (5,00g) were extracted by the method of Blight and Dyer [3] using chloroform/methanol/water in a ratio 2:2:1. After phase separation, the chloroform extracts were evaporated to dry residue and were quantified by weight. The total lipid content was determined gravimetrically.

Preparation of FA methyl esters

The dry residue of the chloroform fraction was methylated by base-catalyzed transmethylation using 2M KOH in methanol and n-hexane [4]. After centrifugation (3500 rps), the hexane layer was separated and analyzed by GC-MS.

GS-MS analysis

Gas chromatography was performed by a model FOCUS Gas Chromatograph with autosampler A 2000, equipped with Polaris Q MS detector (Thermo Scientific, USA). The capillary column used was a TR-5 MS (Thermo Scientific, USA) universal column 30 m length and 0.25mm i. d., with a wide range of applications of food analysis. Helium was used as a carrier gas at flow rate 1 ml/min. Peaks were identified according to two parameters: Retention Time (RT) based on available fatty acid methyl esters (FAME) mix standard (SUPELCO F.A.M.E. Mix C4-C24) and mass spectra (ratio m/z) – compared to internal Data Base (Thermo Sciences Mass Library, USA). FAMEs were identified and quantified by comparison with the RT and peak areas of SUPELCO standards. All chemicals used were of analytical and GC grade (Sharlau, Spain).

ANALYSIS OF FAT-SOLUBLE VITAMINS

Saponification and extraction

The sample preparation was performed using the method of Sanchez-Machado et al [5] with slight modifications.

An aliquot of the homogenized sample (1,00g) was weighed into a glass tube with a screw cap and 1% of methanolic L-ascorbic acid and 1M methanolic potassium hydroxide were added. Three parallel samples of fish edible tissue were prepared and subjected to saponification at 80°C for 20 min. The non-saponified components were extracted with n-hexane and the extract was evaporated under nitrogen. The dry residue was dissolved in MeOH and injected (20 µl) into the liquid chromatograph system.

HPLC conditions

We used reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) for the vitamin analysis. Three fat-soluble vitamins A, D₃ and E were analyzed simultaneously using HPLC system (Thermo Scientific Spectra SYSTEM) equipped with

analytical column ODS2 Hypersil™ 250 x 4, 6 mm, 5 μ , UV and fluorescence (vitamin E) detection. The mobile phase was composed of 97:3 = MeOH : H₂O, flow rate 1ml/min. The qualitative analysis was performed by comparing the retention times of pure substances vitamin A and D₃ absorbing at $\lambda_{\text{max}} = 325\text{nm}$ for vitamin A; $\lambda_{\text{max}} = 265\text{ nm}$ for vitamin D₃ and alpha-TP fluorescence at $\lambda_{\text{ex}} = 288\text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 332\text{ nm}$. The quantitation was done by the method of external calibration on the basis of comparing the chromatographic peak areas of the corresponding standards (Retinol solution, Fluka; DL-alpha Tocopherol, Supelco; Cholecalciferol, Supelco).

Statistical analysis

Standard curves for all-trans-retinol, cholecalciferol and α -tocopherol were obtained using six different concentrations of standard solutions in triplicate. Reproducibility, estimated by the coefficients of variation for determinations of ten parallel samples was calculated. For the determination of the analytical recoveries, samples of homogenized fish tissue were spiked with a methanolic solution containing known amounts of three fat soluble vitamins. All samples were analyzed in triplicate. The results were expressed as average and standard deviation (mean \pm SD). Total lipid content of edible tissue was determined for each group ($n = 5$) and the results were present as g per 100 g raw tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

Fat-soluble vitamin content

Our results showed that rainbow trout edible tissue contains highest amounts of alpha-tocopherol, followed by retinol and cholecalciferol (table 1). Data from the Danish data base [6] for fat-soluble vitamin content of farmed rainbow trout are in good agreement with our results. On the other hand Dias M. G. et al, (2003) [7] was found substantially lower content of the vitamin E in wild rainbow trout fresh tissue (table 1).

Table 1. Fat-soluble vitamin content in edible tissue of rainbow trout (mean \pm SD)

Rainbow trout		
α -tocopherol [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	all-trans-retinol [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	Cholecalciferol [$\mu\text{g}/100\text{g}$]
809.1 \pm 56.0	22.3 \pm 2.0	6.0 \pm 0.3
Danish data base		
1100.0	12.3	5.1
[Dias M.G. et al]		
130	8.8	19

The rainbow trout remains the highest source of alpha-tocopherol when compared with some Black sea fish species such as European sprat and goby with alpha-tocopherol content found to be 284.85 \pm 44.50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and 614.90 \pm 40.30 $\mu\text{g}/100\text{g}$, respectively [8].

Since the analytical method revealed good reproducibility (3.42–7.44%, estimated by the coefficients of variation for ten parallel samples) and analytical recoveries (ranges 72.8–92.7%), evaluated after spiking samples with known amounts of standards) and since we used samples of farmed fish species, the only possible reason for the higher content of fat-soluble vitamins is the diet enriched with fat-soluble vitamins.

Fatty acid composition

The fatty acids compositions of rainbow trout are given in Table 2.

Table 2. *Fatty acids profile in edible fish tissue (mean ± SD)*

Unsaturated FA	Mean± SD	Monounsaturated FA	Mean± SD	Polyunsaturated FA	Mean± SD
C 12:0	2.98±0.04	C 14:1	3.64±0.32	C 18:3 n3	4.03±0.28
C 13:0	0.00	C 16:1	4.76±0.8	C 20:5 n3	2.21±0.05
C 14:0	2.03±0.04	C 17:1	0.00	C 20:4 n6	4.21±0.39
C 16:0	12.93±1.02	C 18:1 n 9 t	0.76±0.01	C 20:3 n3	0.00
C 17:0	0.00	C 18:1 n9 c	11.03±0.99	C 20:3 n6	2.31±0.2
C 18:0	3.57±0.26	C 20:1	2.40±0.23	C 20:2	2.09±0.05
C 20:0	3.07±0.1	C 22:1 n9	3.17±0.32	C 22:6 n3	9.40±1.2
C 21:0	0.00	C 24:1	2.78±0.1	C 22:2	0.50±0.01
C 22:0	1.05±0.05	Total MUFA	28.54	Total PUFA	43.13
C 23:0	0.00	C 18:3 n6	3.11±0.24	n – 3	15.64
C 24:0	3.76±0.01	C 18:2 n6 t	2.63±0.3	n – 6	25.44
Total SFA	28.33	C 18:2 n6 c	13.18±2.24	n – 3/n – 6	0.62

The present study indicated that the analyzed trout (12.30 g/100 g raw tissue) could be characterized as highly fat fish.

The FA composition of tissue lipids in fish is strongly influenced by the FA in their dietary lipids [9]. It has been shown that the amount of FA varies widely among the species but in most studies the palmitic (C 16:0) and stearic (C 18:0) acids are the predominant SFA. The total SFA content in Bulgarian rainbow trout (28.33%), was lower than the amount of SFA (25.39%) found by Haliloglu (2002) [10] probably due to the differences in the amounts of palmitic and stearic acids. Our results showed that 80% of total SFA were composed of palmitic acid. In contrast to others our results for some Bulgarian Black sea fish species [8], freshwater fish, as brown trout, shows lower concentration of SFA group. Availability of low level of this fatty acid supports the results published in many similar studies conducted on freshwater fish.

Significant differences were also observed in monounsaturated fatty acid (MUFA) among the fresh water fish species investigated by others. For example,

Haliloglu described 41.90% of total MUFA which is higher than our results – 28.54%. In the other side our results is similar to the result presents in Danish date base for SFA content in rainbow trout (28.50%) [6]. In contrast to other publications we observed similar amounts of SFA and MUFA groups. Among MUFA the highest content was found for oleic acid (40%) followed by palmitoleic acid (16,12%). These results are in a good agreement with the data of Haliloglu [10].

The long chain omega-3 and omega-6 fatty acids commonly called PUFA and their ratios (omega-3/omega-6) are also considered important for the FA composition. The total sum of Omega-6 acids series of the analyzed fish samples was 25.44% of total FA while the sum of omega 3 FA was only 15.64% of total FA. The linoleic acid (cis+trans) was the most dominant FA in the group of PUFAs – 15.81%. Fishes are unable to synthesize any fatty acids of the omega-6 and omega-3 series unless a precursor with this structure is present in the diet. The ability to elongate and desaturate fatty acids is not the same in all fish species. The Omega-3/Omega-6 ratio has been suggested to be a useful indicator for comparing the relative nutritional value of fishes [11]. A ratio between 0.2–1.6 would constitute a healthy human diet. Our results revealed an omega-3/omega-6 ratio of 0.62 which is within the recommended range. Hearn T. showed that in freshwater fishes n 3/n 6 ratio ranged from 0.55 to 5.60 and our results confirm this. [12]

In modern nutrition studies, namely the values of EPA (C20:5) and DHA (C22:6) were used as one of the key biochemical characteristics of products consumed by human population. At the Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids held in 2000 [13], there was consensus about the importance of reducing the omega-6 and increase the omega-3 PUFA in diet of both adults and newborns for optimal brain and cardiovascular health and function.

CONCLUSION

Total lipids, fatty acids profile and fat soluble vitamin content in the rainbow trout from central Bulgaria were defined and compared. SFA was the group with the lowest level in this fish, which corresponds to their total lipid content. The highest PUFA values related to the high-level concentrations of LA, ARA and DHA. The n3/n6 ratio was found to be 0.62.

The results for the fat-soluble vitamins content in the analyzed fishes are in the same order of magnitude with those reported by other groups.

Regarding to the lipid contents, n3/n6 ratio and high level of all analyzed fat soluble vitamins we may conclude that Rainbow trout have good nutritional quality.

Like marine fish, freshwater fish constitute a healthy addition to the human diet.

REFERENCES

1. Rosamond L. Naylor, Rebecca J. Goldburg, Jurgenne H. Primavera, Nils Kautskysk, Malcolm C. M. Beveridge, Jason Clay, Carl Folkesk, Jane Lubchenco, Harold Mooney & Max Troell, *NATURE*, **405**, 29 (2000)
2. Веселин Видев, Александър Атанасов, Галин Николов, Маргарита Маринова, *Trakia Journal of Sciences*, **7**, Suppl.2, 203-207 (2009)
3. E. C. Bligh, and W. J. Dyer, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 913–917 (1959)
4. BDS EN ISO 5509 (2000)
5. Lopez-Cervantes, D.I. Sanchez-Machado and N. J. Rios-Vazquez, *Journal of Chromatography A*, **1105**, 135–139 (2006)
6. Danish Food Composition Databank, Department of Nutrition, National Food Institute (2007)
7. Dias M. G., Sanchez M. V., Bartolo H., Oliveira L., *Electronic Journal of environmental, Agricultural and food chemistry*, **4**, 510–513, (2003)
8. M.Stancheva, A. Merdzhanova, D. A. Dobreva, L. Makedonski, *Ovidius University Annals of Chemistry*, **21**, 1, 23–28 (2010)
9. K. A. Abbas, A. Mohamed and B. Jamilah, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **7** (3&4), 37-42 (2009)
10. H. I. Haliloglu, A. Bayir, A. Sirkecioglu, N. Aras, M. Atamanalp, *Food Chemistry*, **86**, 55–59 (2004)
11. W. Steffens, M. Wirt, *Arch. Pol. Fish*, **13**, 5-16 (2005)
12. Hearn T. L., Sgoutas S., *J. Food Sci.*, **52**, 1209–1211(1987)
13. A. P. Simopoulos, A. Leaf, and N. Jr. Salem, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **63**(3), 119–121, (2000)

ORGANOCHLORINE POLLUTANTS IN BLUEFISH (*POMATOMUS SALTATRIX*) FROM BULGARIAN BLACK SEA COAST

*Mona Stancheva, Tomislav Rizov,
Lubomir Makedonski, Stanislava Georgieva
Department of Chemistry, Medical University – Varna,
Marin Drinov 55, 9002 Varna, Bulgaria,
e-mail: stanislavavn@mail.bg*

ABSTRACT

Concentrations of 14 polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticide dichlorodiphenyl-trichloroethane (*p,p'*-DDT) including its metabolites (*p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD) were measured in muscle tissue samples of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). Samples were collected from Black Sea (region of Varna, Bulgaria) in the period of 2003–2006. DDTs and PCBs were determined by gas chromatograph equipped with electron-capture detector and mass spectrometry allowing better identification of compounds.

Total PCB concentration (sum of 14 congeners) in muscle tissue of bluefish varied in the range of 1.2 to 384.9 ng/g lipid weight. Concentrations in bluefish ranged from 367.1 to 879.5 ng/g lipid weight for total DDTs (sum of *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD and *p,p'*-DDE).

The levels of DDTs and PCBs in bluefish from region of Varna were found comparable or slightly higher than those found in fish from other parts of the Black Sea coast and from neighbor seas Marmara Sea and Aegean Sea.

Keywords: polychlorinated biphenyls; organochlorine pesticides; fish; Black Sea; Bulgaria

INTRODUCTION

Persistent organic pollutants (POPs) such as polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) are long-lived organic chemicals that are generally resistant to chemical and biological degradation processes. Organochlorine compounds (OCs) are among the most dangerous pollutants because of their high liposolubility and tendency to bioaccumulate along the food chain. As a consequence, they are widespread in the biotic compartment of the environment [1].

Pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) are found in various parts of the environment in quite small concentrations, but they accumulate and thus become a threat to human health and life [2, 3]. PCBs and OCPs were measured in sediments collected in 2000 from the mouth of the Danube Delta and it was found that the Danube river is a potential source of contamination to the Black Sea [4, 5].

Fish are an excellent indicator for pollution in aquatic ecosystems, where trace contaminants are difficult to analyze directly. Fish consumption is the main source of human exposure to different environmental contaminants like PCBs and DDTs. There are only few data available on residue concentrations of OCPs in fish from the Bulgarian coast of the Black Sea [6].

The bluefish (*Pomatomus saltatrix*) enters the Black Sea in spring for feeding and spawning and moves back to the Sea of Marmara in winter. It feeds primarily on fish (anchovy, horse mackerel and young mackerel) and partially on crustaceans (shrimps).

The purpose of this study was to determine the levels of persistent organochlorine contaminants in bluefish from the Bulgarian Black Sea coast and to monitor the accumulation of these pollutants during the period 2003–2006.

MATERIALS AND METHODS

Fish samples were collected from Black Sea – region of Varna, Bulgaria in the period of 2003 – 2006. The fish were immediately frozen (-18°C) after sampling.

Conventional methods for the determination of organochlorine compounds in fatty samples usually involve clean-up steps, including multiple digestion of extracts, acid digestion followed by liquid chromatography or gel permeation chromatography (GPC) combined with adsorption liquid chromatography [7, 8]. Most of these methods use GC/ECD or GC/MS for analytical determination [9, 10]. GC with IT-MS/MS detection provides high confidence in identification of target analytes, based on a selected parent ion and a whole mass spectrum of its daughter ions, high sensitivity and selectivity.

The analytical method for determination of residues of OCP and PCB was based on BDS EN 1528:2001. Briefly, the edible tissues of fish were homogenized and subsamples of 20 g were taken from it for extraction. Each sample was spiked with internal standards PCB 30 and PCB 204. These standards were used to quantify the overall recovery of the procedures. The OCs were extracted with hexane / dichloromethane (3/1, v/v) in Soxhlet apparatus. After lipid determination, the extract was cleaned-up on a glass column packed with neutral and acid silica. PCBs and OCPs were eluted with 80 ml n-hexane followed by 50 ml n-hexan/dichloromethane (80:20). The eluates were concentrated to near dryness and reconstituted in 0.5 ml in hexane.

The PCBs were analyzed by a Perkin Elmer Autosystem XL gas chromatograph equipped with an electron capture detector. A Restek Rtx-5 capillary column (60m

length, 0.25mm ID, 0.25 µm film thickness) was used for separation of organochlorines. The experimental conditions were as follows: split/splitless injector temperature – 250°C, detector temperature – 310°C, oven temperature – 120°C for 1 min, then programmed at a rate of 2°C/min to 320°C and hold 15 min. Helium was used as the carrier gas. Pure reference standard solutions were used for instrument calibration, recovery determination, and quantification (PCB Mix 20, – Dr. Ehrenstorfer Laboratory, IUPAC № 28, 31, 52, 77, 101, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169, 180).

Gas chromatographic analysis of the DDTs were carried out by GC FOCUS (Thermo Electron Corporation, USA) equipped with an AI 3000 autosampler and using POLARIS Q Ion Trap mass spectrometer. Experimental mass spectrometer parameters are the following: the ion source and transfer line temperatures were 220°C and 250°C, respectively. The splitless injector temperature was 250°C. The oven was programmed as follows: 60°C (1 min), 30°C/min to 180°C, 2°C/min to 260°C, 30°C/min to 290°C with a final hold for 3.0 min. Splitless injections of 1 µl were performed using a TR-5ms capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m, 0.25 mm ID and a film thickness of 0.25 µm. Helium was applied as carrier gas at a flow of 1 ml/min.

The selectivity of the IT-MS/MS method was based on the appropriate selection of parent ions for the detection of each analyte by mass spectrometry extracted ion mode. Pure reference standard solutions (EPA 625/CLP Pesticides Mix 2000 µg/ml – Supelco) were used for instrument calibration, recovery determination and quantification of p,p'-DDT, p,p'-DDD and p,p'-DDE.

The detection limit of the method varied from 0.2 to 0.5 ng/g lipid weight for PCBs and from 0.2 to 0.8 ng/g for the DDT and its metabolites.

Recoveries were determined by adding known amounts of PCBs and DDTs standards (at three levels of concentrations) to empty samples before extraction. The recoveries were within 73–108%.

The RSD values with five times repeatedly determined was less than 16%. A procedural blank and a spiked sample with standards were run to check for the interference and cross-contamination.

RESULTS AND DISCUSSIONS

1. PCBs levels.

Concentrations of individual PCBs congeners found in the fish studied, average of duplicate measurements, are listed in Table 1. Total PCB concentration (sum of 14 congeners) in muscle tissue of bluefish varied in the range of 1.2 to 384.9 ng/g lipid weight. Results were reported as „not detectable“ (nd) when the concentrations were lower than the detection limits.

For monitoring of PCB burden, food samples are analyzed usually for seven indicator PCBs (IUPAC № 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), noted with *. They are defined by WHO as important for evaluating the risk to human health.

Table 1. *Lipid content (%) and concentrations of individual PCBs congeners (ng/g lipid weight) in bluefish*

Bluefish	2003	2004	2006
Lipids (%)	10.6	14.7	12.9
PCB 28*	nd	0.4	nd
PCB 31	2.1	nd	nd
PCB 52*	2.1	nd	43.6
PCB 77	7.0	nd	nd
PCB 101*	3.2	nd	38.5
PCB 105	6.0	0.2	47.5
PCB 118*	4.4	nd	56.7
PCB 126	nd	nd	nd
PCB 128	3.7	0.6	nd
PCB 138*	nd	nd	78.9
PCB 153*	7.9	nd	70.1
PCB 156	nd	nd	nd
PCB 169	nd	nd	nd
PCB 180*	nd	nd	49.6
Sum PCBs (ng/g lw)	36.4	1.2	384.9
Sum PCBs* (ng/g lw)	17.6	0.4	337.4

In general, our results indicate that PCB contamination of bluefish from the Black Sea in 2006 is slightly higher compared to the results from bluefish of the Marmara Sea, where concentrations as sum of 7 congeners were found 319.0 ng/g fat [11]. In the period 2003 -2004 the levels of PCBs in muscle tissue of bluefish from Bulgarian coast of Black Sea were found lower than results in 2006.

2. DDT and its metabolites.

Figure 1 showed the distribution pattern of p,p'-DDE, p,p'-DDD and p,p'-DDT in bluefish from Bulgarian part of the Black Sea. Concentrations of individual metabolites found in the fish were reported like average of duplicate measurements.

In all tested fish samples, the residues were found in the order of DDE > DDD > DDT and this is in agreement with the results of other authors [3, 4]. In all samples DDT was present mainly in the form of its metabolites p,p'-DDE and p,p'-DDD, suggesting previous contamination.

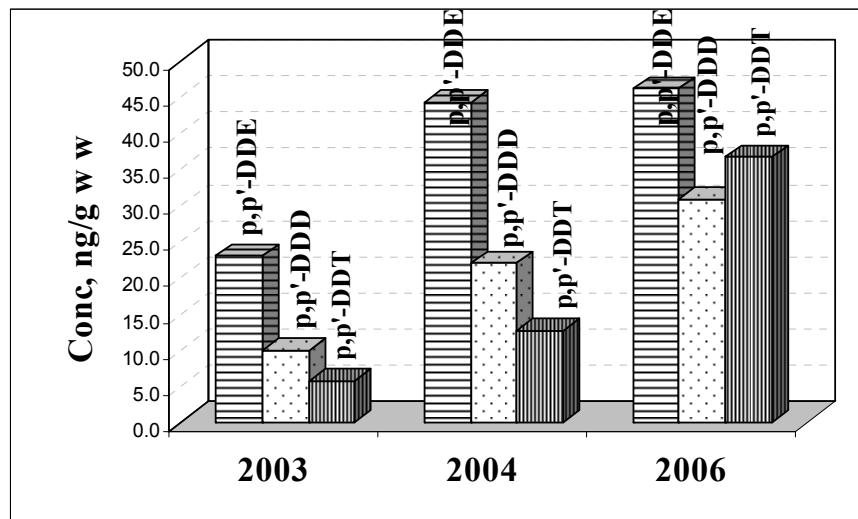


Figure 1. Distribution pattern of *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT in bluefish

Concentrations in muscle tissue of bluefish ranged from 367.1 to 879.5 ng/g lipid weight for total DDTs (sum of *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD and *p,p'*-DDE). The results are presented in Figure 2. The analysis of bluefish during the study period 2003 – 2006 showed a mean total load of DDT pollutants 595.0 ng/g lipid weight.

Comparison between levels of the PCBs and DDTs contamination in bluefish are presented in Figure 2.

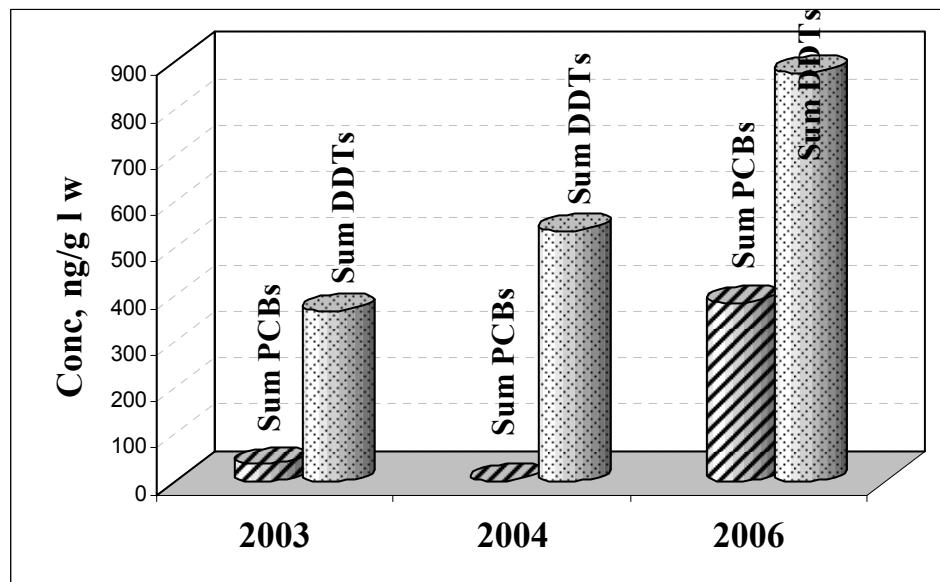


Figure 2. Levels of DDTs and PCBs in bluefish during the period of study 2003 – 2006

DDT group components are the main organochlorine contaminant in muscle tissue of bluefish during the all period of study. The levels of DDTs increased during the period 2003 – 2006.

CONCLUSIONS

The mean residue concentrations of PCBs in muscle tissue of bluefish quantified in our study are between 1.2 and 384.9 ng/g lipid weight. The analysis in muscle tissue of bluefish during the study period showed a mean total load of DDT pollutants 595.0 ng/g lipid weight.

Concentrations of organochlorine contaminants in bluefish increased during the period of study 2003–2006.

The levels of DDTs and PCBs in bluefish from region of Varna were comparable or slightly higher than those found in fish from other parts of the Black Sea coast and from neighbor seas Marmara Sea and Aegean Sea.

The experimental data present initial investigations from a profound study of PCBs and DDTs in fish and seafood from Black Sea.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financed by the National Science Fund, Ministry of Education and Science of Bulgaria (Project DVU 440/2008).

REFERENCES

1. A.G. Smith, S.D. Gangoli, *Food Chem. Toxicol.*, 40 (2002) 767–779.
2. P.Kurt, H. Ozkoc, *Marine Pollution Bulletin*, 48 (2004) 1076–1083.
3. C.Maldonado, JM.Bayona, *Estuar Coast Shelf Sci*, 54 (2002) 527.
4. A.Covaci, A.Gheorghe, O.Hulea, P. Schepens, *Environ Poll*, 140 (2006) 136-149.
5. G.Fillmann, J.W.Readman, I.Tolosa, J.Bartocci, J.P. Villenueve, C.Cattini, L.D. Mee, *Mar Poll Bull*, 44 (2002) 122.
6. T.Stoichev, L.Makedonski, T.Trifonova, M.Stancheva, F.Ribarova, *Chem. and Ecology*, Vol.23, (2007) No. 3, 191-200
7. F.E.Ahmed, *Tre Anal Chem*, Vol. 22 (2003) No. 3.
8. A.Beyer, M. Biziuk, *Food Chem*, 108 (2008) 669–680.
9. R.Serrano, M.Barreda, E.Pitarch, F.Hernandez, *J. Sep Sc*, i 26 (2003) 75–86.
10. T.Stoichev, N.Rizov, A.Kolarska, F.Ribarova, M.Atanasova, *J. Univ. Chem. Technol. Metal.*, 40 (2005) 251
11. M.Coelhan, J.Stroheimer, H.Barlas, *Environ Int*, 32 (2006) 775–780.

ЛИПИДЕН ПРОФИЛ НА БИОМАСА ОТ ЩАМ *SPOROBOLOMYCES SALMONICOLOR AL₁*

C. Димитрова*, K. Павлова, Л. Луканов***

***Медицински университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет,
катедра „Химия и биохимия“**

****Институт по Микробиология – БАН,
секция „Микробен биосинтез и биотехнологии“**

ABSTRACT

The composition of lipids and other lipophilic compounds as α -tocopherol, ergosterol, β -carotene, coenzyme Q₁₀ from biomass of psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁ was studied. The strain was cultivation under different conditions – at 6°C on malt slant agar for 14 days and at 22°C for 120 hours in batch fermentation carried out in a laboratory bioreactor.

The influence of different grow conditions on synthesized quantities of biologically active substances and production of biomass was determinated.

Key words: *Sporobolomyces salmonicolor AL₁, Coenzyme Q₁₀, β -carotene*

УВОД

Много микроорганизми (алги, бактерии, плесени и дрожди) синтезират мазнини по време на нормалния клетъчен метаболизъм. Особен интерес обаче представляват онези микроорганизми, чиито клетки едновременно с преимуществено синтезираните ненаситени мастни киселини продуцират и Коензим Q₁₀ (CoQ₁₀). Поради това от биомасата с еднократна екстракция може да се получи евтин продукт, който да съдържа и двата компонента и директно да бъде използван като фуражна добавка (1, 2).

Предлагат се много търговски продукти, които са сбор от липиди и природни антиоксиданти като хранителни добавки. Състава, чистотата и източника на получаване на всеки от компонентите може да бъде много различен и трябва да бъде строго контролиран, за да се гарантира желания ефект. Не са много съобщенията в литературата за микроорганизми, които да продуцират едновременно CoQ₁₀, полиненаситени мастни киселини и каротеноиди – вещества с добре позната физиологична активност (3,4,5). Rick Y. (6) патентова процедура за култивиране на дрождевия щам *Yarrowia lipolytica* и получаване на споменатите вещества от неговата биомаса.

Въз основа на досегашните ни изследвания върху синтеза на биологично-активни вещества от психрофилни дрожди се оформи целта на настоящата работа – определяне на липиди и съществащи ги вещества в биомасата на щам *Sporobolomyces salmonicolor AL₁*, култивиран при различни условия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизъм

Щам *Sp. salmonicolor AL₁* е изолиран от почвена проба от остров Ливингстон – Антарктида и е селекциониран като продуцент на полизахарида глюкоманан (7).

2. Хранителни среди и условия на култивиране

2.1. Повърхностно култивиране при температура 6°C.

Повърхностното култивиране се провежда на твърда хранителна среда със състав (g/L): малцов екстракт – 20.0 и агар – 20.0 в петрита. Стерилните петрита се посяват с 1ml суспензия от изследваните дрожди. Култивирането се извършва в хладилна камера при температура 6°C в продължение на 14 дни.

2.2. Дълбочинно култивиране при температура 22°C.

Ферментационната среда съдържа, (g/L) – захароза – 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.5, KH_2PO_4 – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, дрождев екстракт – 1.0. Началната стойност на pH е 5.3 и средата е стерилизирана при 112 °C за 30 min. Дълбочинното култивиране се провежда в 7 литров лабораторен биореактор (Sartorius) с работен обем от 5L и протича при аерационен поток от 0.5 v/v/m и разбъркване 400 грт при 22°C в продължение на 120 часа.

След завършване на ферментацията биомасата се центрофугира, двукратно се промива с дестилирана вода и се изсушава чрез лиофилизация.

3. Екстракция и анализ на ергостерол, β-каротен и CoQ₁₀.

Екстракцията на ергостерол, β-каротен и CoQ₁₀ се извършва по методика, описана в предишно изследване (8).

Хроматографското определяне се провежда на HPLC система Varian ProStar с PDA детектор. Използва се колона Microsorb-MV C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Подвижната фаза включва метанол, n-хексан, i-пропанол при съотношение 70:25:5 v/v (A) и ацетонитрил (B) в градиентен режим от 30A:70B до 90A:10B, а скоростта на потока е 1 ml/min. Всички разтворители са доставени от Labscan (Ireland). Ергостеролът се детектира при 282 nm, β-каротенът при 450 nm, а CoQ₁₀ при 270 nm.

Идентификацията на веществата се извършва по времената на задържане на стандартите ергостерол, β-каротен и CoQ₁₀ (Sigma). Количественото определяне се осъществява по метода на абсолютната калибровка. За обработка на

дannите е използван софтуер Star Chromatography Workstation Version 6.30 (build 5).

4. Екстракция и определяне на количеството липиди.

Липидите се екстрагират в апарат на Соксле с n-хексан в продължение на 8 часа. След изпаряване на разтворителя на ротационен вакуумизпарител екстрактът се претегля.

Мастнокиселинният състав на триацилглицеролите се определя чрез капилярна газхроматография на техните метилови естери (9) на GC-система Pye Unicam 304, снабдена с пламъчно-йонизациянен детектор и 30 m капилярна колона Innowax (Scotia Pharmaceuticals Ltd). Преестерификацията на триацилглицеролите до метилови естери е извършена по методика на Metcalfe L. и Wang. C. (10).

Фосфолипидите се екстрагират от дрождевата биомаса с CHCl₃:CH₃OH (2:1) по стандартна процедура, а фосфолипидните компоненти се разделят чрез двупосочна тънкослойна хроматография на Silica gel 60 G "Merck" (11). Количественото им определяне става спектрофотометрично при 700 nm (12). Токофероловият състав се определя директно в липидната фракция (13) на HPLC система "Merck-Hitachi" с флуоресцентен детектор "Merck-Hitachi" F-1050, колона с размери 250x4 mm с неподвижна твърда фаза "Nucleosil" Si 50-5 и подвижна фаза n-хексан : диоксан (96:4) (Merck), със скорост 1 ml/min.

5. Статистически анализ

Статистическата обработка на резултатите е направена с SPSS (ver.11), при ниво на значимост $\alpha < 0.05$. Използван е вариационен анализ (ANOVA) като сравнението между групите е направено с теста на Tukey-Kramer. Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При култивирането на щам *Sp. salmonicolor AL₁* за биосинтез на екзополизахариди биомасата се явява страничен продукт. Тя представлява интерес като носител на биологичноактивни вещества и е обект на нашето изследване. По този начин се използват възможностите на щама за екзо- и ендогенно производство на вещества с изразена физиологична активност.

Щамът е култивиран дълбочинно и повърхностно, на различни среди и температури, за да се проследи влиянието на тези фактори върху липидния му профил.

При култивиране на щам *Sp. salmonicolor AL₁* на твърда среда, което се провежда при 6°C, общото липидно съдържание е приблизително два пъти по-високо в сравнение с дълбочинното при 22°C (табл. 1). Това потвърждава факта, че оцеляването на психрофилните дрожди при екстремално ниски температури е свързано с натрупване на липиди и въглехидрати за сметка на подтискане синтеза на протеини и нуклеинови киселини (14).

Анализът на мастнокиселинния състав на триацилглицеролите в липидната фракция показва, че ненаситените киселини преобладават в двета случая. При повърхностното култивиране те са 65.2%. При дълбочинното са 58.0%, от които 57.7% се падат на олеиновата, а от палмитоолеиновата и линоловата се детек-

тират следи и вероятно това се дължи на по-високата температура, при която се е развивал щама (15).

Таблица 1. Съдържание на липиди и липидни компоненти в биомаса от щам *Sp. salmonicolor AL₁*, култивиран при различни условия

Вещества	Начин на култивиране	Повърхностно	Дълбочинно
Липиди в суха биомаса, %		6.5±0.1	3.8±0.1
Фосфолипиди в суха биомаса, mg/g		5.9±0.3	2.1±0.1
Ергостерол в суха биомаса, mg/g		10.1±0.5	6.9±0.3
α-токоферол в суха биомаса, µg/g		4.3±0.2	-
β-каротен в суха биомаса, µg/g		89.9±4.3	68.4±3.5
Коензим Q ₁₀ в суха биомаса, µg/g		107.6±8.8	292.0±12.5
Мастни киселини* , % (W/V) ± 0.1			
Миристинова (C _{14:0})		2.1	2.0
Палмитинова (C _{16:0})		30.2	33.0
Палмитоолеинова (C _{16:1})		2.3	следи
Маргаринова (C _{17:0})		0.1	0.2
Стеаринова (C _{18:0})		2.2	6.4
Олеинова (C _{18:1})		59.8	57.7
Линолова (C _{18:2})		2.3	следи
Линоленова (C _{18:3})		0.8	0.3
Арахинова (C _{20:0})		0.2	0.4
Ненаситени мастни киселини		65.2	58.0
Фосфолипиди** , % (W/V) ± 0.1			
Фосфатидилхолин		48.4	26.6
Фосфатидилетаноламин		26.4	25.0
Фосфатидни киселини		5.5	14.1
Лизофосфатидилхолин		7.7	15.6
Лизофосфатидилетаноламин		7.6	7.8
Дифосфатидилглицерол		2.2	6.3
Фосфатидилсерин		2.2	4.6

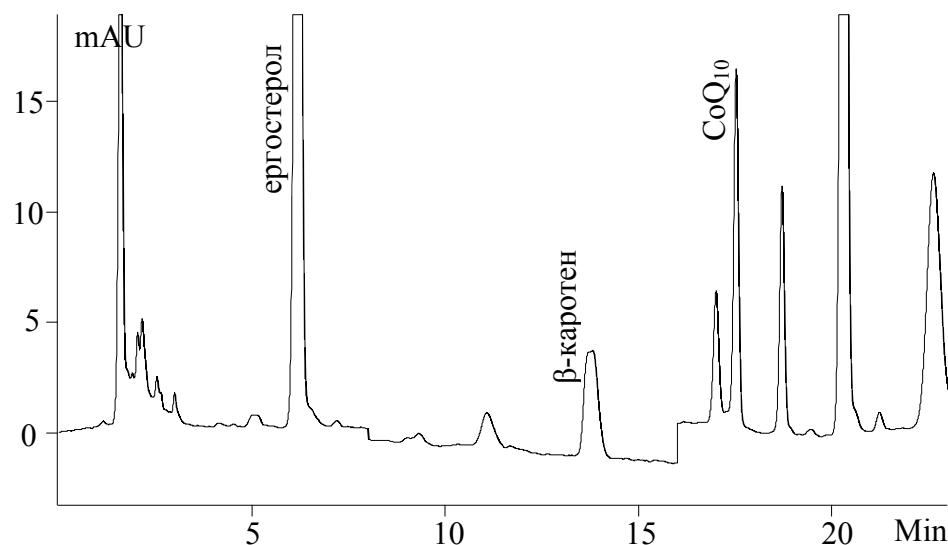
* – в липидната фракция ; ** – във фосфолипидната фракция

Резултатите са осреднени от три стойности.

Фосфолипидното съдържание в биомасата, получена при ниска температура и повърхностно култивиране е 3 пъти повече в сравнение с тази, получена при по-висока температура и дълбочинно. Същата закономерност се наблюдава и относно количеството ергостерол, което е 1.5 пъти повече. Това е следствие

от по-високото общо липидно съдържание в биомасата на повърхностно култивирания щам.

Микроорганизмите, които синтезират в по-голяма степен ненаситени мастни киселини са си изградили механизъм за защита от окислението им чрез биосинтез на протективни вещества като токофероли, каротеноиди, CoQ₁₀ (6). Изследванието от нас щам *Sp. salmonicolor AL₁* притежава тази способност. На фиг.1 е показана хроматограма на екстракт от биомасата му с детектирани ергостерол, β-каротен и CoQ₁₀. Един от критериите за идентификация на дрожди според определителя на Kurtzman и Fell (16) е присъствие на CoQ₁₀ в биомасата им.



Фигура 1. Хроматограма на екстракт от биомаса на *Sp. salmonicolor AL₁*

Количество CoQ₁₀ в биомасата на дълбочинно култивирания щам е 2.6 пъти повече от това получено при повърхностното му култивиране, докато при β-каротена е обратно. α-токоферол се открива в минимално количество единствено в биомасата на повърхностно култивирания щам. Следователно не само температурата е фактор за натрупването на дадено вещество, а и достъпът на кислород по време на ферментацията. Според тази закономерност могат да бъдат подбрани такива условия за развитие на щама, при които да се получи биомаса, богата на желания компонент.

В заключение, тъй като споменатите вещества са липорастворими, при екстракция с неполярен разтворител може да се получи микробно масло богато на антиоксиданти, което да намери приложение в козметиката или като хранителна добавка.

Изследването е финансирано по проект ДТК 02/46, Фонд „Научни изследвания“ към МОН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burja A., Radianingtyas H., A. Windust, Barrow C. (2006) Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1161-1169
2. Armenta R., Burja A., Radianingtyas H., Barrow C. (2006) Critical Assessment of Various Techniques for the Extraction of Carotenoids and Co-enzyme Q₁₀ from the *Thraustochytrid* Strain ONC-T18, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9752-9758
3. Turunen M., Olsson J., Dallner G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660, 171-199
4. Shimokawa, H., (2001) Beneficial effects of eicosapentaenoic acid on endothelial vasodilator function in animals and humans. *World Rev. Nutr. Diet*, 88:100-108
5. Dutta D., Chaudhuri U., Chakraborty R. (2005) Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *Afr. J. Biotech.*, 4, 1510-1520
6. Rick W. Ye USPC: 2009/424941
7. Pavlova K., Koleva L., Kratchanova M., Panchev I. (2004) Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 20, 435-439,
8. Dimitrova S., Pavlova K., Lukanov L., Zagorchev P. (2010) Synthesis of Coenzyme Q₁₀ and β-carotene by yeasts isolated from Antarctic soil and lichen in response to ultraviolet and visible radiations, *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 795-804
9. ISO 5509 (2000): Animal and vegetable fats and oils. Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatographic method.
10. Metcalfe L., Wang. C. (1981) *J. Chromatogr. Sci.*, 19, 530-534
11. Schneiter R., Daum G. (2005) Extraction of yeast lipids. Analysis of yeast lipids. *Methods in Molecular Biology*, 313, Yeast protocols: Second Ed., 41-46, 75-84
12. Beshkov M., Ivanova L. (1972) Determination of phospholipids in lipid mixtures. *Sci. Works of High Inst. Food and Flavour Ind.*, Plovdiv, 20, 231-234
13. ISO9936 (1997): Determination of tocopherols and tocotrienols by HPLC method.
14. Koleva L., Pavlova K., M. Zlatanov (2003-2004) Effect of temperature and sodium chloride on the biomass and fatty acid composition of Antarctic Yeast strain *Spocobolomyces roseus AL₈*. , Bulgarian Antarctic Research, *Life Sciences*, 4
15. Chattopadhyay M. (2006) Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J. Biosci.* , 31, 157–165
16. Kurtzman C., Fell J. (1998) The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th and Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam (Netherlands)

ОПРЕДЕЛЕЯНЕ НА БИОЛОГИЧНОАКТИВНИ ВЕЩЕСТВА В ЕКСТРАКТИ ОТ *FOLIA BETULAE*

С. Димитрова*, В. Андонова, П. Пенева**, Д. Пенков**,
М. Касърова**, Л. Луканов***

***Медицински университет – Пловдив,**

Фармацевтичен факултет, катедра „Химия и биохимия“

**** Медицински университет – Пловдив,**

Фармацевтичен факултет, катедра „Фармацевтични науки“

ABSTRACT

Birch leaves contain a wide range of biologically active substances (BAS) – flavonoids, tannins and terpenes. They have diuretic, gall removing, inflammatory, antimicrobial, constipating and urine chasing action. They determine the therapeutic use of the extract.

Extracts of birch leaves are obtained by different technological methods – maceration and percolation, extraction with different concentrations of ethanol, changes in temperature regime. The influence of technological factors on the content of the BAS are examined. The study presents the phytochemical characterization of the extract and its standardizing according to important groups of biologically active substances – flavonoids (rutin, quercetin) and terpenes (betulin and betulinic acid), by means of modern highly effective methods for proving and quantitative defining.

The present HPLC method creates a possibility of reliable analysis of leaves of birch extracts and other medicinal forms content them.

Key words: *Folia Betulae, rutin, quercetin, betulin, betulinic acid*

УВОД

При фитохимични проучвания на растителни drogi от бреза е установено наличието на различни групи биологично активни вещества: flavonoidи, танини, терпени, гликозиди, етерични масла (1, 2, 3, 4).

Флавоноидите са най-широко разпространената група фенолни съединения в растенията и се срещат както в свободно състояние така и под формата на гликозиди. В литературата се откриват данни за изследвана противовъзпалителна (5), противотуморна (6), антиоксидантна (1) и antimикробна (7, 8) активност на flavonoidите. Те образуват комплекси с повърхностно разположените протеини от бактериалната клетъчната стена или разрушават клетъчната мембра на микроорганизмите и така проявяват antimикробна активност *in vitro* (9).

Терпени също са доказани в различни видове *Betulae* (10, 11). Голям брой изследвания показват антибактериална (12), противовирусна, антифунгална (13) и антиоксидантна (14) активност на терпеновите съединения. Проведени са проучвания върху активността на тритерпеноиди от дамаранов тип, изолирани от листа на бреза, спрямо туморни клетки (*Ehrlich ascite carcinoma*). Установен е цитотоксичен ефект на екстракта, адитивен с противотуморното действие на антрациклиновите антибиотици (3). Установен е антитролиферативен ефект на бетулиновата киселина спрямо различни туморни клетъчни култури (10, 15, 16). Тритерпените от дамаранов тип проявяват противотуморен ефект, който се изразява в промяна на permeabilитета и микровискозитета на мембрани на туморните клетки (2).

За определяне на вещества от посочените групи е подходящ HPLC методът. По този начин Abreu и сътр. (17) определят кверцетин, рутин и бетулинова киселина в *Hypericum brasiliense*, Y. Zu и сътр. (18) предлагат такъв за едновременно анализиране на пет flavonoида (катехин, рутин, кверцетин, камферол, изорамнетин) в екстракт от листа на зърнастец (*Hippophae rhamnoides L.*), а G. Zhao и сътр. (11) – бетулин и бетулинова киселина в екстракт от кора на бяла бреза.

Целта на настоящото изследване е количествено определяне на рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин в етанолови екстракти на *Folia Betulae alba*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и технология на получаване на екстрактите

1.1. Материали – листа от бреза (*Folia Betulae Alba*), етилов алкохол 96%, етилов алкохол 60% (Valerus).

1.2. Листата са събрани и изсушени при спазване на най-благоприятните условия за събиране на drogi. Определени са контролните показатели на изсушените листа. Дрогата отговаря на изискванията на Европейската фармакопея по основните показатели.

Листата от бреза са оситнени до 0.5 mm. Приготвят се четири течни екстракти, получени по метода на перколация (USP 24,1151, Process P), мацерация (USP 24, 1151, Process M) и мацерация при повишена температура – 50-60 °C (табл.1).

Таблица 1. Означение на екстракта, използван метод, екстрагент и температура

Означение на екстракта	Метод	Екстрагент	Температура
П96	Перколация	Етилов алкохол 96%	До 25°C
П60	Перколация	Етилов алкохол 60%	До 25°C
M96	Мацерация	Етилов алкохол 96%	До 25°C
Д60	Мацерация	Етилов алкохол 60%	Загряване до 50-60°C

2. HPLC определяне на рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин

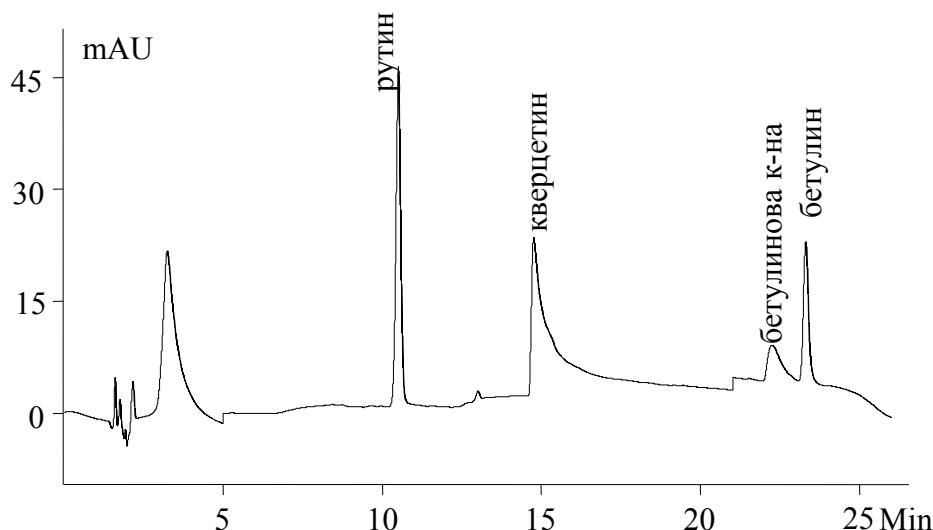
Анализът се извършва на HPLC система Varian Prostar с колона Microsorb-MV C₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) и PDA детектор. Използвана е подвижна фаза A (H₂O, pH=3):B (CH₃CN) (LabScan) в градиентен режим от 90(A):10(B) до 10(A):90(B) и скорост на потока 1 ml/min. Рутин и кверцетин се детектират при 368 nm, бетулинова киселина и бетулин при 210 nm. Идентификацията на веществата се прави по времената на задържане спрямо тези на чистите такива, а количественото определяне – по метода на външния стандарт. Стандартната права е построена по 6 калибрационни нива, съответстващи на разтвори с концентрации 5; 10; 20; 30; 40; 50 μg/ml на смес от чистите вещества рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин (Sigma), използвани като свидетели. Преди инжектиране анализираните разтвори се филтратват през микрофильтър (0,20μm). За обработка на данните е използван софтуер Star Chromatography Workstation Version 6.30 (build 5).

3. Статистически анализ

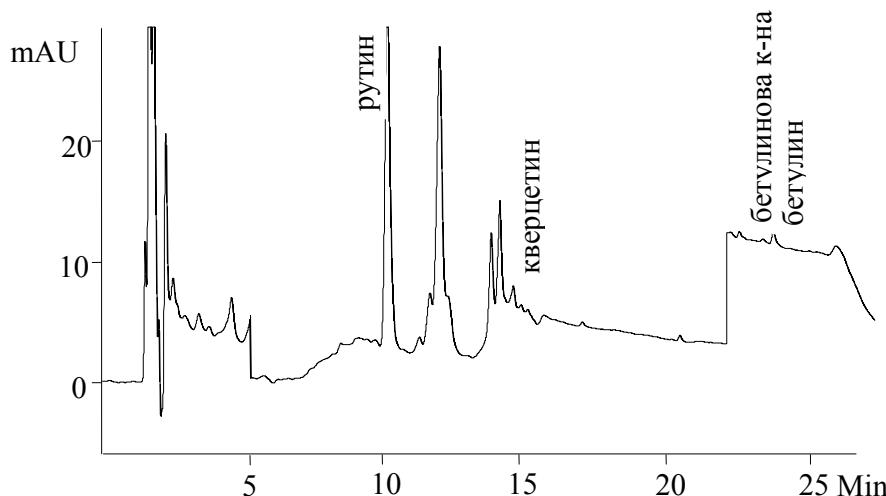
Статистическата достоверност на разликите е оценявана с помощта на критерия t за сравняване на показатели за относителен дял, при ниво на значимост $\alpha < 0.05$. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

HPLC методът за едновременно количествено определяне е разработен въз основа на посочените в литературата (11, 17, 18) като е съобразен с природата на изследваните вещества и хроматографската система, с която разполагаме. На фиг. 1 е показана хроматограма на стандартна смес от рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин, а на фиг. 2 – на екстракт Д60.



Фигура 1. Хроматограма на стандартна смес от рутин, кверцетин, бетулинова киселина и бетулин



Фигура 2. Хроматограма на етанолов екстракт D60 от *Folia Betulae Alba*

Използването на различни технологични подходи и екстрагенти обуславя разликата в концентрацията на биологично активните вещества. Получените данни представени на табл. 2 показват, че рутин се извлича в по-голяма степен при повишена температура и по-ниска концентрация на етанол (Д60), което се определя от неговата гликозидна структура. Неполярната структура на бетулина и бетулиновата киселина вероятно е причината за по-доброто им извлечане с високо концентриран етилов алкохол (М96). Резултатите показват, че при екстракт П60 има само следи от бетулин, а при М96 концентрацията му е най-висока. Известно е, че бетулинът е нестабилен и лесно се окислява до бетулинова киселина (19). В екстракт М96 съдържанието на кверцетин е най-високо в сравнение с другите модели. Температурата също е фактор за по-пълното извлечане на изследваните вещества. При мацерация с 60%-ен етанол и нагряване се постига ефекта на 96%-ия етанол при перколация върху екстракцията на кверцетин, бетулинова киселина и бетулин.

Таблица 2. Съдържание на рутин, кверцетин, бетулинова к-на и бетулин в моделните екстракти

Екстракт \ Вещество, ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Рутин	Кверцетин	Бетулинова киселина	Бетулин
П96	26.3±1.4	7.5±0.5	46.4±2.5	19.1±1.5
П60	35.4±2.7	6.0±0.3	34.4±2.1	следи
М96	27.5±2.1	8.9±0.5	76.6±3.1	35.0±1.9
Д60	38.6±2.9	6.5±0.3	46.3±2.7	18.4±1.1

Получаването на екстракти може да бъде провеждано по различен начин в зависимост от желания ефект върху различни патологични състояния.

Изследванията са финансиирани по проект НО-8/2009 от Фонд „Научни изследвания“ към Медицински университет – Пловдив.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nuengchamnong N., Hermans-Lokkerbol A., Ingkaninan K. (2004) Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal*, 12, 25-37
2. Prokof'eva N., Anisimov M., Kiseleva M., Rebachuk N., Pokhilo N. (2002) Cytotoxic activity of dammarane triterpenoids from birch leaves. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, 645-649
3. Setzer W., Setzer M. (2003) Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem.*, 3, 540-56
4. Demirci B., Paper D., Demirci F., Can Baser K., Franz G., Essential Oil of *Betula pendula* Roth. Buds. *Advance Access Publication* 6 October 2004
5. Klinger W., Hirschelmann R., Süss J. (1989) Birch sap and birch leaves extract: screening for antimicrobial, phagocytosis-influencing, antiphlogistic and antipyretic activity. *Pharmazie*, 44, 558-60
6. Kandaswami C., Lee L., Lee P., Hwang J., Ke F., Huang Y., Lee M. (2005) The antitumor activities of flavonoids, *In Vivo*, 19, 895-909
7. Smullen J., Koutsou G., Foster H., Zumbé A., Storey D. (2007) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, 41, 342-9
8. Cushnie T., Lamb A. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 26, 343-56
9. Pepelnjak S., Kalodera Z., Zovko M. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L'Herit. *Acta Pharm.*, 55, 431-435
10. Drag M., Surowiak P., Drag-Zalesinska M., Dietel M., Lage H., J. Oleksyszyn, (2009) Comparision of the Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract, Betulin and Betulinic Acid Towards Human Gastric Carcinoma and Pancreatic Carcinoma Drug-sensitive and Drug-Resistant Cell Lines. *Molecules*, 14, 1639-1651
11. Zhao G., Yan W., Cao D. (2007) Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 959–962
12. Cowan M. (1999) Plant products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, October, 564-582
13. Webster D., Taschereau P., Belland R., Sand C., Rennie R. (2008) Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol.*, 115, 140-146
14. Grassman J. (2005) Terpenoids as antioxidants. *Vitam. Horm.*, 72, 505-535
15. Ju E., Lee S., Hwang H., Kim J. (2004) Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Life Sci.*, 74, 1013-1026
16. Rzeski W., Stepulak A., Szymański M., Siflinger M., Kaczor J., Wejksza K., Zdzisińska B., Kandefer-Szerszeń M. (2006) Betulinic acid decreases expres-

- sion of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 374, 11-20
- 17. Abreu I., Porto A., Marsaioli A., Mazzafera P., (2004) Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science.*, 167, 949–954
 - 18. Y. Zu, C. Li, Y. Fu and C. Zhao, (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 41, 714-719
 - 19. C. Qi-he, L. Jing, Z. Hai-feng, He Guo-qing, Fu Ming-liang (2009) The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 175–180

ЛИПИДЕН СЪСТАВ НА СЕМЕНА ОТ *MADIA SATIVA L.*

*G. Антова¹, М. Златанов¹, М. Ангелова-Ромова¹, Т. Ненкова¹,
Е. Иванова¹, М. Марчева², С. Кирилова¹*

¹ ПУ „Паисий Хилендарски“, Катедра „Химична технология“,

ул. „Цар Асен“ 24, 4000 гр. Пловдив, E-mail: ginant@uni-plovdiv.bg

² Институт по растителни генетични ресурси „К. Малков“, гр. Садово

COMPOSITION OF *MADIA SATIVA L.* SEED OILS

*G. Antova¹, M. Zlatanov¹, M. Angelova-Romova¹, T. Nenkova¹,
E. Ivanova¹, M. Marcheva², S. Kirilova¹*

¹ University of Plovdiv „Paisii Hilendarski“, Department of Chemical
Technology, 24 Tzar Asen Str., 4000 Plovdiv,

² Institute of Plant Genetic Resources, 4122 Sadovo

ABSTRACT

Vegetable seed oils obtained of different varieties of *Madia sativa L.* (Family Asteraceae) were investigated. The oil content in the seeds varied from 32.4 % to 36.6%. The biological active substances – fatty acids, phospholipids, sterols and tocopherols were studied. Fatty acid composition was established by gas liquid chromatography. Linoleic acid (47.5% – 50.5%) was the main component in the fatty acid fraction, followed by oleic acid (30.2% – 32.4%). Phospholipids were found to be 1.7% – 2.6 % in the raw oils. The contents of sterols and tocopherols were 0.21% – 0.23% and 768 – 856 mg/kg respectively. All of tocopherol derivatives were identified in the tocopherol fraction and α -tocopherol (74.4% – 96.2%) predominated in the oils.

Key words: *Madia sativa L.*, glyceride oils, fatty acids, phospholipids, sterols, tocopherols

ВЪВЕДЕНИЕ

Madia sativa L. произхожда от Латинска Америка. Представлява едногодишно тревисто растение с плодове под формата на черни или кафяви ядки с размери от 2-5 mm. Плодовете намират приложение като сировина за получаване на растително масло за хранителни цели, като храна за птици и дребни бозайници, докато листата се използват в медицината [12]. Отглежда се на полу-сухи, топли и слънчеви терени до 950 m надморска височина.

У нас през последните години се провеждат изследвания, свързани с използването на семената от различни сортове *Madia sativa L.* като маслодайна сировина за хранителни и промишлени цели. Растителното масло е изследвано ос-

новно по отношение на мастнокиселинния състав, в който преобладават линолевата и олеиновата киселина [2,11]. Тези масла могат да се разглеждат като алтернатива на класическите за България масла от слънчоглед, соя и рапица.

Цел на настоящата работа е да се изследват основни физикохимични характеристики на растителното масло от *Madia sativa L.*, както и неговия състав по отношение на основните биологично активни компоненти (мастни киселини, фосфолипиди, стероли и токофероли), които формират качествата му като хранителен продукт.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За провеждане на изследванията са използвани семена от различни сортове *Madia sativa L.*, осигурени от Института по растителни генетични ресурси „К. Малков“, гр. Садово.

Използвани са стандартни методики по БДС и ISO за анализ на липиди. Маслеността е определена тегловно след екстракция с апарат на Соксле [9]; мастно киселинният състав – чрез газова хроматография [5,6]; йодното число е изчислено на базата на мастно киселинния състав [8]; съдържанието на токофероли – чрез високоефективна течно – течна хроматография [4]; съдържанието на стероли [10] и фосфолипиди [7] – спектрофотометрично, след изолиране с помощта на тънкослойна хроматография. Оксидантната стабилност е определена с помощта на апарат „Rancimat“ 679 при температура 100°C и продухване с 20 dm³/h въздух [3].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Данните за съдържанието на масло и на биологично активни вещества (фосфолипиди, токофероли, стероли и каротеноиди) в глицеридните масла, изолирани от семената на изследваните сортове *Madia sativa L.*, са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Физикохимична характеристика на семена и глицеридни масла от различни сортове *Madia sativa L.*

Показатели	Сорт		
	<i>Madia sativa L.,</i> BGR 459 Molina, USA	<i>Madia sativa L.,</i> BGR 458 Герма- ния	<i>Madia sativa L.,</i> BGR 457 Герма- ния
Масленост, %	35.4	34.2	36.6
Йодно число, g J₂/100g	119.0	115.4	116.4
Оксидантна стабилност, h	12.5	10.3	9.9
Стероли, %, в т. ч. % от общото количество стероли	0.21	0.23	0.23
свободни	71.4	78.3	78.3
	28.6	21.7	21.7
Фосфолипиди, %	2.6	1.7	2.4
Токофероли, mg/kg	856	795	768

Съдържанието на сурово масло в изследваните сортове *Madia sativa L.* варира от 34.2% до 36.6%. Общото съдържание на фосфолипиди, стероли и токофероли е сходно и близко до данните, съобщени за други растителни масла [1].

Най–високо съдържание на фосфолипиди и токофероли се наблюдава в маслото от сорта *Madia sativa* L., Molina, USA, където то е съответно 2.6% и 856 mg/kg. Количество на стероли и в трите изследвани сорта е от еднакъв порядък, като основната част от стеролите е в свободна форма (71.4%-78.3%).

Йодното число, което е мярка за степен на ненаситеност на мастните киселини в растителните масла е с високи стойности ($\text{ЙЧ} > 100 \text{ gJ}_2/100\text{g}$), като резултат от по–голямото съдържание на есенциалната линолова киселина. Йодното число е косвен показател и за оксидантната стабилност на маслата. Близките стойности за йодните числа на изследваните масла са в съответствие и с еднаквата оксидантна стабилност (9.9h – 12.5h). Тези стойности се доближават до оксидантна стабилност на слънчогледово масло, линолов тип (8h – 12h).

Мастнокиселинният състав е един от основните показатели, които служат за охарактеризиране качествата на растителните масла както по отношение на тяхната хранителна стойност, така и по отношение на тяхната оксидантна стабилност при съхранение и термична обработка. Съставът може да варира в известни граници, в зависимост от климатичните условия, където се отглеждат съответните сортове [2]. Съставът на глицеридните масла от семената на изследваните сортове *Madia sativa* L. е определен чрез капилярна газово-течна хроматография и данните са представени в Таблица 2.

Таблица 2. Мастнокиселинен състав на глицеридни масла от семена на различни сортове *Madia sativa* L. (тегл. %)

Мастни киселини, %	Сорт		
	<i>Madia sativa</i> L., BGR 459 Molina, USA	<i>Madia sativa</i> L., BGR 458 Германия	<i>Madia sativa</i> L., BGR 457 Германия
C _{12:0}	0.2	0.2	0.2
C _{14:0}	0.1	0.2	0.1
C _{14:1}	0.1	0.1	0.1
C _{16:0}	13.4	13.0	13.5
C _{16:1}	0.2	0.1	0.2
C _{17:0}	0.1	0.1	0.1
C _{18:0}	4.0	5.2	4.2
C _{18:1}	30.2	32.4	32.3
C _{18:2}	50.5	47.5	48.1
C _{18:3}	0.1	0.1	0.1
C _{20:0}	0.4	0.6	0.5
C _{20:1}	0.2	0.3	0.2
C _{22:0}	0.1	0.1	0.1
C _{22:1}	0.4	0.1	0.3
Наситени мастни к-ни	18.3	19.4	18.7
Ненаситени мастни к-ни	81.7	80.6	81.3

* C_{12:0}-лауринова; C_{14:0}-миристинова; C_{14:1}-миристолеинова; C_{16:0}-пальмитинова; C_{16:1}-пальмитолеинова; C_{17:0}-маргаринова, C_{18:0}-стеаринова; C_{18:1}-олеинова; C_{18:2}-линолова; C_{18:3}-линоленова; C_{20:0}-арахинова; C_{20:1}-гадолеинова; C_{22:0}-бехенова; C_{22:1}-ерукова

В растителните масла от различните сортове *Madia sativa* L. преобладават ненаситените мастни киселини, като тяхното количество съответно е от 80.6% до 81.7%. При всички изследвани масла доминира линоловата киселина ($C_{18:2}$) (47.5% – 50.5%), следвана от олеиновата киселина ($C_{18:1}$) (30.2%-32.4%), което ги причислява към маслата от линолов тип, в които количеството на линоловата киселина е в границите на 48.0%–74.0%, а на олеиновата – 14.0%-39.0% [1]. Линоленовата киселина е идентифицирана в количество от 0.1%. От наситените мастни киселини преобладава палмитиновата киселина ($C_{16:0}$) в количество 13.0% – 13.5%, следвана от стеариновата киселина (4.0% – 5.2%). Мастнокиселинният състав на изследваните сортове *Madia sativa* L. е сходен със състава на слънчогледовото масло, линолов тип.

Токофероловият състав е определен директно в маслото чрез високоефективна течно-течна хроматография с флуоресцентна детекция, като получените резултати са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Токоферолов състав на глицеридни масла от семена на различни сортове *Madia sativa* L.

Токофероли (T) и токотриеноли (T-3), %	Сорт		
	<i>Madia sativa</i> L., BGR 459 Molina, USA	<i>Madia sativa</i> L., BGR 458 Германия	<i>Madia sativa</i> L., BGR 457 Германия
α- T	74.4	88.3	96.2
α- T-3	3.5	-	-
β-T	5.2	2.8	2.8
β-T-3	2.5	0.8	-
γ-T	6.0	2.2	1.0
γ- T-3	5.1	4.5	-

От индивидуалния състав на токоферолите в маслата са идентифицирани основно наситените деривати – α, β и γ- токофероли. От ненаситените производни на токоферолите са идентифицирани α, β и γ- токотриеноли. Основният представител от токоферолите в маслата на всички анализирани преби е α- токоферол (74.4%–96.2%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семената от изследваните сортовете *Madia sativa* L. са сравнително богати на глицеридно масло (34.2% – 36.6%). По своя мастнокиселинен състав и по оксидантна стабилност маслата от *Madia sativa* L. са близки до тези на слънчогледовото масло, линолов тип. Високото съдържание на биологично активни вещества в изследваните масла обуславя потенциално им използване като ценен хранителен продукт.

Изследванията са проведени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания и мобилни проекти“ към Поделение Научна и Приложна Дейност, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

ЛИТЕРАТУРА

1. О`Брайн Р. Д., Преработка на масла и мазнини, *Въведение в технологията на маслата и мазнините*, изд. Съюз на маслопреработвателите, София, 2004.
2. Angelini Luciana G., Elisabetta Moscheni, Giusefiana Colonna, Paola Belloni, Enrico Bonari, Variation in agronomic characteristics and seed oil composition of new oilseed crops in central Italy, *Industrial Crops and Products*, 6, 3-4, 313-323, 1997.
3. Animal and vegetable fat and oils – Determination of Oxidation stability (Accelerated oxidation test). ISO 6886, 1996.
4. Animal and vegetable fat and oils – Determination of tocopherols and tocotrienols contents – Method using HPLC, ISO 9936, 1997.
5. Animal and vegetable fat and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO 5509, 2000.
6. Animal and vegetable fat and oils – Determination of methyl esters of fatty acids (Gas chromatographic method). ISO 5508, 2000.
7. Animal and vegetable fat and oils – Determination of phosphorous spectrophotometrically. ISO 10540-1, 2003.
8. AOCS, 1999d, American Oil Chemists Society (AOCS), Calculated iodine value, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society (5th ed.), AOCS, Champaign, IL, 1999, p. Cd 1c-85.
9. International Organization for Standardization, ISO 659, second ed., 1988-02-15, The gravimetric determination of the oil from the hexane extract (or light petroleum extract) from oilseeds.
10. Ivanov S. A., P. I. Bitcheva, B. T. Konova, Methode de determination chromatographique et colorimetrique des phytosterols dans les huiles vegetales et les concentres steroliques, *Rev. Fr. Corps Gras*, 19 (3) 177-180, 1972.
11. Schmeda-Hirschmann, Guillermo, *Madia sativa, a potential oil crop of Central Chile*, *Economic Botany*, 49 (3) 257-259 1995.
12. Zardini Elsa, *Madia sativa Mol. (Asteraceae-Heliantheae-Madiinae): An Ethnobotanical and Geographical Disjunct*, *Economic Botany*, 46 (1) 34-44, 1992.

ЛИПИДЕН СЪСТАВ И ФИЗИКОХИМИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА СЕМЕНА ОТ САФЛОР (*Carthamus tinctorius L.*)

М. Златанов¹, Г. Антова¹, М. Ангелова-Ромова¹, Б. Дамянова²,
С. Момчилова², И. Мареков², М. Марчева³, О. Тенева¹

¹ПУ „П. Хилендарски“, кат. Химична технология,

ул. Цар Асен 24, 4000 Пловдив, e-mail: magzlat@uni-plovdiv.bg

²Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН

³Институт по растителни генетични ресурси „К. Малков“, гр. Садово

LIPID COMPOSITION AND PHYSICO CHEMICAL CHARACTERISTICS OF SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius L.*)

M. Zlatanov¹, G. Antova¹, M. Angelova-Romova¹, B. Damyanova²,
S. Momchilova², I. Marecov², M. Marcheva³, O. Teneva¹

¹University of Plovdiv „P. Hilendarski“, Department of Chemical
Technology, 24 Tzar Assen Str. 4000 Plovdiv, e-mail: magzlat@uni-plovdiv.bg

²Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian
Academy of Science

³Institute of Plant Genetic Resources, 4122 Sadovo

ABSTRACT

Vegetable seed oils obtained from seeds of Bulgarian varieties of safflower were investigated. The oil content in the seeds varied between 31.2% to 32.9%. Phospholipids were found to be 1.0 – 1.7% in the raw oils. The quantity of sterols and tocopherols were 0.3% and 544–673 mg/kg respectively. Linoleic acid (40.2 – 76.6%) was the main component in the fatty acid fraction, followed by oleic acid (12.1 – 48.8%).

Key words: safflower oil, fatty acids, phospholipids, sterols, tocopherols

ВЪВЕДЕНИЕ

Сафлорът е маслодайна култура, известна още от древността. Родина на сафлора са Етиопия и Афганистан, а в Европа и Русия става известен през 18 век [1]. Семената му съдържат средно от 25.0 до 37.0% масло, като при някои форми достига и до 60.0%. Съвременните сравнителни проучвания върху качеството на маслото за хранителни цели, добито от сафлор, му отреждат едно

от първите места сред всички отглеждани маслодайни култури по света. Освен в хранителната индустрия – получаване на маргарин, като добавка към различни дресинги и като изходна сировина за хидрогениране, маслото се използва и за редица технически цели, в медицината и козметиката [1,2,15].

Цел на настоящите изследвания е да се охарактеризират някои български и интродуцирани у нас сортове сафлор по отношение на съдържанието на глицеридно масло в семената, на биологичноактивни вещества (стероли, фосфолипиди и токофероли) в него, както и на оксидантната му стабилност, с оглед възможностите за неговото съхранение и приложение.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За провеждане на изследванията са използвани семена от сортове сафлор, осигурени от Института по растителни генетични ресурси „К. Малков“, гр. Садово, реколта 2008 г.

За извършване на изследванията са използвани стандартни методики по БДС и ISO за анализ на липиди. Маслеността е определена тегловно след екстракция с апарат на Соксле, коефициентът на рефракция – съгласно ISO 6320 [9], плътността – съгласно ISO 6320 [10], йодното число – на базата на мастнокиселинния състав, мастнокиселинният състав – чрез газова хроматография [7,8], съдържанието на токофероли – чрез високоефективна течно - течна хроматография [5], съдържанието на стероли [6] и фосфолипиди [11] – спектрофотометрично, след изолиране с помощта на тънкослойна хроматография. Оксидантната стабилност е определена с помощта на апарат „Rancimat“ 679 при температура 100°C и продухване с 20 dm³/h въздух [4].

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Количеството на масло в семената и на основните му физикохимични показатели са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Физикохимични показатели на сафлорово масло

Сорт	Физикохимични показатели			
	Масленост, %	Плътност, g/cm ³	Коеф. на рефракция	Йодно число, g I ₂ /100g
<i>Carth. tinct. L. № 105</i>	31.2	0.898	1.475	138.8
<i>Carth. tinct. L. № 198</i>	32.4	0.948	1.475	142.1
<i>Carth. tinct. L. Ринконада</i>	32.9	0.914	1.473	117.4
<i>Carth. tinct. L. Карнобат</i>	32.2	0.918	1.476	150.9

Изследваните семена по отношение на глицеридно масло имат сходно съдържание с досега изследвани други сортове, от порядъка на 30.0 – 35.0% [1,2].

Докато относителната плътност и коефициента на рефракция са с близки стойности, то йодното число на различните глицеридни масла варира в по-широки граници, което се дължи на различния им мастнокиселинен състав.

Съдържанието на основните биологичноактивни компоненти в маслото (стероли, фосфолипиди и токофероли), които определят неговата хранителна стойност и оксидантна стабилност е представено в Таблица 2.

Таблица 2. Съдържание на биологичноактивни вещества в сафлорово масло

Сорт	Компонент		
	Стероли, %	Фосфолипиди, %	Токофероли, mg/kg
<i>Carth. tinct. L. № 105</i>	0.3	1.0	553
<i>Carth. tinct. L. № 198</i>	0.3	1.2	673
<i>Carth. tinct. L. Ринконада</i>	0.3	1.7	564
<i>Carth. tinct. L. Карнобат</i>	0.3	1.1	544

Общото съдържание на стероли в анализираните сортове е от еднакъв порядък (0.3%). Направените изследвания показват високо съдържание на фосфолипиди, особено в маслото от сорт *Ринконада* – 1.7%. Стойностите за съдържанието на тези компоненти са сходни с данните от по-ранни изследвания [3, 15]. Най-високо съдържание на токофероли е установено в сорт №198 (673 mg/kg), което е близко до това в други сортове сафлор [14, 15].

Индивидуалният състав на мастните киселини от глицеридните масла е определен с помощта на капилярна газова хроматография, след предварително метилиране на триацилглицеролите, съгласно методиката на *Christie* [13] и последващо пречистване чрез тънкослойна хроматография [7]. Данните от изследването са представени в Таблица 3.

Основните компоненти в мастнокиселинния състав на изследваните масла са ненаситени мастни киселини, главно линолова (40.2–76.6%) и олеинова киселина (12.1–48.8%). Докато първите два сорта (№105 и №198) са със сходен индивидуален мастнокиселинен състав, в които линоловата киселина е съответно 63.8% и 66.6%, то другите два сорта се различават значително. В маслото от сорт *Ринконада*, преобладава олеиновата киселина (48.8%), за сметка на по-ниското съдържание на линолова киселина (40.2%). В маслото от сорт *Карнобат*, обратно, има изключително високо съдържание на линолова киселина (76.6%) за сметка на олеиновата киселина (12.1%). Във всички преби е идентифицирано и наличието на вакценова киселина (0.6 – 0.7%), която е позиционен изомер на олеиновата киселина ($C_{18:1}(11)$). От нааситените мастни киселини основен представител е палмитиновата киселина (6.2 – 6.7%).

Таблица 3. Мастнокиселинен състав на триацилглициеролите от сафлорово масло

Мастни киселини*, %	Сорт			
	<i>Carth. tinct. L. № 105</i>	<i>Carth. tinct. L. № 198</i>	<i>Carth. tinct. L. Ринконада</i>	<i>Carth. tinct. L. Карнобат</i>
C _{14:0}	0.1	0.1	0.1	0.1
C _{16:0}	6.7	6.6	6.2	6.5
C _{16:1}	0.1	0.1	-	0.1
C _{18:0}	2.3	2.2	3.1	2.8
C _{18:1(9)}	25.4	23.0	48.8	12.1
C _{18:1(11)}	0.7	0.7	0.6	0.7
C _{18:2}	63.8	66.6	40.2	76.6
C _{18:3}	0.1	-	-	0.2
C _{20:0}	0.3	0.3	0.5	0.4
C _{20:1}	0.2	0.2	0.2	0.2
C _{20:2}	-	-	-	-
C _{22:0}	0.3	0.2	0.3	0.3
Насит. МК	9.7	9.4	10.2	10.1
Ненасит. МК	90.3	90.6	89.8	89.9

*C_{14:0} - Миристинова; C_{16:0} - Палмитинова; C_{16:1} - Палмитолеинова; C_{18:0} - Стеаринова;
C_{18:1} - Олеинова; C_{18:2} - Линолова; C_{18:3} - Линоленова; C_{20:0} – Арахинова; C_{20:1} - Ейкозенова;
C_{20:2} – Ейкозадиенова; C_{22:0} - Бехенова

Оксидантната стабилност на изследваните масла от различни сортове сафлор, определена кондуктометрично, на базата на електропроводимостта на разпадните им продукти е представена в Таблица 4.

Таблица 4. Оксидантна стабилност на масла от сафлор

Сорт	Индукционен период, h
<i>Carth. tinct. L. № 105</i>	10.1
<i>Carth. tinct. L. № 198</i>	11.0
<i>Carth. tinct. L. Ринконада</i>	15.7
<i>Carth. tinct. L. Карнобат</i>	12.3

Оксидантната стабилност на изследваните масла варира в границите от 10.1 h до 15.7 h, като разликата може да се обясни с различния мастнокиселинен състав на глицеридните масла и съдържание на токофероли в тях. Най-стабилно е маслото от сорт *Ринконада* (15.7 h), което има високо съдържание на стабилната спрямо окисление олеинова киселина (48.8%) и ниско съдържание на нестабилната линолова киселина (40.2%). По своята оксидантна стабилност сафлоровото масло е близко до слънчогледовото масло, линолов тип, чиято оксидантна стабилност е в рамките на 8 – 12 h [12, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От изследваните сортове сафлор, маслото от сорт *Ринконада* се характеризира с най-високо съдържание на биологичноактивни вещества и най-добър балансиран мастнокиселинен състав, съгласно последните тенденции в селекцията на маслодайни култури, според които количеството на олеиновата и линоловата киселини трябва да е от еднакъв порядък.

Изследванията са проведени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ към МОН (договор ВУ АН 203) и Дирекция „Научно производствена дейност“ към ПУ „П. Хилендарски“.

ЛИТЕРАТУРА

1. Димитров И.: *Сафлор (Carthamus tinctorius)*, Земеделие Плюс, 6-7, 33-34, 2007.
2. Златанов М., Ст. Иванов, Г. Паскалев, Сафлорово масло, *Хранителна промишленост*, 3, 16-18, 1993.
3. Abadi S.L., Chromatographic analysis of plant sterols in food and vegetable oils, *Journal of Chromatography*, 935, 173-201, 2001.
4. Animal and vegetable fat and oils – Determination of Oxidation stability (Accelerated oxidation test). ISO 6886, 1996.
5. Animal and vegetable fat and oils – Determination of tocopherols and tocotrienols contents (Method using HPLC). ISO 9936, 1997.
6. Animal and vegetable fat and oils – Determination of individual and total sterols contents (Gas chromatographic method). ISO 12228, 1999.
7. Animal and vegetable fat and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO 5509, 2000.
8. Animal and vegetable fat and oils – Determination of methyl esters of fatty acids (Gas chromatographic method). ISO 5508, 2000.
9. Animal and vegetable fat and oils – Determination of refractive index. ISO 6320, 2000.
10. Animal and vegetable fat and oils – Determination of relative density. ISO 6320, 2000.
11. Animal and vegetable fat and oils – Determination of phosphorous spectrophotometrically. ISO 10540-1, 2003.
12. Baydar H., I. Turgut, Variation of Fatty Acid Composition According to Some Morphological and Physiological Properties and Ecological Regions in Oilseed Plants, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 1, 81-86, 1999.
13. Christie W. W.: *Lipid Analysis*, The Oily Press: Bridgwater, England, 2003.
14. Lee Y. C., I. H. Kim, J. Chang, Y. K. Rhee, H. I. Oh and H. K. Park, Chemical Compositions and Oxidative Stability of Safflower Oil Prepared with Expeller from Safflower Seeds Roasted at Different Temperatures, *Food Chemistry*, 84, 1, 1-6, 2004.
15. Smith J., *Safflower, AOCS press*, Champaign, Illinois, 1996.

ЕКСЕРГОЕКОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ НА ПРОЦЕСИТЕ НА ПРЕРАБОТВАНЕ НА ЦИНКОВИ КЕКОВЕ ОТ ПРОИЗВОДСТВО НА ЦИНК

Г. Патронов, Сн. Магаева

*Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“,
Камедра „Химична технология“, ул. „Цар Асен“ 24, 4000 Пловдив,
e-mail: patron@uni-plovdiv.bg*

ABSTRACT

The present investigation represents an exergoecological analysis of processing the zinc cakes from zinc production – waelz process (without and with utilization of zinc – containing waste materials) and jarosite process. The necessary analysis data have been taken from real operating installations at KCM SA – Plovdiv and Lead & Zinc Complex Plc – Kardjali, Bulgaria.

The results present near values of exergy characteristics of the waelz processes without and with re-used resources, with a light advantage for the latter. The exergy efficiency of the jarosite process is rather higher - almost twice. This bears out the priority of the hydrometallurgical processes over the pyrometallurgical processes from thermodynamic point of view.

The residual antropogenic emissions in the environment deserve a most serious attention, namely heat emissions, gases emissions and solid wastes (clinker and jarosite cake). The main part of them occurs under the waelz process. This fact, together with the high value of irreversible exergy losses, makes it ineffective from a thermodynamic and ecological point of view.

Ключови думи: *exergy analysis, zinc cakes, waelz process, jarosite process*

ВЪВДЕНИЕ

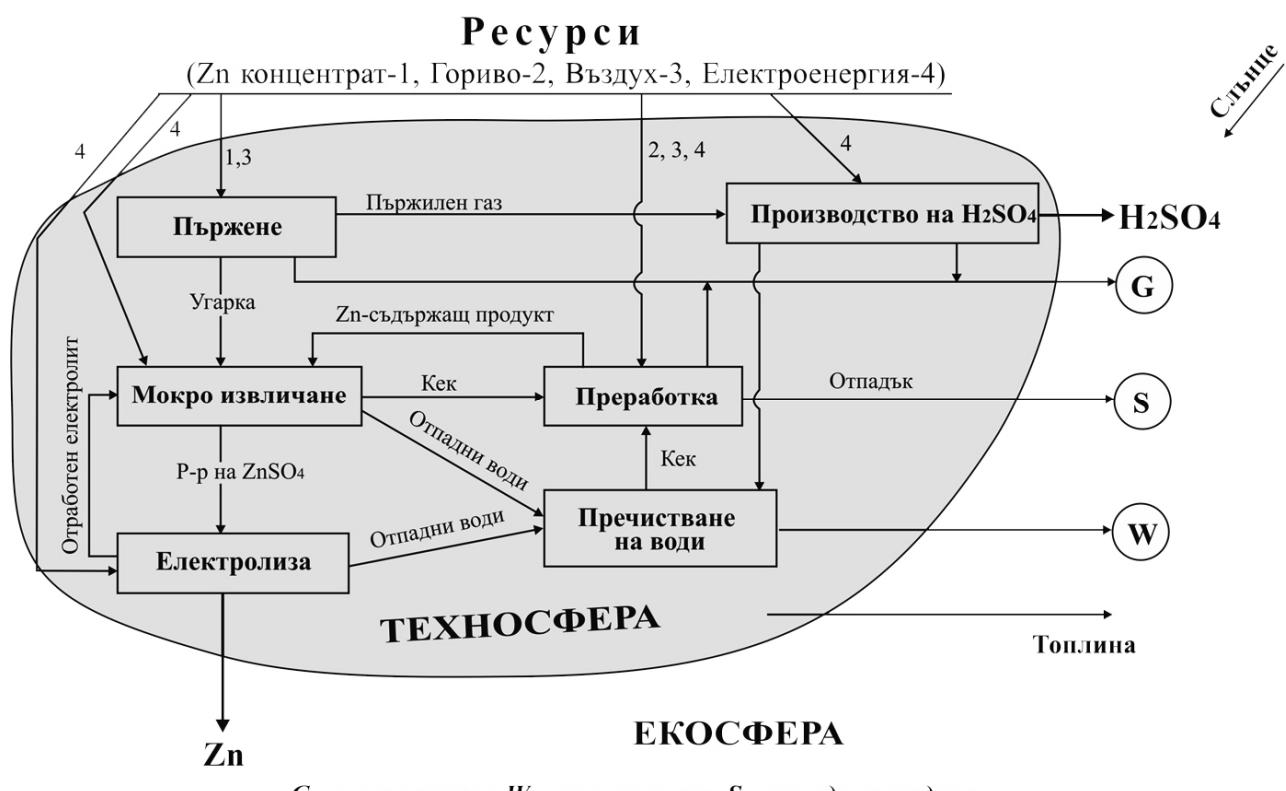
Металургията е отрасъл със значителна консумация на материални и енергийни ресурси и същевременно емитиращ значителни количества различни отпадъци в екосферата. Производствената система за добиване на цинк се отличава с многообразие на използваните процеси и съоръжения, множество съществуващи варианти за замяна на някои от тях с по-ефективни, възможности за енерготехнологична комбинация на химико-технологичните възли и максимална утилизация на всички енергийни ресурси [1-6].

Настоящето изследване е ексергоекологичен анализ на технологичните процеси за преработване на цинкови кекове, съпътстващи хидрометалургични-

те процеси при добиване на цинк. Тези технологични процеси се явяват по същество допълнителни звена, екологизиращи системата на цинково производство. Тяхното енергийно охарактеризиране дава много важна информация при определяне на възможностите за повишаване на екологичната устойчивост на цялата система на цинково производство. В световната практика в момента се използват пиromеталургични и хидрометалургични методи за преработка на отпадъчните кекове.

СХЕМА НА ИЗСЛЕДВАНЕ И МЕТОД НА АНАЛИЗ

Изследването е извършено по схемата на фиг.1. Анализирани са следните варианти на процесите на преработване на цинкови кекове, получени при мокро извличане на цинкова угарка: пиromеталургичният *велц* процес – без и с добавяне на вторични сировини и хидрометалургичният *ярозит* процес. Първият се прилага в КЦМ – АД, Пловдив, а вторият – в ОЦК, Кърджали. Технологичните схеми в двета завода са използвани като моделни схеми.



Фигура 1. Схема на производствената система за добиване на цинк по хидрометалургичния метод и взаимодействието и с околната среда

Като метод на анализ е приложен ексергийният метод на термодинамичен анализ. За тази цел се съставят материален, енергиен и ексергиен баланси [7].

Материалният баланс е съставен след обработка на данните от работата на реално функциониращите инсталации. Направена е проверка на технологични-

те данни и съгласуваността на технологичните потоци по състав, като са приложени условията на покомпонентния баланс [8].

Енергийният баланс, представен в най-общ вид чрез уравнение (1), е съставен по енталпийния метод [9]:

$$\sum E' + \sum H' = \sum E'' + \sum H'' \quad (1)$$

където $\sum E'$ и $\sum E''$ са сумите от внесената и изведена от системата енергия, а $\sum H'$ и $\sum H''$ - сумите от внесената и изведена от системата енталпия.

За определяне на стойностите на релативните енталпии на компонентите от материалните потоци е прието предложеното в [9] стандартно състояние.

Ексергийният баланс, основан на втория закон на термодинамиката, в най-общ вид се представя от уравнение (2):

$$\sum \mathcal{E}' \geq \sum \mathcal{E}'' + \Delta \mathcal{E} \quad (2)$$

където $\sum \mathcal{E}'$ и $\sum \mathcal{E}''$ са сумите съответно на внесената и изведена от системата ексергия, а $\Delta \mathcal{E}$ - изменението на ексергията на системата.

При стационарни процеси, какъвто е разглеждания от нас случай $\Delta \mathcal{E} = 0$.

Ексергията на материалните потоци е изчислена на базата на стандартното състояние, предложено от Szargut [7].

На базата на ексергийния баланс са определени абсолютните (вътрешни и външни ексергийни загуби) и относителните ексергийни характеристики (ексергийна ефективност, потенциал на съвършенство) на отделните химико-технологични възли.

Вътрешните загуби D_{irr} са изчислени по разликата в ексергийните стойности на входящите ($\sum_i \mathcal{E}_{iinput}$) и изходящи потоци ($\sum_i \mathcal{E}_{ioutput}$) за всеки конкретен етап [10]:

$$D_{irr} = \sum_i \mathcal{E}_{iinput} - \sum_i \mathcal{E}_{ioutput} = T_0 \Delta S \quad (3)$$

Външните загуби D_{effl} включват ексергията на неизползваемите материални и енергийни потоци, постъпващи в околната среда.

Ексергийната ефективност η_e е определена чрез отношението на ексергията на използваемите изходящи потоци \mathcal{E}_{ut} към ексергията на входящите $\sum_i \mathcal{E}_{ioutput}$:

$$\eta_e = \frac{\mathcal{E}_{ut}}{\sum_i \mathcal{E}_{ioutput}} \cdot 100, \% \quad (4)$$

Ексергийната ефективност и ексергийните загуби илюстрират възможността за ексергийно усъвършенстване на системата, дефинирано чрез потенциала за усъвършенстване P_{ot} [11]:

$$P_{ot} = D_{irr} (1 - \eta_e) + D_{effl} \quad (5)$$

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Ексергийните баланси на вариантите за преработка на цинкови кекове – *велиц* процес без и с добавяне на вторични сировини и *ярозит* процес са представени в таблици 1-3. За по-голяма точност и сравнимост процесите са разгледани съвместно с тези на мокро извлечане и електроекстракция.

Таблица 1. Ексергийен баланс на процесите на извличане на цинк от цинкова угарка с велц процес

Входяща ексергия			Изходяща ексергия		
Поток	MJ/t Zn	%	Поток	MJ/t Zn	%
Угарка	355	1,0	Катоден цинк	4 812	13,1
Гориво (кокс и мазут)	22 625	62,4	Клинкер	5 791	16,0
Zn прах	207	0,6	Газови емисии	1 520	4,2
Електроенергия	13 065	36,0	Cu-Cd-Co кек	208	0,6
			Топлинни загуби	2 631	7,3
			Вътрешни загуби	21 290	58,8
Общо	36 252	100,0	Общо	36 252	100,0

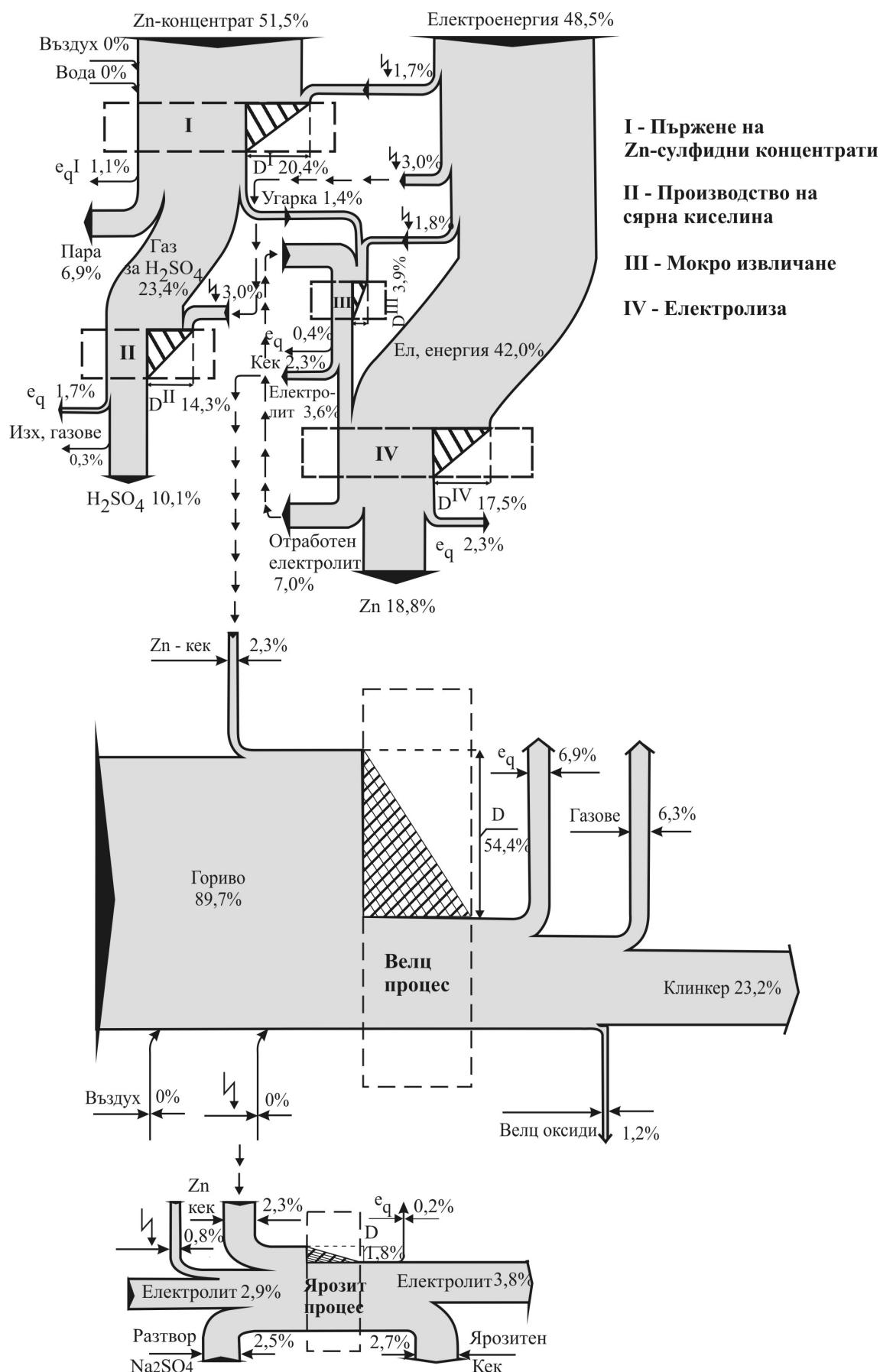
Таблица 2. Ексергийен баланс на процесите на извличане на цинк от цинкова угарка с велц процес и добавяне на вторични суровини

Входяща ексергия			Изходяща ексергия		
Поток	MJ/t Zn	%	Поток	MJ/t Zn	%
Угарка	313	0,9	Катоден цинк	4 812	13,5
Гориво (кокс и мазут)	22 133	61,9	Клинкер	5 685	16,0
Zn прах	183	0,5	Газови емисии	1 492	4,2
Втор. суровини	207	0,6	Cu-Cd-Co кек	184	0,5
Електроенергия	12 937	36,1	Топлинни загуби	2 596	7,2
			Вътрешни загуби	21 004	58,6
Общо	35 773	100,0	Общо	35 773	100,0

Таблица 3. Ексергийен баланс на процесите на извличане на цинк от цинкова угарка с ярозит процес

Входяща ексергия			Изходяща ексергия		
Поток	MJ/t Zn	%	Поток	MJ/t Zn	%
Угарка	343	2,5	Катоден цинк	4 812	34,3
P-р на NaHSO ₃	287	2,0	Cu-Cd-Co кек	284	2,1
Zn прах	282	2,0	Ярозитен кек	308	2,2
Електроенергия	13 098	93,5	Топлинни загуби	775	5,5
			Вътрешни загуби	7 831	55,9
Общо	14 010	100,0	Общо	14 010	100,0

Общата ексергийна Grassman – диаграма на производството на цинк в двата варианта – с *велц* и *ярозит* процес е отразена на фиг. 2. Като използваеми са приети продуктите, предадени на друг потребител – Zn и H₂SO₄.



Фигура 2. Обща Grassman – диаграма на цинково производство с прилагане на weltц и ярозит процес

Абсолютните и относителни ексергийни характеристики на разглежданите химикотехнологични възли за преработване на цинкови кекове са представени в таблица 4. Изчисленията са извършени, като всеки от процесите е разгледан самостоятелно, т.е. ексергията на внесените в съответния възел потоци е приета за 100%.

Таблица 4. Ексергийни характеристики на процеси за преработване на цинкови кекове

№	Процес	Загуби				η_e , %	P_{ot} , MJ
		D_{irr}	%	D_{effl}	%		
		MJ		MJ			
1.	<i>Велц</i> процес	13 658	59,6	3 224	14,0	26,4	13 276
2.	<i>Велц</i> процес с добавяне на вторични сировини	13 373	59,2	3 148	13,9	26,9	12 924
3.	<i>Ярозит</i> процес	194	20,6	324	34,4	45,0	431

Общата ексергийна ефективност на химикотехнологичната система „Хидрометалургично добиване на Zn“, съгласно фиг.2, е ниска и има следните стойности за отделните варианти:

- С прилагане на *велц* процес – 15,3%
- С прилагане на *велц* процес и добавяне на вторични сировини – 15,6%
- С прилагане на *ярозит* процес – 26,2%.

Основната част от загубите на работоспособна енергия са вътрешни. Първостепенна роля заемат собствените загуби, дължащи се на необратимостта на основните химични процеси, протичащи в реални условия – пържене на цинков сулфиден концентрат, електролиза, конверсия на SO_2 в H_2SO_4 , горене на кокс и мазут във велц пещта. Останалите вътрешни загуби са сравнително ниски и се дължат на необратимостта на процесите на разтваряне, триене, топлообмен при температурни и концентрационни разлики, разширение, смесване, разделяне на потоци с различни термодинамични параметри, изпарение и кондензация и др.

Нерентабилен в енергийно отношение е *велц* процеса за преработка на цинкови кекове. Той има ниска ексергийна ефективност – 26,4% и много висок потенциал за усъвършенстване – 13 276 MJ (табл.4). Тези стойности на основните ексергийни показатели за *велц* процеса се определят основно от естеството на протичащите в пещта необратими химични процеси (изгаряне на горивото, редукция на метални оксиди и др.), топлообмен с околната среда, неоползотворяване ексергията на пещните газове и др. Целевият продукт на този процес – велц оксидите има твърде ниска ексергийна стойност – 1,2 %. Преработването му до неутрален разтвор на $ZnSO_4$ е свързано със значителни ексергийни разходи. Това увеличава още повече термодинамичното несъвършенство на разглеждания химикотехнологичен възел.

По-пълното извлечане на Zn от цинковите концентрати, оползотворяването на част от твърдите отпадъци и възможното влагане на вторични сировини е

причина за наличието на този химико-технологичен възел в схемата на цинково производство. Резултатите показват близки стойности на ексергийните характеристики за процесите на *вelicuvane* без и с вторични сировини с леко преимущество на последните. В някои заводи този пиromеталургичен процес е заменен с хидрометалургични такива – *ярозит*, *хематит*, *гъотит*. Най-широко приложение от тях в последните десетилетия намира *ярозит* процеса. Значително повисоката ефективност – 45,0% и ниската стойност на потенциала за усъвършенстване – 431 MJ за *ярозит* процеса потвърждават предимството от термодинамична гл. т. на хидро пред пиропроцесите [7].

Сериозно внимание заслужават антропогенните емисии в околната среда. Екологичен проблем е натрупването на твърдите отпадъци (клинкер след преработване и ярозитен кек) в депа, поради липса на подходящи технологии за преработването им. Депонирането на ярозитния кек изисква и предварителна стабилизация (поради класификацията му като опасен отпадък), което налага и допълнителни разходи. Голяма част от топлинните и газови емисии, и твърди отпадъци се наблюдават при процеса *вelicuvane*, което заедно с високите стойности на останалите ексергийни показатели го прави неефективен от термодинамична и екологична гл. т.

Независимо от посочените недостатъци, процесите за преработване на отпадни цинкови кекове обезпечават по-висока степен на извлечане на цинка и предоставят възможности за рециклиране. Това оправдава и по-високите енергийни и екологични разходи.

ИЗВОДИ

Извършеният ексергоекологичен анализ на *вelic* (без и с добавяне на вторични сировини) и *ярозит* процесите за преработване на отпадни цинкови кекове в контекста на химикотехнологичната система „Хидрометалургично добиване на цинк“ позволява да се направят следните изводи:

- ниска ексергийна ефективност на технологичната система като цяло – от 15,3% до 26,2% съответно за цинково производство с *вelic* и *ярозит* процес, дължаща се основно на високата стойност на вътрешните загуби от работоспособна енергия;
- ниска ефективност от термодинамична и екологична гл. т. на *вelic* процеса;
- по-добри ексергоекологични показатели на хидропроцеса *ярозит* пред пиропроцеса *вelic*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторите изказват своята сърдечна благодарност на инж. Стойчев и инж. Колев за оказаната помощ и съдействие при извършването на анализите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gordon R.B. at all, *Resources Conservation & Recycling* 39 (2003) 107
2. Morris D., *Canadian Metallurgical Quarterly* 33 (1994) 297
3. Masini A., L.W.Ayres, R.U.Ayres, *An Application of Energy Accounting to Five Basic Metal Industries*, CMER, INCEAD, Fontainebleau, France, May 2001
4. Dobrev N., *Proceedings of ZINC 2006*, 11-12 September, Plovdiv, Bulgaria (2006) 23
5. Lessidrenski P., I.Gruev, A.Apostolov, S.Stoyanova, E.Bekrieva, *Proceedings of ZINC 2006*, 11-12 September, Plovdiv, Bulgaria (2006) 213
6. Habashi F., *Journal of Mining and Metallurgy* 45B (1) (2009) 1
7. Szargut J., D.Morris, F.Stewart, *Exergy Analysis of Thermal, Chemical and Metallurgical Processes*, Hemisphere Publ. Corp., New York 1988
8. Magaeva Sn., G.Patronov, D.Boiadjiev, L.Popova, *Годишник на СУ „Св.Климент Охридски“, Химия* 91 №2 (2001) 63
9. Магаева Сн., Ст.Караиванов, *Химия и индустрия* 7 (1982) 322
10. Morris D., F.Stewart, J.Szargut, *Canadian Metallurgical Quarterly* 33 (1994) 289
11. R.Rivero, *Proceedings of Thermodynamic Analysis and Improvement of Energy System*, 10-13 June, Beijing, China (1997) 299

НАУЧНИ ТРУДОВЕ
том 37, кн. 5, 2010

Химия

*Предпечатна подготовка: Цветелина Сотирова
Печат и подвързия: УИ „Паисий Хилендарски“*

ISSN 0204-5346

