

BIRLA CENTRAL LIBRARY
PILANI | RAJASTHAN |

Class No. 615, 19487

Book No. N 2 C V-4

Accession No. 57132

*This book has been
graciously presented by*

Prof. M. L. Schroff

COLLECTANEA
PHARMACEUTICA SUECICA

Edidit

Kungl. Farmaceutiska Institutets Bibliotek

Stockholm

VOLUMEN IV

1949

S T O C K H O L M

1 9 5 0

Stockholm 1950 Ivar Heggströms Boktryckeri A. B.

INDEX

1. ALIN, K. & N.-Å. DIDING, Den egenbaktericida effekten hos vissa injektionslösningar. (The autobactericidal action of different solutions for injection.) — *Farm. revy.* 1949, 48, 545-550. — *Statens bakteriologiska laboratorium, Stockholm.*
 2. BERGEFORS, L. & G. SCHILL, Bestämning av organiskt bunden jod. (Determination of organically bound iodine.) — *Sv. farm. tidskr.*, 1949, 53, 219-227, 233-244. — *Farmaceutiska institutet, kemiska avd., Stockholm.*
 3. BJÖRLING, C. O., Adsorption analysis of salts of organic acids. A preliminary report. — *Farm. revy.* 1949, 48, 281-285. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
 4. BJÖRLING, C. O., The Adsorption of some phenolic compounds on aluminium oxide. — *Farm. revy.* 1949, 48, 588-599. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
 5. BJÖRLING, C. O., The separation of adrenaline from mixtures. 1. — *Farm. revy.* 1949, 48, 601-606. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
 6. BONDESON, W. & H. SAMLESTRÖM, Adstriktionsvärde och barktjocklek hos svensk ekbark. (Adstriktionswert und Rindendicke schwedischer Eichenrinde.) — *Sv. farm. tidskr.*, 1949, 53, 337-346. — *Farmaceutiska institutet, avd. för farmakognosi, Stockholm.*
 7. CANBÄCK, T., Studies on the reaction between aromatic nitro compounds and active methylene groups.
 - XIII. Survey of the literature of theoretical interpretations of this reaction. — *Sv. farm. tidskr.*, 1949, 53, 153-157.
 - XIV. The mechanism of the reaction. — *Farm. revy.* 1949, 48, 153-166.
 - XV. An investigation into the difference in behaviour of twenty-nine m-dinitrobenzene derivatives in their reaction with acetone in alkaline solution. — *Farm. revy.* 1949, 48, 217-224, 234-241, 249-258.
 - XVI. The mechanism of neutralization of m-dinitrobenzene derivatives by aliphatic amines at -72°C . — *Acta chem. scand.*, 1949, 3, 916-953.
 - XVII. The reactivity of methylene groups in their reaction with m-dinitrobenzene in alkaline solution. — *Sv. farm. tidskr.*, 1950, 54, 1-17.
 - XVIII. The chemical estimation of Digitalis and Strophanthus glycosides. — *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1949, 1, 201-210.
- XIII - XVIII. *Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm.*

8. DIDING, ELNA, Fotometrisk bestämning av progesteron med 2,4-dinitrofenylhydrazin. (Photometric determination of progesterone with 2,4-dinitrophenylhydrazine.) — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 269-278. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
9. DIDING, N.-Å. & ELNA DIDING, Progesteronlösning till injektion. (Sterilization of progesterone solutions for injection.) — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 421-424. — *Apotekens kompositionslaboratorium, Stockholm.*
10. DIDING, N.-Å. & C. O. ROSÉN, Penicillinberedningars hållbarhet. (The stability of crystalline penicillin in pharmaceutical preparations.) — Farm. revy, 1949, 48, 265-276. — *Apotekens kompositionslaboratorium, Stockholm.*
11. DIDING, N.-Å. & E. SANDELL, Adeps lanae i vattenfria penicillinsalvor. (Wool fat in anhydrous penicillin ointments.) — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 617-621. — *Apotekens kompositionslaboratorium and Farmaceutiska institutet, avd. för farmaceutisk teknologi, Stockholm.*
12. ERLÉN, I., Fluorimetric determination of adrenaline III. The chemical structure of the fluorescent compound. — Farm. revy, 1949, 48, 485-496. — *Apotekens kontrolllaboratorium, Stockholm.*
13. ELVIUS, P., K.-E. GRÖNKVIST & E. SANDELL, Bestämning av oljors och fetters hållbarhet. 2. (Stability tests for oils and fats. 2.) — Farm. revy, 1949, 48, 17-27. — *Farmaceutiska institutet, avd. för farmaceutisk teknologi, Stockholm.*
14. ERNERFELDT, F, Gjutning av suppositorier. (The preparing of suppositories by fusion.) Farm. revy, 1949, 48, 43-44. — *Farmaceutiska institutet, avd. för farmaceutisk teknologi, Stockholm.*
15. HELMBERG, H., The determination of eserine in partly decomposed solutions. — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 637-643. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
16. HELMBERG, H., On the stability of eserine solutions—especially eye drops. — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 658-662. — *Statens farmaceutiska laboratorium, Stockholm.*
17. LILJESTRAND, Å., Assay of the curative action of neoarsphenamine by time-mortality data. — The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1949, 1, 78-86. — *Statens farmaceutiska laboratorium and Karolinska sjukhusets medicinska klinik, Stockholm.*
18. SCHILL, G., Kloralhydratets stelningpunkt. (Freezing point of chloral hydrate.) — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 165-173, 187-192, 201-211. — *Farmaceutiska institutet, kemiska avd., Stockholm.*
19. THÖRN, N. & A. ÅGREN, Kvantitativ bestämning av oxidimorfin i morfin. (Quantitative determination of oxidimorphine in morphine.) — Sv. farm. tidskr., 1949, 53, 17-24, 33-44, 49-55. — *Farmaceutiska institutet, kemiska avd., Stockholm.*
20. WESTER, S., Injectabile sulfuris. — Farm. revy, 1949, 48, 289-292. — *Apotekens kontrolllaboratorium, Stockholm.*

Den egenbaktericida effekten hos vissa injektionslösningar

av

K. ALIN och N. DIDING

Från Statens bakteriologiska laboratorium, chef professor G. Olin

(Inserted in Coll. Pharm. Succ. IV., 1949)

Enligt svenska farmakopéns bestämmelser föreskrives bakteriologisk sterilitetsprovning för vissa läkemedel. Vid den sterilitetskontroll, som på grund därav under de senaste åren utförts på aseptiskt framställda injektionslösningar har det visat sig, att levande bakterier sällan kunnat påvisas i de undersökta lösningarna. I de fall, då växt av bakterier erhållits, har det i allmänhet skett vid provning omedelbart efter lösningarnas färdigställande, medan det vid förnyad provning efter någon tid ofta visat sig att lösningarna blivit sterila. Orsaken härtill torde vara att bakterierna på grund av den för dem i injektionslösningen föreliggande ogynnsamma miljön avdödas efter varicrande tider bl.a. beroende på arten av ingående läkemedel.

Att många i injektionslösningar ingående läkemedel ha en baktericid verkan har framhållits av olika författare. Sålunda visade JENSEN (1) att autosterilisationstiden för ett antal avsiktligt infekterade läkemedelslösningar förededde stora variationer, dels beroende på läkemedlets art, dels på mängden av de bakterier, som tillsatts vid provningen. Av ett antal lösningar, infekterade med *Staphylococcus aureus*, visade sig sålunda diemal- och allypropymallösning i sprit, kininlösning och hypnofenlösning vid sterilitetsprovning omedelbart sterila. Den baktericida

effekten tillskrives i dessa fall kombinationen av de använda kemikalierna. ERNE och SÖDERLUNDH (2) ha vid prövningar av liknande karaktär använt sporbildande jordbakterier med en resistens av > 2 tim. och < 3 tim. vid 100° . Därvid visade det sig, att den autosteriliserande effekten var högst varierande hos olika injektionslösningar. För de i MB 1944 upptagna injektabilierna, vilka skola steriliseras genom upphettning vid 80° under 2 tim., erhöles stark egenbaktericid verkan hos Inj. chinini och Inj. tetraponi papaverini atropini. Övriga prövade lösningar kunde med hänsyn till den egenbaktericida verkan uppdelas i 2 grupper, en med svagare egenbaktericid effekt och en, i vilken denna verkan saknades. Liknande iakttagelser för andra injektionslösningar ha gjorts av v. DÖBELN och LINDGREN (3). Vid prövning med *Staphylococcus aureus* och *Escherichia coli* som testmikrober påvisades påtaglig autosterilisationstendens hos Inj. coffeini och Inj. phenemali. DIDING (4) erhöles samma resultat för Inj. coffeini, Inj. aethocaini 2 %, Inj. adrenalini och Inj. nicetamidi. Som testmikrober användes *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* och *Staph. aureus*.

Frågan om autosterilisationen i injektionslösningar är av intresse, när det gäller att avgöra om ett konserveringsmedel lämpligen bör tillsättas. Enligt svenska farmakopéns steriliseringsföreskrifter skall dylikt i vissa fall tillsättas, nämligen om så erfordras. Detta torde i många fall få bli en bedömningsfråga, där bl.a. sådana förhållanden som steriliseringsmetod, dispenseringsform samt läkemedlets art och eventuella egenbaktericida effekt måste tagas i beaktande. Även till autoklaverade lösningar kan härvidlag, vid viss dispenseringsform, sådan tillsats vara befogad.

I föreliggande undersökning har den egenbaktericida effekten i ett antal ofta använda injektionslösningar närmare studerats sedan dessa infekterats med kända testmikrober. Såsom sådana har valts *E. coli*, *Staph. aureus* och *Bacillus subtilis*, när man har anledning räkna med risk för infektion av dessa eller liknande bakterier vid lösningarnas handhavande på sjukhus. Genom att en sporbildande bakterie medtagits, erhålles en uppfattning även av den germicida effekten. I stor utsträckning ha sådana lösningar valts vid prövningarna, för vilka ifrågasvarande förhållande tidigare icke undersökts. Samtliga prövade lösningar ha beretts enligt givna föreskrifter och dispenserats på injektionsflaskor à 20 ml.

Metodik

De tre olika bakteriestammarna förvarades på snedagar vid $+4^\circ$. Före användningen gjordes 3 omstickningar på snedagar. Till insädd i de olika preparaten användes en 20 timmars tvättad snedagarkultur, som suspenderats i c:a 5 ml fysiologisk koksaltlösning. Av bakteriesuspensionen sattes en ögla till 5 ml av preparatet, som sedan förvarades i rumstemperatur. Från den sålunda infekterade lösningen togs efter 2, 5, 10, 20 och 30 dagar $\frac{1}{2}$ ml och sattes till 100 ml buljong, som inkuberades vid 37° . Från de preparat, som ej gävo växt i buljongen, uttogs i fortsättningen inga prov. Om någon växt ej inträtt på 5:e dagen gjordes en insädd från stamkulturen, varigenom kontroll erhöles att växthämning ej förelåg i den med $\frac{1}{2}$ ml lösning försatta buljongen.

Tabell

Injektionslösning	Testmikrob	Resultat av sterilitetsprövningen efter:				
		2	5	10	20	30
		dygn				
Inj. acid. ascorbic.	E. coli	+	+	—		
	S. aureus	+	—			
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. adrenalini	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	—		
Inj. atropini	E. coli	+	+	+	+	+
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. carbacholini 0,025 %	E. coli	+	+	+	+	+
	S. aureus	+	—			
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. dihydromorfinoni	E. coli	+	+	+	+	+
	S. aureus	+	—			
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. ephedrini	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. hypnopheni	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. methadoni ACO	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	—	
Inj. morphini 1 %	E. coli	+	+	+	+	+
	c. scopolamini	+	—			
	hydrobrom. 0,04 %	+	+	+	+	+
Inj. nicetamidi	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	—				
Inj. oxiconi 1 %	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+

Injektionslösning	Testmikrob	Resultat av sterilitetsprovningen efter:				
		2	5	10	20	30
		dygn				
Inj. papaverini 2 %	E. coli	+	+	—		
	S. aureus	—	+			
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. pentazoli	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. pethidini 5 %	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	—
Inj. phenemali	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. phenopromini	E. coli	+	—			
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	—
Inj. picrotoxini	E. coli	+	+	+	+	+
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. prostigmini 0,05 %	E. coli	+	+	+	+	+
	S. aureus	+	+	—	+	+
	B. subt.	+	+	+	+	+
Inj. g-Strophantini 0,05 % ...	E. coli	+	+	+	—	
	S. aureus	—				
	B. subt.	—	+	+	+	+
Inj. sulfuris	E. coli	+	—			
	S. aureus	+	+	+	—	
	B. subt.	—				
Inj. tetraponi	E. coli	—				
	S. aureus	—				
	B. subt.	+	+	+	+	+

+ växt
— ingen växt

Diskussion

Resultaten återfinnas i tabellen. Av denna framgår att förutsättningarna för olika bakterier att kvarleva i de här prövade injektionslösningarna äro högst varierande. Utpräglad egenbactericid effekt har kunnat konstateras endast för Inj. nicetamidi. *Staphylococcus aureus* har i allmänhet avdöats efter en ganska kort tid utom i Inj. sulfuris, medan *E. coli* och *Bacillus subtilis* genomgående visat en högre resistens, mest utpräglad för den sistnämnda, vilket är helt naturligt med hänsyn till att den är sporbildare.

Med tanke på att ett flertal av de här prövade injectabilierna ofta tillhandahållas i injektionsflaskor, innehållande ett större antal doser, torde man ej kunna bortse från risken att dylika lösningar under användningen bli infekterade. Som framgår av de erhållna resultaten kan en dylik infekterad lösning under lång tid innehålla levande bakterier. Ur denna synpunkt synes ett mera generellt föreskrivande vara befogat att injektionslösningar, som tillhandahållas på flerdosbehållare, oavsett den vid beredningen använda steriliseringsmetoden, skola försättas med ett lämpligt bakteriostatiskt medel. Föreskrift av denna innebörd återfinnes t. ex. i såväl amerikanska som brittiska farmakopéerna. Amerikanska farmakopén föreskriver sålunda följande:

"A bacteriostatic agent must be added to Injections packaged in multiple-dose containers, regardless of the method of sterilization employed, unless otherwise directed in the individual monograph."

Brittiska farmakopén upptager en liknande föreskrift för lösningar avsedda för parenteral injektion:

"*Multiple-dose containers.* When the container is sealed so as to permit the withdrawal of successive doses on different occasions, the solution or preparation of the drug contains a suitable bacteriostatic in such a concentration as will prevent the growth of microorganisms."

Sammanfattning

Den egenbactericida effekten har undersökts i 21 olika injektionslösningar. Av dessa utgöras de flesta av sådana, som finnas upptagna i *Pharmacopoea Suecica* eller MB 1944. Lösningarna infekterades avsiktligt och som testmikrober användes *E. coli*, *S. aureus* och *B. subtilis*. Resultaten visa, att växt av *B. subtilis* kunde påvisas efter 30 dagar genom sterilitetsprov i de flesta av de undersökta lösningarna. *S. aureus* kunde däremot sällan påvisas efter 48 timmar. *E. coli* intar en mellanställning. Med anledning av att ett stort antal av de prövade lösningarna dispenserades i flaskor med gummihätta innehållande flera doser, föreslås ett generellt tillståndande av ett bakteriostatiskt ämne till dylika lösningar.

Litteratur

1. JENSEN, E., Dansk Tidsskr. f. Farm. 13, 1 (1939)
2. ERNE, K. och SÖDERLUNDH, S., Sv. F. T. 50, 21 (1946)
3. v. DÖBELN, W. och LINDGREN, G., Sv. F. T. 47, 629 (1943)
4. DIDING, N., Farm. Revy 45, 629 (1946)

Summary

The autobactericidal action of 21 different injections, most of them listed in Pharm. Suecica or MB 1944 was investigated. The solutions were intentionally infected with either *E. coli*, *S. aureus* or *B. subtilis*. The results show that growth of *B. subtilis* could be demonstrated by sterility tests after 30 days in most of the solutions tested, while *S. aureus* could rarely be demonstrated after 48 hours. *E. coli* is midway between the others. As a large number of the solutions tested are distributed in multiple-dose containers it is suggested that a bacteriostatic agent be added to such solutions for general use.

Bestämning av organiskt bunden jod

av *Lennart Bergfors* och *Göran Schill*

(Från Kungl. farmaceutiska institutets kemiska avdelning)

Inserted in Coll. Pharm. Succ. IV, 1949

Litteraturen upptar ett mycket stort antal metoder för bestämning av organiskt bunden jod. I svenska farmakopén Ed. XI ingå tre preparat innehållande organiskt bunden jod, nämligen Jodphthaleinnatrium, Thyroxinum och Thyreoideum. På samtliga preparat förekommer kvantitativ bestämning av jodhalten. I princip äro bestämningarna lika. Först förstöres den organiska substansen, och joden erhålles i form av jodid. Därefter oxideras denna till jodat, vilket sedan bestämmes genom titrering med natriumtiosulfat efter tillsats av kaliumjodid och syra.

På samma sätt kan även jodhalten i det närstående preparatet jodkasein bestämmas.

Vid utförandet av bestämningar enligt farmakopén ha en del svagheter hos metoderna framkommit, vilka förtjäna att påpekas. Vidare torde metoderna i vissa fall avsevärt kunna förenklas.

JODFTALEINNATRIUM.

Förbränning med kaliumpermanganat i alkalisk miljö.

Enligt Ed. XI förbrännes den organiska substansen med kaliumpermanganat i alkalisk lösning. Metoden har angivits av bl. a. *Butler* och *Burdett* (1), vilka emellertid bestämde joden som jodid genom argentometrisk titrering. *Canbäck* (2) har kritiskt granskat metoden och därvid modifierat den så, att jodiden i stället för att bestämmas argentometriskt oxideras till jodat med brom, varefter överskottet av brom bortskaffas med myrsyra. Efter tillsats av kaliumjodid och syra titreras frigjord jod med tiosulfat. Denna metod att bestämma jodid har tidigare angivits av bl. a. *Vieböck* och *Brecher* (3) och ingående undersökts av t. ex. *Baggesgaard Rasmussen* och *Bjerrresö* (4).

Farmakopéns metod har använts vid övningarna på farmaceutiska institutet och synes ge bra resultat. Vid de flesta bestämningarna har emellertid den komplikationen uppstått, att en gul till brun färg kvarstannat efter bromöverskottets bortskaffande med myrsyra. Detta förhållande har även observerats av *Canbäck* (2), som anger, att detta beror på att överskottet av bromvatten ej varit tillräckligt eller att lösningen varit för sur.

Det låg därför nära till hands att anta, att färgen berodde på ofullständigt oxiderad jod. Försök gjordes att komma ifrån denna kvarstående brunfärgning dels med ökad brommängd (upp till 50 ml bromvatten-R), dels med klorvatten som oxidationsmedel. Intetdera visade sig tillfredsställande.

Att färgen ej härrörde från jod framgick för övrigt av att lösningen ej avfärgades vid tillsats av natriumtiosulfat. Slutfördes emellertid jodbestämningen utan att hänsyn togs till brunfärgningen, erhöles efter tillsats av kaliumjodid, svavelsyra och titrering med tiosulfat en färglös lösning.

Vi antogo då, att färgen möjligen kunde bero på att en del mangan på tvåvärt stadium av bromen oxiderats till exempelvis brunsten. Några försök att oxidera manganjoner med brom vid olika pH utfördes därför.

50 ml 1-molar acetatbuffert med varierande pH blandades med 20.0 ml 5 %-ig lösning av mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$). Blandningens pH kontrollerades med glaselektrod, varefter 15 ml bromvatten-R tillsattes. Efter 15 minuter bortskaffades överskottet av brom med myrsyra, som tillsattes droppvis med omsvängning efter varje tillsats. Med en droppe metylrött-I kontrollerades, att all brom förbrukats, varefter 1 g kaliumjodid och 15 ml svavelsyra M/1 tillsattes. Lösningen titrerades med 1/10 normalt natriumtiosulfat med stärkelse-R som indikator. Förbrukad mängd natriumtiosulfat anges i tabell 1, kolumn Mn. För att kontrollera, om oxidationen av jodiden förlöpte kvantitativt under dessa varierande betingelser, utfördes även en serie försök, där mangansulfatlösningen utbytts mot 15.00 ml av en kaliumjodidlösning, som vid argentometrisk titrering med eosin som indikator, visat sig innehålla 5,138 g kaliumjodid per liter. I övrigt utfördes bestämningarna på ovan angivet sätt. Förbrukad mängd natriumtiosulfat anges i tabell 1, kolumn »KI, Found». I kolumn »KI, Calc.» anges den tiosulfatförbrukning, som beräknas ur den argentometriska titreringen.

Table 1.

Oxidation of Mn^{2+} and I^- at different pH values with bromine water.

The bromine excess removed with formic acid. After addition of KI and H_2SO_4 , titration with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

pH	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		
	Mn	KI	
		Found	Calc.
3.6	0.02	27.34	27.40
4.4	0.20	27.40	
5.0	12.35	27.34	
5.9	40.00	27.35	

Oxidationen av jodiden sker kvantitativt inom hela det prövade pH-området. Av försöken framgår också mycket tydligt, att manganoxidationen avtar kraftigt med sjunkande pH, och vid pH lägre än 3,6 är den helt utan betydelse.

När farmakopéns bestämning av jodftaleinnatrium utföres, blir lösningens manganhalt ungefär lika stor som i nyssnämnda försök. Lösningens pH före bromtillsatsen kan variera något, då uppmätningen av syror och alkali sker med mätglas. Några försök med blindprov beredda enligt Ed. XI visade, att en variation i pH från 3,9 till 4,2 kan erhållas vid normal noggrannhet i arbetet. Dessa blindprov behandlades därefter med bromvatten-R o. s. v. enligt farmakopén, varvid lösningen med pH 3,9 gav en förbrukning av 0,12 ml 0,1000-n natriumtiosulfat medan lösningen med pH 4,2 förbrukade 0,35 ml.

Det var alltså tydligt, att bromoxidationen borde utföras vid $\text{pH} < 3,6$, och vidare borde försöket arrangeras så att små mätfel ej kunde föra pH över denna gräns. Ökades ättiksyremängden till 10 ml konc. ättiksyra erhöles pH 3,5, och tillsattes 25 ml konc. ättiksyra blev pH 3,2. Med 25 ml konc. ättiksyra i stället för 10 ml ättiksyra 5 M, bör alltså lösningens pH säkert bli lägre än 3,6 oberoende av små mätfel. Några försök utfördes med denna ändring dels på blindprov, dels på blindprov försatt med 15,00 ml av den i tabell 1 använda kaliumjodidlösningen. Samtidigt undersöktes, om en minskning av oxidationstiden från 15 till 5 minuter gav någon skillnad i resultat. Förbrukningen av natriumtiosulfat återfinnes i tabell 2.

Table 2.

Iodophthalein Sodium.

Oxidation with bromine water at pH 3.2 of blind tests and blind tests with KI added respectively.

	Time of oxidation	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	
		Found	Calc.
Blind test	5 min.	0.02	—
" "	15 "	0.04	—
" " + KI	5 "	27.41	27.40
" " + KI	15 "	27.42	

Efter surgörning med 25 ml konc. ättiksyra erhöles alltså fullständig oxidation både efter 5 och 15 minuter. I intet fall erhöles någon kvarstående brunfärgning. Vid denna surhetsgrad reagerar brom och myrsyra något långsammare, men detta medför ej någon större nackdel.

I en serie försök jämfördes slutligen resultaten enligt en så modifierad metod («Modif. method») med resultaten från bestämningar enligt farmakopén («Ed. XI»). Före bromvattentillsatsen mättes lösningarnas pH med glaselektrod. Resultaten i tabell 3.

Den modifierade metoden ger enligt dessa försök endast obetydligt lägre värden. Den skillnad, som möjligen erhålles, beror som ovan nämnts på att farmakopéns metod ger oxidation av manganjoner till brunsten eller dylikt, som i sur lösning frigör jod ur kaliumjodid. Den viktigaste följden av modi-

Table 3.
Determination of iodine in Iodophthalein Sodium.
Treatment with alkaline permanganate solution.

Weight	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Percentage of I	Colour after addition of formic acid
Modified method: Oxidation at pH 3.2 Time of oxidation 5 minutes			
0.1122	27.52	51.9	None
0.1222	30.01	51.9	"
0.1128	27.73	52.1	"
0.1188	29.18	51.9	"
0.1123	27.47	51.7	"
0.1160	28.55	52.0	"
0.1123	27.54	51.9	"
Pharm. Suec. Ed. XI: Oxidation at pH 4.1			
0.1361	33.56	52.2	Faintly brown
0.1136	27.97	52.1	" "
0.1070	26.27	51.9	" "
0.1147	28.29	52.2	" "

fikationen måste emellertid anses vara, att den brunfärgning, som farmakopéns metod ger, här helt undviktes.

Förbränning med kaliumpermanganat i sur miljö.

Enligt farmakopéns metod sker förbränningen genom uppvärmning på vattenbad under 45 minuter i alkalisk lösning. Av litteraturen framgår emellertid, att en förbränning i sur miljö borde gå avsevärt snabbare. En dylik förbränningsmetod har använts bl. a. av *Clark* och *Jones* (5) och upptagits bland *AOAC:s metoder* (6) samt av *de Jong* och *Lenstra* (7). Enligt dessa metoder sker samtidigt med förbränningen en oxidation av jodiden till jodat med kaliumpermanganatet. Brunsten och överskottet av kaliumpermanganat borttages med natriumnitrit, som dock ej reducerar jodatet.

Vid genomprovning av dessa metoder på jodftaleinnatrium visade det sig ofta svårt att bortskaffa de sista brunstenspartiklarna. Detta gick i allmänhet först sedan stort överskott av natriumnitrit tillsatts. Blev överskottet av nitrit alltför stort, reagerade det emellertid i den sura lösningen med jodatet, varför för låga värden ibland erhöles.

Det är emellertid ingenting som hindrar, att man förbränner med kaliumpermanganat i sur miljö och tar bort överskottet av brunsten och kaliumpermanganat med natriumpyrosulfid som reagerar betydligt kraftigare än natriumnitrit. Även jodatet reduceras, men man kan sedan oxidera den bildade jodiden med brom, om man bara håller pH tillräckligt lågt, som förut påpekats.

Vid bestämning av jodftaleinnatrium använde vi följande metod. 0.1000 g jodftaleinnatrium löstes i 10 ml vatten och 2 ml natronlut 2 M genom svag uppvärmning. Därefter tillsattes 15 ml kaliumpermanganatlösning

(1 + 20) och 20 ml svavelsyra 2.5 M samt några glaspärlor. Blandningen uppvärmdes försiktigt, och kokades sedan under 5 minuter samt avkyldes något. Lösningen avfärgades med natriumpyrosulfatlösning (1 + 9), som tillsattes i obetydligt överskott. Därefter neutraliserades med natronlut 2 M med metylrött-I som indikator. Efter tillsats av 25 ml konc. ättiksyra och 3 g natriumacetat kylde lösningen till rumstemperatur. Därefter tillsattes bromvatten-R till svag guldfärgning samt ytterligare 10 ml. Efter 5 minuter borttogs bromöverskottet med myrsyra (kontroll med metylrött). Lösningen försattes med 1 g kaliumjodid och 10 ml svavelsyra 2.5 M samt titrerades med 1/10 normalt natriumtiosulfat. Vid proven användes dels samma jodftaleinpreparat som i tabell 3 (nr 1), dels ytterligare två preparat med lägre jodhalt (nr 2 och 3). Resultaten i tabell 4.

Av tabellen framgår, att denna avsevärt snabbare metod ger väl reproducerbara värden. Resultaten med preparat nr 1 överensstämmer väl med de i tabell 3 funna.

Table 4.
Determination of iodine in Iodophthalein Sodium.
Treatment with acid permanganate solution.

No of sample	Weight	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Percentage of I
1	0.1243	30.53	52.0
	0.1226	30.24	52.2
	0.1143	28.15	52.1
	0.1365	33.46	51.9
	0.1454	35.78	52.0
2	0.1196	25.20	44.6
	0.1395	29.44	44.4
	0.1402	29.21	44.1
	0.1167	24.60	44.6
	0.0925	19.52	44.6
3	0.1131	20.70	38.7
	0.1003	18.43	38.9
	0.0968	17.83	39.0
	0.1031	18.78	38.5
	0.0966	17.63	38.6
	0.1144	21.05	38.9

TYROXIN OCH JODKASEIN.

Uppslutning med nitratdestruktionsblandning.

Farmakopéns metod för bestämning av jod i tyroxin utgör en modifikation av *Hunters* metod (8). Enligt denna metod förbrännes den organiska substansen med en blandning av kaliumnitrat, kaliumkarbonat och natriumkarbonat (s. k. nitratdestruktionsblandning), varefter jodiden oxideras till jodat med natriumhypoklorit. Detta oxidationsmedel visade sig ha vissa nackdelar och

har därför i allt större utsträckning börjat utbytas mot brom. Oxidation med brom användes sålunda t. ex. av *Baggesgaard Rasmussen* och *Bjerresö* (4). Överskottet av brom bortskaffas här liksom vid jodftaleinnatrium med myrsyra.

Metoden gav vid våra försök i stor utsträckning goda resultat, men då och då erhöles värden som med ända till 20 % överstego de beräknade.

Av litteraturen framgår, att man ansett metoden behäftad med åtskilliga felkällor. De viktigaste synas vara följande.

1. Oxidationsmedel bortskaffas ej helt vid myrsyratillsatsen.
2. Bromtillsatsen är otillräcklig för att oxidera både jodiden och vid smältningen bildat nitrit.
3. Jodförluster vid upphettningen.

1. »Oxidationsmedel bortskaffas ej helt.» I farmakopén föreskrives, att smältan efter uppslutning i nickeldegel skall lösas i 150 ml kokhett vatten. Efter filtrering tvättas degeln och filtret tre gånger med kokhett vatten, 15 ml varje gång. Sedan lösningen avkylts tillsattes 5 g natriumacetat och 15 ml bromvatten-R. Oxidationen sker alltså i alkalisk lösning. Först därefter tillsattes 15 ml konc. ättiksyra. Oxidationstiden kan variera ganska avsevärt, då ju ingen föreskrift finnes, att ättiksyretillsatsen skall ske omedelbart. Vidare kan begreppet avkylning fattas ganska olika. Antingen en nedkylning till rumstemperatur eller endast en avkylning till en temperatur, där man lättare kan hantera den ursprungligen kokheta lösningen.

Några försök rörande reaktionstidens och temperaturens inverkan utfördes. För att undvika felkälla 2 (nitritbildning) gjordes blindprov på följande sätt.

7 g nitratdestruktionsblandning och 5 g natriumacetat löstes i 200 ml vatten. Lösningen uppvärmdes till angiven temperatur och försattes med 15 ml bromvatten-R. Efter angiven tid tillsattes 15 ml konc. ättiksyra (under loppet av ca 30 sek.). Därefter borttogs bromöverskottet med konc. myrsyra under omsvängning. En droppe metylrött-I tillsattes för att kontrollera, att all brom bortskaffats. Vid behov avkyldes lösningen till rumstemperatur och försattes därefter med 2 g kaliumjodid och 25 ml svavelsyra 2.5 M. Efter 5 minuter titrerades frigjord jod med 1/10 normalt natriumtiosulfat med stärkelse-R som indikator. Denna sista reaktionstid visade sig nödvändig, då annars lösningarna efterblånade. Resultaten i tabell 5.

Som synes stiger tiosulfatförbrukningen kraftigt med temperaturen. Oxidationstiden synes vara utan betydelse vid vanlig temperatur. Av allt att döma bildas i den alkaliska lösningen framför allt i värme föreningar av brom på högre oxidationsstadium, som sedan inte fullständigt reagera med myrsyran i den ättiksura lösningen. *Waters* och *Beal* (9) anföra också, att den efterblåning, som erhålles vid reaktioner av denna typ, måste bero på att »oxiderrade bromderivat» bildas, som ej »dissocieras» genast vid lågt pH. Efterblåningen kunde undvikas om endast obetydligt överskott av brom användes. Tillsattes bromen i sur lösning fingo de ej heller någon efterblåning, men vid pH 4.5 och lägre erhöles 25 % för låga värden.

I den bland *AOAC:s metoder* (6) upptagna *Elmslie-Caldwell's metod* för

Table 5.
Thyroxin.
Blind test.

Oxidation with bromine water in alkaline solution (pH 10.3).

Temperature during oxidation	Time of oxidation in seconds	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
80	.15	0.55
80	15	0.58
50	15	0.20
50	15	0.32
20	15	0.07
20	15	0.06
20	60	0.05
20	60	0.08

bestämning av jod sker emellertid bromoxidationen i sur lösning, och Heim (10) fann både säker slutpunkt vid titreringen och rätt jodhalt, när bromen tillsattes i sur lösning.

För att söka bestämma i vilken form bromen föreligger i lösningen utfördes några försök. Enligt Farkas och Lewin (11) kan bromat bestämmas jämte hypobromit på följande sätt. Bromat + hypobromit bestämmas genom att lösningen försattes med kaliumjodid och svavelsyra tills lösningen blir 0.5 normal med avseende på fri syra, varefter frigjord jod titreras med tiosulfat. Hypobromit kan bestämmas i den ursprungliga lösningen genom att den göres bikarbonatalkalisk och försattes med känd mängd arsenit, varefter överskottet härav återtitreras med 1/10 normal jod. Bromatet erhålles som skillnad mellan de båda bestämningarna.

Denna metod användes på våra lösningar. Bildad mängd bromat + hypobromit hade redan tidigare bestämts genom försöken i tabell 5. Det återstod alltså att bestämma, hur stor del av denna summa som utgjordes av hypobromit. Proven bereddes vid 80° som i tabell 5. Sedan bromen borttagits med myrsyra, neutraliserades lösningen med natronlut 5 M till rent gul färg mot metylrött, varefter 4 g natriumbikarbonat tillsattes. 25.00 ml 1/10 normal natriumarsenitlösning tillsattes och efter 5 minuter återtitrerades med 1/10 normal jod och stärkelse-R som indikator. Härvid förbrukades 23.06 resp. 23.09 ml 1/10 normal jod. Vid ställning av samma arsenitlösning förbrukade 25.00 ml efter tillsats av 4 g natriumbikarbonat och 200 ml vatten 23.03 resp. 23.05 ml 1/10 normal jod. Sannolikt innehöll blindprovet ej hypobromit utan endast bromat, vilken alltså orsakat hela den i tabell 5 funna tiosulfatförbrukningen.

För att studera förhållandena, då oxidationen sker i sur lösning utfördes samma försöksserie som i tabell 5 med den skillnaden, att ättiksyran tillsattes före bromvattnet. Vidare utsträcktes reaktionstiden till 5 och 15 minuter. Resultaten i tabell 6.

Resultaten i tabellerna 5 och 6 visa alltså, att det viktigaste är, att oxidationen sker vid rumstemperatur. Hålles temperaturen högre erhålles blindvär-

Table 6.
Thyroxin.

Blind test.

Oxidation with bromine water in acid solution (pH 4.3).

Temperature during oxidation	Time of oxidation in minutes	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
80	15	1.45
50	5	0.09
50	5	0.07
50	15	0.10
20	5	0.00
20	5	0.01
20	15	0.01
20	15	0.02

den, som måste vara svåra att reproducera, om lösningens temperatur ej är exakt fastlagd. Vid 20° kunna blindproven i sur lösning helt försummas, medan de i alkalisk lösning uppgå till ungefär 1 % av den mängd titrer-
vätska, som förbrukas vid en vanlig analys. Sur lösning synes alltså vara att föredra vid oxidationen.

För att kontrollera, att oxidationen av jodid till jodat förlöper kvantitativt vid rumstemperatur under de betingelser som använts i tabell 6, gjordes motsvarande försök med tillsats av 15.00 ml av den kaliumjodidlösning, som tidigare använts i tabell 1. Resultat i tabell 7.

Table 7.
Thyroxin.

Blind test to which KI was added.

Oxidation with bromine water in acid solution (pH 4.3).

Time of oxidation in minutes	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	
	Found	Calc.
5	27.39	27.40
5	27.40	
15	27.39	
15	27.39	

Som framgår av tabellen är oxidationen fullständig. I detta sammanhang förtjänar att påpekas, att kontrollen med metylrött efter myrsyratillsatsen visade sig nödvändig, då det i allmänhet dröjde flera minuter innan all brom försvunnit.

2. »Bromtillsatsen är otillräcklig.» För att undersöka hur mycket nitrit, som under olika upphettningförhållanden kan bildas vid smältningen, gjordes några försök. Nitritbestämningen utfördes på följande sätt. Smältan löstes i 100 ml vatten och försattes med överskott av 1/10 normalt cerisulfat. Efter surgörning med svavelsyra tillsattes kaliumjodid, och frigjord jod titrerades med 1/10 normalt tiosulfat.

Smältningen skedde i ett par försök (»Ed. XI») enligt farmakopén, d. v. s. degeln var svagt rödglödande efter 10 minuter, och massan började smälta efter 20 minuter, då upphettningen avbröts. I ett par andra försök upphettades så kraftigt, att massan började smälta redan efter ett par minuter och sedan hölls smält under återstoden av de 20 minuterna. I ett av dessa fall skedde upphettningen med kraftig mekerlåga (»Meker»), i ett annat med kraftig bunsenlåga (»Bunsen»). Resultaten i tabell 8. Bildad nitritmängd anges i ml 1/10 molar natriumnitritlösning.

Table 8.

Thyroxin.

Formation of nitrite in melting of blind test.

Heating	Nitrite formed (ml. of 0.100M)
Pharm. Succ. Ed. XI	10.5
" " " "	8.2
Meker	38.2
Bunsen	12.2

Enligt Ed. XI sätter man till 15 ml bromvatten-R. Detta reagens innehåller vid 20° omkring 3.3 % brom. 15 ml bromvatten-R är alltså ekvivalent med c:a 31 ml 1/10 molar natriumnitritlösning. För att oxidera den mängd jodid, som normalt bildas vid förbränning av den mängd thyroxin, som Ed. XI föreskriver, åtgår mindre än 2 ml bromvatten-R. Av allt att döma borde farmakopéns 15 ml bromvatten-R vara fullt tillräckliga för oxidationen av såväl jodiden som det normalt bildade nitritet.

För att kontrollera denna slutsats gjordes några försök. Först undersöktes, om bromoxidationen av nitritet var fullständig dels under Ed. XI:s betingelser (alkalisk lösning, oxidationstid 15 sek.), dels under de av oss föreslagna betingelserna (sur lösning, oxidationstid 5 min.).

7 g nitratdestruktionsblandning och 5 g natriumacetat löstes i 200 ml vatten. Till den kalla lösningen sattes 15.00 ml 1/10 molar natriumnitritlösning. Vid försöken enligt Ed. XI:s metod (»Ed. XI») tillsattes därefter 15 ml bromvatten-R. Efter 15 sekunder tillsattes 15 ml konc. ättiksyra, varefter bromöverskottet borttogs med myrsyra. Kontroll med metylrött-I. Efter tillsats av 2 g kaliumjodid och 25 ml svavelsyra 2.5 M titrerades frigjord jod med tiosulfat. Vid försöken enligt den modifierade metoden (»Modif. method») tillsattes ättiksyran före bromen. Bromens reaktionstid var 5 minuter, varefter försöket slutfördes på samma sätt. Resultat i tabell 9.

Jämföres tabell 9 med tabellerna 5 och 6 finner man, att oxidationen av nitritet måste vara fullständig i samtliga fall, då de erhållna värdena väl överensstämmer med blindprovsvärdena under samma betingelser.

Slutligen upprepades dessa försök men med tillsats av 5.00 ml kaliumjodidlösning (haltbestämd genom titrering med silverniträt och eosin som indikator) före bromvattentillsatsen. Resultat i tabell 10.

Table 9.

Thyroxin.

Blind test with addition of nitrite.
Oxidation with bromine water.

Method	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$
Pharm. Suec. Ed. XI (oxidation at pH 10.3)	0.06
" " " " " " " 10.3	0.08
Modified "method" (oxidation at "pH" 4.3)	0.01
" " " " " " " 4.3	0.01

Table 10.

Thyroxin.

Blind test with KI and nitrite added.
Oxidation with bromine water.

Method	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	
	Found	Calc.
Pharm. Suec. Ed. XI (oxidation at pH 10.3)	9.32	9.24
" " " " " " " 10.3	9.28	
Modified "method" (oxidation at "pH" 4.3)...	9.29	
" " " " " " " "	9.25	

Närvaron av nitrit inverkar som synes ej på den kvantitativa oxidationen av jodiden.

Det är emellertid möjligt, att nitritbildningen blir större i ett prov, som innehåller organisk substans. Det torde därför vara lämpligare att föreskriva, att bromvatten tillsättes tills den i början bruna färgen bleknar samt därefter ytterligare exempelvis 10 ml. I blindprovet bör i så fall samma mängd bromvatten användas.

3. »Jodförluster vid upphettningen.» Vad slutligen beträffar jodförluster vid upphettningen anför *Lindholm* (12), att om destruktio- nen företages i så stark värme att blandningen hålles smält i blott några minuter, kan joden fullständigt förflyktigas. *Beal och Szalkowski* (13) anför emellertid, att endast långvarig upphettning medför någon nämnvärd risk för jodförluster genom förgasning. *Butler och Burdett* (1) ha vid uppslutning av jodftaleinnatrium med natriumkarbonat under vissa skärpta betingelser funnit en jodförlust genom förgasning på c:a 1.5 %.

Någon genomförd försöksserie ha vi icke utfört, men ett par värden kunna anföras, vilka i varje fall visa, att *Lindholms* uppgifter äro överdrivna. I två försök upphettades så kraftigt, att massan var smält inom 2—3 minuter, varefter den hölls smält under resten av de föreskrivna 20 minuterna. Försöken, som utfördes på c:a 0.25 g jodkasein, gav en halt av 5.86 resp. 5.95 % jod (vid förbränning enligt Ed. XI 5.95 %).

Den av oss använda metoden med bromoxidation i sur lösning prövades slutligen på ett preparat av thyroxin och tre preparat av jodkasein. Substansen smältes med destruktionsblandningen enligt Ed. XI. Smältan löstes, försattes

med 5 g natriumacetat och 15 ml konc. ättiksyra samt avkyldes till rumstemperatur. Bromvatten-R tillsattes tills den i början bruna färgen bleknade samt därefter ytterligare 10 ml. Efter 5 minuter borttogs bromöverskottet med myrsyra. Kontroll med en droppe metylrött-I. Därefter fullföljdes bestämningen enligt farmakopén. Blindproven kunde försummas. Resultaten för tyroxin i tabell 11 och för jodkasein i tabell 12. På grund av brist på material kunde ej flera bestämningar på tyroxin utföras.

Table 11.

Thyroxin.

Determination of iodine in thyroxin according to the modified method of Pharm. Succ. Ed. XI (oxidation in cold, acid solution).

Weight	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Percentage of I
0.02646	8.00	63.9
0.02091	6.38	64.5
0.01988	5.99	63.7

Table 12.

Iodinated Casein.

Determination of iodine in iodinated casein according to the modified method of determining thyroxin (oxidation in cold, acid solution).

No of sample	Weight	ml. 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Percentage of I
1	0.2347	6.60	5.95
	0.2725	7.65	5.94
	0.2232	6.27	5.94
	0.2780	7.83	5.96
2	0.2217	5.68	5.42
	0.2679	6.89	5.44
	0.2386	6.09	5.41
	0.2422	6.30	5.50
3	0.2374	5.59	4.99
	0.2150	5.09	5.01
	0.7461	17.77	5.04
	0.7122	16.84	5.00

Som framgår av de två sista värdena i tabell 12 synes en ökning av den invägda mängden ej medföra någon ändring av resultatet.

Förbränning med kaliumpermanganat i sur miljö.

Ed. XI:s metod för att bestämma jod i tyroxin är emellertid mycket omständlig. Vi undersökte därför om inte den betydligt enklare metod med sur permanganatförbränning, som vi förut provat på jodftaleinnatrium, kunde användas även här.

Av substansen invägdes 0.02000 g, som behandlades på exakt samma sätt som beskrivits för jodftaleinnatrium under rubriken »Förbränning med kaliumpermanganat i sur miljö». Resultaten i tabell 13. Både 5 och 15 minuters koktid prövades.

Table 13.

Thyroxin.

Determination of iodine in thyroxin by treatment with permanganate in acid medium.

Weight	Time of boiling in minutes	ml. 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Percentage of I
0.02088	5	6.38	64.6
0.02056	5	6.30	64.8
0.01881	15	5.72	64.4
0.02509	15	7.67	64.7

Av tabellen framgår, att metoden ger väl reproducerbara värden och synes vara väl lämpad för jodbestämning i tyroxin. 5 minuters koktid är tillräcklig.

På samma sätt utförda blindprov visade en förbrukning av mindre än en droppe 1/10 normalt tiosulfat.

Jämföras värdena i tabell 13 med resultaten från bestämningar på samma preparat enligt den modifierade farmakopemetoden i tabell 11, finner man ganska god överensstämmelse.

Det visade sig, att samma metod med permanganatförbränning i sur lösning kunde användas med små ändringar även på jodkasein. Permanganatmängden ökades till 50 ml lösning (1 + 20). Upphettningen måste dock ske med viss försiktighet och i en kolv på 500 ml för att undvika överpösning. Reaktionen var ej heller färdig efter 5 minuter, varför kokningstiden utsträcktes till 15 minuter. Även 30 minuter prövades men befanns vara onödigt lång tid.

Haltbestämningen utfördes på samma substanser som i tabell 12. Resultaten återfinnas i tabell 14.

På samma sätt utförda blindprov förbrukade mindre än en droppe 1/10 normalt natriumtiosulfat. Resultaten äro som synes väl reproducerbara. Anmärkningsvärt är emellertid, att de värden som erhållits för samtliga tre preparat ligga c:a 2 % högre, än de som erhållits enligt den modifierade farmakopemetoden. Den enda tänkbara förklaringen till denna skillnad är, att en viss jodförlust sker vid förbränning enligt Ed. XI. Genom likformigt arbete ha värdena i tabell 12 trots detta blivit så jämna.

SKÖLDKÖRTEL.

Uppslutning med natriumhydroxid och natriumkarbonat.

Farmakopéns förbränningsmetod är beskriven av *Johnson och Nelson* (14). Substansen uppslutes med en blandning av natriumhydroxidlösning

Table 14.

Iodinated Casein.

Determination of iodine in iodinated casein by treatment with permanganate in acid medium.

No of sample	Weight	Time of boiling in minutes	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Percentage of I
1	0.2406	15	6.87	6.04
	0.2328	15	6.69	6.08
	0.2580	15	7.39	6.06
	0.2029	15	5.88	6.13
	0.2029	15	5.88	6.13
	0.2576	15	7.41	6.08
	0.2647	15	7.60	6.07
	0.2051	15	5.92	6.10
	0.2714	30	7.80	6.08
	0.2130	30	6.12	6.08
	0.2700	30	7.72	6.05
2	0.2226	15	5.88	5.59
	0.2552	15	6.68	5.54
	0.2328	15	6.17	5.60
	0.2316	15	6.14	5.61
	0.2495	15	6.57	5.56
	0.2500	15	6.64	5.61
3	0.2341	15	5.66	5.11
	0.2763	15	6.69	5.12
	0.2527	15	6.07	5.08
	0.2228	15	5.41	5.13
	0.2222	15	5.45	5.18
	0.2546	15	6.17	5.12

och natriumkarbonat försatt med rivet filterpapper. Efter upphettningen löses smältan i vatten. Jodiden oxideras med bromvatten till jodat. Metoden har efterprovats av *Canbäck* och *Wallenberg* (15).

I farmakopéns utformning av metoden sker oxidationen med brom i varm alkalisk lösning. Efter tillsats av 10 ml konc. ättiksyra bortskaffas bromöverskottet med myrsyra. Därefter tillsättes 10 ml 50 %-ig svavelsyra, och efter avkylning till rumstemperatur tillföres kaliumjodid, varefter lösningen *omedelbart* skall titreras med tiosulfat. Lösningens pH vid kaliumjodid tillsatsen är c:a 4.5, och det bildade jodatet reagerar vid detta pH endast långsamt med kaliumjodid. Försök visade, att en reaktionstid på 10—15 minuter var nödvändig. Ökades däremot syramängden till 40 ml svavelsyra 2.5 M, blev reaktionen momentan, vilket påpekats av *Ehrlén* (16).

Som tidigare anförts medför oxidation med brom i varm alkalisk lösning, att bromat bildas. Vid efterföljande surgörning med ättiksyra och tillsats av myrsyra förstöres ej bromatet fullständigt utan kan ge upphov till för höga värden.

I farmakopéns metod är pH vid myrsyratillsatsen c:a 6.5. Därefter tillsättes svavelsyra och först efter avkylning kaliumjodid. Det är tänkbart, att

bromat vid detta lägre pH kan ge brom med den bromid, som finnes i lösningen. Om denna i sin tur förstörs av ett eventuellt överskott av myrsyra i lösningen, skulle detta medföra, att bromatbildningen eliminerades. För att undersöka denna detalj utfördes några försök.

7.5 g 50 %-ig natronlut och 5 g natriumkarbonat löstes i 200 ml vatten, och lösningen uppvärmdes till angiven temperatur. Därefter tillsattes 10 ml konc. ättiksyra, 0.3 g kaliumbromid, 5.10 ml kaliumbromat 0.1002-n, 1 droppe myrsyra och 50 ml svavelsyra 2.5 M i nämnd ordning. Lösningen avkyldes vid behov till rumstemperatur, och efter 5 minuter tillsattes 0.5 g kaliumjodid. Efter ytterligare 5 minuter titrerades med 1/10 normalt natriumtiosulfat. Resultaten i tabell 15 kolumn KBrO_3 .

Vidare utfördes analoga försök med kaliumbromatet utbytt mot 5.10 ml 0.1000-n kaliumjodat. Tanken bakom dessa sista försök var att utröna, om kaliumjodat på motsvarande sätt kunde reagera med bromid och eventuellt förstöras på samma sätt som bromat. Resultaten av dessa försök i tabell 15, kolumn KJO_3 .

Table 15.

Thyroid.

Blind test.

No addition of bromine, instead 5.10 ml of 0.1002N KBrO_3 and 5.10 ml of 0.1000N KJO_3 respectively.

Temperature	ml. of 0.1000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	
	KBrO_3	KJO_3
80	4.23	5.02
80	4.07	5.03
50	4.90	5.00
50	4.80	5.07
20	5.00	5.05
20	5.16	4.96

Det framgår av tabellen, att kaliumbromat i viss mån förstörs vid högre temperatur. Vid rumstemperatur är förstöringen obetydlig eller ingen. Beträffande kaliumjodat kan ingen förstöring med säkerhet påvisas. Någon nämnvärd fördel med att sätta till svavelsyran före kaliumjodiden kunde alltså ej konstateras.

Hur mycket bromat som bildas, och i vad mån detta förstöres, undersöktes genom några blindprovförsök. Dels utfördes blindprov enligt Ed. XI med svavelsyran tillsatt före kaliumjodiden, dels analoga försök, där kaliumjodiden tillsattes först. I de senare försöken kunde alltså ingen förstöring av bromat ske efter ytterligare surgörning.

7.5 g 50 %-ig natronlut och 5 g natriumkarbonat löstes i 200 ml vatten. Lösningen uppvärmdes till angiven temperatur och försattes med 7 ml bromvatten-R och efter angiven reaktionstid tillsattes 10 ml konc. ättiksyra. Bromöverskottet bortskaffades med myrsyra. Kontroll med metylrött-I. I ena försöksserien (I) tillsattes därefter 50 ml svavelsyra 2.5 M och efter avkylning

0.5 g kaliumjodid. Efter 5 minuter titrerades med 1/100 normalt natriumtiosulfat. I den andra försöksserien (II) avkyldes lösningen och försattes med 0.5 g kaliumjodid och därefter med 50 ml svavelsyra 2.5 M. Titring efter 5 minuter. Resultat i tabell 16.

En tydlig skillnad mellan resultaten av de båda försöksserierna kan endast utläsas vid 20°. Man ser emellertid också hur varierande värden, som kunna erhållas vid samma temperatur, om denna överstiger rumstemperaturen.

I kolumn III i tabell 16 upptas några försök med oxidation i sur lösning. 7.5 g 50 %-ig natronlut och 5 g natriumkarbonat löstes i 200 ml vatten. Lösningen uppvärmdes till angiven temperatur och försattes med 25 ml konc. ättiksyra. Lösningens pH blev då c:a 4.5. Därefter tillsattes 7 ml bromvatten-R, och efter 5 minuter bortogs bromöverskottet med myrsyra. Kontroll med metylrött-I. Efter avkyllning tillsattes 0.5 g kaliumjodid och 50 ml svavelsyra 2.5 M. Titring efter 5 minuter.

Table 16.

Thyroid.

Blind test.

I. Oxidation in alkaline solution. H₂SO₄ before KI.

II. Oxidation in alkaline solution. KI before H₂SO₄.

III. Oxidation in acid solution. KI before H₂SO₄.

Temperature on bromine addition	ml. 0.01000N Na ₂ S ₂ O ₃				
	I		II		III
	15 sec.	60 sec.	15 sec.	60 sec.	5 min.
80	3.65		3.78		5.00
80			1.85		2.97
50	1.05		0.65		0.69
50	0.40		0.57		0.15
20	0.00	0.00	0.21	0.14	0.00
20	0.00	0.00	0.18	0.16	0.00

Som tydligt framgår av tabellen måste bromoxidationen ske i kall lösning. Skall den utföras i alkalisk lösning måste svavelsyran tillsättas före kaliumjodiden. Att bildat bromat förstöres under dessa betingelser måste bero på att ett visst överskott av myrsyra tillsatts. Förstöringen blir därför ganska oberäknelig. Sker däremot reaktionen i sur lösning, kan kaliumjodiden tillsättas före svavelsyran utan att någon tiosulfatförbrukning erhålles.

De i tabell 16 upptagna försöken upprepades därefter med den skillnaden, att en viss mängd kaliumjodidlösning tillsattes före bromvattentillsatsen. Resultaten i tabell 17. Den använda kaliumjodidlösningen haltbestämde genom oxidation med bromvatten-R vid pH 4, varvid den i tabell 17 använda mängden befanns förbruka 11.02 ml 0.01000 normalt natriumtiosulfat. I kolumnerna I, II och III äro försöksbetingelserna samma som i motsvarande kolumner i tabell 16.

Table 17.

Thyroid.

Blind test with KI added.

I. Oxidation in alkaline solution. H_2SO_4 before KI.II. Oxidation in alkaline solution. KI before H_2SO_4 .III. Oxidation in acid solution. KI before H_2SO_4 .

Temperature on bromine addition	ml. 0.01000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$		
	I	II	III
	15 sec.	15 sec.	5 min.
80	17.87	14.78	
80	22.99	15.96	
20	11.06	11.12	11.02
20		11.00	11.01

Av tabellen framgår, att oxidationen av jodid är kvantitativ vid vanlig temperatur i samtliga fall.

Slutligen gjordes jämförande försök mellan farmakopéns metod och den av oss modifierade metoden. De senare försöken utfördes alltså under samma betingelser som använts i tabell 16, kolumn III d. v. s. oxidation i kall, sur lösning (pH 4.5). Resultat i tabell 18. Bestämningarna enligt farmakopén utfördes så att oxidationen alltid kom att ske i mer eller mindre varm lösning. Den enda avvikelser från farmakopéns text var att svavelsyramängden ökades till 40 ml svavelsyra 2.5 M. Resultaten i tabell 19. Vid beräkningen av värdena har blindprovet antagits vara 0. Som redan framgått av tabell 16, I varierar blindprovsvärdet med temperaturen, men eftersom temperaturen icke är bestämd, måste blindprovet få ett slumpartat varierande värde.

Table 18.

Thyroid.

Determination of iodine according to the modified method of Pharm. Succ. Ed. XI (oxidation in cold, acid solution).

Weight	ml. of 0.01000N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Percentage of I
1.025	9.59	0.198
1.032	9.40	0.193
1.011	9.30	0.195
1.153	10.69	0.196
1.060	9.80	0.195
1.119	10.30	0.195
1.084	10.20	0.199

Resultaten i tabell 19 variera på c:a 10 %, medan skillnaden mellan högsta och lägsta värde i tabell 18 endast är c:a 3 %.

Table 19.

Thyroid.

Determination of iodine according to Pharm. Suec. Ed. XI
(oxidation in warm, alkaline solution).

Weight	ml. of 0.01000N Na ₂ S ₂ O ₃	Percentage of I
1.066	9.80	0.194
1.005	9.40	0.198
1.046	10.60	0.214
1.053	10.15	0.204
1.081	10.30	0.202
1.066	10.80	0.214

Andra förbränningsmetoder.

Farmakopéns förbränningsmetod är ganska tidsödande, varför ett par andra metoder också ha prövats. Först försöktes förbränning med användande av 20 g nitratdestruktionsblandning. Efter urkokning av smältan och neutralisation av lösningen med svavelsyra, inställdes lösningens pH på c:a 4 med hjälp av acetatbuffert. Den kalla lösningen försattes med bromvatten-R till begynnande gulfärgning och därefter ytterligare 10 ml. Efter 5 minuter borttogs bromöverskottet med myrsyra, och bestämningen slutfördes som ovan angivits för sköldkörtel. Resultaten gävo emellertid vid handen, att denna typ av förbränning synes vara mera känslig för kraftig upphettning än farmakopéns metod. Värdena blevo vid oförsiktig upphettning lätt för låga. Detta stämmer ju för övrigt med erfarenheterna från haltbestämningen av jodkasein enligt farmakopéns tyroxinmetod.

Vidare prövades också den metod, som finnes upptagen i USP XIII. Man uppsluter här med kaliumkarbonat, men metoden syntes dock fordra kraftigare upphettning än vanlig bunsenlåga, för att fullständig förbränning skulle erhållas.

Även sur permanganatförbränning prövades. Härvid åtgick mycket stora mängder permanganat (c:a 10 g). Fullständig förbränning syntes erhållas, men värdena varierade i allmänhet ganska mycket.

Litteraturförteckning:

1. *Butler och Burdett*: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 11 (1939), 237.
2. *Canbäck*: Svensk Farm. Tidskr. 48 (1944), 381.
3. *Vieböck och Brecher*: Pharm. Monatshefte 10 (1929), 191.
4. *Baggesgaard Rasmussen och Bjerresö*: Dansk Tidsskr. Farm. 15 (1941), 121.
5. *Clark och Jones*: J. Ass. Off. Agr. Chem. 25 (1942), 755.
6. *Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, Ed. 6 (1945), 418.
7. *de Jong och Lenstra*: Pharm. Weekblad 83 (1948), 161.
8. *Hunter*: J. Biol. Chem. 7 (1909), 321.

9. *Waters och Beal*: J. Am. Pharm. Ass., Scient. Ed. 34 (1945), 297.
10. *Heim*: J. Am. Pharm. Ass., Scient. Ed. 37 (1948), 468.
11. *Farkas och Lewin*: Anal. Chem. 19 (1947), 662.
12. *Lindholm*: Arch. Pharm. Chem. 52 (1945), 305.
13. *Beal och Szalkowski*: J. Am. Pharm. Ass., Scient. Ed. 24 (1935), 742.
14. *Johnson och Nelson*: J. Am. Pharm. Ass., Scient. Ed. 30 (1941), 625.
15. *Canbäck och Wallenberg*: Svensk Farm. Tidskr. 49 (1945), 561.
16. *Ehrlén*: Kommentarer till Svenska farmakopén 1946, Stockholm 1947, sid. 282.

SUMMARY.

Determination of organically bound iodine.

The XIth Edition of the Swedish Pharmacopoeia lists three preparations containing organically bound iodine: Iodophthalein Sodium, Thyroxin and Thyroid. A closely related compound is Iodinated Casein. The methods of determining the iodine content of these preparations have been found to possess certain weaknesses and can in some cases be simplified.

IODOPHTHALEIN SODIUM.

Treatment with potassium permanganate in alkaline medium.

By the method described in the Swedish Pharmacopoeia Ed. XI the substance is decomposed in alkaline permanganate solution in the same way as that described in the USP XII. The iodine is then oxidised to iodate by bromine in a solution buffered with acetate. The excess bromine is removed with formic acid, and the iodate is then determined in the usual way by iodometric titration.

After the removal of the excess bromine there often remains a brown colouring. It is shown that this is due to manganous ions being oxidised by the bromine to manganese dioxide or a related compound. On acidification this manganese compound liberates iodine from potassium iodide and may thus cause consumption of sodium thiosulfate.

Table 1 shows that the formation of manganese dioxide diminishes rapidly with decreasing pH value, and at $\text{pH} < 3,6$ it is insignificant (column Mn). Within the whole range of pH values investigated the oxidation of iodine is quantitative (column KI).

A pH value of approx. 3.2 which is independent of normal measuring errors, is obtained by increasing the quantity of acetic acid to 25 ml. of concentrated acid.

Table 2 shows that the oxidation of potassium iodide is complete at this pH value even if the time of oxidation is reduced to 5 minutes.

In table 3 the results obtained by a method thus modified are compared with those obtained in determinations according to the Pharmacopoeia. The difference between the results is insignificant but the advantage of the modified method is that the brown colouring is avoided.

Treatment with potassium permanganate in acid medium.

An appreciable gain of time is achieved, if the permanganate oxidation is carried out in acid medium. The following method has been proved suitable:

0.1000 g of iodophthalein sodium is dissolved in 10 ml. of water and 2 ml. of 2M sodium hydroxide. The solution is heated with 15 ml. of a 5 per cent solution of potassium permanganate and 20 ml. of 2.5M sulfuric acid and boiled for 5 minutes. After cooling the solution is decoloured with a small excess of a 10 per cent solution of sodium pyrosulfite. The solution is neutralised with 2M sodium hydroxide (methyl red) and 25 ml. of concentrated acetic acid and 3 g of sodium acetate are added and the mixture cooled to room temperature. Bromine water is added until a faint yellow colouring appears and after that a further 10 ml. After 5 minutes decolorisation is affected by the dropwise addition of formic acid. 1 g of potassium iodide and 10 ml. of 2.5M sulfuric acid are added and the solution is titrated with sodium thiosulfate. Results of the determinations are shown in table 4.

THYROXIN AND IODINATED CASEIN.

Fusion with nitrate destruction mixture.

According to the Swedish Pharmacopoeia Ed. XI thyroxin is decomposed by Hunter's method and the iodide is then oxidised to iodate by bromine water in alkaline solution.

If the oxidation is carried out in warm solution bromate is formed and large blind test value are obtained (table 5). Even when the oxidation takes place in acid solution (pH 4.3) blind values are obtained at higher temperatures (table 6). The blind test values obtained at 20° C can be neglected.

Table 7 shows that the oxidation of iodide is complete in acid solution within 5 minutes.

In the fusion nitrite is formed (table 8), which is quantitatively oxidised in the acid solution (table 9, cf. tables 5 & 6). The presence of nitrite does not influence the quantitative oxidation of iodide (table 10).

Tables 11 and 12 show the results of determinations of iodine in thyroxin and iodinated casein when the bromine oxidation takes place in cold acid solution.

Treatment with potassium permanganate in acid medium.

Thyroxin can, however, be estimated much more simply through oxidation with permanganate in acid solution as stated above for iodophthalein sodium. 0.02000 g are weighed out. Results are shown in table 13.

The results of these determinations agree rather well with the values obtained according to the modified method of the Pharmacopoeia (table 11).

The same method can also be used for iodinated casein if the quantity of permanganate is increased to 50 ml. of a 5 per cent solution and the boiling time to 15 minutes. Results in table 14. The blind test values can be neglected. The determinations were made on the same substances as in table

12, but the values obtained were about 2 per cent higher, probably due to loss of iodine when the fusion was carried out according to the Pharmacopoeia.

THYROID.

Fusion with sodium hydroxide and sodium carbonate.

According to the Swedish Pharmacopoeia Ed. XI the compound is decomposed in the same way as described in the USP XII. The iodine is oxidised by bromine water in warm alkaline solution. As pointed out above the oxidation in alkaline solution causes the formation of bromate. The solution is then made acid (40 ml. of 2.5M sulfuric acid) and after cooling potassium iodide is added, and the solution is titrated at once. In the tests, the results of which are shown in table 15, the addition of bromine was omitted and in its place potassium bromide and a known quantity of potassium bromate and potassium iodate respectively and one drop of formic acid were added before the sulfuric acid. The bromate is to a certain extent destroyed in the acidification if the temperature is high and an excess of formic acid is present. At room temperature the destruction is insignificant. On the other hand, iodate is not destroyed at any temperature.

Tables 16 and 17 show that the oxidation by bromine should be carried out in cold, preferably acid, solution.

Table 18 shows the results obtained in determinations of iodine in thyroid according to the following modified method:

1.000 g of substance is fused in the prescribed manner with sodium hydroxide solution and sodium carbonate. The contents of the crucible are then dissolved by boiling with water and after this 25 ml. of concentrated acetic acid are added and the mixture cooled to room temperature. 7 ml. of bromine water are added and after 5 minutes the excess bromine is removed with formic acid. After addition of 0.5 g of potassium iodide and 50 ml. of 2.5M sulfuric acid the liberated iodine is titrated with 0.01N sodium thio-sulfate with 3 ml. of starch solution as indicator. The value for the blind test was 0 as shown above.

In table 19 the corresponding determinations have been made according to Pharm. Suec. Ed. XI. The oxidation took place in warm solution. When calculating the values, the value for the blind test was assumed to be 0.

The difference between the highest and lowest values according to the modified method is about 3 per cent and about 10 per cent according to the method of Pharm. Suec. Ed. XI.

Adsorption Analysis of Salts of Organic Acids

A preliminary report

by

Carl Olof Björling

State Pharmaceutical Laboratory, Stockholm

(Will be inserted in Collect. Pharm. Suec. IV 1949)

In recent years a new method for analysis of salts has been developed. Samuelson¹ filtered a solution of an inorganic salt through a column of a proton saturated cation exchanger. The anions passed through the column, but the cations—*e.g.* Li, Na, K, Ca, Ba, Cu, Pb, Fe, Al—were exchanged for hydrogen ions. The acid in the filtrate was titrated or otherwise determined. The cations withheld by the exchanger were eluted with hydrochloric acid and could be determined in the usual way. The yields were good and the time required for an analysis short. The method permits a separation of ions interfering with each other in analyses, *e.g.* phosphate from calcium. As very little is reported on salts of organic acids (however, compare 1) it seemed worth while to pay some attention to them. This paper is devoted to the analysis of sodium and calcium salts of some water soluble acids.

Procedure. The exchanger used was Amberlite IR-100 H from Nordiska Armaturfabrikerna, Linköping. To avoid swelling during the experiments the resin is kept in water for a day and then poured into a glass tube, 1 cm wide, to a height of 20 cm. When fixed vertically the column permits water to flow through it rather freely without suction. The rate of flow is regulated by a stop-cock at the lower end. The resin is washed with water until the washings are colourless and neutral to methyl red. Then 50 ml of hydrochloric acid 5M is filtered through the column (rate of flow: 5 ml per minute) and the excess of acid removed by washing with 200—500 ml of water (test with silver nitrate or methyl-red). The column is then ready for the analysis.

Blank value. 100 ml of water run through the column and titrated with 1/10 normal sodium hydroxide (phenolphthalein) consumed 0,15 ml. With “equilibrium water” the value was 0,13 ml. Smaller quantities of water gave proportionally smaller blanks. All figures given below are corrected accordingly.

Capacity. The exchanging capacity of the column was tested in the following way. 20 ml of 1/10 molar sodium chloride solution was filtered through the column which was eluted completely with water (25 ml). The hydrochloric acid in the filtrate was titrated with 1/10 normal sodium hydroxide. Indicator: phenolphthalein. The process was repeated with further quantities of sodium chloride. Results see Table 1.

Table 1 Testing the Capacity of the Column

Millival Na Cl introduced	Millival HCl titrated
1,998	1,998
2,998	2,994
4,994	4,930
5,992	5,840

Thus, 2 millival could be used for the column.

RESULTS

1. *Salts, prepared extemporaneously.* 20 ml of one tenth normal solutions of some acids were titrated with one tenth normal sodium hydroxide, using phenolphthalein as the indicator. The titrated solutions were filtered (5 ml per minute) through the Amberlite column, and the acid re-liberated was eluted with water and titrated in the filtrate. All the chemicals used were duly tested for foreign anions. For results see Table 2.

Table 2. Acids, Titrated and Analysed

Acid	Millival found on		Yield %	Elution with ml
	direct titration	titration after Amberlite		
Tartaric acid	Free acid		99,9	50
	0,994	0,986	99,2	25
	0,994	0,992	99,8	50
	0,994	0,993	99,9	60
	2,004	2,001	99,9	50
	2,004	2,001	99,9	50
Citric acid	2,028	2,025	99,9	50
	2,028	2,024	99,8	50
Lactic acid	1,728	1,734	100,2	70
	1,728	1,728	100,0	70
Sulfosalicylic acid	1,536	1,534	99,9	50
	1,561	1,569	100,5	50

The direct determination of lactic acid was performed by the method given in the Swedish pharmacopoeia. For the "Amberlite analysis" the solution was heated on a water bath with 20 % excess of 1/10 normal sodium hydroxide for 5 minutes to destroy the anhydrides. The carbon dioxide of the air was excluded by means of a soda lime tube. After cooling the solution was filtered through the resin.

The exchange method failed with propionic and benzoic acids; for benzoic acid even in more dilute solution. The elution was slow and incomplete. Acetic acid has been tried with success by Samuelson¹.

2. *Calcium lactate*, conforming to the tests in the Ph. Svec. Ed. XI. It contained at most 1,2 % calcium lactyl lactate and 27,9 per cent water of crystallisation, the latter determined at 105° (theory 29,2 % H₂O).

About 0,3000 g dissolved in 10 ml of water was filtered through the column and eluted with 70 ml of water. Indicator: phenolphthalein.

Table 3. Calcium Lactate

	Per cent			
	Found	Mean	Theory	Yield
Ca, determ. as in Ph. Sv.	13,03; 13,13; 13,07	13,08	13,00	100,6
Acids, calculated as lactate ion. ...	57,3; 57,4	57,3	57,78	99,3

3. *Calcium gluconate*, conforming to the tests in the Ph. Svec. Ed. XI. The loss of water at 130° was 0,5 %. The water content according to the formula is 4 %.

About 0,4500 g dissolved in 20 ml of water. Elution with 70 ml of water. Indicator: phenolphthalein. Towards the end of the titration the red colour of the solution persisted for some seconds indicating a slow reaction between the sodium hydroxide and the titrand. However, there was no doubt as to where to fix the end point.

Table 4. Calcium Gluconate

	Per cent			
	Found	Mean	Theory	Yield
Ca, determ. as in Ph. Sv.	8,97; 9,01	8,99	8,94	100,6
Acids, calculated as gluconate ion	85,6; 86,6; 86,1	86,1	87,04	98,9

4. *Calcium glycono-phosphate*, conforming to the tests in the Ph. Svec. Ed. X. The loss of weight at 130° was 11,0 %. The water content according to the formula is 14,6 %.

About 0,2500 g dissolved in 20 ml of water. Elution with 25 ml of water. Indicator: phenolphthalein. A potentiometric titration ascertained that it was the correct indicator.

Table 5. Calcium Glycono-phosphate

	Per cent			
	Found	Mean	Theory	Yield
Calcium, titration to pH 3,5 ...	16,28; 16,45	16,37	16,28	100,6
Acids, calculated as C ₃ H ₇ O ₈ P ...	69,8; 69,2	69,5	69,08	100,6

5. *Novalgin*, the sodium salt of amidopyrine methane-sulfonic acid (1 H₂O), free from chloride and sulfate. The loss of weight at 105° was 5,3 % (according to formula 5,1 % H₂O).

About 0,4000 g (1 millival) dissolved in 20 ml of water. The usual quantity 2 millivals, gave low yields (2—3 per cent loss). Elution with 50 ml of water. By a potentiometric titration it was ascertained that phenolphthalein was the correct indicator. The approximate content of amidopyrine was determined oxidimetrically with permanganate in alkaline solution by Schulek and Meny-hárth's method.³

Table 6. *Novalgin*

	Per cent				
		Found	Mean	Theory	Yield
Bases, as Na (sulfate ash)		6,48; 6,59	6,54	6,55	99,8
Acids, as amidopyrine methane-sulfonium ion	With KMnO ₄	89; 89		88,32	
	With Amberlite	87,5; 88,0	87,8		99,4

6. *Sodium menadiol sulfate*, Ph. Sv. (2-methyl-1,4-naphthylene-di-sodium-di-sulfate), a specimen of rather low quality: light brown colour; contained chloride and sulfate. About 0,4000 g dissolved in 20 ml of water. Elution with 50 ml of water. Indicator: phenolphthalein.

As it was found difficult to obtain a sulfate ash free from carbon, the sodium content was determined in the following way. After the elution with water, 50 ml of hydrochloric acid 5M was filtered through the column, thus eluting the sodium which was determined as Na₂SO₄. A blank was run.

The percentage of oxidizable hydroquinone derivative was determined with ceric sulfate by Canbäck and Ehrlén's method.⁴

Table 7. *Sodium Menadiol Sulfate*

	Per cent found, as Na ₂ C ₁₁ H ₈ S ₂	Average
Acids	92,9; 92,7; 93,2; 93,0	93,0
Oxidizable	89,3; 89,8	89,6
Bases	93,5; 93,0	93,3

The result may be interpreted by the assumption that the substance contained 89,6 per cent sodium menadiol sulfate plus at most 1,4 per cent sodium sulfate or at most 1,1 per cent sodium chloride, the rest being water. This coincides with the outcome of the qualitative tests.

Summary

A method is given for the analysis of the sodium or calcium salts of some water soluble acids. A solution of the salt is filtered through a column of Amberlite IR-100 H, eluted with water, and titrated. The accuracy is good.

Literature

1. *Samuelson, O.*, Studier rörande jonbytande fasta ämnen Dissertation, Stockholm 1944.
Samuelson, O., Svensk kem. tidskr. 56 277, 1944; 57, 158, 250, 1945; 58 247, 1946.
Samuelson, O., IVA 17 5, 9, 17, 1946.
Runeberg, G., Samuelson, O., Svensk kem. tidskr. 57 91, 1945.
Regestad, S. O., Samuelson, O., *ibid.* 61 8, 1949.
2. *Wiesenberger, E.*, Mikrochemie ver. Mikrochim. Act. 30 176, 1942.
3. *Schulek, E., Menyhárth, P.*, Z. analyt. Chem. 89 426, 1932.
4. *Canbäck, T., Ehrlén, L.*, Farm. Revy 46 210, 1947.

The Adsorption of some Phenolic Compounds on Aluminium Oxide

by

Carl Olof Björling

State Pharmaceutical Laboratory, Stockholm

(Will be inserted in *Collect. Pharm. Suec.* IV, 1949)

In recent years aluminium oxide has been used for the analysis of alkaloid salts (1, 2, 3, 4, 5). Most alkaloids investigated hitherto are not adsorbed from alcohol or water by the oxide, but some of them form interesting exceptions to the rule: *Reimers* (1, 2) on chromatographic analysis found a delayed elution of morphine and apomorphine, *Björling* (5) of oxedrine. As the three compounds are all phenols, it was natural to ascribe to the phenol group a rôle in the adsorption processes.

The basic aluminium oxide adsorbs preferentially, as is well known, acid substances by neutralisation. Though morphine, etc. are mainly bases they also have acidic properties which may modify the adsorption.

The present paper will deal with the adsorption on aluminium oxide of three series of compounds, comprising di, mono, and non phenolic bodies. The first two series consist of alkaloids, the third of simple benzene derivatives.

Series 1. Adrenaline, oxedrine, ephedrine

Series 2. Apomorphine, morphine, codeine, and dionine

Series 3. Catechol, resorcinol, hydroquinone; guaiacol, phenol; veratrole, anisole.

EXPERIMENTAL

General

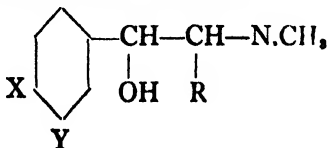
Aluminium oxide, standardised by *Brockmann's* method (6), was used in all the experiments.

Most often, two sets of chromatographic experiments were made; one in *macro scale*, employing about 0,5 millimol of the substance to be tested and 10 g of the oxide in a tube, 1 cm wide; another in *micro scale*, using about 0,005 millimol of the substance and 0,4 g of the oxide in a column, 3 mm wide, or 1 g in a 5 mm tube.

"Alcohol" designates 95 v/v per cent ethanol.

Series 1

consists of adrenaline, oxedrine, and ephedrine.



	X	Y	R
Adrenaline	OH	OH	H
Oxedrine	OH	H	H
Ephedrine	H	H	CH ₃

The three compounds differ mainly in the number of phenolic hydroxyls: two, one, and none, respectively (the CH₃ of the ephedrine is thought to be of minor importance). If the phenol group has any influence on the adsorption process it might be possible to demonstrate it with this series.

a) *Adrenaline*

Macro scale, alcohol

0,1 g of adrenaline dissolved in an equivalent amount of hydrochloric acid 0,5-n (about 1 ml) and 10 ml of alcohol was eluted with alcohol, 5 × 5 ml. The eluates were collected separately in 10,00 ml of hydrochloric acid N/10 and titrated back with sodium hydroxide N/10 (50 per cent alcoholic medium at the colour change, bromophenol blue, cf. 1, 5, 18). No acid was consumed, and no adrenaline could be detected by the Folin-Ciocalteu reagent (see appendix and 20). Strong positive reaction was, however, obtained after further elution with hydrochloric acid N/2.

Micro scale, 1 g of Al₂O₃, water

1—5 ml of an aqueous solution, containing 0,2—2 mg of adrenaline hydrochloride, was sucked into the oxide. No adrenaline was eluted by 25 ml of water or by 25 ml of a 10 per cent sodium chloride solution.

The pH of a buffered adrenaline solution greatly influenced the adsorption.

2 ml of an 0,5 ‰ adrenaline hydrochloride solution was mixed with 2 ml of a buffer solution M/10, the mixture sucked into the column, and eluted with 13 ml of the buffer. The adrenaline was determined in the eluate by the iodine method (see appendix). In parallel experiments the pH of the eluates was determined in separate portions of approximately 5 ml. Table 1 shows the results.

Table 1
Per cent Adrenaline Eluted from Solutions of Different pH

pH in the original solution		1,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
pH in the eluate	first 5 ml	2,1	8,6	8,6	8,7	8,7	9,6	9,6	9,4
	next 5 ml	1,2	4,2	5,0	8,8	8,9	9,9	10,0	9,0
	last 3—4 ml	1,1	3,2	4,3	5,6	8,9	8,7	10,0	8,9
Per cent adrenaline recovered in the eluate		100	87	85	62	0	0	0	0

Buffers according to the Swedish Pharmacopoeia 1946.

Thus, if the eluting buffer has a pH lower than 6 the adrenaline is not adsorbed quantitatively, and for total elution the pH must be in the vicinity of 1.

The limiting value of the pH of the solution leaving the column without eluting any adrenaline is, with the buffers used, somewhere between 5, 6 and 8, 9. Obviously, the oxide has a considerable capacity for adjusting the pH of the eluent.

The elution with hydrochloric acid was easy, and half normal acid was not more effective than one tenth normal. The following figures illustrate the connexion between the volume of 1/10 normal hydrochloric acid and the recovery of adrenaline in the eluate.

Elution with	5	10	15	20	25 ml HCl N/10
Per cent recovery	91	95	100	100	100

Table 2 shows the results of some elution experiments with hydrochloric acid.

Table 2

Recovery of Adrenaline Eluted from Aluminium Oxide with Hydrochloric Acid N/10. Iodine Method

Mg of Adrenaline	
Introduced	Recovered
0,45	0,47 0,48
0,80	0,78
0,82	0,84 0,83
0,90	0,89
1,21	1,17
1,35	1,33
2,01	2,02

b) *Oxedrine*

The results are summarized in Table 3.

Table 3

The elution of Oxedrine, Macro Scale

Compound		Dissolved in	Eluted with	Maximal recovery %
Oxedrine base	0,08 g	alcohol	45 ml alcohol	97
	0,08 g	alcohol	30 ml alcohol. KI 1 %	96
Oxedrine tartrate	0,1 g	alcohol 85 %	30 ml alcohol	50
	0,1 g	alcohol 85 %	30 ml alcohol. NaBr 1 %	93
	0,06 g	water	15 ml water	90*
	0,06 g	water	35 ml water	100
	0,06 g	water	15 ml NaHCO ₃ 2 %	100

* not maximal elution. See next line.

The oxedrine is clearly less firmly bound to the oxide than is adrenaline. The base is slowly eluted with alcohol, and the rapidity is increased by salts (compare 5). From the tartrate the free base is eluted incompletely by alcohol, but better by an alcoholic salt solution. Water elutes the oxedrine tartrate quantitatively, probably as the salt. Even a sodium bicarbonate solution is just as effective.

The results indicate so marked a difference between adrenaline and oxedrine that it might be possible to separate the two compounds from each other by chromatography with water.

c) *Ephedrine*

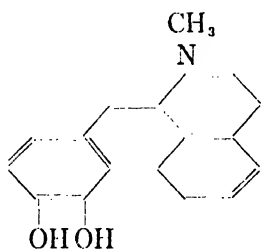
is relatively easily eluted with alcohol from aluminium oxide, from its salts as the base by alcohol or an alcoholic salt solution (1, 4, 5). With increasing water content in the elutrient the elution is very easy, from salts of ephedrine partly or totally as the salt.

Conclusion

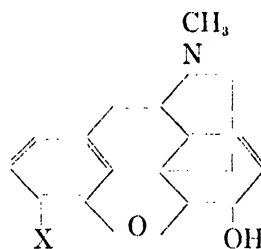
In the first series it is evident that the adsorbability decreases strongly with the number of phenolic hydroxyls.

Series 2

consists of apomorphine, morphine, and codeine and dionine.



Apomorphine



Morphine X = OH
Codeine X = OCH₃
Dionine X = OC₂H₅

The difference between the first and second members is greater than in the first series.

a) *Apomorphine*

Reimers et al. (1) found that the free base was eluted incompletely (58 %) from apomorphine hydrochloride by alcohol from aluminium oxide (Merck). The results of the present investigation are summarized in Table 4.

Compared to adrenaline, apomorphine in alcoholic solution is less firmly bound to the oxide than adrenaline, whereas the two substances are both adsorbed in water solution. According to the normal rules, the adsorption from water should be smaller than from alcohol. The discrepancy may be explained by the assumption that apomorphine is more liable to be destroyed by the alkaline oxide in aqueous than in alcoholic medium and that the destruction is complete in the *micro scale* experiments. It was evident that the apomorphine was also affected in alcoholic medium as the eluates were always more or less discoloured. The

fact that after the elution of 30 per cent of the apomorphine with alcohol (experiment 9 a, *macro scale*) it was possible to recover but a few additional per cents by further elution with hydrochloric acid (experiment 9 b) points in the same direction. Moreover, the acid eluates were discoloured which indicates an oxidation.

Table 4
The Elution of Apomorphine

- A. *Macro scale*: 0,2 g of the hydrochloride dissolved in 1 ml of H₂O + 10 ml of alcohol.
- B. *Micro scale*: 0,1 mg of the hydrochloride dissolved in 1 ml of H₂O. 0,4 and 1 g Al₂O₃ in a 3 mm tube.

	Nr	Eluted with	Per Cent Yield after Elution with ml					Method of Determination
			5	10	15	20	25	
Macro scale	1	Alcohol	3	27	35	41	45	Titrimetric
	2	Alcohol					38,6	
	3	Alcohol	3	20	34	41	42,3	Titrimetric
	4	Alcoh. NaBr. 1 % ₀					43	
	5	Alcohol					38	Photometric
	6	Alcohol					38	
	7	Alcohol					35	Photometric
	8	Alcohol					35	
	9 a	Alcohol					28	Titrimetric
9 b	Alcohol					33		
		continued with HCl N/10 . . .		2-4				Photometric
Micro scale	10	Water		0				Photometric
	11	Alcohol		0				
	12	HCl N/10		100				Photometric

Finally, the figure for maximal elution found by *Reimers* (1) 58 per cent, with the less basic aluminium oxide, Merck, is greater than the figure obtained here, about 40 per cent, with the Brockmann oxide.

All the evidence gained thus shows that apomorphine is partly destroyed by the oxide in alcohol and far more in water. The complete elution with acid resembles the behaviour of adrenaline, but no attempt has been made to prove that the method of analysis gives apomorphine and not deterioration products.

b) *Morphine*

Reimers (1) found, on chromatographic analysis of morphine hydrochloride on aluminium oxide (Merck) that the free base was rapidly eluted by 90 per cent alcohol. However, the values were somewhat lower than those calculated from an extraction method. He concluded that the morphine might contain an unknown oxidation product, which was less eluable than the morphine but could be extracted by the organic solvents.

Table 5 shows a summary of the results of the present experiments.

Table 5

The Elution of Morphine

- A. *Macro Scale*: 0,2 g of the hydrochloride, dissolved in 0,5 ml of H₂O + 10 ml of alcohol; titrimetric determination.
- B. *Micro Scale*: 3 mg of the hydrochloride, dissolved in 2 ml of H₂O; 1 g of Al₂O₃; photometric determination.

	Eluted with	Per Cent Yield after Elution with ml							Per Cent Yield after Extraction of the Eluate
		10	15	20	25	30	35	40	
Macro scale	Alcohol	65,3	82,4	87,2	91,7	94,6	95,9	95,9	96,2 97,3 96,1 96,0
	Alcohol		76,1	86,1	91,5	94,0	95,0		
	Alcohol				94,9				
	Alcohol				95,0				
	Alc. NaBr 1 %	68,3	80,8	87,8	92,0	93,9	94,3		
	Alc. NaBr 1 %	73,1		86,1	93,5	94,5			
Micro scale	Alcohol	96,5							
	Alcohol	94,8							
	Water	101							
	Water	99							

Again, the adsorption of the mono-phenolic compound is smaller than of the di-phenol. Morphine and oxedrine behave similarly.—As with apomorphine, Reimer's figures are higher than mine, presumably because of the different basicity of the oxides used.

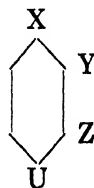
c) *Codeine* and *Dionine*

are easily eluted as the bases by alcohol from aluminium oxide (*cf.* 1, 5), even from their salts of mono-valent acids.

Series 3

consists of the following members

	X	Y	Z	U
a Catechol	OH	OH	H	H
a Resorcinol	OH	H	OH	H
a Hydroquinone ...	OH	H	H	OH
b Guaiacol	OH	OCH ₃	H	H
b Phenol	OH	H	H	H
c Veratrole	OCH ₃	OCH ₃	H	H
c Anisole	OCH ₃	H	H	H



The experiments were only qualitative and were made in *macro scale*. 25 mg of the substance was dissolved in 5 ml of the solvent. Elution was performed with the same solvent and 5 ml portions of the eluates were tested for the compound. The column was pushed out, samples were taken from four parts of it and tested. Table 6 shows the results.

Table 6

The Elution of Phenols and Phenol Ethers. Qualitative Detection in the Eluate and the Column

Eluate ml	Catechol			Resor- cinol	Hydro- quino- ne	Guaiacol		Phenol		Vera- trole	Ani- sole
	Alcohol	Water	H Cl N/10	Water	Water	Alcohol	Alcohol 50 %	Alcohol	Water	Alcohol	Alcohol
5	—	—	—	+	+	+	+++	++	++	++	++
10	—	—	—	+	+	+	++	+	+	+	+
15	—	—	—	+	+	+++	+	(+)	(+)	—	—
20	—	—	—	+	(+)	++	—	—	—	—	—
25	—	—	—	+	(+)	+	—	—	—		
Top	+++	+++	+	—	—	—		—	—		
1/3 from top	—	—	++	—	—	—		—	—		
2/3 from top	—	—	+++	(+)	(+)	—		—	—		
Bottom	—	—	(+)	+	+	+		(+)	(+)		
Parts of Column	+++ very strong reaction ++ strong reaction + reaction (+) reaction? — no reaction										

Of the three di-phenols, catechol is adsorbed most strongly. It is totally adsorbed from alcohol and water, but clearly desorbed by hydrochloric acid. The meta and para derivatives are adsorbed to a smaller extent. The mono-phenols are weakly adsorbed, and the non-phenolic bodies scarcely at all.

Discussion

Some of the experiments were made with salts, not with the free compounds. For weak bases this does not matter very much, if the acid of the salt is monovalent (*cf.* 5).

In all the series, especially in the first and third ones, the same trend is evident: the (ortho) di-phenolic compounds are adsorbed more strongly than are the mono-phenolic substances, and these, in turn, more strongly than the non-phenolic ones. Adrenaline, apomorphine, and catechol are retained by the oxide, both in alcoholic and aqueous solution, and are desorbed fully only by acid.

Oxedrine, morphine, and phenol and guaiacol are desorbed slowly and incompletely by alcohol, fully by water, and constitute an intermediate stage between the di-phenols and the non-phenols which are easily desorbed.

Is there any connexion between the adsorbability of the compounds and their other chemical properties?

In the first series the strength of the bases are: ephedrine $p_b \sim 4,6$, and certainly not much more for oxedrine and adrenaline. In the second series the p_b values are: about 7 for apomorphine and about 6,1 for the other three. The members of the third series lack basic properties entirely.

Thus, the adsorption of the substances investigated seems to be independent of their basic properties.

Is there, then, any relation between acidic character and adsorbability? The following figures have been found in the literature.

Table 7
Acidic Properties, p_s

	Water	Alcohol	Literature
Apomorphine	8,9		7
Morphine	9,9		7
Codeine, dionine	very great		
Catechol	9,9	12,0	8,10
Resorcinol	9,8	12,2	8, 9
Hydroquinone	10,4	12,6	8, 9
Phenol	9,9	12,7	8, 9
Guaiacol	9,9?		
Veratrole, anisole	very great		
Adrenaline	?		
Oxedrine	?		
Ephedrine	very great		

In Series 2, the more acidic apomorphine is adsorbed more than morphine and both much more than the non-acidic codeine and dionine.

In Series 3 no other clear connexion can be traced apart from the fact that the acidic phenols are adsorbed more than the non-acidic compounds. In Series 1 our knowledge is nil.

Consequently, nothing has been definitely proved, but it seems permissible to assume, as a working hypothesis, that the strength and the nature of the acidic (phenolic) functions of the molecules exert an influence upon the adsorption. This matter will be investigated further on other series of substances.

A very striking feature is, however, that the ortho di-phenolic substances are strongly adsorbed compared with the other di-phenols.

APPENDIX

Methods of Determination and Comments

Series I

a) *Adrenaline* conforming to the tests in the Swedish Pharmacopoeia was used. In the *micro* experiments it was determined by an iodine method (*cf.* 11—17).

Standard curve. Mix 10 ml of potassium biphthalate M/10, 10 ml of tri-sodium citrate M/10, and 1—10 ml of an adrenaline hydrochloride solution, containing 0,2—2 mg of adrenaline. Adjust the pH to 6,0 by means of sodium hydroxide N/10 and a pH-meter, add immediately 1,0 ml of iodine N/10, and, after exactly 60 seconds, 2,00 ml of sodium thiosulphate N/10. Dilute with water to 50,0 ml and measure the extinction at 5300 Å after 5—20 minutes.

Assay. Treat the eluates in the same way.

It was necessary to use citrate in the buffer. With biphthalate only the eluates with hydrochloric acid became turbid after the addition of alkali (from aluminium and phthalate), and some adrenaline was lost on filtration. The citrate eliminated this difficulty. —No other buffer was tried.

The extinction-wavelength curves (by means of a Pulfrich photometer) differed slightly in shape, depending on the nature of the buffers used. However, adrenaline eluted from aluminium oxide with hydrochloric acid gave the same curve in a given buffer as adrenaline oxidized directly in this buffer.

Small deviations from pH 6 during the oxidation with iodine do not matter, which is illustrated by the following figures.

pH	5,7	6,0	6,3
Extinction coefficient	0,394	0,394	0,393

b) *Oxedrine* tartrate, conforming to the tests in the Swedish Pharmacopoeia, was used. Its equivalent weight, determined bromometrically (24) was 81,1 (calculated 80,8).

The oxedrine in the aqueous eluates was determined bromometrically.

The oxedrine base was prepared from the tartrate by precipitation with ammonia, washing, and drying *in vacuo*. Its melting point was 184° (according to the Swedish Pharmacopoeia, corr. 180—184°) and its equivalent weight 167,3 (calc. 167,2), determined acidimetrically by potentiometric titrations. The base is easily soluble in alcohol, but very sparingly soluble in water and in most organic solvents.

The oxedrine in the alcoholic eluates was determined acidimetrically in about 50 per cent alcohol, using bromophenol blue as the indicator. The same procedure was applied to the *macro* determinations of apomorphine and morphine (*cf.* 1, 5).

Series 2

a) *Apomorphine hydrochloride*

The sample used, which complied with the tests in the Swedish Pharmacopoeia was assayed by the Kjeldahl method (91,2; 91,8; 93,3 %, calculated as the salt with half a mole of water of crystallisation) and by the method given in A.O.A.C. (18) (92,3 and 92,9 %) Mean value: 92,3 per cent. The loss of weight *in vacuo* was 3,6 % ($\frac{1}{2}$ H₂O = 2,9 %).

The photometric Determination

Apomorphine was assayed by the Folin-Ciocalteu method, mainly as will be described for adrenaline in a subsequent paper (19). However, it was necessary to modify it. The standard curve obtained by the usual procedure was strongly concave up-wards for quantities of apomorphine smaller than 1000 μ g. The cause was evidently that the apomorphine is rapidly destroyed in the sodium hydroxide which is added to the test solution before the phenol reagent, and this effect is more marked for small quantities of the alkaloid. But if the order of addition was changed to:

1. test solution
2. phenol reagent
3. NaOH
4. Na₂CO₃

the calibration curve became almost a straight line, and, furthermore, the sensitivity increased.

Table 8

Standard Curve for Apomorphine hydrochloride with the Folin-Ciocalteu Reagent. Filter M 575 (Lumetron). Reaction Time: 40 Minutes.

Folin + NaOH + Na ₂ CO ₃		NaOH + Folin + Na ₂ CO ₃	
Apomorphine HCl (calc. as 100 %) μ g	Extinction Coefficient	Apomorphine HCl (calc. as 100 %) μ g	Extinction Coefficient
48	0,058	462	0,108
72	0,093	923	0,229
119	0,146	1380	0,588
142	0,164; 0,168	2300	1,260
189	0,236; 0,229		
237	0,265; 0,265		
379	0,400; 0,400		
474	0,485; 0,482		

In all the cases where the eluates might become alkaline, as on elution with water or alcohol, the recipient was charged with hydrochloric acid N/10, in order to make the apomorphine keep better. The acid was duly neutralized before the analysis was continued (*cf.* 19, adrenaline).

b) Morphine

The sample of morphine hydrochloride conformed to the tests in the Swedish Pharmacopoeia and contained 11,7 per cent water (theory 14,4). Its content of alkaloid was assayed in four ways:

1. *Kjeldahl*: 99,1 and 98,4 %, calculated as morphine hydrochloride, 3 H₂O.
2. *Mannich* (20): 99,1 and 99,2 %.
3. Extraction with chloroform and sec. propanol by the method given in the Danish Pharmacopoeia 1933 (but with five extractions): 96,7 and 96,1 %.
4. Extraction with chloroform and ethanol by A.O.A.C's method (18): 99,8 and 98,7 %.

Mean value of all the methods: 98,4 %.

The *Photometric Determination* was performed by the Radulescu method, mainly as described by Allport (21). The following procedure was adopted.

To 1—5 mg of morphine hydrochloride in 1—10 ml of water add 10,0 ml of hydrochloric acid 1-N and water to 20 ml. Add 8,0 ml of a freshly prepared 1 per cent sodium nitrite solution, set aside for exactly 5 minutes, add 10 ml of ammonia 5M and water to 50,0 ml. Measure the colour at 4700 Å within 3 hours. A blank is run.

Among others *Baggesgaard-Rasmussen et al.* (22) and *Reimers and Gottlieb* (23) have investigated the reaction thoroughly. But a few additional comments are given here.

1. The acidity during the nitrosation of the morphine must not be varied. The following figures illustrate this fact (*cf.* 23) for 2 mg of morphine hydrochloride nitrosated in 20 ml of hydrochloric acid of different strengths.

Table 9

Dependance of Extinction Coefficient on the Strength of the Acid during Nitrosation

Molarity of Acid	Ammonia 5M ml	Extinction coefficient
1,0	17,6	0,245; 0,246; 0,252
0,75	16,6	0,266; 0,269
0,5	15,6	0,279; 0,273
0,25	14,6	0,305; 0,307
0,10	14,0	0,362

2. The excess of ammonia is not critical (*cf.* 23).

3. Alcohol must not be present during the nitrosation:

Per cent alcohol	0	20	40	75
Extinction coefficient	0,175	0,167	0,147	0,109

Thus, when the morphine was eluted with alcohol the eluates were evaporated to dryness and the residues dissolved in hydrochloric acid. It was ascertained that this procedure did give a quantitative yield.

Series 3

The qualitative tests for the phenols were performed by the Folin-Ciocalteu reagents.

Eluates. 0,1 ml was withdrawn, possibly neutralized, and mixed with the reagents.

Columns. 0,5 g was heated with 5 ml of hydrochloric acid 1-N, the mixture filtered, cooled, neutralized, and mixed with sodium citrate and the reagents.

The tests for the phenol ethers veratrole and anisole were performed by evaporating the eluates gently and weighing the residues. This, of course, is only a very rough method, for the ethers distil considerably with the alcohol.

References

1. *Reimers, F. and Gottlieb, K. R.* Dansk Tids. Farm. 17 (1943) 54.
2. *Reimers, F.* Ibid. 19 (1945) 167.
3. *Reimers, F., Gottlieb, K. R. and Christensen, V. Aa.* Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20 (1947) 99.
4. *Björling, C. O. and Ehrlén, I.* Svensk farm. tid. 49 (1945) 125, 145.
5. *Björling, C. O.* Act. Chem. Scand. 1 (1947) 392.
6. *Brockmann, H. and Schodder, H.* Ber. 74 (1941) 73.
7. *Kolthoff, I. M.* Biochem. Z. 162 (1925) 342.
8. *Treadwell, W. D. and Schwarzenbach, G.* Helv. Chim. Act. 11 (1928) 386.
9. *Kolthoff, I. M.* Acid-Base Indicators New York 1937.
10. *Böeseken and van Rossem* Rec. trav. chim. Pays-Bas 30 (1911) 392.
Pauly, H., Schübel, K. and Lockemann, K. Annalen 383 (1911) 288.
11. *Jackerott, K. A.* Dansk Tids. Farm. 15 (1941) 217.
12. *Jackerott, K. A. and Rasmussen, S. K.* Arch. Pharm. Chem. 52 (1945) 200.
13. *Büchi, J. and Hörler, Th.* Pharm. Act. Helv. 20 (1945) 276, 22 (1947) 575.
14. *Thorvik, A.* Meddel. norsk farm. selsk. 9 (1947) 57.
15. *Ehrlén, I.* Farm. rev. 45 (1946) 753, 47 (1948) 321.
16. Surveys of photometric methods for the assay of adrenaline (cf. also 15) are given by:
Barker, J. H. et al. Biochem. J. 26 (1932) 2129 and
17. *Pekkarinen, A.* Act. phys. scand. 16 (1948) suppl. 54.
18. Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington 1945.
19. *Björling, C. O.* Farm. revy 48 (1949) 601.
20. *Mannich, C.* Arch. d. Pharm. 276 (1935) 97, 199, 280 (1942) 386.
21. *Allport, N.* Colorimetric Analysis London 1945.
22. *Baggesgaard-Rasmussen, H., Hahn, C. and Ilver, K.* Dansk Tids. Pharm. 19 (1945) 41.
23. *Reimers, F. and Gottlieb, K. R.* Ibid. 21 (1947) 14.
24. For example: Nordiska specialitetskommissionen, Analysetoder, XII (1938) 5.

The Separation of Adrenaline from Mixtures I.

Carl Olof Björling

State Pharmaceutical Laboratory, Stockholm

(Will be inserted in *Collect. Pharm. Suec.* IV, 1949)

Whitehorn (1), *Shaw* (2, 3, 4), and *Kobro* (5) have separated adrenaline from other substances by means of adsorption. Whitehorn used silica but recovered only a fraction of the adrenaline. Kobro improved Whitehorn's technique. Shaw employed aluminium hydroxide at pH 8,5 which adsorbed adrenaline preferentially among many compounds. On the addition of sodium hydroxide the aluminium hydroxide dissolved and the adrenaline was determined with an arseno molybdate reagent. However, the method is very laborious and the results are inconsistent, as stated by several authors (13).

In a recent paper (6) it has been shown that adrenaline is adsorbed on aluminium oxide, Brockmann, from aqueous solution if the pH is greater than 6, and that it can be eluted quantitatively by hydrochloric acid.

Many other substances, however, are not adsorbed by the oxide, irrespective of the pH. The present investigation is based on these facts.

The procedure used previously, including chromatography and subsequent determination of the adrenaline with iodine, is not suitable to practical problems. In pharmaceutical preparations for example, the concentration of adrenaline is so low that it would be necessary to suck 50—100 ml of liquid through the aluminium oxide column in order to enrich a quantity sufficient for the determination. Such a procedure takes a long time and should be avoided, for this reason and for the losses of adrenaline (see below).

There are, then, two other alternatives, *viz.* not to use the chromatographic method at all, or to use it together with a more sensitive mode of determination.

EXPERIMENTAL

Aluminium oxide, standardized by Brockmann's method, was used throughout the experiments. For particulars see (6).

PLAIN SOLUTIONS OF ADRENALINE

1. The first alternative, referred to above, was carried out as follows.

The adrenaline was adsorbed by shaking 50 ml of an aqueous solution, containing 2 mg of the hydrochloride, with 1 g of aluminium oxide for 2 minutes. After centrifuging for 2 minutes, 1500 r.p.m., the clear solution was decanted taking care not to lose any oxide.

The desorption was performed thus. The remaining oxide was shaken with 10 ml of hydrochloric acid *n*/10 for 2 minutes. After centrifuging the liquid was decanted through a small paper filter into a 50 ml volumetric flask and the process repeated with 10 and 5 ml of the acid. The amount of adrenaline in the collected acid was determined by the iodine method (6) (see Table 1).

Table 1

Recovery of Adrenaline after Adsorption and Desorption. Shaking Method

Mg of Adrenaline	
Introduced	Recovered
2,01	1,95
2,08	2,01
2,08	2,05

The method will be tried for separation analyses.

2. For the alternative of adopting the chromatographic method but using a sensitive assay, the Folin-Ciocalteu test was chosen (no equipment for fluorimetry was available). It has been used on many compounds phenolic in character, inter alia adrenaline (7). The reaction is, unfortunately, not so specific as the iodine or the fluorimetric methods, but since the aluminium oxide causes good purification it seemed justifiable to employ it.

Standard curve

Suck 15 ml of hydrochloric acid *n*/10 through a column of 1 g of aluminium oxide in a 5 mm wide tube, to the filtrate add 0,2 g of tri-sodium citrate and 1 drop of phenol red (0,05 %) and titrate with normal and one tenth normal sodium hydroxide to colour change. Add 0,05—0,2 mg of adrenaline hydrochloride dissolved in 1—15 ml of water, 10,0 ml of sodium hydroxide *n*/10, 2 ml of the phenol reagent, 8,0 ml of sodium carbonate 20 %, and water to 50,0 ml. After 30 minutes measure the blue colour at about 5700 Å.

Assay

Introduce an appropriate quantity of adrenaline hydrochloride solution (containing 0,05—0,2 mg in not more than 10 ml) into the oxide, elute with 15 ml of hydrochloric acid and proceed as above.

The results of some assays are seen in Table 2.

Table 2
Recovery of Adrenaline Eluted with Hydrochloric Acid

Mg of Adrenaline	
Introduced	Recovered
0,051	0,048; 0,045
0,102	0,095; 0,098
0,153	0,156; 0,148
0,204	0,191; 0,204

The accuracy is not too good, but the method has its flaws (see also the comments).

The question whether this chemical assay and physiological methods for adrenaline are equivalent has been discussed (see for example 8, 9 and 10). *Møller* and *Schou* (11) have shown that the iodine method gives results concordant with those obtained by biological means. The following simple experiment indicates that the chromatographic procedure followed by a Folin-Ciocalteu determination does give the same values as the iodine method on adrenaline partly destroyed in alkaline solution.

25 ml of an adrenaline hydrochloride solution was mixed with 2,00 ml of sodium hydroxide $n/10$. After 15 minutes 2,05 ml of hydrochloric acid $n/10$ was added and the solution diluted to 50 ml.

10,00 ml of this solution, where part of the adrenaline was destroyed, was assayed by the iodine method (6) without chromatography, and 1,00 ml by the technique employed in the second paragraph here (chromatography and Folin-Ciocalteu). For results see Table 4.

Table 4
Adrenaline, partly Destroyed. Comparison between Two Methods

Method	Per cent recovery
Iodine, no Al_2O_3	69; 67
Folin + Al_2O_3	70; 70

Comments on the Folin-Ciocalteu-Aluminium Oxide Procedure

1. It is, of course, possible to construct a standard curve, omitting the addition of hydrochloric acid filtered through the column and the neutralizing. However, the molar extinction obtained in this way was somewhat greater than that gained by the procedure recommended (26100 and 25400, respectively, calculated for adrenaline). Besides, there is always a very slight haze in the solution and it is more acceptable to include the haze in the standard curve than to correct for it.

2. At room temperature the colour develops gradually and becomes constant between 30 minutes and 24 hours. Heating the mixture, as is often recommended, frequently gives variable results.

3. The quantity of the phenol reagent is not critical. 1 ml gave the extinction coefficient 0.393, 2 ml 0.390.

4. The amount of sodium hydroxide (= the concentration of NaOH) is of greater importance. The extinction coefficient at 40 minutes was with 4 ml of NaOH $n/10$ 0.630, with 10 ml 0.660 and with 20 ml 0.676. The maximum extinction was attained after 10 minutes with 4 ml, after 25 minutes with 10 ml, and after 40 minutes with 20 ml of NaOH.

The same factor causes the extinction coefficient not to be inversely proportional to the end volume of the reaction mixture. The following figures were obtained in a series of experiments with 10 ml NaOH $n/10$, 2 ml reagent and 8 ml Na_2CO_3 in each flask but with different end volumes. They are calculated to the same volume:

Diluted to	20	25	40	50	75	100	ml
Extinct. coeff.	0,283	0,266	0,248	0,234	0,231	0,223	

5. Therefore, it is necessary to neutralize the hydrochloric acid eluate exactly. A potentiometric titration curve of the eluted acid, mixed with the citrate, had an inflexion, which is steep between pH 5 and 8. Hence, it was possible to use phenol red at this titration. One drop of the indicator per 50 ml solution caused a faint blue colour with the reagents corresponding to the extinction coefficient 0.02, which is included in the blank value, about 0.03—0.04.

The standard curve is a straight line.

Different batches of phenol reagent may give slightly different standard curves.

SEPARATION ANALYSES

Adrenaline and procaine are often mixed, *e. g.* in local anesthetics. Procaine hydrochloride is easily eluted from aluminium oxide by water at any pH. The pH of common injections is 4—5 so it should be adjusted to 6 before the chromatography (see 6).

Iodine method

An injection with the following composition was investigated.

Procaine hydrochloride	2	grams
Adrenaline hydrochloride	0,00385	,,
Chlorobutanol	0,05	,,
Sodium chloride	0,02	,,
Sodium pyrosulphite	0,05	,,
Water to make	100	ml

The pH was 4.5. 5 ml of the solution mixed with a few drops of tri-sodium citrate M/10 (pH = 7.3) had pH 6.3, which then increased only slowly on further addition of the citrate. Thus, only small quantities of citrate are needed to augment the pH to 6 and there is little risk of „overdosage”.

The procedure finally arrived at was the following.

25.00 ml of the injection, mixed with 0.2 g of tri-sodium citrate was sucked through 1 g of aluminium oxide (5 mm tube), and the column washed with 10 ml of water. In the eluate the procaine was determined by *Seydlitz's* method (12). The recipient was changed, the adrenaline eluted with 20 ml of hydrochloric acid n/10, and determined by the iodine method (6). Results:

	Calculated	Found
Procaine hydrochloride	0,500 g	0,495; 0,490
Adrenaline hydrochloride	0,96 mg	0,92; 0,88

The time needed for such an analysis is unnecessarily long and increases still more when the concentration of adrenaline is lower. 75 ml of another injection required one hour for the first suction, and the recovery of adrenaline was only 75 per cent.

Other injections were analysed in the following way.

Folin-Ciocalteu method

3—10 ml of the solution mixed with 0.1 g of tri-sodium citrate was sucked through the oxide. Elution with water and hydrochloric acid as before. The adrenaline was determined by the Folin method.

Results

	Introduced	Found
Adrenaline	0,161 mg	0,166 mg 0,166
	0,105 mg	0,100 mg 0,098

Comments

1. The least traces of procaine give precipitations and blue colouration with the Folin-Ciocalteu reagents. Hence, it is important to perform the elution with water with great care.—5 ml of a 2 per cent procaine hydrochloride solution treated as described for the injections yielded no colour with the Folin reagents.

2. Chlorobutanol, which is often a component of injections, does not react with the reagents, at least not in the quantities commonly used (0.02—0.05 g per 100 ml).

3. The sodium pyrosulphite, which is also a common ingredient, does not interfere. 0.006 g dissolved in 10 ml of water and mixed with 10 ml of tri-sodium citrate M/10, was sucked through the column that was eluted with 15 ml of water. After changing the recipient the elution was continued with 15 ml of hydrochloric acid n/10 and the procedure performed as usual. No colour was produced.

References

1. *Whitehorn, J. C.* J. Biol. Chem. 56 (1923) 751, 108 (1935) 633.
2. *Shaw, F. H.* Biochem. J. 32 (1938) 19.
3. *Shaw, F. H.* Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci. 19 (1941) 151.
4. *Shaw, F. H. and Forshaw, A.* Ibid. 24 (1946) 53.
5. *Kobro, M.* Act. Med. Scand. 124 (1946) 511.
6. *Björling, C. O.* Farm. Revy 48 (1949) 588.
7. *Folin, O. and Ciocalteu, V.* J. Biol. Chem. 73 (1927) 627.
8. *Johannessohn, F.* Bioch. Z. 76 (1916) 377.
9. *Maiweg, H.* Ibid. 134 (1922) 292.
10. *Folin, O., Cannon, W. B. and Denis, W.* J. Biol. Chem. 13 (1912--13) 477.
11. *Møller, K. O. and Schou, S. Aa.* Dansk Tids. Pharm. 16 (1942) 121.
12. *Seydlitz, H.* Svensk farm. tid. 50 (1946) 65.
13. *E. g. Bloor, W. R. and Bullen, S. S.* J. Biol. Chem. 138 (1941) 727.

Adstriktionsvärde och barktjocklek hos svensk ekbark.

Av *Wolmar Bondeson* och *Hadar Sahleström*

Från Kungl. farmaceutiska institutets farmakognostiska avdelning
(Eingeführt in Coll. Pharm. Succ. Vol. 4, 1949)

Enligt Ed. X av svenska farmakopén utgöres *cortex quercus*, ekbark, av »barken från yngre stammar och grenar av *Quercus robur* L. och *Q. sessilis* Ehrhart» och skall bestå av »1—2 mm tjocka stycken, som på utsidan äro släta, matt glänsande, brunrå till silverrå». Det är således glansbark av bestämd tjocklek, som avses.

För garverierna avsedd, »hackad ekbark» av svensk proveniens synes att döma av talrika prover genomgående utgöras av ca 10 mm tjocka barkstycken med framskriden fällbarksbildning.

I fällbarken (rhytidomet), som är ett nekrotiserat vävnadskomplex, är garvämneshalten låg, varför barkens totala halt av garvämne är desto lägre, ju större del av densamma, som utgöres av fällbark. Det ovannämnda farmakopékravet, att drogen skall bestå av *g l a n s b a r k*, kan därför anses motiverat av hänsyn till garvämneshalten.

Enligt äldre undersökningar av v. *Schroeder* (1) avtager garvämneshalten i ekstammens glansbark i riktning från huvudstammens bas uppåt mot träd Kronans topp och periferi. Detta resultat förefaller att ej ha beaktats i

farmakopéföreskrifterna. DAB. 6 (1926) föreskriver i likhet med vår Ed. X, att barktjockleken skall vara 1—2 mm, medan Ph. Helvet. V (1933) föreskriver 1—3 mm. I Kommentar z. Ph. Helvet. V (1947) säges härom: »Dickere Rinde als 3 mm und aussen rauhe Rinde würden von älteren Ästen stammen, in denen der Gerbstoff weitgehend zu unlösl. Gerbstoffrot umgewandelt ist.» Den uppfattningen synes alltså råda, att bark från äldre grenar är mindervärdig och att av denna anledning en viss barktjocklek ej får överskridas. Att garvämnehaltigen efterhand avtager, sedan fällbarksbildning inträtt, har ovan redan framhållits; vad däremot beträffar glansbarken, talar v. Schroeders resultat för att barkens värde ökar med åldern. Såsom framgår av det ovan anförda citatet ur Kommentar z. Ph. Helvet. V, jämföras bark av större tjocklek än 3 mm med bark, som är skrovlig på ytan, dvs. befinner sig i ett stadium av fällbarksbildning. Det ligger nära till hands att förmoda en sådan överensstämmelse mellan å ena sidan de av nämnda farmakopéer fastställda tjockleksgränserna och å andra sidan fällbarksbildningens inträde, att tjockleksbegränsningen kunde betraktas blott som ett kompletterande krav, av samma innebörd som kravet på glansbark. I själva verket inträffar det också emellanåt, som vi på åtskilliga prover kunnat iakttaga, att fällbark börjar utbildas redan vid en barktjocklek av 2—3 mm. Allmäntilligt är detta förhållande dock icke. Fällbarksbildningens inträde sammanhänger ej blott med »grenarnas» ålder och med barktjockleken utan i hög grad dessutom med trädets ålder och med miljöfaktorer. Enligt Paessler (2) inträder fällbarksbildning hos eken vanligen vid 12—20 års ålder, medan ibland t. o. m. en 25 år gammal ek ännu kan vara fällbarkfri. Vanligt torde vara, att huvudstammen av en 20 år gammal ek har en i torkat tillstånd intill 4 mm tjock glansbark. Hos äldre ekar äro även relativt unga, smala grenar redan skrovliga av fällbarksbildning.

Vid den under åren 1940—45 av Medicinalstyrelsens materiellnämnd organiserade insamlingen och odlingen av medicinalväxter visade det sig, att prover eller partier av insamlad ekbark ofta ej kunde godtagas som officinell drog, emedan den av svenska farmakopéns Ed. X fastställda övre tjockleksgränsen, 2 mm, överskreds beträffande stora delar av ifrågavarande poster, även då de i övrigt voro utan anmärkning. Med hänsyn till barkskalningens lönsamhet, som ju är en förutsättning för anskaffningen av ekbark inom landet, är det således en fråga av vikt, om den i Ed. X satta övre gränsen för barktjockleken är motiverad eller icke.

För att avgöra denna fråga är en efterprövning av v. Schroeders resultat enligt vår mening ej tillfyllest. En bedömning av ekbarken såsom drog bör grunda sig på dess värde som adstringerande medel (adstriktionsvärdet), vilket sannolikt men ej med nödvändighet följer förändringarna i den enligt hudpulvermetoden eller annan metod bestämda garvämnehaltigen, som v. Schroeders resultat avse.¹⁾ Vi ha därför undersökt hur adstriktionsvärdet hos ekstambarken förändras i akropetal riktning och därjämte fastställt stamdiameter, ålder och barktjocklek för varje zon, i vilken adstriktionsvärdet bestämts.

¹⁾ På anført ställe (1) saknas upplysning om den använda metoden.

Ekbarkens garvämneshalt är underkastad stor variation, och sannolikt gäller detta även adstriktionsvärdet. P a e s s l e r (3) meddelar följande medels hudpulvermetoden bestämda gränsvärden för denna variation hos glansbarken, nämligen 6—17 % enligt filtrerförfarandet, 5—16 % enligt skakförfarandet. Mellan ekbarkens båda moderväxter, sommareken eller stjälek-eken, *Quercus Robur* L., och vintereken, druveken eller bergeken, *Q. petraea* (M a t t u s c h k a) L i e b l e i n (i Ed. X kallad *Q. sessilis* E h r r h a r d t), har enligt P a e s s l e r (2) ingen olikhet med avseende på de genomsnittliga värdena eller gränsvärdena för garvämneshalten kunnat påvisas; båda ge på den för arten gynnsammaste ståndorten den garvämneshaltigaste barken. Orsakerna till garvämneshaltens stora variation få sökas dels i ålders- och miljöfaktorer, dels i förändringar, som inträffa i den avskalade barken under torkning eller lagring. M u n t z och S c h o e n (4) funno, att garvämneshalten i ett prov av ekbark under 16 månaders förvaring sjönk från 12,0 till 6,9 %.

Även om drogens morfologiska bedömning, vars förutsättningar vi i första hand avsett att utreda, kan utgöra en grundval för utslutning av vissa mindervärdiga drogtyper, kan den givetvis, som ovanstående uppgifter understryka, ej ge tillräckligt besked om ekbarkens kvalitet. Då kravet på föreskrift om värdebestämning härmed uppställer sig, ha vi i syfte att få ett underlag för fastställande av lämplig minimifordran även utfört bestämningar av adstriktionsvärdet hos några svenska drogprover.

Tidigare bestämningar av adstriktionsvärdet hos svensk ekbark saknas. För utländsk ekbark föreligga några men föga samstämmiga uppgifter på funna adstriktionsvärden. D a f e r t och F l e i s c h e r (5) angiva genomsnittliga adstriktionsvärdet för ekbark (glansbark) till 4,48, medan man enligt J a r e t z k y (6) bör kunna kräva ett adstriktionsvärde på 8 till 10. T e m e s v a r y (7) har bestämt såväl garvämneshalten (enligt hudpulvermetoden) som adstriktionsvärdet hos en och samma ekbark med resultaten 15,17 % resp. 11,19.

Material.

1. Bark från skilda stamavsnitt av samma ek (tab. 3—5).

En 14 år gammal ek, *Quercus Robur* L., vuxen vid Erstavik, fälldes i slutet av maj 1945. Trädet hade jämförelsevis tidigt utbildad fällbark, som från stammens bas sträckte sig något över 2 m uppåt. Huvudstam och två grenar sågades till ½-meterlånga stycken, som numrerades i uppstigande följd. Barken avskalades och torkades vid 30—35° C. För bestämning av adstriktionsvärdet och övriga data användes av varje stycke det basala partiet; från de smalaste grenavsnitten måste dock större delen av barken användas.

2. Ekbark av olika, svensk proveniens (tab. 6).

Åtta prover på glansbark av varierande tjocklek erhöles genom materielnämnden och droggrossisterna från olika, svenska samlare (prov 1—8).

En artbestämning av moderväxterna med ledning av barkproverna var ej genomförbar. Visserligen föreligger enligt P a e s s l e r (2) en morfologisk olikhet mellan druvekens bark och stjälekens: »Die Traubeneichenrinde hat im borkefreien Zustand meist einen silberweissen Glanz. Aus diesem

Grunde führt sie auch die Bezeichnung *Spiegelrinde*. Die Rinde der Stieleiche ist dagegen meist dunkler, zuweilen mattgrün.» Olikheten tycks dock ej vara generell. Ofta ha barkstyckena tvärgående zoner av omväxlande silvergrå och mörkare brungrå färg. *W e i m a r c k* (8) anför i sin undersökning rörande de nordiska ekarnas systematik ingenting beträffande barkkaraktärerna; av intresse i detta sammanhang är emellertid hans uttalande om de ifrågavarande ekarterna, att »snart sagt varje individ avviker från alla andra i en eller flera karaktärer» och att ekarnas systematik måste »stödjas på den samlade morfologien, ej på enstaka karaktärer».

Ett prov på »hackad ekbark» av det slag, som saluföres till garverierna, ställdes till vårt förfogande av Garvämnesaktiebolaget Weibull i Landskrona (prov 9).

Samtliga barkprover voro insamlade våren 1945.

Metod.

Flertalet av de talrika metoder, som utarbetats för bestämning av garvämneshalten i vegetabiliska garvmedel, ha numera endast historiskt intresse. Bland volumetriska metoder har endast *L ö w e n t h a l s* kaliumpermanganatmetod, som modifierats av *v. S c h r o e d e r*, ännu en viss teknisk betydelse, medan den blivit betecknad som värdelös för växtkemiskt och växtfysiologiskt ändamål. Den inom garverikemien allmänt använda metoden är hudpulvermetoden. Enligt denna bestämmes såsom garvämne den del av garvmedlets (t. ex. ekbarkens) extraktivämnen, som upptages av hudpulver, antingen då extraktlösningen skakas med hudpulvret (skakmetoden) eller då den filtreras genom ett skikt av hudpulver (filtrermetoden). Den på så vis fastställda garvämneshalten, angiven i viktprocent av garvmedlet, är ett mått på sammanlagda mängden av dels vid hudpulvret irreversibelt bundet, egentligt garvämne, dels i hudpulvret absorberade, uttvättbara beståndsdelar. Endast det egentliga garvämet har garvande och adstringerande förmåga, vars grad f. ö. växlar med garvämnets art.

Trots att hudpulvermetoden sålunda ger föga besked om de som garvämne bestämda extraktivämnens natur, anses den för garverikemiska ändamål uppfylla de praktiska kraven. Däremot är metoden mindre ägnad för värdebestämning av garvämnesdroger, vilka lämpligen böra bedömas på grund av sin adstringerande förmåga. Detta gäller ej blott, då man vill jämföra olika slags garvämnesdroger sinsemellan med hänsyn till deras verkan utan även vid bedömningen av skilda prover av samma slags drog. Då nämligen sammansättningen av innehållsämnena i växtens levande såväl som döda vävnader fortgående förändras, är det ingalunda säkert, att förändringarna i den enligt hudpulvermetoden bestämda garvämneshalten, exempelvis i en serie barkstycken från olika nivåer av samma ekstam, motsvaras av liknande förändringar i adstriktionsvärdet.

K o b e r t (9) införde 1914 en biologisk metod för värdebestämning av garvämnesdroger. Han bestämde hos ett drogutdrag den lägsta koncentration, som inom 24 timmar åstadkom fullständig agglutination av tvättade blodkroppar i 1-procentig suspension. Användbarheten av denna agglutinationsmetod för prövning av adstringerande medel har bekräftats genom senare undersökningar [*G r ö n b e r g* (10)].

Kobert prövide tre olika förfaringssätt för fastställande av ekvivalenspunkten, dvs. den lägsta koncentration, som medför fullständig agglutination, nämligen *ögongränsen* (slutpunkten erhålles genom okulärt fastställande av agglutinationen), *filtrergränsen* (slutpunkten bedömes med ledning av filtratet, som blir klart, när blodkropparna, till följd av agglutinationen kvarhållas av filtret) och *reaktionsgränsen* (slutpunkten bedömes med ledning av färgreaktionen med järnklorid, vilken uteblir, när allt garvämne bundits av blodkropparna). Som utslagsgivande betraktade han filtrergränsen. För galläpplen kunde Kobert (9) med sin metod beräkna garvämneshalten genom jämförande försök med rent galläpplegarvämne (tannin). På samma sätt tänkte sig Kobert (11) en kvantitativ bestämning även av andra garvämnesdroger genom jämförelse med de renfränställda garvämnen. Genomförandet av sådana bestämningar strandade emellertid på svårigheterna att isolera garvämnen i oförändrat skick. Wasicky (12) utarbetade på grund av Koberts agglutinationsmetod, men med användande av defibrinerat blod, en bestämning av drogens *adstriktionsvärde*. Detta fastställdes i parallellförsök med olika spädningar av dels drogutdrag, dels tanninlösning såsom drogens blodkroppssagglutinerande verkan i procent av tanninets (eller drogens procenthalt av garvämne, uttryckt som tannin).

Den av oss använda metoden ansluter sig i stort sett till ett av Brandt och Schlund (13) föreslaget utförande av agglutinationsmetoden enligt Kobert-Wasicky. Adstriktionsvärdet ha vi i anslutning till Dafert och Fleischer (5) angivit utan procentbeteckning då denna kunde ge ett intryck att det rör sig om ett värde på garvämneshalten, medan det i själva verket är fråga om ett verkningsvärde, fastställt i relation till tannin, vars adstriktionsvärde villkorligt antages lika med 100.

Ett 0,5-procentigt barkutdrag bereddes på följande sätt. Barken bragtes till pulver nr 30 och eftertorkades tre dygn vid 30—35° C. 5,00 g av den pulvriserade barken extraherades med 600 ml fysiologisk koksaltlösning genom uppvärmning i kokande vattenbad 1 timme under ofta upprepad omskakning. Därefter filtrerades blandningen genom büchnertratt med hjälp av vattenstrålpump. Extraktionen upprepades på samma sätt med 400 ml fysiologisk koksaltlösning. Efter avsugning genom büchnertratten eftersköljdes med så mycket vatten, att sammanlagt erhöles 1000 ml barkutdrag, som slutligen filtrerades. I några fall utfördes bestämningarna dels med på angivet sätt berett utdrag, dels med ett vattenutdrag, som efteråt försattes med koksalt. Vid båda förfaringssätten erhöles samma resultat.

Som reagens användes en blodkroppssuspension, som erhöles på följande sätt. Färskt, defibrinerat svinblod centrifugerades till dess blodkropparna fullständigt avsatt sig. Serum dekanterades och ersattes med fysiologisk koksaltlösning, i vilken blodkropparna uppslammades genom omsvängning. Uppslamningen centrifugerades, den klara vätskan dekanterades och ersattes med fysiologisk koksaltlösning. Proceduren upprepades ytterligare en gång. Av den så erhållna, praktiskt taget serumfria blodkroppsuppslammningen erhöles reagenset genom spädning med fysiologisk koksaltlösning i förhållandet 1:10.

Som jämförelselösning användes en med fysiologisk koksaltlösning beredd, 0,5-procentig tanninlösning. För att kompensera den växlande känsligheten hos blodreagenset gjordes alltid parallellförsök med spädningar av drogutdraget och tanninlösningen.

Samtliga bestämningar utfördes under sommaren 1945.

Preliminär bestämning.

Med barkutdrag resp. tanninlösning ansattes en förberedande serie i provrör (tab. 1).

Tabelle 1
Nach Brandt (14).

Reagenzglas Nr	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Rindenauszug bzw. Tanninlösung ml	7,8	6,3	5,0	4,0	3,2	2,6	2,1	1,7	1,4	1,1	0,9	0,7
Physiolog. Kochsalzlös. ml	0,2	1,7	3,0	4,0	4,8	5,4	5,9	6,3	6,6	6,9	7,1	7,3
Blutreagenz ml	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Rören omskakades omedelbart efter ansättningen och ånyo efter 15 minuter, varpå de lämnades i vila under 16 timmar. Därefter fastställdes ekvivalenspunkten med hjälp av filtrergränsen på följande sätt. De agglutinerade blodkropparna, som avsatt sig på provrörens botten, uppslammades genom försiktig omskakning och blandningen filtrerades genom ett fuktat filter (Munktell 1 F) av 9 cm diameter. Fullständig agglutination ansågs föreligga i de rör, från vilka ett klart filtrat erhöles, i motsats till övriga rör, vilkas icke agglutinerade blodkroppar passerade filtret och meddelade filtratet ett grumligt och rödaktigt utseende. Bland de rör, i vilka total agglutination ägt rum, angavs ekvivalenspunkten av det, som innehöll minsta dosen av barkutdrag resp. tanninlösning.

Definitiv bestämning.

Intervallerna mellan de olika rören i ovan angivna serie äro alltför stora för att tillåta en noggrannare bestämning. Genom att omkring ekvivalenspunkten, som i den första, preliminära bestämningen ungefärligt fastställts, ansätta en ny serie med snävare intervaller, kunde exaktare värden erhållas. Härvid blev det oftast lämpligt att först späda barkutdraget med fysiologisk koksaltlösning för att undvika alltför små volymskillnader och stora mätfel vid avpipetteringen i de olika rören. Till barkutdraget sattes därför så mycket fysiologisk koksaltlösning, att ett rör, i vilket avmätts 4,0 ml av den så erhållna extraktutspädningen, 4,0 ml fysiologisk koksaltlösning och 2,0 ml blodreagens, kom att innehålla samma mängd barkutdrag som ekvivalensröret i den preliminära serien. Tanninlösningen späddes på motsvarande sätt. Med dessa spädningar ansattes en serie rör för den slutgiltiga bestämningen (tab. 2).

Tabelle 2.

Reagenzglas Nr	I	II	III	IV	V	VI	VII
Extraktverdünnung							
bzw. verd. Tanninlösung ml...	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	2,8
Physiolog. Kochsalzlösung ml	3,8	4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,2
Blutreagenz ml	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Ekvivalenspunkten bestämdes på samma sätt som i föregående serie. Barkens adstriktionsvärde erhöles ur formeln $\frac{100 T}{D}$, där T och D angiva mängden tannin resp. bark i ekvivalensröret.

Resultat.

Material 1.

Huvudstammen karakteriserades av de i tab. 3 angivna data.

Tabelle 3.
Der Hauptstamm.

Stammabschnitt	Alter des Stammabschnittes Jahre	Stammdiameter cm	Rindendicke mm	Rindentypus	Adstriktionswert der Rinde
1	14	12,0	4,2—8,2	Borkig	5,7
2	13	10,0	3,5—5,5	„	6,2
3	12	9,2	3,5—5,2	„	6,5
4	11	8,2	3,3—4,6	„	7,7
5	10	7,0	3,2—4,0	Glanzrinde, teilweise rissig-borkig	10,2
6	9	6,4	2,5—3,0	Glanzrinde	10,9
7	8	5,7	2,5—2,8	„	9,1
8	8	5,8	2,0—2,8	„	9,1
9	7	4,9	1,9—2,5	„	9,1
10	6	4,0	1,0—2,4	„	8,6
11	5	2,5	1,4—1,9	„	8,5
12	4	1,0	0,4—1,4	„	8,4

Gren nr 1 karakteriserades av de i tab. 4 angivna data.

Tabulle 4.

1. Ast.

Ast- abschnitt	Alter d. Ast- abschnittes Jahre	Astdiameter cm	Rindendicke mm	Rindentypus	Adstriktionswert
1	9	4,0	2,0—2,2	Glanzrinde	10,2
2	8	3,5	1,5—2,0	"	10,2
3	7	2,8	0,9—1,8	"	8,0
4	6	1,9	0,5—1,4	"	7,4
5	5	1,2	0,5—1,0	"	6,0
6	5	1,2	0,3—0,9	"	3,0

Gren nr 2 karakteriserades av de i tab. 5. angivna data.

Tabulle 5.

2. Ast.

Ast- abschnitt	Alter d. Ast- abschnittes Jahre	Astdiameter cm	Rindendicke mm	Rindentypus	Adstriktionswert
1	8	2,6	0,9—2,0	Glanzrinde	8,3
2	8	2,2	0,8—1,3	"	6,9
3	7	1,9	0,6—1,2	"	5,0
4	6	1,3	0,5—0,8	"	4,8
5	4	0,7	0,1—0,3	"	3,5
6	2	0,5	0,1—0,3	"	3,3

Material 2.

Handelsproverna av svensk ekbark karakteriserades av de i tabell 6 angivna data.

Tabulle 6.

Verkaufsmuster schwedischer Eichenrinde.

Muster Nr	Rindendicke mm	Rindentypus	Adstriktionswert
1	2,3—3,4	Glanzrinde	10,6
2	2,2—3,1	"	10,1
3	1,4—2,1	"	8,2
4	1,6—1,9	"	6,9
5	1,0—1,7	"	8,2
6	1,0—1,6	"	10,0
7	0,1—0,6	"	7,4
8	0,1—0,5	"	7,7
9	8,5—12,5	Borkig. (Borken nimmt etwa d. Hälfte der Rindendicke ein).	5,6

Sammanfattning och diskussion.

Ur de siffror i tab. 3—5, som avse glansbarken, kan utläsas en genomgående tendens, nämligen den i centripetal-basipetal riktning fortskridande stegringen av adstriktionsvärdet. Då ålder, stamdiameter och barktjocklek tilltaga i samma riktning, finnes ett visst sammanhang även mellan dessa faktorer och adstriktionsvärdet.

Grenarna ha emellertid mindre diameter, tunnare bark och i stort sett lägre adstriktionsvärde än lika gamla avsnitt av huvudstammen. Adstriktionsvärdets förändringar synas således ej vara direkt knutna till barkens levnadsålder. Ur de meddelade siffrorna kan ej heller utläsas någon konstant relation mellan adstriktionsvärdet och barktjockleken, endast en i samma riktning fortgående ökning av båda.

Det material, som ligger till grund för tab. 3—5, härrör från samma träd. De absoluta värdena ha därför betydelse endast vid sammanställning av dem med värden på ekbark av annat ursprung (tab. 6). Beträffande de relativa värdena och den ur dem framträdande tendensen i adstriktionsvärdets förändringar synes någon principiell olikhet ej behöva antagas föreligga mellan ekar, tillhörande skilda systematiska former eller vuxna under olika yttre betingelser.

Av de i tab. 3—5 sammanställda siffrorna torde därför följande slutsatser kunna dragas med avseende på det ur drogbedömningssynpunkt intressanta sambandet mellan ekbarkens morfologiska karaktärer och dess adstriktionsvärde. Adstriktionsvärdet hos glansbarken tilltager i stort sett med barktjockleken. Först genom fällbarksbildningens inträde upphör barkens värdeökning för att vid fortskridande fällbarksbildning övergå i värdeminskning. Farmakopékraven på en tjockleksmaximering äro därför olämpliga. Kraven på en minimitjocklek av 1 mm kunna däremot vara skäliga med hänsyn till de i allmänhet låga adstriktionsvärdena för tunn bark. Möjligen kunde rentav en höjning av denna undre gräns vara motiverad.

Dessa på grundval av den systematiska undersökningen erhållna resultat styrkas av de i tab. 6 sammanställda siffrorna för handelsprover av svensk ekbark. Tjockare glansbark visar i allmänhet högre adstriktionsvärde än tunnare.

På grund av det sammanlagda materialet synes för *cortex quercus* kunna uppställas kravet, att barkens adstriktionsvärde ej skall understiga 8.

Zusammenfassung.

Adstriktionswert und Rindendicke schwedischer Eichenrinde.

In der Rinde vom Hauptstamm und von zwei Ästen einer 14-jährigen Eiche (*Quercus Robur* L.) wurde der Adstriktionswert nach der Blutmethode von Kobert-Wasicky—Brandt zonenweise bestimmt. Die gefundenen Werte sind aus Tab. 3—5 herauszufinden. Eine Steigerung des Adstriktionswertes der Glanzrinde in zentripetaler-basipetaler Richtung des Baumes konnte festgestellt werden. Der Hauptsache nach nimmt der Adstriktionswert der Glanzrinde auch mit der Rindendicke zu. Erst nach der Borkebildung fängt der Adstriktionswert an mit der Rindendicke abzunehmen. Die

Anforderungen gewisser Arzneibücher, nach denen die Dicke der Eichenrinde höchstens 2 mm (Ph. Suec. X und DAB. 6) bzw. 3 mm (Ph. Helvet. V) betragen darf, sind also mit Rücksicht auf die Adstriktionswerte nicht begründet.

Ferner wurde der Adstriktionswert in neun Verkaufsmustern schwedischer Eichenrinde bestimmt (Tab. 6). Der mittlere Adstriktionswert von sechs Mustern, deren Rindendicke nicht geringer war als 1 mm, betrug 9; die Grenzwerte derselben Muster waren 6,9 bis 10,6. Man dürfte nach der Meinung der Verfasser einen Adstriktionswert von mindestens 8 verlangen können.

Citerad litteratur.

1. Schroeder, v., cit. av Paessler, J., Collegium No. 559, 410 (1916).
2. Paessler, J., Collegium No. 559, 405—417 (1916).
3. Paessler, J., i Handb. d. prakt. u. wissenschaftl. Pharmazie, herausg. v. H. Thoms, Bd. 3, 2. Hälfte, p. 872 (1926).
4. Muntz & Schoen, Revue des eaux et forêts, cit. i Journ. de pharm. et de chim. [5], 4, 583—586 (1881).
5. Dafert, O. & Fleischer, M., Pharm. Monatshefte 16, 235—236 (1935).
6. Jaretsky, R., i Leitfaden f. d. pharmakognost. Untersuchungen . . ., herausg. v. R. Wasicky, 2. Teil, p. 214 (1936).
7. Temesváry, I., Ber. d. ungar. pharm. Ges. 6, 396—402 (1930).
8. Weimarck, H., Bot. not. 1947, 61—78.
9. Kobert, R., Ber. dtsch. pharm. Ges. 24, 470—495 (1914).
10. Grönberg, J., i Handb. d. biol. Arbeitsmeth., herausg. v. E. Abderhalden, Abt. 4, T. 7 B, 1451 (1935).
11. Kobert, R., Collegium No. 553, 164—172 (1916).
12. Wasicky, R., Pharm. Post 50, 785—787 (1917).
13. Brandt, W. & Schlund, F., Pharm. Ztg 69, 597—598 (1924).
14. Brandt, W., Arch. d. Pharm. 264, 655 (1926).

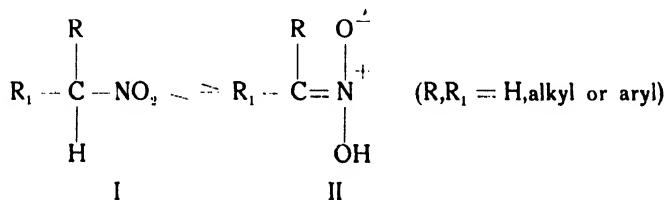
Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds and Active Methylene Groups

XIII. Survey of the literature of theoretical interpretations of this reaction

By *Teodor Canbäck*.

(Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm.)

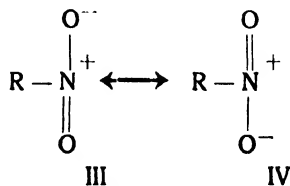
Primary and secondary aliphatic nitro compounds exist in two tautomeric forms, the usual nitro form, I, and the *aci*-nitro form, II, which are in equilibrium.



Numerical values of the equilibrium constant for a few simple aliphatic nitro compounds have been given by *Turnbull* and *Maron* (1).

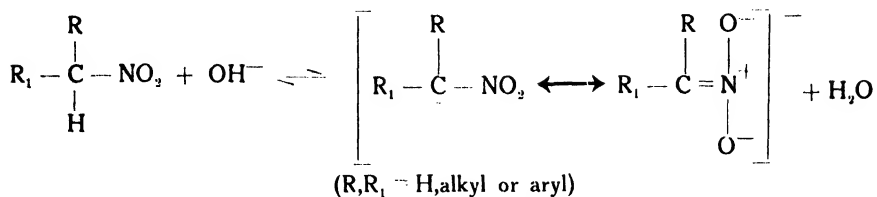
Tertiary aliphatic nitro compounds cannot rearrange according to this scheme as they lack a hydrogen atom on the α -carbon atom.

In general the equilibrium lies far towards the nitro form which is stabilized by resonance, III and IV, while in the *aci*-form, II, no such stabilization by resonance is possible.



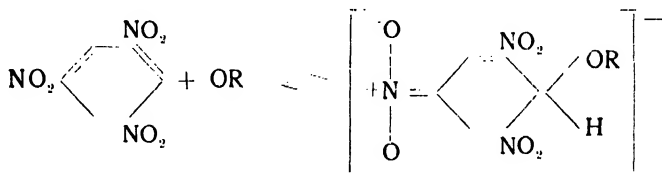
If, however, there is a possibility for resonance between the *aci*-form and another system, e. g. a benzene ring, the *aci*-form will be stabilized at the cost of the nitro form. In phenylnitromethane, for example, the phenyl group is conjugated with the carbon-nitrogen double bond in the *aci*-form, but is insulated in the nitro form. The equilibrium is certainly shifted towards the *aci*-form as the *aci*-form of phenylnitromethane can be isolated, whereas that of the nitromethane cannot, though the actual position of the equilibrium is not known for phenylnitromethane. If primary and secondary aliphatic

nitro compounds are dissolved in alkali an ion is formed according to the scheme: —



Tertiary aliphatic nitro compounds are indifferent against alkali. Aromatic nitro compounds can be most closely compared with aliphatic tertiary nitro compounds. They are in general insoluble in alkali as they have no hydrogen atom on the α -carbon atom and for the same reason they cannot rearrange into an *aci*-form.

On the other hand a great number of aromatic nitro compounds add alkali or alcoholate according to the scheme (see *Meisenheimer* [3]):



Here the symmetric trinitrobenzene reacts as a general acid and it is one of the few known examples of an organic acid whose acidity is unequivocally not due to a dissociable proton.

No system capable of expressing the acid strength of such organic acids seems to have been published.

It is necessary for the formation of this type of ions that the benzene ring is loaded with several groups that stabilize negative charges, e. g. nitro groups.

The characteristic behaviour of certain aromatic nitro compounds of adding alcoholate ions has often been used in the chemical analyses. This is because a displacement of the main band of the spectrum of the compounds (in solution) occurs from about 300 m μ to about 500 m μ and the light absorption becomes conveniently measurable.

Of the large number of publications dealing with the characteristic behaviour of these nitro compounds to add alcoholate or hydroxyl ions, the work by *Jackson* and his school (2) may be mentioned. Further work has been done by *Meisenheimer et al.* (3), by *Hantzsch et al.* (4), by *Busch* and *Kögel* (5), by *Giua* (6) and others.

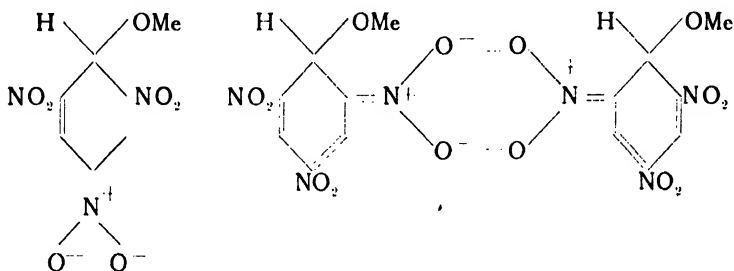
The result of these investigations is that the formulation of the addition product is depicted as exemplified above, with the addition of alcoholate ions to 1,3,5-trinitrobenzene.

It is obvious that mononitro and *m*-dinitrobenzene derivatives do not add alcoholate if there should be no more strongly negative substituent on the benzene ring.

Sidgwick, Taylor and *Baker* (7) give a survey of the reaction between

aromatic nitro compounds and alkali in which they, in the main, sustain *Meisenheimer's* opinion of the mechanism of the reaction. They conclude with the following:—

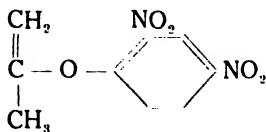
»*Meisenheimer's* formula, however, cannot be considered as completely satisfactory; it does not take into account the fact that more than one nitro group must be attached to the nucleus for this type of salt formation to take place, nor does it offer any explanation of the deep colour of the salts. It is evident that the stability of the compounds and their colour has something to do with all the nitro groups and not only with one. The compounds in which the salt formation occurs are those in which two or more nitro groups are in the meta position to one another. The anion from such a compound can be written in as many separate formulae as there are nitro groups: e. g. the anion of the addition product of potassium methylate and trinitrobenzene can be written in the three forms



and these formulae do not differ in the positions of the constituent atoms, but only in the kinds of valencies uniting the atoms. Hence the anion is almost certainly a resonance-hybrid of all three formulae, a view which offers the best explanation of the necessity for the presence of more than one nitro group; the extra stability arising from the resonance will account for the formation of the compounds, and their colour may well be due to the resonance between the quinonoid systems in much the same way as in the triphenylmethane dyes.»

The colour reaction between carbonyl compounds, especially aliphatic aldehydes and ketones, and polynitro benzene compounds has been known for a long time and *Janovsky* (8) is probably the one who first described the reaction. A few years later *Billó* (9) and *Willgerodt* (10) described the same reaction. After that the colour reaction has been rediscovered many times and as late as 1921 *Rudolph* (11) describes it again as a new discovery. Only a few investigators try to give an explanation of the reaction between acetone and *m*-dinitrobenzene.

Reitzenstein and *Stamm* (12) proposed the following structure for the coloured compound after they had isolated a compound with the composition $C_8H_8N_2O_5$ from the reaction products of acetone, 2,4-dinitrochlorobenzene and alkali:—



This formula must be looked at with some reservation as it has not been possible to repeat the isolation of the compound. Besides there is no reason why a compound with this structure should give a blue-violet colour when combined with alkali. Probably the compound that *Reitzenstein* and *Stamm* worked with consists of compounds of the same type that *Jackson* (2), *Zimmermann* (13) and others prepared. Those compounds are addition products of alkali metal alcoholate to the nitro compound and are almost certainly mixtures of several compounds of which little is known.

In general the investigators try to connect the reaction with the *Jaffé* reaction (14) between picric acid and creatinine in alkaline solution.

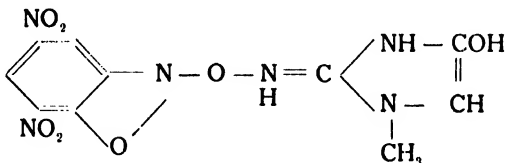
However, *Reissert* (15), *Sasaki* (16) and *Weise* and *Tropp* (17) point out that the reaction between picric acid and creatinine in alkaline solution is a special case of the general reaction between aromatic nitro compounds and compounds containing active methylene groups.

Weise and *Tropp* (17) make a distinction between the reduction of picric acid to picramic acid that can be done at a higher temperature by most reducing compounds, e. g. reducing sugar, see *Braun* (18), and the condensation reaction with active methylene compounds in alkaline solution.

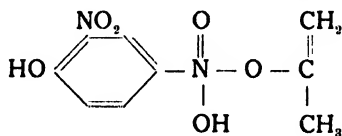
Zimmermann (13) has reviewed the older literature dealing with the *Jaffé* reaction and similar reactions.

There are, according to *Zimmermann* (13), five different opinions on the reaction.

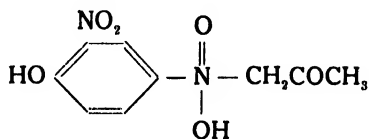
1. *Greenwald et al.* (19) believe that the red compound that is formed from picric acid and creatinine in alkaline solution has the following structure: —



2. *Anslow* and *King* (20) depict the condensation product of 2,4-dinitrophenol and acetone in alkaline solution as follows: —

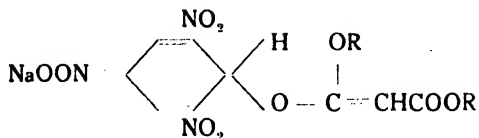


3. *Reissert* (15) depicts the same condensation product as follows: —

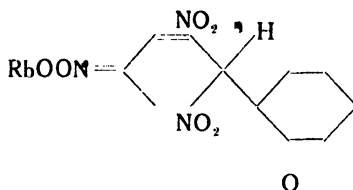


4. *Jackson* (2) proposes the following structure of the compound that is

formed from 1,3,5-trinitrobenzene and diethyl malonate in alkaline solution: —



5. *Zimmermann* (13) means that the condensation product of 1,3,5-trinitrobenzene and *cyclo*-hexanone in alkaline solution is best described by the following structure: —



Zimmermann believes he has found conclusive evidence of the formation of a new C — C bond. He is of the opinion that the new bond between the benzene ring and the *cyclo*-hexanone is an ordinary covalent C — C bond.

Of the opinions quoted on the structure of the condensation product, only those held by *Jackson* (2) and *Zimmermann* (13) are in accordance with modern ideas on the reactions of a benzene ring, heavily loaded with negative substituents, with alcoholate.

As far as I know no attempts have been made to explain the different effects of an alcoholate and acetone on *m*-dinitrobenzene in alkaline solution.

Weise and *Tropp* (17) investigated the colour reactions of some methylene compounds with picric acid and they arranged them in a series according to the intensity of their reaction.

Zimmermann (13) gives some new examples of methylene compounds that react and he summarizes the results of his investigations as follows: — The presumption is that a nitro body sufficiently activated joins with a methylene compound that is also sufficiently activated.

I will attempt to explain the difference in the reactions between certain methylene compounds and alcoholate in a forthcoming publication.

Only a very few investigators have studied how substitution in the benzene ring affects the addition of alcoholate and of acetone. According to *Meisenheimer* (3) a positive reaction is obtained with all α -unsaturated nitro compounds. Aromatic nitro compounds react if they easily can rearrange into the quinoid form.

Bost and *Nicholson* (21) have studied the colours which are obtained from different aromatic nitro compounds when treated with acetone and alkali, and they summarize as follows: — »Phenomenal as it may seem, mononitro compounds give no color with the reagent, dinitro compounds give a purplish blue color, while trinitro compounds produce a blood red color, except where an amino, substituted amino, or hydroxyl group is present.

Acylation of the amino or hydroxyl group does not alter the inhibiting effect of such groups on the color test. The substitution of an alkyl group for an amino hydrogen does not alter the inhibition of the amino group, whereas the substitution of a methyl group for enolic-hydrogen permits the compound to respond to the general color test. Noteworthy examples are the 2,4-dinitro-aniline, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroacetanilide, 2,4-dinitrophenylacetate, 2,4-dinitrodiethylaniline and 2,4-dinitroanisole.

In cases where the benzene nucleus is richly substituted, as in 2,4-dinitro-mesitylene, 2,4,6-trinitromesitylene and 2,4,6-trinitro-1,3-dimethyl-5-terbutyl benzene, no color is produced.

The steric effect of the nitro group in the isomeric dinitrobenzenes is noteworthy. *m*-Dinitrobenzene readily responds to the test, *p*-dinitrobenzene gives a reddish yellow which soon passes into a greenish yellow color, while *o*-dinitrobenzene gives no color at all.»

As far as I have been able to establish, no investigation has been made on the quantitative effects in the spectra of the addition products which are brought about by substitution in the benzene ring.

A preliminary report (22) has been published previously, and in a forthcoming paper I will describe a systematic investigation of the spectra of a number of substituted *m*-dinitrobenzenes condensed with acetone.

References

1. Turnbull and Maron: *J. Amer. chem. Soc.*, **65**, 212 (1943).
2. a. Jackson: *Amer. Chem. J.*, **11**, 97 (1889).
 b. Jackson and Moore: *ibid.*, **12**, 7 (1890).
 c. Jackson and Moore: *ibid.*, **12**, 164 (1890).
 d. Jackson: *ibid.*, **12**, 307 (1890).
 e. Jackson and Ittner: *Ber.*, **28**, 3063 (1895).
 f. Jackson and Soch: *Amer. Chem. J.*, **18**, 133 (1896).
 g. Jackson and Ittner: *ibid.*, **19**, 199 (1897).
 h. Jackson and Boos: *ibid.*, **20**, 444 (1898).
 i. Jackson: *ibid.*, **21**, 424 (1899).
 j. Jackson and Gazzalo: *ibid.*, **23**, 376 (1900).
 k. Jackson and Earle: *ibid.*, **29**, 89 (1903).
 l. Jackson and Earle: *ibid.*, **29**, 214 (1903).
3. a. Meisenheimer: *Ann.*, **323**, 205 (1902).
 b. Meisenheimer and Counerade: *Ann.*, **330**, 133 (1903).
 c. Meisenheimer: *Ann.*, **355**, 249 (1907).
 d. Meisenheimer and Witte: *Ber.*, **36**, 4164 (1903).
 e. Meisenheimer: *Ber.*, **36**, 4174 (1903).
4. a. Hantzsch and Kissel: *Ber.*, **32**, 3137 (1899).
 b. Hantzsch: *ibid.*, **40**, 1523 (1907).
 c. Hantzsch and Picton: *ibid.*, **42**, 2119 (1909).
 d. Hantzsch and Voigt: *ibid.*, **45**, 85 (1912).
 e. Hantzsch and Hein: *ibid.*, **52**, 493 (1919).
5. Bausch and Kögel: *Ber.*, **43**, 1549 (1910).
6. Giua: *Gaz. chim. ital.*, **45**, II, 361 (1915) from (13).

7. Sidgwick, Taylor and Baker: *The Organic Chemistry of Nitrogen*. Oxford, 1942, p. 259.
8. a. Janovsky: Ber., 19, 2158 (1886).
b. Janovsky: *ibid.*, 24, 971 (1891).
9. Bittó: Ann., 269, 377 (1892).
10. Willgerodt: Ber., 25, 608 (1892).
11. Rudolph: Z. anal. Chem., 60, 239 (1921).
12. Reitzenstein and Stamm: J. prakt. Chem. N. F., 81, 167 (1910).
13. Zimmermann: *Untersuchungen über die Jaffésche Reaction*, diss., Bonn 1936.
14. Jaffé: Z. physiol. Chem., 10, 390 (1886).
15. Reissert: Ber., 37, 831 (1904).
16. Sasaki: Biochem. Z., 114, 63 (1921).
17. Weisse and Tropp: Z. physiol. Chem., 178, 125 (1928).
18. Braun: J. prakt. Chem., 96, 412 (1865).
19. a. Greenwald: J. Amer. chem. Soc., 47, 1443, 2620 (1925).
b. Greenwald: *ibid.*, 50, 1469 (1928).
c. Greenwald: J. biol. Chem., 77, 539 (1928).
d. Greenwald: *ibid.*, 80, 103 (1929).
e. Greenwald: *ibid.*, 86, 333 (1930).
20. Anslow and King: J. chem. Soc., 1929, 1210.
21. Bost and Nicholson: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 7, 190 (1935).
22. Canbäck: Svensk kem. Tidskr., 58, 101 (1946).

Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds and Active Methylene Groups

XIV. The mechanism of the reaction

By TEODOR CANBÄCK

(Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm)

(This paper will be inserted in *Collectanea Pharmaceutica Suecica IV*, 1949)

JANOVSKY (1) described in 1891 the occurrence of highly coloured mixtures when aldehydes and alkali were added to a solution of certain nitro compounds. Since then the reaction has been studied now and then and some attempts to explain the reaction have been made. In this connection BITTÓ (2), JACKSON (3), WILLGERODT (4), REISSERT (5), WEISE and TROPP (6) and ZIMMERMANN (7) may be mentioned.¹ In general, these authors used picric acid as the nitro component and they try to connect this reaction and the JAFFÉ reaction (8) for the determination of creatinine.

WEISE and TROPP (6) deal exclusively with picric acid as the nitro component and they make a distinction between a reaction involving a reduction, cf. BRAUN (9), and a reaction involving a condensation. If a solution of picric acid is heated together with, for instance, an alkaline solution of glucose, the picric acid is reduced to the highly red coloured picramic acid. This reaction is not very specific, and is brought about by most reducing compounds.

The condensation reaction is more specific and requires special structures in the reacting compounds.

¹ Paper XIII in this series is a survey of the literature (55).

The following deals exclusively with the condensation reaction, which is treated theoretically on the same lines as previously (10).

The reaction has been studied by means of spectrophotometric methods.

The modern concept of the relation between the light absorption and the constitution of organic compounds has been summarized by LEWIS and CALVIN (11) on the basis of the overwhelming importance of the resonance phenomenon in the production of colour in organic molecules. They try to find a way between the older school, represented by WITT (12), WIZINGER (13), and PFEIFFER (14) among others, and the extreme quantum mechanic school, represented by SKLAR (15), BROOKER (16), FÖRSTER (17), PAULING (18) and so on.

In the ultraviolet part of the spectrum the quantum mechanic has been successful in elucidating the absorption spectra of a number of simple organic compounds. As an example benzene may be mentioned (19).

If the absorption band that benzene shows at about $255 \text{ m}\mu$ is due to a transition from the ground state to the first excited state, in which the two KEKULÉ structures contribute most, the agreement with the theoretically calculated value $245 \text{ m}\mu$ is fairly good. For further particulars regarding the value of these calculations, see MULLIKEN (20).

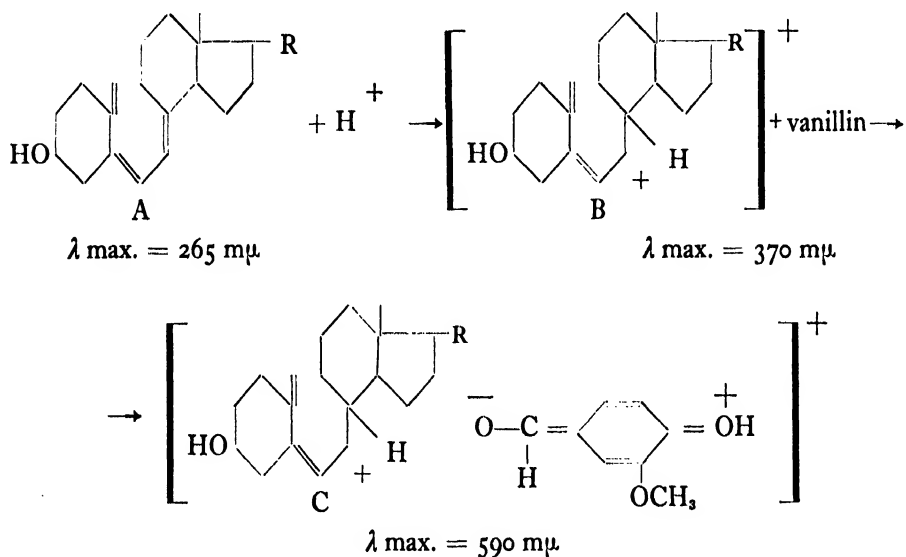
Undoubtedly the quantum mechanic methods of treating the subject will give correct results in the future, but for the moment it seems to be more practical to use the LEWIS' system, as it has greater possibilities of giving at least a qualitative interpretation of the spectra of organic molecules by means of concepts familiar to the organic chemist.

The energy difference that we are dealing with in the absorption spectra in the visible and ultra violet part of the spectrum arise from transitions between different electronic states of the molecule, mainly from the ground state to an excited state. The pure electronic changes are, however, usually accompanied by simultaneous changes in both vibrational and rotational energies. The properties of a simple unsaturated compound like butadiene is usually best represented by the conventional structural formulae completed by polar structures. As a result of resonance among all these structures there arises a number of electronic states of the molecule. The most stable of these, the ground state, is essentially that which is represented by the conventional structure with small contributions from polar structures. The other states, the excited states, on the other hand are resonance hybridised of the polar structures with only small contributions from the conventional structure. The more the excited state is stabilized, e. g. if many polar structures of not too widely different energy content are possible, the less energy is required for the excitation, and hence the light absorption occurs at longer wavelengths than if there were no resonance present. Furthermore, any change in the molecule that increases the resonance in the excited states will, therefore, result in an increase in the wavelength of the absorbed light and, if the increase in resonance is great enough, the compound will absorb light in the visible part of the spectrum and appear coloured.

Now some types of reactions will be discussed which increase the resonance in the excited states.

Two technically simple ways of getting a coloured compound from an uncoloured one are as follows:

along the conjugated carbon chain. In this case it is possible to estimate the red shift which is brought about by the aldehyde, as one can measure the absorption of the positively charged ion B under the same circumstances. The red shift which must be attributed to the presence of the aldehyde is about 220 m μ .



Colour reactions of this type are very common in the photometric analysis.

An analogous interpretation of the reaction may be applied in the second of the above cases, the reaction between aromatic nitro compounds like *m*-dinitrobenzene and acetone under the influence of alkali. If *m*-dinitrobenzene is dissolved in acetone and this solution shaken with an equal volume of 10 normal sodium hydroxide solution, the acetone phase is coloured brilliant violet and in the visible part of the spectrum the absorption has its maximum at 559 m μ .¹ Figure 1.

Nitrobenzene and 1,4-dinitrobenzene² do not react in this way. 2,4-Dinitrotoluene and 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene give this reaction whereas dinitromesitylene does not. Compare (48) and (49). With 1,3,5-trinitrobenzene, 2,4,6-trinitrotoluene and 2,4,6-trinitro-1,3-dimethylbenzene and trinitromesitylene colours are obtained, but the reaction here has a slightly different course which will be discussed below.

Thus to obtain a positive reaction it is necessary that two nitro groups are present on the benzene ring and that they are in *meta* position to each other. Further at least *one* of the *ortho* positions of the nitro groups must be occupied by a hydrogen atom.

¹ The following symbols will be used:

$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-k \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-E}$,
 where I_0 is the intensity of the light which penetrates the pure solvent to a depth of 1 cm., and I the intensity of the light which penetrates a solution of molarity c . ϵ is the molar extinction coefficient, k the extinction coefficient and E the extinction.

² 1,4-Dinitrobenzene in acetone solution gives with alkali a bright yellow colour. See also RUDOLPH (36).

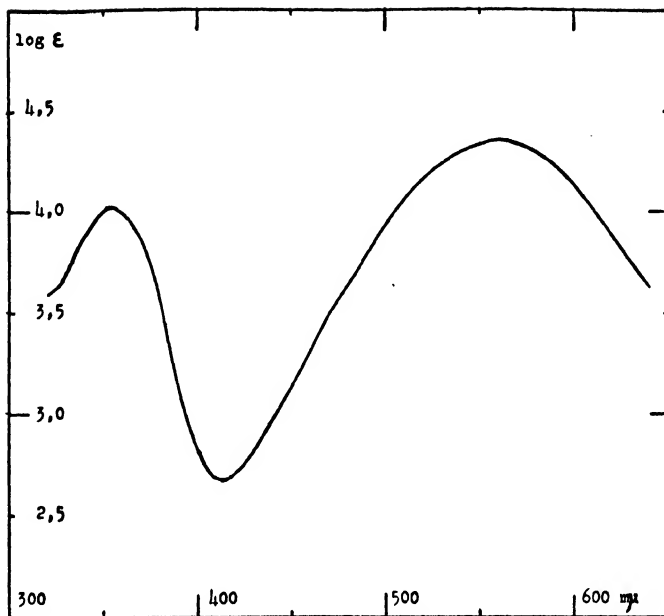
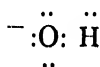
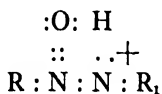


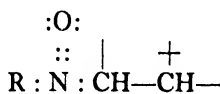
Figure 1

Absorption curve of *m*-dinitrobenzene and acetone in alkaline solution.

Already these general results eliminate the assumption that the coloured compound could be regarded as a simple molecular compound of the nitro compound and the methylene compound. For such compounds the following types of structures must be assumed.



a



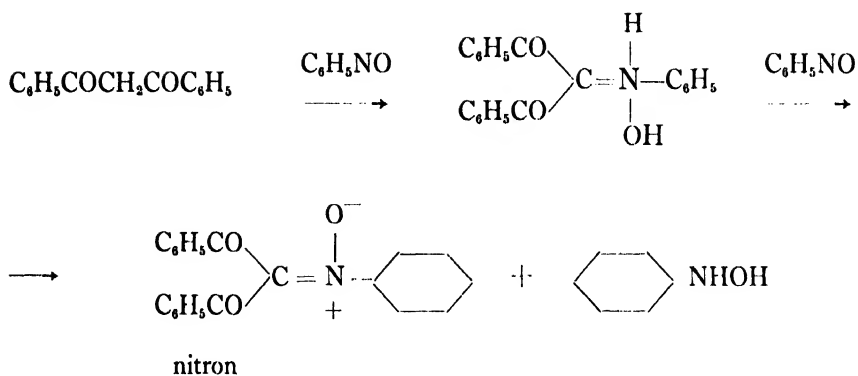
b

Here *a* represents a molecular compound of the type trinitrobenzene + naphthylamine and *b* one of the type trinitrobenzene + naphthalene.

As the presence of a hydrogen atom on an *ortho* carbon atom is not necessary for the formation of these types of compounds, such an interpretation of the structure of the coloured compound is excluded.

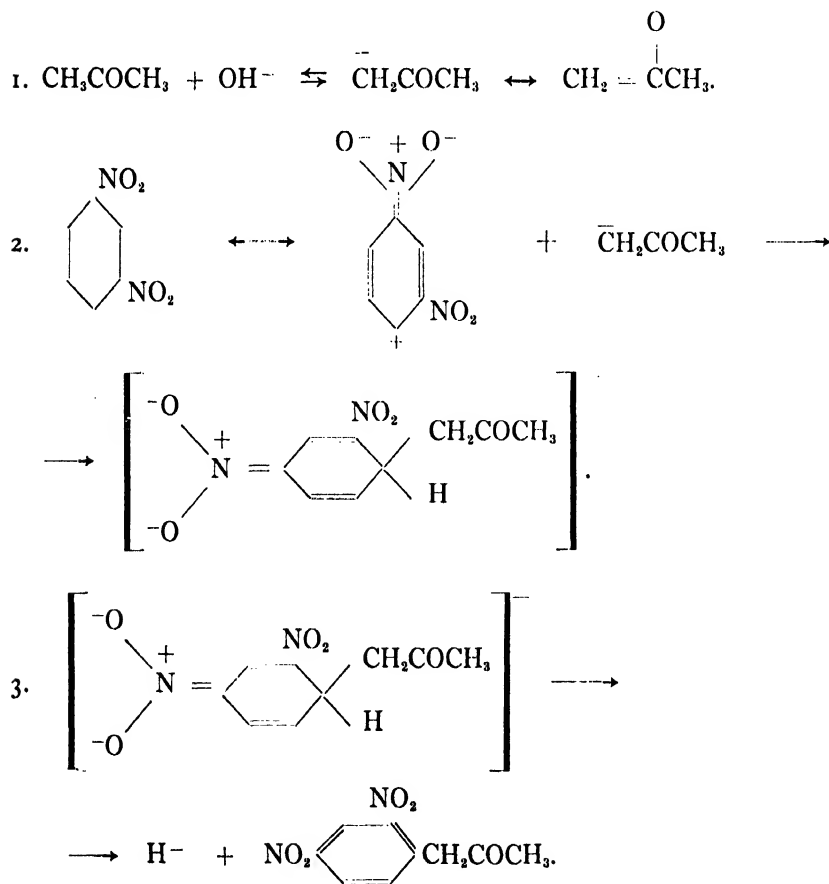
Another possible explanation of the reaction may be formulated analogously to that of SCHÖNBERG and AZZAM (22) for the reaction between nitrosobenzene and dibenzoylmethane. This formulation requires, however, that at least one of the nitro groups is reduced to a nitroso group under the conditions laid down.

They propose the following scheme:



If, however, a solution of *m*-nitrosanitrobenzene in acetone is shaken with an equal volume of 10 normal sodium hydroxide solution, it is not a violet but a yellow colour which develops. The experiment has been repeated under different conditions but always with the same result. Accordingly this interpretation of the reaction does not seem to be the correct one.

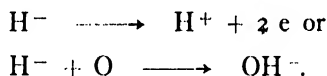
The following course of the reaction will be assumed as a hypothesis:



The bond¹ between the benzene nucleus and the acetone ion must be regarded as a bond between a dipole and an ion with many resonance forms. For the sake of typographical simplicity the bond is here depicted as a C—C bond. Hence there is only a formal resemblance between this way of representing the bond and that of ZIMMERMANN (7) who actually believed in the formation of a *real* C—C bond.

The mechanism of the reaction is formulated in accordance with the modern viewpoint on the replacement of negative groups from the benzene nucleus by bases (23). The similarity between the proposed reaction and other reactions will be briefly illustrated. When a nucleophilic reagent, e. g. a negative ion, attacks an aromatic nucleus, a stable anion, such as a chloride ion, nitrite ion or alkoxide ion is displaced by the entry of the substituent. Only a few examples will be mentioned, namely the synthesis of the 2,4-dinitrophenylacetoacetic ester from 2,4-dinitrochlorobenzene and sodium acetoacetic ester (24), the synthesis of 2,4,6-trinitrophenylacetoacetic ester from 2,4,6-trinitrodiphenylether and sodium acetoacetic ester (25) and the synthesis of 2,4-dinitrodiphenylamine from 2,4-dinitrochlorobenzene and aniline (26). In all these cases the displaced anion is stable.

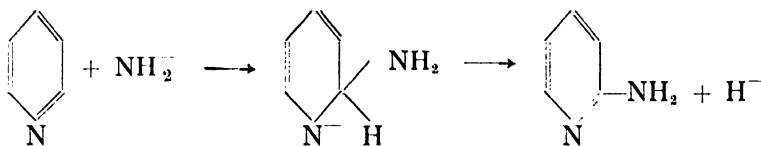
In a relatively few reactions, however, it is necessary to assume that a hydrogen atom is displaced in the form of the unstable hydride ion. Simultaneously or immediately afterwards an oxidation of the hydride ion to a proton occurs or the ion is transformed into other products:



As examples of this type of reaction, which has been very little studied, the following reactions may be mentioned. For a more extensive review see WHELAND (56).

When nitrobenzene is heated with sodium hydroxide, *o*- and *p*-nitrophenol are obtained (27); from pyridine α -pyridone (28), and from phenol or resorcinol floroglucinol is obtained (29). In all these cases a hydrogen atom is directly displaced by a hydroxyl group and in the form of a hydride ion.

By the action of sodium or potassium amide, heterocyclic bases can be converted into amines; the preparation of α -aminopyridine according to the method described by *Tschitschibabin* may be mentioned:



Further examples of this type of amination may be found in a review prepared by LEFFLER (30).

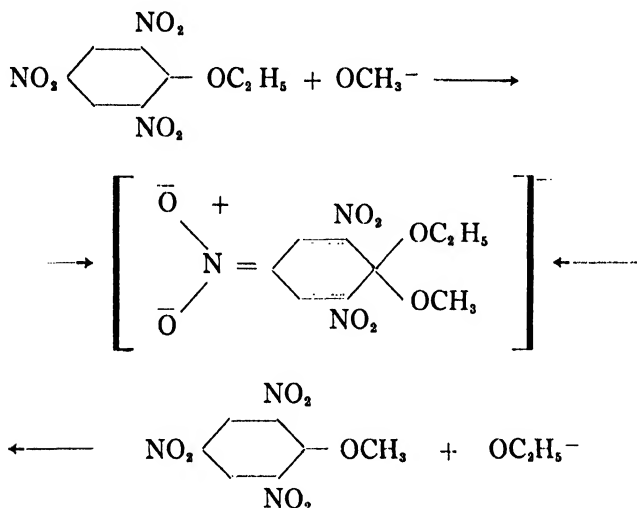
If *m*-dinitrobenzene is treated with hydroxylamine, 2,4-dinitroaniline is obtained together with 2,4-dinitro-*m*-phenyldiamine (31), from naphthalene is obtained α - and β -naphthylamine (32).

¹ Only one of the several resonance forms of the condensation product is shown.

If *m*-dinitrobenzene is treated in ethanolic solution by potassium cyanide one obtains primarily 2,6-dinitrobenzotrile, in which one of the nitro groups is immediately displaced by an ethoxy group so that the final result is 2-nitro-6-ethoxybenzotrile (33). From picric acid is obtained isopurpuric acid, 2-hydroxyl-amino-3,5-dicyano-4,6-dinitrophenol (34).

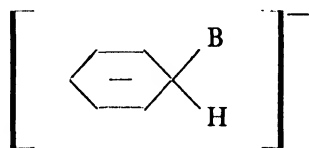
In the examples mentioned the nucleophilic reagents are the hydroxide ion, the amide ion, the hydroxylamine molecule and the cyanide ion, and the electrophilic reagent is generally an aromatic nucleus loaded with negative substituents.

Additional support for the proposed reaction may be found in the ingenious experiment by MEISENHEIMER (35). MEISENHEIMER showed that the same ion is obtained from 2,4,6-trinitrophenylethylether and methoxide ions and from 2,4,6-trinitrophenylmethylether and ethoxide ions:



Hence it is proved that the benzene ring acts as a pseudo-acid when it contains several nitro groups in *meta* positions and that the essential part of the reaction is an addition of the anion to the nucleus.

All the analogous reactions cited support the view that a relatively stable ion of the type



is produced from *m*-dinitrobenzene and acetone in the presence of alkali hydroxide and that this ion is responsible for the selective absorption in the visible part of the spectrum.

For a red shift of the absorption maximum from 235 m μ for *m*-dinitrobenzene to about 560 m μ for the addition product of *m*-dinitrobenzene and acetone, it is essential that the added anion is stabilized by resonance. That is clearly demon-

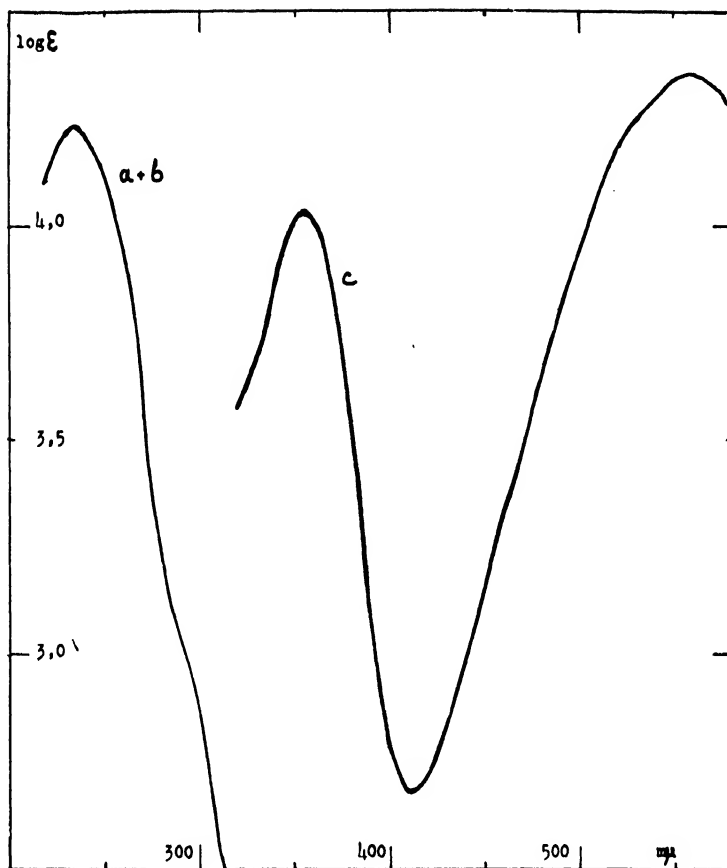


Figure 2

Absorption curves of *a.* *m*-dinitrobenzene dissolved in isopropyl alcohol, *b.* *m*-dinitrobenzene dissolved in isopropyl alcohol, and sodium propoxide solution added, *c.* *m*-dinitrobenzene dissolved in acetone and sodium ethoxide solution added.

strated in fig. 2, which shows the absorption curves of *m*-dinitrobenzene in isopropyl alcohol and in isopropyl alcohol to which sodium propoxide solution has been added. The curves (*a* and *b*) are identical and cannot be distinguished. In the same figure the absorption curve (*c*) of the *m*-dinitrobenzene-acetone compound is also plotted. It is clear that the red shift must be attributed to a

specific effect of the resonance hybride $\overline{\text{CH}_2\text{COCH}_3} \longleftrightarrow \text{CH}_2 = \overset{\overline{\text{O}}}{\text{C}} - \text{CH}_3$.

With the symmetric trinitrobenzene derivatives the conditions are somewhat different. If alkali is added to an ethanolic solution of 1,3,5-trinitrobenzene, an intense colour is obtained with absorption maxima at 426 and 496 $m\mu$. If alkali is added to an acetone solution of the same nitro compound, the maxima occur at 462 and 536 $m\mu$. See figure 3.

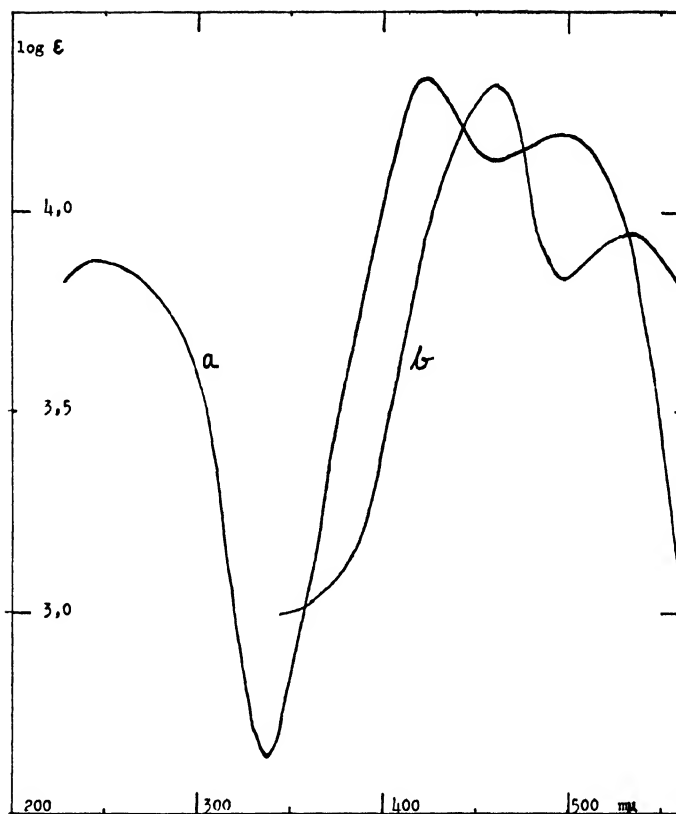
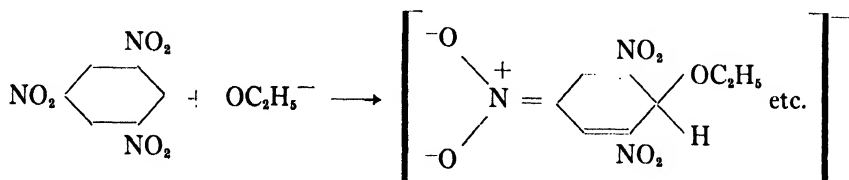


Figure 3

Absorption curves of *a.* 1, 3, 5-trinitrobenzene dissolved in ethanol and sodium ethoxide solution added, *b.* 1, 3, 5-trinitrobenzene dissolved in acetone and sodium ethoxide solution added.

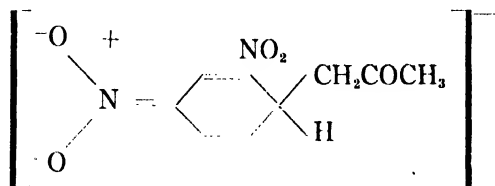
In this case the difference between the effect of the acetone ion and the ethoxide ion is very small. The reason is that the many nitro groups on the benzene ring make even as weak reagents as hydroxyl and ethoxide ions capable of producing sufficient stabilization of the quinoid form of the benzene ring.



This phenomenon gives a clue as to how the effect of the methylene compounds is to be interpreted.

Summary

On adding alkali to a solution of *m*-dinitrobenzene in acetone, a brilliant violet colour is obtained, which depends on the formation of the ion



In this ion the quinoidal structure of the benzene ring is stabilized by the addition of the acetone ion.

Experimental

All melting points are corrected and determined on the Kofler block. Boiling points are not corrected. Absorption spectra were obtained on a Beckman quartz spectrophotometer model DU using 1 ± 0.002 cm. quartz cells. A hydrogen lamp or a tungsten filament was used as a source of light. The spectra of the addition products have been measured in the following way. A weighed amount of the nitro compound was dissolved in the specified solvent and the solution shaken with an equal volume of 10 normal sodium hydroxide solution or, in the cases where the solvents were alcohols, as much of the corresponding sodium alkoxide dissolved in the same alcohol was added to the solution of the nitro compound so that the final concentration of the alkali was 0.25 normal. The solutions were then placed in the cells and the absorption curves were determined with the solvent, treated as the solution, as a blank.

Acetone, analytical reagent from „LKB”.

Ethanol, „extra finsprit”, without noticeable absorption in 1 cm. cells to 215 m μ .

Isopropyl alcohol, „Baker’s analyzed”, without noticeable absorption in 1 cm. cells to 215 m μ , b. p. 81°—82°.

Nitrobenzene, freshly distilled, analytical reagent, b. p. 210°—211°.

1,3-Dinitrobenzene, obtained from Merck, Elberfeldt, recrystallized five times from 95 per cent ethanol. Colourless needles, which after drying over phosphorous pentoxide *in vacuo* melted at 89.5°—90.0°. Another reagent from Eastman Kodak purified in the same way melted at 89.0°—89.5°.

Both preparations showed identical UV spectra, and polarographically the presence of trinitrobenzenes could not be shown.

The test on 1,2-dinitrobenzene described by *Truhaut* (37) was negative for both preparations.

1,4-Dinitrobenzene was synthesized in the main as by WITT and KOPETSCHNI (38). 5.0 g. *p*-nitroaniline, m. p. 145°—147°, was dissolved in a mixture of 12.5 ml. concentrated sulfuric acid and 55 ml. water, 0.10 g. silver nitrate added and the mixture heated cautiously to about 50°. Then twenty grams ammonium persulfate were added in small portions while the mixture was vigorously stirred. The mixture was stirred at 50° for 2 hours and was then allowed to stand for 24

hours at room temperature. The precipitate was sucked off, washed with water, dilute sodium hydroxide and again with water. The damp precipitate was placed in a flask and the 1,4-dinitrobenzene isolated by steam distillation. After recrystallization from glacial acetic acid and drying over sulfuric acid *in vacuo*, 2.1 g. light yellow needles were obtained with m. p. 173°—174°. Reported by BAMBERGER and HÜBNER (39) m. p. 174°.

1,3,5-Trinitrobenzene, obtained from Bofors Nobelkrut, was recrystallized five times from 95 per cent ethanol. Dried *in vacuo* over sulfuric acid, m. p. 122°—123°.

2,4-Dinitrotoluene, obtained from Coleman and Bell Co., was recrystallized five times from 95 per cent ethanol and dried *in vacuo* over phosphorous pentoxide, m. p. 69°—70°.

2,4,6-Trinitrotoluene, obtained from Bofors Nobelkrut, was recrystallized three times from 95 per cent ethanol. Dried over phosphorous pentoxide *in vacuo*, m. p. 80.5°—81.0°.

4,6-Dinitro-1,3-dimethylbenzene, was synthesized according to BORSCHÉ (40). To 5 g. *m*-xylene, b. p. 137°—139°, 25 g. nitric acid, sp. gr. 1.52, was stirred in drop by drop and the mixture was set aside at room temperature over night and then put on crushed ice. The oil was extracted with ether and the ether phase washed first with 20 % sodium carbonate solution and then with water until the reaction was neutral. After drying with sodium sulfate the ether was evaporated and the remaining crude product recrystallized four times from absolute ethanol with the aid of charcoal. White needles were obtained after drying *in vacuo* over phosphorous pentoxide, m. p. 91.5°—92.0°. Reported by DAVIES (41) 93°.

2,4,6-Trinitro-1,3-dimethylbenzene, was prepared from 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene according to the directions given by GREVINGK (42).

One gram 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene was dissolved in a cold mixture of 10 ml. nitric acid, sp. gr. 1.52, and 20 ml. sulfuric acid, sp. gr. 1.84. The mixture was set aside at room temperature over night and was then put on 200 ml. crushed ice. The nitro compound was extracted with ether and worked up as described for 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene. After two recrystallizations from 95 per cent ethanol and one from glacial acetic acid it was dried over phosphorous pentoxide *in vacuo*, m. p. 181°—182°. FITTIG (43) reports 176° (uncorrected?) and DEVERGENES (44) 182.5°—183.5°.

Dinitromesitylene was prepared by FITTIG's method (45). To 25 ml. nitric acid, sp. gr. 1.52, 10 g. freshly distilled mesitylene, b. p. 163°—165°, was added drop by drop, and the mixture heated on the steam bath for one hour. After cooling the mixture was put on 500 ml. crushed ice and the precipitate filtered off and washed free from acid with water. After two recrystallizations from 95 per cent ethanol and drying over phosphorous pentoxide *in vacuo*, white needles were obtained, m. p. 85°—86°. FITTIG (46) reports m. p. 86°.

Tritromesitylene was prepared according to FITTIG's method (46). Seven grams freshly distilled mesitylene were nitrated with a mixture of 25 ml. nitric acid, sp. gr. 1.52, and 50 ml. sulfuric acid, sp. gr. 1.84, on the steam bath for two hours. After cooling the mixture was put on 500 ml. crushed ice and the nitro compound worked up as described for dinitromesitylene. M. p. 231°—232°. GIBSON (47) reports m. p. 232°—233°.

1-Nitroso-3-nitrobenzene. Attempts to prepare the compound by means of reduction of *m*-dinitrobenzene by Zn according to the directions given by ALWAY

(50) and ALWAY and GORTNER (51) were unsuccessful. Solid solutions of *m*-nitrosonitrobenzene in *m*-dinitrobenzene with variable compositions were always obtained. M. p. varied from 63° to 85°. At last, oxidation of *m*-nitroaniline with neutralized Caro's acid followed by steam distillation gave a pure compound. The method has been described by BAMBERGER and HÜBNER (52). Ten grams of *m*-nitroaniline were brought to a fine powder and suspended in 1 500 ml. water. 35.5 g. ammonium persulfate was thoroughly blended in a mortar with 25 ml. ice cold concentrated sulfuric acid and the mixture was stirred for 15 minutes under ice cooling. Then it was neutralized with solid potassium carbonate. Thereupon this mixture was added to the suspension and the whole mixture shaken vigorously for 20 minutes and then rapidly filtered. The damp deposit was placed in a flask and the formed *m*-nitrosonitrobenzene isolated by steam distillation. Only the first 50 ml. of the distillate were collected. The crystals were sucked off and dried over sulfuric acid *in vacuo*. M. p. 89.5°—90.0°. All attempts to recrystallize the compound failed. BRAND (53) reports m. p. 90°, BAMBERGER and HÜBNER (52) 89.5°—90.0°. When dissolved in ethanol, the compound showed an absorption band with the maximum at about 760 m μ and $\epsilon = 57$. FENIMORE (54) reports the maximum at 760 m μ and $\epsilon = 55.4$.

This investigation has been supported by a grant from *Statens medicinska forskningsråd* which is here gratefully acknowledged.

References

1. JANOVSKY: Ber. 24, 971 (1891).
2. BITTÓ: Ann., 269, 377 (1892).
3. JACKSON: Am. Chem. J., 11, 97 (1889) and later papers.
4. WILLGERODT: Ber., 25, 608 (1892).
5. REISSERT: Ber., 37, 834 (1904).
6. WEISE and TROPP: Z. physiol. Chem., 178, 125 (1928).
7. ZIMMERMANN: *Untersuchung über die Jaffésche Reaktion*, Diss. Bonn 1936.
8. JAFFÉ: Z. physiol. Chem., 10, 390 (1886).
9. BRAUN: J. prakt. Chem., 96, 412 (1865).
10. CANBÄCK: Report at the Meeting of Kemistsamfundet, November 1946.
11. LEWIS and CALVIN: Chem. Rev., 25, 273 (1939).
12. WITT: Ber., 9, 522 (1876).
13. WIZINGER: *Organische Farbstoffe*, Bonn 1933.
14. PFEIFFER: *Organische Molekülverbindungen*, Stuttgart 1927.
15. SKLAR: J. Chem. Phys., 5, 669 (1937).
16. BROOKER: Resonance and Organic Chemistry in *Frontiers in Chemistry*, vol. III, N. Y. 1945.
17. FÖRSTER: Angew. Chem., 52, 223 (1939).
18. PAULING: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 25, 577 (1939).
19. See WHELAND: *The Theory of Resonance and its Application to Organic Chemistry*, Chapter 6, N. Y. 1944.
20. MULLIKEN: J. Chem. Phys., 7, 121 (1939).
21. SCHALTEGGER: Helv., 39, 285 (1946).

22. SCHÖNBERG and AZZAM: J. chem. Soc., 1939, 1428.
23. BRANCH and CALVIN: *The Theory of organic Chemistry*, N. Y., 1945, p. 481.
24. BORSCHKE: Ber. 42, 601 (1909).
25. JACKSON and EARLE: Amer. Chem. Journ., 29, 89, 214 (1903).
26. REISSERT and GOLL: Ber., 38, 90 (1905).
27. WOHL: Ber., 32, 3486 (1899).
28. TSCHITSCHIBABIN: Ber., 56, 1879 (1923).
29. BARTH and SCHREDER: Ber., 12, 417, 503 (1879).
30. LEFFLER: *The Amination of Heterocyclic Bases by Alkali Amides in Organic Reactions*, vol. I, N. Y. 1942.
31. MEISENHEIMER and PATZIG: Ber., 39, 2533 (1906).
32. GRAEBE: Ber., 34, 1778 (1901).
33. LOBRY DE BRUYN: Rec. trav. chim., 2, 205 (1883).
LOBRY DE BRUYN and GEUNS: *ibid.*, 23, 26 (1904).
34. BORSCHKE and BÖCKER: Ber., 37, 4388 (1904).
35. MEISENHEIMER: Ann. 323, 205 (1902).
36. RUDOLPH: Z. anal. Chem. 60, 239 (1921).
37. TRUHAUT: J. Pharm. chim. (8), 18, 125, 339 (1934).
38. WITT and KOPETSCHNI: Ber., 45, 1134 (1912).
39. BAMBERGER and HÜBNER: Ber., 36, 3809 (1903).
40. BORSCHKE: Ann., 386, 359 (1912).
41. DAVIES: J. chem. Soc., 121, 2650.
42. GREVINGK: Ber., 17, 2424 (1884).
43. FITTIG: Ann., 148, 6 (1868).
44. DEVERGENES: Ann. Chim. anal. appl. (2), 2, 280 from C. 1920 III 881.
45. FITTIG: Ann., 141, 132 (1867).
46. FITTIG: Ann., 141, 134 (1867).
47. GIBSON: J. chem. Soc., 117, 950.
48. BOST and NICHOLSON: Ind. Eng. chem. Anal. Ed., 7, 190 (1935).
49. CANBÄCK: Svensk kem. Tidskr., 58, 101 (1946).
50. ALWAY: Ber., 36, 2530 (1903).
51. ALWAY and GORTNER: Ber., 38, 1900 (1905).
52. BAMBERGER and HÜBNER: Ber., 36, 3806 (1903).
53. BRAND: Ber., 38, 4011 (1905).
54. FENIMORE: J. Amer. Chem. Soc., 70, 3114 (1948).
55. CANBÄCK: Svensk farmaceutisk tidskrift, in press.
56. See p. 256 of ref. (19).

Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds and Active Methylene Groups

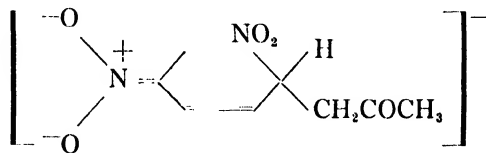
XV. An investigation into the difference in behaviour of twenty-nine m-dinitrobenzene derivatives in their reaction with acetone in alkaline solution

By TEODOR CANBÄCK

(Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm)

(This paper will be inserted in *Collectanea Pharmaceutica Succica IV*, 1949)

In the fourteenth paper in this series (1) the fundamental reaction between *m*-dinitrobenzene and acetone in alkaline solution was discussed. The formation of a quinoid ion¹



was made responsible for the light absorption. In this paper the influence on the reaction and the light absorption of the addition products caused by substituents in the benzene ring will be investigated. Furthermore the difference in behaviour

¹ The bond between the benzene nucleus and the acetone ion, which is a bond between a dipole and an ion with several resonance forms, is here depicted as a common C—C bond, see further ref. (1). For the sake of simplicity, as a rule only the *para* quinoid structures will be shown in the following formulae.

of the alkyl derivatives in the reaction will be discussed in connection with differences in their UV spectra. *The methylene compound is in all cases the same, viz. acetone.*

The dependence of the light absorption on substituents in nitrobenzenes may roughly be divided into three parts, (a) steric hindrance against a planar configuration of the nitro groups and the benzene ring, (b) influence of an electron donating group, and (c) influence of an electron attracting group. Inductive effects arising from the alkyl groups will be treated here in connection with the steric inhibition of resonance caused by these groups.

The compounds investigated are collected in table 1. Methods of synthesis and of purification are given in the experimental section. All compounds are derivatives of *m*-dinitrobenzene, and the substituents are almost exclusively in *ortho* and *para* position respectively to the nitro groups.

Table 1. The m-dinitrobenzene derivatives investigated

1,3-dinitrobenzene
 2,4-dinitrotoluene
 2,4-dinitroethylbenzene
 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene
 2,4-dinitrostilbene
 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene
 dinitromesitylene
 2,4-dinitrophenol
 2,4-dinitrophenyl acetate
 2,4-dinitroanisole
 2,4-dinitrodiphenylether
 2,4-dinitroaniline
 N-(2,4-dinitrophenyl)-piperidine
 2,4-dinitrophenylpyridinium chloride
 2,4-dinitroacetanilide
 2,4-dinitrodiphenylamine
 2,4-dinitrophenylhydrazine
 acetophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone
 2,4-dinitrochlorobenzene
 2,4-dinitrobenzoic acid
 methyl 2,4-dinitrobenzoate
 3,5-dinitrobenzoic acid
n-propyl 3,5-dinitrobenzoate
 diethylaminoethyl 3,5-dinitrobenzoate hydrochloride
 2,4-dinitrophenylacetic acid
 methyl 2,4-dinitrophenylacetate
 ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate
 2,4-dinitrophenylacetone
 ethyl *bis*-(2,4-dinitrophenyl)-acetate

1. *Effects on the UV spectra in pentane solution and on the reaction with acetone in alkaline solution caused by the alkyl groups in 2,4-dinitroalkylbenzenes.*

To get an idea of the steric and inductive effects caused by the alkyl groups in 2,4-dinitroalkylbenzenes, a study was made on the UV spectra of a number of such compounds in pentane solutions. The results of the measurements are given in table 2 and in figures 1 and 2.

Table 2. UV absorption spectra of alkyl derivatives of *m*-dinitrobenzene in pentane solution.

Compound	λ max. $m\mu$	ϵ
1,3-dinitrobenzene	227	21000
2,4-dinitrotoluene	232	15930
2,4-dinitroethylbenzene	233	13800
2,4-dinitro- <i>t</i> -butylbenzene	257	10610
2,4-dinitrostilbene	233	14900
4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene	243	15100
dinitromesitylene	238 ¹	3990 ¹

¹ inflexion point

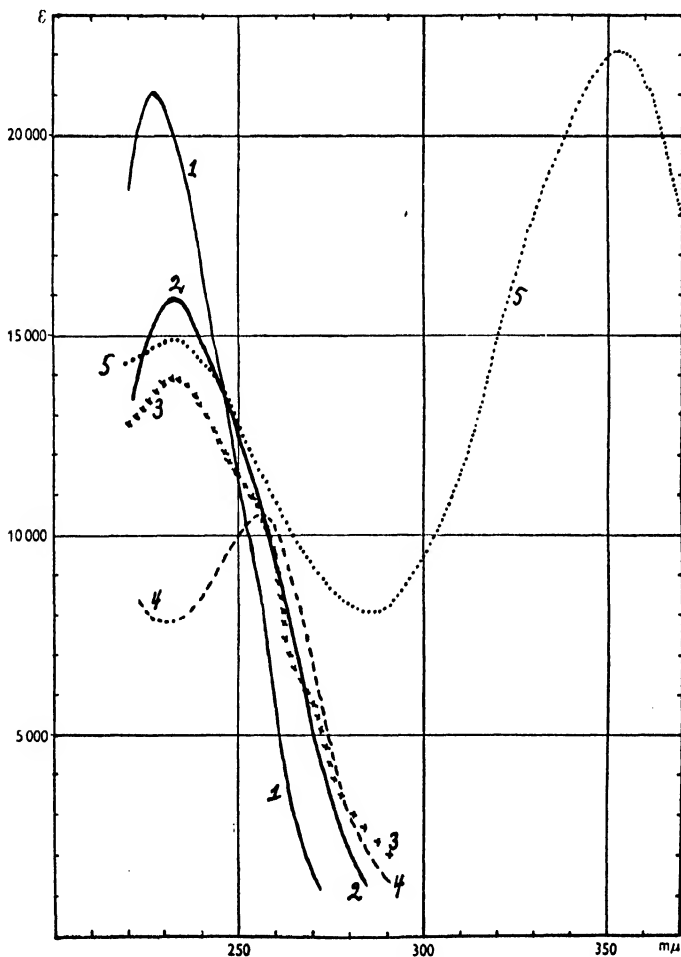


Figure 1. Absorption curves in pentane solution of 1. 1,3-dinitrobenzene, 2. 2,4-dinitrotoluene, 3. 2,4-dinitroethylbenzene, 4. 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene, 5. 2,4-dinitrostilbene.

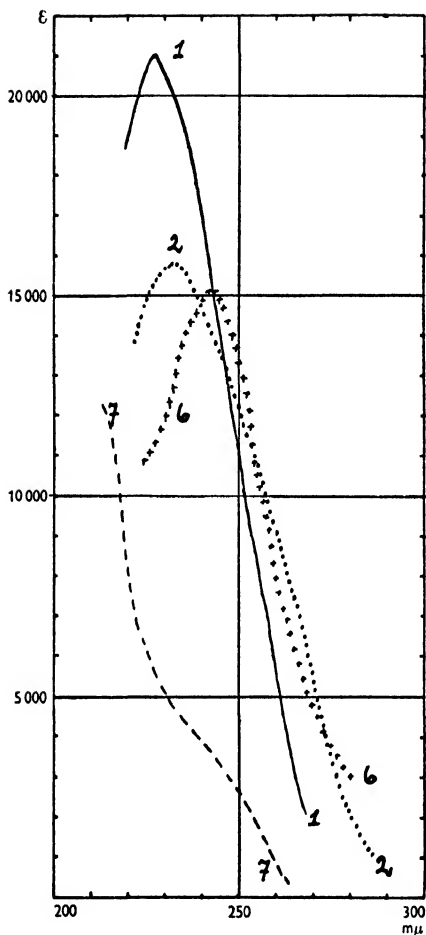


Figure 2. Absorption curves in pentane solution of 1. 1,3-dinitrobenzene, 2. 2,4-dinitrotoluene, 6. 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene, 7. dinitromesitylene.

BROWN and REAGAN (2) have recently published an investigation into the steric effects in the UV absorption spectra of *o*-alkyl nitro compounds. An extract from their results is given in table 3.

Measurements of the mononitro derivatives have not been repeated as those of BROWN and REAGAN are made on *iso*-octane solutions and mine on pentane solutions, both solvents giving comparable data.

A priori it is probable that those effects which influence the UV spectra of the alkyldinitrobenzenes will also be noticeable in the spectra of their addition products with acetone in alkaline solution. In table 6 measurements of those ions are given. They will be discussed later.

It is logical to assume that a substituent that inhibits the nitro group resonance by steric inhibition of a planar configuration of the molecule will cause a displacement of the absorption maximum to shorter wavelengths, e.g. a blue shift, and

Table 3. UV absorption of nitrobenzenes in iso-octane according to BROWN and REAGAN.

Compound	λ max. $m\mu$	ϵ
nitrobenzene	252	8620
<i>o</i> -nitrotoluene	250	5950
<i>p</i> -nitrotoluene	264	10250
<i>o</i> -nitrocumene	247	3760
<i>p</i> -nitrocumene	265	10430
<i>o</i> -nitro- <i>t</i> -butylbenzene	no maximum ¹	—
<i>p</i> -nitro- <i>t</i> -butylbenzene	265	10720
nitromesitylene	no maximum ²	—

¹ at 250 $m\mu$ ϵ is 1450; ² at 250 $m\mu$ ϵ is 2060.

also a weakening of the intensity of the absorption. This shift towards shorter wavelengths can be traced in table 3 with regard to *o*-nitrotoluene and *o*-nitrocumene, and may possibly be present also in *o*-nitro-*t*-butylbenzene and nitromesitylene. In the dinitro derivatives this effect is not present, instead a red shift is noticed in comparison with the parent compound, *m*-dinitrobenzene. A closer examination of tables 2 and 3 indicates further that the influence of the nitro groups on the intensity of the absorption is additive. To enhance this impression table 4 has been compiled. The molar extinction coefficients of the mononitro and the dinitro derivatives have been tabulated together with the sum of the extinction coefficients for the corresponding *ortho* and *para* derivatives. Although only a few corresponding compounds have been studied the impression is striking, and the phenomenon is most easily explained by assuming that nitro groups in *meta* position to each other act upon ϵ independently of each other. The calculations for the *t*-butylbenzene and mesitylene derivatives are only approximate, as in the case of the mononitro compounds no maxima are present. Because of uncertainty due to overlapping of bands which have maxima beyond the range of BROWN'S and REAGAN'S measurements, the extinction values at the inflexion points are too high, and are certainly not caused solely by the characteristic nitro group absorption.

It has not been possible to synthesize the *ortho* and *para* mononitro derivatives of ethylbenzene nor the 2,4-dinitrocumene in sufficiently pure states. See further (3).

In resonating molecules, a ground state and excited states are provided by resonance splitting of the energy levels of more or less fictitious structures. The energy differences between the ground state and the first excited state correspond in most cases to absorptions in the visible or ultra violet part of spectrum. The probability of an electronic transition between two such states can be calculated by means of quantum mechanics, and the intensity of the absorption is an expression of the probability of a transition from a lower to a higher energy level. An essential condition for these calculations is that the distribution of electric charge in the molecule is affected by the transition. In symmetric molecules like benzene the contributions of polar structures are of minor importance by the

Table 4. The additive effect of nitro groups on the molar extinction coefficient.

Derivative of	<i>o</i> -nitro ϵ	<i>p</i> -nitro ϵ	<i>o, p</i> -dinitro ϵ	Sum of ϵ of <i>o</i> and <i>p</i> mononitro
benzene	8620	8620	21000	17240
toluene	5950	10250	15900	16200
ethylbenzene	—	—	13800	—
cumene	3760	10430	—	14190
<i>t</i> -butylbenzene	1450	10720	10610	(12170)
1,3-dimethylbenzene	—	—	15100	—
mesitylene	2060	2060	3990	(4120)

formation of the resonance hybrid, and hence the absorption is very weak. In polar compounds with no, or very little, steric inhibition of resonance like the nitrobenzenes ($\epsilon = 8000-10000$) or *m*-dinitrobenzenes ($\epsilon = 15000-20000$) the probability of a transition from a lower to a higher energy level is much higher, and the intensity of the absorption is of quite a different degree than in the case of benzene ($\epsilon = 200$).

The above arguments are confirmed by the behaviour of many organic compounds when treated with acids and bases. 5-Nitro-4-hydroxy-1,3-dimethylbenzene in acid aqueous solution has an absorption maximum at 378 $m\mu$ and $\epsilon = 2670$. In alkaline solution, when the formation of a phenolate ion is complete, the absorption maximum has shifted to 447 $m\mu$ and ϵ risen to 4710 (4). This combination of a red shift and an increase in the absorption is characteristic, and the intensified absorption is explained by the higher probability of transition in the ion than in the undissociated compound.

With these well known points of view and the results of the measurements as a basis, it is possible to make some generalizations about the wavelength shifts caused by alkyl substitutions in *m*-dinitrobenzenes. The wavelengths of the maxima of the compounds investigated have been tabulated in table 5.

Table 5. Wavelengths of absorption maxima of mononitro- and meta-dinitrobenzene derivatives.

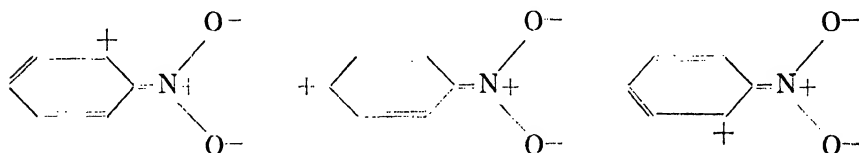
Derivative of	2-nitro ¹ λ max.	4-nitro ¹ λ max.	2,4-dinitro λ max.
benzene	252 $m\mu$	252 $m\mu$	227 $m\mu$
toluene	250	264	232
ethylbenzene	—	—	233
cumene	247	265	—
<i>t</i> -butylbenzene	no maximum	265	257
stilbene	—	—	233
1,5-dimethylbenzene	—	—	243
1,3,5-trimethylbenzene	no maximum	no maximum	238 inflexion point

¹ Values taken from BROWN and REAGAN (2).

The substitution of a nitro group for a hydrogen atom in 4- and 2-position respectively to the already present nitro group in a 2- or 4-nitroalkylbenzene, causes in all cases a shift of the absorption maximum towards shorter wavelengths. In the *t*-butylbenzene and mesitylene derivatives the results are not quite clear. The factors which are operating (see table 2, 3 and 5) may be explained in the following way.

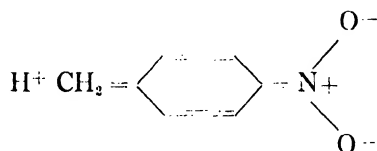
The absorption maximum that benzene exhibits at 255 $m\mu$ is ascribed to a transition from a lower state to an excited state which is provided by resonance splitting of the energy levels of the two KÉKULÉ structures. The contributions from the DEWAR structures are calculated at only twenty per cent (5).

In nitrobenzene, however, polar structures of the types



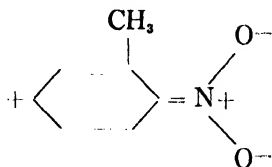
will contribute much more, which causes the intensity of the absorption to increase from $\epsilon = 200$ for benzene to $\epsilon = 8620$ for nitrobenzene. However the shift, if any, of the wavelength is very small, nitrobenzene having its maximum at 252 $m\mu$. This shows that the conditions in benzene and nitrobenzene are not comparable. The coincidence of the absorption maxima of the two compounds is purely accidental.

If now a methyl group is introduced in *para* position to the nitro group, additional possibilities of resonance occur as hyperconjugation



will contribute in the excited state. The result is that the difference between the energy levels of the ground state and the excited state will decrease, and hence the absorption band will be shifted towards longer wavelengths. As the polarity is increased the intensity of the absorption is enhanced. In table 5 it is seen that the substitution of an alkyl group (methyl, *isopropyl* and *t*-butyl) for a hydrogen atom causes a red shift of 12–13 $m\mu$.

The substitution of an alkyl group for a hydrogen atom in *ortho* position causes structures of the type



to contribute to the resonance, but the contribution of such structures is much less here than in the corresponding *para* compounds. The reason is that steric hindrance of the resonance occurs.

Although the inhibiting effect of a single methyl group in *ortho* position is very small, and although a coplanar configuration can certainly be obtained through small adjustments of the valence angles, the strain that has arisen in the molecule is great enough to decrease the maximum absorption from $\epsilon = 8620$ to $\epsilon = 5950$. The position of the maximum is, however, only shifted $2 \text{ m}\mu$ towards shorter wavelengths. This behaviour of an *ortho* methyl group is well known from investigations of other molecules (6). The absorption maximum is affected by the other *ortho* alkyl substituents in the same way and its height decreases in the sequence $\text{H} > \text{CH}_3 > (\text{CH}_3)_2\text{CH} > (\text{CH}_3)_3\text{C}$.

Almost maximum probability of transition seems to exist already at the methyl group by *para* substitution, and the structure of the alkyl group is of minor importance. However, the usual electron repelling order of the alkyl groups can be traced: $(\text{CH}_3)_3\text{C} > (\text{CH}_3)_2\text{CH} > \text{CH}_3 > \text{H}$.

Among the *meta* dinitrobenzene derivatives investigated the alkyl group is always present in both *ortho* and *para* position to a nitro group. Of the *ortho* and *para* effects discussed, the *para* effect will determine the position of the absorption maximum with regard to the parent compound *meta* dinitrobenzene. This is clear from table 5 from which it is seen that the introduction of a methyl group causes a red shift of $5 \text{ m}\mu$, of an ethyl group $6 \text{ m}\mu$, and of a *t*-butyl group $30 \text{ m}\mu$. That is the same sequence as in the *para* nitrobenzene series. If two methyl groups are introduced, both in *ortho* and *para* position to the nitro groups, a red shift of $16 \text{ m}\mu$ is obtained. The complete blocking of the nitro groups with a third methyl group, as in the mesitylene compound, causes a shift of $5 \text{ m}\mu$ towards shorter wavelengths with reference to the xylene compound.

Fig. 3 a shows the small steric hindrance in the toluene compound against a coplanar configuration of the *ortho* nitro group. The *para* nitro group is not affected.¹ In the xylene compound, however, both nitro groups are hindered, fig. 3 b, but with only small adjustments of the bond angles a planar structure may still be obtained. From figure 2 it is seen that the red shift caused by the *para* methyl group is still present in both compounds. On the other hand in the mesitylene compound, fig. 3 c, both nitro groups are effectively held out of plane by the bulky methyl groups. From fig. 2 it is also apparent that the absorption spectrum of the mesitylene compound is quite different from those of the toluene and xylene compounds.

The intensity of the UV absorption of the dinitrobenzenes is, as seen in table 4, about equal to the sum of the corresponding *ortho* and *para* mononitrobenzenes, and the intensity decreases in the same sequence as in the case of the *ortho* nitro-

¹ The dimensions used in the drawings are those listed by JONES (7).

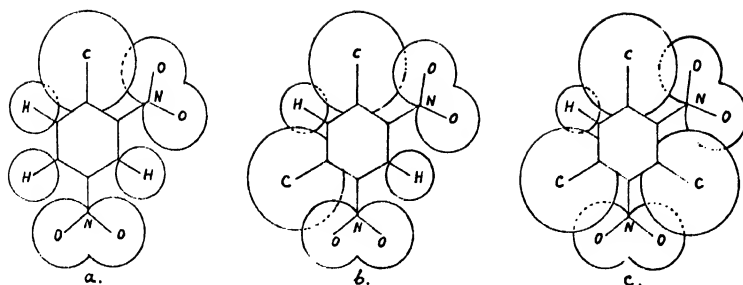


Figure 3. a. 2,4-dinitrotoluene, b. 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene, c. dinitromesitylene.

alkylbenzenes. Thus in the dinitro series the *ortho* effect dominates the height of the absorption band.

Now, it is interesting to compare the results obtained from the study of the UV spectra with those obtained from measurements of the absorption in the visible part of spectrum of the addition compounds obtained from the dinitroalkylbenzenes and acetone in alkaline solution.

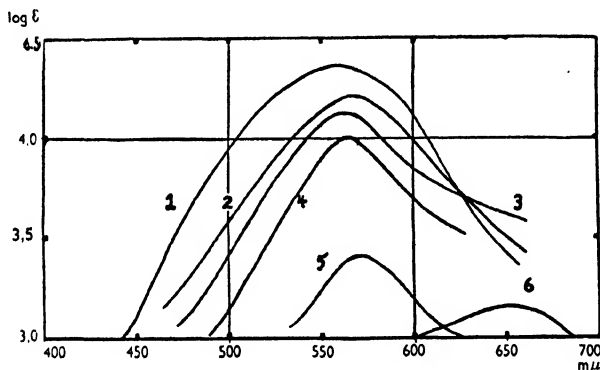


Figure 4. Absorption curves of the condensation products of acetone and 1. 1,3-dinitrobenzene, 2. 2,4-dinitrotoluene, 3. 2,4-dinitroethylbenzene, 4. 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene, 5. 2,4-dinitrostilbene, 6. 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene.

Table 6. Absorption maxima of the addition compounds obtained from *m*-dinitrobenzene derivatives and acetone in alkaline solution.

Compound	λ max. $m\mu$	" ϵ " ¹
1,3-dinitrobenzene	559	23100
2,4-dinitrotoluene	563	14230
2,4-dinitroethylbenzene	565	10550
2,4-dinitro- <i>t</i> -butylbenzene	565	2390
2,4-dinitrostilbene	568	16100
4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene	650	1790
dinitromesitylene	no absorption within the range 400—700 $m\mu$	

¹" ϵ " is the molar extinction coefficient after 15 minutes.

The spectra are very much alike, fig. 4, and in table 6 the results of the measurements are tabulated.

The addition products have been obtained in the following way:—

Ten to fifty mg. of the nitro compound were dissolved in acetone to a volume of 100.0 ml. From this solution aliquotes were withdrawn and diluted with acetone to 25.00 ml. This diluted solution was shaken with 25 ml. of a 10 normal sodium hydroxide solution for two minutes, and the acetone solution was allowed to separate from the aqueous phase for ten minutes. The measurements of λ max. and " ϵ " were made fifteen minutes after the beginning of the shaking.

This method can be criticised because the measurements were not made at the moment of maximum absorption. From fig. 5 it is seen that in certain compounds the maximum absorption is not reached within fifteen minutes.

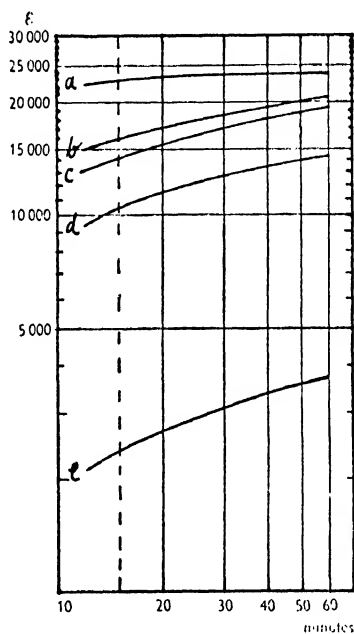


Figure 5. The molar extinction coefficients of the condensation products of acetone and a. 1,3-dinitrobenzene, b. 2,4-dinitrostilbene, c. 2,4-dinitrotoluene, d. 2,4-dinitroethylbenzene and e. 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene plotted against time. The dotted line indicates the moment of measurement of " ϵ ".

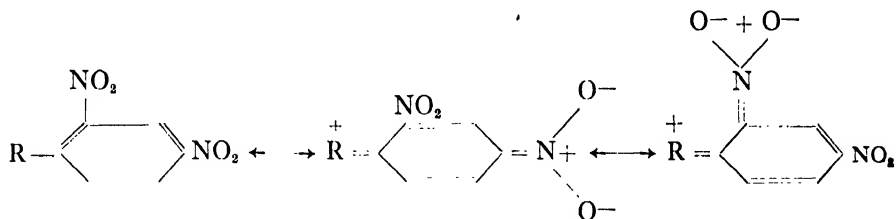
I am, however, of the opinion that the characteristic effects caused by the substituents are illustrated better by this mode of measurement than by measurements made at the moment of maximum absorption; the reason being that simultaneously with the increase in the extinction the ion is destroyed by the strong alkali, and the absorption maximum is broadened and lowered. The mutual succession of the substituents is *not* shifted if the measurements of the absorption are made at the later point. In that case it would be necessary to include the time as a parameter when comparing the effects of the different substituents. For instance, the *m*-dinitrobenzene compound reaches its maximum absorption

within 7—8 minutes, whereas the absorption of the 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene compound is still increasing after 120 minutes.

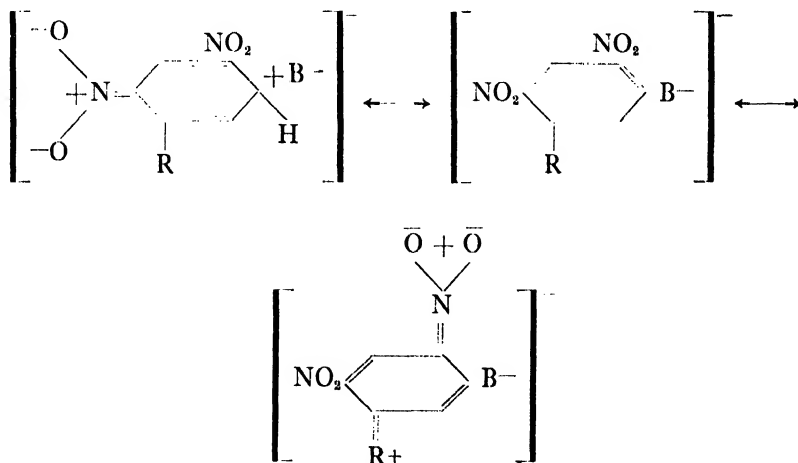
Direct comparison of tables 2 and 6 shows that the different groups have about the same effect on the absorption in the UV as on the absorption of the coloured ion in the visible. The maxima of absorption are shifted in both cases towards longer wavelengths in the following order: $H < CH_3 < C_2H_5 < C(CH_3)_3$, while the intensities of the maxima are decreased in the same order. When positions 1 and 3 in the ring are blocked by alkyl groups (as in the xylene compound) the mechanism of the reaction is obviously altered and the addition of the acetone ion probably takes place in position 5. λ max. as well as ϵ are abnormal for 1,3-dimethyl-4,6-dinitrobenzene. If all *ortho* positions are blocked as in dinitromesitylene, no addition occurs and no absorption in the visible is present. 2,4-Dinitrostilbene behaves in the main as 2,4-dinitrotoluene, and the unsaturated side chain has no pronounced influence on the absorption in the visible, thus agreeing with lack of influence on the UV absorption between 220 and 250 $m\mu$; compare fig. 1.

2. The influence of an electron donating group.

An electron donating group R resonates with the dinitrobenzene ring in the following way:—



This resonance will be active also in the quinoid ions obtained by the addition of the acetone ion B^- :—



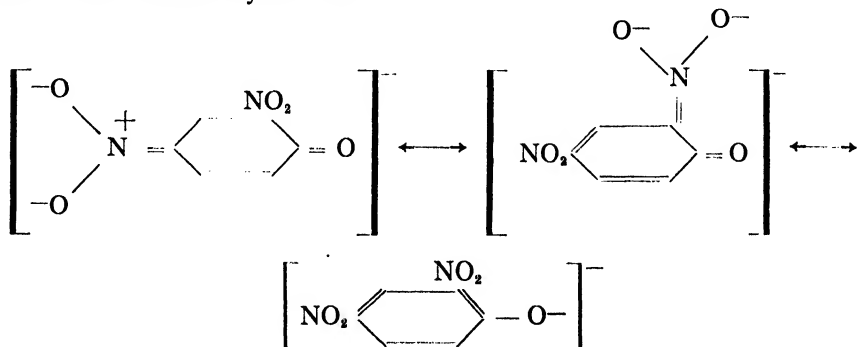
Hence there is a competition in the ion between two efforts both of which are trying to stabilize the quinoid structures of the molecule. This competition, which may be regarded as a certain type of cross-conjugation, ought to shift the absorption maximum towards shorter wavelengths in comparison with that of the addition product of the parent compound *m*-dinitrobenzene and also to decrease the height of the maximum. In table 7 measurements are given of a number of addition compounds of 2,4-dinitrobenzenes substituted in position 1 by an electron donating group. The expected blue shift and the decrease in the height of the maxima are in the main confirmed. The general appearance of the spectral absorption curves is the same as of those reproduced in fig. 4.

Table 7. Absorption maxima of the addition compounds obtained from 2,4-dinitrobenzene derivatives (which in position 1 contain an electron donating group) and acetone in alkaline solution.

Addition compound obtained from	λ max. $m\mu$	ϵ
1,3-dinitrobenzene (parent compound)	559	23100
2,4-dinitrophenol	415	16450
2,4-dinitrophenyl acetate	415	14700
2,4-dinitroanisole	550	12310
2,4-dinitrodiphenylether	561	13830
2,4-dinitroaniline	525	13270
2,4-dinitroacetanilide	425	22150
N-(2,4-dinitrophenyl)piperidine	565	13360
2,4-dinitrodiphenylamine	432	16550
2,4-dinitrophenylhydrazine	568	4235
acetophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone	490	28600
2,4-dinitrochlorobenzene	545	21650

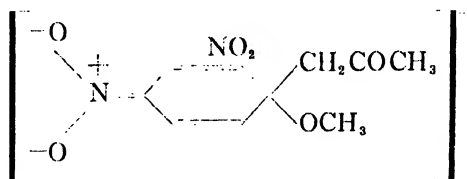
The coloured ions were obtained by the method described for the alkyldinitrobenzenes. Contrary to the behaviour of those ions, these addition compounds reached their maximum absorption values in a few minutes and the colours were stable for a relatively long period of time. Owing to the different mobility of the unshared electron pairs of the oxygen, nitrogen and halogen atoms, the differences in the stabilizations gained from the addition of the acetone ion are marked. Hence the absorption spectra differ somewhat in shape according to the type of substituent present.

The hydroxyl group has the greatest influence. In alkaline solution the nitro body is present as a phenolate ion and the structures which are contributing most to the resonance hybrid are:—

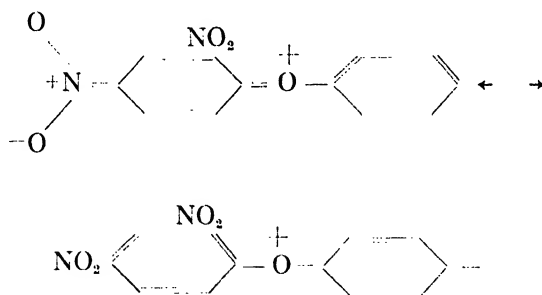


In fact, the influence of the phenolic hydroxyl is so great that the positions of the absorption band are identical in 2 normal sodium hydroxide solution and in the acetic solution prepared in the usual way. No addition of the acetone ion seems to occur. Acetylation of the hydroxyl group does not change the course of the reaction as 2,4-dinitrophenyl acetate has the same absorption spectrum in 2 normal sodium hydroxide solution as in acetic alkaline solution. Probably the acetyl group is immediately split off in the alkaline solution.

If, however, the phenolic hydroxyl group is alkylated an addition product is obtained. With 2,4-dinitroanisole the structure

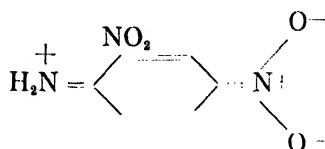


is the most probable one. The absorption maximum is only shifted $9\text{ m}\mu$ towards shorter wavelengths in comparison with the absorption maximum of the ion obtained from *m*-dinitrobenzene. The intensity is, however, decreased a little. With 2,4-dinitrodiphenylether the same addition occurs and structures like:—

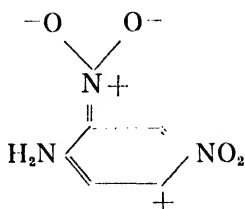


are probably of minor importance in their effects when contrasted with the corresponding diphenylamine derivative.

At 2,4-dinitroaniline there is a competition between quinoid structures like:—



which do not promote the formation of an addition product with the acetone ion, and structures like:—



which are necessary for securing the reaction with acetone. The first structure seems to be chiefly responsible for the colour formation. This is clear from the fact that the aniline compound has λ max. at 525 $m\mu$, whilst N-(2,4-dinitrophenyl)-piperidine has λ max. at 565 $m\mu$, which is close to λ max. for the *m*-dinitrobenzene addition compound. In the piperidine derivative the large piperidine nucleus cannot be coplanar with the benzene ring and hence structures of the type:—

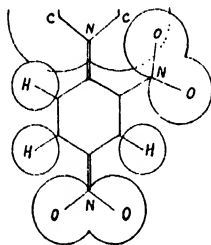
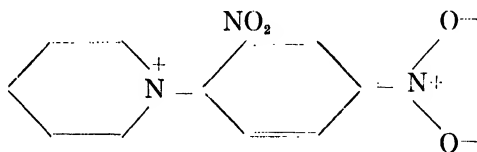
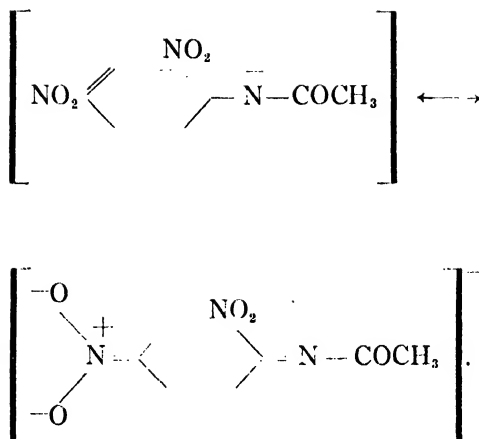


Figure 6. *N*-(2,4-dinitrophenyl)-piperidine.

are impossible. That the steric inhibition of the resonance exists is clear from figure 6.¹ The formation of the usual addition product is, however, possible as the piperidine nucleus can easily take a more or less perpendicular position against the benzene ring. SPITZER and WHELAND (8) have pointed out analogous effects in the reaction between nitro and cyano aryl bromides and piperidine. The proof, however, was not complete.

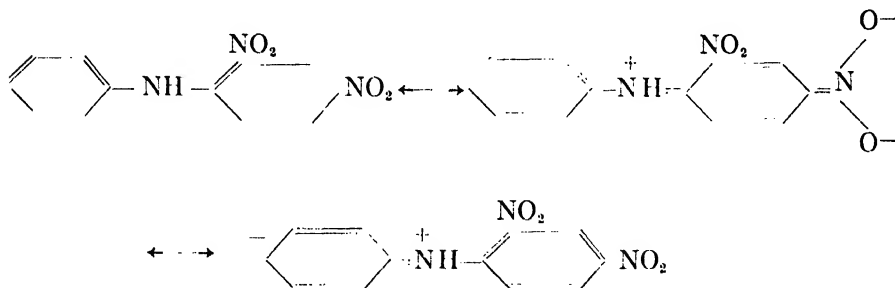
If the amino group in 2,4-dinitroaniline is acetylated the problem is still further complicated by the fact that 2,4-dinitroacetanilide is an acid. In the acetone phase an ion is certainly formed with the resonance structures:—

¹ Polarographic studies on 2,4-dinitroaniline and N-(2,4-dinitrophenyl)-piperidine have indicated the presence of a certain strain in the latter molecule (31).



The observed λ max. = 425 $m\mu$ is close to that of 2,4-dinitrophenol. In 0.1 normal sodium hydroxide solution 2,4-dinitroacetanilide has λ max. = 347 $m\mu$ and ϵ = 9700.¹

If a benzene ring is substituted for an amino hydrogen in 2,4-dinitroaniline the resonance with the new ring is so strong that the formation of an addition compound with the acetone ion is prevented. The structures contributing most seem to be:—

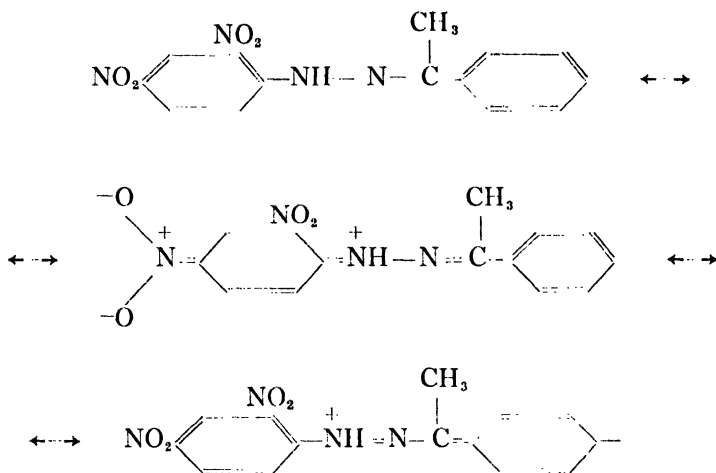


Both λ max. and ϵ are close to those of 2,4-dinitrophenol. A further proof that no addition compound is formed is that 2,4-dinitrodiphenylamine has an almost identical spectrum in 0.1 n sodium hydroxide solution as in the alkaline acetone solution.

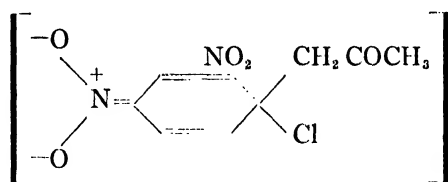
2,4-Dinitrophenylhydrazine has λ max. = 568 $m\mu$ and ϵ = 4235. Here an addition product is certainly formed as 2,4-dinitrophenylhydrazine in 0.1 normal

¹ In a rough spectrophotometric determination of the dissociation constant of 2,4-dinitroacetanilide (the measurements made on alkaline, neutral and acid aqueous solutions) pK_a was calculated to be about 8. This value is, however, very uncertain as the compound is broken down by alkali.

sodium hydroxide solution has λ max. = 384 $m\mu$ and $\epsilon = 2710$. As might be expected the acetophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone does not add the acetone ion as λ max. = 490 $m\mu$ and $\epsilon = 28600$ which values are close to those in 1 normal sodium hydroxide ethanolic (95 %) solution, λ max. = 455 $m\mu$, $\epsilon = 17400$; compare (9). In the hydrazone the following structures contribute most:—

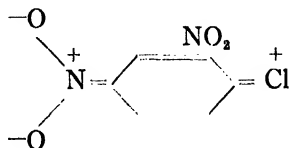


With 2,4-dinitrochlorobenzene the following ion is produced:—

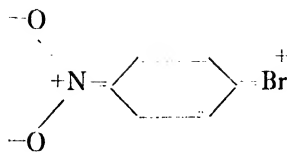


which is ascertained by the fact that when the coloured solution is acidified the presence of chloride ions can be shown. It has, however, not been possible to isolate either 2,4-dinitrophenylacetone or 2,4-dinitrophenylisopropenylether, see (10).

As is well known, a halogen atom has very little tendency to get positively charged and structures like:—



seem to contribute only in very small amounts. For instance, the dipole moment of *p*-nitrochlorobenzene requires only small contributions from the analogous structure:—

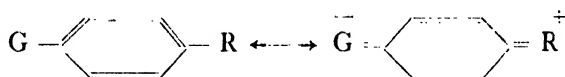


to be explained (11).

A small displacement of the absorption maximum is, however, noticeable but the intensity of the band is almost identical with that of the *m*-dinitrobenzene-acetone ion.

3. The influence of a side chain containing an electron accepting group.

When a substituted aryl ring is bonded in *para* position to a group G that has a lack of electrons the chief resonance forms are:—



How this resonance would operate upon the formation of the quinoid ion stabilized by the addition of acetone is hard to predict.

Table 8.

Addition compound obtained from	λ max. $m\mu$	ϵ
2,4-dinitrobenzoic acid	—	—
methyl 2,4-dinitrobenzoate	567	10900
3,5-dinitrobenzoic acid	563	500
<i>n</i> -propyl 3,5-dinitrobenzoate	565	10620
diethylaminoethyl 3,5-dinitrobenzoate hydrochloride	565	10600
2,4-dinitrophenylpyridinium chloride	(—)	(—)

In table 8 are given the results of measurements on *m*-dinitrobenzene derivatives which are bonded to an electron accepting group. A free carboxyl group in position 1 has a very strong inhibiting effect on the addition of the acetone ion. This effect cannot be due solely to the fact that most of the acid remains in the aqueous layer as 3,5-dinitrobenzoic acid gives a normal reaction. The absorption intensity of the addition product of the latter acid is, however, as might be expected, very small, $\epsilon = 500$ (calculated on the total amount of acid present). The esters of both acids give normal addition products and the λ max. are close to that of *m*-dinitrobenzene. ϵ is, however, only about 11000.

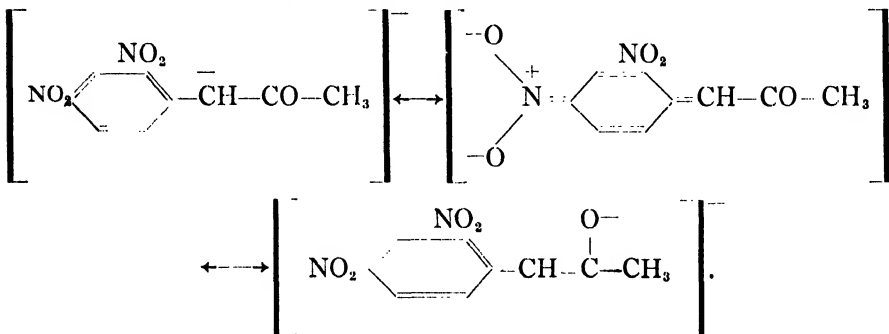
I have not had the opportunity to investigate compounds with other electron accepting groups like $-\text{NO}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, $-\text{B}(\text{OH})_2$ or $-\text{CN}$. Such compounds are difficult to prepare and instable. With 2,4-dinitrophenylpyridinium chloride a strong colour is obtained, but this colour is due to the formation of a glutaconaldehyde derivative in the alkaline solution.

More interesting are those compounds which have a carboxyl or carbonyl group insulated from the benzene nucleus by a methylene group. Measurements on some such derivatives are given in table 9.

Table 9. Absorption characteristics in alkaline acetone solution of some compounds having the common structure $2,4-(NO_2)_2C_6H_3CHR_1COR_2$.

Compound	λ max. $m\mu$	ϵ
2,4-dinitrophenylacetic acid	576	7330
methyl 2,4-dinitrophenylacetate	579	11300
2,4-dinitrophenylacetone	490	32000
ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate	511	11250
ethyl <i>bis</i> -(2,4-dinitrophenyl)acetate	580	22400

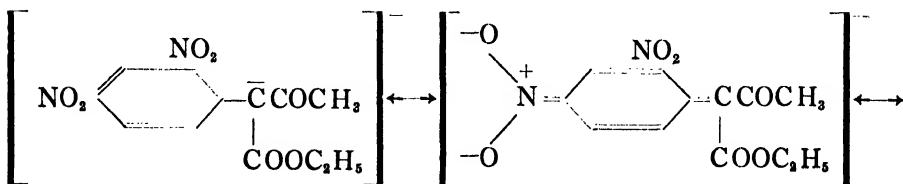
These compounds behave in quite a different way to the one previously discussed. An addition compound is certainly not formed as the absorption characteristics are the same both in alkaline acetone solution and in 1 normal sodium hydroxide solution. Instead, one of the hydrogen atoms in the methylene group dissociates and the structures which contribute to the formation of the highly coloured resonance hybrid are of the following type:—

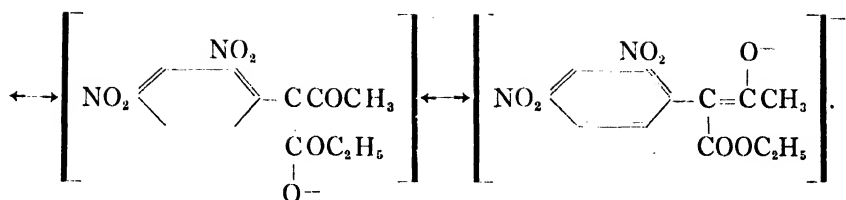


The increasing number of groups, which enhance the resonance in 2,4-dinitrophenylacetone, ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate, 2,4-dinitrophenylacetic acid and its ester and ethyl *bis*-(2,4-dinitrophenyl)acetate, displace the absorption maxima towards longer wavelengths in the same sequence.

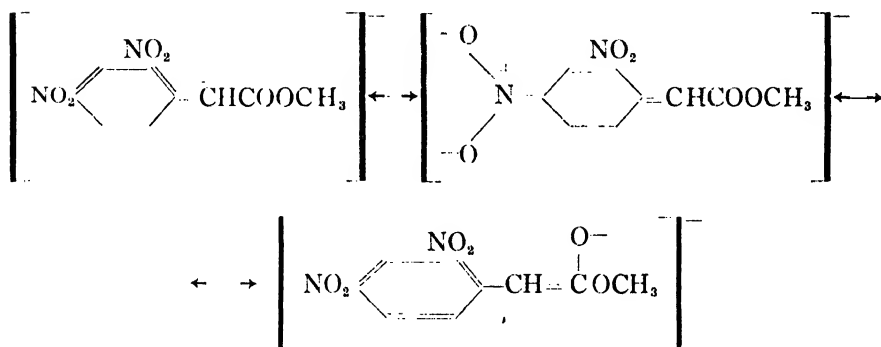
As early as 1888 v. RICHTER (12) observed and gave the correct explanation of the blue colour of ethyl *bis*-(2,4-dinitrophenyl)acetate in alkaline solution. Recently this compound has been proposed as an acidimetric indicator with the interval pH 7.5—9.1 (13).

The reason why ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate absorbs at shorter wavelengths than methyl 2,4-dinitrophenylacetate is that a high degree of cross-conjugation is present:—

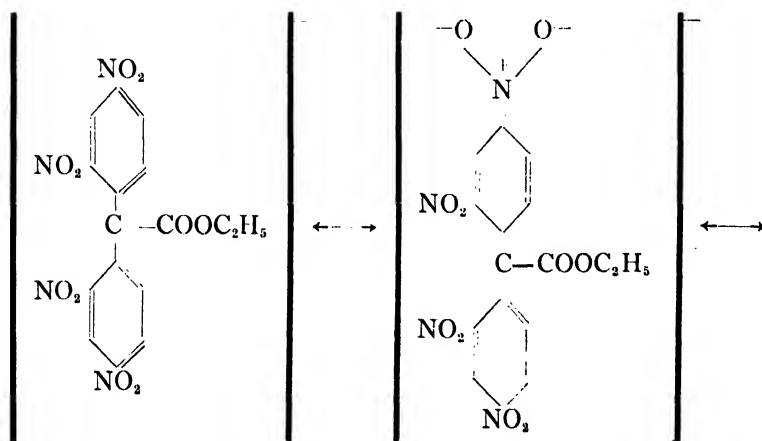


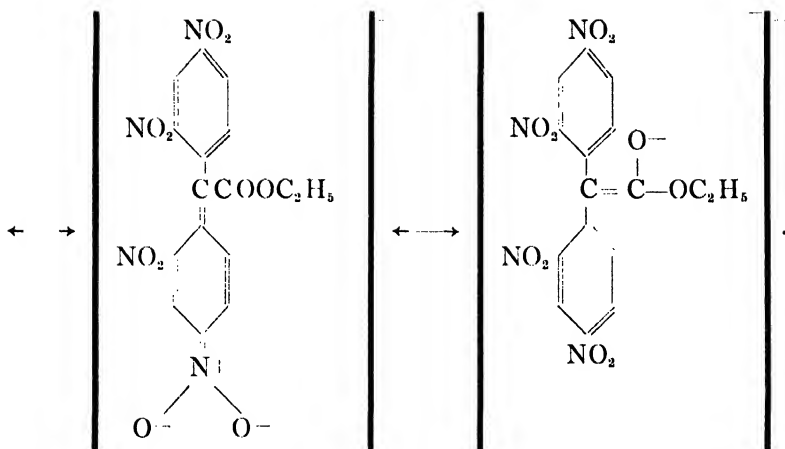


In methyl 2,4-dinitrophenylacetate the contributing structures are:—



and thus here the favourable quinoidal structures contribute more to the resonance hybrid than in the 2,4-dinitrophenylacetoacetate ester. In ethyl bis-(2,4-dinitrophenyl)acetate only a very small degree of cross-conjugation is present:—





In fact, ethyl *bis*-(2,4-dinitrophenyl)acetate is comparable with the triphenylmethane dyes.

SUMMARY

The UV spectra of seven alkyl derivatives of *m*-dinitrobenzene have been measured and discussed.

The difference in behaviour of twenty-nine derivatives of *m*-dinitrobenzene in the reaction with acetone in alkaline solution has been investigated by photometric methods and explained on the basis of the modern concept of light absorption by organic molecules.

EXPERIMENTAL

All melting points were determined on the Koffler block and corrected. Boiling points were not corrected. Absorption spectra were determined on a Beckman quartz spectrophotometer model DU using 1 \pm 0.002 cm. quartz cells. A hydrogen lamp or a tungsten filament was used as a source of light. The spectra of the addition products have been obtained as described in a previous paper (1) with the exceptions mentioned in the text. When the measurements were made on aqueous alkaline solutions the nitro body was dissolved in ethanol and an aliquot (usually a few millilitres) diluted to the desired concentration with sodium hydroxide solution.

Acetone, ethanol, 1,3-dinitrobenzene, 2,4-dinitrotoluene, 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene and dinitromesitylene were the same or of the same purity as described in a previous paper (1).

Pentane, obtained from Merck, Elberfeldt, without noticeable absorption in 1 cm. cells to 212 $m\mu$.

2,4-Dinitroethylbenzene was prepared according to BORSCHÉ's method (14). Ten gm. of fresh distilled ethylbenzene, b.p. 135°—136°, were dissolved in 36 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84. To this solution was added in small portions a

mixture of 9 ml. of nitric acid, sp.gr. 1.52, and 18 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84, while the temperature was held just below 70°. Then the mixture was heated on the waterbath for three hours, cooled and put on 1 kg. of crushed ice. The oily layer was extracted with benzene and the benzene solution washed with saturated sodium carbonate solution and water until the washwater was neutral. The benzene solution was dried over anhydrous sodium sulphate and the benzene removed *in vacuo*. The 2,4-dinitroethylbenzene was fractionated and the fraction boiling at 167°—169°/9 mm. was collected and redistilled. B.p. 176°—177°/17 mm. $n_D^{20} = 1.5650$. BORSCHÉ gives b.p. 168°—171°/11 mm. The 2,4-dinitroethylbenzene is very sensitive to oxygen and light and must be distilled immediately before use. Even when 2,4-dinitroethylbenzene is kept in amber coloured ampoules under nitrogen, deterioration takes place fairly rapidly.

2,4-Dinitro-*t*-butylbenzene was prepared according to DU TOIT MALHERBE'S method (15). Four gm. of fresh distilled *t*-butylbenzene, b.p. 166°—172°, were added dropwise to an icecooled mixture of 8 gm. of nitric acid, sp.gr. 1.52, and 12 gm. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84. The mixture was then held at 55°—60° for five hours, cooled and put on 500 gm. of crushed ice. The next day the nitro compound was extracted with ether, and the ether solution washed first with a 20 per cent sodium carbonate solution to remove most of the trinitro compound that had formed and then with water until the washwater was neutral. The ether phase was dried over anhydrous sodium sulphate and the ether removed *in vacuo*. The residue was fractionated and the fraction boiling at 176°—179°/9 mm. was collected. This fraction was cooled and the crystals sucked off. After three recrystallizations from 95 per cent ethanol, m.p. 61°—62° and b.p. 178°—179°/9 mm. DU TOIT MALHERBE reports b.p. 185°/15 mm. and m.p. 61°—62°. Like 2,4-dinitroethylbenzene 2,4-dinitro-*t*-butylbenzene is very sensitive to oxygen and light and must be distilled immediately before use.

2,4-Dinitrostilbene was prepared according to THIELE'S and ESCALES' method (16). 2.7 gm. of 2,4-dinitrotoluene, 1.8 gm. of fresh distilled benzaldehyde and 3 drops of piperidine were heated for five minutes in an oil bath at 170°. The melt was then held at 130°—140° for two hours. After cooling the melt was dissolved in 10 ml. of boiling glacial acetic acid, the solution cooled to room temperature and the crystals sucked off. After three recrystallizations from 95 per cent ethanol, m.p. 140°—141°. THIELE and ESCALES report 139°—140°. The compound was kept in the dark to avoid transformation to the low melting form.

2,4-Dinitrophenol, "indicator substance" obtained from Merck, Darmstadt. Recrystallized from 95 per cent ethanol, m.p. 114°—115°.

2,4-Dinitrophenyl acetate was prepared from 2,4 dinitrophenol and acetic anhydride. M.p. 71.5°—72.0°. BLANKSMA reports 72° (17).

2,4-Dinitroanisole was prepared according to HOLLEMAN'S and WILHELMY'S method (18). 10.1 gm. of 2,4-dinitrochlorobenzene were dissolved in 50 ml. of hot absolute methanol and a solution of 3.5 gm. of KOH (Ph. Succ. XI) in 5 gm. of water was added. The mixture was refluxed for 30 minutes, cooled to room temperature and a few millilitres of diluted hydrochloric acid were added. The deposited crystals were sucked off, dried and recrystallized from 50 per

cent methanol, m.p. 86° — 87° . This is the labile form of the compound, for further information about the dimorphism see V. ALPHEN (19).

2,4-Dinitrodiphenylether was prepared in the usual way from 2,4-dinitrochlorobenzene and phenol, m.p. 70° — 71° .

2,4-Dinitroaniline, "laboratory reagent" obtained from the British Drug Houses. Recrystallized three times from acetone + water, m.p. 179° — 180° .

N-(2,4-dinitrophenyl)-piperidine was prepared in the following way. 2.03 gm. of 2,4-dinitrochlorobenzene were dissolved in 5 ml. of benzene and 1.70 gm. of fresh distilled piperidine added. The mixture was heated to reflux for two hours. Then the piperidine hydrochloride was filtered off and washed with benzene. The benzene was removed *in vacuo* and the residue recrystallized three times from 95 per cent ethanol, m.p. 91.5° — 92.0° . LELLMANN and GELLER (20) report 92° .

2,4-Dinitrophenylpyridinium chloride was prepared by refluxing for two hours equimolecular weights of 2,4-dinitrochlorobenzene and pyridine in benzene solution. The precipitate was sucked off, washed with ether and dried. The compound was dissolved in 95 % ethanol and precipitated with ether. M.p. 200° (decomp.).

2,4-Dinitroacetanilide was prepared by heating 5 gm. of 2,4-dinitroaniline and 5 ml. of acetic anhydride to reflux for one hour. Then 200 ml. of water were added and after a few hours the precipitate was sucked off and recrystallized twice from 95 per cent ethanol. M.p. 119° — 120° . BORSCHÉ (21) reports 121° .

2,4-Dinitrodiphenylamine was prepared according to UHLMANN's method (22). Five gm. of 2,4-dinitrochlorobenzene, 5 gm. of crystalline sodium acetate, 2.5 gm. of fresh distilled aniline and 35 ml. of absolute ethanol were heated to reflux for two hours. Then 25 ml. of absolute ethanol were added and after cooling to room temperature the crystals were sucked off and washed with absolute ethanol. After three recrystallizations from absolute ethanol, m.p. 158.0° — 158.5° . UHLMANN (22) reports 159° .

2,4-Dinitrophenylhydrazine, commercial product from Schuchardt, Görlitz. Recrystallized from dioxane, m.p. 190° — 192° (decomp.).

Acetophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone was prepared in the usual way, m.p. 240° .

2,4-Dinitrochlorobenzene, "analytical reagent" from Schering-Kahlbaum. Recrystallized from ethyl acetate, m.p. 51.5° — 52.0° .

2,4-Dinitrobenzoic acid was prepared from 2,4-dinitrotoluol in the following way, cf. CURTIUS and BOLLENBACH (23). Ten gm. of 2,4-dinitrotoluene were dissolved in 60 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84, and 10 gm. of finely powdered chromic acid were added while stirring. The temperature was held at about 60° . The stirring was continued for 12 hours and then the mixture was put on 500 ml. of crushed ice. The precipitate was sucked off and washed with cooled water. After drying the crude product was sublimated at 150° . M.p. 180° — 181° .

Methyl 2,4-dinitrobenzoate was prepared in the usual way from 2,4-dinitrobenzoic acid and absolute methanol. Recrystallized from 60 per cent methanol, m.p. 70° — 71° . HAEUSERMANN and TEICHMANN (24) report 70° .

3,5-Dinitrobenzoic acid, laboratory reagent. When recrystallized from ethyl acetate, m.p. 205° — 207° .

n-Propyl 3,5-dinitrobenzoate was prepared from *n*-propylalcohol and 3,5-dinitrobenzoyl chloride. M.p. 73.5°—74.5°.

Diethylaminoethyl 3,5-dinitrobenzoate hydrochloride was prepared from diethylaminoethanol and 3,5-dinitrobenzoyl chloride. 2.3 gm. of 3,5-dinitrobenzoyl chloride were dissolved in 30 ml. of chlorobenzene and a solution of 1.17 gm. of diethylaminoethanol in 20 ml. of chlorobenzene was added. The solution was refluxed for twenty minutes and was then cooled to room temperature. The crystals were sucked off and recrystallized from ethyl acetate (charcoal). M.p. 125.0°—125.5°. Cl_{calc.} 10.20, found 10.22 per cent.

2,4-Dinitrophenylacetic acid was prepared according to BORSCHÉ's method (25). 11.2 gm. of phenylacetic acid were dissolved in 60 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84, and while cooling under the tap a mixture of 15 ml. of nitric acid, sp.gr. 1.52, and 30 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84, was added. The mixture was allowed to stand at room temperature until the next day and was then put on 400 ml. of crushed ice. The deposit was sucked off, washed with water and dissolved in dilute sodium hydroxide solution. This solution was immediately filtered and acidified with dilute hydrochloric acid. The crystals were sucked off and washed with water until the washwater was free from chloride ions. After recrystallization from hot water three times, m.p. 178°—180°. BORSCHÉ reports 179°—180°.

Methyl 2,4-dinitrophenylacetate was prepared from 2,4-dinitrophenylacetic acid and absolute methanol. The compound was recrystallized from 50 per cent methanol, m.p. 82°—83°. BORSCHÉ (26) reports 82°—83°.

Ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate was prepared according to BORSCHÉ's method (27). Thirty-seven gm. of fresh distilled ethyl acetoacetate were dissolved in 150 ml. of ether and 6.5 gm. of sodium were added. When the metal had reacted 28 gm. of 2,4-dinitrochlorobenzene dissolved in 100 ml. of ether were added. Then the mixture was heated to reflux for four hours. After cooling the mixture was shaken with water several times and then twice with 0.5 normal sodium hydroxide solution. The combined aqueous phases were acidified with nitric acid when an oily layer was deposited. The oil was separated, cooled and scratched whereupon crystals separated out. After repeated recrystallizations from 95 per cent ethanol, m.p. 94.0°—94.5°. HECKMANN (28) reports m.p. 94°.

2,4-Dinitrophenylacetone was prepared according to BORSCHÉ's method (29). Ten gm. of ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate were dissolved in 72 ml. of sulphuric acid, sp.gr. 1.84, and 24 ml. of water were added. When the gas evolution ceased the mixture was put on 400 ml. of crushed ice. The next day the deposit was sucked off, washed with water and dried. After repeated recrystallizations from 50 per cent ethanol, m.p. 73.5°—74.0°. BORSCHÉ reports 75° and NEBER, HARTUNG and RUOPP (30) 75°.

Ethyl bis-(2,4-dinitrophenyl)acetate was prepared in the main according to v. RICHTER's method (12). Three gm. of ethyl 2,4-dinitrophenylacetoacetate were dissolved in 100 ml. of a sodium ethoxide solution prepared from 0.23 gm. of sodium and 100 ml. of absolute ethanol. Then a solution of 2.00 gm. of 2,4-dinitrochlorobenzene in 100 ml. of absolute ethanol was added. The mixture was refluxed for three hours and then cooled to room temperature. After acidifying with diluted sulphuric acid 200 ml. of water were added and the mixture

was kept in a refrigerator over the night. A thick oil containing deposited crystals had separated out. The oily layer was separated and treated with ether whereupon it solidified. The crystals were sucked off and recrystallized twice from 95 per cent ethanol. M.p. 152° — 153° . v. RICHTER (12) reports 154° , FEHNEL and AMSTUTZ (13) 150.0° — 153.5° .

This investigation has been supported by a grant from *Statens medicinska forskningsråd* which is here gratefully acknowledged.

REFERENCES:

1. CANBÄCK: *Farm. Revy*, 48, 153 (1949).
2. BROWN and REAGAN: *J. Amer. Chem. Soc.*, 69, 1032 (1947).
- 3 a. BORSCHÉ: *Ann.* 386, 365 (1912).
- b. A. P. 2 140509 sec C. 1939 I 2251.
STERLING and BOGERT: *J. Org. Chem.*, 4, 20 (1939).
NEWTON: *J. Amer. Chem. Soc.*, 65, 2434 (1943).
DOUMANI and KOBE: *J. Org. Chem.*, 7, 1 (1942).
4. LUNDGREN and CANBÄCK: *Svensk Farm. Tidskr.*, 52, 398 (1948).
5. PAULING and WHELAND: *J. Chem. Phys.*, 1, 362 (1933).
- 6 a. A short discussion on the subject is given by WHELAND in *The Theory of Resonance and its Application to Organic Chemistry*, Sec. 6.4, N. Y. 1944.
- b. REMINGTON: *J. Amer. Chem. Soc.*, 67, 1838 (1945).
7. JONES: *J. Amer. Chem. Soc.*, 67, 2140 (1945).
8. SPITZER and WHELAND: *J. Amer. Chem. Soc.*, 62, 2995 (1940).
9. ROBERTS and GREEN: *J. Amer. Chem. Soc.*, 68, 214 (1946).
10. CANBÄCK: *Svensk Farm. Tidskr.*, 53, 151 (1949).
11. See ref. 6a p. 133 and 268 for a discussion of the corresponding chloro compound.
12. v. RICHTER: *Ber.*, 21, 2470, 2475 (1888).
13. FEHNEL and AMSTUTZ: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16, 53 (1944).
14. BORSCHÉ: *Ann.* 386, 365 (1912).
15. DU TOIT MALHERBE: *Ber.*, 52, 319 (1919).
16. THIELE and ESCALES: *Ber.*, 34, 2843 (1901).
17. BLANKSMA: *Chem. Weekbl.*, 6, 717 through C. 1909 II 1220.
18. HOLLEMAN and WILHELMY: *Rec.*, 21, 439 (1902).
19. v. ALPHEN: *Ber.*, 63, 94 (1930).
20. LELLMANN and GELLER: *Ber.*, 21, 2283 (1888).
21. BORSCHÉ: *Ber.*, 50, 1355 (1917).
22. UHLMANN: *Ann.*, 332, 98 (1904).
23. CURTIUS and BOLLENBACH: *J. prakt. Chem.*, (2), 76, 287 (1907).
24. HAEUSERMANN and TEICHMANN: *J. prakt. Chem.*, (2), 52, 428 (1895).
25. BORSCHÉ: *Ber.*, 42, 1313 (1909).
26. BORSCHÉ: *Ber.*, 42, 1314 (1909).
27. BORSCHÉ: *Ber.*, 42, 601 (1909).
28. HECKMANN: *Ann.*, 220, 131 (1883).
29. BORSCHÉ: *Ber.*, 42, 606 (1909).
30. NEBER, HARTUNG and RUOPP: *Ber.*, 58, 1244 (1925).
31. CANBÄCK: Unpublished investigation.

Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds and Active Methylene Groups. XVI. The Mechanism of Neutralization of Meta Dinitrobenzene Derivatives by Aliphatic Amines at -72°C

TEODOR CANBÄCK

Apotekens Kontrollaboratorium, Stockholm, Sweden

Reprinted from

ACTA CHEMICA SCANDINAVICA 3 (1949) 946—953

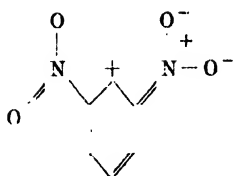
Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds and Active Methylene Groups. XVI. The Mechanism of Neutralization of *Meta* Dinitrobenzene Derivatives by Aliphatic Amines at -72°C

TEODOR CANBÄCK

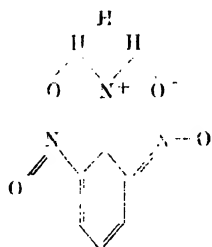
Apotekens Kontrolllaboratorium, Stockholm. Sweden

In a very interesting paper, Lewis and Seaborg¹ some years ago discussed the acidity of some aromatic nitro compounds towards amines at low temperatures. They investigated whether or not trinitrobenzene, in petroleum ether solution, was neutralized by ammonia, methylamine, dimethylamine and triethylamine, and found that trinitrobenzene only gave a slight colour with triethylamine but an intense crimson colour with the weaker base ammonia. The selective light absorption is due to a quinoid structure of the nitro compound stabilized by the addition of the amine. Even more remarkable, however, was that *meta* dinitrobenzene, the ionization constant of which in aqueous solution could not be greater than 10^{-17} , in petroleum ether solution was neutralized by ammonia and methylamine, while the stronger bases dimethylamine and triethylamine were without noticeable effect.

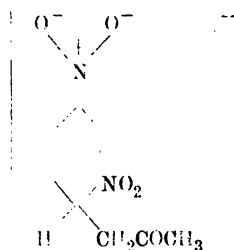
To explain this phenomenon Lewis and Seaborg assume the presence of a double chelation. The energy gained from the double chelation is then responsible for the attachment of ammonia and methylamine to the benzene ring, while dimethylamine, where only a single chelation is possible, and triethylamine, where no chelation is possible, are not attached. A condition precedent for this theory is that in the *meta* dinitrobenzene derivatives the carbon atom between the nitro groups is lacking in electrons, or, otherwise expressed, that an *ortho* quinoid resonance form:



dominates during the neutralization. They write the formula for the double chelation in the following way:



The investigations previously reported in this series ^{2, 3} have given evidence that the most important resonance form of the addition compound between *meta* dinitrobenzene and acetone in alkaline solution may be expressed by the formula:



This compound is an anion in which the benzene ring has a quinoid structure, and the acetone ion is assumed to be attached *ortho* respectively *para* to the two nitro groups.

The formula given by Lewis and Seaborg for the addition product between aromatic nitro compounds and amines thus does not agree with my formulation of the addition product between aromatic nitro compounds and acetone in alkaline solution. Although the experimental conditions are quite different — chelation is, for instance, impossible when the acetone anion is attached — and therefore *a priori* it is not necessary to assume the same mechanism for the addition of the different nucleophilic reagents (the weak nucleophilic amines and the strong nucleophilic acetone ion) to the ring, it was of interest to extend Lewis' and Seaborg's investigations to the *meta*

dinitrobenzene series in the hope of determining where the attachment of the amines actually takes place.

These experiments were performed at -71 to -73°C (ethanol + solid CO_2). Lewis and Seaborg do not report at what temperature they were working.

Skellysolve B was used as a solvent. The results are given in Table 1. Table 2 gives the results of Lewis' and Seaborg's measurements. In Table 1 are also included λ max. and ϵ max. in ultra violet (pentane), taken from Canbäck³. The measurements of 2,6-dinitrotoluene are new. See Fig. 1.

Table 1. Colour intensities produced on mixing different amines with *m*-dinitrobenzene derivatives in petroleum ether solution at -72°C . Included are the UV absorption characteristics of the nitro bodies in pentane at $+20^{\circ}\text{C}$.

	1,3-Dinitro- benzene	2,4-Dinitro- toluene	2,6-Dinitro- toluene	4,6-Dinitro- 1,3-dimethyl- benzene	Dinitro- mesitylene
Benzylamine	+++	++	—	—	—
Dimethylamine	++	++	—	—	—
Piperidine	+	+	—	—	—
Triethylamine	—	—	—	—	—
N-Ethylpiperidine	—	—	—	—	—
Quinine	—	—	—	—	—
Hexamethylene- tetramine	—	—	—	—	—
ϵ max.	21000	15900	12000	15100	3900 *
λ max. $m\mu$	227	232	227	243	238

* Inflexion point.

In Table 1 the approximative strengths of the colours are indicated by the number of +. *Meta* dinitrobenzene gave a clear crimson and 2,4-dinitrotoluene a blue-reddish colour.

As seen in Table 1, the same tendency is found in the *meta* dinitrobenzene series as Lewis and Seaborg observed. However, Lewis' and Seaborg's statement that *meta* dinitrobenzene does not give a colour with secondary amines must be corrected. At -71 to -73°C dimethylamine, as well as piperidine, gave bright colours, *e. g.* the amines did neutralize the nitro compound. Similarly 2,4-dinitrotoluene was neutralized by primary as well as by secondary amines. 2,6-Dinitrotoluene, dinitroxyline and dinitromesitylene were not noticeably influenced by any of the amines.

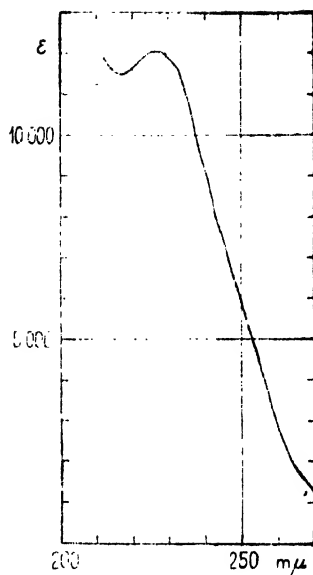


Fig. 1. Ultra-violet spectrum of 2,6 dinitrotoluene in petroleum ether.

Table 2. Colour production on mixing several bases with nitro compounds according to Lewis and Seaborg.

	1,3-Dinitrobenzene	1,3,5-Tri-nitrobenzene	2,4,6-Tri-nitrotoluene	2,4,6-Tri-nitroxylyene	Trinitro-mesitylene
Ammonia	+	+	+	+	+
Methylamine	+	+	+	+	+
Dimethylamine	-	+	+	-	-
Triethylamine	-	+	+	-	-

Thus in principle Lewis' and Seaborg's statement, that *meta* dinitrobenzene is neutralized only when a double chelation is possible, is not true. The following description of the phenomenon might be more correct.

The amines in petroleum ether solution are such weak nucleophilic reagents that at the temperatures at which Lewis and Seaborg worked neutralization of *meta* dinitrobenzene only occurs when a double chelation is possible. At -72°C , however, the energy gained from a simple chelation is great enough to allow even secondary amines to be attached to the ring and thus to stabilize a quinoid form of the nitro compound.

The nitrogen atom in triethylamine is known¹⁴ to be blocked by the bulky ethyl groups. To test if the phenomenon could possibly be explained by the

steric hindrance in the amine, quinine and hexamethylenetetramine were investigated. The nitrogen atom in the quinuclidine nucleus is not hindered. As seen in Table 1, neither quinine nor hexamethylenetetramine was neutralized by *meta* dinitrobenzene, indicating that the steric hindrance in triethylamine was not responsible for the failure of the reaction.

The attachment of the amines might occur at the carbon atom between the nitro groups since a positive reaction is obtained with 2,4-dinitrotoluene but not with 2,6-dinitrotoluene.

However, it is not absolutely certain that the attachment of the amines takes place in this position as 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene, although sterically hindered but still capable of adding anions³, gives a negative reaction even though the carbon atom between the nitro groups is unsubstituted. The fact that Lewis and Seaborg obtained a positive reaction with 2,4,6-trinitroxylyene is explained by the presence of a nitro group *para* to the unsubstituted ring carbon atom. The latter compound is therefore much more acid than 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene. It may also be that the small steric hindrance (see below) present in 2,6-dinitrotoluene (with both nitro groups hindered contrary to 2,4-dinitrotoluene in which only one nitro group is hindered) is sufficient to counteract the energy gained from a simple chelation even at -72° , *e. g.* if the attachment takes place in the position *ortho* — *para* to the nitro groups. Additional support of this theory is found in the investigations performed by Field, Garner and Smith⁴ and Garner and Gillbe⁵ on the ionization of aromatic nitro compounds in liquid ammonia. From their results it will only be mentioned here that conductimetric as well as photometric measurements showed that 1,3-dinitrobenzene, 2,4-, 3,5-, and 2,6-dinitrotoluene behaved in the same manner, while 1,4-, and 1,2-dinitrobenzene as well as 2,5-, 2,3-, and 3,4-dinitrotoluene behaved in a different manner. Of special interest in this connection is that 1,3-dinitrobenzene, 2,4-, 3,5-, and 2,6-dinitrotoluene gave blue or violet coloured solutions in liquid ammonia while 2,5-, 2,3-, and 3,4-dinitrotoluene and 1,2-, and 1,4-dinitrobenzene gave yellow solutions. It is thus highly improbable that the attachment of the ammonia takes place on the carbon atom between the two nitro groups, which are in a *meta* position to each other.

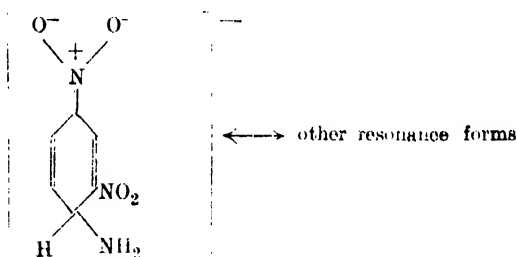
The molar extinction coefficient ϵ , as has been previously demonstrated³, is a very sensitive measurement of the steric hindrance in *meta* dinitrobenzene derivatives. From Table 1 it is apparent that 2,4-dinitrotoluene and 4,6-dinitro-1,3-dimethylbenzene are hindered to about the same extent, while dinitromesitylene is very strongly hindered. *Cf.* Canbäck³, Fig. 3.

2,6-Dinitrotoluene has λ max. = 227 μ and ϵ = 12000 in petroleum ether. In agreement with the theory previously advocated³, the methyl group in the

joint *ortho* position has no influence on λ max. in comparison with the parent compound *meta* dinitrobenzene. The latter compound has also λ max. = 227 $m\mu$. ϵ for 2,6-dinitrotoluene may be considered to be twice that of *ortho* nitrotoluene³, which according to Brown and Reagan⁶ is 5950. The calculated value is then 11900 and the observed value 12000. The steric hindrance in 2,6-dinitrotoluene is thus very small.

In the reaction between acetone and *meta* dinitrobenzene derivatives in alkaline solution, the attachment of the acetone anion seems to occur at the ring carbon atom that is *para* to one of the nitro groups. Additional support for this point of view is obtained from the fact that 2,6-dinitrotoluene gives a positive reaction with λ max. 550 $m\mu$ and ' ϵ ' = 1900 after 15 minutes. As in the case of the other sterically hindered alkyl *meta* dinitrobenzenes the colour developed slowly³.

Till now in this paper only the place of attachment of the amines on the benzene ring has been discussed. No standpoint has been taken on the question of whether or not the addition product formed is a neutral one, as Lewis and Seaborg suggest, or if an anion is formed by a reaction analogous to the reaction between *m*-dinitrobenzene and acetone in alkaline solution, *e. g.* if an ion of the following type is formed by the addition of an *amide* ion. The latter



formulation of the addition product appears to be true when the nitro bodies are dissolved in liquid ammonia. The different behaviour of the tertiary amines contrary to the primary and secondary ones observed in this investigation, is then easily explained by the fact that the former amines cannot dissociate according to the scheme $2 \text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{NH}_2^-$ and hence the strongly nucleophilic amide ion is not formed. With this latter formulation of the neutralization reaction, it is not necessary to use conceptions such as double chelation to give a reasonable explanation of the observed phenomena.

EXPERIMENTAL

Melting points were determined on the Kofler block and corrected. UV and spectra in the visible were determined on a Beckman Quartz spectrophotometer model DU using 1 cm quartz cells.

2,6-Dinitrotoluene. The compound was isolated chromatographically* from a mixture of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene obtained from Bofors Nobelkrut. M. p. 65.6–66.0°. Refractive index 1.5400 at 82–83° (Kofler¹⁰ gives 80–82°). Transition point of the instable and the stable form, 40° (Schaum⁷ gives 40.5°, and Kofler⁸ 36°). The instable form melted by rapid heating at 58° (Kofler¹⁰ gives 58°). The melting point, when mixed with 2,6-dinitrotoluene prepared from 2,4,6-trinitrotoluene by selective reduction and deamination according to Holleman and Böeseken⁹, was 65°.

Petroleum ether for UV measurements was prepared from Skellysolve B which was freed from aromatic compounds by the method given by Weissberger¹¹. B. p. 65–66°. Without noticeable absorption in 1 cm cells to 212 μ .

Benzylamine, b. p. 185°, *dimethylamine*, b. p. 7°, *piperidine*, b. p. 106°, and *triethylamine*, b. p. 90°, were commercial reagents. They were distilled immediately before use. *N-Ethylpiperidine*, *quinine* and *hexamethylenetetramine* were commercial products which were used without further purification. Other compounds and reagents were the same as used previously^{2, 3}.

The neutralization at –72° was tested in the following way. About 0.1 g of the nitro compound was dissolved in 25 ml Skellysolve B. To 5 ml of this solution was added 1 ml of the amine to be tested. The test tube was closed and placed for 30 minutes in an ethanol-solid CO₂ bath and the colour noted. The temperature varied between –71 and –73°. With some of the amines, parts of the solution sometimes solidified.

'e' was determined as described previously³.

Lepsius¹² has reported that 2,6-dinitrotoluene gives no colour with acetone and alkali. Rudolph¹³, on the contrary, reports a red colour that develops slowly.

SUMMARY

Contrary to the statement of Lewis and Seaborg, 1,3-dinitrobenzene in petroleum ether solution gives a distinct crimson colour when secondary amines are added to the solution if the temperature is approx. –70° C. Tertiary amines give no positive reaction.

Assuming the mechanism of neutralization proposed by Lewis and Seaborg, the place of attachment of the amine has been discussed. It has been shown that the most probable place is ortho respectively para to the two nitro groups.

It is mentioned that the mechanism of the neutralization is better understood if an amide ion is assumed to be the nucleophilic reagent operating in the reaction, *e. g.* that a coloured, complex organic anion is formed. A reasonable, simple structure for the resonating anion is suggested.

* On Superfiltral. Solvent Skellysolve B. Eluent 99 vol. Skellysolve B + 1 vol. acetone.

REFERENCES

1. Lewis, G. N., and Seaborg, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 2122, 3529.
2. Canbäck, T. *Farm. Revy* 48 (1949) 153.
3. Canbäck, T. *Farm. Revy* 48 (1949) 217.
4. Field, M. J., Garner, W. E., and Smith, C. C. *J. Chem. Soc.* (1925) 1227.
5. Garner, W. E., and Gillbe, H. F. *J. Chem. Soc.* (1928) 2883.
6. Brown, W. G., and Reagan, H. *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1032.
7. Schaum, K. *Ann.* 462 (1928) 194.
8. Kofler, L. *Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische.* Innsbruck (1948) p. 197.
9. Holleman, A. F., and Böeseken, J. *Rec. trav. chim.* 16 (1897) 425.
10. Ref. 8, p. 224.
11. Weissberger, A. *Physical methods of organic chemistry.* New York (1946) p. 767.
12. Lepsius *Chem. Zt.* 20 (1896) 839.
13. Rudolph, O. *Z. anal. Chem.* 60 (1921) 239.
14. Brown, H. O., and Eldred, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 445.

Received July 8, 1949.

The Reactivity of Methylene Groups in Their Reaction with *m*-Dinitrobenzene in Alkaline Solution.

XVII. *Studies on the Reaction between Aromatic Nitro Compounds
and Active Methylene Groups.*

By Teodor Canbäck.

(Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm.)

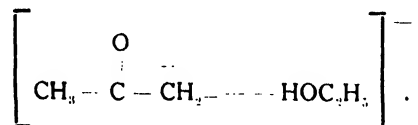
In previous contributions (1, 2) were discussed the variations of the absorption data of addition products of *m*-dinitrobenzene and acetone in alkaline acetonic solution when different substituents were introduced into the parent nitro compound, *m*-dinitrobenzene. It is much more difficult to form an opinion based on quantitative measurements of the effect on the reaction brought about by variations in the activation of the methylene group. In this paper an attempt will be made to give a theoretical interpretation of the observations made while working with some sixty methyl, methylene, and methinyl compounds activated by different groups.

The measurements were made in the following way. The methylene compound and an excess of *m*-dinitrobenzene were dissolved in ethanol (95 per cent). The solution was made alkaline by the addition of sodium hydroxide solution and the absorption band in the range 400—750 μ measured. The reaction is described as positive when a measurable colour was observed in this range.

Thus, in all cases the nitro compound was the same. Cf. (2) in which investigation the methylene compound always was acetone and the nitro body was varied. The molar extinction coefficient of the addition product was calculated on the basis of the amount of methylene compound present. The nitro compound was usually present in about a hundredfold molar excess.

To obtain comparable results the same solvent of polar character had to be used throughout. After trying methanol, ethanol, propanol-(2), propanol-(1), butanol-(1), pyridine, dioxan, nitrobenzene, chlorobenzene, chloroform and other solvents the measurements were taken in ethanolic solution. Ethanol was chosen because it had good solvent properties and could be mixed with a rather concentrated aqueous sodium hydroxide solution to give a clear solution. Unfortunately a displacement of the absorption band of the addition product of *m*-dinitrobenzene and acetone towards shorter wavelengths was noted when compared with the measurements made on alkaline acetic solutions. At the same time the intensity of the absorption was strongly decreased.

The decrease in the absorption intensity is almost certainly due to the stabilization of the anion of the methylene compound by combination with the solvent, the anion forming a hydrogen bond with the ethanol



The reactivity of the anion might thus be less in ethanolic than in acetic solution.

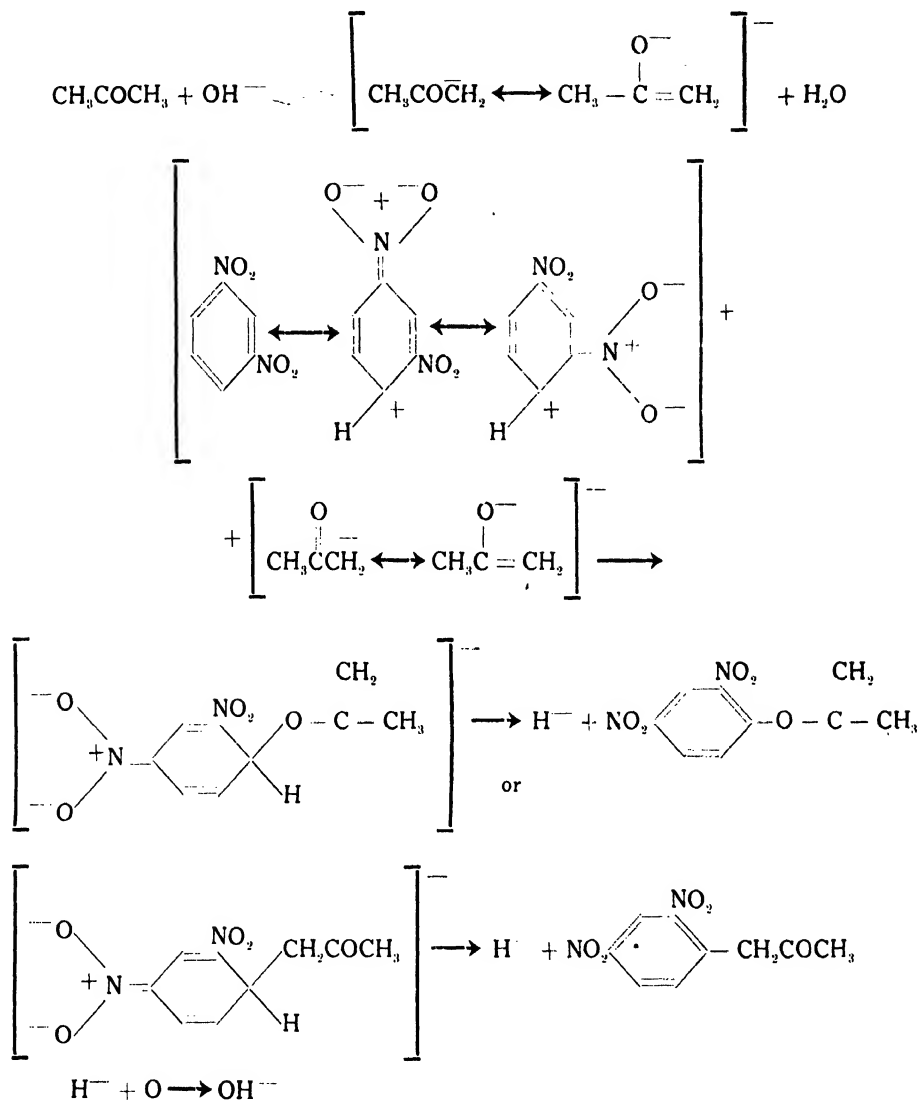
While λ max. of the addition product of *m*-dinitrobenzene and acetone in alkaline acetic solution is 559 m μ and $\epsilon = 23\,100$ (calculated on the basis of the amount of *m*-dinitrobenzene present) the corresponding values in ethanolic solution are only λ max. 510 m μ and $\epsilon = 570$ (calculated on the basis of the amount of acetone present). The displacement of the band amounts in this case to 50 m μ . Therefore the figures reported in this paper are not comparable with those in previous contributions (1, 2). In all the measurements taken Beer's law was fulfilled in the concentration ranges studied.

Discussion.

It is obvious from the measurements given in the tables below that the power to activate the methylene group so much that a positive reaction is obtained with *m*-dinitrobenzene in alkaline solution is not restricted to the grouping $-\text{CH}_2\text{CO}-$. Other groups, such as $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{NO}_2$ and $-\text{CH}_2\text{CH} = \text{CH}_2$, are on principle equally effective. It is also evident that a necessary condition for a positive reaction is that a methyl or methylene and not a methinyl group is present. Only those compounds containing a carbonyl group will be discussed in detail here.

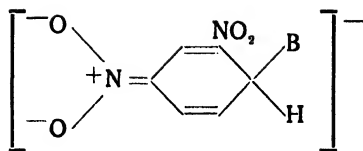
The same hypothesis of the course of the reaction as was used in previous

contributions (1, 2) will be used here. The principle is exemplified by the reaction between *m*-dinitrobenzene and acetone:

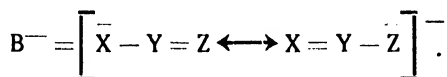


The over all base-catalysed reaction might thus be regarded as a substitution followed by an oxidation. However, all attempts to isolate 2,4-dinitrophenylacetone or 2,4-dinitrophenyl-*iso*-propenylether from the reaction mixture have been unsuccessful and the course of the reaction is not proved. The complex ion has been depicted as containing a simple —C—C— or —C—O— bond although in reality it is a bond between an anion and a dipole, cf. (1).

In what follows it is assumed that an anion of the type



is responsible for the light absorption in the visible. B^- is a base with a resonance system of the triad type:



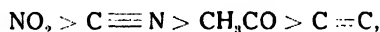
It is also assumed that B^- only to a very slight extent contributes to the light absorption but that B^- is responsible for the stabilization of the quinoid structure of the benzene ring. These assumptions mean that the position of the absorption bands in the spectrum is almost unaffected by variations in B^- while the intensity of the absorption depends exclusively on B^- . The different effects observed among the methylene compounds might thus be attributed to differences in nucleophilic reactivity between their anions.

The variations noted in the positions of the absorption bands are, as seen in the tables, very small. The differences in the height of the bands are on the contrary very large. The reasons for these last mentioned variations will be discussed below.

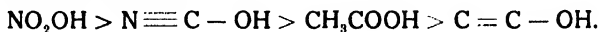
Structural units which can be made to dissociate to give a proton may be arranged in the following order of decreasing acidity^{*})



From studies on hydroxyl acids it is known that the acid-strengthening groups are those groups which have a high polarity or which introduce new possibilities of resonance in the system. The groups we are interested in may be arranged in the following order of decreasing resonance-inducing effect when they are directly or indirectly by means of a conjugated system attached to the oxygen atom:



and we have the series of acids:

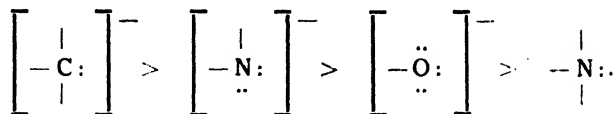


These groups (the nitro group, etc.) are the most effective acid-strengthening substituents also in the ammonia and methan acids series. See ref. (6), section 28.

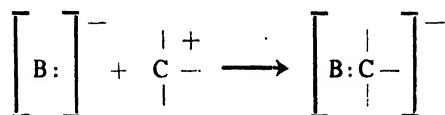
When the corresponding bases of these proton dissociating groups as nucleophilic reagents attack a molecule, e. g. attack a carbon atom lacking

^{*}) For a complete discussion see ref. (6), chap. VI, especially section 28.

electrons, they may be arranged in the following order of decreasing activity:



This means, while only considering the reaction



where $[\text{B}]^{-}$ is one of the abovementioned nucleophilic reagents, that a carbanion is superior to an amide ion; the amide ion superior to the alkoxide ion and the latter superior to the amine. *In aqueous ethanolic solution only the carbanion gives a positive reaction with m-dinitrobenzene.* In other solvents, however, e. g. in petroleum ether, the carbanion as well as the amide ion gives a positive reaction at low temperature. On the other hand neither the alkoxide ion nor the (tertiary) amines give even in petroleum ether a positive reaction. For a discussion of the reactivity of amines in petroleum ether, see (3).

In order to get a broad view of the base-catalysed prototropic reaction of the methylene compounds some of the more important structures have been studied in detail. The reagents have been arranged in more or less naturally closed groups, though from a theoretical point of view this arrangement is purely arbitrary.

A. Grouping $-\text{CH}_2\text{COCH}_2-$

Table 1.

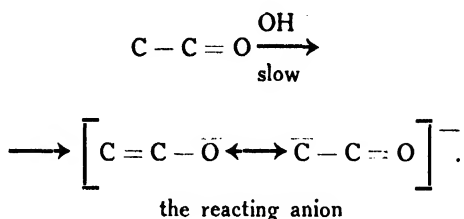
Absorption data of the addition products of m-dinitrobenzene and various compounds containing the structure $-\text{CH}_2\text{COCH}_2-$

Compound	λ max. $m\mu$	ϵ
Acetone	510	570
Butanone	500	200
Cyclohexanone	510	1 680
Dihydromorphinone HCl	505	1 380
Dihydrocodeinone bitartrate	505	1 830
Hydroxydihydrocodeinone HCl	505	1 120
Estrone	530	1 460

The first group of methylene compounds studied consists of aliphatic and cyclic monoketones. Acetone is a little more activated than butanone. All the cyclic ketones have about the same activity. Curiously enough the hydroxyl in hydroxydihydrocodeinone has a noticeable suppressing effect though it is located in γ -position.

By the aliphatic as well as by the cyclic ketones the extinction increases

with time, by the cyclic ketones slower than by the aliphatic ones. This phenomenon might depend on a slow dissociation, cf. *Dewar* (4).



To obtain comparable results the measurements in this series had to be made after a defined lapse of time. Of the reported values only that of estrone is *considerably* dependent on time. Usually the extinction of the addition product of estrone and *m*-dinitrobenzene (5) is measured after sixty minutes. The extinction values of the other addition products are almost constant after five minutes. A period of five minutes was chosen. Thus, in the reported ϵ values a time factor is included.

B. Grouping $-\text{COCH}_2\text{CO}-$

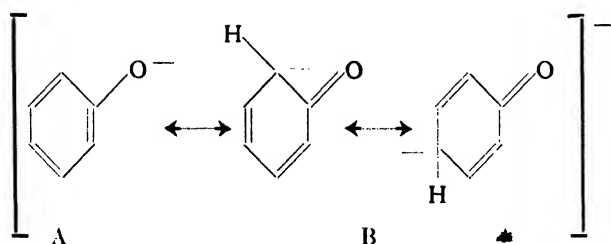
Table 2.

Absorption data of the addition products of m-dinitrobenzene and various compounds containing the structure $-\text{COCH}_2\text{CO}-$

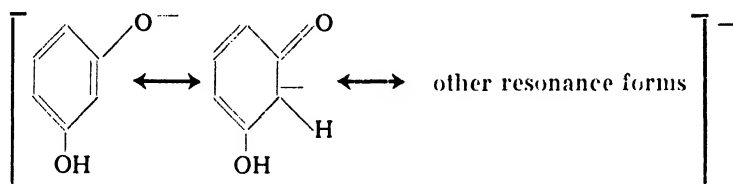
Compound	λ max. m μ	ϵ
(Phenol)	—	—
Resorcinol	500	a faint colour
Phloroglucinol	500	a faint colour
Acetylacetone ¹⁾	—	—
Ethyl acetoacetate	500	275
Diethyl malonate	470	880

¹⁾ Acetylacetone gives in high concentrations a very rapidly fading colour with λ max. at about 500 m μ . At the same time the sodium salt precipitates.

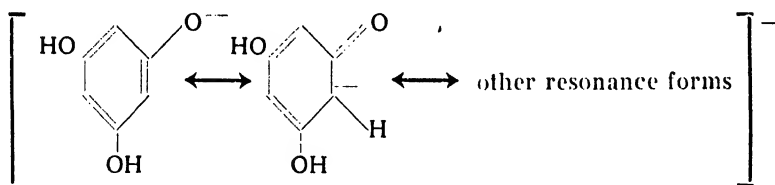
This atomic arrangement is particularly suited to the demonstration of the superiority of the carbanion as a nucleophilic reagent. In the series phenol, resorcinol and phloroglucinol the phenol anion might be considered solely as an enolate ion (A). The other resonance forms, the carbanions (B), seem seldom to take part in a reaction (compare however the salicylic acid synthesis and the *Reimer — Tiemann* reaction):



In the resorcinol anion, however, the enolate ion form and the carbanion form have about equal reactivity as nucleophilic reagents:

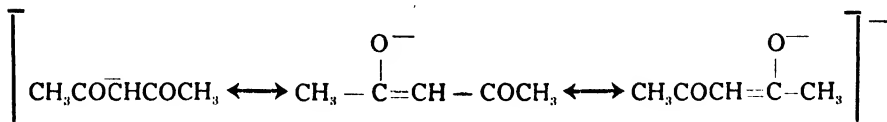


and the same is true in the phloroglucinol anion:



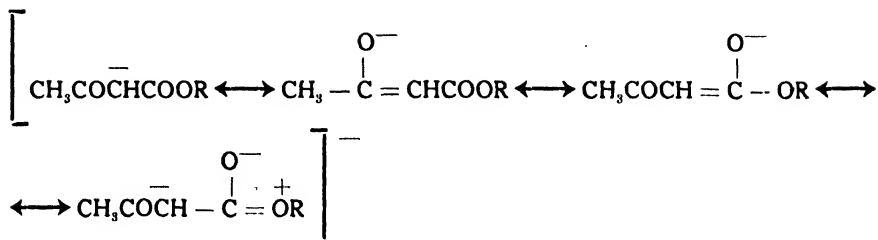
The experimental results indicate as might be expected that phenol gives a negative reaction while resorcinol as well as phloroglucinol give positive reactions. This is in good agreement with the well known fact that under certain experimental conditions phenol by methylation with methyl iodide gives only O-derivatives, resorcinol gives a mixture of O- and C-derivatives while phloroglucinol only gives C-derivatives.

The second series consists of acetylaceton, acetoacetic ester and malonic ester. The dissociation constants of these acids are of the order 10^{-8} , 10^{-11} , and $< 10^{-18}$. These great variations of the dissociation constants depend on the different degrees of resonance in the corresponding bases, the anions. In the acetylaceton anion the principle resonance forms are:



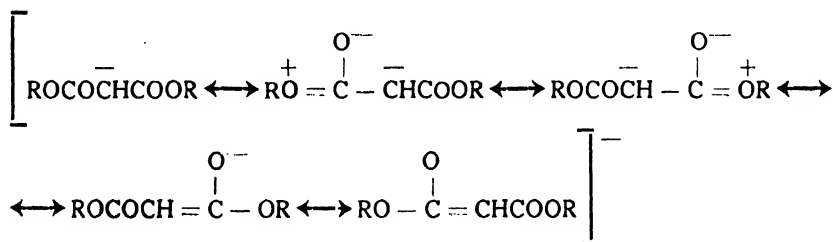
Here the resonance is especially strong as two resonance forms are identical. These two forms are of enol type and thus O-derivatives might be expected to be the common reaction products.

The acetoacetic ester anion is a resonance hybrid of the type:



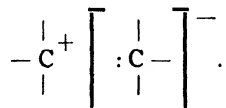
All the resonance forms are different and a strong cross-conjugation, the ester resonance, is present. K_a for the ester is about one thousandth of that of acetylacetone.

In the malonic ester the ester resonance is dominant and the anion might be regarded chiefly as a carbanion. K_a of the malonic ester is so small that the ester is practically insoluble even in concentrated aqueous alkaline solutions.



The absorption intensities of the addition products of *m*-dinitrobenzene and these compounds increase in the same order as the K_a values decrease. This strongly supports the view that by the formation of the complex anion the carbanion form is the most important one.

The bond between the dipole, the nitro compound, and the anion might thus best be described as



C. Grouping $C_6H_5CHRCOR_1$

Table 3.

Absorption data of the addition products of *m*-dinitrobenzene and various compounds containing the structure $C_6H_5CHRCOR_1$.

Compound	λ max. $m\mu$	ϵ
Phenylacetone	510	2 620
Phenylacetic acid	—	—
Methyl phenylacetate	500	720
Diphenylacetic acid	—	—
Diethylaminoethyl diphenyl- acetate HCl	—	—
Phenylcyclohexylacetic acid	—	—
Diethylaminoethyl phenyl- cyclohexylacetate HCl	—	—
Phenylethylacetic acid	—	—
Ethyl phenylethylacetate	—	—
Tropic acid	—	—
Methyl tropate	—	—
Phenylacetamide	—	—
Phenylethylacetamide	—	—
Phenaceturic acid	—	—
Toluene	—	—
Ethylbenzene	—	—
Acetamide	—	—
Chloroacetamide	—	—
Ethyl acetate	—	—
Ethyl chloroacetate	520	a rapidly fading colour

In this grouping the methylene or methinyl hydrogen is activated both by the benzene nucleus and by the carbonyl group. R is H or a straight chain or an alicyclic or aromatic ring. Only in those cases where R = H is the reaction positive. R_1 is $-C_nH_{2n+1}-$, $-OC_nH_{2n+1}-$, $-OH$ or $-NH_2$. As seen in table 3 the presence of a carboxyl or an amide group does not make the system mobile enough to give a positive reaction. This is in good agreement with the fact (23) that the acid-strengthening effect decreases in the series $-COCH_3 > -COOR > -CONR_2 > -COOH$.

The activation brought about solely by the benzene ring is not sufficient to produce a positive reaction as toluene like ethylbenzene gives no reaction. On the contrary, as was shown above, a single $-CO-$ grouping in the form of a ketone is sufficient for a positive reaction. Neither a single ester grouping as in ethyl acetate, nor an amide group as in acetamide gives a sufficient activation of the methylene hydrogen to produce a positive reaction. A combination, however, of a benzene nucleus and an ester group as in methyl phenylacetate gives a positive reaction while, on the contrary, a

combination of a benzene nucleus and an amide group as in phenylacetamide is not enough. If in ethyl acetate a halogen is substituted for an α -hydrogen as in $\text{CH}_2\text{ClCOOC}_2\text{H}_5$, the acidity of the remaining α -hydrogen atoms is increased so much that a positive reaction is obtained, e. g. the halo ester gives an anion, cf. (22). Owing to the rapid hydrolysis of the ester the duration of the colour is, however, too short to permit a quantitative measurement of the extinction. If the same substitution is made in acetamide we obtain $\text{CH}_2\text{ClCONH}_2$. Here again no colour is obtained.

D. Grouping $x\text{-C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{R}$

Table 4.

Absorption data of the addition products of m-dinitrobenzene and various compounds containing the structure $x\text{-C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{R}$

Compound	λ max. m μ	ϵ ¹⁾
Acetophenone	515	6 100
2,4,6-Trimethylacetophenone	515	260
p-Bromoacetophenone	510	10 700
p-Aminoacetophenone	—	—
p-Hydroxyacetophenone	515	a rapidly fading colour
p-Acetamidoacetophenone	520	a rapidly fading colour
p-Methoxyacetophenone	515	100
Phenacyl bromide	—	—
2,4,6-Trimethylphenacyl chloride	500	25 300
Phenacyl alcohol	—	—
Phenacyl acetate	—	—
Phenacyl benzoate	—	—
Phenyl α -piperidinomethyl ketone HCl	—	—
Phenacylpyridinium bromide	—	—
Phenyl β -piperidinoethyl ketone HCl	510	1 040
2,4,6-Trimethylphenyl β -piperidino- ethyl ketone HCl	510	595
Benzophenone	—	—

1) ϵ is here the molar extinction after 15 minutes.

When measuring the extinction coefficients of the addition products of the compounds in this group it was observed that some of the reactions were very dependent on time. The shape of the extinction coefficient/time curves indicated, as seen in fig. 1, that probably different mechanisms of dissociation are present among the phenacyl derivatives studied. The reported ϵ values are those obtained 15 minutes after the mixing of the reagents. The ϵ values cannot be used for a detailed study of the nucleophilic properties of the anions of the phenacyl derivatives. However, as the differences in the

reported ϵ values are very large they may be used for a superficial discussion of the reactivity of the methylene compound. The underlying mechanisms of dissociation will, if possible, be investigated later.

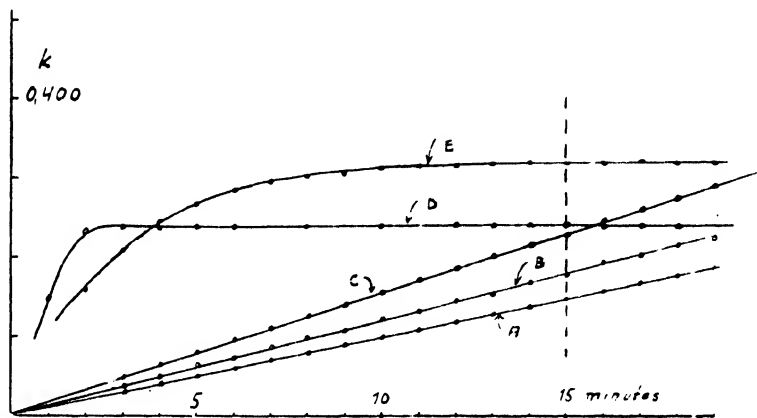
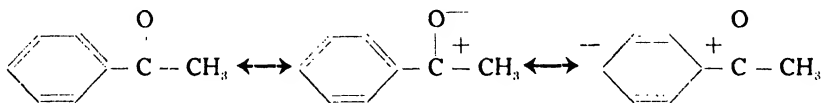


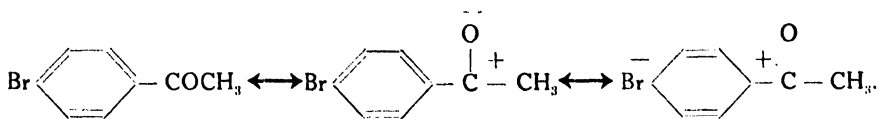
Fig. 1. Extinction coefficient k plotted against time of the addition products of *m*-dinitrobenzene and

- A. acetophenone at 515 μ .
- B. 2,4,6-trimethylacetophenone at 515 μ .
- C. 2,4,6-trimethylphenyl β -piperidinoethyl ketone at 510 μ .
- D. phenyl β -piperidinoethyl ketone at 510 μ .
- E. 2,4,6-trimethylphenacyl chloride at 510 μ .

The acid-strengthening effect of the carbonyl group is greatly enhanced by an adjacent benzene ring if the latter can give the carbonyl carbon a partial positive charge. This phenomenon is well illustrated in the series acetone, acetophenone and 2,4,6-trimethylacetophenone. Resonance hybrids of the type

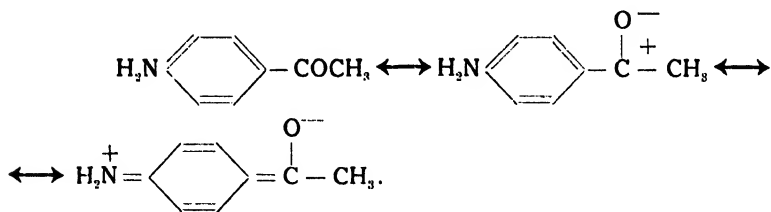


will increase the ability of the α -hydrogen to dissociate. If the resonance is blocked as in methyl mesityl ketone an ϵ value of the same magnitude as by acetone is observed. Support for this opinion is provided by the ϵ values found by *p*-bromoacetophenone and *p*-aminoacetophenone. In the former the dominating resonance forms are



The strongly electronegative properties of the halogen are here dominant. The bromine atom seems to have no tendency to contribute with the unshared pair of electrons to the benzene resonance. On the other hand, in

p-aminoacetophenone the unshared pair of electrons of the amino nitrogen will readily take part in the resonance and we have the hybrid



This resonance will counteract the acid-strengthening properties of the carbonyl carbon, and, as seen in table 4, no colour is obtained. Between these two extremes we find the p-hydroxy, the p-methoxy and the p-acetamido derivatives. Here only rapidly fading colours are observed. The acid-strengthening effect of a para substitution on the α -hydrogen in the acetophenone series might thus be arranged in the following decreasing order:



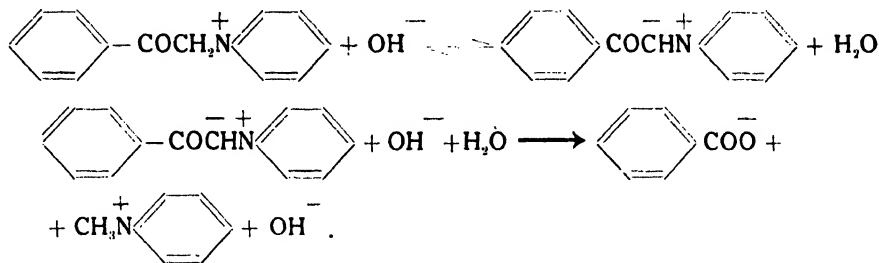
This is in good agreement with *Hammelt's* (6) series of the influence of para substituents on the rate or equilibrium constants of certain general reactions of aromatic compounds. Unfortunately the reported values are not fitted for a quantitative application of *Hammelt's* equation.

The effect of the following substituents in a position in acetophenone has been investigated, viz., Br, OH, OCOR, NR₂, NR₃⁺, CH₂NR₂.

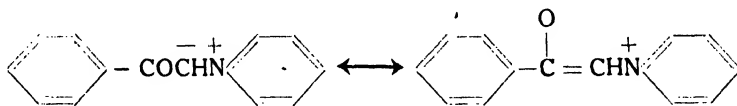
Phenacyl bromide is hydrolysed too rapidly to give a positive reaction. However, in the sterically strongly hindered 2,4,6-trimethylphenacyl chloride the reaction is positive, and, indeed, here the highest k value of all is observed. 2,4,6-Trimethylphenacyl chloride is so highly sterically hindered that the compound is stable against bases (7). The reason being that the resonance of the benzene nucleus with the carbonyl group is inhibited. The α -hydrogen, however, which is not hindered from dissociating, is strongly activated by the structure —COCH₂Cl, and consequently the reaction is positive. This is no contradiction, as 2,4,6-trimethylacetophenone gives with Grignard reagent an enolate (8) and not a tertiary alcohol derivative. Cf. the analogous activation of the hydrogen in CH₂ClCOOC₂H₅ as described above. The α -hydroxyl in the phenacyl alcohol suppresses as usual in ketols the acid-strengthening properties of the carbonyl group. The esterification of the hydroxyl does not change the reactivity of the hydrogen.

If a nitrogen is substituted for an α -hydrogen the reaction is completely blocked by the electropositive properties of the nitrogen. *Rabe* and *Schneider* (17) observed that phenyl α -piperidinomethyl ketone was more soluble in aqueous alkali than in water and attributed this to the formation of an enol salt. They also reported that an aqueous solution of the base turned yellow when alkali was added. It has not been possible to verify the latter observation when using pure phenyl α -piperidinomethyl ketone hydrochloride.

When the nitrogen is positively charged as in phenacylpyridinium bromide the expected strong positive reaction is not obtained. The reason being that β -ketoalkylpyridinium salts are rapidly hydrolyzed in alkaline solution. *Kröhnke* (9) has proposed the following reaction:

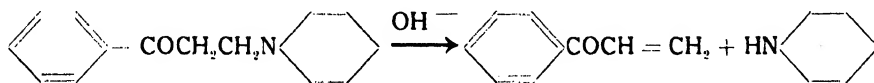


This reaction has recently been reinvestigated by *Pearson and Dillon* (10) and they were able to demonstrate that also another formulation of the hydrolysis is in accordance with the experimental results. It is, however, possible to isolate the yellow coloured enol-betaine and its existence in solution is without doubt. The enol-betaine is best described as a resonance hybrid:



The inner electrostatic bond is certainly so strong that it completely inhibits an addition to *m*-dinitrobenzene in alkaline solution.

If the nitrogen is insulated from the α -carbon by a new carbon atom as in phenyl β -piperidinoethyl ketone and 2,4,6-trimethylphenyl β -piperidinoethyl ketone the reaction again is positive. Here the inductively transmitted electropositive properties of the nitrogen are too small successfully to counteract the acid-strengthening effect of the carbonyl group. However, in alkaline solution cleavage of these compounds occurs according to scheme (11)



but the velocity of this reaction is too low to have any disturbing influence within the time interval studied.

As in the corresponding acetophenone the benzene resonance in 2,4,6-trimethylphenyl β -piperidinoethyl ketone is blocked by steric hindrance and as expected the ϵ value observed is lower than that of the addition compound of the unsubstituted ketone.

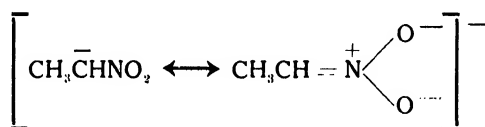
To illustrate the necessity of the hydrogens for the reaction benzophenone has been included in the series. It gives, as seen, no colour.

E. Other groupings

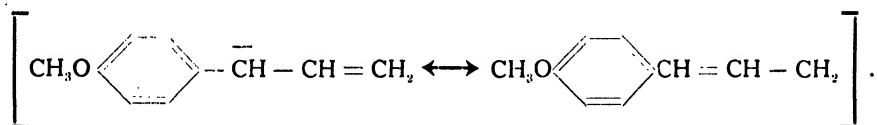
Table 5.
Absorption data of the addition products of *m*-dinitrobenzene and various compounds.

Compound	λ max. m μ	ϵ
Nitroethane	510	a rapidly fading colour
Acetonitrile	515	10 300
Benzyleyanide	510	14 800
Ethyl cyanoacetate ..	510	6 700
Anethole	510	a faint colour
Allyl alcohol	---	---
Allyl bromide	---

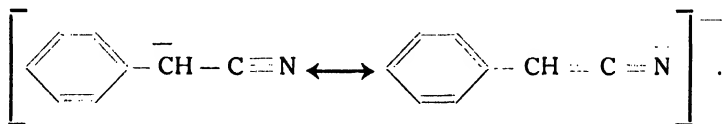
These compounds have only been studied and reported to illustrate that it is not, as mentioned above, necessary to activate the methylene hydrogens by means of a carbonyl group. An aliphatic nitro group as in nitroethane is quite enough. The resonance hybrid of the anion is



In anethole the following resonance forms, cf. (12), are dominant in the hybrid of the anion:



Unfortunately it has not been possible to obtain estragol. This compound would give an anion indistinguishable from that of anethole. Allyl alcohol and allyl bromide gave no colours. In benzyleyanide the resonance hybrid is



Like the chlorine atom in ethyl chloroacetate the cyano group in ethyl cyanoacetate enhances the acid property of the hydrogen enough to make the latter dissociable, and the reaction is here again positive.

Results.

The investigation has given the results that all compounds which contain a sufficiently activated methylene group $\text{R}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{R}$: give with *m*-dinitrobenzene

in alkaline ethanolic solution a coloured complex anion. Structures which enhance the acidic properties of the methylene hydrogens are activating.

Only very few of these structures are by themselves capable of activating the methylene hydrogens sufficiently. Such are the carbonyl, the nitro and the cyano groups in α position. All the others must be supported by other activating groups such as phenyl, suitably substituted phenyl, ester, halogen etc. If a strongly electropositive group is bonded directly or indirectly by a conjugated system to the carbon atom of the methylene group the electropositive group in most cases completely inhibits the reaction. Such groups are present in phenacylamines, ketols etc. The acid-strengthening effect of the carbonyl group is also completely inhibited in an amide grouping and in a carboxyl group, but is maintained though greatly weakened in an ester grouping.

From the experimental results may be concluded that the bond between *m*-dinitrobenzene and the anion of the methylene compound is between the partially positively charged part of the *m*-dinitrobenzene nucleus and the carbanion.

Experimental.

All melting points were determined on the Kofler block and corrected. Boiling points were not corrected. Absorption spectra were determined on a Beckman quartz spectrophotometer model DU using $1 \pm 0,002$ cm. Corex cells. A tungsten filament was used as light source. The absorption data were obtained in the following way. The methylene compound to be tested was dissolved in a suitable volume of 95 per cent ethanol and to 2,00 ml. of this solution were added 4,00 ml of an 1,00 per cent solution of *m*-dinitrobenzene in 95 per cent ethanol. Then 4,00 ml of 5N sodium hydroxide solution were added and the volume adjusted to 10,00 ml. with 95 per cent ethanol and the solution thoroughly mixed. When not otherwise specified the absorption spectrum was measured after five minutes against a blind in which the methylene compound was omitted. In cases when the reaction was dependent on time numerous measurements had to be made to establish the maximum of the absorption band. The concentration of *m*-dinitrobenzene was always the same, about 0,024. Only in those cases where ϵ of the addition product was below 1000 did the proportion of *m*-dinitrobenzene: methylene compound fall below one hundred.

Acetone, ethanol 95 per cent and m-dinitrobenzene were the same réagents as used previously (1, 2).

The following compounds were of C. P. grades. They were used after recrystallization from a suitable solvent or distilled immediately before use.

Butanone, b. p. 79°—80°; *cyclohexanone*, b. p. 155°—156°; *dihydro-morphinone hydrochloride*, U. S. P. XIII; *dihydrocodeinone bitartrate*, Ph. S. XI; *hydroxydihydrocodeinone hydrochloride*, Ph. S. XI; *estrone*, Ph. S. XI; *phenol*, Ph. S. XI; *resorcinol*, Ph. S. XI; *phloroglucinol*, Ph. S. XI; *acetylacetone*, b. p. 139°—141°; *ethyl acetoacetate*, b. p. 71°/12 mm.; *diethyl malonate*, b. p. 195°—197°; *phenylacetone*, b. p. 100°—102°/12 mm.; *phenylacetic acid*, m. p. 77°—78°; *diphenylacetic acid*, m. p. 148°—150°; *diethylaminoethyl diphenylacetate hydrochloride*, m. p. 112°—114°; *diethylamino-*

ethyl phenylcyclohexylacetate hydrochloride, m. p. 146°—147°; *toluene*, b. p. 109°—110°; *ethylbenzene*, b. p. 136°—137°; *acetamide*, m. p. 79°—80°; *ethyl acetate*, Ph. S. XI; *ethyl chloroacetate*, b. p. 143°—144°; *acetophenone*, b. p. 90°/12 mm.; *p-bromoacetophenone*, m. p. 49°—51°; *p-aminoacetophenone*, m. p. 104°—105°; *phenacyl bromide*, m. p. 49°—50°; *benzophenone*, m. p. 47°—48°; *nitroethane*, b. p. 112°—115°; *ethyl cyanoacetate*, b. p. 95°/12 mm.; *anethole*, m. p. 21°; *allyl alcohol*, b. p. 96°—97°; *allyl bromide*, b. p. 70°—71°.

Methyl phenylacetate was prepared from methanol and phenylacetic acid, b. p. 108°—109°/12 mm., $n_{D,20}^{\circ}$ 1,5087. *Phenylcyclohexylacetic acid* was obtained by alkaline hydrolysis of diethylaminoethyl phenylcyclohexylacetate hydrochloride. After acidification the acid was extracted with ether, the solvent evaporated and the acid crystallized from 60 per cent ethanol, m. p. 149°—150°. *Phenylethylacetic acid* was obtained by alkaline decomposition of phenylethylbarbituric acid, b. p. 151°—153°/12 mm., m. p. 45°—46°. *Ethyl phenylethylacetate* was prepared from the corresponding acid and ethanol, b. p. 128°—130°/12 mm. *Tropic acid* was prepared by alkaline hydrolysis of atropine sulphate, m. p. 116°—118°. *Methyl tropate* was prepared from tropic acid and diazomethane, b. p. 118°—120°/20 mm., m. p. 36°—37°. *Phenylacetamide* was prepared from methyl phenylacetate and ammonia, m. p. 157°—158°. *Phenaceturic acid* was prepared according to *Hotter* (13) from phenylacetyl chloride and glycine in alkaline solution, m. p. 143°—145°. *Phenylethylacetamide* was prepared from ethyl phenylethylacetate and ammonia, m. p. 85°—86°. *Chloroacetamide* was prepared from ethyl chloroacetate and ammonia, m. p. 119°—120°. *2,4,6-Trimethylacetophenone* was prepared according to *Noller and Adams* (14) from mesitylene, acetic acid anhydride and $AlCl_3$, b. p. 239°—240° (corrected), $n_{D,20}^{\circ}$ 1,5164. *p-Acetamidoacetophenone* was prepared from p-aminoacetophenone and acetic acid anhydride, m. p. 167°—168°. *p-Hydroxyacetophenone* was prepared from p-aminoacetophenone according to *Klingel* (15), m. p. 106°—107°. *p-Methoxyacetophenone* was prepared from p-hydroxyacetophenone and diazomethane, m. p. 36°—37°, b. p. 134°—135°/12 mm. *Phenacyl acetate* and *phenacyl benzoate* were prepared from phenacyl bromide and sodium acetate respectively sodium benzoate, m. p. 49°—50° and 118°—119°. *Phenacyl alcohol* was prepared according to *Fischer and Busch* (16) from phenacyl acetate by alkaline hydrolysis with barium carbonate, m. p. 84°—85°. *Phenyl α -piperidinomethyl ketone hydrochloride* was prepared from phenacyl bromide and piperidine according to *Rabe and Schneider* (17), m. p. 227°—228° (decomp.). *Phenacylpyridinium bromide* was prepared according to *Bamberger* (18) from phenacyl bromide and pyridine, m. p. 197°—199°. *2,4,6-Trimethylphenacyl chloride* was prepared from mesitylene, chloroacetyl chloride and $AlCl_3$ according to the method given by *Allewelt and Day* (19) for the preparation of phenacyl chlorides, m. p. 67°—68°. *Phenyl β -piperidinoethyl ketone hydrochloride* was prepared from acetophenone, piperidine hydrochloride and paraformaldehyde according to *Mannich and Lammering* (11), m. p. 192°—193°. *2,4,6-Trimethylphenyl β -piperidinoethyl ketone hydrochloride* was prepared

from 2,4,6-trimethylacetophenone, piperidine hydrochloride and paraformaldehyde in the same way as phenyl β -piperidinoethyl ketone hydrochloride, m. p. 185°—186° (decomp.), $Cl_{\text{calc.}}$ 11,98 per cent, Cl_{found} 11,79 per cent. Acetonitrile was prepared according to *Dumas* (20), b. p. 80°—82°. *Benzyl cyanide* was prepared according to *Adams* and *Thal* (21), b. p. 105°—110°/12 mm.

References.

1. *Canbäck*: *Farm. Revy*, 48, 153 (1949).
2. *Canbäck*: *ibid.*, 48, 217 (1949).
3. *Canbäck*: *Acta Chem. Scand.*, 3, 946 (1949).
4. *Dewar*: *The Electronic Theory of Organic Chemistry*, Oxford, 1949, p. 98.
5. *Zimmermann*: *Z. physiol. Chem.*, 246, 47 (1937).
6. For a discussion, see *Branch and Calvin*: *The Theory of Organic Chemistry*, N. Y., 1945, p. 416.
7. *Tsi-Yu Kao and Ching-Sin Miao*: *J. Chinese Chem. Soc.*, 12, 75 (1945) ref. in *C. A.* 40, 4042 (1946).
Fuson and Johnson: *J. Amer. Chem. Soc.*, 68, 1668 (1946).
O'Shaughnessy and Rodebush: *ibid.*, 62, 2910 (1940).
Ferguson and Robinson: *ibid.*, 71, 742 (1949).
8. *Fuson, Fugate and Fisher*: *ibid.*, 61, 2362 (1939).
9. *Kröhnke*: *Ber.* 70, 864 (1937); 66, 604 (1933); 68, 1177 (1935).
10. *Pearson and Dillon*: *J. Amer. Chem. Soc.*, 70, 1933 (1948).
11. *Mannich and Lammering*: *Ber.* 55, 3510 (1922).
12. *Campbell and Young*: *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 296 (1949).
13. *Hotter*: *J. prakt. Chem.*, [2] 38, 98 (1888).
14. *Noller and Adams*: *J. Amer. Chem. Soc.*, 46, 1889 (1924).
15. *Klingel*: *Ber.*, 18, 2691 (1885).
16. *Fischer and Busch*: *Ber.*, 24, 2679 (1891).
17. *Rabe and Schneider*: *Ber.*, 41, 872 (1908).
18. *Bamberger*: *Ber.*, 20, 3344 (1887).
19. *Allewelt and Day*: *J. Org. Chem.*, 6, 386 (1941).
20. *Dumas* in *Gattermann-Wieland, Die Praxis des organischen Chemikers*, 26 Aufl., Berlin 1939, p. 143.
21. *Adams and Thal* in *Organic Syntheses*, Collect. volume I, 2nd Ed., N. Y., 1944, p. 107.
22. *Newman and Magerlein* in *Organic Reactions*, vol. V, N. Y., 1949, p. 416.
23. Cf. ref. (4) p. 105.

Received 3.12.49.

THE CHEMICAL ESTIMATION OF DIGITALIS AND STROPHANTHUS GLYCOSIDES

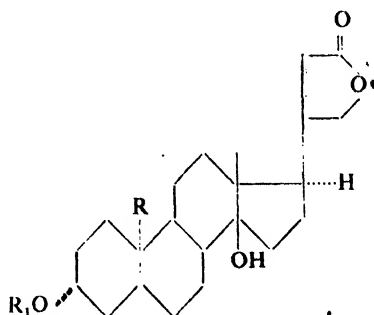
BY TEODOR CANBÄCK, LEG. APOT., FIL. LIC.

Director of the Pharmaceutical Control Laboratory, Stockholm, Sweden

Member of the Swedish Pharmacopœia Commission

CERTAIN glycosides of plant origin possess valuable cardiotoxic properties. The Families Scrophulariaceae and Apocynaceae are the plant orders which contain most members furnishing drugs of therapeutic value. If in this connection the toad poisons are included, the heart-active substances from a chemical viewpoint may be subdivided into three large groups: the digitalis-strophanthus group, the scilla-helleborus group and the nitrogenous venoms secreted by the parotid glands of toads. The chief differences between the groups are: the members of the first group are glycosides, the aglucones of which contain a five-membered lactone ring, the members of the second group are glycosides, the aglucones of which contain a six-membered lactone ring and the members of the last group are suberylarginine derivatives of acetylated hydroxylactones more closely related to the scilla group than to the digitalis group.

Only the first group will be discussed here. The ring system of the cardiac glycosides from the genera *Digitalis* and *Strophanthus* is given below:—



The sugar moiety R₁ may be composed of as many as four sugar molecules. The sugars are for the most part α -desoxy sugars (cymarose, digitoxose and sarmentose) and digitalose, glucose and rhamnose. When an α -desoxy sugar is joined directly to the nucleus, the hydrolysis of the glycoside bond is easily effected; when rhamnose or glucose is the first sugar molecule the union is much firmer, and drastic conditions are necessary for splitting off the sugars. Digitoxin may be mentioned as an example of the first group; ouabain as an example of the second group. In fact, it is only very recently that Mannich has succeeded in

splitting off rhamnose from ouabain without dehydrating the aglucone at the same time. The aglucones are steroids* with a $\Delta\alpha\beta$ -butenolide C_{17} side chain and they are hydroxylated in positions 3 and 14. Many of the aglucones have additional hydroxyl groups in positions 5, 12 and 16. Summarising, it may be said that the characteristic cardiac-stimulating activity of the glycosides is due to the steroid skeleton of the aglucone, the C_{17} side chain, the C_{14} hydroxyl group and to a minor extent to the structure of the sugar moiety. The glycosides are present in the plants in mixtures. From *Digitalis purpurea* a number of substances have been isolated: the purpurea glycosides, which on partial hydrolysis give digitoxin and gitoxin, gitalin, the inactive glycoside diginin, saponins such as digitonin, tannins and enzymes.

It is about fifty years since the first paper was published on the biological assay of digitalis, and there is still controversy among the biologists as to which method shall be used. In recent publications Gold *et al*¹ advocate a human assay of digitalis to overcome the discrepancy between the potencies of digitalis preparations obtained by the cat method and the actual activity in man, especially by oral administration. This discrepancy has emphasised the necessity of finding a more specific method of analysis than the crude lethal dose method. Thus it is desirable that any assay method of cardiotoxic drugs should take account of not only the amount and the distribution of the active glycosides, but also of the absorbability of the active principles from the intestine.

CHEMICAL TESTING

It is symptomatic that in the last few years some very interesting papers on the chemical estimation of digitalis and strophanthus preparations have been published. Some of these papers will now be reviewed and commented upon.

The chemical assay of digitalis leaf is a complicated matter. The ideal method should give figures for:—(1) the total amount of active glycosides; (2) the amount of each different glycoside; (3) the amount of aglycones; (4) the absorbability of the glycosides. As the potency of the glycosides varies with the number of sugar molecules attached to the nucleus it is also desirable to have information of the amount of sugars attached.

The structure of the compounds also gives some clue to the solution of the problem. Purely physical methods such as ultra-violet and infra-red spectroscopy would give some information. Colorimetric methods which determine either the sugars or the butenolide group should give reliable figures of the amount of active principles present, but unfortunately no method is known, which differentiates between the glycosides and the aglucones when working on the genin part of the glycoside. However, by combination of a method based on the sugars and a method

*The alkaloids from *Erythrophleum* have cardiotoxic activity. They are not steroids.

DIGITALIS AND STROPHANTHUS GLYCOSIDES

based on the butenolide group it is easy to calculate the amounts of glycosides and aglucones present.

It should also be possible to separate the glycosides from the aglucones by chromatography on aluminium oxide, or charcoal, or paper strips or by partition chromatography. The separation of the different glycosides (or, after hydrolysis, the aglucones) would also be possible by some kind of chromatography. The chromatographic spectrum of the glycosides could be determined by the aid of pure glycosides.

The extraction of the glycosides from digitalis leaf powder or from galenicals can be done in different ways. Usually an aqueous, methyl alcoholic or ethyl alcoholic extract is prepared. The tannins are removed by shaking with fresh lead oxide or precipitated by lead acetate solution, the precipitate is filtered off and the dissolved lead removed by hydrogen sulphide or sodium phosphate. From this partially purified extract the glycosides and aglucones are extracted with chloroform. Free sugars are left in the aqueous phase. When the final estimation is made on the sugar moiety of the glycosides the latter are hydrolysed and the free sugars estimated.

This route of isolation and purification has some disadvantages, as at all stages large losses are suffered. Extraction with water or with alcohols of different strengths may result in a fractionation of the glycoside complex, as the different glycosides have very different solubilities in these solvents. When the tannins are precipitated by lead acetate, coprecipitation of the glycosides will occur, and it is difficult to wash the precipitate free from them. The extraction of the glycosides and the aglucones from the aqueous or alcoholic solution by chloroform is a very troublesome procedure. The presence of saponins enhances the solubilities of the active principles in the aqueous phase, and even repeated extraction will not give a quantitative yield.

Methylene chloride is a much better solvent than chloroform when extracting pure or purified glycosides from tablets containing lactose because the solubility of lactose in methylene chloride is much less than in chloroform. Lactose disturbs most of the known colour reactions, especially those carried out in alkaline solution, and measuring the transmission at about 500 $m\mu$ is unreliable when chloroform is used as the solvent.

METHODS DEPENDENT ON THE BUTENOLIDE SIDE CHAIN

All glycosides from the digitalis and strophanthus groups show in ethyl alcoholic solution an absorption maximum between 215 and 220 $m\mu$ in most cases at 217 $m\mu$ with $\log \epsilon$ about 4.2. This absorption is very characteristic and is due to the $\Delta^{\alpha:\beta}$ -butenolide group. Of course, it is not possible to differentiate between glycosides and aglucones. The method has been used for some years in this laboratory as routine control on injections containing ouabain or digitoxin. When suitable

equipment is available and interfering substances are known to be absent, the method is very rapid.

Extinction plotted against amount of glycoside present gives a straight line when the measurements are made on the peak of the absorption curve. If alkali is added, it is possible to follow the isomerisation of the glycosides as the peak at 217 $m\mu$ gradually disappears, which is a good identification of the substance present.

The following methods depend on a reaction with the butenolide group: the Legal reaction with sodium nitroprusside and alkali, the Knudson and Dresbach method with alkaline sodium picrate solution, the Raymond method with *m*-dinitrobenzene in alkaline solution, the Kedde method with alkaline sodium 3:5-dinitrobenzoate solution and the Warren, Howland and Green method with sodium β -naphthoquinone-4-sulphonate.

The Legal reaction depends on the formation of a red colour when sodium nitroprusside is added to an alkaline solution of the glycosides. The colour test has been described by Jacobs, Hoffman and Gutus² and has been extensively used in research work on the cardiac glycosides. Qualitatively the test is performed so that a relatively large amount (0.01 g.) of the glycoside to be tested is dissolved in pyridine and an equal volume of water is added. A few drops of a 10 per cent. sodium hydroxide solution are added and then 1 ml. of 0.3 per cent. sodium nitroprusside solution. When a heart-active glycoside is present, a bright red colour develops, which slowly fades. The test has been criticised by Elderfield³, who proposed the use of potassium ferricyanide instead of sodium nitroprusside. Hardegger, Heusser and Blank⁴ have shown that the Legal test is not specific for the butenolide group, but that certain related synthetic products also give a positive reaction. The reaction probably involves a condensation of the butenolide group with the reactive NO group (in alkaline solution), and the colour is probably due to salt formation of an isonitroso derivative.

Kedde⁵ has developed a quantitative method for the assay of digitalis preparations based on the Legal reaction. He works in a buffered solution of pH 11, and obtains a relatively stable colour. The absorption band has a maximum at about 470 $m\mu$.

Some years ago Knudson and Dresbach⁶ used the Baljet⁷ reaction to estimate digitalis preparations. The Baljet reaction is based on the Jaffe reaction⁸: creatinine gives with alkaline picrate solution a red colour. The glycosides give a red-orange colour when their solutions are treated with alkaline picrate solution. The method has recently been of current interest in the United States of America and Bell and Krantz⁹ especially have contributed some interesting investigations. In a series of papers they have shown that the method gives reliable results when the transmission is measured by means of a photoelectric colorimeter. In a collaborative study¹⁰ of the assay of digitalis and its preparations by the Baljet reaction and the cat method it was shown that significant correlation between the two methods existed, showing that both methods

DIGITALIS AND STROPHANTHUS GLYCOSIDES

measure the same activity of the drugs. Their method has been made the basis for method I, Digitoxin Colorimetric Controls, in the U.S.P. XIII. For the decolorisation of ethyl alcoholic extracts of digitalis leaf powder they use lead acetate and sodium phosphate. No extraction of the glycosides with chloroform is used, but the reagent, alkaline picrate solution, is added directly to the purified aqueous extract of the drug. After 20 minutes the difference in transmission between the extract and a blank is measured at about 525 m μ . As standards the U.S.P. digitalis reference standard tincture and the same tincture of half strength are used.

U.S.P. XIII uses absolute methyl alcohol to extract digitoxin from tablets.¹¹ It is necessary to change the composition of the reagent to avoid precipitation of digitoxin and sodium picrate in the final solution. To the methyl alcoholic digitoxin solution containing 0.1 to 1.0 mg. in 10 ml. are added 10 ml. of reagent (2 g. of trinitrophenol dissolved in methyl alcohol to 50 ml., 5 ml. of sodium hydroxide solution (1 in 10) and water to 100 ml.) and after 30 minutes the transmission is measured at about 525 m μ .

The modified Knudson-Dresbach chemical assay has been criticised from different aspects and published results indicate that the values obtained are generally higher than the values obtained by bioassay procedures. The most serious drawback is that glycosides as well as aglucones are determined and reported, as Baljet pointed out. Goldstein¹² has shown that ageing of digitalis tinctures does not apparently affect their potencies according to the chemical assay, which is rather improbable. Elmqvist and Liljestrand,¹³ working with infusions and pills, point out that while the bioassays (guinea-pig) indicate a rapid deterioration of the preparation with time, the potencies obtained by the chemical assays are constant or sometimes even increase. Vos and Welsh¹⁴ have reported similar results.

Another disadvantage of the Knudson-Dresbach method is that the difference between the absorption curve of the picrate ion in alkaline solution and the absorption curve of the test solution with alkaline picrate solution is very small, while difficulties of purely technical kinds are present. The Lambert-Beer law is not fulfilled. Lactose interferes as it gives a pronounced colour with the alkaline reagent. An advantage is that the curves obtained by plotting photometer readings against time indicate the presence of interfering substances when the resulting curves differ in shape from those obtained with a standard.

In 1935, Marthoud¹⁵ pointed out that a solution of *m*-dinitrobenzene and heart-active glycosides in ethyl alcohol, on addition of alkali, develops a bright blue-violet colour. This colour test was quantitatively used by Raymond¹⁶ to estimate the amount of ouabain in East African arrow poisons prepared from seeds of *Strophanthus* species and from *Acocanthera* wood. Rasmussen¹⁷ used the method to estimate ouabain in injections, Anderson and Chen¹⁸ to assay digitoxin. Canbäck modified the method and estimated digitalis, strophanthus¹⁹ and uzara

preparations²⁰. The reaction is a special case of the general reaction of *m*-dinitrobenzene with active methylene groups in alkaline solution.

Anderson and Chen¹⁸ use the following technique: 150 to 250 μg . of digitoxin is dissolved in 10 ml. of 47.5 per cent. ethyl alcohol and 1 ml. of a 1 per cent. *m*-dinitrobenzene solution in absolute ethyl alcohol is added. The mixture is placed in an ice-bath for 5 to 10 minutes. Then 2 ml. of a 20 per cent. solution of sodium hydroxide is added and the mixture returned to the ice-bath. Exactly 5 minutes after the addition of the sodium hydroxide the transmission is measured in a photoelectric colorimeter equipped with an orange filter. Water is used as a blank. The amount of digitoxin present is read from a standard curve. The colour fades fairly rapidly and it is necessary to read exactly 5 minutes after the addition of the alkali. The colour intensity is dependent on the alcoholic strength and the temperature, both of which must be rigidly controlled.

To overcome most of the difficulties the following technique¹⁹ for the estimation of digitoxin tablets has been used in this laboratory:—

As much of well powdered tablets as corresponds to 800 μg . of digitoxin is weighed into a 15-ml. centrifuge tube and 10.00 ml. of methylene chloride is added. The tube is immediately closed with a cork covered with tinfoil and shaken in a machine for 30 minutes. Then the mixture is centrifuged at 2,000 r.p.m. for some minutes. 5.00 ml. of the clear solution is transferred to a beaker and the methylene chloride evaporated in a vacuum at 50°C. The residue containing the glycoside and any lubricant that may be present (stearic acid), is treated with 5 ml. of 50 per cent. ethyl alcohol and carefully warmed to about 70°C. for a few seconds. This warming is necessary to dissolve the glycosides under the prescribed conditions. The solution is cooled and the separated stearic acid removed by filtration. The filtrate is adjusted to 6.00 ml. with 50 per cent. ethyl alcohol to this solution 2.00 ml. of a 1 per cent. *m*-dinitrobenzene solution in 50 per cent. ethyl alcohol and 2.00 ml. of 10 N sodium hydroxide solution is added. At the same moment as the alkali is added a stop watch is started and the extinction is determined at about 620 $m\mu$ every 30 seconds. The logarithms of the extinctions were plotted against time and a straight line is obtained. Log extinction at zero time is read from the graph. A standard curve is prepared from "zero" extinctions, obtained with weighted amounts (200 to 600 μg .) of digitoxin.

In this modification the Raymond method is unaffected by reasonable variations in alcoholic strength of the final solution and by temperature variations within the range 17° to 23°C. From measurements made on digitoxin, cymarín, strophanthin, ouabain, gitoxin, digitoxigenin, strophanthidin, and on the synthetic analogue β -phenyl- $\Delta^{\alpha}:\beta$ -butenolide the extrapolated molar "zero" extinction coefficient has been found to be about 12,000 or $\log \epsilon = 4.08$ at 620 $m\mu$. Lactose interferes, therefore it is preferable to extract digitoxin with methylene chloride, instead of with chloroform, from tablets containing this sugar. Injections, even those containing glycerol, are diluted with ethyl alcohol and directly estimated.

The Raymond method has the following advantages over the

DIGITALIS AND STROPHANTHUS GLYCOSIDES

Knudson-Dresbach method. The absorption maximum lies far in the red part of spectrum at $620\text{ m}\mu$, and thus yellow and red colours from impurities have a less serious effect on the measurements than in the Knudson-Dresbach method. The reagent is colourless and stable for some days. The measurements are made very rapidly. Another positive character is that the glycosides from *Scilla* and *Helleborus* do not give colours. A disadvantage is that it is necessary to work with speed in order to obtain sufficient points to construct the curve. The Raymond method, like the Knudson-Dresbach method, makes no distinction between glycosides and aglucones.

The Raymond method has been discussed more in detail than the other methods because in my opinion this method is the most promising of those acting on the lactone side chain. In combination with one of the methods discussed below acting on the sugar moiety, it seems possible to devise a good chemical assay of digitalis preparations.

A new reagent for digitalis glycosides has recently been proposed by Kedde⁵. He uses 3:5-dinitrobenzoic acid in alkaline solution to estimate the sum of glycosides and aglucones. The mechanism of the reaction is probably the same as in the Raymond reaction.

Another new reagent is sodium β -naphthoquinone-4-sulphonate used by Warren, Howland and Green²¹ for the estimation of digitoxin. Ehrlich and Herter²² and Feigl and Frehden^{23,24} described the use of the reagent for the detection of active methylene groups. The colour produced is probably due to the formation of a quinoid condensation product. The condensation reaction is carried out in alkaline solution and the colour produced is purple. On acidification with acetic acid a stable yellow colour is obtained which may be extracted by dibutyl phthalate.

Warren, Howland and Green²¹ assay digitoxin tablets in the following way. Tablets are ground to a fine powder, which is extracted with boiling chloroform. After filtering, the volume is adjusted and an aliquot part, corresponding to $200\text{ }\mu\text{g.}$ of digitoxin, is evaporated in an Erlenmeyer flask on a steam bath. 0.1 ml. of chloroform is added and the flask is shaken to wet all the residue. Then 4 ml. of alcohol and 0.5 ml. of 0.05 N sodium hydroxide solution are added. The flask is placed in a 100°C. bath and after 1 minute 1 ml. of the reagent (containing 0.024 per cent. of sodium β -naphthoquinone-4-sulphonate and 0.024 per cent. of sodium sulphite in distilled water) is rapidly added. One and one-half minutes after the addition of the reagent 0.5 ml. of acetic acid solution (containing 13 per cent. of acetic acid in alcohol) is added with agitation. The flask is removed from the bath, and cooled under the tap. The volume is adjusted to 25 ml. with alcohol and the transmission measured within 2 hours at about $450\text{ m}\mu$. A blank is prepared in the same manner omitting the digitoxin. As aldehydes give a positive reaction with the reagent, aldehyde-free ethyl alcohol must be used.

As expected, the authors report that lanatoside A (digitoxin derivative) and lanatoside C (digoxin derivative) gave a strong positive reaction. Curiously, however, gitoxin and its derivative lanatoside B gave only

a weakly positive test. The only structural difference between digitoxin and gitoxin is the additional hydroxyl group on C₁₆, and it is hard to believe that this hydroxyl group could interfere. The slight solubility of gitoxin may be responsible for the different behaviour of the glycoside. Digitonin gave a negative reaction.

METHODS DEPENDENT ON THE SUGAR MOIETY OF THE GLYCOSIDES

Many methods for the detection and determination of the sugars in the heart-active glycosides have been reported. All the digitalis glycosides of interest are built up according to the same scheme:—aglucone + 3 digitoxose (+ glucose). The strophanthus glycosides contain other sugars instead of digitoxose, for instance, ouabain contains rhamnose, k-strophanthin- β -cymarose and glucose, and cymarosin cymarose.

On the basis of a sugar determination it is for the moment a technically easier task to devise an assay method which is specific for the glycosides and excludes the aglucones, than to construct one on the basis of a determination of the butenolide side chain. In the first case it is only necessary to extract the glycosides and the aglucones from an aqueous or ethyl alcoholic extract and to determine the sugars which are set free in a separate hydrolytic reaction. In the latter case it is necessary to separate glycosides and aglucones by a tedious process and then to estimate the glycosides. When working with a sugar method it is, however, always a good thing to remember that the part of the molecule actually measured is not the specific one. On principle those methods which depend on a reaction with the butenolide side chain should therefore be preferred.

Of the proposed colorimetric sugar methods only two recently described modifications of the Keller-Kiliani test will be discussed. The Keller-Kiliani test depends on the colours obtained when concentrated sulphuric acid is added to digitoxose dissolved in glacial acetic acid containing traces of ferric chloride. As early as 1906 Cloetta and Fischer²⁵ tried this method for the estimation of heart-active glycosides.

Recently James, Laquer and McIntyre²⁶ have described a modification that has been introduced in the U.S.P. XIII as Method II, Digitoxin Colorimetric Controls. They assayed digitoxin tablets in the following way. Ground tablets corresponding to 4 mg. of digitoxin were extracted overnight with 50 ml. of chloroform. The supernatant chloroform was filtered and the residue extracted 6 times with 5-ml. quantities of chloroform. The volume was adjusted and an aliquot part of the chloroform solution corresponding to 200 μ g. of digitoxin was evaporated to dryness. To the residue were added 3 ml. of glacial acetic acid, 0.10 ml. of 5 per cent. ferric chloride solution (FeCl₃.6H₂O) and 0.25 ml. of concentrated sulphuric acid. The transmission was measured at 15-minute intervals until a maximum reading was reached, usually within 15 to 45 minutes. The light filter had a maximum transmission between 500 and 570 m μ . The Lambert-Beer law is fulfilled.

In assaying injections containing glycerol it is necessary to prepare a

DIGITALIS AND STROPHANTHUS GLYCOSIDES

special graph from measurements made on solutions containing known amounts of glycerol and digitoxin.

In a comprehensive study Soos²⁷ has investigated the details of the Keller-Kiliani test when applied to digitalis leaf. He used the reagent recommended by Lindewald^{28,29}, which consists of 97 ml. of glacial acetic acid, 2 ml. of concentrated sulphuric acid and 1 ml. of a 5 per cent. ferric chloride aqueous solution. Soos assays digitalis leaf in the following way. 1.50 g. of powdered leaf is moistened with a small quantity of water in a mortar and allowed to swell during 15 minutes. Then the mixture is washed into a flask with water and the weight adjusted to 151.5 g. The mixture is shaken now and then during 1 hour. After that 15 ml. of a 15 per cent. lead acetate solution is added. The precipitate is allowed to settle and the clear supernatant solution is filtered. 110 g. of the filtered solution, corresponding to 1.00 g. of the drug, is extracted with 3×25 ml. of chloroform. The chloroform solution is dried with sodium sulphate and filtered into an Erlenmeyer flask. The chloroform is distilled off and the residue dissolved in 10 ml. of freshly prepared reagent. The extinction is measured at 30-minute intervals and the maximum value recorded during 5 hours. As the reaction is sensitive to light it is preferable to let the solution stand in the dark during this time. The absorption curve has a maximum at 570 m μ .

Soos points out that unknown impurities in the glacial acetic acid he used had a very pronounced effect on the development of the colour. Thus it is necessary to construct a graph with the glacial acetic acid actually used. As standard substances either digitoxin or digitoxose may be used. Drawbacks of the methods are that the development of the colour takes 2 to 5 hours and that the extraction of the glycosides from the aqueous extract with chloroform is never quantitative. Usually about 80 per cent. is recovered. The presence of saponins in the drug decreases the yield obtained by extraction. Nevertheless, the method probably is the best of the known methods for assaying digitalis leaf. It is the only method that measures the glycosides present in the drug excluding the aglucones. But, as pointed out previously, the method has the defect of not measuring an essential part of the heart-active molecule.

The time seems to be near when the pharmacopœias will have seriously to discuss the problem of the assay of drugs containing heart-active glycosides in the light of the experience gained with chemical methods. A combination of a method assaying the total amount of glycosides and aglucones present, and a method assaying only glycosides would appear to define most of the necessary characteristics of the drugs.

REFERENCES

1. Gold, *J. Amer. pharm. Ass., Pract. Ed.*, 1947, 8, 594.
2. Jacobs, Hoffman and Gustus, *J. biol. Chem.*, 1926, 70, 1.
3. Paist, Blout, Uhle and Elderfield, *J. org. Chem.*, 1941, 6, 273.
4. Hardegger, Heusser and Blank, *Helv. chim. Acta.*, 1946, 29, 477.
5. Kedde, *Bijdrage tot het chemisch Onderzoek van Digitalis-preparaten*, Diss., Leiden, 1946.

TEODOR CANBÄCK

6. Knudson and Dresbach, *J. Pharmacol.*, 1923, **20**, 205.
7. Baljet, *Schweiz. Apoth. Ztg.*, 1918, **56**, 71, 89.
8. Jaffe, *Hoppe-Seyl. Z.*, 1886, **10**, 390.
9. Bell and Krantz, *J. Pharmacol.*, 1945, **83**, 213.
10. Bell and Krantz, *J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed.*, 1946, **35**, 260.
11. Bell and Krantz, *J. Pharmacol.*, 1946, **87**, 198.
12. Goldstein, *J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed.*, 1947, **36**, 296.
13. Elmqvist and Liljestrand, *Acta physiol. Scand.*, 1946, **12**, 53.
14. Vos and Welsh, *J. Pharmacol.*, 1945, **85**, 346.
15. Marthoud, *Contribution à l'étude de l'emploi des dinitrobenzènes comme réactifs du groupement carbonyle*, Diss., Lyon, 1935.
16. Raymond, *Analyst*, 1938, **63**, 478; 1939, **64**, 11.
17. Rasmussen, *Dansk. Tidsskr. Farm.*, 1944, **18**, 48.
18. Anderson and Chen, *J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed.*, 1946, **35**, 353.
19. Canbäck, *Svensk farm. Tidskr.*, 1947, **51**, 261.
20. Canbäck, *ibid.*, 1947, **51**, 401.
21. Warren, Howland and Green, *J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed.*, 1948, **37**, 186.
22. Ehrlich and Herter, *Hoppe-Seyl. Z.*, 1904, **41**, 329.
23. Feigl and Frehden, *Mikrochemie*, 1934, **16**, 79.
24. Feigl, *Qualitative Analysis by Spot Tests*, Elsevier, New York—Amsterdam, 1946, pp. 389-392.
25. Cloetta and Fischer, *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1906, **54**, 294.
26. James, Laquer and McIntyre, *J. Amer. pharm. Ass., Sci. Ed.*, 1947, **36**, 1.
27. Soos, *Scientia Pharm.*, 1948, **16**, 1, 29.
28. Lindewald, *Farm. Notishl.*, 1939, **48**, 39.
29. Lindewald, *Pharm. Zentralh.*, 1944, **85**, 80.

Fotometrisk bestämning av progesteron med 2,4-dinitrofenylhydrazin.

Av *Elna Diding*

Från Statens farmaceutiska laboratorium.

(Inserted in *Collectanea pharmaceutica suecica*, IV, 1949)

Enligt svenska farmakopén Ed. XI bestämmes progesteron kvantitativt genom sin förmåga att åstadkomma en sekretionsfas i med östron förbehandlad livmoder från infantil kanin. Denna biologiska bestämningsmetods noggrannhet uppges enligt farmakopéns kommentar uppgå till knappast $\pm 30\%$. Förutom att metoden sålunda ger ganska osäkra värden, är den dessutom behäftad med en del andra icke oväsentliga olägenheter. För en bestämning åtgår ej mindre än sju kaniner; bestämningens utförande kräver ganska mycket arbete och tager cirka två veckor i anspråk. Allt detta medför, att det är av allra största intresse att erhålla en kompletterande bestämningsmetod för progesteron i beredningar, som ger tillfredsställande resultat och är snabbare i utförande än den för närvarande officiella biologiska metoden.

Olika kemiska bestämningsmetoder för progesteron ha prövats. Sålunda har *Elvidge* (1) undersökt olika fotometriska metoder, och han rekommenderar en reaktion, som grundar sig på bildningen av en röd färg vid behandling av progesteron i starkt alkalisk lösning med salicylaldehyd. För-

söksresultat finnas angivna för progesteronberedningar innehållande mellan 2—10 mg/ml. Denna metod har emellertid vid prövning vid Statens farmaceutiska laboratorium ej kunnat verifieras, vilket möjligen kan bero på skillnader i kvalitet på den använda salicylaldehyden. Dessutom är den ganska arbetskrävande, emedan ny standardkurva måste uppgöras för varje enskild bestämning.

Klein, Weiner och Gordon (2) ha angivit en metod enligt vilken progesteron får reagera med 2,4-dinitrofenylhydrazin, och den utfällda svårlösliga hydrazonen väges. Varje progesteronmolekyl reagerar därvid med båda sina karbonylgrupper. Metoden är utformad så att den även möjliggör bestämning om progesteron föreligger i oljelösning, vilket ju är det vanliga. Därvid löses oljelösningen av progesteronet i hexan och progesteronet extraheras med sprit (90 vol.-%). Alkoholutdraget indunstas, och återstoden uppvärms med dinitrofenylhydrazin i absolut alkohol och litet koncentrerad klorvätesyra. Den erhållna fällningen väges sedan efter torkning i vakuum. Med denna metod ha förf. erhållit mycket tillfredsställande resultat. Vid bestämning av invägda mängder progesteron på 18—20 mg lösta i 2—20 ml sesamolja återfanns mellan 97,5—104,5 %. En nackdel synes dock vara att relativt mycket undersökningsmaterial åtgår för en bestämning. De i handeln vanligast förekommande progesteronpreparaten innehålla vanligen 1, 2, 5 och 10 mg/ml.

Egna undersökningar.

Vid arbete med ovannämnda av *Klein m. fl.* (2) angivna metod visade det sig, att den erhållna hydrazonfällningen var löslig i kloroform. Sålunda erhöles för invägda mängder på cirka ett mg progesteron en stark rödgul färg vid fällningens upplösning i 100 ml kloroform. På grund härav föreföll det motiverat att närmare undersöka möjligheten av att använda denna kloroformlösning för att på fotometrisk väg bestämma dylika små mängder progesteron. I första hand upptogs absorptionskurvan för den erhållna färglösningen inom spektrums synliga del. Vid dessa förberedande försök erhöles en kurva av det i fig. 1 återgivna utseendet. Den erhållna kurvan innehåller icke några maximi- eller minimipunkter och för de fortsatta undersökningarna valdes filter M 440 (Lumetron). Därefter bestämdes extinktionsvärdena för olika kloroformlösningar, som erhöles för uppvägda mängder progesteron liggande mellan 0,1—1,5 mg. Utseendet av de erhållna kurvorna tydde på att hydrazonutfällningen i spritmediet vid dessa låga progesteronkoncentrationer ej var fullständig. Genom att variera utfällningsmetodiken visade det sig emellertid slutligen möjligt att erhålla en rätlinjig extinktionskurva. Följande metod användes därvid.

Metodik.

En lösning av 0,25—1,25 mg progesteron i 5 ml sprit försattes i en 50 ml bägare med 3,0 ml av en 0,25 % nyberedd lösning av 2,4-dinitrofenylhydrazin i 2 N klorvätesyra. Bägaren täckes med ett urglas och får stå på ett kokande vattenbad under 15 minuter. Därefter tillsättes 10 ml 2 N klorvätesyra och bägaren får stå ytterligare på vattenbadet tills spriten avgått (30 minuter). Den uppkomna fällningen upptages därefter kvantitativt på ett litet glas-

filter (Pyrex M eller motsvarande), tvättas ett par gånger med 2 N klorvätesyra och slutligen med 3×5 ml vatten. Filter jämte fällning torkas i vakuum-exsiccator. Därefter upplöses fällningen i kloroform medelst genomsugning, och kloroformlösningen spädes till 100 ml. Extinktionen mätes i Lumetron fotometer med användande av filter M 440.

Den erhållna färgen har visat sig hållbar under minst 24 timmar.

Sambandet mellan mg progesteron och extinktionskoefficient framgår av tab. 1 samt fig. 2.

Bestämning av progesteron i oljelösning.

Progesteron användes vanligen löst i jordnötolja, sesamolja, olivolja eller etyloleat. För att man skall kunna använda ovan angivna fotometriska metod för den kvantitativa bestämningen, är det därvid nödvändigt att så fullständigt som möjligt separera progesteronet från oljan. I första hand prövades härvid det separeringsförfarande som angivits av *Klein m. fl.* (2), och som grundar sig på oljans och progesteronets olika löslighetsförhållanden i hexan och 90 vol-% alkohol. Medan oljan är lättlöslig i hexan och svårlöslig i alkoholen gäller för progesteronet omvända förhållanden. Det visade sig emellertid att en ringa del av oljan eller eventuellt i densamma befintliga substanser tydligen delvis löstes i spriten och detta medförde vid de förberedande försöken missvisande resultat. Genom att vidtaga en del förändringar vid separeringsförfarandet var det dock möjligt att på ett mera effektivt sätt bortskaffa rester av oljan. Följande separeringsmetod har använts vid de försök, som nedan redovisas.

Bestämningens utförande.

Progesteronoljelösning motsvarande 0,5–1,2 mg progesteron inväges i ett vägglas och överföres med hjälp av 10 ml hexan till en separertratt. Därefter extraheras med 4×5 ml 90 vol-% sprit, spritutdragen samlas i en andra separertratt, som innehåller 20 ml hexan, och blandningen omskakas. Spritfasen filtreras genom ett med sprit fuktat filter ned i en 50-ml bägare. Återstoden i den andra separertratten extraheras med ytterligare 2×5 ml 90 vol-% sprit, spritutdragen filtreras varefter filtret tvättas med sprit. De samlade filtraten indunstas på vattenbad till torrhet. Återstoden löses i 5 ml sprit och progesteronbestämningen utföres enligt i det föregående angivna metod, med undantag för att den erhållna hydrazonfällningen dessutom tvättas med 6×1 ml hexan.

Försöksresultat.

I. Tabellerna 2, 3 och 4 ange resultat av olika försök, varvid kända progesteronmängder tagits i arbete. I tabell 2 ha försöken utförts utan olja men med samma separeringsförfarande som angivits för oljelösningar. Av tabellerna 3 och 4 framgår resultaten vid varierande mängder sesamolja och jordnötolja.

II. Tabellerna 5, 6 och 7 ange försöksresultaten vid progesteronbestämning av ett antal farmaceutiska specialiteter (I—XV).

Av de erhållna resultaten framgår följande.

Medelst den angivna metoden ha mängder av progesteron mellan 0,4—1,2 mg nöjaktigt kunnat bestämmas (tab. 1—2).

Metoden möjliggör även med nöjaktig noggrannhet bestämning av progesteron i sesamolja eller jordnötolja i koncentrationer liggande mellan 1—25 mg progesteron per ml olja (tab. 3—4).

Av resultaten i tab. 7 att döma finns anledning tro, att när progesteron föreligger löst i etyloleat för höga värden erhållas vid de svagare progesteronlösningarna. Vid kontrollförsök med enbart etyloleat visade det sig också, att betydande blindvärden erhöles. Detta kan möjligen bero på i etyloleatet förekommande föroreningar. Metodens utformning för bestämning av progesteron i etyloleat är därför ej slutgiltigt färdig, men arbete härpå pågår.

Av tab. 3—4 framgår, att den föreslagna tvättningen med 6×1 ml hexan i vissa fall icke företagits. Orsaken härtill var att undersöka huruvida det vid dessa upprepade tvättningar möjligen utlöstes något av hydrazonfällningen, varigenom för låga värden skulle erhållas. Då detta emellertid ej tycktes vara

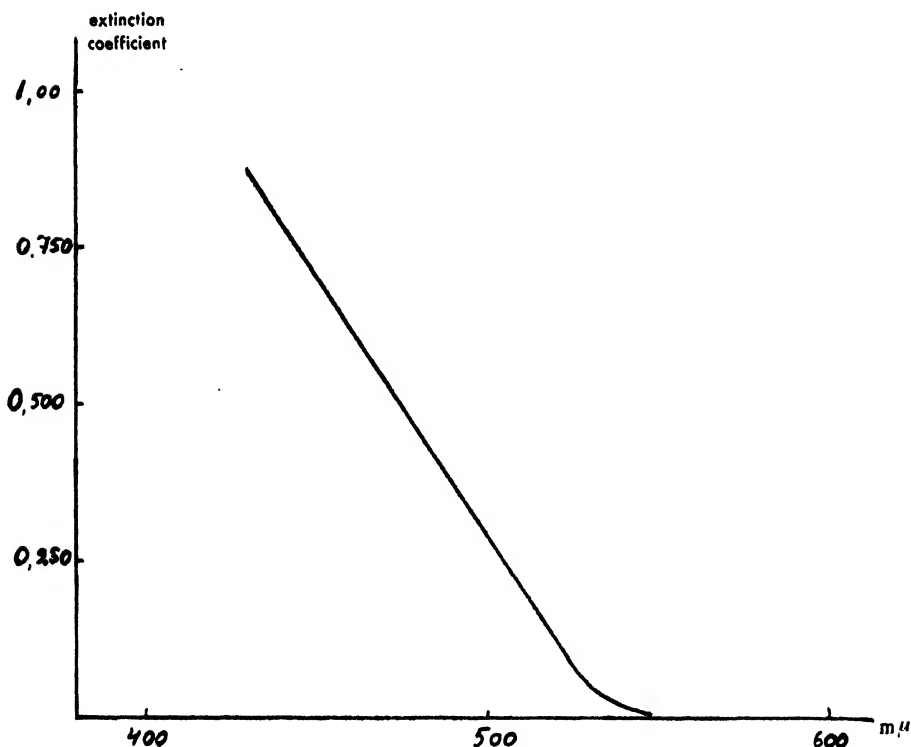


Figure 1.

Absorption curve for the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of progesterone in chloroformic solution. About 1 mg progesterone taken. The derivative obtained is dissolved in 100 ml of chloroform.

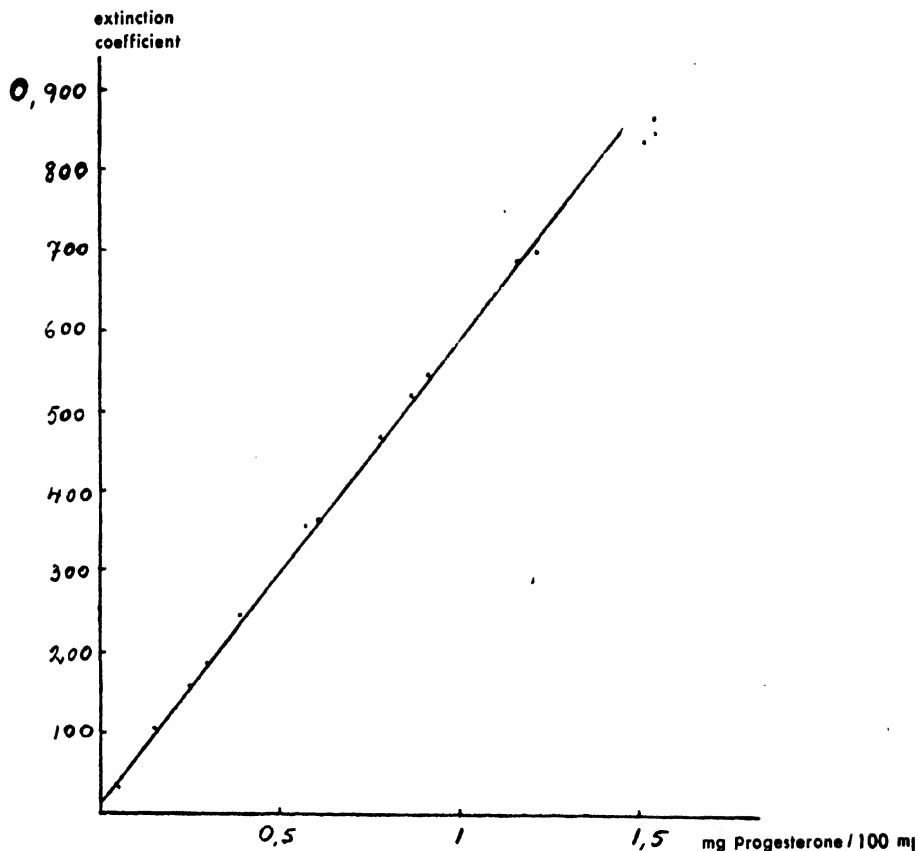


Figure 2.
Standard curve of progesterone.

fallet, och då vid förberedande försök tvättningarna föreföllo vara värdefulla vid analys av progesteron i olivolja eller etyloleat, utfördes alltid dessa tvättningar vid de fortsatta undersökningarna.

Smältpunkterna för erhållna fenylhydrazonfällningar har av *Klein m. fl.* (2) angivits ligga mellan 270° — 280° . I föreliggande undersökning ha även några smältpunktsbestämningar utförts, varvid använts progesteronmängder på c:a 1 mg dels i substans dels i oljelösning. Vid utfällningen har förfarits på samma sätt, som vid den kvantitativa bestämningen, dock har, då det här ej gällde något kvantitativt utbyte, tillsatsen av 2-N HCl och avdunstning av spriten uteslutits. De erhållna smältpunkterna ha vid de utförda bestämningarna legat mellan 270° — 280° (Koflers mikrosmltpunksapparat).

Table 1.
Data for the standard curve of progesterone.

progesterone taken mg/100 ml	extinction coefficient k
0,0505	0,038
0,152	0,108
0,253	0,159
0,303	0,187
0,386	0,249
0,574	0,359
0,606	0,362
0,772	0,470
0,772	0,471
0,772	0,471
0,861	0,510
0,909	0,547
1,16	0,688
1,21	0,697
1,51	0,833
1,54	0,845
1,54	0,863

Table 2.
Determination of progesterone without oil according to the method for
progesterone in oil.

progesterone added mg	extinction coefficient k	progesterone found mg	percentage found of added
0,386	0,249	0,40	103
0,574	0,344	0,57	100
0,772	0,461	0,77	100
1,16	0,650	1,10	95
1,54	0,848	about 1,54	about 100
0,772	0,495	0,83	106

Table 3.
Determination of progesterone in sesame oil.

progesterone added	sesame oil added	extinction coefficient	progesterone found	percentage, found of added
mg	g	k	mg	
*0,86	0,05	0,500	0,84	98
*0,77	0,06	0,437	0,73	95
0,77	0,11	0,434	0,73	95
0,77	0,13	0,452	0,76	99
*0,86	0,13	0,536	0,91	106
*0,77	0,15	0,454	0,76	99
0,77	0,24	0,440	0,73	95
0,77	0,24	0,418	0,70	91
*0,77	0,29	0,462	0,77	100
0,77	0,42	0,456	0,77	100
0,77	0,44	0,433	0,73	95
0,77	0,44	0,459	0,77	100
0,77	0,44	0,483	0,81	105
*0,77	0,58	0,480	0,81	105
0,91	0,96	0,550	0,93	102
0,91	0,99	0,546	0,92	101

Table 4.
Determination of progesterone in arachis oil.

progesterone added	arachis oil added	extinction coefficient	progesterone found	percentage, found of added
mg	g	k	mg	
*0,86	0,09	0,497	0,83	97
*0,86	0,16	0,495	0,83	97
*0,86	0,16	0,498	0,84	98
*0,86	0,35	0,483	0,81	94
*0,86	0,39	0,480	0,81	94
*0,86	0,69	0,490	0,82	95
*0,86	0,73	0,517	0,87	101

* The precipitates have not been washed with hexane.

Table 5.

Determination of progesterone in commercial preparations with arachis oil.

preparation number	progesterone labelled mg/ml	oil solution taken g	extinction coefficient k	progesterone found mg/ml	percentage, found of labelled
I	2	0,3522	0,419	1,82	91
	2	0,4406	0,522	1,84	92
	2	0,4198	0,512	1,87	93
II	10	0,1035	0,586	8,8	88
	10	0,0849	0,487	8,8	88
III	25	0,0393	0,558	21,9	88
	25	0,0394	0,570	22,3	89
IV	2	0,4112	0,477	1,78	89
	2	0,4435	0,531	1,86	93
V	5	0,1783	0,532	4,6	92
	5	0,1477	0,418	4,3	86

Table 6.

Determination of progesterone in commercial preparations with sesame oil.

preparation number	progesterone labelled mg/ml	oil solution taken g	extinction coefficient k	progesterone found mg/ml	percentage, found of labelled
VI	5	0,1843	0,563	4,7	94
	5	0,1818	0,548	4,7	94
VII	1	0,8983	0,631	1,09	109
	1	0,9135	0,672	1,15	115
VIII	2	0,3910	0,509	2,02	101
	2	0,5212	0,666	1,99	100
IX	5	0,1600	0,519	5,0	100
	5	0,2316	0,691	4,6	92
X	2	0,3472	0,487	2,14	107
	2	0,4575	0,575	1,95	98
XI	5	0,2244	0,615	4,3	86
	5	0,2668	0,738	4,3	86

Table 7.

Determination of progesterone in commercial preparations with ethyl oleate.

preparation number	progesterone labelled mg/ml	solution taken g	extinction coefficient k	progesterone found ng/ml	percentage found of labelled
XII	10	0,1046	0,648	9,1	91
	10	0,0897	0,599	9,8	98
XIII	5	0,1878	0,595	4,6	92
	5	0,2089	0,672	4,7	94
XIV	2	0,3074	0,456	2,15	108
	2	0,4328	0,620	2,11	106
XV	1	0,4502	0,369	1,18	118
	1	0,4275	0,343	1,16	116

Litteratur:

1. Elvidge, W. F., *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 19, 260 (1946).
2. Klein, D., Weiner, N. och Gordon, M., *Anal. Chem.* 20, 174 (1948).

Vid fortsatta försök har visat sig, att den beskrivna metoden med små förändringar, även är användbar för kvantitativ bestämning av östron och testosteron. Resultat erhållna härvid komma att senare redovisas.

Photometric determination of progesterone with 2,4-dinitrophenylhydrazine.*Summary.*

A quantitative method for the determination of progesterone in amounts of about 1 mg has been worked out. The method is based upon the fact that with 2,4-dinitrophenylhydrazine progesterone yields a red hydrazone soluble in chloroform. The colour of this solution is measured in a photometer.

Method for the determination of progesterone.

Dissolve 0,25—1,25 mg of progesterone in 5 ml of alcohol (96 % v/v) in a 50 ml beaker. Add 3,0 ml of a freshly prepared 0,25 % solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine in 2 M hydrochloric acid. Place the beaker covered with a watch glass on a boiling water bath for 15 minutes. Remove the watch glass, add 10 ml of 2 M hydrochloric acid, and evaporate the alcohol for 30 minutes. Transfer the precipitate quantitatively to a glass filter (Pyrex M), and wash with 2 M hydrochloric acid and then with three portions of water. Dry the precipitate in a desiccator. Dissolve it in chloroform by suction and make up to 100 ml with chloroform. Read the extinction in a photometer at 440 m μ .

This method has been used for the determination of progesterone in oil. The separation has been performed according to the following method in principle given by *Klein et al.* (2).

Method for the determination of progesterone in oil.

Weigh a solution of progesterone in oil containing 0,5—1,2 mg of progesterone into a weighing bottle. Transfer the solution to a separator with the aid of 10 ml of hexane (b. p. 60°—80°). Extract with four 5 ml portions of alcohol (90 % v/v). Collect the alcoholic layers in a second separator containing 20 ml of hexane and shake. Filter the alcoholic layer into a 50 ml beaker. Repeat the extraction in the second separator twice with 5 ml of alcohol (90 % v/v) and wash the filter with alcohol. Evaporate the filtrate to dryness on a boiling water bath. Dissolve the residue in 5 ml of alcohol (96 % v/v) and proceed according to the method for the determination of progesterone. In this case, the precipitate after having been washed with water is also washed with six 1 ml portions of hexane.

Results obtained are given in tables 1—7 and figures 1—2.

Progesteronlösning till injektion.

Av Elna Diding och Nils Åke Diding.

Från Apotekens kompositionslaboratorium

(Inserted in *Collectanea Pharmaceutica Suecica* IV, 1949)

Progesteronlösning till injektion beredes enligt Svenska farmakopén genom upplösning av substansen i steril olivolja, varefter lösningen avfylls på ampuller. Denna beredningsmetod för injektabilier, vilken förutsätter aseptiskt arbete, föreskrives i farmakopén i regel i sådana fall, då ingående verk samma substanser utgöras av termolabila ämnen, som vid en sterilisering genom värmebehandling kunna undergå sönderdelning eller inaktiveras. Dylik aseptisk beredning av injektionslösningar utan efterföljande värmebehandling måste ur bakteriologisk synpunkt generellt betraktas som mindre tillfredsställande och bör endast komma till användning i de fall, då sterilisering genom värmebehandling på grund av läkemedlets egenskaper är utesluten. I den mån aseptiskt framställda injektionslösningar äro ävsedda att lagerhållas på apotek, måste de även underkastas sterilitetsprövning.

Litteraturuppgifter beträffande progesteronets hållbarhet i oljelösning och

dylika lösningars resistens mot värmebehandling äro sparsamma. Av tillgängliga uppgifter, bl. a. över progesteronets framställning, synas emellertid vissa antaganden beträffande substansens stabilitet kunna dragas. Numera framställes progesteron i ren form huvudsakligen syntetiskt ur t. ex. kolesterolin, sapogener, gallsyror eller pregnanderivat från urinextrakt, och i vissa faser vid dessa synteser ingå oxidationsreaktioner vid relativt höga temperaturer (1). I en översikt av Kober (2) angives att progesteronets stabilitet synes vara stor framförallt gentemot inflytande av högre temperaturer, och att substansen t. ex. kan upphettas till smältpunkten utan att sönderdelas. Dessa förhållanden tyda på att progesteron är ett ganska stabilt ämne även vid förhöjd temperatur. Beträffande hållbarheten för progesteronberedningar angiver Stephens (3), att progesteron är en stabil substans och att det i den form, i vilket det tillhandahålles för kliniskt bruk, ej minskar i aktivitet efter förvaring under mer än två år. Att progesteron i olja torde tåla sterilisering vid den temperatur, som vanligen användes för oljelösningar, framgår även av brittiska farmakopéns (1948) beredningsföreskrift för *Injunctio progesteroni*, som framställes genom upplösning av substansen i olja och efterföljande värmebehandling vid 150° under 1 timme.

Experimentellt.

Med utgångspunkt från föregående ha vi ansett det motiverat att närmare undersöka möjligheten att vid beredning av progesteronlösning till injektion använda en sådan steriliseringsmetod, som i svenska farmakopén vanligen föreskrives för lösningar innehållande termostabila läkemedel, d. v. s. i detta fall upphettning vid 140°—150° under 3 timmar. Problemet har således gällt att undersöka, huruvida progesteron vid dylik sterilisering i oljelösning undergår sönderdelning eller bibehåller sin aktivitet oförändrad.

Bestämning av progesteron i ett preparat kan utföras dels genom biologisk prövning av verkningsvärdet, varvid den erhållna effekten jämföres med den, som erhålles med ett standardpreparat, dels genom kemisk värdebestämning. Enligt svenska farmakopéns föreskrifter skall progesteronets verkningsvärde i beredningar bestämmas på biologisk väg, varvid effekten på infantil kaninuterus registreras och jämföres med den, som erhålles med ett känt standardpreparat. En kemisk bestämningsmetod för progesteron i oljelösning har angivits av Diding (4). I föreliggande arbete har såväl biologisk prövning enligt svenska farmakopén som kemisk bestämning enligt Diding gjorts. Undersökningen har utförts på följande sätt. En 0,5 % progesteronlösning bereddes genom upplösning av progesteron i jordnötolja utan uppvärmning. Den erhållna lösningen dispenserades på injektionsflaskor à 10 ml. Lösningarna behandlades därefter på ettdera av följande sätt:

1. Ingen värmebehandling (enl. Ph. Sv. Ed. XI).
2. Upphettning i varmluft 140°—150° under 3 timmar
3. » » » 140°—150° » 12 »
4. » » » 170°—180° » 1 timme

På de lösningar, som framställts enligt 1 och 2, utfördes biologisk prövning av progesteroneffekten enligt svenska farmakopén, varvid lösning 1 betrak-

lades som standardpreparat. Efter östronbehandling erhöll varje kanin en dos av prov respektive standard motsvarande 0,25 mg progesteron per injektion. Vid dessa prövningar erhöles i samtliga fall den efter progesteronbehandling karakteristiska förändringar i livmoderhornen med fullt utvecklade sekretionsfas. Någon kvantitativ skillnad i effekt efter behandling med lösning 1 och 2 kunde icke i något fall iakttagas vid den histologiska undersökningen. Resultaten av de kemiska bestämningarna av progesteron i lösningarna 1-4 återfinnas i nedanstående tabell. Som framgår av denna har icke någon sönderdelning av progesteronet i de på olika sätt värmebehandlade lösningarna kunnat påvisas med den använda metoden.

Solution number	progesterone, added mg/ml	progesterone, found mg/ml
1	5,28	5,2 5,5
2	5,28	5,3 5,2 5,5
3	5,28	5,1 5,3
4	5,28	5,3 5,6

Genom de erhållna resultaten från såväl de biologiska som kemiska prövningarna har framgått, att svenska farmakopéns steriliseringsmetod I 3 b (upphetning i varmluft vid 140°-150° under 3 timmar) väl torde lämpa sig som steriliseringsmetod för oljelösning av progesteron. Av denna anledning föreslås följande beredningsföreskrift för Injectabile progesteroni, 0,5 %.

Progesteronum	0,5 g
Oleum arachidis	q. s.

	100 ml

Progesteronet löses i jordnötoljan och lösningen avfyller på för utlämnandet avsedda kärl, vilka därefter steriliseras enligt svenska farmakopéns förfaringssätt I. 3 b. Eg. v. 0,92.

Anm.: Svenska farmakopen upptager endast olivolja som oljevehikel för injektionslösningar. Enligt en undersökning av Sandell (5) synes jordnötolja ur oxidationssynpunkt i allmänhet vara ett lämpligare vehikel, och den har därför föreslagits i ovanstående beredning.

Till laboratorn vid Statens bakteriologiska laboratorium, med. dr. Gunnar Norlin vilja vi framföra ett varmt tack för de värdefulla råd och den hjälp, som lämnats oss vid utförandet av de biologiska prövningarna.

Litteratur.

1. *Pincus, G. och Thimann, K.*: The Hormones, Chemistry, Physiology and Applications. Vol I (1948).
2. *Kober, S.*: Die Hormone, bzw. Hormonverwandten mit Lipoidcharakter. Ingår i »Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden» Abt. V, T. 3 B/2, herausg. v. E. Abderhalden (1938).
3. *Stephens, G. A.*: Hormones and Vitamins (1947).
4. *Diding, E.*: Svensk Farm. Tidskr., 53, 269 (1949).
5. *Sandell, E.*: Farm. Revy. 47, 17 (1948).

Summary.

The Swedish Pharmacopoeia specifies that *Injectio Progesteroni* should be prepared in an aseptic way by dissolving progesterone in previously sterilized olive oil. From a bacteriological point of view the aseptic method is not very satisfactory. The sterilization of a 0,5 % solution of progesterone in arachis oil by heating at 140°- 150° for three hours has therefore been investigated. The progesterone effect of the heated solution has been compared with that of a standard solution that was not heated in the biological way prescribed in the Swedish Pharmacopoeia. No difference in effect was found. The progesterone content of the two solutions has also been chemically determined. Such chemical determinations were also performed on two further solutions of progesterone, one heated at 140°—150° for 12 hours, and the other at 170°-180° for one hour. No difference in progesterone content was found in the various solutions. Consequently it is proposed that the injection be prepared by dissolving progesterone in arachis oil and then heating at 140°—150° for three hours.

Penicillinberedningars hållbarhet

Av *Nils Åke Diding* och *Carl Olof Rosén*

Apotekens kompositionslaboratorium

(Inserted in Col. Pharm. Succ. IV, 1949)

Resultatet av de senaste årens snabba utveckling på penicillinforskningens område har bl.a. medfört, att penicillinets användning icke enbart är begränsad till den parenterala terapiformen. Numera ingår penicillin som verksamt beståndsdel i ett flertal olika farmaceutiska beredningsformer, såsom salvor, tabletter, pastiller, slem, vaginalsuppositorier m.fl. Dylika beredningar finnas intagna i såväl engelska som amerikanska farmakopéerna. Beträffande deras medicinska värde är det numera klarlagt, att de i många fall äro lämpliga och berättigade (1, 2, 3).

Vid bedömning av de olika penicillinberedningarnas lämplighet måste stor vikt fästas vid deras hållbarhet. Penicillin är känsligt för påverkan av flera olika faktorer och sönderdelas därvid snabbt. Bristande kännedom om vilka dessa faktorer voro, medförde till en början stora svårigheter att erhålla stabila preparat. Sedan kännedomen ökat om vilka föroreningar, som skadligt påverka penicillin, och allteftersom framställningsmetoderna förbättrats, har förvaringstiden för de i handeln förekommande penicillinsorterna avsevärt kunnat ökas. Under senare år har kristalliniskt penicillin av mycket hög renhet funnits tillgängligt. Stabiliteten av dylikt synes vara mycket god. Således uppges kristalliniskt benzylpenicillinnatrium, förvarat i torrt tillstånd, icke visa någon märkbar nedgång i styrka efter ett år (16), och enligt officiella amerikanska föreskrifter får kristalliniskt penicillin efter förvaring vid 100° under 4 dygn högst visa 10 % nedgång i styrka (4). Fortfarande är dock renheten hos de olika saluförda penicillinsubstanserna rätt varierande, vilket torde förklara de skiftande uppgifter om penicillinets hållbarhet, som föreligga i litteraturen.

Vid framställning av farmaceutiska beredningar, innehållande penicillin, är det nödvändigt, att till varje beredningsform välja sådana konstituentia, som ge de inaktiverande faktorerna den minsta möjligheten att göra sig gällande. Dessutom måste förvaring ske i lämplig miljö. Många undersökningar ha utförts, främst i de anglosachsiska länderna, för att utröna värdet av olika kompositioner under olika förhållanden. I det följande skall lämnas en kortfattad översikt, grundad på i litteraturen tillgängliga uppgifter, om penicillinets och olika penicillinberedningars hållbarhet samt om faktorer, som påverka denna.

Penicillinets stabilitet är starkt beroende av fuktighetshalten. I närvaro av större mängd fuktighet sker en snabb nedbrytning och inaktivering. I officiella amerikanska bestämmelser (4) tillåtes en maximal fuktighetshalt av 2,5 % i amorft penicillin och 1,5 % i kristalliniskt. Vid bestämning av penicillinets hygroskopicitet har det visat sig, att benägenheten att upptaga fuktighet är starkt varierande hos olika penicillinpreparat (5). Framför allt voro de amorfa formerna av natriumpenicillin starkt hygroskopiska och som följd av vattenupptagandet ägde en snabb inaktivering rum. Ju renare substanserna äro, desto mindre tycks benägenheten vara att taga upp fuktighet, och kristalliniskt natriumpenicillin G visade sig väsentligt mindre hygroskopiskt än de amorfa sorterna. Vid framställning av vattenfria farmaceutiska beredningar rekommenderades användning av kalciumpenicillin eller kristalliniskt natriumpenicillin G.

Hållbarheten av penicillin, löst i vatten, synes vara starkt beroende av lösningens pH. Penicillinets sönderfall i vattenlösning är en hydrolytisk spjälkning av β -laktamringen, varvid bildas överksam penicilloinsyra och i sur lösning penicillinsyra (2, 11). Maximal stabilitet erhålles vid pH 6—6,5 (6). Hållbarheten av penicillin, löst i destillerat vatten, anges olika av olika författare, men i allmänhet rör det sig om några dagar vid rumstemperatur och en något längre tid vid förvaring i kylskåp (2, 6, 7, 8, 16). I vissa fall har hållbarheten visat sig bättre, när amorfa penicillinsorter använts (8). Detta torde kunna förklaras genom närvaron av buffrande föreningar.

För att öka hållbarheten av vattenlösningar av penicillin har undersökts möjligheten att tillsätta buffrande substanser i sådant förhållande att för penicillinet optimalt pH erhålles (2, 5, 6, 7, 8, 16). Därvid förlänges nedbrytningstiden såväl vid förvaring i rumstemperatur som vid lägre temperatur.

Små mängder av tunga metaller, såsom bly, järn, koppar och zink, ha visat sig påskynda penicillinets sönderfall i icke buffrade lösningar (9). Sälunda visade en lösning, innehållande 2 500 I. E. penicillin och 0,2 γ koppar per ml en sänkning av penicillinhalten med 32 % efter 6 dagar, medan en kontrolllösning utan koppar under samma tid visade en sänkning av halten med 16 %. Metallernas inverkan synes vara av katalytisk art. Om lösningar, innehållande små mängder av tung metall, samtidigt utsätts för inverkan av luftens syre eller andra oxiderande ämnen, ökas sönderfallshastigheten ytterligare (9). Organiska peroxider ha samma verkan. Av denna anledning måste oljor, vax m.m., som ingå i penicillinberedningar vara peroxidfria.

Såsom redan delvis framgått av ovanstående spelar förvaringstemperaturen en stor roll. Låg temperatur fördröjer sönderdelningen av penicillinet.

Vissa bakterier producera enzymer, penicillinaser, som snabbt inaktivera penicillin. Av denna anledning är det av betydelse att de här avsedda farmaceutiska beredningarna framställas aseptiskt och förvaras i sterila kärl.

Då de största erfarenheterna rörande olika penicillinberedningars hållbarhet torde finnas samlade i Amerika, synes en kort redogörelse för officiella amerikanska föreskrifter angående några olika penicillinpreparat kunna vara av intresse (4).

1. *Penicillin i olja och vax*

Beredningen utgöres av en suspension av calciumpenicillin eller kristalliniskt penicillin i renad jordnötolja eller sesamolja, i vilken vitt vax är dispergerat. Om beredningen är flytande, skall minst 50 % av det använda penicillinet utgöras av partiklar med en storlek av minst 50 μ . Styrkan av preparatet skall vara 100 000, 200 000 eller 300 000 I. E. per ml. Innehållet av vitt vax i oljan skall vara 3 %, om preparatets styrka är högst 200 000 I. E. per ml, och 4,7—4,9 %, om styrkan är 300 000 I. E. per ml. Fuktighetshalten får utgöra högst 1 %. Preparatet skall vara sterilt. Jordnötoljan, sesamoljan och det vita vaxet skall fylla amerikanska farmakopéns (U. S. P. XIII) fordringar. Preparatet skall förvaras i steril, sluten behållare om högst 20 ml. Hållbarhetstid: om kristalliniskt penicillin använts 18 månader, eljest 12 månader.

2. *Penicillinsalva*

Denna skall beredas av calciumpenicillin eller kristalliniskt penicillin i en salvbasa av ullfett eller vaselin eller en blandning av dessa. Dessutom finnas vissa andra tillsatser, såsom vitt vax, gult vax, jordnötolja etc. angivna. Fuktighetshalten får vara högst 1 %. Styrkan skall vara minst 250 I. E. per gram. Salvan får innehålla högst 50 mikroorganismer per gram. Renad jordnötolja skall användas, och varje annan komponent i salvan skall fylla fordringarna i U. S. P. XIII. Hållbarhetstid: 9 månader vid förvaring under 15°.

3. *Buffrade penicilintabletter*

Dessa skola beredas av natrium-, kalcium-, kalium- eller prokainpenicillin med tillsats av en eller flera buffrande substanser, t.ex. natriumcitrat, natriumbensoat, citronsyra, aluminiumhydroxid, kalciumkarbonat, magnesiumoxid m.fl. i mängd, som kan utöva buffrande verkan. Styrkan skall vara minst 50 000 I. E. per tablett. Fuktighetshalten får vara högst 1 %. Varje substans, som användes, skall uppfylla fordringarna i U. S. P. XIII eller National Formulary (N. F.). Hållbarhetstid: om kristalliniskt natrium- eller kaliumpenicillin använts 18 månader, eljest 12 månader.

4. *Penicillinsugtabletter*

Dessa skola beredas av natrium-, kalcium-, kalium- eller prokainpenicillin med tillsats av lämpliga indifferentia. Styrkan av varje sugtablett får ej vara mindre än 500 I. E. Fuktighetshalten får vara högst 1 %. Varje substans, som ingår i sugtablettarna, skall uppfylla fordringarna i U. S. P. XIII eller N. F. Tablettarna skola förvaras vid högst 15°. Hållbarhetstid: 9 månader.

5. *Penicillin-sulfonamid pulver*

Detta pulver skall vara sammansatt av calciumpenicillin och sulfonamid eller sulfonazol. Det skall vara sterilt. Fuktighetshalten får vara högst 1 %. Mängden av sulfonamid eller sulfonazol skall ej överstiga 0,0125 g per 100 I. E. penicillin. Hållbarhetstid: 9 månader.

EGNA UNDERSÖKNINGAR.

Avsikten med föreliggande arbete har varit att studera hållbarheten av ett antal penicillinberedningar, framställda utan andra hjälpmedel än sådana, som finnas på varje svenskt apotek och under förhållanden, som råda där. Till samtliga prövade beredningar har använts kristalliniskt benzylpenicillin-natrium (ca 1 500 I. E. per mg). Övriga ingående substanser ha utgjorts av varor, provhaltiga enligt svenska farmakopén. Härigenom ha författarna hop-pats kunna draga vissa slutsatser beträffande apotekens möjligheter att fram-ställa hållbara penicillinberedningar.

Temperaturens inverkan har undersökts genom förvaring dels vid rums-temperatur, dels i kylskåp. Utensilier och i lämplig grad även konstituentia ha steriliserats enligt svenska farmakopéns föreskrifter. Allt arbete har skett aseptiskt.

Aktiviteten har bestämts mikrobiologiskt enligt den metod, som angivits av *Diding-Söderlundh* (12).

1. Vattenlösningar

a) Som spädningsvätska för penicillinlösningar till injektion torde i de flesta fall användas fysiologisk koksaltlösning. Med hänsyn till vad tidigare angivits beträffande en accelererande inverkan på penicillinets inaktivering av små mängder tunga metaller har det enligt vår uppfattning varit av intresse att närmare undersöka inverkan av sådana mängder tunga metaller, som kunna maximalt förekomma i fysiologisk koksaltlösning, beredd av natriumklorid, provhaltig enligt Ed. XI. Då hållbarheten av buffrade penicillinlösningar, innehållande små mängder tunga metaller, synes vara bättre än av obuffrade, ha även de förra prövats. Följande buffrade koksaltlösning med pH 6,5 har därvid använts som lösningsmedel:

Sek. natriumfosfat	0,50 g
Primärt natriumfosfat	1,00 g
Natriumklorid	7 g
Aq. sterilisata	ad 1 000 ml

Lösningen har steriliserats genom autoklivering. En liter av denna lösning kan maximalt innehålla ungefär följande mängder tunga metaller (Cu), om de använda salterna äro provhaltiga enligt Ed. XI (10).

Från Natr. chloridum	140 γ
„ Natr. phosph. monobasic.	50 γ
„ Natr. phosph. dibasic.	20 γ
<hr/>	
Totalt	210 γ

Som jämförelse kan nämnas att motsvarande lösning, beredd med substanser, provhaltiga enligt U. S. P. XIII, maximalt skulle kunna innehålla:

Från Natr. chloridum	35 γ
„ Natr. phosph. monobasic.	20 γ
„ Natr. phosph. dibasic.	5 γ
<hr/>	
Totalt	60 γ

Följande penicillinlösningar, samtliga av styrkan 10 000 I. E. per ml, undersöktes. Som lösningsmedel användes sterilt, glasdestillerat vatten, och de tillsatta salterna utgjordes av rena analysvaror:

Lösning: *Penicillin löst i:*

- I Aqua destillata
- II Aqua destillata + 50 γ metall per liter (Pb och Cu)
- III Aqua destillata + 200 γ metall per liter
- IV Sol. natr. chlor. physiol.
- V Sol. natr. chlor. physiol. + 50 γ metall per liter
- VI Sol. natr. chlor. physiol. + 200 γ metall per liter
- VII Buffrad koksaltlösning
- VIII Buffrad koksaltlösning + 50 γ metall per liter
- IX Buffrad koksaltlösning + 200 γ metall per liter

Varje lösning dispenserades på två flaskor, av vilka en förvarades vid rumstemperatur och en i kylskåp.

Resultaten av styrkeprovningarna framgå av tabell 1, varvid penicillinstyrkan angivits i procent av begynnelsehalten.

Tabell 1

Lösning	Temp.	Antal dagar						
		1	3	5	7	12	18	35
I	4°	96	92		89	91	94	81
I	20°	98		65				
II	4°	96	98		93	94	89	66
II	20°	100		< 50				
III	4°	95	95		90	94	81	56
III	20°	92		< 50				
IV	4°	104	105		95	90	91	67
IV	20°	90		70				
V	4°	100	97		87	93	91	57
V	20°	95		< 50				
VI	4°	98	100		94	90	—	56
VI	20°	89		< 50				
VII	4°	100	94		94	97	97	95
VII	20°	102		100	92			0
VIII	4°	98	96		91	94	98	98
VIII	20°	100		100				0
IX	4°	96	99		92	92	96	90
IX	20°	103		101				0

SAMMANFATTNING:

Av tabellen framgår, att förvaringstemperaturen i samtliga fall visat sig ha en mycket stor betydelse. Vidare framgår tydligt den ökade hållbarheten i de buffrade lösningarna. I dessa, förvarade i kylskåp, är nedgången relativt obetydlig efter 35 dagar. Förvarade vid 20° visa de full aktivitet efter 5 dagar, medan däremot efter 35 dagar ej påvisbar mängd penicillin finnes kvar. I de buffrade lösningarna, i motsats till de övriga, kan ej heller någon inverkan av de tillsatta metallerna iakttagas.

b) De ovan undersökta lösningarna voro relativt högpotenta. Som ögon-droppar användes en svagare beredning, där styrkan är 500 I. E. per ml. En sådan lösning undersöktes även, varvid kristalliniskt benzylpenicillinnatrium löstes i Sol. natr. chloridi physiologica. Lösningen förvarades i sterila ögon-droppsfaskor à 10 ml, dels i kylskåp, dels vid rumstemperatur. Undersök-ningarna gåvo följande resultat (penicillinets styrka är angiven i procent av den ursprungliga halten) :

Tabell 2

Temp.	Antal dagar		
	1	4	7
4°	99	94	85
20°	99	91	75

Samtidigt utfördes försök med kristalliniskt benzylpenicillinnatrium, löst i buffrad koksaltlösning med tidigare omtalad sammansättning. Lösningens styrka var även här 500 I. E. per ml, och den förvarades i sterila ögon-droppsfaskor à 10 ml (tabell 3).

Tabell 3

Temp.	Antal dagar	
	10	22
4°	95	88

Förvarad i rumstemperatur visade en likadan lösning efter 25 dagar mindre än hälften av den ursprungliga mängden penicillin.

SAMMANFATTNING:

Penicillinlösning (500 I. E. per ml) beredd av kristalliniskt penicillin och med buffrad koksaltlösning som lösningsmedel har vid förvaring i kylskåp sjunkit med ca 10 % efter 20 dagar. För motsvarande icke buffrade lösning sjönk halten under samma betingelser på 7 dagar ungefär 15 %. Ur hållbar-hetssynpunkt torde det därför vara lämpligt att som lösningsmedel för penicil-linlösningar använda buffrad koksaltlösning.

2. Slem

I litteraturen finnas angivna flera olika kompositioner. Enligt engelska uppgifter (1) minskades halten i dylika beredningar 20 % under tre veckor i kylskåp, medan andra uppgifter tyda på en nedgång till 85 % efter 8 dagar (2).

Här har prövats ett slem med följande sammansättning:

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt)	100 000	I. E.
Cellugel super	2,5	g
Klorkresol	0,1	g
Aq. sterilisata	ad	100 g

Cellugel super löses i vattnet genom autoklavering vid 120° i 20 min. Till det erhållna, avsvalnade slemmet sättes sedan aseptiskt klorkresol och penicillin. Styrka: 1 000 I. E. per gram. Beredningen förvarades i glasproppburkar å 10 g, dels i kylskåp, dels vid rumstemperatur. Följande resultat erhöles (penicillinets styrka är angiven i % av den ursprungliga halten):

Tabell 4

Temp.	Antal dagar						
	1	5	8	11	15	18	37
4°	107	101		87	93	86	67
20°	107	83	73		<50		

Därjämte gjordes ett slem, där Cellugel super löstes i den tidigare angivna buffrade koksaltlösningen. Denna beredning visade sig emellertid ha en mycket tunnflytande konsistens, varför kompositionen ansågs olämplig och inga hållbarhetsprov utfördes.

SAMMANFATTNING:

Det prövade penicillinslemmet visade efter cirka 10 dagars förvaring i kylskåp en nedgång i styrka på ungefär 15 %.

3. Salvor

Penicillinsalvor kunna indelas i två beträffande hållbarheten väsentligt skilda grupper, nämligen vattenhaltiga och vattenfria salvor. De vattenfria salvorna äro betydligt stabilare, förutsatt att det ingående penicillinet icke är hygroskopiskt och övriga substanser äro peroxidfria (1, 2, 5, 17). Kliniska erfarenheter tyda emellertid på att den terapeutiska effekten är märkbart bättre i vattenhaltiga salvor (2, 13).

Av vattenhaltiga salvor har dels prövats sådana av emulsionstypen vatten i olja, dels av typen olja i vatten. Någon nämnvärd skillnad i hållbarhet mellan dessa två synes icke föreligga (2).

a) Hållbarheten hos följande vattenhaltiga salva har prövats:

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt)	100 000	I. E.
Unguentum molle	75	g
Aq. sterilisata	25	g

Penicillinet löstes i det sterila vattnet, och lösningen inarbetades aseptiskt i den steriliserade mjuka salvbasen. Styrka: 1 000 I. E. per gram. Salvan förvarades i salvburkar à 10 g, dels i kylskåp, dels vid rumstemperatur. Följande resultat erhöles (penicillinets styrka är angiven i procent av den ursprungliga halten):

Tabell 5

Temp.	Antal dagar						
	1	6	10	11	17	32	42
4°	98	101		100	78	72	65
20°	98	92	78				

I en annan beredning användes i stället för aqua sterilisata en steril buffrad koksaltlösning med den sammansättning, som tidigare angivits:

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt) 100 000 I. E.
 Unguentum molle 75 g
 Buffrad koksaltlösning (steril) 25 g

Denna salva bereddades på motsvarande sätt som föregående och förvarades i kylskåp i salvburkar à 10 g. Följande resultat erhöles (penicillinets styrka är angiven i % av den ursprungliga halten):

Tabell 6

Temp.	Antal dagar		
	1	25	52
4°	100	82	84

SAMMANFATTNING:

Av resultaten framgå, att den prövade vattenhaltiga, buffrade penicillin-salvan efter 50 dagars förvaring i kylskåp visat en nedgång i penicillinaktivitet på mindre än 20 %.

b) Följande vattenfria salva har prövats:

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt) 100 000 I. E.
 Vaselin 89 g
 Paraffin. liq. 1 g
 Adeps lanae 10 g

Styrka: 1 000 I. E. per g. Salvan förvarades i salvburkar à 10 g, dels i kylskåp, dels vid rumstemperatur. De i kylskåp förvarade burkarna voro paraffinerade för att utestänga luftens fuktighet. Penicillinaktiviteten minskade enligt nedanstående tabell 7 (penicillinets styrka är angiven i % av den ursprungliga halten):

Tabell 7

Temp.	Antal dagar									
	2	7	12	18	29	32	34	37	41	74
4°	106			105		78	80			75
20°	106	99	89	90	62			67	64	

SAMMANFATTNING:

Trots förvaring vid låg temperatur och i skydd för luftens fuktighet sjönk penicillinhalten i den prövade salvan med ca 30 % efter ungefär 2½ månad. För den i rumstemperatur förvarade salvan sjönk halten ännu snabbare. Som förut nämnts, angives i amerikanska föreskrifter en hållbarhetstid av 9 månader på salvor av motsvarande slag (4). De salvbaser, som användes vid den av oss prövade salvan utgjordes av farmakopévaror. Med hänsyn till penicillinets känslighet för peroxider synes det ligga nära till hands att antaga, att den relativt snabba nedgången av penicillinstyrkan kan ha berott på oxidationstillståndet i det använda fettet. Sålunda har visats, att *adeps lanae*, provhålligt enligt svenska farmakopén, kan hålla hög halt av peroxider (14). För att erhålla bättre hållbarhet på vattenfria penicillinsalvor torde krävas speciella fordringar beträffande oxidationstillståndet av ingående fetter.

4. *Penicillinsuspension i olja och vax*

Följande komposition prövades:

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt)	10 000 000 I. E.
Cera alba	3 g
Ol. arachidis	ad 94 g

Vaxet och oljan smältes tillsammans och steriliserades. Penicillinet rördes ut till en homogen massa med en liten del av den ungefär 50° varma oljeblandningen, varefter resten tillsattes efter hand. Beredningen förvarades i glasproppburkar à 10 g, dels i kylskåp, dels vid rumstemperatur. Förslutningarna voro paraffinerade. Resultaten av styrkeprövningarna framgå av tabell 8 (penicillinets styrka är angiven i procent av den ursprungliga halten):

Tabell 8

Temp.	Antal dagar								
	1	6	8	12	29	35	42	50	75
4°	104		111					85	80
20°	104	101		103	70	74	77		

SAMMANFATTNING:

Penicillinsuspension i olja och vax har vid förvaring i kylskåp efter ca två månader visat en nedgång i styrka på ungefär 15—20 %. Motsvarande beredning, förvarad i rumstemperatur, har visat ännu snabbare nedgång. Orsaken till det relativt snabba sönderfallet, som är större, än vad man har anledning att vänta med hänsyn till amerikanska uppgifter, torde liksom vid den vattenfria salvan bero på peroxider i ingående vax och olja.

5. *Penicillin sugtabletter*

Som tidigare omnämnts anges i officiella amerikanska föreskrifter en hållbarhetstid på 9 månader för penicillin sugtabletter, när de förvarats i tätslutande förpackning vid en temperatur under 15°. Beträffande det ingående penicillinet tillåtes användande av amorft penicillin. Av danska undersökningar framgå (15), att hållbarheten av penicillin sugtabletter ökas, om tabletterna beredas med kristalliniskt penicillin. Dessutom synes det vara av stor betydelse, att tabletterna förvaras skyddade för fuktighet och därför föreskrives, att de omedelbart efter framställningen skola fyllas på för utlämnande avsedda kärl, vilkas förslutning skall överdragas med fast paraffin.

I föreliggande undersökning har hållbarhetsprövningen utförts på tabletter av styrkan 500 I. E. per sugtablett. Vid framställningen har använts dels kristalliniskt och dels amorft penicillin (ca 1 150 I. E. per mg). Komposition och beredningssätt har varit följande (efter danska rekommendationer):

Benzylpenicillinnatrium (kristalliniskt)	550 000 I. E.
Sacchar. lactis anhydricum	50 g
Saccharum pulv.	940 g
Acid. stearicum	10 g
Aether	200 ml
Spirit. dilut.	q. s.

Härav bereddes 1 000 tabletter på följande sätt. Rörsockret granulerades med den utspädda spriten, och granulatet torkades under två timmar vid 105°. Penicillinet, utrivet med det vattenfria mjölksockret, blandades med det torra granulatet. Stearinsyran löstes i eter och sprayades över denna blandning. Efter eterns avdunstning slogos omedelbart tabletter à 1 g. Vattenfritt mjölksocker bereddes av pulveriserat mjölksocker genom torkning vid 130° till konstant vikt. Vid tablettslagningen skall granulatet vara fullständigt torrt, och luftfuktigheten i arbetsrummet hållas låg. Tabletterna skola vid framställningen omedelbart uppsamlas i för utlämnande avsedda kärl, vilkas förslutning överdragas med en tunt lager fast paraffin.

Tabletterna ha förvarats i tablettburkar, dels vid rumstemperatur, dels i kylskåp. Förvaringen har skett i burkar med paraffinerade lock. Resultaten framgå av nedanstående tabell 9 (penicillinets styrka är angiven i % av den ursprungliga halten).

Tabell 9

Lösning	Temperatur	Antal dagar			
		1	30	60	120
I	4°	103	100	100	94
I	20°	100	89	83	
II	4°	96	85		82
II	20°	100	79	70	

(I. Penicillinsugtabletter, beredda med kristalliniskt penicillin och II. Penicillinsugtabletter, beredda med amorft penicillin.)

SAMMANFATTNING:

Resultaten visa, att penicillinsugtabletter framställda med kristalliniskt penicillin och förvarade i paraffinerade burkar i kylskåp icke nämnvärt nedgått i styrka efter 4 månader. Motsvarande tabletter framställda med amorft penicillin ha visat en något sämre hållbarhet. För att undersöka paraffinerings betydelse har även ansatts en serie försök med tabletter förvarade på icke paraffinerade burkar. Dessa försök äro ännu icke avslutade, men hittills erhållna resultat tyda på att hållbarheten härvid blir avsevärt mindre.

LITTERATURFÖRTECKNING

1. Penicillin, its properties, uses and preparations (1946). Published by direction of the Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain.
2. *J. Büchi, F. O. Gundersen*, Pharm. Act. Helvetiae, 23, 86 (1948).
3. *B. Bäverstedt*, Sv. Läkartidningen 45, 589, (1948).
4. Title 21 Food and Drugs Chapter 1—Food and Drug Administration par. 141 and 146.
5. *W. A. Woodard*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20, 197, (1947).
6. *S. Molinas, H. Welch*, J. A. P. A., Sc. ed. 36, 41, (1947).
7. *B. Johnson, A. F. Lerrigo*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20, 183, (1947).
8. *R. Denston*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. 19, 322, (1946).
9. *E. L. Smith*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. 19, 309, (1946).
10. *N. Thörn*, Sv. F. T. 50, 569, (1946).
11. *T. Canbäck*, Farm. Revy 45, 249, (1946).
12. *N. Diding, S. Söderlundh*, Farm. Revy 47, 860, (1948).
13. *F. O. Gundersen*, Norsk Farm. Tidskrift 56, 272, (1948).
14. *E. Sandell*, Farm. Revy 47, 17, (1948).
15. *H. Lindholm, J. B. Termansen*, Arch. Pharm. Chem. 105, 389, (1948).
16. *T. Macek, E. Hanus, B. Feller*, J. A. P. A. Sc. ed. 37, 322, (1948).
17. *S. Culter*, J. A. P. A. Sc. ed. 37, 370, (1948).

SUMMARY

The stability of crystalline penicillin in some pharmaceutical preparations has been investigated.

Aqueous penicillin solutions, containing traces of heavy metals (50—200 microgram Pb and Cu per 1 000 cc solution) showed after 35 days a greater loss in activity than solutions prepared without metals (storing temp. 4°). Furthermore the decomposition was considerably retarded in solutions containing 0,01 m phosphate buffer.

A water-containing penicillin ointment buffered with 0,01 m phosphate buffer retained 80 % of its activity after 50 days (storing temp. 4°).

Anhydrous penicillin ointment and penicillin suspension in oil and wax showed 25 % resp. 20 % loss in activity after 75 days (storing temp. 4°). These unsatisfactory results are believed to depend on oxidising agents in the vehicles used.

Troches penicillin showed no significant loss in activity after 120 days (storing temp. 4°).

Adeps lanae i vattenfria penicillinsalvor.

Av N. Å. Diding och E. Sandell

(Inserted in *Collectanea Pharmaceutica Suecica* IV, 1949)

Från Apotekens kompositionslaboratorium och Farmaceutiska institutet, avd. för farmaceutisk teknologi.

Penicillinsalvor av olika slag ha numera stor användning för behandling av infektiösa hud- och ögonsjukdomar, brännskador m. m. De salvor, som därvid rekommenderats, äro med hänsyn till sin sammansättning och hållbarhet av två olika huvudtyper, nämligen vattenhaltiga och vattenfria.

Redan på förhand kan antagas att vattenhaltiga salvor tillåta en snabbare diffusion av penicillinet från salvan, så att med dem högre penicillinkoncentrationer kunna erhållas inom behandlingsområdet. Undersökningar i detta avseende ha hittills framför allt utförts som in vitro-försök, som avse att efterlikna de förhållanden, under vilka preparaten användas. Sålunda framhålla *Clymer och Ferlanto* (1) efter dylika försök, att penicillinet tillgänglighet är avsevärt bättre i salvor av typen olja i vatten än i vattenfria salvor. Samma förhållande ange också *Büchi och Gundersen* (2) efter diffusionsförsök på agarplattor, varvid ingen som helst effekt erhöles med vattenfri salva. *Culter* (3) däremot anger efter användning av samma metodik tydlig diffusion även från olika vattenfria salvor och drager den slutsatsen, att detsamma kan

väntas ske, då sådan salva appliceras på sår eller användes som ögonsalva.

Dylika modellförsök ge givetvis värdefulla upplysningar, men säkra slötsatser om den farmakologiska effekten vid olika användningssätt kunna knappast dragas. Härför erfordras kliniska undersökningar, och sådana synas ej föreligga i samma utsträckning. *Bellows* (4) anger kliniskt goda resultat med vattenfria ögonsalvor, liksom även *Büchi och Gundersen* (2). Vid dermatologisk användning däremot finna *Storck och Gundersen* (6) o/v-salvor överlägsna. *Culler* (3) kan hänvisa till goda erfarenheter med vattenfria salvor.

Engelska farmakopén upptager såväl vattenhaltig som vattenfri penicillinsalva. I officiella amerikanska föreskrifter (5) upptages endast vattenfri penicillinsalva.

Om sålunda resorptionsförhållandena för olika salvtyper ej torde vara helt klarlagda, kan det däremot med bestämdhet sägas, att det i fråga om hållbarheten föreligger en bestämd skillnad mellan de två huvudtyperna av penicillinsalvor. Vattenhaltiga penicillinsalvor äga en i jämförelse med de vattenfria mycket begränsad hållbarhet och utgöra av denna anledning typiska extemporeberedningar. Vattenfria penicillinsalvor uppvisa däremot om de beredas på lämpligt sätt god hållbarhet. Enligt amerikanska föreskrifter (5) får vattenfri penicillinsalva lagerhållas under ett år, om förvaringen sker vid lägre temperatur än 15° och eljest 9 månader. Gällande engelska farmakopé föreskriver för salva av samma typ lagring i skydd för fuktighet och vid låg temperatur, helst ej över 15°, men anger ingen fixerad hållbarhetstid. Den vattenhaltiga *Cremor penicillini* skall däremot beredas för tillfället.

Denna goda hållbarhet av vattenfria salvor uppnås dock ej generellt utan kräver beaktande av åtskilliga faktorer såsom penicillinets kvalitet, fuktighetshalten, förvaringstemperatur samt renheten av ingående konstituentia. *Woodard* (7) framhåller sålunda, att amorft penicillinnatrium har större tendens att upptaga fuktighet än kristalliniskt salt och därför är olämpligt att använda i dessa sammanhang. Ännu bättre stabilitet uppvisar penicillinkalcium. *Culler* (3) visar, att orent penicillinnatrium (400 I.E./mg) hade mycket begränsad hållbarhet även i vattenfria salvbaser, medan ganska god stabilitet uppnåddes med orent penicillinkalcium (500-650 I.E./mg). Minst lika tillfredsställande resultat erhöles emellertid med kristalliniskt penicillinnatrium eller -kalium (c:a 1600 I.E./mg). Sålunda visade en penicillinsalva innehållande 500 I.E. per g av kristalliniskt penicillinnatrium en nedgång av 14 % i styrka efter ett år, medan motsvarande salva innehållande orent penicillinnatrium redan efter 2 veckor nedgått till mindre än hälften av den ursprungliga styrkan. Salvbaser utgjordes i båda fallen av bomullsfröolja (5 %) och vaselin (95 %). Tydligt bättre hållbarhet erhöles ofta, då salvorna förvarades i kylskåp.

Büchi och Gundersen (2) prövade hållbarheten av en vattenfri penicillinsalva innehållande 1000 I.E. per g, där salvbaser utgjordes av 15 % ullfett, 50 % vaselin och 35 % flytande paraffin. Förvarad vid rumstemperatur visade denna salva en snabb nedgång i styrka; efter 10 dagar återstod 85 %, efter 60 endast 40 % av den ursprungliga styrkan. Den snabba nedgången antaga författarna bero på den fuktighet, som salvan på grund av penicillinets hygroskopicitet upptagit under beredningen.

Av särskilt intresse äro de undersökningar av penicillinsalvors hållbarhet, som utförts av *Woodard* i tidigare nämnt arbete (7). Där visas först, att penicillinsalvor av styrkan 25000 I.E./g, beredda med kristalliniskt penicillinnatrium och flytande paraffin—vaselin som bas, ha oförändrad styrka efter 4 månaders lagring vid rumstemperatur. Svagare salvor däremot (650 I.E./g) uppvisa dålig hållbarhet under samma lagringsförhållanden: efter 4 månader erhöles en nedgång i styrkan av omkring 40 %.

Woodard uttalar den förmodan, att i salvan närvarande fuktighet (: 0,1 %) kan orsaka förstöringen av penicillinet, då detta föreligger i låg koncentration i salvan. Härför tala några jämförande försök med salvor innehållande penicillinkalcium i samma koncentration, vilka visa att detta mera fuktighetsresistenta salt utmärkes av god stabilitet i dessa beredningar. Men dessutom framlägges den teorien, att ullfettalkoholer (*Alcoholia Lanae*), vilka tillsatts vaselinet i de svagare salvberedningarna, kunna spela en viss roll. Det visade sig nämligen, att penicillinnatriumsalva beredd med nyhemkommen sådan produkt, var betydligt hållbarare än motsvarande tidigare beredning. *Woodard* framhåller därför att ullfettalkoholerna äro utsatta för oxidation vid längre tids lagring, och att härvid bildade produkter kunna förstöra penicillinet. Det hänvisas till uppgifter av *Smith* (8), att organiska peroxider (i butanol och eter) inaktivera penicillin och att oxiderade oljor böra undvikas vid framställning av penicillinberedningar. Här må dock framhållas, att de nämnda proven av ullfettalkoholer vid undersökning visade praktiskt taget samma peroxidhalt, varför dessa försök knappast utgöra direkt stöd för oxidationsteorien.

Då det vid här tidigare utförda försök (9) visat sig, att hållbarheten av vattenfri penicillinsalva, innehållande 10 % ullfett samt vaselin, var påfallande dålig i jämförelse med uppgifterna i amerikanska föreskrifter, ansågs att ullfettets roll borde närmare prövas. Ungefär samtidigt hade nämligen i annan undersökning (10) framkommit, att i handeln förekommande ullfett ofta är starkt oxiderat.

Kännedomen om ullfettets sammansättning är ännu långt ifrån fullständig. Den oförtvålbara delen utgör omkring 40 % och innehåller främst kolesterol. Bland ingående syror anses vissa oxisyror såsom mest karakteristiska enligt senaste uppgifterna på området, angivna av *Bertram* (11).

Ullfettets känslighet för oxidation synes föga uppmärksammas inom farmacien, utan produkten anses i stället som synnerligen stabil. Ett stort antal kemiska arbeten behandla emellertid oxidationen av kolesterol under inverkan av ljus och luftsyre. En sammanfattning ges av *Bergström* (12) i samband med en omfattande undersökning på området. Oxidationen äger rum vid CH_2 -grupp närmast intill dubbelbindningen under bildning av peroxider samt bl. a. keto- och oxi-kolesterol.

Experimentellt.

I det följande framlägges endast en första undersökningsserie över sambandet mellan penicillinet's hållbarhet och oxidationstillståndet hos ingående ullfett i vattenfri salva.

Olika prov av ullfett insamlades i handeln, och sådana med för undersökningen lämpliga peroxidvärden utvaldes. Vid tidigare kontroll hade samtliga visat sig provhaltiga enligt farmakopéns föreskrift, nu kontrollerades endast att föreskriftens prov på fri syra samt på vattenutdragets permananatförbrukning fortfarande uppfylldes.

De utvalda proven hade följande peroxidhalt, uttryckt såsom förbrukning av N/100 natriumtiosulfat (ml) per g ullfett vid bestämning enligt *Wheeler's* metod.

I	0,71	V	1,22
II	1,14	VI	4,2
III	1,05	VII	7,7
IV	1,24	VIII	8,2

Proven IV och V utgjordes av I, som försatts med 0,01 % propylgallat respektive 0,01 % NDGA (»nordihydrognaiaretic acid»).

Under användande av dessa åtta prov av ullfett framställdes lika många penicillinsalvor av följande sammansättning:

Penicillinnatrium krist. (c:a 1600 I.E./mg)	100000 I.E.
Adeps lanae	10
Vaselin	ad 100 g

Salvorna förvarades i burkar av brunt glas med bakelitlock, vid rumstemperatur och i skydd för ljuset.

Under förvaringen bestämdes salvornas penicillinhalt med vissa mellanrum enligt cylinderplattmetoden i här tidigare utarbetad modifikation (13). För varje bestämning invägdes c:a 1 g salva i separertratt och skakades med 30 ml eter. Penicillinet extraherades med 4×25 ml buffertlösning (pH 6,5), varefter den erhållna lösningen späddes med buffert till önskad koncentration. Resultaten av haltbestämningarna (I.E. per g salva) ha sammanställts i nedanstående tabell.

Salva nr	A n t a l d a g a r			
	7	15	60	105
I	910	840	810	750
II	1040	810	680	740
III	940	790	830	730
IV	1000	960	870	780
V	920	870	790	820
VI	750	610	410	410
VII	900	750	620	430
VIII	970	850	490	420

Det framgår, att de undersökta salvorna ur hållbarhetssynpunkt utgöra två tydligt åtskilda grupper, I—V och VI—VIII. De förra ha beretts av obe-

tydligt oxiderat ullfett, de senare av ganska starkt oxiderat. Nedgången i styrka utgjorde i medeltal 24 % efter 3 ½ mån. lagring av I—V, medan motsvarande värde för gruppen VI—VIII var 58 %. Inom grupperna kunna inga signifikativa skillnader konstateras.

Under lagringen undersöktes även peroxidhalten av de olika salvorna. Denna ökades tydligt i de flesta proven men visade någon nedgång i de med antioxidantia försatta, IV och V. Erhållna värden ge emellertid ingen ytterligare ledning vid bedömning av hållbarhetsresultaten.

Det är sålunda tydligt, att uppmärksamhet bör ägnas ullfettets oxidations-tillstånd vid beredning av vattenfria penicillinsalvor, innehållande denna produkt. Vissa svårigheter torde emellertid ofta föreligga att er hålla ur denna synpunkt invändningsfri vara, eftersom oxidationstendensen i samband med lagring ej är obetydlig. Möjligheterna till konservering av ullfett böra bland annat prövas.

Summary.

In this paper the stability of penicillin ointments containing wool fat and white soft paraffin is studied. It is shown that the oxidation condition of the wool fat is a factor of decisive importance. Ointments containing crystalline sodium penicillin (1000 I.E./g) and 10 % wool fat of low peroxide values lost on an average 24 % of their initial activity in 3 ½ months at room temperature, while ointments containing wool fat of high peroxide values lost 58 % in the same period.

Litteratur.

1. *H. A. Clymer och R. J. Ferlauto*: J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed., 36, 211 (1947)
 2. *J. Büchi och F. O. Gundersen*: Pharm. Acta Helvet., 23, 86 (1948)
 3. *S. H. Culter*: J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed., 37, 370 (1948)
 4. *J. G. Bellows*: Amer. J. Ophthalm., 27, 1206 (1944)
 5. Title 21 Food and Drugs Chapter 1 - - Food and Drug Administration par. 146
 6. *H. Storck och F. O. Gundersen*: Dermatologica, 94, 355 (1947)
 7. *W. A. Woodard*: Quart. J. Pharm. Pharmacol., 20, 197 (1947)
 8. *E. L. Smith*: Ibid., 19, 309 (1946)
 9. *N. Å. Diding och C. O. Rosén*: Farm. Revy, 48, 265 (1949)
 10. *E. Sandell*: Ibid., 47, 17 (1948)
 11. *S. H. Bertram*: J. Amer. Oil Chemists' Soc., 26, 454 (1949)
 12. *S. Bergström*: Arkiv Kemi, Min. Geol., 16 A, N:o 10 (1943)
 13. *N. Å. Diding och S. Söderlundh*: Farm. Revy, 47, 860 (1948)
-



Fluorimetric Determination of Adrenaline III.

The chemical structure of the fluorescent compound

By Inge Ehlén

(Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm)

This paper will be inserted in *Coll. Pharm. Suec.* IV, 1949.

In connection with a report on the determination of adrenaline by the fluorescence method I put forward the opinion that the fluorescence appearing at the oxidative degradation of adrenaline is due to 1-methyl-3,5,6-trihydroxy-indole formed from adrenochrome by an intramolecular rearrangement (1). The proposed formula was based partly on experiments described in the paper and partly on similarities to the conditions of the melanine formation from dihydroxyphenylalanine.

In addition to the literature cited in the preceding paper there will be mentioned here a paper by *Rangier* (2) in which he considers the fluorescent compound to be 1-methyl-2,3-dihydro-3,6,7-trihydroxy-indole. *Cohen* (3) claims that adrenochrome is at first converted into ooadrenochrome which is the 5,6-quinone of 1-methyl-indoxyl.

The purpose of the present investigation is a further study of the formation and of the chemical properties of the fluorescent compound.

Experiments carried out in order to isolate the compound were not successful. An attempt to obtain the acetyl derivative in the following way was made. A concentrated solution of adrenochrome in pyridine was gently heated in a test-tube where the air was expelled by a stream of nitrogen. Acetyl chloride was then added. The olive-green greasy masses formed could, however, not be further purified.

Spectrophotometric measurements made during the adrenochrome transformation did not give the absorption spectrum of the fluorescent compound with any degree of certainty. On the other hand the results from polarographic analyses were worth attention.

The polarographic behaviour of adrenochrome has previously been investigated by *Wiesner* (4). He found *i. a.* that the cathodic wave obtained in a solution of adrenochrome containing sulphite or dithionite was gradually transformed into a cathodic-anodic wave indicating a partial reduction to leuco-adrenochrome. At this reduction the wave-height decreased and simultaneously a new cathodic wave at a potential about 0.7 V more negative developed. The new wave he attributed to an addition compound between sulphite (or dithionite) and an adrenochrome derivative, formed in a reaction competitive to the reduction.

Wiesner has also studied the melanization of dihydroxyphenylalanine polarographically (5) and his results confirmed the course of oxidation of this compound originally proposed by *Raper*, as he proved the existence of an oxidation wave from a substance formed from the "red quinone". In connection with this, *Wiesner* calls attention to an analogous oxidation wave in adrenochrome solutions. It seems possible to him that adrenochrome could be subject to an intramolecular oxydo-reduction. *Wiesner* is not brought in contact with the fluorescence problem.

Experimental

In a polarographic cell neutral or alkaline aqueous solutions of adrenochrome were allowed to rearrange spontaneously in the absence of air. The mercury was continuously dropping and at regular intervals current-potential curves were recorded. Simultaneously the intensity of the fluorescence of the solutions was measured. From data obtained from the current-potential curves the velocities of the rearrangement of adrenochrome and of the formation of degradation products with other polarographic characters were determined.

By the polarographic determination an instrument constructed in this laboratory was used (6). The instrument is intended for manual operation. The iR -drop in the cell circuit was subtracted from the applied voltage before the current-potential curves were plotted. The cell resistance amounted to between 1.200 and 1.300 ohms in all experiments. The resistance of the galvanometer was 12.300 ohms and its sensitivity 0.0615 μ A/scale division. The current is below always expressed in galvanometer scale divisions. A saturated calomel half-cell was used as reference electrode.

The solutions to be investigated were prepared by dissolving pure adrenochrome in buffer solutions, which were prepared from 0.1 molar solutions of potassium dihydrogen phosphate or of sodium hydrogen carbonate to which sodium hydroxide solution was added to suitable pH. The solutions contained as a maximum suppressor 10 drops of a 0.5 per cent gelatin solution per 50 mls.

Tank nitrogen led through an alkaline sodium dithionite washing solution was used to remove dissolved oxygen from the solvent and from the solution in the cell and also to keep the atmosphere above the solution free from air during the experiment.

The current-potential curves were prepared by measurements of the current at applied voltages over the range from + 0,3 V to - 2,0 V (vs SCE). In the anodic part of the curve the galvanometer deflection was usually observed at intervals of 25 mV and in the cathodic part usually at intervals of 100 mV.

Ten minutes were required to obtain a total current-potential curve. During the following 10 minutes the fluorescence was determined. Then a new series of c.-p. measurements was begun and so on. The diffusion current at a certain potential as well as the fluorescence were thus determined every 20th minute. (In the concentration range examined the diffusion current is known to be a linear function of the adrenochrome concentration.) In consideration of these 20 minutes intervals, the pHs of the adrenochrome solution were chosen between 7,5 and 10, where the rearrangement proceeds with a velocity, suitable for kinetic calculations.

Evaluation of the fluorescence by the aid of a Lumetron 402-EF fluorimeter has been described previously (1). By these measurements 1,00 ml of the solution from the polarographic cell was mixed with 250 mls about 1/100 molar buffer solution (acetic acid-acetate) with pH 4,7 as the fluorescence shows maximum stability at about this pH. A comparison of the stability of the fluorescence at different pHs was carried out at identically the same conditions that prevail in the actual analyses. The decrease of the fluorescence intensity observed after 10 minutes in an open cuvette was

at pH	2,4	about	35 %
" "	3,8	"	12 %
" "	4,7	"	8 %
" "	5,5	"	20 %
" "	6,6	"	50 %
" "	8,2	"	70 %

In the following experiments usually one minute elapsed from the moment the sample was withdrawn from the cell and diluted with buffer until the fluorescence was determined.

It may be mentioned that the fluorescence in acid solutions seems exceedingly green to the naked eye while it in alkaline or neutral solution shows a marked tinge of yellow.

The experiments were carried out at 19°—21° C.

The following solutions were investigated:

I.	0,0120 g adrenochrome/50 mls phosphate buffer	pH	7,29
II.	0,0113 " " 50 " " "	" "	8,05
III.	0,0186 " " 50 " " "	" "	8,05
IV.	0,0116 " " 50 " " "	" "	8,53
V.	0,0120 " " 50 " carbonate	" "	9,08
VI.	0,0123 " " 50 " " "	" "	9,54
VII.	0,0116 " " 50 " " "	" "	10,03

(The current measurements of sol. III were made with a lower sensitivity of the galvanometer, 0,185 μ A/scale division.)

The c.-p.-curves from sol. IV are represented in *Figure 1*. For the sake of perspicuity only every second curve is plotted.

Fig. 1

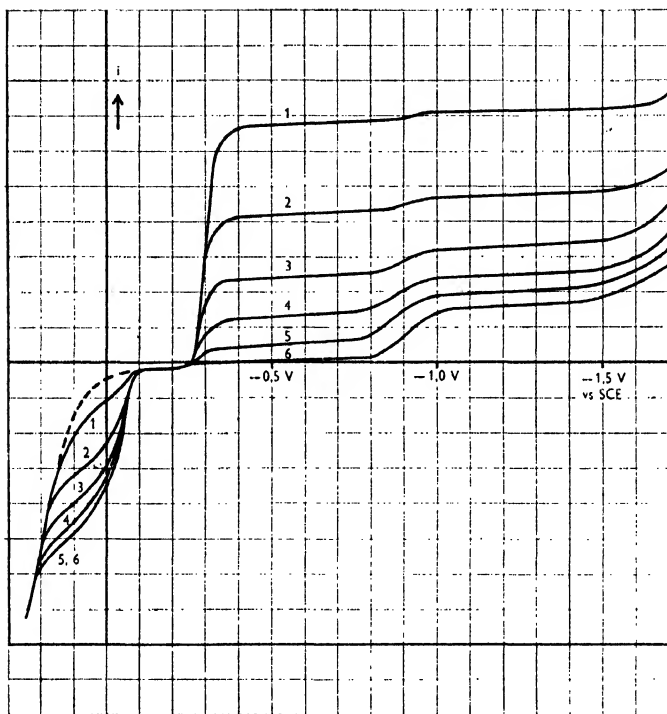


Fig. 1. — Current-potential curves from solution IV.

Curve 1	is obtained	10—20	minutes	
" 2	" "	50—60	" "	
" 3	" "	90—100	" "	
" 4	" "	130—140	" "	
" 5	" "	180—190	" "	
" 6	" "	360	" "	after the start of the spontaneous reaction

Similar curves were obtained for all other solutions. The half-wave potentials of those curves, however, are somewhat displaced in relation to the half-wave potentials of the reproduced curves owing to the different pH of the solutions.

When the cathodic adrenochrome wave disappeared, there developed both a secondary cathodic wave at a potential 600 mV more negative and an anodic wave 200 mV more positive than the original adrenochrome wave. When the reaction was followed long enough the new anodic wave gradually disappeared and the c.-p.-curve *in this range* resumed approximately the same shape as at the start of the reaction. The secondary cathodic wave simultaneously lost its characters.

The half-wave potential of the adrenochrome wave at pH 8,53 was $-0,295$ V, at pH 8,05 $-0,265$ V and at pH 7,27 $-0,220$ V (vs SCE). The results agree exactly with those found by *Wiesner*. From the curves at pH 8,53 the half-

wave potential of the anodic step could be estimated to $-0,05$ V. The shape of this step, however, made it clear that the value was rather approximate. At pH 8,05 the potential was determined to be $-0,03$ V and at pH 9,08 to $-0,075$ V. The secondary cathodic wave appeared at $-0,90$ V at pH 8,53.

Calculations

In the following section the results obtained from the current-potential curves and from the fluorescence measurements will be treated from a kinetic viewpoint. The c.-p.-curves will be examined in two respects mainly, *viz.* the height of the reduction wave attributed to adrenochrome (part I) and the height of the anodic wave formed at the spontaneous rearrangement (part II). The fluorescence will be discussed in part III.

Only the results from the measurements on solution IV, however, will be given in detail to exemplify the procedure. Solution IV was elected for this purpose as the velocity of the reactions taken into account seemed to be most suitable here. Results having reference to the solutions I—III, V—VII may be found in *Table IV* or are graphically recorded in *Fig. 2* and *3*.

Part I: In *Table I* the concentration of adrenochrome of solution IV at different times is recorded and expressed as the diffusion current at $-0,550$ V.

Table I. — Transformation of adrenochrome.

Time minutes	Adrenochrome conc. Diff. curr. at $-0,550$ V in galv. scale div.	k_1	Adrenochrome transformed per cent
0	172 (calc.)	—	—
18	135,5	0,012	21
38	107	0,012	38
58	84	0,012	51
78	65,5	0,015	62
98	48	0,013	72
118	37	0,017	79
138	26	—	83
158	18	—	90
188	9	—	95
218	4	—	98
360	0	—	100

k_1 = velocity constant

By substituting the concentration data from two successive c.-p.-curves into the formula

$$c_2 = c_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t}$$

the k_1 -values given in the third column were obtained. They indicate that the adrenochrome transformation follows the rate of a first order reaction comparatively well. At a chosen value of 0,012 of the velocity constant (k_1) the current at zero time was calculated to be 172. From this value as a measure on the initial concentration the figures of the fourth column have been calculated. The transformation per cent was used to compare the course of reaction in the various solutions. *Figure 2* graphically shows this comparison.

Fig. 2

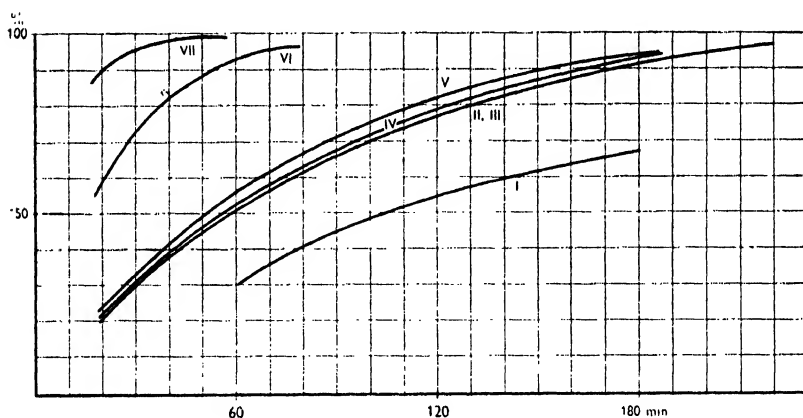


Fig. 2. — Adrenochrome transformed, expressed in per cent of the initial concentration, as a function of time. Curve I refers to solution I and so on. The curves II and III coincide.

Part II: In *Table II* a comparison of the anodic current of solution IV at different times is made. The difference between the diffusion current observed at + 0,050 V and the zero-time current at this potential is considered to be proportional to the concentration of the compound formed. The zero-time current was not measured in this solution. It was calculated from a c.-p.-curve of a slightly acid solution with the same concentration of adrenochrome. In this solution no measurable transformation occurs during the time that elapses for obtaining a c.-p.-curve. A projection of this curve in which the half-wave potential of its adrenochrome step was made to coincide with the half-wave potential of solution IV was reckoned as an idealized zero curve. The errors introduced by the use of this rather conventional procedure are negligible.

Table II. — Formation of the compound responsible for the anodic wave.

Time minutes	Diff. curr. at + 0,050 V in galv. scale div.	k_2
0	16 (calc.)	—
12	29	0,017
32	43	0,015
52	56	0,017
72	64	0,017
92	71	0,017
112	76	0,018
132	80	0,020
152	84	—
182	85	—
212	85	—

k_2 = velocity constant

Part III: The fluorescence of solution IV at different times expressed in per cent of an arbitrarily chosen standard is given in *Table III* and plotted in *Figure 3* (curve IV). This figure also shows the fluorescence as a function of time for some of the other solutions.

Table III. — Formation of the fluorescent compound.

Time minutes	Fluorescence per cent	k_3
23	23	0,014
44	43	0,016
63	57	0,018
83	69	0,020
104	75	0,020
123	80	0,023
143	83	—
161	85	—
193	85	—
221	84	—
270	81	—
300	78	—
360	72	—

k_3 = velocity constant

Fig. 3

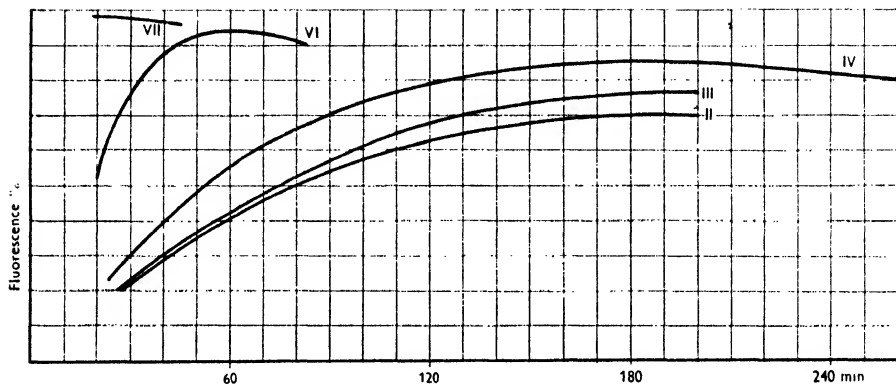


Fig. 3. — Fluorescence intensity as a function of time. Curve II, IV, VI, VII refer to solution II, IV, VI, VII diluted 1 : 250. Curve III refers to solution III diluted 1 : 400.

It is clear from *Figure 3* and *Table III* that the fluorescence rises to a maximum and then falls off. The decomposition of the fluorescent compound thus proceeds simultaneously to its formation at a rate that cannot be neglected. As I did not succeed in obtaining an exact idea of the velocity of this decomposition under the actual experimental conditions, the rate of the formation of the fluorescent compound could not be kinetically treated in a completely correct manner. When neglecting the rate of the decomposition the calculations according to the formula

$$c = c_0 (1 - e^{-k \cdot t}),$$

where c_0 denotes the highest intensity of the fluorescence, gave the k_3 -values in *Table III*.

As has been mentioned before the anodic current in a current-time diagram shows a maximum similar to that of the fluorescence. In *Table II*, column k_2 , the results are recorded from a kinetic treatment of the development of the anodic wave.

Thus the measurements lead to three different velocity constants,

k_1 , that refers to the transformation of adrenochrome,
 k_2 , to the formation of the compound responsible for the anodic wave and
 k_3 , to the formation of the fluorescent compound.

(The secondary cathodic wave which develops when the adrenochrome disappears was not made the basis of any quantitative calculations. As the wave-heights were relatively small, such calculations would have been subjected to too large errors.)

In *Table IV* the values of these three constants of the investigated solutions are given. They are the average values obtained at calculations by the aid of the

first three (or four) measurements in every experiment. Concerning k_2 and k_3 , it is gained thereby, that the error, made when the maximum concentration of the fluorescent compound (or the compound responsible for the anodic wave) actual at a certain moment is used instead of the total amount formed, will be eliminated to the greatest possible extent.

Table IV. — Comparison between the velocity constants calculated from solution I—VII.

Solution number	pH	k_1	k_2	k_3
I	7,29	0,008	—	—
II	8,05	0,011	0,014	0,014
III	8,05	0,011	0,012	0,013
IV	8,53	0,012	0,016	0,016
V	9,08	0,014	0,017	0,017
VI	9,54	0,044	0,050	0,054
VII	10,03	0,110	—	—

Discussion

The figures given for the constant k_1 in *Table IV* emphasize the well-known fact that the degradation of adrenochrome in aqueous solutions proceeds faster with increasing alkaline reaction. In the same direction k_2 and k_3 develop with increasing alkalinity. The magnitudes of the two last-mentioned constants calculated from measurements on the same solutions agree well at all experiments. This indicates that the formation of the fluorescent compound is combined with the development of the anodic wave, i. e. the fluorescence and the possibility of an anodic oxidation may be ascribed to the formation of the same compound.

In the different experiments the values of k_2 and k_3 show a rather good correspondence to k_1 indicating that the same reaction is observed. The corresponding curves in Fig. 2 and Fig. 3 give a graphical comparison between the transformation of adrenochrome and the formation of the fluorescent compound.

The concentration of the fluorescent compound reaches a maximum and then falls off indicating the influence of some "deteriorating" factor. It is probable, especially as the fluorescent compound in alkaline solution is very rapidly destroyed in contact with air, that this factor is oxygen which cannot be completely kept out from the solutions during the measurements. The decomposition of the fluorescent compound, however, makes that the value of c_0 , used at the calculation of k_2 and k_3 , is too small. With higher values of the maximum concentration, k_2 and k_3 would have been in still better correspondence with k_1 . The hypothesis about the deteriorating effect of oxygen seems to be supported by the fact that k_2 and k_3 are in better agree-

ment with k_1 in the more concentrated solution III than in solution II. Both solutions have pH at 8,05, and under the influence of equal amounts of oxygen the disturbing effect must be relatively greater in the less concentrated solution.

In spite of some technical shortcomings the results of the polarographic analyses seem to be a good proof of the theory that the spontaneous adrenochrome transformation in neutral and alkaline solutions is an intramolecular rearrangement of adrenochrome into a compound showing the characteristic fluorescence. This compound is assumed to be an *o*-dihydroxy compound on account of its polarographic oxidation wave. The half-wave potential is closely connected with those of 5,6-dihydroxyindole and its 2-carboxylic acid, which *Wiesner* found to appear by the transformation of the "red quinone" and situated in a potential range where the reduction potentials of many quinones are to be found. However, nothing was observed indicating that the anodic wave by the decomposition of the fluorescent compound was transformed into the corresponding cathodic wave, a behaviour which would have indicated an oxidation to the corresponding quinone.

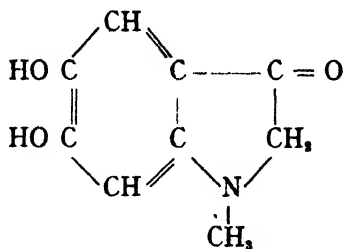
The secondary cathodic wave that *Wiesner* ascribed to an addition product between an added reducing agent and an unknown compound, develops also in the absence of these reducing agents. Hence *Wiesner's* point of view cannot be correct. In spite of no figures were calculated for the velocity constant of this reaction, the experimental results made it probable (cf. Figure 1) that this wave grows parallel to the anodic wave. The primarily well-defined step tends to be less distinct as the anodic wave begins to disappear.

It is reasonable to assume that the reducible group responsible for the secondary cathodic wave is formed by a conversion of the enol into a keton. A great many ketones are known to be reduced at the dropping mercury electrode at half-wave potentials of about this magnitude. The c.-p.-curve obtained in a solution of the related compound adrenalone by the same experimental conditions showed a well-defined cathodic wave at about $-1,2$ V. If a solution of the "red quinone" (obtained by shaking a solution of dihydroxyphenylalanine with silver oxide and filtration) was allowed to rearrange at conditions similar to those in the adrenochrome experiment a quinone wave of decreasing height and an anodic wave were observed but no secondary cathodic wave. This behaviour is in accordance with the proposed theories as the red quinone by its rearrangement cannot form a keto-compound responsible for a secondary cathodic wave.

Wiesner found the secondary cathodic wave to be of about the same height as that of adrenochrome. In all my experiments I found the height of the secondary wave to be only about one fourth of the adrenochrome step. This phenomenon can hardly be explained by the hypothesis that in the pH-range 7,5—10 one fourth of the compound exists in keto-form and three fourth in enol-form. It is more probable that the keto-conversion is quantitatively accomplished. The small current must then be caused by an irreversibility in the cathodic reaction under the actual experimental conditions. This is not an unusual phenomenon observed by the polarography of carbonyl compounds (7).

The polarographic analysis has thus supported the proposed formula of the fluorescent compound in regard to the dihydroxy-configuration. Moreover it

has shown the presence of a reducible group, probably a carbonyl group occurring by an enol-keto conversion in the five-membered nucleus. The compound seems to be 1-methyl-3-oxo-5,6-dihydroxy-2,3-dihydro-indole.



A compound with this structure can be considered as a derivative of indoxyl (keto configuration). Indoxyl resembles the fluorescent compound formed by the oxidative degradation of adrenaline in other respects too. An aqueous solution of indoxyl is yellow with a yellowish-green fluorescence and the alkaline solution is very easily oxidized. The oxidation of indoxyl into indigo may give a hint how the oxidation of the fluorescent compound proceeds. Neither the oxidation of indoxyl to indigo nor the oxidation of the fluorescent compound involves the formation of the corresponding quinones.

The fluorescent compound is insoluble in ether but it can be extracted from an aqueous solution at pH 4 by shaking with ether containing some ethanol. *Figure 4* gives the absorption spectrum of such an ether extract (diluted with ethanol) from one of the experimental solutions which was acidified when the fluorescence showed maximum intensity.

Fig. 4

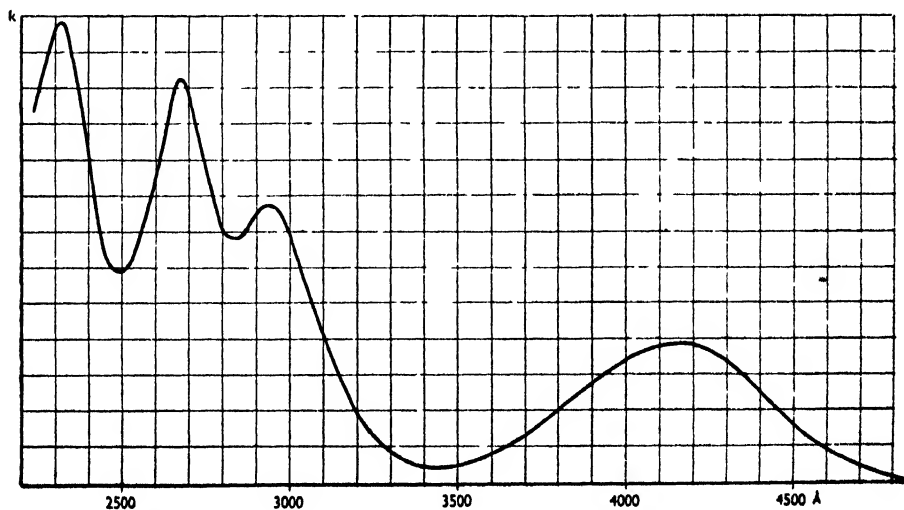


Fig. 4. — Absorption spectrum of a diluted ether-ethanol extract containing the fluorescent compound.

The absorption spectrum, obtained by the aid of a Beckman spectrophotometer, shows four maxima at 2.320, 2.580, 2.940 and 4.150 Å respectively.

References

1. *Ehrlén, I.*: Farm. Revy 47 242 (1948).
2. *Rangier, M.*: Compt. rend. 220 226 (1945).
3. *Cohen, G. N.*: Bull. Soc. Chim. Biol. 28 104 (1945).
4. *Wiesner, K.*: Bioch. Zeitschr. 313 48 (1942).
5. *Wiesner, K.*: Bioch. Zeitschr. 314 214 (1943).
6. *Canbäck, T., Ehrlén, I., and Wester, S.*: Farm. Revy 47 69 (1948).
7. *Pasternak, R. A.*: Diss. Zürich 1946.

Note: In a recent paper (*Lund, A.*: Acta pharmacol. 5 75 (1949)) the isolation of the fluorescent oxidation product of adrenaline has been reported.

Bestämning av oljors och fetters hållbarhet II

Farmaceutiska institutet, avd. för farmaceutisk teknologi

Av PER ELVIUS, K.-E. GRÖNKVIŠT och ERIK SANDELL

(This paper will be inserted in *Collectanea Pharmaceutica Svecica* IV, 1949.)

I en allmän översikt har nyligen redogjorts för de metoder, som framför allt inom livsmedelsindustrien användas för bestämning av hållbarheten hos oljor och fetter, och det har föreslagits, att dylika borde komma till användning även inom farmacien vid varukontrollen av dessa ämnen (1). Kännedom kan på detta sätt erhållas om oljornas lagringsegenskaper, vilket är av särskilt värde vid deras användande i beredningar, innehållande oxidationskänsliga läkemedel. I viss utsträckning kunna accelererade hållbarhetsbestämningar även komma till användning för fastställandet av för läkemedelsberedningar lämpliga antioxidantia.

Såsom rutinmetoder vid sådan undersökning höra, såsom tidigare framhållits, Swift-metoden och syreabsorptionsmetoder i första hand komma i fråga. Den förstnämnda är numera helt dominerande bland förekommande standardförfaranden. Då emellertid för sådan bestämning erforderlig apparatutrustning ej varit tillgänglig för oss, ha försök här utförts under användande av ett i fråga om behövlig apparatur vida enklare förfarings sätt. Avsikten har framför allt varit att få en uppfattning om denna metods lämplighet. Undersökningarna ha först avsett rena oljor och fetter (ELVIUS och SANDELL). Därefter har samma metodik använts för bedömning av den stabiliserande effekten av vissa antioxidantia (GRÖNKVIŠT och SANDELL).

Bestämningsmetod

Vid bestämningarna av hållbarheten har använts det i den tidigare översikten såsom *filtrerpappersmetoden* betecknade förfaringssättet i avslutning till ett av LEA (2) föreslaget utförande. Detta tillgår så, att filtrerpapper neddoppas i oljan eller det smälta fett, som skall undersökas, samt sedan pressas mellan filtrerpapper för borttagande av överskott. Omkring 0.12 g olja kommer att på detta sätt fördelas på varje prov (5.5 cm filtrerpapper). Papperen inhängas i torkskåp vid 100° samt uttagas under försökets gång med lämpliga mellanrum ett och ett för peroxidbestämning. LEA framhåller, att god temperaturkontroll är en förutsättning för metodens användbarhet, men påpekar för övrigt dess framträdande fördelar: ingen speciell apparatur kräves och ej heller det omständliga rengöringsarbete, som ofta förekommer vid andra förfaringssätt.

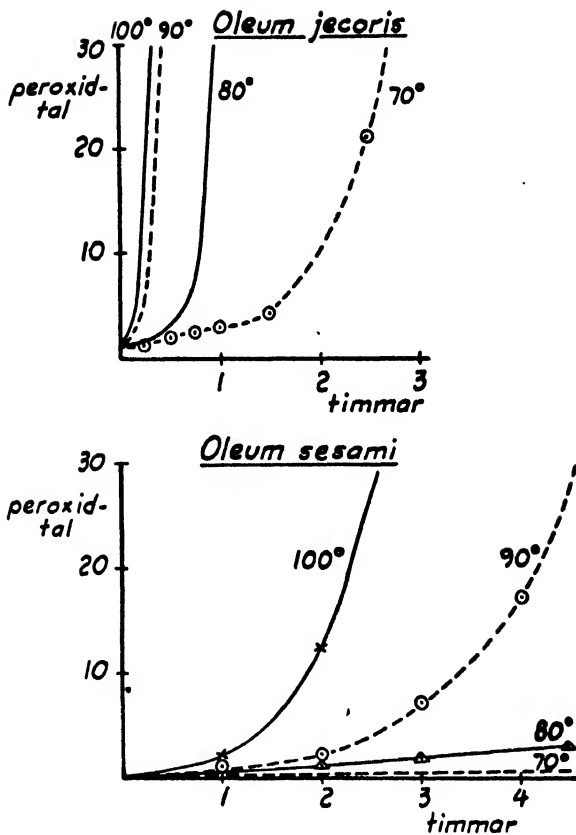
Denna bestämningsmetod utformades här ytterligare under inledande försök, innan den egentliga undersökningen vidtog. I första hand utfördes en genomprövning av temperaturförhållandena i det använda torkskåpet (typ *Helios*), varvid framgick, att inom 1° konstant temperatur endast kunde erhållas på den övre hyllan, och då ej dess yttersta delar. För försöken användes filtrerpapper, Munktell nr 3, av 9 cm diameter. På dessa invägdes 0.50 g olja, som samtidigt fördelades över papperets yta. För varje olja iordningställdes en serie dylika prov, vilka med några cm mellanrum uppträdde på en smal glasstav, som därefter snabbt kunde placeras på en upphängningsanordning i det i förväg till avsedd temperatur uppvärmda torkskåpet. För ernående av en konstant behandling är det nämligen av betydelse, att skåpet endast öppnas under så kort tid som möjligt under försökets gång. Med den här beskrivna anordningen kan insättningen av den iordningställda serien utföras på 5—10 sek., och ett prov uttagas på 3—5 sek.

Oxidationstillståndet för uttagna prov har bestämts jodometriskt enligt WHEELER och uttryckes liksom i tidigare arbeten genom angivande av *peroxidtalet* = ml förbrukat N/100 natriumtiosulfat per g olja.

Behandlingstemperatur

Vid orienterande försök framgick, att behandlingen vid den av LEA föreslagna temperaturen, 100°, i allmänhet gav en för bestämning av hållbarheten ganska lämplig oxidationskurva med tydligt markerad induktionsperiod. Vissa mera ohållbara oljor och fetter visade däremot ett mycket snabbt oxidationsförlopp under dessa betingelser. Det måste för den skull anses önskvärt, att behandlingen utföres vid en till de skilda oljetyperna så anpassad temperatur, att en tydligt markerad induktionsperiod alltid erhålles. Först då är en noggrannare jämförelse olika olje-
prov emellan möjlig.

För fastställande av denna lämpligaste behandlingstemperatur ha de aktuella oljorna på beskrivet sätt behandlats vid temperaturerna 100°,



90°, 80° och 70°. I vidstående diagram ha resultaten sammanfattats från två sådana försöksserier, utförda med de mycket olikartade oljorna torskleverolja och sesamolja.

Med ledning av dylika förprov ha de behandlingstemperaturer valts, som användas i följande undersökning av olika oljor.

Hållbarhetsbestämning av införskaffade oljeprov

På ovan angivet sätt ha bestämningar utförts med ett antal från apoteken insamlade prov av olika oljor. Såsom mått på hållbarheten angives här induktionsperiodens längd, beräknad från försökets början, tills ett peroxidtal av 10 uppnåtts. Bestämningen har utförts med ledning av den uppgjorda oxidationskurvan. Erhållna resultat ingå i nedanstående sammanställning, som även upptager oljornas peroxidtal vid bestämnings början.

Oleum arachidis. Bestämningarna utförda vid 90°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.05	4.5 t
II	0.10	4.0 t
III	1.21	3.8 t

Oleum rapae. Bestämningarna utförda vid 90°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.27	5.0 t
II	0.49	4.8 t
III	1.36	4.2 t

Oleum sesami. Bestämningarna utförda vid 90°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.20	4.5 t
II	0.35	3.6 t
III	3.0	0.7 t

Adeps suillus. Bestämningarna utförda vid 80°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.24	5.0 t
II	0.30	4.6 t
III	1.12	4.0 t

Oleum amygdalae. Bestämningarna utförda vid 80°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.54	2.5 t
II	1.42	4.5 t
III	2.8	3.6 t

Oleum olivae. Bestämningarna utförda vid 80°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.38	3.7 t
II	0.60	3.5 t
III	1.06	3.2 t

Oleum sojæ. Bestämningarna utförda vid 80°.

	Peroxidtal	Induktionsperiod
I	0.05	6.0 t
II	1.20	3.8 t
III	1.42	5.3 t

Av erhållna resultat framgår i första hand, att en oljas hållbarhet, såsom den kommer till uttryck i bestämningar av detta slag, i allmänhet avhänger av dess oxidationstillstånd. Oljan med lägsta peroxidhalten uppvisar mestadels den längsta induktionsperioden. Detta bör givetvis i de flesta fall vara regeln, eftersom enligt oxidationskurvan en högre peroxidhalt angiver, att en del av induktionsperioden redan passerats, och en viss del av oljans naturliga antioxidantia blivit förbrukade.

Såsom i den tidigare lämnade översikten framhållits, kan fastställandet av låg peroxidhalt dock aldrig utgöra tillräcklig bedömningsgrund med avseende på en oljas hållbarhet. Förhållanden, som sammanhånga med oljans proveniens, dess utvinnande och senare bearbetning, kunna ofta endast komma till uttryck genom en särskild hållbarhetsbestämning. Det kan härvid visa sig, att en olja av låg peroxidhalt karakteriseras av dålig hållbarhet. Av de här undersökta oljorna uppvisar sålunda den ur oxidationssynpunkt bästa mandeloljan den kortaste induktionsperioden.

Det skulle i detta sammanhang varit önskvärt, att en omfattande hållbarhetsprövning kommit till utförande avseende i handeln förekommande oljor av mycket låg peroxidhalt. En uppfattning om olikheterna oljorna emellan skulle på detta sätt erhållas och därmed även om hållbarhetsbestämningarnas värde. Emellertid voro handelsförhållandena vid tiden för provens insamlande (1946—1947) sådana, att i handeln förekommande olja av ett och samma slag ofta var av samma ursprung. En mera omfattande undersökning av det åsyftade slaget var därför ej möjlig att utföra.

Hållbarhetsbestämningar vid rumstemperatur

Det anföres ofta, att de betingelser, som komma i fråga vid accelererade hållbarhetsbestämningar, starkt avvika från vanliga lagringsförhållanden, och att resultaten därför bli mer eller mindre missvisande. För att erhålla en uppfattning i denna fråga ha vissa av de ovan anförda bestämningarna utförts även vid rumstemperatur. De liksom tidigare färdigställda serierna av filterpapper ha placerats på glasstavar i ett mörkrum, varifrån prov för peroxidbestämning uttagits med lämpliga mellanrum. Rumstemperaturen har under försökets gång varierat endast så obetydligt, att man helt kan bortse från detta vid en jämförelse mellan samtidigt ansatta prov. Erhållna värden på induktionsperioden ingå i följande sammanställning, som även för jämförelses skull upptager de tidigare resultaten med samma oljor.

Oleum arachidis.	Peroxidtal	Induktionsperiod vid 90°	Induktionsperiod vid rumstemp.
I	0.05	4.5 t	14.5 dagar
II	0.10	4.0 t	15 dagar
III	1.21	3.8 t	10 dagar

Oleum sesami.	Peroxidtal	Induktionsperiod vid 90°	Induktionsperiod vid rumstemp.
I	0.20	4.5 t	30 dagar
II	0.35	3.6 t	28 dagar
III	3.0	0.7 t	11 dagar

Oleum olivae.	Peroxidtal	Induktionsperiod vid 80°	Induktionsperiod vid rumstemp.
I	0.38	3.7 t	8 dagar
II	0.60	3.5 t	7 dagar
III	1.06	3.2 t	8 dagar

Oleum sojæ.	Peroxidtal	Induktionsperiod vid 80°	Induktionsperiod vid rumstemp.
I	0.05	6.0 t	29 dagar
II	1.20	3.8 t	25 dagar

Av sammanställningen framgår, att resultaten med de båda metoderna visa en relativt god överensstämmelse i fråga om en och samma olja. Jämföras däremot skilda oljor, kunna stora avvikelser uppträda. Jordnöt-olja och sesamolja av låg peroxidhalt (I och II) visa sålunda ungefär samma hållbarhet, då bestämning utföres vid 90°, vid rumstemperatur är däremot skillnaden betydande. Försöken i fråga ha utförts parallellt, varför variationer i fråga om behandlingen knappast torde föreligga. Vi skola senare ytterligare återkomma till denna fråga.

Försök med antioxidantia

Det är ett mycket stort antal substanser, som under de senaste tial åren föreslagits och delvis funnit användning såsom oxidationsförhindrande tillsatser i oljor och fetter. Men först på de allra senaste åren synes man ha nått fram till en mera preciserad uppfattning av verkningsmekanismen för dessa antioxidantia och en viss överblick av detta mycket heterogena område. I den säkerligen viktigaste sammanfattningen av detta slag anför sålunda MATTILL (3), att den primära antioxidations-effekten alltid utövas av di- och polyfenoler med OH-grupperna i o- eller

p-ställning eller ämnen med liknande elektronkonfiguration. Övriga antioxidantia sammanfattas under beteckningen *synergister*. Dessa endast förstärka den verkan, som utövas av närvarande egentliga antioxidantia. Ensamma visa de ingen oxidationsskyddande effekt. I allmänhet äro synergisterna av syrakaraktär. Citronsyra, askorbinsyra, fosforsyra äro de viktigaste representanterna för denna grupp.

Undersökningen av filterpappersmetodens användbarhet för provning av antioxidantia har utförts med tillhjälp av välkända sådana substanser, nämligen som fenolantioxidantia pyrokatekin, hydrokinon och propylgallat, som synergister askorbinsyra och fosforsyra. Såsom substrat ha använts jordnötolja och sesamolja. Dessa ha varit av ur oxidationssynpunkt god kvalitet (peroxidtal för de båda proven av jordnötolja 0.12 och 0, för sesamolja 0.32 och 0). Det är nämligen väl känt, att antioxidantia utöva god effekt endast i oförstörda oljor och fetter. Har oxidationen redan blivit framträdande, reagera tillsatta antioxidantia med förekommande peroxider, och effekten blir osäker eller uteblir helt.

De nämnda antioxidantia ha för båda oljorna prövats i koncentrationer av 0.001 och 0.005 mol per 1 000 g olja. Substanserna ha finpulvrerats och därefter lösts i oljan under uppvärmning i vattenbad under 10 min. Under dessa betingelser löstes askorbinsyra ej fullständigt ens i den lägre koncentrationen.

Hållbarhetsbestämningar med dessa prov utfördes först enligt filterpappersmetoden vid 90° på samma sätt som vid de tidigare försöken med de rena oljorna. *Det visade sig emellertid genast, att denna metodik var ganska oanvändbar för bedömning av tillsatsernas stabiliserande effekt.* Oljeprov, innehållande så effektiva antioxidantia som hydrokinon och propylgallat, visade i det närmaste samma induktionsperiod som olja utan sådana tillsatser. Tydligt förstöras tillsatta antioxidantia snabbt under dessa betingelser och hinna aldrig inverka på oxidationsförloppet. Under dessa omständigheter utfördes hållbarhetsbestämningarna i stället vid rumstemperatur såsom vid den avslutande provningen av de rena oljorna.

Såsom tidigare angivits (1) ha de senare årens undersökningar ofta visat, att accelererade metoder ej utgöra en säker grund vid bedömning av antioxidantia. Endast förvaringsprov under normalt förekommande betingelser äro helt tillförlitliga. Samtidigt med bestämningarna enligt filterpappersmetoden ansattes därför även lagringsprov, bestående av 30 g olja i med kork förslutna sprundburkar à 60 g av brunt glas. Dessa förvarades därefter i ett stängt skåp i ett rum av ordinär temperatur, och öppnades först efter 18 månader för peroxidbestämning.

Vid dessa försök erhållna resultat ha sammanställts nedan. Liksom tidigare anges induktionsperiodens längd såsom tiden från försökets början, tills peroxidtalet 10 uppnåtts. Såsom uttryck för den stabiliserande effekten av de olika antioxidantia anges även "protection factor" = förhållandet mellan ökningen av induktionsperioden och dennas längd hos obehandlad olja. För lagringsproven redovisas peroxidtalet efter 18 mån. förvaring.

OLEUM ARACHIDIS

Konc. av tillsatta antioxidantia: 0.001 mol/1 000 g olja.

	Ind.-period vid accel. prov	"Protection factor"	Peroxidtal för lagringsprov (18 mån)
Utan tillsats	18 dagar	—	5.6
pyrokatekin	24 dagar	0.3	3.9
hydrokinon	25 dagar	0.4	0.89
propylgallat	28 dagar	0.6	0.70
askorbinsyra	19 dagar	0	4.3
fosforsyra	11 dagar	proox.	13.9

Konc. av tillsatta antioxidantia: 0.005 mol/1 000 g olja.

	Ind.-period vid accel. prov	"Protection factor"	Peroxidtal för lagringsprov (18 mån)
Utan tillsats	22 dagar	—	5.9
pyrokatekin	44 dagar	1.0	1.60
hydrokinon	24 dagar	0.1	0.34
propylgallat	42 dagar	0.9	0.39
askorbinsyra	21 dagar	0	0.25
fosforsyra	19 dagar	proox.	2.3

OLEUM SESAMI

Konc. av tillsatta antioxidantia: 0.001 mol/1 000 g olja.

	Ind.-period vid accel. prov	"Protection factor"	Peroxidtal för lagringsprov (18 mån)
Utan tillsats	46 dagar	—	2.2
pyrokatekin	39 dagar	proox.	1.43
hydrokinon	46 dagar	0	0.69
propylgallat	61 dagar	0.3	0.70
askorbinsyra	53 dagar	0.15	0.45
fosforsyra	30 dagar	proox.	1.89

Konc. av tillsatta antioxidantia: 0.005 mol/1 000 g olja.

	Ind.-period vid accel. prov	"Protection factor"	Peroxidtal för lagringsprov (18 mån)
Utan tillsats	38 dagar	—	1.19
pyrokatekin	52 dagar	0.4	0.69
hydrokinon	41 dagar	0	0.31
propylgallat	59 dagar	0.6	0.56
askorbinsyra	38 dagar	0	0.11
fosforsyra	45 dagar	0.2	0.74

Vid bedömning av den här använda accelererade metoden ha givetvis resultaten från lagringsprov avgörande betydelse. Av dessa senare framgår med all tydlighet att hydrokinon och propylgallat utgöra synnerligen effektiva antioxidantia. Redan den lägre tillsatsen, motsvarande av hydrokinon omkring 0.01 %, av propylgallat omkring 0.02 %, är tillräcklig för erhållande av god verkan. Även pyrokatekin verkar oxidationskyddande men är de båda tidigare väsentligt underlägset. Askorbinsyre-tillsats har i tre av de fyra proven visat sig mycket värdefull. Effekten av fosforsyra är däremot mindre uttalad.

Den förbättring av hållbarheten, som således i många fall anges av utförda lagringsprov, kommer i de flesta fall även till uttryck vid de accelererade bestämningarna, dock ej med samma tydlighet. Men i åtskilliga fall råder ej alls samstämmighet mellan resultaten. Den goda effekten vid tillsats av askorbinsyra kommer sålunda i de flesta fall ej alls till synes. Detsamma gäller även beträffande hydrokinon i försöken med sesamolja.

Diskussion: Vid den här utförda prövningen av filtrerpappersmetoden för accelererad bestämning av oljors hållbarhet har framkommit, att detta förfaringssätt innebär ett för det praktiska arbetet ganska enkelt utförande. För erhållande av reproducerbara resultat är det dock av avgörande betydelse, att en noggrann temperaturkontroll kan genomföras.

Emellertid har det visat sig, att metoden i fråga är behäftad med ganska utpräglade principiella svagheter. Vid prövning av rena oljor och fetter ha försök utförda vid förhöjd temperatur och vid rumstemperatur visserligen givit ganska överensstämmande resultat vid bedömning av olika prov av samma slags olja. Men jämförelsen kan ej utsträckas att gälla prov av olika oljor. Oljor, som visa samma induktionsperiod vid 90°, kunna ha helt olika stabilitet, då samma prövning utföres vid rumstemperatur.

För bedömning av olika antioxidantia kan filtrerpappersmetoden, utförd vid 80°—100°, knappast användas, ty under dessa betingelser påverkas oxidationsförloppet endast obetydligt genom dylika tillsatser i oljan. Tydlig effekt har däremot erhållits vid rumstemperatur med samma förfaringssätt. Jämföras emellertid härvid uppnådda resultat med lagringsprov med samma oljor, uppträda åter markerade avvikelser. Särskilt har detta varit fallet vid prövning av olja innehållande askorbinsyra, men har även förekommit för ett så utpräglat härskningsförebyggande ämne som hydrokinon. Den goda effekt, som erhållits vid lagringsproven, åter-speglas ej vid accelererad bestämning.

Såsom ett försök till förklaring av de ovan påtalade avvikelserna vid hållbarhetsbestämning enligt filtrerpappersmetoden vilja vi understryka de stora skillnaderna i fråga om oxidationsbetingelser vid detta förfaringssätt och vid lagring. De lättoxiderade substanser, naturligt förekommande eller tillsatta, som verka oxidationsskyddande i oljorna och således äro ansvariga för dessas hållbarhet, äro under vanliga lagringsförhållanden i oljelösning ganska väl skyddade mot förstöring genom direkt inverkan av luft och värme. De äro därför i tillfälle att förhindra den peroxidbild-

ning, som utgör fettoxidationens inledande stadium. Vid accelererade bestämningar ändras emellertid förhållandena ganska radikalt och speciellt torde så vara fallet vid filtrerpappersmetoden. Luften kommer på grund av oljans utbredning över en stor yta i mer eller mindre direkt kontakt med de då lättförstörda antioxidantia. Avgörande kommer under sådana betingelser att bli i vilken utsträckning närvarande ämnen av detta slag tåla luftens inverkan. Deras oxidationsskyddande effekt kommer alltså mindre till synes.

Ett dylikt betraktelsesätt ger förklaring till åtskilliga i denna undersökning omnämnda förhållanden. Det är tydligt, varför prövningen av rena oljor ger jämförbara resultat för ett och samma slags olja men ej alltid tillåter en jämförelse olika oljor emellan. Emedan tillsatta artificiella antioxidantia troligen förstöras mycket snabbt vid förhöjd temperatur, kunna dessa ämnen ej alls prövas med filtrerpappersmetoden under sådana betingelser. Även vid rumstemperatur bli resultaten missvisande, t.ex. i fråga om askorbinsyra, säkerligen av samma orsak.

Sammanfattningsvis synes filtrerpappersmetoden således mindre väl lämpa sig för prövning av oljors och fetters hållbarhet eller för bedömning av olika antioxidantia. Säkerligen ha betingelserna för oxidationen ändrats så radikalt, att andra egenskaper blivit utslagsgivande, än de som under normala lagringsbetingelser äro av betydelse.

Litteratur:

1. E. SANDELL: *Farm. Revy*, 47, 699 (1948).
2. C. H. LEA: *J. Soc. Chem. Ind., Lond.*, 53, 388 T (1934).
9. H. A. MATTILL: *Oil and Soap*, 22, 1 (1945).

SUMMARY

Stability tests for oils and fats

Swift stability test and oxygen absorption methods are now accepted in the oil industry as accelerated tests for predicting the stability of oils and fats. The use of these methods should be of value in pharmacy too. A survey of this field has already been published (1).

In this investigation, however, we have tried a method which can be used without any special apparatus. The susceptibility to oxidation is obtained by the method earlier described by LEA (2), samples of the oil being dispersed on filter papers and then treated in an oven at a fixed temperature. The technique has been somewhat modified in our tests, in order to obtain a uniform treatment.

The stability of some samples of pure oils and fats was determined in this manner, at a temperature of either 80° or 90° C. In most cases there is, of course, a distinct connection between the peroxide number of the oil and the stability. Exceptions are still occurring, indicating that the establishing of a low peroxide content only cannot be satisfactory.

The stability of some of the above samples was determined at room temperature too by the same method. It is evident from these trials that results obtained at 80° or 90° C and at room temperature generally can be compared for the same kind of oil. Considerable deviations can arise, however, when it is a question of different oils.

The same methods were used for the determination of the stabilizing effect of some wellknown antioxidants, phenolic inhibitors as synergists. Heating of the samples at 80° or 90° C *was not applicable* for this purpose. Added antioxidants are obviously destroyed under these conditions and have no chance to act upon the course of the oxidation. These accelerated tests were therefore performed at room temperature only. In addition, samples were kept under storage conditions. Their peroxide values were determined after 18 months. From inspection of results obtained it is evident, that the protection indicated by the accelerated tests often differs from storage data.

Finally, we therefore maintain that the method used is not very reliable as a stability test for oils and fats. Presumably the oxidation conditions are altered so drastically, that other properties than those shown by oils in ordinary storage are decisive.

Farm. Revy, 47, 850 [1948]). Dispenseringen utföres från en behållare, innehållande den försiktigt smälta massan och omgiven av ett vattenbad av 40° temperatur. Behållaren bör vara försedd med en elektrisk omrörare. Såsom kanyl användes ett glasrör, utdraget till en spets med omkring 3 mm diameter. Såsom handstöd under dispenseringsarbetet användes lämpligen en enkel träbrygga, under vilken backen kan framföras successivt.

Omedelbart sedan en back påfyllts, placeras den kallt, varvid massan stelnar på c:a 20 minuter. För kakaofettets omgring till α -modifikationen förvaras suppositorierna sedan vid rumstemperatur till följande dag. De kunna då upptagas, varvid höljet samtidigt invikes.

För att pröva denna metodik har en större sats av *Suppos. anti-haemorrhoidalia anaesthetica* beretts. Själva dispenseringsarbetet kunde härvid bekvämt utföras med en hastighet av 2—3 000 suppositorier per timme. Doseringsnoggrannheten blev synnerligen god, motsvarande den som tidigare redovisats vid arbete med olja i den använda apparaten. (För att glasventilerna i apparaten skola fungera måste perubalsamen vara ytterst noggrant fördelad i massan.)

Såsom i farmakopéföreskriften särskilt framhålls bör sedimenteringsrisken alltid observeras, då suppositorier beredas genom gjutning. För den skull har ett antal bestämningar av zinkhalten utförts i den ovan nämnda beredningen. Efter upplösning av en suppositorie i eter och skakning av eterlösningen med M/I svavelsyra, då zinkoxiden löses, bestämmas ingående mängd zink i vattenfasen genom titrering med kaliumferrocyanid och difenylamin som indikator. Ingen haltvariation kunde konstateras mellan suppositorier uttagna vid olika tillfällena under tillverkningen. Därefter utfördes analys av olika delar av samma suppositorie för att undersöka, om sedimentering äger rum i formarna före stelandet. Endast obetydliga differenser kunde påvisas.

Det prövade förfaringssättet utgör sålunda en enkel och snabb metod för suppositorieframställning i större skala och torde säkerligen vara att föredraga framför arbete med gjutformar, oavsett kostnaden för dessas anskaffande. Det tidsödande momentet utgör givetvis formarnas tillverkning. Detta har här ej tidsstuderats, eftersom så först kan ske sedan manuell skicklighet uppnåtts i rutinarbete. I varje fall kan detta arbete knappast vara mera tidsödande än då det utföres vid inläggning av på annat sätt framställda suppositorier.

SUMMARY

The preparing of suppositories by fusion

In this paper is shown that suppositories can be prepared by fusion, using moulds made from the aluminium-foil generally used for the wrapping of these preparations. The moulds are made by aid of a wooden model and are placed into a stand. Accurately-measured quantities of the melted mass are then poured at the rate of 2—3 000 per hour, using a type of automatic filler earlier described in this journal.

The Determination of Eserine in Partly Decomposed Solutions.

By Hans Hellberg

The Chemical Department of the State Pharmaceutical Laboratory,
Stockholm

(Inserted in Collect. pharm. succ. IV, 1949)

In a previous paper (1) the present author reported some methods for the quantitative determination of eserine. Later, *Ehrlén* proposed another modification of the photometric rubreserine method (2). Both papers consider only eserine uncontaminated by its decomposition products. These will however obscure or spoil the results of the methods unless special precautions are taken.

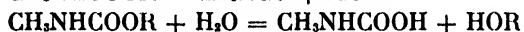
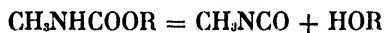
The deterioration of eserine in aqueous solutions is initiated by decomposition of the urethane chain, leading to methyl amine, carbon dioxide and eserinol as final products. The intermediate stages are less well known. In contact with air or certain other oxidants the eserinol is oxidized, at first as a rule to rubreserine and then to products as yet only partly known.

Generally, the decomposition of a substance may be measured by two different principles. Either some of the decomposition products or the com-

pound remaining intact can be determined. It seems to be impossible to invent a method for measuring the quantitative degradation of eserine, based on any of the decomposition products and applicable in practice. However, it may be of theoretical interest to study what happens to eserine in aqueous solutions free from air, and to this end it is possible to work out a procedure for eserinol. This compound is stable in a medium free from oxygen and certain other oxidants but it is rapidly oxidized to rubreserine by air or oxygen at pH 11. As will be proved in a subsequent paper (3) this oxidation takes place without accelerating the primary decomposition of the alkaloid. It is therefore possible to determine eserinol in the presence of eserine after air-oxidation to rubreserine, fundamentally by the method previously reported by the author (1). However, a special calibration curve must be drawn, because the colour depends somewhat on the pH at the oxidation. For the details of the procedure see the experimental part.

The degradation of eserine in 0,200-molar sodium carbonate at 25,0° C was studied by this method. The hydrolyses were carried out in air-free solutions in nitrogen atmosphere. The results, which are given in Table 2 a in the experimental part, should be compared with those in Table 2 b, which refer to the same conditions of hydrolysis but to determinations of eserine remaining intact. By adding corresponding percentages of intact and of decomposed eserine, 100 per cent will be obtained to within reasonable limits of error.

The other way of studying the degradation is by determining the alkaloid remaining intact. In a partly decomposed solution one may expect a series of compounds containing methyl amine. Apart from eserine and methyl amine, methyl isocyanate and methyl carbamic acid may also occur.



From a solution alkalized with sodium carbonate, eserine is extracted quantitatively by ether. Methyl amine is also extracted in minor quantities. Methyl isocyanate is probably hydrolyzed at the pH of a sodium carbonate solution. However, according to F a u r h o l t methylcarbamic acid is rather stable at neutral and moderately alkaline pH (4). But according to the same author its k_a is about 10^{-7} and therefore the compound — if formed — is probably not extracted by ether at pH 11. Among the methyl amine-free products, eserinol has the character of a base and a phenol and will be extracted by ether from sodium carbonate solution. But only in exceptional cases, when the hydrolysis takes place without free access of air or other suitable oxidant, will there be any eserinol in the liquid. Rubreserine and the other coloured oxidation products are not extracted by ether from sodium carbonate solution except in traces.

Therefore, if a partly decomposed eserine solution is alkalized with sodium carbonate and extracted with ether, the eserine will pass over to the ether phase quantitatively. Eserinol will also be found in the ether solution, if it occurs among the decomposition products. But on oxidation with air or oxygen in the water phase the eserinol can be rapidly transformed to rubreserine and other oxidation products, which are not extractable. Methyl

amine will pass over in minor quantities — about 10 per cent of the free amine under the extraction conditions used in this work. However, it is demonstrated in the experimental part that it is possible to get rid of the methyl amine by evaporating the dried ether solution. It may now be predicted that the residue of the evaporation is fairly pure eserine and consequently all the four methods for the determination of eserine, described in the earlier paper (1), should be applicable. One of these methods deals with the alkaloid as such, two of them are determinations of methyl amine, liberated from the alkaloid, and the fourth founded on eserinol, which after liberation from the alkaloid is oxidized to rubreserine.

The four methods were applied to studies of the degradation of eserine in carbonate-bicarbonate buffer of pH about 11. The hydrolyses were performed at 25,0° C and with oxygen slowly bubbling through the solution. The experiments are described in the experimental part and it appears from Tables 4 and 5 that these fundamentally different methods give results, which are consistent within reasonable limits of error. This seems to prove that our prediction was correct, that eserine may be isolated from its partly decomposed solutions by the procedure outlined above. Further support comes from the fact that the method for determining decomposed alkaloid described first gives results corresponding to those from the methods based on the eserine remaining intact.

Experimental Part.

1. The determination of eserinol in air-free eserine hydrolysates.

Construction of the standard curve. In air-free 0,1-normal sodium hydroxide and in nitrogen atmosphere eserine salicylate was completely hydrolyzed. The solution was filled up to a suitable volume with airfree water and from this eserinol standard aliquots (0,5—5 mg) were taken and added to a mixture of 2,00 ml of 1,00-molar sodium carbonate and as much 0,1-molar sodium bicarbonate as was equivalent to the sodium hydroxide in the aliquot. The liquid was diluted to 10 ml and slowly bubbled with air for 5 minutes. 1,6 ml 1 M phosphoric acid was added and the solution transferred to a volumetric flask and filled up to 25,00 ml. The stability of eserinol in the standard solution was good. Even after 4 hours no decrease in the content of eserinol could be detected. The results of some calibration series are recorded in Table 1 and Fig. 1.

Table 1. *Calibration data for the photometric determination of eserinol in sodium carbonate solution.*

Eserinol (as eserine salicylate)	Extinction at 550 m μ (1 cm cuvette)	Eserinol	Extinction
0,482 mg	0,106	1,93 mg	0,406
0,860	0,199	2,41	0,520
0,964	0,209	2,53	0,547
1,45	0,311	3,37	0,744
1,68	0,376	4,21	0,929

Determination in hydrolysates. 50,00 mg eserine salicylate was dissolved in water in a 50 ml volumetric flask and the solution freed from air by a stream of nitrogen. The nitrogen bubbling was slowly continued throughout the experiment. The liquid was mixed with 10,00 ml air-free 1,00-molar sodium carbonate and filled up with air-free water. The temperature of the liquid, was maintained at $25,0^{\circ} \pm 0,05^{\circ} \text{C}$. by immersion in a water bath, regulated automatically. At certain intervals 5,00 ml were drawn, diluted to 10 ml and treated by the procedure described under »construction of the standard curve». When calculating the time of hydrolysis the 5 minutes during which air was bubbled through the solution were included. The results are recorded in Table 2 a and should be compared with those in Table 2 b which originate from hydrolyses at the same soda concentration and the same temperature, but assayed by determinations of eserine remaining intact.¹⁾ If the decomposed eserine in Table 2 a and the intact eserine in Table 2 b are added, the sum will be 100 per cent to within reasonable limits of error. The chief source of this error is a blank in the rubreserine determinations in Table 2 b, which has not been corrected for.

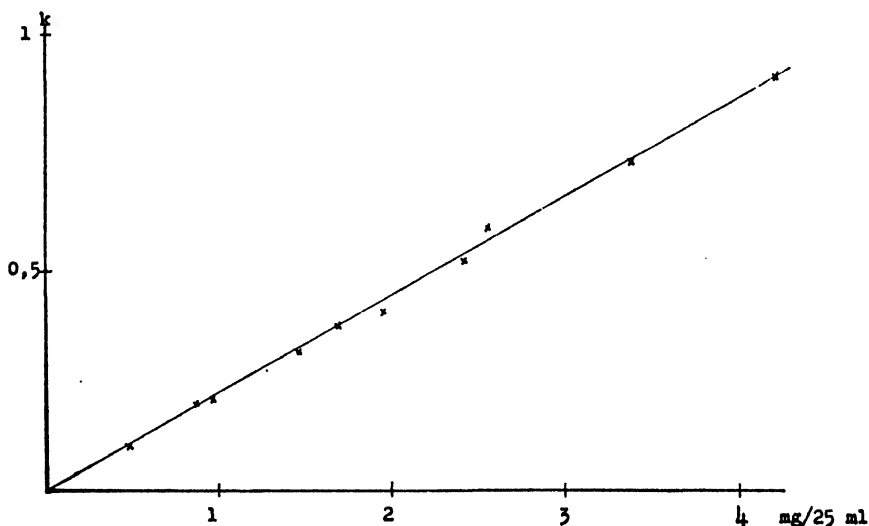


Fig. 1. Calibration curve for the photometric determination of eserinol in sodium carbonate solution.

2. The determination of intact eserine in eserine hydrolysates.

The possibility of removing methyl amine quantitatively from the ether-extractable products of hydrolysis. Solutions of pure eserine and partly decomposed eserine were alkalinized with sodium carbonate and extracted with ether. The extracts

¹⁾ The hydrolyses in Table 2 b occurred with free access of air. This difference is immaterial, as will be further elucidated in a subsequent paper (3).

Table 2 *Decomposition of eserine in 0,200-molar sodium carbonate at 25,0° C.*

Original concentration of eserine salicylate 0,1 per cent.

a) Determination of eserinol by the procedure given in section 1 of the experimental part. Air-free solution.

Decomposed eserine after:				
30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
35,5 %	52,0 %	69,0 %	83,7 %	91,5 %
32,4	50,8		83,7	93,4

b) Determination of intact eserine by the rubreserine method, reported in section 2 of the experimental part. Free access of air.¹⁾

Remaining eserine after:			
30 min	60 min	120 min	180 min
61,2 %	48,6 %	31,0 %	20,4 %
62,1	48,4	33,4	

were dried with anhydrous sodium sulphate. Two equal portions were drawn for each experiment. One was evaporated directly to dryness, the other after addition of 20 ml of a 0,01-normal solution of methyl amine in dry ether. In both cases the residues were treated with small portions of ether, which were again evaporated. The residues were dissolved in some water and a few drops of 5 N sulphuric acid, and the eserine determined by titration of the methyl amine liberated by hydrolysis and distillation. See procedure in (1). The results are reported in Table 3.

Table 3. *The possibility of removing methyl amine.*

	The consumption of 1/100 normal sulphuric acid	
	Methyl amine added	No methyl amine added
Unhydrolyzed eserine	9,75 ml	9,50 ml 9,68
Hydrolyzed eserine (40 % decomposed)	3,07	3,17
(60 % decomposed)	4,30	4,35

Conditions of hydrolysis. The experiments were performed on two different scales, *viz.* with 0,4 and 0,04 per cent solutions of eserine salicylate. The temperature was maintained at 25,0° C \pm 0,05° by keeping the reaction vessel in an automatically regulated water bath. The solutions were carbonate-bicarbonate buffers (95 per cent anhydrous sodium carbonate and 5 per cent sodium bicarbonate). In the experiments with 0,4 per cent eserine salicylate the buffer was 0,200-molar and with 0,04 per cent of

1) See note p. 640.

the alkaloid salt 0,100-molar. A decrease of pH was to be feared on account of the chiefly acidic products formed on decomposition of eserine salicylate. But by choosing these comparatively high buffer concentrations and by adding the bicarbonate the pH was kept up during the hydrolyses. Nevertheless, in the stronger solution a decrease of pH from about 10,90 to 10,50 was shown. In the dilute solution the pH never fell below 10,85. The displacement in the former case was great enough to effect the reaction velocity distinctly. This is easily seen from Tables 4 and 5.

In order to avoid the eserinol when extracting a slow stream of carbon dioxide-free oxygen was led through the solutions in all the experiments in this section. It should be pointed out, that the eserinol will never complicate the analyses in practice.

The determinations in 0,4 per cent solutions of eserine salicylate. At certain intervals two 10 ml portions were drawn and rapidly extracted with 3×40 ml peroxide-free ether. The ether solutions were dried with sodium sulphate and evaporated to dryness. The residues were treated with a few ml of ether which was evaporated again. One residue was dissolved in a few ml water and 3 drops of 1M sulphuric acid, and the eserine was determined titrimetrically after hydrolysis and distillation of methyl amine by the procedure described by the author in a previous paper (1). The other residue was dissolved in 10,00 ml 0,01000-normal sulphuric acid and made up to 25,00 ml in a volumetric flask. 5,00 ml of this solution was taken for determining eserine by the modification of the rubreserine method described by the author (1). The remaining 20 ml were titrated with 0,01000-normal borax, using methyl red as the indicator. All the results are found in Table 4. The determinations in Table 2 b were made by the rubreserine procedure.

The determinations in 0,04 per cent solutions of eserine salicylate. 5 ml portions were drawn at intervals and rapidly extracted with 3×25 ml peroxide-free ether. To the filtrated ether solution was added 5 ml 0,01-normal sulphuric acid, the ether was evaporated and the eserine determined in the water solution as rubreserine in the same manner as at the higher concentration.

Simultaneously 10 ml portions were extracted with ether, the ether solutions dried with anhydrous sodium sulphate, evaporated to dryness and treated with another small portion of ether. The residue was dissolved in a few ml of water and 3 drops of 1M sulphuric acid. After hydrolysis of the eserine and distillation, the methyl amine was determined photometrically with ninhydrin. The detailed procedure is given in (1). The results are found in Table 5.

Conclusions.

In summing up it may be concluded, that the conformity between the results of the fundamentally different methods shows, that they all depict correctly the decomposition of eserine.

One or other of the following procedures is recommended for the determinations of eserine in partly decomposed solutions.

Table 4. *Hydrolysis of 0,4 per cent eserine salicylate solutions at pH about 10,7 and 25,0° C.*

Time of hydrolysis	Eserine remaining intact; found by		
	Direct titration	Hydrolysis. titration of methyl amine	Photometric determination as rubreserine
32 min.	84,0 %	82,5 %	81,9 %
60 min.	71,8	71,6	76,0
120 min.	57,1	57,1	57,0
180 min.	45,9	46,2	45,5

Table 5. *Hydrolysis of 0,04 per cent eserine salicylate solutions at pH 10,9 and 25,0° C.*

Time of hydrolysis	Eserine remaining intact; found by	
	Photometric determination of methyl amine after hydrolysis	Photometric determination as rubreserine
<i>Experiment 1</i>		
90 min.	43,5 %	44,4 %
180 min.	27,6	22,2
<i>Experiment 2</i>		
45 min.	61,8	64,8
120 min.	37,0	35,5

1) Alkalinize the solution, 5—10 ml containing 20—100 mg of eserine salicylate, with sodium carbonate and extract immediately with three portions of peroxide-free ether, 25—40 ml in each. Dry the ether solution with anhydrous sodium sulphate, filter and evaporate the solvent on a water bath. Treat the residue with another portion of ether and evaporate again. Dissolve the residue in 0,01-normal sulphuric acid and titrate back with borax or hydrolyze the alkaloid and titrate the methyl amine after distillation (1).

2) Treat the solution, containing only 1—6 mg of eserine salicylate, as before but complete with a photometric determination of methyl amine with ninhydrin (1).

3) Extract the solution, containing 0,5—5 mg of eserine, with ether as before. Add 0,01-normal sulphuric acid to the filtered ether solution and evaporate the ether on a water bath. Determine eserine in the water solution photometrically as rubreserine, e. g. according to (1).

References.

1. *Hellberg*, Svensk farm. tidskr. 51, 560 (1947).
2. *Ehrlén*, Farm. Revy 47, 519 (1948).
3. *Hellberg*, Svensk farm. tidskr. In press.
4. *Faurholt*, Den Kongel. Vet. og Landbohøjskoles Aarsskrift 1924, Copenhagen, p. 1.

On the Stability of Eserine Solutions — Especially Eye Drops.

By *Hans Hellberg*

The Chemical Department of the State Pharmaceutical Laboratory,
Stockholm

(Inserted in Collect. Pharm. Suec. IV. 1949)

Eserine is nowadays principally used as a miotic in eye drops. Some ophthalmologists assert that the deterioration of eserine solutions — perceptible through the red colour developed — does not influence the miotic properties (1), whereas other authors are more undecided (2). However, it is well known that the decomposition of eserine in aqueous solution will first attack the urethane chain, which *Stedman* has shown to have a decisive influence upon the physiological properties of the alkaloid (3). Moreover, in biochemical experiments with cholinesterase inhibition, *Ellis et al.* have shown that the decomposition products have no effect comparable with that of intact eserine (4).

Until now, no sensitive method for testing miotic potency biologically has been worked out. Rather great differences in concentration are necessary to secure differences in effect. But a powerful red colour may be produced in an only slightly decomposed eserine solution. It is, therefore, no wonder that solutions, apparently highly decomposed, may exert satisfying miotic effect. But this does not mean that the decomposition products have a miotic effect. To make sure some biological tests were performed, in which the action on the rabbit's eye of a freshly prepared solution was compared with that of an entirely decomposed one.

Stock solution of decomposed eserine. 25,0 mg eserine salicylate was dissolved in 4,5 ml of water and mixed with 0,75 ml of 1 M sodium hydroxide. After 15 minutes the solution was shaken gently for 5 minutes. 0,50 ml 1 M phosphoric acid was added and the solution made up to 10,0 ml. pH about 7.

Stock solution of eserine. 0,25 per cent solution of eserine salicylate in diluting liquid (see below).

Diluting liquid. Phosphate buffer pH 7 as in the Swedish pharmacopoeia.

For the experiments fully grown, white rabbits were used. The stock solution of eserine exerted miotic effect down to dilutions of 1:100. From 1:50 upwards a distinct effect was always produced. In the main experiment six rabbits were used, divided into three groups. 0,1 ml of the 1:50 dilution of the eserine stock solution was instilled in one eye of all the rabbits. Simultaneously 0,1 ml of the dilutions 1:5, 1:15 and 1:50 of the decomposed eserine stock solution was placed in the other eye. In all the eyes treated with intact eserine there was a distinct miotic effect, while none of the eyes treated with decomposed eserine was affected.

The products of eserine present in the decomposed solution used were chiefly methyl amine, carbon dioxide and rubreserine. In naturally

decomposed eye-drops the main products of decomposition are probably not rubreserine but some substances even more unlike eserine. It therefore seems permissible to conclude from the experiments that the decomposed eserine in eye-drops is devoid of miotic properties. Consequently it is of interest to know the stability of eserine under the conditions to which the alkaloid is likely to be submitted in the preparation and storage of eye-drops.

* * *

The changes in eserine solutions are particularly obvious, as they reveal themselves by a red colour. They have, therefore, been the object of much interest. Most investigators have only established the time during which eserine solutions of certain types remained colourless (5,6,7,8). This manner seems to be primitive. Considerably more valuable is the work of *Ellis et al.* (4), who have studied the decomposition of eserine in aqueous solutions of body temperature by two quantitative methods. Firstly they used a biochemical method determining the power of the solution to inhibit the enzyme cholinesterase. Secondly they applied a photometric determination analogous to the rubreserine method used in this work. They seem to apply these methods directly to the hydrolysates, which appears to be unsuitable in the latter case, as coloured products appear on decomposition.

Even the simple observation of the production of colour showed that the pH of an eserine solution affected the stability considerably. *Ellis et al.* confirmed this pH-dependence in their quantitative experiments.

At an early stage it was observed that the addition of bisulphite to eserine solutions apparently acted as a preservative (5, *i.a.*), as the formation of colour was prevented. After recognizing some of the decomposition products the addition of sulphite seemed logical, because the oxidation of eserinol to rubreserine with air would be hindered and an accumulation of eserinol produced, by which the progress of decomposition should be prevented. However, experiments by the author had indicated that the primary decomposition of eserine was independent of a possible oxidation of the eserinol by oxygen or air (9). This point was examined more exhaustively in this work.

A series of hydrolyses were performed under different conditions of oxidation. The details are stated in Talbes 1 a and 1 b, where the results are given. In the experiments where oxygen was not bubbled continuously, the portion drawn for analysis was treated with a slow stream of oxygen for 5 minutes, this time being included in the total time of hydrolysis. For the method of assay the reader is referred to a previous paper (9).

The experiments show that oxygen does not affect the decrease in eserine content during hydrolysis. Nor does the sulphite seem to inhibit the decomposition in any other way.

One of the demands made on eyedrops is that their pH shall not deviate too much from the physiologic one. Different opinions have been asserted, but nobody seems to go outside the limits pH 5—pH 8. Therefore, the stability of eserine solutions was investigated in the pH-range

Table 1 a. Decomposition of 0,4 per cent eserine salicylate in 0,200 molar sodium carbonate solution at 25,0° C. Determinations of eserine titrimetrically after hydrolysis and distillation.

	Eserine remaining intact after				
	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
Air-free solution Nitrogen atmosphere	79,0 %	67,5 %	52,2 %	41,6 %	
Open vessel		67,8	52,1	47,0	
Open vessel. Sodium pyrosulphite added 0,1 g/50 ml		72,0	54,0	43,6	35,8
Oxygen bubbling	79,2	67,7	52,8	42,7	

Table 1 b. Decomposition of 0,04 per cent eserine salicylate in 0,100 molar carbonate-bicarbonate buffer pH 10,9 at 25,° C. Determinations of eserine by the rubreserine method.

	Eserine remaining intact after						
	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.	240 min.
Air-free solution Nitrogen atmosphere	75,8 %	58,7 %		38,0 %		23,3 %	16,0 %
Oxygen bubbling	75,8	58,9	46,4	40,2	30,2	24,1	16,7

5—8 and at a constant temperature (25°) not too far from ordinary room temperature. The analyses were carried out in accordance with the directions given in (9). The results are found in Tables 2 a and 2 b. Three of the experiments in Table 2 a had to be discontinued after a little more than 30 days because of mould formation in the solutions. The solutions used for the experiments in Table 2 b contained 0,04 % of methyl p-hydroxybenzoate as a preservative.

The results show that at room temperature eserine salicylate solutions in pure water or with 2 per cent boric acid have good stability. However, it is

Table 2 a. The stability of 0,4 per cent eserine salicylate solutions at 25° C. Determinations of eserine titrimetrically.

Solvent	Eserine remaining intact after						
	2	10	15	20	30	60	100days
Water		98 %			100 %		
2 % boric acid					97 %	98 %	104% ¹⁾
Phosphat buffer pH 7		96 %	91 %	89 %	81 %		
Borate buffer pH 8	97 %	80 %	71 %	62 %	40 %		

¹⁾ Probably some evaporation of the last portion of the solution.

Table 2 b. The stability of 0,1 per cent eserine salicylate solutions at 25°. Determinations of eserine by the rubreserine method.

Solvent	Eserine remaining intact after					
	5	10	20	30	40	50 days
Water	98 %	97 %	96 %	100 %	97 %	95 %
2 % boric acid	100	99	99	102	100	100
Phosphate buffer pH 7	98	96	90	90	85	85
Borate buffer pH 8	78	60	45	38	31	24

to be noted that the water solution had turned distinctly pink as early as after 2 days. Even the boric acid solution was pink after 10 days.

According to the Swedish pharmacopoeia eye drops shall be delivered sterilized. For solutions of eserine salicylate the pharmacopoeia states that this may be done by heating for 1 hour at 100° C. That such a treatment is quite out of the question at pH 7 or above can be foreseen from the results of the preceding experiments. As to solutions in pure water or with boric acid the statement needed examination. In order to make the experiments more obvious, the solutions were heated to 100° C for 2 hours. At the same time the effect of sulphite was examined once more. The results are found in Table 3.

None of the solutions examined was completely stable during the treatment. The stability appeared to be greatest at a pH below 5 but such a solution is unsuitable for the eye. Moreover, it was demonstrated that the sulphite was of no significance for the stability, but served instead to conceal the decomposition.

Table 3. Heating of 0,1 per cent eserine salicylate solutions to 100° C for 2 hours. Determinations of eserine by the rubreserine method.

Composition of the solution			Colour after heating	pH after heating	Eserine intact after heating
Boric acid	Sulphite as Na ₂ SO ₃ and/or Na ₂ S ₂ O ₅	Sulphuric acid n/100			
0	0	0	strongly red	6,48	0
0	0	0,5 ml/25 ml	almost colourless	4,23	28 %
0	1‰	0	colourless	3,03	90 %
2 %	0	0	faintly pink	5,05	83 %
2 %	0	0	faintly pink	4,99	76 %
2 %	1‰	0	colourless	6,33	0
2 %	1‰	0	colourless	5,61	12 %
2 %	1‰	0	colourless	3,38	83 %
2 %	1‰	0	colourless	3,00	86 %

Conclusions.

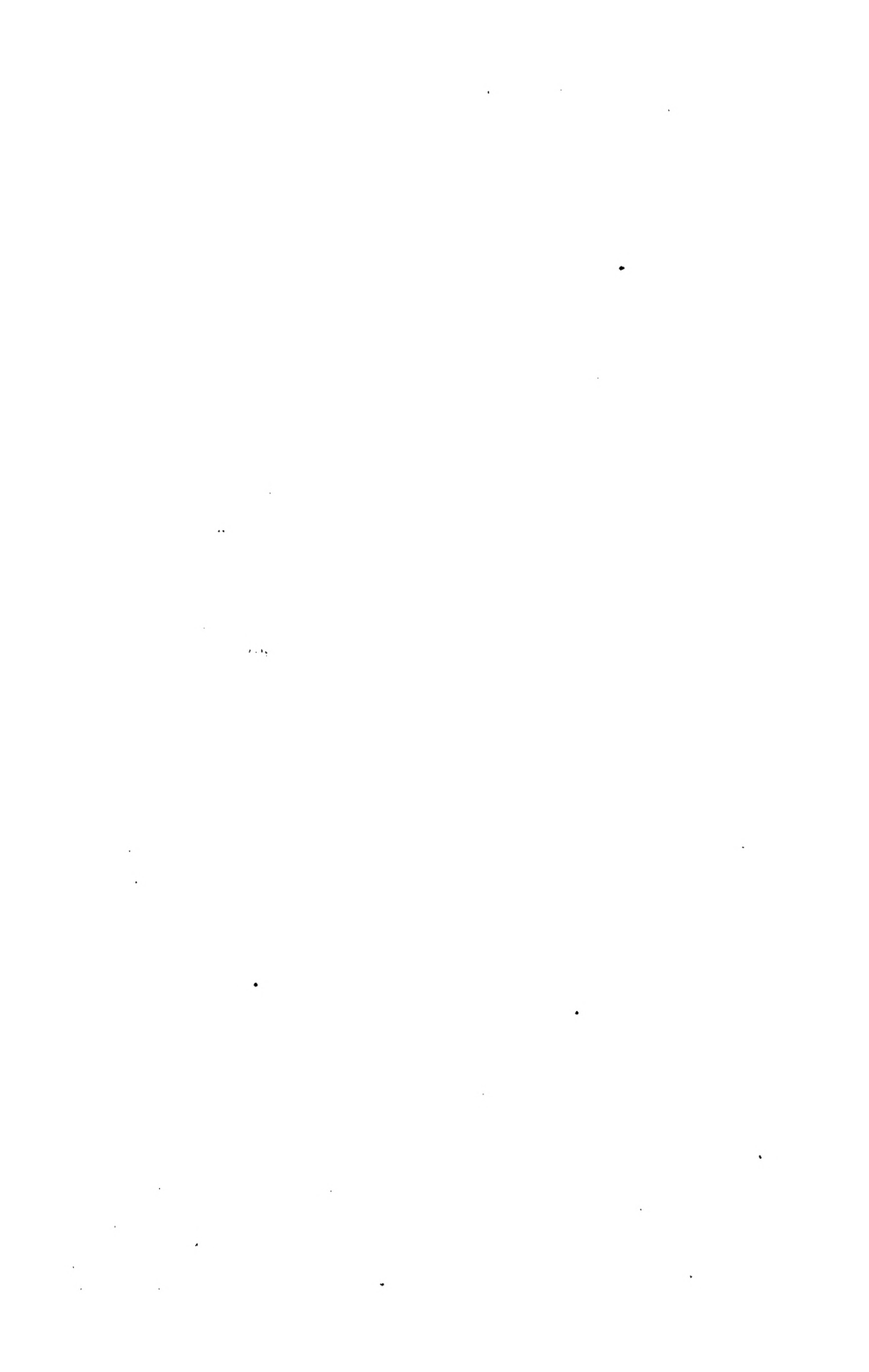
The presence of air or sulphite in eserine solutions has no real influence on their stability. Acidic solutions containing sulphite remain colourless because the coloured decomposition products are converted by the sulphite to substances which are colourless at acidic pH.

For the sake of stability the pH of eserine solutions must not rise above 7. Preferably the pH may be 6 or lower. If not satisfactorily buffered, the solutions must be kept in glass, free from extractable alkali. A solution with 2 % boric acid is stable at room temperature and not easily infected. It is recommended even for medical reasons, *e.g.* by *Hind and Goyan* (10). A stable eserine solution, *e.g.* one made with boric acid, may be beautified by the addition of a small quantity of sulphite. However, the strong acidic displacement of pH even by very small quantities of bisulphite or pyrosulphite must be taken into consideration for physiological reasons.

Solutions of eserine must not be sterilized by heating, whatever the pH value.

References.

1. *Gifford and Smith*, Arch. Ophthalmolog. 9, 227 (1933)
 2. *Hicks*, Am. J. Ophthalmolog. 20, 1040 (1937)
 3. *Stedman*, Biochem. J. 20, 719 (1926)
 4. *Ellis, Plachte and Strauss*, J. pharmacol. 79, 295 (1943)
 5. *Bridel*, Journ. pharm. chim. 27, 166 (1923)
 6. *Krantz and Slama*, J. am. pharm. ass. 16, 412 (1927)
 7. *Krantz, Carr and Musser*, J. am. pharm. ass. 25, 979 (1936)
 8. *Rae*, Pharm. J. 156, 329 (1946)
 9. *Hellberg*, Svensk farm. tidskr. 53, 637 (1949)
 10. *Hind and Goyan*, J. am. pharm. ass. 36, 33 (1947)
-



ASSAY OF THE CURATIVE ACTION OF NEOARSPHENAMINE BY TIME-MORTALITY DATA

BY ÅKE LILJESTRAND

From the State Pharmaceutical Laboratory and the Medical Clinic of the Caroline Hospital, Stockholm

Received November 6, 1948

THE commonest current methods employed for testing the action of nearsphenamine are those in which the drug is injected into mice or rats already lightly or heavily infected with *Trypanosoma equiperdum* on a previous day. Blood specimens removed from every animal are examined daily, involving the counting of many squares of the counting-chamber, before deciding whether or not the animals are cured. These methods are laborious and time-consuming, and for this reason, and because of other disadvantages, Bülbring and Burn¹ proposed that the activity of a preparation should be estimated from the survival times of mice infected and treated on the same day. In the present work, this method has been extended and examined statistically.

METHOD

Blood taken from rats which had been infected 2 days earlier was diluted with 1 per cent. sodium citrate solution till it contained 7,000 trypanosomes in 1 microlitre. Mice weighing about 16 to 18 g. were infected by intraperitoneal injection with 0.5 ml. of this trypanosome suspension. Nearsphenamine was injected intravenously in 0.2 per cent. solution within 2 hours from the time of infection. The doses were calculated in proportion to the body weight. The usual precautions to prevent the oxidation of the nearsphenamine were taken.

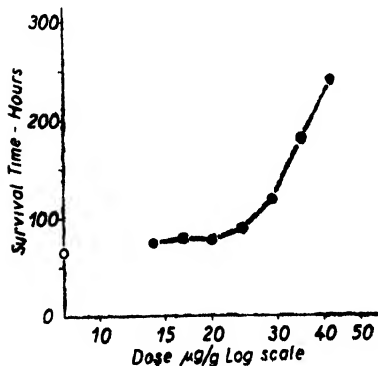


FIG. 1. Survival in hours from the time of infection for the median in every group.

○ Untreated. ● Treated.

RESULTS

The results of a preliminary pilot-experiment provided a curve relating dosage with survival time. Seven groups each of 15 infected mice were injected with graded doses of nearsphenamine ranging from 13.9 µg./g. of body weight upwards by steps of 20 per cent. From 2 days after the infection the mortality was noted every hour for 36 hours. After that, observations at night were discontinued. For the two highest doses the mortality was noted only once a day. A control group of 40 mice was followed at the same time. The survival time-

THE ASSAY OF NEOARSPHENAMINE

dosage curve was drawn from the medians of the survival times in every group (see Fig. 1). All animals, except those receiving the highest dose, died, the last mouse surviving until the 15th day. In the highest dose group, i.e., those receiving $41.5 \mu\text{g./g.}$, 3 animals survived, the last one dying on the 18th day. Since we rarely found any animals dying after this time it was decided that any mouse living beyond the 18th day should be counted as definitely cured.

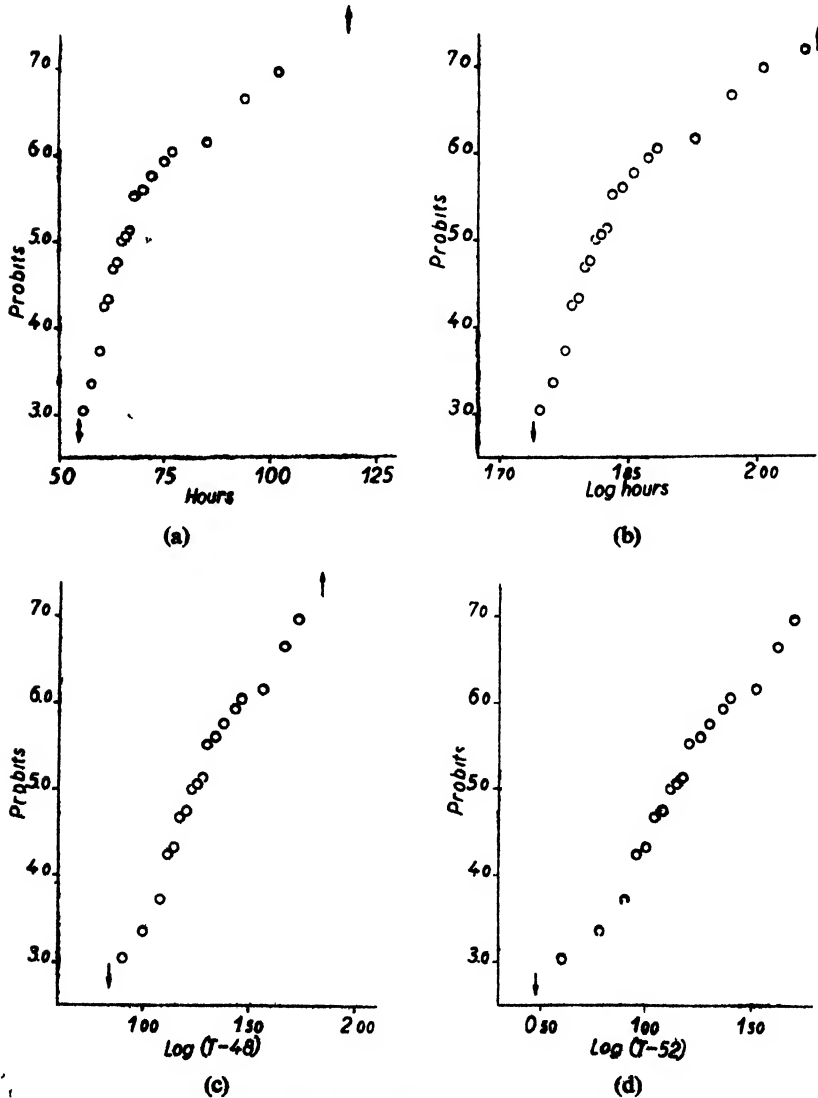


Fig. 2. Probit transformations for the survival times from the time of infection of the 40 infected control mice. (a) Survival time in hours; (b) Log survival time in hours; (c) Log (survival time in hours - 48); (d) Log (survival time in hours - 52). The times of the last observation with all living animals and those of the first observation with all dead animals are marked with arrows.

Using this basis we observed which function of survival time had a normal distribution. In toxicity tests in which the lethal time is delayed, some function of the time elapsing between the time of injecting the animal and its death can be found to be normally distributed, and the standard deviation of this function becomes a suitable measure of the varying sensitivity of the animals to the drug. Since the untreated infected controls show differences in their survival times, these were also determined and their limits of variation ascertained.

Of the 40 controls mentioned above, 4 animals died during periods when observations were more infrequent. For the other 36, the time of death could be stated to within an hour. The percentage of animals that had died up to the various times was transformed into probits according to Bliss². These values were then plotted on graph paper with the probits along one axis and the time or the logarithm of the time along the other, the time being measured from the moment when the animals were infected (see Fig. 2 a and b). If the plotted function of time had been normally distributed, the points should have fallen mainly along a straight line. In neither case did this happen, however, but the points fell along curved lines. That this was not accidental could be seen from similarly curved lines with corresponding probit transformations for the lower neoparsphenamine doses, in spite of the small number of animals in each one of these groups.

Every mouse was inoculated with about 3.5 million trypanosomes. In this way it received such a large number of trypanosomes that one hardly needs to take into account any differences in virulence between the infecting material of the different mice due to random variation. The dispersion of survival times will thus be mainly due to the host animals, i.e., the possibilities of growth for the trypanosomes in the different mice and the varying resistance of these to the fully developed infection. With intraperitoneal infection the conditions of growth may be regarded as nearly optimal, and so no great differences should exist between the different mice on this ground. This line of reasoning is confirmed by the results from the trypanosome counting method. In this the animals are used when the infection is very strong in the blood, that is, 2 days after being infected. Relatively few animals, however, need to be rejected on account of badly developed infection. In other words, full development of the infection is reached at approximately the same time by the majority of the infected animals. Consequently the differences in survival times would chiefly be due to the varying resistance of the mice against the fully developed infection. If such is the case some function of the time between the point when full infection is reached and the time of death might have a normal distribution.

The first control mouse died 55 hours after being infected. Evidently full infection must have been reached some time earlier, after which the remaining time of survival was influenced only by the resistance of the mouse. Times of 48 and 52 hours after infection were, therefore, chosen, as it was considered that full infection might have been attained

THE ASSAY OF NEOARSPHENAMINE

in the control group at one of these periods. New probit diagrams were made with the logarithms of the times from these new starting points along one axis, that is, the logarithm of the survival time in hours minus 48 and hours minus 52 respectively. In both cases good agreement with a normal distribution was obtained (*see* Fig. 2 c and d). In view of the small amount of material the points on both figures appear to lie reasonably near a straight line.

Also for the mice treated with nearsphenamine the logarithms of (survival time in hours—48) seemed to be normally distributed for every dose. As the groups were rather small, on a later occasion 2 groups with 40 infected mice in each were treated with doses of 20 and 31 g./g. of body weight respectively. In these groups, too, no certain deviation from the formula just mentioned could be found, the points lying fairly well along a straight line in the probit diagram. On this occasion a certain change in sensitivity to the nearsphenamine was observed as compared to that shown in Figure 1 since half of the animals in these two groups died after 108 and 218 hours.

If this transformation of the primary values, i.e., the logarithm of (survival time in hours—48) proves to be generally useful for experiments of this kind in different laboratories, the mice of a group in different tests or at different times should as a rule be approximately normally distributed when their times of survival are transformed in this manner. The values given by Bülbring and Burn and also those found in earlier experiments from this laboratory, lend support to this contention. These figures confirm, among other things, that the maximum mortality of the controls as well as that of the animals treated with small nearsphenamine doses occurs during the night between the second and third day after the infection.

TABLE I

Day after Infection	Reading Time		Time in Hours After the Infection (T)	Class Limit Log (T-48)	Class Width	Class Middle
	Time of Day					
2	22 o'clock	...	61	1.114	0.248	1.238
3	8	"	71	1.362	0.104	1.414
3	14 ¹⁵	"	77.25	1.466	0.102	1.517
3	22	"	85	1.568	0.104	1.620
4	8	"	95	1.672	0.104	1.724
4	20 ¹⁵	"	107.75	1.776	0.105	1.828
5	13	"	124	1.881	0.104	1.933
6	9 ³⁰	"	144.5	1.985	0.098	2.034
7	10	"	169	2.083	0.099	2.132
8	17	"	200	2.182	0.104	2.234
10	10	"	241	2.286	0.103	2.337
12	14	"	293	2.389	0.105	2.442
15	9	"	360	2.494	0.099	2.544
18	17	"	440	2.593	0.103	2.645

* Calculated with the class width taken as 0.103, which is the mean of all class widths except the first

A. LILJESTRAND

As it thus seems that the logarithm of (survival time in hours-48) in practice may be taken as normally distributed in the different dosage groups, due regard should be given to this fact in the spacing of the reading times. The following example shows how this may be performed so that the intervals between the observations are as far as possible equally large when expressed in the normally distributed function, i.e., log. (time in hours between the time of infection and the observation -48). Even allowing for this, the readings can be so arranged that most of them are made during the normal working day.

EXAMPLE

Groups of 20 newly infected mice, which had been kept in the laboratory for over a week before this experiment were injected intravenously with doses of 24 and 30 $\mu\text{g./g.}$ of body weight of the International Standard and of a commercial preparation respectively, both in 0.3 per cent. solution. The mice were infected at 9 o'clock in the morning and the injections of nearsphenamine were made within the following 2 hours. The readings were performed according to Table I. The times when the mice were found dead are given in Table IIa and the corresponding class middle for each animal in Table IIb. Two methods of analysis of the data are now available.

TABLE IIa
RESULTS. NUMBER OF DEAD MICE

Day	Reading Time Time of day		Standard		Test Preparation	
			24 $\mu\text{g./g.}(S_L)$	30 $\mu\text{g./g.}(S_H)$	24 $\mu\text{g./g.}(U_L)$	30 $\mu\text{g./g.}(U_H)$
2	22 o'clock
3	8	"	4	...
3	14 ¹⁵	"	7	2
3	22	"	...	1	2	4
4	8	"	...	4	5	3
4	20 ⁴⁵	"	...	8	3	6
5	13	"	...	4	6	2
6	9 ³⁰	"	...	2	1	...
7	10	"	2	...
8	17	"	...	1	5	1
10	10	"	2	...
12	14	"
15	9	"
18	17	"
Surviving after the 18th day		1

The simplest method is to calculate the means, standard deviations, and standard errors of the means in the usual manner for each group as in Table IIB t-analysis for the differences between the means of S_H and S_L and between U_H and U_L shows in the first case $P < 0.001$ and in the second case $P = 0.001$. The differences are therefore not attributable to random variation alone. This shows that the test really is sensitive to a difference in dosage of 20 per cent. For the difference between the means of S_L and U_H $P = 0.05$, i.e. the larger test dose has smaller effect than the smaller standard dose.

THE ASSAY OF NEOARSPHENAMINE

TABLE II
RESULTS TRANSFORMED
CLASS MEANS FROM TABLE I FOR THE DEATH OF EACH MOUSE

Mouse			Standard		Test Preparation		
Number	24 µg./g. (S _L)	30 µg./g. (S _M)	24 µg./g. (S _L)	30 µg./g. (U _M)	
1	1.517	1.724	1.238	1.414	
2	1.620	1.724	1.238	1.414	
3	1.620	1.724	1.238	1.517	
4	1.620	1.828	1.238	1.517	
5	1.620	1.828	1.414	1.517	
6	1.724	1.828	1.414	1.517	
7	1.724	1.828	1.414	1.620	
8	1.724	1.828	1.414	1.620	
9	1.724	1.828	1.414	1.620	
10	1.724	1.933	1.414	1.620	
11	1.724	2.034	1.414	1.620	
12	1.724	2.034	1.517	1.724	
13	1.724	2.132	1.517	1.724	
14	1.828	2.132	1.620	1.724	
15	1.828	2.132	1.620	1.724	
16	1.828	2.132	1.620	1.724	
17	1.828	2.132	1.620	1.724	
18	1.933	2.234	1.620	1.828	
19	1.933	2.234	1.724	1.828	
20	2.132	2.645	1.724	2.132	
Total	35.099	39.914	29.432	33.128	
Mean	1.75495	1.9957	1.4716	1.6564	
Standard deviation	0.138	0.232	0.159	0.164	
Standard error of the mean	0.031	0.052	0.036	0.037	
Total S	75.013	Total U	...	62.560

More information, however, may be extracted from the material if it is subjected to variance analysis (Fisher³), the results of which are shown in Table III.

TABLE III
ANALYSIS OF VARIANCE. DATA OF TABLE II

Source of Variation	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F	P
Between samples ...	1	1.9385	1.93850	61.74	<0.001
Between doses of same substance	2	0.9211	0.46055	14.67	<0.001
Random sampling ...	76	2.3867	0.03140	—	—
Total ...	79	5.2463	—	—	—

Slope, 2.18 Potency, 0.72 Fiducial limits, 0.580 to 0.809 (P = 0.05).
Percentage limits, 80.5—112.0

The slopes of the dosage-response lines were calculated and found to be homogeneous. It was therefore legitimate to calculate a combined slope and to use this value in order to obtain the potency of the unknown in terms of the standard from the equation provided by Gaddum⁴, and the fiducial limits of error of the estimated potency from the equation provided by Fieller⁵.

Summarising the results, the unknown preparation had a potency of 0.72 of the standard with fiducial limits of error of 0.580 to 0.809 for P = 0.05.

When material is grouped it is desirable to group it within narrow class limits, i.e. to group it in many classes, in order to extract as much

A. LILJESTRAND

information as possible. In this case the number of classes directly depends on the frequency of the readings; many times of observations allow many classes with narrow class limits, whereas few readings allow only a few classes and widely spaced class limits. The number of the observations, however, is limited by the fact that in practice it is hardly feasible to make observations during the night. An increase of the number of readings during the day but none during the night implies alternating small and large intervals between the observations, with varying class widths, and this naturally gives no increased precision.

This could also be verified in the material from our example in which more readings were made during the days than are recorded in the tables. The number of readings in the example is near the maximum possible in practice with approximately equally spaced intervals. The fact that the first class has a much larger width than the rest has no great importance as in any case the doses of neoarsphenamine must be so large that only single animals die here.

One objection that has been raised against using survival times for estimating the curative action is that one does not know if the death of the animal is due to the infection. A certain control of this, however, exists. No deaths are caused by the infection on the day when the animals are infected or on the first or even on the greater part of the second day after infection. If the animals die during this time, it is due either to technical faults, which should be few with proper technique, or to non-specific deaths. Mice dying during this time must therefore be excluded from the analysis. When the groups are not too small and the times of survival not too long, the death of one or two mice during this period does not appreciably alter the accuracy of the test. If more mice die, it shows that they were in bad condition and the assay must be rejected. It has been found convenient to keep the mice in the laboratory for some days before they are used in order to make sure that they are in good condition.

When it is desired accurately to determine the curative potency of a preparation, the calculations will be performed as indicated in the example quoted above. Often, however, it is only necessary to ascertain that the potency of the test preparation is not less than that of the standard or of a certain proportion of it. The doses to be used should give a clearly prolonged survival time without making the test unwieldy. In our experiments a dose of 24 to 30 $\mu\text{g/g.}$ of body weight fulfilled these conditions. As a control of the sensitivity of the method a weaker dose of the standard was given as well, by way of example say 20 per cent. weaker. In a successful experiment a difference between the two should be evident.

PRACTICAL PERFORMANCE OF A TEST

Guided by these principles and by the aforementioned results, the test is performed as follows: 60 mice which have been kept in the laboratory for a week are infected intraperitoneally with 0.5 ml. per mouse of a trypanosome suspension containing 7,000 trypanosomes per

THE ASSAY OF NEOARSPHENAMINE

microlitre. This is obtained from the blood of rats that have been infected 2 days earlier. The trypanosomes are counted in a counting chamber and the blood is diluted with 1 per cent. sodium citrate solution to the desired concentration. The infection is performed at 9 o'clock in the morning. Within the next hour the mice are injected intravenously with the different doses of the 0.3 per cent. neoarsphenamine solutions. During the preparation of the solutions the usual precautions against oxidation are observed (*see* Burn⁶). 20 mice receive 24 μ g. and 20 mice 30 μ g./g. of body weight of the standard and 20 mice receive the dose of the test preparation that is to be compared with the higher standard dose, and which must not be less potent than this standard dose if the preparation is to pass the test. The mice are observed at 16 o'clock on the second day after the infection. Those which have died are rejected and excluded from the calculations. After that the readings of the mortality are spaced according to the times in Table 1. The mean and the standard error of the mean are calculated for every group, the value for every animal being that of the corresponding class middle seen in the table. Thus, if an animal has died only on the fourth day at 8 o'clock its value is 1.620. The preparation passes the test if t-analysis shows that it is stronger or not weaker than the larger standard dose. In the latter case, however, a significant difference between the standard doses must exist, otherwise the test must be repeated. If t-analysis shows that the test preparation is significantly weaker than the larger standard dose it is rejected.

DISCUSSION

When testing substances on animals, it can be shown in many cases that the logarithm of the duration of the effect or the logarithm of the time till the effect appears is approximately normally distributed (Bliss², Goodwin and Marshall⁷, Goldberg⁸ and others). A close study of this question, however, may reveal that a more complicated function of the time has a normal distribution (Ipsen⁹). On the other hand, it is sufficient to have an approximate knowledge of the kind of function that is normally distributed when grouping the observations as the laws for calculating the means, standard errors and t-values are also applicable to a number of different distributions, more or less deviating from the normal. The grouping of the observations advocated in this paper seems to be more rational than making one or two readings every day for a limited number of days as proposed by Bülbring and Burn¹ and Goodwin¹⁰ or for a longer times according to the method of Chen, Geiling and MacHatton¹¹. A further advantage is that an estimate of the error may be obtained for every dose, so extracting all information inherent in the material. A comparison with the results of Hawking¹² shows that, whereas in the trypanosome counting method every animal gives only a qualitative expression for the strength of the preparation in this method, the survival times are quantitative estimates of the strength of the drug, and thus furnish more detailed information.

A. LILJESTRAND

SUMMARY

The basis for using time-mortality data in estimating the curative effect of neoarsphenamine is examined. It is shown how the survival times may be transformed so that they become approximately normally distributed. A routine test has been designed on these lines.

The author is indebted to Dr. W. L. M. Perry, of the National Institute for Medical Research, London, for suggesting the treatment of the material with variance analysis and also for its application to the data.

REFERENCES

1. Bülbring and Burn, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1938, **11**, 67.
2. Bliss, *Ann. appl. Biol.*, 1938, **22**, 134.
3. Fisher, *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1946.
4. Gaddum, *Med. Res. Coun. Spec. Rep.*, 1933, No. 183.
5. Fieller, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1944, **17**, 117.
6. Burn, *Biological Standardisation*, Oxford University Press, 1937.
7. Goodwin and Marshall, *J. Pharmacol.*, 1945, **84**, 12.
8. Goldberg, *Acta physiol. Scand.*, 1948, **15**, 173.
9. Ipsen, *Contribution to the Theory of Biological Standardisation*, Copenhagen, 1941.
10. Goodwin, *J. Pharmacol.*, 1944, **81**, 224.
11. Chen, Geiling and MacHatton, *J. infect. Dis.*, 1945, **76**, 144.
12. Hawking, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1943, **16**, 13.

Kloralhydratets stelningspunkt.

Av Göran Schill

(Från Kungl. farmaceutiska institutets kemiska avdelning)

Inserted in Coll. Pharm. Succ. IV, 1949

Smältpunkten för kloralhydrat anges mycket olika i litteraturen. Uppgifterna variera mellan 46° — 47° [*Rudolphi*¹⁾] och 59° — 60° [*Banchetti*²⁾]. Olika länders farmakopéer ställa också ganska olika fordringar. Så anger t. ex. svenska farmakopén Ed. X 47° — 57° , medan danska farmakopén 1933 föreskriver, att preparatet skall börja sintra vid 49° — 50° och smälta vid 51° — 53° .

Om orsaken till dessa varierande uppgifter lämnas olika förklaringar. *Wolf*³⁾ och *v. Rossem*⁴⁾ ansågo, att kloralhydratet »dissocieras» i smältan, och att en jämvikt erhålles, som inställer sig långsamt. Smältpunkten kommer därför att bli beroende av upphettningshastigheten. Ju snabbare upphettningen sker desto lägre blir dissociationsgraden i smältan och desto högre blir smältpunkten. Även *Fonteyne*⁵⁾ ansåg sig genom undersökningar av ramanspektrum ha visat, att kloralhydrat vid smältning dissocieras i kloral och vatten. *Schoor*⁶⁾ anger däremot, att kloralhydrat kan förekomma i 2 olika former, α och β , av vilka α är stabil vid vanlig temperatur. Vid smältning omvandlas en del av α -formen till β -form, men jämvikten inställer sig icke momentant. Smältpunkten kommer därför att variera med upphett-

ningshastigheten, och ju långsammare uppvärmningen sker desto närmare den »naturliga smältpunkten» kommer man. *Schoor*¹⁾ rekommenderar därför bestämning av stelningspunkten. Substansen bör då hållas smält tills jämvikt inställt sig, underkylas till 43° och ympas med fast kloralhydrat, då en konstant stelningspunkt på 46.8° erhålles. Även i *Kommentaren till Pharm. Helv. Ed. V*²⁾ anges, att kloralhydrat förekommer i 2 former.

I elfte upplagan av svenska farmakopén anges, att smält kloralhydrat skall ha stelningspunkten 47°. Stelningspunktsbestämningen skall givetvis utföras enligt de allmänna föreskrifterna p. 8. 10 g smält kloralhydrat fyller i ett provrör, och en termometer nedföres i smältan, varefter provröret nedsänkes i vatten med en temperatur av omkring 42° och avkyles, tills termometern visar omkring 45°. Genom omröring med termometern bringas substansen att stelna, och den högsta temperatur som avläses räknas som stelningspunkten. I stället för omröring kan man också ympa med en liten kristall kloralhydrat.

Utföres stelningspunktsbestämningen på detta sätt visar det sig emellertid, att mycket växlande resultat kunna erhållas, och man får lätt stelningspunkter som variera mellan 48° och 51°.

En tänkbar orsak till dessa varierande värden kan vara, att svenska farmakopén icke anger någonting om hur länge substansen skall hållas smält. Som ovan nämnts föreligger möjligen någon form av jämvikt i smältan, och denna jämvikt inställer sig relativt långsamt. Det är därför möjligt, att de varierande resultaten beror på att de olika bestämningarna utförts med olika hastighet, vilket medfört, att jämviktslägets stelningspunkt ej uppnåtts i vissa fall.

En serie försök utfördes på följande sätt. 10 g kloralhydrat (provhaltig farmakopévara) uppvägs i ett provrör. I substansen nedfördes en termometer graderad i 1/10 grader, som med hjälp av en kork hölls fäst så att den icke rörde vid provrörets väggar. Substansen smältes därefter genom upphettning i oljebad av önskad temperatur. Sedan smältan förvarats i detta bad angiven tid, överfördes den till ett oljebad med temperaturen 42° och hölls där tills termometern visade ungefär 2° under den väntade stelningspunkten. Genom rivning med en omrörare bringades substansen att kristallisera. Den därvid erhållna högsta temperaturen betraktades som substansens stelningspunkt.

Den väsentligaste avvikelser från Ed. XI:s metod var att tiden och temperaturen för smältningen fixerades. Vidare användes oljebad i stället för vattenbad, för att vatten ej skulle upptas av substansen och ändra stelningspunkten. Resultat i tabell 1.

Av tabellen framgår, att den stelningspunkt som erhöles omedelbart efter fullbordad smältning i allmänhet låg avsevärt högre än de värden som erhöles, när substansen hållits smält en viss tid. Efter hand uppnåddes dock ett definitivt värde, som ej ändrades genom längre smälttid. De låga värdena vid 0 min. för 60° och 55° berodde förmodligen på att smältningen vid dessa temperaturer gick så långsamt (30—60 min.), att jämvikt nästan hann inställa sig efter hand i smältan. Vid 65°, där smältningen gick relativt snabbt,

Table 1
Chloral Hydrate

Variation in freezing point with the time the substance is maintained in melted condition and with the initial temperature of the melt. Cooling time 1—3 min.

Each value constitutes the mean of at least three determinations.

Temp.	Number of minutes substance has been in melted condition								
	0	3	6	9	12	15	18	30	60
85°	51.2	49.6	49.5	49.4	—	—	—	49.6	49.5
70°	49.6	—	—	48.6	48.5	48.3	48.4	48.5	48.4
65°	50.0	49.4	48.9	48.2	48.1	48.0	48.0	48.1	48.0
60°	48.7	48.2	47.9	47.8	47.8	47.6	47.4	47.4	47.5
55°	47.3	47.0	47.1	47.0	47.2	—	—	47.0	46.9

tog det däremot c:a 10 minuter innan stelningspunkten nått sitt definitiva värde. Vid högre temperaturer gick det som synes betydligt snabbare.

Det mest anmärkningsvärda med de erhållna resultaten var emellertid, att den definitiva stelningspunkten blev högre, om substansen hållits smält vid högre temperatur.

En sammanfattning av de definitiva stelningspunkterna för smältor med olika begynnelsestemperaturer finnes i tabell 2. Stelningspunktsbestämningarna ha utförts som i tabell 1. Vid temperaturerna 90°—60° hölls substansen smält 30 min., vid 55°—46° i 60 min., så att jämvikt säkert hann inställa sig. Stelningspunkterna för temperaturerna 50° och 46°, som ju ligga under kloralhydratets normala smältpunkt, bestämdes genom att substansen smältes vid 60°. Temperaturen på badet fick därefter på c:a 30 min. sjunka ned till 50° resp. 46°. Smälttiden räknades från den tidpunkt då den slutliga badtemperaturen uppnåddes.

Table 2
Chloral Hydrate

Variation in freezing point with the initial temperature of the melt. Melts in equilibrium at respective temperatures. Cooling time 1—3 min.

Temp.	90°	85°	80°	75°	70°	65°	60°	55°	50°	46°
Freezing point	50.1	49.6	49.2	48.9	48.4	48.0	47.6	47.0	46.3	45.6

I tabell 3 ges några exempel på avkylningstidens inverkan på stelningspunkten. Kloralhydratet hölls i samtliga försök smält vid 80° i 30 min. och fick sedan svalna till omkring 2° under beräknad stelningspunkt, innan rivning skedde. Det enda som varierades var avkylningen. I första fallet placerades röret med kloralhydrat i en bågare 80°-ig olja, och det hela fick svalna i luften. Avkylningstiden blev då 32 minuter. I det andra fallet omgavs röret med ett luftbad, ett vidare, tomt provrör, vilket sänkte avkylningstiden till 15 min. I tredje fallet fick röret svalna direkt i luften (tid 8 min.) och i sista fallet på vanligt sätt i 42°-igt oljebad (tid 3 min.). Avkylningen var alltså i samtliga fall kontinuerlig.

Table 3
Chloral Hydrate

Variation in freezing point with cooling time.
Melts in equilibrium at 80°. Continuous cooling.

Cooling time in min.	32	15	8	3
Freezing point	47.0	47.9	48.3	49.2

Av försöken framgår, att stelningspunkten blev lägre ju längre avkylningstiden var. När denna var kort erhöles en stelningspunkt som närmast torde höra samman med jämviktsläget vid smälttemperaturen, 80°. De längre tiderna gävo däremot stelningspunkter, som visade, att förhållandena i dessa smältor i olika grad hunnit närma sig det jämviktsläge, som råder i närheten av stelningstemperaturen.

Enligt farmakopéns metod för bestämning av stelningspunkt kan man bringa substansen att kristallisera antingen genom ympning eller genom rivning. Båda metoderna ha försökts men lämnat lika resultat.

Som framgår av ovanstående försök kan stelningspunkten knappast anses vara lämplig som farmakopéprov på kloralhydrat. Visserligen kan man erhålla en lägsta stelningspunkt — 45.6° — men härför fordras, att substansen hållits smält vid 46° i minst en timma, vilket kan vara ganska besvärligt att genomföra.

De hittills utförda försöken ha visat vilka faktorer som påverka kloralhydratets stelningspunkt. Nästa problem blir då att försöka förklara, vad som kan vara orsaken till att stelningspunkten kan ändras på detta sätt. Följande tänkbara orsaker ha prövats:

1. Substansen förstöres delvis vid smältningen
2. Substansen kan uppträda i flera olika modifikationer:
 - a. Enantiotropi eller monotropi föreligger
 - b. Isomeri föreligger, och ett pseudobinärt system erhålles
3. »Dissociation» sker i smältan
4. Jämvikt mellan olika hydrat av kloral föreligger i smältan

1. »Substansen förstöres delvis vid smältningen.» Denna orsak till stelningspunktsvariationerna är visserligen tänkbar, men måste betraktas som ganska osannolik. Det verkar ytterst otroligt, att förstöringen skulle vara mindre vid högre temperatur än vid lägre, vilket ju i så fall skulle bli konsekvensen av de tidigare gjorda försöken.

Några försök utfördes emellertid. 10 g kloralhydrat (provhaltig enl. Ed. XI, halt 100.4 %) hölls smält vid 80° i 2 timmar och gav därefter vid avkylning som i tabell 2 stelningspunkten 49.0°. En annan portion kloralhydrat hölls smält vid 55° i 2 timmar och gav därefter stelningspunkten 47.0°. På båda substanserna gjordes sedan prov på renhet och halt enligt Ed. XI. Renhetsproven gävo samma resultat som före smältningen utom provet på klorid: substansen från 80°-smältan gav opalisering, medan den andra substansen gav svag opalisering med silverniträt. Halt för båda smältorna

100.5 %. I båda fallen alltså en mycket ringa sönderdelning efter långvarig smältning, vilken säkerligen var utan nämnvärd betydelse för stelningspunkten.

Att ett sönderfall av substansen omöjligt kan vara förklaringen till stelningspunktens variationer, ses för övrigt av att man kan få stelningspunkten för en smälta att stiga, genom att höja smältans temperatur. Kloralhydrat hölls sålunda smält vid 50° i en timma, varvid ett uttaget prov gav stelningspunkten 46.2° . Temperaturen på substansen höjdes sedan till 90° , och smältan hölls vid denna temperatur 15 minuter. Stelningspunkten bestämdes därefter på vanligt sätt (se tabell 2) och befanns vara 50.2° .

Ovanstående försök liksom de tidigare stelningspunktsförsöken visar tydligt, att någon form av jämvikt måste föreligga i smältan. Som tidigare nämnts anges i litteraturen 2 möjligheter: dels en jämvikt mellan 2 former, dels en »dissociation».

2. »Substansen kan uppträda i flera olika modifikationer.» *Schoor*^F) anger, att kloralhydrat kristalliserar i 2 modifikationer. Den ena, α -formen, som består av monosymmetriska plattor, är stabil vid vanlig temperatur, medan den andra, β -formen, som består av nålar, är instabil vid vanlig temperatur. *Pope*^G) har beskrivit de båda formerna och uppställt vissa förmodanden om att de äro orsaken till vissa termiska egendomar, som kloralhydrat uppvisar. *van Rossem*^H) ansåg däremot, att de båda formerna endast utgöras av olika växtformer av samma kristalltyp.

a. »Enantiotropi eller monotropi föreligger.» En substans, som uppträder i flera olika kristallformer kan vara enantiotrop eller monotrop. Karakteristiskt för en enantiotrop substans är, att den ena formen omvandlas i den andra redan under bådas smälttemperaturer. Vid snabb upphettning av substansen händer det, att denna omvandling ej hinner genomföras, varför smältpunkten för den vid högre temperatur instabila formen erhålles. Sker däremot upphettningen så långsamt att omvandlingen blir fullständig, smälter substansen vid den stabila formens smältpunkt. Vid smältpunktsbestämning på vanligt sätt blir därför resultatet ofta, att substansen smälter oskarpt vid en temperatur, som ligger mellan de båda formernas smältpunkter.

För en monotrop substans gäller däremot, att den vid vanlig temperatur stabila formen är stabil ända till sin smältpunkt. De instabila formerna ha alltid lägre smältpunkter.

Kloralhydratets varierande smältpunkt skulle kunna tänkas bero på att substansen är enantiotrop. För både enantiotropa och monotropa substanser gäller emellertid, att om smältan avkyles till begynnande kristallisation, så utfaller allt efter försöksbetingelserna en viss form, och man får en bestämd stelningspunkt, som är karakteristisk för denna form.

När det gäller kloralhydrat, kan man däremot få vilken stelningspunkt man vill inom området 50° — 46° , endast genom att hålla smältan vid olika temperaturer. Det finns därför ingen anledning att anta, att kloralhydrat skulle vara en enantiotrop eller monotrop substans.

b. »Isomeri föreligger och ett pseudobinärt system

erhållas.» Det är emellertid också möjligt, att kloralhydratets båda kristallformer utgöras av två isomera eller polymera former, som vid smältning delvis omvandlas i varandra, så att en jämvikt inställer sig. Möjligheten att de båda formerna skulle kunna ha olika konstitution har framhållits både av *Pope*⁶⁾ och *Meyer och Dulk*²⁾.

Flera exempel på stelningspunktsvariationer av denna orsak finnas beskrivna, t. ex. bensaldoxim [*Cameron*⁷⁾], acetaldehyd [*Holleman*⁸⁾]. Problemet har i detalj diskuterats av *Bancroft*⁹⁾.

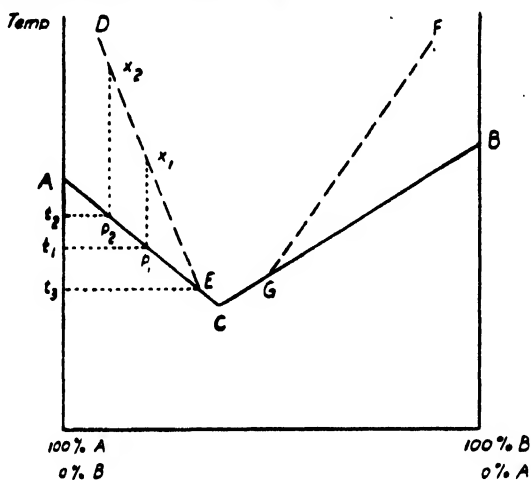


Fig. 1

Om två isomera eller polymera former av ett ämne ha tendens att bilda jämvikt med varandra i smältan, och denna jämvikt inställer sig med viss ej alltför hög hastighet, så fås ett s. k. pseudobinärt system. Ett exempel på en stelningspunktskurva för ett sådant system finnes i linjen ACB i fig. 1. De båda formerna betecknas med A och B. Den rena A-formen är icke stabil i smält tillstånd, utan omvandlas efter hand delvis till B-form, och om substansen hålles smält tillräckligt länge uppnås ett jämviktsläge. Linjen DE i figuren anger, hur jämviktssmältans sammansättning varierar med temperaturen. Avkyles en jämviktssmälta med sammansättningen x_1 så hastigt att sammansättningen ej hinner ändras, börjar substans utkristallisera i punkten P_1 och stelningspunkten t_1 erhålles. På samma sätt ger smältan x_2 begynnande utkristallation i P_2 och stelningspunkten t_2 . Eftersom linjen DE i figuren lutar åt vänster stiger alltså stelningspunkten vid snabb avkylning, om smältans temperatur höjes. Avkyles emellertid smältan så långsamt att jämvikten hela tiden bibehålles, kommer sammansättningen att följa linjen DE, och utkristallisationen börjar i punkten E vid temperaturen t_3 . En lägre stelningspunkt erhålles. Avkyles slutligen en smälta av A-form snabbt, omedelbart efter fullbordad smältning innan dess sammansättning uppnått linjen DE, erhålles en högre stelningspunkt än som ges av en jämviktssmälta av samma temperatur. I samtliga dessa fall är det A-form som utfaller vid begynnande kristallisation.

Smälter man å andra sidan ren B-substans, omvandlas den efter hand till

en viss del till A-form. Smältans stelningspunkt kommer att sjunka efter linjen BC. Så länge smältans sammansättning ligger mellan C och B är det B-form, som utfaller vid avkylning. Så snart punkten C passerats börjar emellertid stelningspunkten stiga efter linjen CA och nu är det A-form som utkristalliserar. Ändringen av smältans sammansättning fortsätter tills linjen DE uppnåtts.

Söker man omsätta dessa allmänna principer beträffande pseudobinära system på kloralhydrat, blir första frågan, hur de isomera formerna skola vara sammansatta. *Schoorl*⁷⁾ går ej alls in på sammansättningen av α - och β -formerna, däremot anför *Pope*⁸⁾, att de båda formerna möjligen kunna ha formlerna $\text{CCl}_2\text{CH}(\text{OH})$, resp. CCl_2CHO , H_2O . Varken *Pope* eller *Schoorl* anger någonting om smältpunkten för den isomera formen, men i *Kommentaren till Pharm. Helv. Ed. V*⁹⁾ uppges, att α -formen smälter vid 57° och β -formen vid 47° . *Meyer och Dulk*¹⁰⁾ anse sig emellertid ha framställt en isomer form av kloralhydrat med smältpunkten 80° . Kristallformen är ej beskriven, utan substansen anges endast som väl kristalliserande. Den förmodas ha formeln CCl_2CHO , H_2O . *Banchetti*¹¹⁾ anser sig ev. också ha funnit en kloralhydratform som smälter över 75° .

Den isomera formen skulle alltså innehålla H_2O bundet som kristallvatten, och skulle smälta till molekyler av samma form, vilket ju är förutsättningen för att ett pseudobinärt system skall uppkomma.

Man måste också ta med i beräkningen att polymera former kunna förekomma. Kloralhydratets nära släktskap med aldehyderna talar för denna möjlighet, då ju polymera former ofta finnas bland dessa. Den bland dessa föreningar förekommande formen av bindning med hjälp av en O-brygga är dock knappast möjlig mellan kloralhydratmolekyler utan att bruttosammansättningen ändras. Några polymera former av kloralhydrat finnas ej beskrivna i litteraturen.

Om man emellertid antar, att det förekommer 2 isomera eller polymera former av kloralhydrat och kallar den vid vanlig temperatur stabila formen för α och den andra för β , så har man två möjligheter.

Den linje i fig. 1, som åskådliggör jämviktssmältans sammansättning vid olika temperaturer, kan med hänsyn till resultaten i tabell 2 tänkas ha två lägen, ED eller FG.

Pope framställde sin β -form — nålformiga kristaller — genom utkristallisation ur smältan och anger, att denna form är stabil vid högre temperatur. Vid samtliga stelningspunktsförsök syntes också den utkristalliserade substansen vara nålformig. Detta tyder närmast på att linjen FG skulle åskådliggöra förhållandet i smältan. Å andra sidan finns då kurvgrenen AC, som borde ge sig tillkänna på olika sätt. Nysmält α -form borde sålunda kristallisera i α -form vid omedelbar avkylning. Något sådant har aldrig iakttagits, men kan måhända vara svårt att bedöma. Vidare borde stelningspunkten för exempelvis 65° -smältan, först sjunka och sedan åter stiga enligt det resonemang, som genomfördes beträffande B-formen i den allmänna diskussionen av ett pseudobinärt system.

För att studera dessa frågor utfördes några försök.

I: En 90° -jämviktssmälta bereddes genom att kloralhydrat smältes och

hölls i oljebad vid 90° i 1 timma. Ett uttaget prov gav stelningspunkten 50.3° , vilket väl stämmer med tabell 2. Substansen borde, om linjen FG var riktig, till huvudsaklig del bestå av β -form.

II: En smälta, som borde innehålla nästan uteslutande α -form, bereddes genom att pulvriserat kloralhydrat smältes under flitig omröring i ett oljebad med temperaturen 70° . Då allt var smält, var smältans temperatur omkring 55° . En kontroll på ett parallellt utfört prov visade omedelbart efter fullbordad smältning stelningspunkten 51.1° .

Omedelbart efter att prov II var smält försattes det med lika mängd av prov I, och stelningspunkten på blandningen bestämdes genom kylning i ett 42° -igt oljebad. Stelningspunkten befanns vara 50.8° . Om linjen FG åskådliggör förhållandena i kloralhydratets jämviktssmälta borde emellertid stelningspunkten för denna blandsmälta legat avsevärt under både I:s och II:s stelningspunkter. Det är följaktligen föga troligt, att I och II bestodo av resp. β - och α -form. Snarare torde de till huvudsaklig del ha innehållit samma form, vilket bör vara fallet om linje DE är den riktiga. Genom denna linje blir också stelningspunktens förändringar lättare att förklara. Den form som utfaller ur smältan är densamma som är stabil vid vanlig temperatur, och på grund av att kurvan lutar åt vänster kommer jämviktssmältan att innehålla mera av denna form vid högre temperatur än vid lägre, och följaktligen blir dess stelningspunkt högre.

Hur skall man då förklara, att det är den nålformiga modifikationen, som utfaller ur smältan, medan den vid vanlig temperatur stabila formen består av plattor?

Enligt Schoor⁶⁾ kan β -formen, den nålformiga, framställas genom snabb utkristallisation ur bensollösning. Nålformiga kristaller erhöles också, då en lösning av kloralhydrat i varm bensol avkyldes i vatten. De erhållna kristallerna avsögos och fingo torka i luften. På denna substans gjordes därefter stelningspunktsbestämning. Kristallerna smältes i 70° -igt oljebad under omröring. Smältningen gick betydligt snabbare än med vanligt kloralhydrat, och all substans var smält, när smältans temperatur var 55° . Omedelbart efter fullbordad smältning avkyldes substansen i 42° -igt oljebad och gav då stelningspunkten 51.2° , d. v. s. nästan densamma som erhålles av nysmält vanligt kloralhydrat. En nyberedd smälta av dessa nålformiga kristaller blandades vidare med lika stor mängd av en likaledes nyberedd smälta av vanligt kloralhydrat. Blandningen gav stelningspunkten 51.4° . Av allt att döma var alltså den på detta sätt framställda nålformiga modifikationen i smält form identisk med vanligt kloralhydrat.

Ytterligare försök gjordes att ur bensol eller kloroform genom omkristallisation framställa en produkt med avvikande smältpunkt. Lösningarna hölles vid temperaturer varierande mellan 35° och 85° , alltifrån några minuter upp till 3 timmar före avkylningen. Torkningstiden varierade mellan 1 timma och 2 dygn. I samtliga fall erhöles nålformiga kristaller, men stelningspunkten, bestämd som i förra försöket, låg alltid vid 50° — 52° . De nålformiga kristallerna voro emellertid inte stabila vid vanlig temperatur, utan föllo efter någon tid sönder till mindre kristaller av plattyp.

Som tidigare nämnts ansågo sig Meyer och Dulk⁷⁾ ha framställt en isomer

kloralhydratform, som de funnit ha smältpunkten 80° . De framställde den genom att blanda kloral och isättika och snabbt indunsta blandningen över svavelsyra. De angåvo också, att snabbheten vid industningen var av avgörande betydelse. Vid långsammare arbete erhöles nämligen substans med lägre smältpunkt ända ned till kloralhydratets vanliga.

Det visade sig emellertid mycket svårt att upprepa dessa försök.

Kloral framställdes genom att kloralhydrat skakades med dubbla mängden konc. svavelsyra. Den avskilda kloralfasen befriades från resterande spår av svavelsyra genom skakning med kalciumkarbonat samt destillerades efter tillsats av P_2O_5 vid vanligt tryck. Då kloral mycket lätt upptar vatten ur luften, skyddades systemet med ett klorkalciumrör. Isättikan var analysvara, som angavs innehålla minst 99 % ättiksyra. Industningen av kloral-isättikblandningen skedde i exsickator med blågel. Trots användande av olika högt vakuum, industningskärl av olika volym och olika proportioner mellan isättika och kloral var återstoden alltid flytande ända tills allt avdunstat, möjligen med undantag för någon enstaka kristall.

*Meyer och Dulk*²⁾ omnämnde emellertid, att en temperaturstegring iaktogs vid blandning av kloral och isättika. Vid de här utförda försöken var denna vanligen ganska liten och uppgick till högst c:a 10° . En möjlighet syntes då vara, att förff. ej använt vattenfritt utgångsmaterial. Tillsats av en liten mängd vatten visade sig också leda till resultat: temperaturstegringen blev kraftigare (40° — 50°), och en kristallinisk återstod erhöles. Följande framställningsmetod visade sig leda till det bästa utbytet: 15 g kloral blandades med 5 g isättika och 1.8 g vatten, varefter blandningen uthålles i en flatbottnad skål, som var så vid att vätskelagret blev högst 5 mm tjockt. Lösningen industnades omedelbart i vakuumsickator. Trycket i exsickatorn hölls så lågt att blandningen kokade kraftigt. Redan några minuter efter det kokningen slutat började substansen utkristallisera, men exsickatorn öppnades inte förrän efter c:a 12 timmar, då en fullständigt torr kristallmassa återstod. Denna bestod vanligen nästan uteslutande av små kristaller, men i vissa fall, då avdunstningsbetingelserna varit mindre goda, erhöles ett övre skikt bestående av små kristaller, och ett undre lager sammansatt av större nålformiga kristaller. Smältpunktsbestämning visade, att de små kristallerna smälte oskarpt vid omkring 80° , medan de nålformiga smälte vid c:a 52° , d. v. s. vid samma temperatur som vanligt kloralhydrat. Utbytet var lågt och översteg aldrig 10 % beräknat på den använda kloralmängden.

På substansen gjordes stelningspunktsbestämning. Smältningen skedde i 90° -igt oljebad, och substansen var fullständigt smält vid c:a 80° . Den avkyldes då omedelbart till begynnande kristallisation. Så snart stelningspunkten avlästs smältes substansen på nytt och omedelbart efter fullbordad smältning gjordes en ny stelningspunktsbestämning o. s. v. Följande serie av stelningspunkter erhöles:

50.2° , 42.0° , 39.6° , 37.6° , 36.5° , 33.8° , 33.2° , 33.0° , 38.4° , 43.6° , 45.8° .

Därefter smältes substansen och hölls vid 90° i 30 min. Stelningspunktsbestämning gav 47.2° .

Vid stelningspunktsbestämningarna iaktogs att så länge sjunkande värden erhöles (50.2° — 33.0°), utföll en finkornig kristallmassa, medan vid de av-

slutande stigande värdena (38.4° — 47.2°), erhöles nålformiga kristaller av samma typ som erhölets vid stelningspunktsbestämningar på vanligt kloralhydrat.

En stelningspunktkurva av samma typ som i fig. 1 syntes alltså ha erhölets. Den enda avvikelser var, att jämviktssmältans stelningspunkt ej överensstämde med den som erhölets med vanligt kloralhydrat (47.2° resp. 50.1°). Detta kunde dock tänkas bero på att den förmodade isoformen ej erhölets i ren form.

Klorbestämning utfördes därför på substansen enligt *Self*^o). 0,1000 g substans kokades med återflöds kylning med 2.0 g zinkpulver p. a., 15 ml isättika p. a. och 50 ml vatten i 90 minuter. Efter avsvälning frånfiltrerades oförbrukad zink, och filtratet försattes med 10 ml konc. salpetersyra, 25.00 ml 1/10 normalt silverniträt och 10 ml ferriammoniumsulfat-R, varefter återtitrerades med 1/10 normal ammoniumrodanid. Parallellt utfördes blindprov. Klorhalten i den förmodade isoformen var i 2 prov 65.0 % resp. 65.3 %, medan vanligt kloralhydrat gav halten 63.2 % vid bestämningen på samma sätt. Beräknat värde 64.3 %.

Trots ett stort antal försök lyckades det inte att framställa en substans, som i jämvikt visade samma stelningspunkt som vanligt kloralhydrat. Försök gjordes då, att omkristallisera den ur olika lösningsmedel. Bäst lämpad syntes en blandning av kloroform och petroleumeter (1 + 4) vara. Omkristallisationen gav till resultat en väl kristalliserande substans, som gav följande stelningspunktsserie, bestämd på samma sätt som i nyssnämnda försök.

66.0° , 64.1° , 53.6° , 48.8° , 44.6° , 44.0° , 42.0° , 40.2° , 39.8° , 38.0° , 37.8° .

När detta sista värde erhölets gav omsmältning och omedelbar avkylning ingen ändring i stelningspunkten. Temperaturen på smältan fick därför stiga till c:a 90° mellan varje stelningspunktsbestämning, varvid följande värden erhöles:

40.1° , 42.2° , 44.5° .

Alldeles som i den tidigare försöksserien erhöles en finkornig kristallmassa i den sjunkande delen av stelningspunktsserien (66.0° — 37.8°), medan den stigande delen (40.1° — 44.5°) gav huvudsakligen nålformiga kristaller.

Efter den sista stelningspunktsbestämningen fick smältan svalna till rumstemperatur. Ännu efter flera timmar var den halvflytande och bestod av väl utvecklade kristallnålar i en klar vätska. Blandningen hade kraftig klorallukt, som tydligt skilde sig från smältans ursprungliga lukt. Efter c:a 12 timmar var dock hela smältan fast.

På substansen utfördes haltbestämning enligt Ed. XI: 2.000 g substans löstes i 5 ml vatten och försattes med 15.00 ml normal natronlut. Efter 2 minuter återtitrerades på överskott av lut med fenoltalein som indikator.

Vid bestämningen iaktogs, att substansen löste sig mycket långsamt i vatten.

Haltbestämningen gav vid handen, att substansens ekvivalentvikt var 155.9. Vanligt kloralhydrat har ekvivalentvikten 165.4.

Klorbestämning enligt *Self*^o) samt bestämning av väte och kol med Reihlen-Weinbrenner-apparat, gav de resultat, som anges i tabell 4, kolumn

»Half hydrate», found. Som jämförelse anföras också motsvarande beräknade värden för kloralhydrat kolumn Chloral hydrate, calc.

van Rossem¹⁾ gjorde försök att framställa ett annat hydrat av kloral, genom att låta en substans långsamt utkristallisera ur en lösning av kloralhydrat i kloral. Substansen, som erhöles i små mängder och i oren form, syntes emellertid av klorbestämningar att döma innehålla ungefär 1 mol vatten på 2 mol kloral. För en substans med exakt denna sammansättning har värdena på klor-, väte- och kolhalt samt ekvivalentvikt beräknats och angivits i tabell 4, kolumn »Half hydrate» calc.

Table 4

	»Half hydrate» found	»Half hydrate» calc.	Chloral hydrate calc.
Cl	66.2 %	68.0 %	64.3 %
H	1.30 %	1.28 %	1.81 %
C	15.31 %	15.34 %	14.51 %
Equivalent weight.....	155.9	156.4	165.4

Som synes är överensstämmelsen mellan »halvhydratet» och den erhållna substansen synnerligen god. Endast halten klor är något för låg. Den använda metoden synes emellertid vid kontroll på vanligt kloralhydrat ge omkring 1.5—2.0 % för låga värden.

Det visade sig emellertid onödigt att gå vägen över isättiklösningen för att framställa »halvhydratet». Följande metod gav bra utbyte. Två mol kloral blandades under avkylning med en mol vatten, varvid en fast substans utkristalliserade. Efter hand blev hela blandningen fast och efter ett dygns förvaring vid c:a 0° omkristalliserades substansen ur petroleumeter och kloroform (4 + 1) och erhöles då som vita glänsande kristallfjäll. Vid analys gav den värden som väl överensstämde med de i tabell 4 angivna. Stelningspunkten bestämdes som vid tidigare försök efter smältning i oljebad. Substansen var fullständigt smält vid omkr. 95°. Därefter togs en stelningspunktserie genom omedelbar avkylning till begynnande kristallisation, omsmältning, efter fullbordad smältning omedelbar avkylning o. s. v. som förut nämnts. Följande värden erhöles:

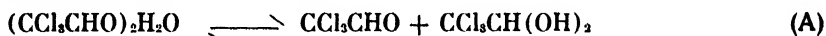
90°, 81.2°, 73.5°, 66.3°, 59.0°, 54.2°, 52.4°, 45.2°, 43.0°, 41.6°, 38.2°, 37.8°.

Överensstämmelsen med det ur ättiksyra framställda, omkristalliserade »halvhydratet» är alltså god. De första värdena äro högre, men de äro ju helt beroende på hur snabbt avkylningen sker. Slutvärdet för båda serierna är emellertid detsamma.

Smältans temperatur höjdes sedan till 90°, och substansen hölls vid denna temperatur 15 minuter i väl slutet rör och gav därefter stelningspunkten 44.0°. Efter 30 min. vid 70° blev stelningspunkten 41.3° och efter 60 min. vid 50° 37.7°. Tydligt nålformiga kristaller erhöles både ur 90°- och 70°-smältorna, medan hela den första stelningspunktsserien gav en finkornig kristallmassa. Smältans beteende var även i övrigt fullständigt detsamma som vid försöket med den ur isättika framställda substansen.

Haltbestämning enligt Ed. XI utfördes på substansen både före och efter stelningspunktsförsöken. Före smältningen hade substansen ekvivalentvikten 155.9 och efter avslutade bestämningar 156.1. Substansens bruttosammansättning hade alltså ej ändrats under försöket.

Sannolikt föreligger i smältan någon form av jämvikt mellan kloral, kloralhydrat och »halvhydrat», t. ex. enligt följande formel [»halvhydratet» har betecknats med $(\text{CCl}_3\text{CHO})_2\text{H}_2\text{O}$].



Av försöken har framgått, att jämviktssmältan vid 70° har lägre stelningspunkt än smältan vid 90°. Då i båda fallen kloralhydrat synes utfalla vid stelningspunkten, bör jämviktssmältan innehålla mera kloralhydrat vid högre temperatur än vid lägre. Jämvikten har alltså förskjutits åt höger med stigande temperatur.

Att en ändring av smältans konstitution sker, framgår också av dess brytningsindex. Mätningarna utfördes med Pulfrichs refraktometer vid 80.0°. »Halvhydratet» smälter visserligen först vid ca 90°, men genom att substansen hölls smält vid 90° några minuter, hann omvandlingen fortskrida så långt, att substansen kunde kylas till 80° och överföras till refraktometern, utan risk för att den skulle stelna. Avläsningarna återfinnas i tabell 5. Temperaturen valdes så låg som 80°, därför att jämvikten inställer sig med lämplig hastighet vid denna temperatur. Mätningarna gjordes i natriumljus (5890 Å).

Table 5
»Half Hydrate»

Variation in the refractive index of the melt with the time.
Temperature 80.0°. Na-light (5890 Å).

Time in min. (reckoned from the melting of the substance)	$n_{\text{D}80^\circ}$
6	1.4706
15	1.4676
23	1.4639
30	1.4615
42	1.4583
58	1.4567
74	1.4560
80	1.4560

Av tabellen framgår att brytningsindex sjunker efter hand. Slutligen synes dock ett konstant värde uppnås. Detta värde erhöles också med substans, som hållits smält samma tid vid 80° i slutet rör.

Meyer och Dulks »isomera kloralhydrat» var med all sannolikhet detta »halvhydrat», alltså en helt ny förening. Framställningen av »halvhydratet» enl. *Meyer och Dulk* har emellertid sitt intresse. Om man utgår från 1 mol kloral och 1 mol vatten i isättiklösning, och indunstar lösningen i vakuum, så får man under vissa betingelser ett »halvhydrat». Försök visade, att samma resultat erhöles, om man istället utgick från kloralhydrat. 16.5 g kloralhydrat (0.1 mol) löstes i 5 g isättika. Blandningen indunstades på det

sätt som beskrivits för kloral-vatten-isättiklösningen, och resultatet blev en substans, som smälte vid omkring 72°. Vid avkylning stelnade substansen först vid 37.0°, och sedan den hållits smält 60 min. vid 50° gav den en stelningpunkt på 44.2°. Den erhållna substansen var sannolikt en blandning av kloralhydrat och »halvhydrat». Det är därför troligt, att i lösningen föreligger någon form av jämvikt mellan kloralhydrat, »halvhydrat», kloral och vatten. Vid indunstningen bortgå de lättflyktigare komponenterna ur lösningen, och »halvhydratet» utfaller.

Någon jämvikt mellan isomera former av kloralhydrat har alltså inte kunnat påvisas. Att någon form av konstitutionsändring äger rum i kloralhydratets smälta framgår emellertid tydligt genom mätningar av dess brytningsindex.

Bestämningarna utfördes med Pulfrichs refraktometer vid temperaturen 60.0°. Substansen smältes snabbt under omröring och överfördes till apparaten så snart den antagit temperaturen 60°. Mätningar gjordes i natriumljus (5890 Å). Avläsningarna finnas i tabell 6.

Table 6
Chloral Hydrate

Variation in the refractive index of the melt with the time.
Temperature 60.0°. Na-light (5890 Å).

Time in min. (reckoned from the melting of the substance)	$n_{D_{60^\circ}}$
2	1.4773
6	1.4782
12	1.4796
17	1.4803
22	1.4807
30	1.4807

Av tabellen framgår att brytningsindex stiger till ett konstant slutvärde. Detta värde erhöles också med ett prov som hållits smält samma tid i slutet rör.

Enligt Lorenz-Lorentz formel är molekylarrefractionen

$$M_R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d}$$

där n = brytningsindex, M = molekylvikt och d = eg. v. för substansen. M_R kan i detta fall endast beräknas för jämviktsläget, då bestämning av egentlig vikt endast kan utföras på en substans i jämvikt. M_R blir vid 60° 29.47.

Beräknat efter den atomrefractionen för D-linjen (5890 Å) som anges av Eisenlohr¹³⁾ skulle kloralhydrat med formeln $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ ha $M_R = 29.08$ och för CCl_3CHO , H_2O $M_R = 29.77$.

Det funna värdet ligger mellan dessa båda och motsäger alltså inte förekomsten av dessa två isomerer. Bestämmer molekylarrefractionen för andra temperaturer, fås emellertid värden, som gör det mindre troligt, att ändringen i brytningsindex skulle bero på förekomsten av isomeri. I tabell 7 anges brytningsindex och motsvarande molekylarrefraktion för temperaturerna

50°, 60° och 90°. Uppgifterna om eg. vikt för smält kloralhydrat vid dessa temperaturer äro hämtade från *Kurnakow och Efremow*¹⁴⁾.

Table 7
Chloral Hydrate

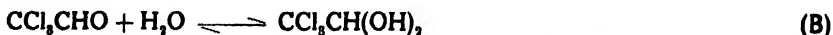
Change in molar refraction with the temperature.
Refractive index is indicated by constant final value.

Temperature	$n_{D_t}^{\circ}$	D_4^t	Molar refraction
50°	1.4879	1.6193	29.42
60°	1.4807	1.5966	29.47
90°	1.4568	1.5148	29.73

Molekylarrefractionen stiger med stigande temperatur. Enligt *Hüchel*¹⁵⁾ är visserligen inte M_R fullständigt temperaturoberoende, utan stiger något med stigande temperatur. Den nödvändiga korrektionen utgör emellertid inte mer än 1 ‰ per 10°, medan stegringen här utgör omkring 3 ‰. Om det i kloralhydratets smälta föreligger en jämvikt mellan två former med olika M_R , synes det därför sannolikt, att halten av den form, som har högst molekylarrefraktion, ökar med temperaturen. Om en jämvikt mellan isomera former skall vara möjlig, måste emellertid jämviktssmältans sammansättning följa linjen DE i fig. 1 enligt den tidigare förda diskussionen. Detta innebär alltså, att koncentrationen av den vid vanlig temperatur stabila formen måste öka med stigande temperatur. Konsekvensen av detta skulle bli, att den form som har högst M_R , d. v. s. CCl_3CHO , H_2O skulle vara stabil vid vanlig temperatur. Detta strider dock mot den vanliga på ett flertal undersökningar stödda åsikten, att vanligt kloralhydrat inte innehåller någon karbonylgrupp.^{16) 17) 18)}

3. »Dissociation sker i smältan». Som tidigare nämnts har *Wolf*¹⁹⁾ och *v. Rossem*²⁾ sökt förklara kloralhydratets smältpunktsvariationer med att en »dissociation» sker i smältan. Förmodligen avses med uttrycket »dissociation» en spjälkning av kloralhydratet i kloral och vatten, som leder till ett visst jämviktsläge. Även *Fonteyne*¹⁶⁾ anger att en sådan spjälkning sker. Vissa av kloralhydratsmältans egenskaper äro också förenliga med denna uppfattning. Om jämvikten inställer sig relativt långsamt, ger den förklaring till kloralhydratsmältans efter hand sjunkande stelningspunkt. »Dissociationen» ger också en ändring av smältans konstitution, varför dess stigande brytningsindex vid konstant temperatur möjligen också kan förklaras på detta sätt.

Som framgår av tabell 2 stiger emellertid stelningspunkten med stigande temperatur på jämviktssmältan. Då det i samtliga fall är kloralhydrat, som utfaller vid avkylning, måste detta innebära, att kloralhydrathalten i smältan ökar med stigande temperatur. Om det är en »dissociation» som sker, blir reaktionsformeln



Med stigande temperatur skulle alltså jämviktsläget förskjutas åt höger, vilket innebär, att reaktionen skulle förlöpa åt höger under upptagande av

värme. En direkt mätning av reaktionsvärmén visade sig svår att genomföra, dels på grund av den kraftiga värmeutvecklingen, dels emedan reaktionen endast förlöper till en jämvikt. Istället mättes temperaturhöjningen, när kloral löstes i stort överskott av vatten, och detta värde jämfördes med den temperaturhöjning, som erhöles, då en smälta av kloralhydrat i jämvikt löstes på samma sätt. Överskottet av vatten var vid försöken så stort att de erhållna lösningarna måste anses vara lika, oberoende av om utgångssubstansen var kloral eller kloralhydrat.

Mätningarna utfördes i ett termoskärlet av omkring 500 ml rymd. Kärlet var slutet med en gummiprop i vilken en Beckmann-termometer och en motor-driven omrörare inpassades. Den substans, som skulle undersökas, inneslöts i en ampull, som krossades nere i kärlet med hjälp av en utifrån manövrerbar skruvanordning. Då mätningarna utfördes, nedsänktes kärlet i ett vattenbad, så att vattnet täckte proppen i ett minst 5 cm tjockt skikt. Temperaturen på vattenbadet avvek från temperaturen inuti kärlet med högst någon grad. Termoskärlets värmeutbyte med omgivningen blev därigenom så litet, att korrektion härför ej behövde införas.

Den använda apparaturen var som synes enkel, men av reproducerbarheten av försöksresultaten att döma syntes den dock ge möjlighet till bestämmningar med några procents noggrannhet.

För försöket användes 7.40 g kloral (0.05 mol) och ekvivalent mängd kloralhydrat (8.30 g). Den substans, som skulle undersökas, infördes i en ampull (kloralhydrat efter smältning till jämvikt vid försökstemperaturen) och efter tillsmältningen kontrollerades genom vägning, att avdunstningen vid tillsmältningen ej översteg 0.5 %. I termoskärlet fylldes 320 g vatten av den önskade temperaturen, varefter det hela placerades i vattenbadet. När temperaturen hållit sig konstant i minst 15 minuter krossades ampullen. Reaktionen gick i samtliga fall snabbt, och konstant temperatur erhöles utan undantag inom 5—7 minuter. Skillnaden mellan de konstanta temperaturnivåerna före och efter reaktionen anges i tabell 8. Apparaturen var exakt lika i samtliga försök.

Table 8

Temperature rise on dissolving 0.05 mol chloral and melted chloral hydrate respectively in 320 g water.

Temperature	Chloral	Chloral hydrate
55°	1.46°	0.48°
80°	—	0.50°

Med den använda apparaten kunde ej reaktionsvärmén för kloral vid 80° bestämmas. Reaktionen blev nämligen så häftig att en del av vätskan övergick i ångform, och på grund av tryckökningen i kärlet pressades 10—20 g vatten ut genom det rör i vilket omröraren löpte. Temperaturhöjningen uppgick vid dessa försök till 1.3—1.4°.

Av försöken framgår att reaktionsformel (B) ej kan förlöpa åt höger under värmeupptagande, då värmeutvecklingen är avsevärt mycket högre vid upplösningen av kloral än vid upplösning av jämviktssmältan. Smältan är alltså energifattigare, varför reaktionen måste ske under avgivande av värme.

4. »Jämvikt mellan olika hydrat av kloral föreligger i smältan.» Man kan emellertid också tänka sig en annan form av spjälkning i smältan. Av försöken med »halvhydratet» har ju framgått, att i dess smälta möjligen föreligger en jämvikt mellan »halvhydrat», kloral och kloralhydrat. Det synes därför vara sannolikt, att en jämvikt av liknande typ också råder i kloralhydratets smälta. Man skulle förslagsvis kunna tänka sig följande jämvikt.



Med stigande temperatur skulle denna jämvikt förskjutas åt vänster, d. v. s. reaktionen skulle förlöpa åt vänster under värmeupptagande. Då varken kloralhydrat eller »halvhydrat» äro stabila i smält form, går det inte att genom direkt mätning av reaktionsvärmerna avgöra, om en dylik jämvikt kan vara möjlig.

Man kan emellertid få vissa upplysningar om jämviktssmältornas sammansättning på en annan väg. Kyler man hastigt ner en jämviktssmälta av kloralhydrat till rumstemperatur, erhålles en fast substans, som visar en stelningspunkt, som tyder på att smältans sammansättning bibehållits relativt oförändrad. Efter någon tids förvaring stiger stelningspunkten och antar efter hand sitt normala värde. Genom att bestämma lösningsvärmerna för en nyss avkyld smälta vid 20°, och jämföra denna med motsvarande värden för de förmodade komponenterna, kan man få en viss uppfattning om substansens sammansättning. I tabell 9 återfinnas resultaten av några sådana försök.

Samma apparatur användes som vid det föregående kalorimeterförsöket. Enda skillnaden var, att substansen inte förvarades i en ampull utan i ett väl slutet rör. Röret tömdes genom en utifrån manövrerbar kolvanordning. De substanser som undersöktes voro kloralhydrat (farmakopévara), »halvhydrat» och substans, som erhållits genom snabb nedkyllning av jämviktssmältor av kloralhydrat med temperaturerna 90° och 50°. 8.3 g kloralhydrat resp. 7.8 g »halvhydrat» invägdes i röret, i termoskärlet fylldes 300 g vatten, och hela apparaten med omrörare och Beckmanntermometer placerades i ett vattenbad. Korrektion för värmeavgivning var även i dessa försök onödig. Temperaturavläsningarna skedde på samma sätt som i föregående försök.

Strax före försöken bestämdes stelningspunkten på prov av de snabbkylda smältorna genom smältning i 70° oljebad. Omedelbart efter det substansen var smält, kylde smältan till begynnande kristallisation. 90°-substansen gav stelningspunkten 51.0° och 50°-substansen 48.4°.

Table 9

Temperature change on dissolving 0.05 mol (equivalents) substance in 300 g water. Temperature 20.0°.

	Chloral hydrate	»Half hydrate»	Rapidly cooled substance from	
			90° melt	50° melt
Temperature change	- 0.13°	+ 0.18°	+ 0.03°	+ 0.08°

Av försöken i tabell 9 framgår att de till vanlig temperatur nedkylda jämviktssmältorna äro energirikare än vanligt kloralhydrat, under det att »halvhydratet» synes vara energirikast av samtliga substanser. Av tabellen framgår vidare, att »90°-smältan» ger lägre värmeutveckling än »50°-smältan». Detta måste innebära, att den högre temperaturen medfört en förskjutning av jämvikten mot högre halt av i fast form energifattigare komponenter. Om man antar, att jämvikt (C) gäller, skulle detta innebära, att »90°-smältan» innehöll mera kloralhydrat än »50°-smältan», vilket ju stämmer väl överens med de resultat, som erhållits ur stelningspunktsbestämningarna.

Om jämvikten (C) råder i smältan, så borde det bildade vattnet dock ge sig tillkänna på något sätt. Någon uppdelning av smältan i flera flytande faser har emellertid aldrig iakttagits, och de snabbkylda jämviktssmältorna voro fasta och läto sig lätt rivras till grovt pulver. Möjligen var dock mängden frigjort vatten så liten, att den icke påverkade substansens utseende.

Några försök gjordes att bestämma vattenhalten i smältan genom att snabbt kyla ned denna, och därefter titrera på ev. frigjort vatten enl. *Fischer*¹¹). Fischers reagens består av en lösning av jod och svaveldioxid i pyridin och metanol och kan användas för att direkt bestämma små mängder vatten. Enligt en modifierad metod av *Bryant, Mitchell och Smith*¹²) kan denna titrering utföras även vid närvaro av karbonylgrupper. Substansen löstes i en blandning av dioxan och metanol försatt med cyanväte och natriumcyanid och titrerades därefter med Fischers reagens. Resultatet av bestämningen blev emellertid, att reagenset reagerade även med vatten bundet i »halvhydrat» och kloralhydrat. Möjligen kan detta bero på att en jämvikt föreligger i lösningen, som förskjutes under titreringens gång.

Även om alltså dessa försök icke motsäger antagandet, att jämvikten (C) råder i smältan, är det därmed icke bevisat att endast denna jämvikt gäller. Man kan också tänka sig, att kloral och vatten kunna bilda ytterligare föreningar, som ingå i andra jämvikter.

Detta kunde prövas genom närmare undersökning av det binära system, som erhålles av kloral och vatten.

*Wolf*³) har utan närmare försök beskrivit kloralhydratets »dissociation» med hjälp av en figur, som anger, att han uppfattar systemet som ett binärt system av kloral och vatten med en kongruent smältpunkt för kloralhydrat. *van Rossem*⁴) anför ett smältpunktsdiagram, som har 3 kongruenta smältpunkter: en för kloralhydrat, en för en substans bestående av 25 mol-% vatten och 75 mol-% kloral och en för en substans sammansatt av 6 eller 7 mol vatten på 1 mol kloral.

Av de tidigare utförda försöken kan man dra vissa slutsatser om några punkter i det binära systemet kloral—vatten. Kloralhydratet, som kan existera i jämvikt med en smälta av samma bruttosammansättning, bör ge en kongruent smältpunkt. Hur »halvhydratet» skall ge sig tillkänna i stelningspunktskurvan är däremot inte fullt klart. Vid högre temperatur på smältan har sönderdelningen av »halvhydratet» gått så långt, att det är kloralhydrat, som utfaller vid snabb avkylning. En smälta av denna typ borde ge en inkongruent smältpunkt för »halvhydratet». Vid lägre temperatur sjunker emellertid kloralhydratkonzentrationen, och den fasta fas, som är i jäm-

vikt med smältan vid begynnande kristallisation, består eventuellt av »halvhydrat». Om så vore fallet skulle en kongruent smältpunkt erhållas.

För att utröna om ytterligare fasta faser kunde bildas, fordrades en fullständig termisk analys av systemet. Detta erbjöd dock stora svårigheter. Sålunda har kloral stelningspunkten — 57.5° enl. *van Rossem'*), och eutekticum vid denna sida av systemet måste alltså ligga ännu lägre. En stor svårighet visade sig också ligga i att jämvikten i systemet inställde sig så långsamt.

Försöken utfördes på följande sätt. Blandningarna innehållande mera än 50 mol-% vatten bereddes av kloralhydrat och vatten. De med lägre vattenhalt av kloral och kloralhydrat. Blandningarna smältes i oljebad och höllos i badet vid 55° i minst 1 timma före bestämningens början. Bestämningarna utfördes på 10 g av blandningarna i ett provrör försett med termometer graderad i 0.1° och omrörare. För att i möjligaste mån göra avkylningen av proven likformig, omgavs provröret med 2 vidare, tomma provrör, och dessutom hölls det hela i ett bad, vars temperatur var c:a 15° lägre än provets. Temperatursänkningen blev på detta sätt c:a 0.7° per minut för den flytande substansen. Bestämningarna avbrötos i allmänhet, när substansen blivit så fast att någon effektiv omröring med omrörare eller termometer icke längre var möjlig, och det alltså icke längre med säkerhet kunde antas, att blandningens temperatur var likformig. Som kallaste kylbad användes is-koksalt, varför ingen av kurvorna utsträckts under c:a -15° . Avkylningskurvorna för de undersökta blandningarna återfinnas i fig. 2 a och b. Sammansättningen av blandningarna, se tabell 10.

Avkylningshastigheten var med säkerhet för hög, för att jämvikt skulle råda i smältorna under avsvanandet. Detta ses t. ex. av kloralhydratets smälta (kurva 12), som gav begynnande kristallisation vid 47.2° , medan jämviktssmältan vid 46° har stelningspunkten 45.6° .

På »kloralsidan» av systemet (kurv. 13—19) har intet eutekticum uppnåtts. Kurvorna visa icke heller på förekomsten av någon inkongruent smältpunkt.

På »vattensidan» (kurv. 1—11) synes av kurvorna 6, 7 och 8 framgå, att en inkongruent smältpunkt föreligger vid ungefär 18° . Temperaturstilleståndet ligger vid något olika temperaturer i de tre kurvorna. Detta beror förmodligen på att jämvikt ej råder i någon av smältorna, men att något olika avkylningshastighet medfört, att förhållandena närmat sig jämviktsläget i olika hög grad i de skilda blandningarna. Kurvan för blandning 7, som avkylts långsammare än de övriga, anger sålunda lägsta temperaturen för den inkongruenta smältpunkten. Sannolikt hör denna punkt samman med förekomsten av ett »dihydrat», sammansatt av 1 mol kloral och 2 mol vatten. Blandning 8, som innehöll 67.1 mol-% vatten, d. v. s. nästan »dihydratets» sammansättning, stelnade fullständigt vid 18° , medan 7, som innehöll 69.8 mol-% vatten var tjockflytande, även efter den inkongruenta smältpunkten. På grund av det enkla förfarings sättet vid bestämningen av kurvorna går det ej att med säkerhet dra några slutsatser om den fasta fasens sammansättning med ledning av den tid temperaturen höll sig konstant i denna punkt.

Kurvorna 1, 2 och 3 visa även vissa egendomligheter. Samtliga blandningar gävo begynnande kristallisation på normalt sätt vid resp. -3.4° , -7.2° och

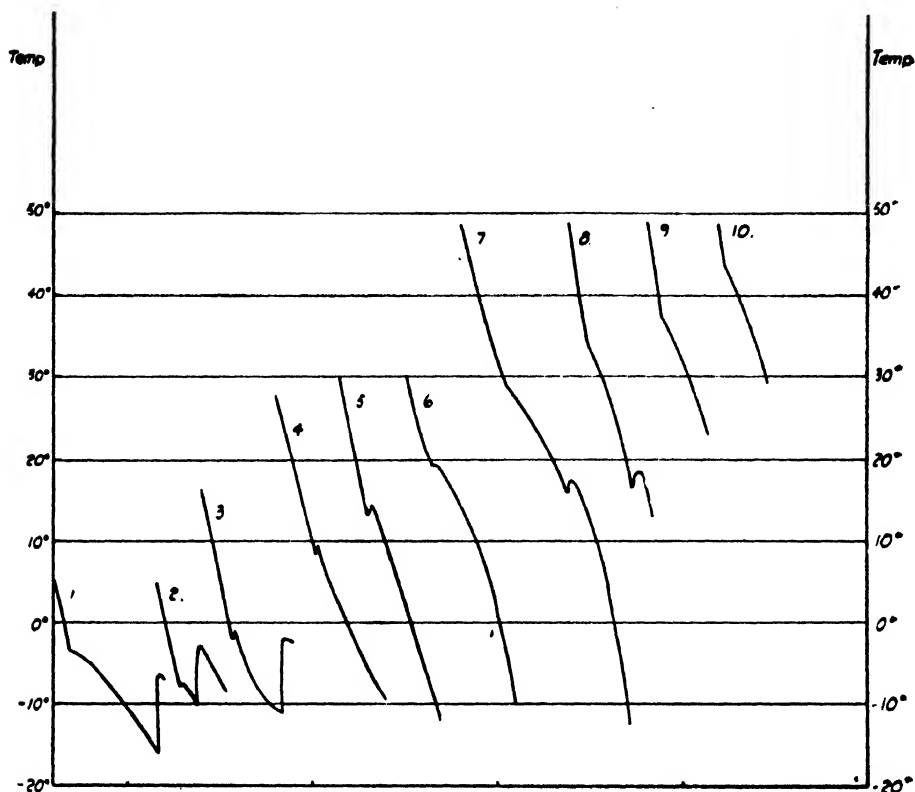


Fig. 2 a
Cooling curves for mixtures of chloral and water
(composition of the mixtures see table 10).

—1.0°. Vid fortsatt avkylning skedde en hastig och kraftig temperaturstegring. Samtidigt stelnade substansen fullständigt eller nästan fullständigt. Temperaturen steg i blandning 1 till -6.6° , och i 2 till -2.8° och i 3 till -2.2° . Denna temperaturstegring, som följdes av att substansen helt stelnade, borde av allt att döma ange ett eutekticum. Det synes emellertid egendomligt, att den eutektiska temperaturen skulle ligga ungefär 4° lägre för blandning 1 än för blandningarna 2 och 3. Vidare låg den primära stelningspunkten för blandning 2 c:a 5° lägre än den eutektiska temperaturen.

På blandning 2 gjordes en ny upptagning av avkylningskurvan. Innan bestämning utfördes, hölls blandningen smält vid 0° i 20 timmar. Vid avkylning erhöles denna gång begynnande kristallisation vid -11.4° , och efter viss ytterligare avkylning steg temperaturen plötsligt till -5.5° , varvid substansen stelnade helt. Den eutektiska temperaturen blev alltså i detta andra försök 2.7° lägre än i det första.

Dessa varierande resultat kunna möjligen bero på att underkylningen varit olika stark, men en antagligare förklaring är, att de skiftande värdena på den eutektiska temperaturen beror på att förhållandena i de olika

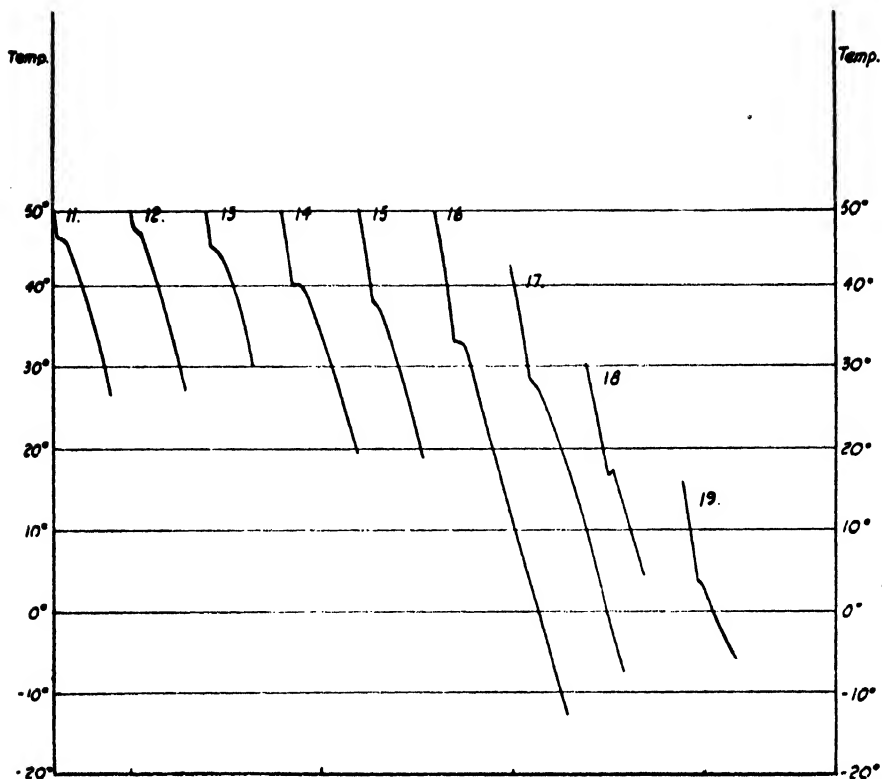


Fig. 2 b
Cooling curves for mixtures of chloral and water
(composition of the mixtures see table 10).

blandningarna i högre eller lägre grad avvikit från jämviktsläget. När blandning 2 i andra försöket gav avsevärt lägre eutektisk temperatur än i första, kan detta alltså bero på att den långa förvaringen vid låg temperatur fört blandningens sammansättning närmare jämviktsläget.

På liknande sätt kan man också möjligen förklara, att den primära stelningspunkten i blandning 2 låg under den eutektiska temperaturen.

I fig. 3 anges det ur dessa bestämningar erhållna stelningspunktsdiagrammet för systemet kloral—vatten. Partierna närmast axlarna ha uteslutits. Eutekticum på »kloralsidan» har ej uppnåtts, medan eutekticum på »vattensidan» ej kunnat bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Förekomsten av kloralhydrat och »dihydrat» framgår fullt tydligt av kurvan, medan »halvhydratet» varken ger sig till känna genom inkongruent eller kongruent smältpunkt. Detta beror förmodligen på att jämvikten förskjutes vid temperatursänkningen, så att kloralhydrat visserligen utfaller vid begynnande kristallisation, men att någon inkongruent smältpunkt ej erhålles, då »halvhydrat» börjar utkristallisera redan före denna temperatur.

Följande slutsats kan dragas av de utförda försöken:

Orsaken till kloralhydratets stelningspunktsvariationer måste vara, att i

Table 10

Composition of the chloral—water mixtures included in fig. 2 a and b.

Curve No.	Content in mol-% of	
	H ₂ O	CCl ₂ CHO
1	96.9	3.1
2	91.1	8.9
3	83.2	16.8
4	79.1	20.9
5	76.8	23.2
6	74.0	26.0
7	69.8	30.2
8	67.1	32.9
9	64.8	35.2
10	59.7	40.3
11	54.5	45.5
12	50.0	50.0
13	42.0	58.0
14	35.3	64.7
15	32.8	67.2
16	27.8	72.2
17	21.2	78.8
18	11.7	88.3
19	5.0	95.0

kloralhydratets smälta föreligga jämvikter som innefatta både »halvhydrat» (sammansatt av 2 mol kloral och 1 mol vatten) och »dihydrat» (sammansatt av 1 mol kloral och 2 mol vatten).

Litteraturförteckning.

1. *Rudolphi*: Z. physik. Chemie 37 (1901), 429
2. *V. Meyer och Dulk*: Annalen der Chemie 171 (1874), 74
3. *Wolf*: J. phys. chem. 4 (1900), 21
4. *van Rossem*: Z. physik. Chemie 62 (1908), 681
5. *Schoorl*: Commentaar op de nederlandsche Pharmacopee, Vijfde uitgave, door de Graaff, Schoorl en van der Wielen, Utrecht 1929.
6. *Pope*: J. chem. soc. 75 (1899), 455
7. *Cameron*: J. phys. chem. 2 (1898), 409
8. *Holleman*: Z. physik. Chemie 43 (1903), 129
9. *Bancroft*: J. phys. chem. 2 (1898), 141
10. *Self*: Pharm. J. 79 (1907), 4
11. *Fischer*: Z. angew. Chemie 48 (1935), 394
12. *Bryant, Mitchell och Smith*: J. amer. chem. soc. 62 (1940), 3504
13. *Eisenlohr*: Z. physik. Chemie 75 (1910), 585, 79 (1912), 129
14. *Kurnakow och Efremow*: Z. physik. Chemie 85 (1913), 403
15. *Hückel*: Theoretische Grundlagen der organischen Chemie, Leipzig 1941
16. *Schou*: Dansk Tidsskrift f. Farm. 1 (1927), 419
17. *Petrikaln och Hochberg*: Z. physik. Chemie (B) 4 (1929), 306

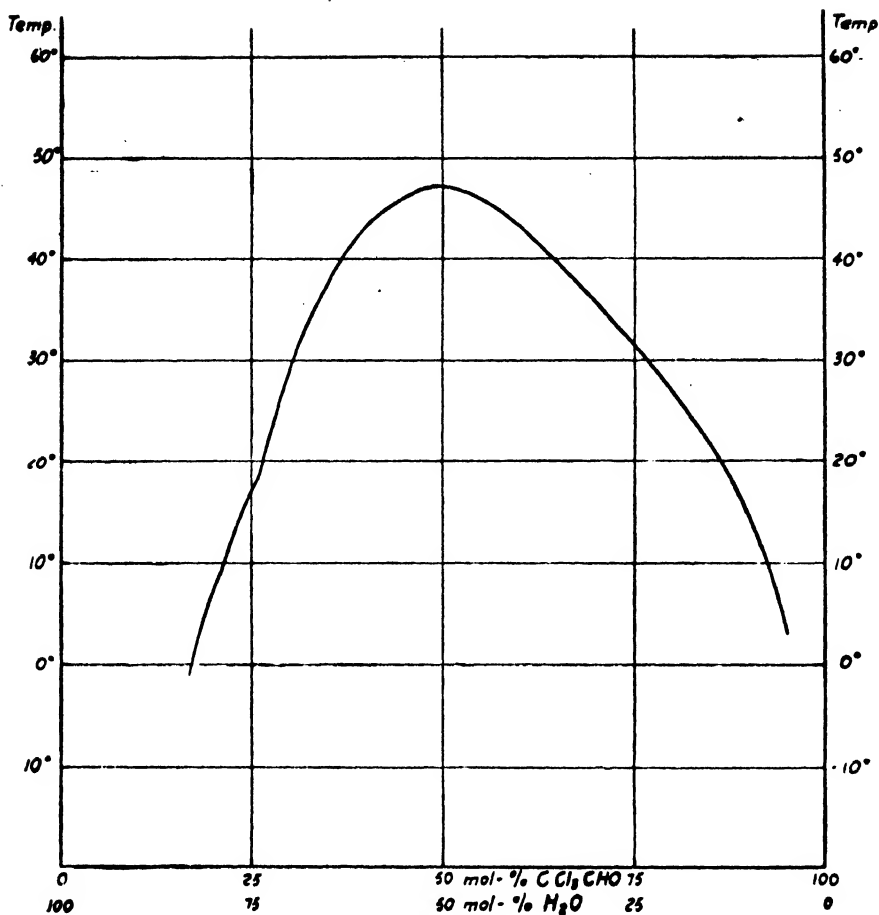


Fig. 3
Freezing point diagram for the system chloral—water.

18. *Fonteyne*: *Natuurw. Tijdschr.* 24 (1942), 69, *gm Chem. Abstr.* 37 (1943), 5653
19. *Banchetti*: *Ann. chim. applicata* 31 (1941), 422, *gm Chem. Abstr.* 38 (1944), 2313
20. *Kommentar zur Pharmacopoea helvetica editio quinta* bearb. von Eder, Büchi, Flück und Käsermann, Zürich 1947.

SUMMARY

Freezing point of chloral hydrate

The melting point of chloral hydrate is stated very differently in the literature, with temperatures varying between 46° and 60° C. In the Swedish Pharmacopoeia Ed. XI there is used instead the freezing point for melted chloral hydrate, which is given as 47°.

The freezing point, however, is very much dependent on how the determination is carried out. Experiments have shown that it varies

1. with the time the substance is maintained in melted condition (table 1). The freezing point is gradually falling finally reaching a constant value.

2. with the initial temperature of the melt (table 2). The higher the initial temperature the higher the freezing point will be.

3. with the time of cooling (table 3). Slow cooling gives lower freezing point than quicker cooling.

Consequently determination of the freezing point cannot be regarded as suitable for pharmacopoeia test.

Various conceivable causes for these freezing point variations have been investigated.

It has been found by experiments that no destruction of the substance takes place in the melt.

Moreover the freezing point variations of chloral hydrate cannot be due to enantiotropy or monotropy.

Nor do the various crystal forms of chloral hydrate constitute isomeric forms that may give a pseudo-binary system. Experiments have on the contrary shown that they are identical in melted form.

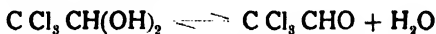
A form of chloral hydrate produced by *Meyer and Dulk*²⁾ has been found to be an impure »half hydrate» (composed of 2 mol chloral and 1 mol water). This »half hydrate» has been produced in pure form by mixing 2 mol chloral and 1 mol water. After the mixture had been kept at 0° for twenty-four hours, the solid mass obtained was re-crystallised from a mixture of petroleum ether and chloroform (4 + 1), from which the substance was obtained as white shiny crystalline flakes. Analysis gave results agreeing well with the computed values (table 4). »The half hydrate» melted at app. 95°. It was not stable in melted form and the freezing point, which at first was app. 90° gradually sank to 37.8°. The substance that was crystallised out in these freezing point experiments appeared to be »half hydrate» in all cases. The substance was then maintained in melted condition at high temperature for 15—30 minutes. When the temperature of the melt was 90° there was obtained the freezing point 44.0°, whereas the temperature 70° gave the freezing point 41.3°. During these determinations chloral hydrate crystallised out while the mixture acquired a strong chloral smell. On cooling this melt to room temperature, it took several hours for it to solidify throughout. Determination of the equivalent weight of the substance according to the Swedish Pharm. Ed. XI, before and after these freezing point experiments, showed that the gross composition was not altered during the experiment. An equilibrium between chloral hydrate, »half hydrate» and chloral is probably present in the melt.

The determination of refractive index for a melt of this »half hydrate» showed that a change in the constitution of the substance takes place during melting (table 5). The refractive index gradually sank to a constant value.

On the other hand, a melt of chloral hydrate showed rising refractive index (table 6). There was also reached in the end a constant value.

The determination of the molar refraction of chloral hydrate at various temperatures showed that the value rises by app. 3 %_∞ per 10° (table 7).

The variations in freezing point of chloral hydrate cannot be explained by a simple dissociation



In fact, from the freezing point determinations it is found that the percentage of chloral hydrate in the melt increases with the temperature.

If the above equilibrium were to hold good, this would imply that heat is absorbed when chloral combines with water to form chloral hydrate. Experiments have shown, however, that heat is evolved in this reaction (table 8).

When melts of chloral hydrate are rapidly cooled, there are obtained solid substances, which show higher heat of solution than chloral hydrate not melted before (table 9).

In view of the conditions in the melt of the »half hydrate» it would appear more probable that the chloral hydrate is in equilibrium with other hydrates of chloral in the melt.

A thermal analysis of the system chloral-water gave the cooling curves shown in fig. 2 a and b, and the freezing point diagram in fig. 3. The chloral hydrate gives a congruent melting point, while an incongruent melting point is to be seen in the left half of the curve. This point, which appears clearly on the curves 6, 7 and 8 in fig. 2 a, probably indicates the presence of a »dihydrate» composed of 1 mol chloral and 2 mol water. The »half hydrate» on the other hand causes neither a congruent nor an incongruent melting point. This is probably due to the equilibrium being displaced during the cooling.

Equilibrium did not prevail in the melts during the determinations as the rate of cooling was too great (app. 0.7° per min.). According to this the eutecticum on the left half of the curve could not be determined with sufficient accuracy. Eutecticum on the right half of the curve was not attained with the cooling employed.

The reason for the freezing point variations of the chloral hydrate is probably that equilibriums are present in the melt, which comprise both »half hydrate» and »dihydrate» of chloral.

Kvantitativ bestämning av oxidimorfin i morfin.

(Från Kungl. Farmaceutiska institutets kemiska avd.)

Av Nils Thörn och Allan Ågren.

Inserted in Coll. Pharm. Suec. IV, 1949.

Bland arbetsuppgifterna för »Kommittén för prövning av läkemedels hållbarhet» stod 1946 i första rummet prövningen av morfinampullers hållbarhet. Vid lagerhållning av denna läkemedelsberedning kan kassationen uppgå till ganska stora belopp, vilket är fallet t. ex. beträffande de militära lagren. Sålunda anför t. ex. 1944 års utredning rörande försvarets läkemedelsförsörjning, att den icke omsättningsbara resten av morfinampuller beräknas representera en årlig summa av omkring 50.000 kronor¹⁾. Att söka lösa detta hållbarhetsproblem ur kemisk och farmaceutisk synpunkt har kommittén anförtrott åt oss.*)

Vi började bearbeta uppgiften 1946 och fingo medel till apparatur och material ur anslaget för främjande av medicinsk forskning. På grund av de långa leveranstiderna av vetenskaplig apparatur kunde vi ej få vår utrustning komplett förrän i november 1947, då det definitiva arbetet igångsattes.

*) Problemets biologiska sida bearbetas av *H. Rydin*, Statens farmaceutiska laboratorium.

För att kunna studera hållbarheten var det av betydelse att känna någon väldefinierad produkt, som uppkommer i samband med sterilisering och förvaring av morfinhydroklorid i vattenlösning. En sådan substans synes oxidimorfin vara. Detta ämne, som även går under namnet pseudomorfin, finnes omnämnt i litteraturen i många sammanhang. Sålunda är oxidimorfin "en naturlig beståndsdel i opium, och vidare anses oxidimorfin vara en produkt, som uppkommer under morfinets omvandling i den levande organismen").

Oxidimorfin anses vara uppbyggt av två molekyler morfin, vars 2-ställda väteatomer genom oxidation försvunnit och kolatomerna sammanbundits.

Vår första uppgift var att syntetisera rent oxidimorfin, som skulle användas för utprovandet av lämplig bestämningsmetod. En sammanställning av olika syntesmetoder har gjorts av *Fulton*³⁾. Som oxidationsmedel användas kaliumferricyanid, merkuroklorid, kaliumpersulfat m. fl. Vi ha försökt de nämnda metoderna och funnit persulfatmetoden vara den för våra förhållanden lämpligaste. Enligt detta förfaringssätt lösas 10 g morfinhydroklorid i 2,5 liter vatten och försätts med 100 ml kopparsulfatlösning (1:10060 med avseende på koppar), 200 ml 5 % kaliumpersulfatlösning, 150 ml 5 % natriumbikarbonatlösning och 50 ml pyridin. Efter några minuter utfaller ett finkristalliniskt pulver. Substansen renas genom tre gånger upprepade upplösningar i klorvätesyra och utfällning med ammoniak. Produkten var svagt gul.

Dietzel och *Huss*⁴⁾ ha lagt bildningen av oxidimorfin till grund för en undersökning av olika steriliseringsmetoders inflytande på morfin. De ha undersökt morfins och oxidimorfins absorption i ultraviolett ljus. Vi ha funnit att den av oss framställda substansen giver samma extinktionskurva som deras, och vi betrakta därför vår substans som rent oxidimorfin.

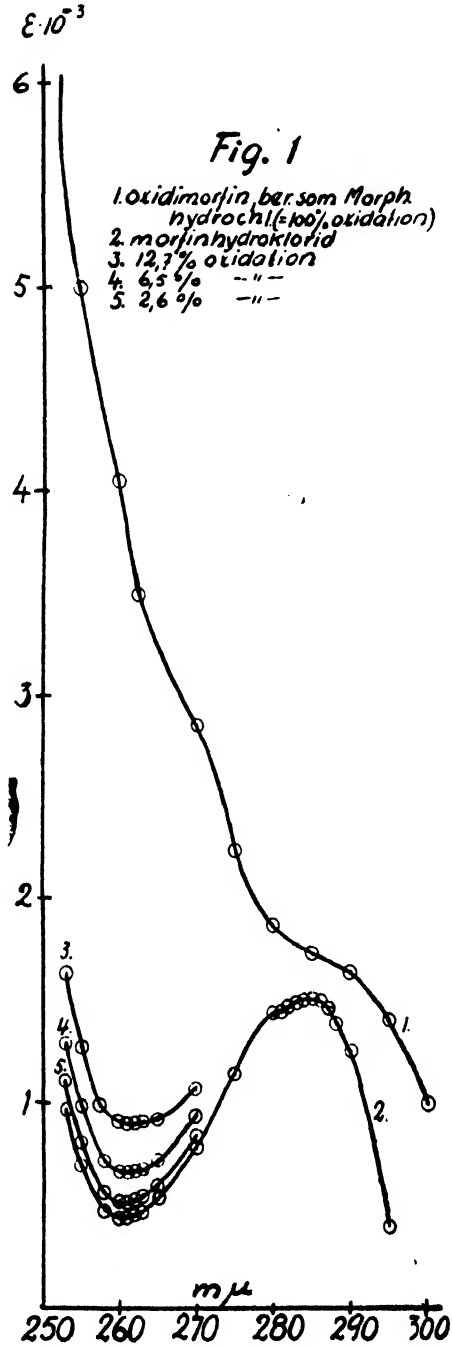
I arbetet av *Dietzel* och *Huss*, som ovan nämnts, har uppsatts som mål att utreda den kemiska förändringen, som morfinhydroklorid undergår vid upphettning i vattenlösning. Dessa författare använde sig av omsorgsfullt renad morfinhydroklorid och vatten och utförde försöken vid varierande pH i atmosfär av syrgas respektive kvävgas. Genom att mäta absorptionen i ultraviolett ljus visade de, att en förändring av lösningen skedde i syrgasatmosfär men ej i kvävgasatmosfär. Därav drogo de den slutsatsen, att förändringen måste vara en oxidation. Genom att jämföra absorptionen i lösningar, som avsevärt förändrats, t. ex. efter uppvärmning under 2 timmar vid 150°, i syrgasatmosfär och vid pH 11,7, med absorptionen hos en lösning av oxidimorfin, drogo de den slutsatsen, att oxidationsprocessen resulterar i bildning av oxidimorfin.

Undersökning i ultraviolett ljus.

Undersökningarna i ultraviolett ljus ha utförts med »Beckman Spectrophotometer Model DU». Därvid upptogos extinktionskurvor för morfinhydrokloridlösning och oxidimorfinhydrokloridlösning. Lösningsmedlet har varit c:a M/100 klorvätesyra. Syran var avsedd att förhindra hydrolytiska förändringar. Bandvidden var maximalt 1 m μ . Extinktionen mättes i 1 cm kyvett. Morfinlösningens halt var 0,2 ‰ beräknat som Morphini hydrochloridum. Oxidimorfinlösningens halt var 0,04 ‰ beräknat som oxidimorfinbas.

Den del av morfinets extinktionskurva (se fig. 1), som intresserar oss mest

är området omkring 260 $m\mu$, där förändringar av morfinet är lättast iakttagbara, enär differensen mellan morfinets och oxidimorfinets extinktionskurvor här ligger väl till.



Extinktionskurvans förändring vid en partiell oxidation av morfin till oxidimorfin kan givetvis lätt beräknas ur de rena lösningarnas extinktionskurvor. Men på grund av oxidimorfinkurvans branta förlopp inom detta våglängdsområde bli sådana beräkningar relativt osäkra.

Vi ha därför upptagit extinktionskurvor för kända blandningar av morfin och oxidimorfin. Blandningarna motsvarade oxidationsgraderna 2,6 %, 6,5 % och 12,7 %. I dessa upptogs endast våglängderna omkring 260 m μ , vilka som ovan anförts äro av särskilt intresse.

Försöksresultaten framgå av tabellerna 1 a, b, c, d och e samt av fig. 1. I tabellerna har såväl den direkt uppmätta extinktionen (E) som den molära extinktionen (ϵ) angivits. Denna senare har beräknats med morfinhydrokloridens molekylvikt som grund. I figuren angives endast den molära extinktionen.

Tabell 1 a.

Morfin.

Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ	Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ
250	0,865	1625	281	0,770	1447
253	0,520	977	282	0,785	1475
255	0,370	695	283	0,792	1488
258	0,252	474	284	0,800	1503
260	0,233	438	285	0,805	1513
261	0,235	442	286	0,800	1503
262	0,242	455	287	0,782	1469
263	0,252	474	288	0,740	1390
265	0,289	543	290	0,612	1150
270	0,425	799	295	0,212	398
275	0,616	1157	300	0,045	85
280	0,769	1445			

Tabell 1 b.

Oxidimorfin.

Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ
250	1,08	730J
255	0,700	4990
260	0,568	4050
265	0,490	3490
270	0,400	2850
275	0,314	2240
280	0,262	1870
285	0,242	1730
290	0,232	1650
295	0,198	1410
300	0,141	1000

Tabell 1 c.
12,7 % oxidation.

Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ
253	0,895	1630
255	0,700	1280
258	0,540	985
260	0,499	910
261	0,493	899
262	0,492	897
263	0,500	912
265	0,505	921
270	0,585	1067

Tabell 1 d.
6,5 % oxidation.

Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ
253	0,696	1290
255	0,530	981
258	0,390	722
260	0,361	668
261	0,361	668
262	0,363	672
263	0,368	681
265	0,390	722
270	0,508	940

Tabell 1 e.
2,6 % oxidation.

Våglängd i m μ	Extinktion E	Molär extinktion ϵ
253	0,587	1100
255	0,430	804
258	0,303	567
260	0,280	524
261	0,280	524
262	0,283	529
263	0,297	555
265	0,327	611
270	0,452	845

Blandningarnas extinktionsvärden stämma väl överens med de ur rena lösningar beräknade extinktionsvärdena. Metoden är därför fullt användbar för bestämningar av oxidationsgrader från 5 % och uppåt. Oxidimorfin-

halten erhålles ur *differensen* mellan de uppmätta extinktionsvärdena i provlösning och i nyberedd morfinlösning av exakt samma halt.

Vi kommo dock snart underfund med, att vid anbefallda steriliseringsmetoder och normala förvaringsbetingelser oxidationen av morfinet endast i undantagsfall uppnådde så höga värden som 2 %. Flertalet av de av *Dietzel* och *Huss* funna värdena ha erhållits under betingelser, som torde sakna motsvarighet i praktiken. Vår strävan har därför i fortsättningen inriktats på att finna en kolorimetrisk *direktmetod*, som gör det möjligt att bestämma små mängder oxidimorfin i närvaro av stora mängder morfin.

Kolorimetriska metoder.

Ättiksyreanhydridmetoden.

Av i litteraturen behandlade kolorimetriska metoder äro ett fåtal kvantitativt utformade och då så är fallet baserade på bestämning av oxidimorfin i substans utan närvaro av morfin. *Drevon*⁷⁾ anger emellertid ett sätt att ur en mycket utspädd ren lösning fälla oxidimorfin och sedan bestämma mängden enligt nedan angivet förfarande. Ett många gånger rekommenderat fällningsmedel för alkaloider är kiselwolframsyra, som *Drevon* här använder sig av. För att ur mycket utspädda oxidimorfinlösningar (8 till $20 \cdot 10^{-6}$ g/l) kunna isolera fällningen med kiselwolframsyra tillsätter han en bariumsulfatsuspension och centrifugerar blandningen. Den klara vätskan avhållles, centrifugrörets väggar torkas, varefter fällningen löses i koncentrerad svavelsyra försatt med ättiksyreanhydrid. Därvid uppkommer en grön färg, vars styrka han mäter. *Drevon* anger att morfin ej giver denna reaktion. Vi ha sökt tillämpa metoden på lösningar innehållande små mängder oxidimorfin i närvaro av relativt stora mängder morfin (1:20), vilka båda substanser sålunda fällas av kiselwolframsyra. Det visade sig då, att oxidimorfin gav en grön färg (max. 650 m μ) och morfin en violett färg (max. 530 m μ). Dessa båda maxima ligga så åtskilda, att en mätning av endera färgen synes kunna göras. Emellertid har morfinet även på våglängd 650 m μ en så stark absorption, att vid arbete med ovan nämnda mängdförhållande, en kvantitativ bestämning är omöjlig.

Formalinsvavelsyremetoden.

Metoden att ur mycket utspädda lösningar med hjälp av kiselwolframsyra och bariumsulfat fälla oxidimorfin och morfin, vilken metod givetvis är ganska omständlig, ha vi sökt tillämpa i förening med ett annat färgframkallande reagens. Som sådant använde vi t. ex. formalinsvavelsyra, som ej heller visade sig lämplig. Samma var förhållandet med formalinsvavelsyra och vätesuperoxid⁸⁾.

Glyoxylsyremetoden.

Det bekvämaste förfarings sättet vore givetvis, om man kolorimetriskt kunde bestämma oxidimorfin utan föregående isolering. I litteraturen angivas ett flertal kvalitativa färgreaktioner, som basera sig på användningen av aldehyder. Sålunda beskriver *Pesez*⁷⁾ användningen av t. ex. glyoxylsyra,

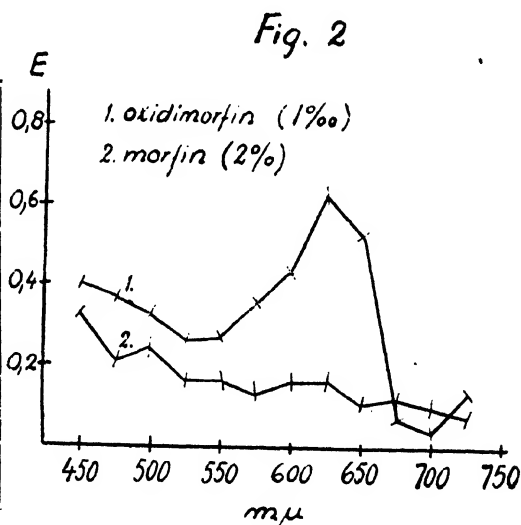
som med oxidimorfin giver en intensivt grön färg. Preliminära försök gåvo vid handen, att glyoxylsyra syntes användbar även för kvantitativa bestämningar under betingelser, som vi önskade.

Pesetz framställer reagenset på följande sätt: Till 10 ml av en 5 % vattenlösning av oxalsyra sätts 5—6 droppar mättad kvicksilverkloridlösning och ett stycke aluminiumfolium. Man värmer tills livlig vätgasutveckling inträder, varefter reaktionen förlöper frivilligt. Efter 5 minuter filtreras och 4—5 droppar koncentrerad svavelsyra tillsätts. Detta reagens använder han på så sätt, att till 2 ml koncentrerad svavelsyra sätts några korn oxidimorfin och 3—4 droppar reagens. Färgen observeras först i kyla, härefter nedsänkes provet i kokande vattenbad, varvid efter 1—2 minuter en mycket vacker, smaragdgrön färg uppstår. Morfin giver en violett färg.

Till att börja med använde vi ett reagens berett enligt *Pesetz*, och i övrigt arbetade vi på följande sätt vid upptagning av extinktionskurvorna för oxidimorfin och morfin: Till 1 droppe 1 % oxidimorfinlösning, resp. 2 % morfinhydrokloridlösning sattes 2 ml koncentrerad svavelsyra och 3 droppar glyoxylysrereagens. Efter ½ minut i kokande vattenbad mättes extinktionen vid olika våglängder. Den använda apparaten var en Leifo-fotometer, där filtren utbytts mot en monokromator. Skiktjockleken var 1 cm. Resultaten återfinnas i tabell 2 och fig. 2. Av värdena och figuren framgår, att vid våglängd 625 μ oxidimorfinsmängden kan bestämmas, om vederbörlig hänsyn toges till morfins extinktion.

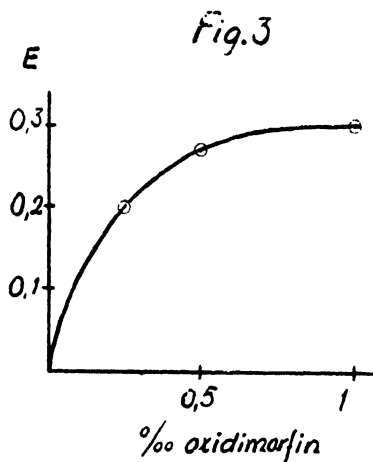
Tabell 2.

Våglängd i m μ	Extinktion E	
	oxidimorfin	morfin
450	0,40	0,33
475	0,37	0,21
500	0,33	0,24
525	0,26	0,16
550	0,27	0,16
575	0,36	0,13
600	0,43	0,16
625	0,63	0,16
650	0,53	0,11
675	0,07	0,12
700	0,04	0,10
725	0,14	0,08



Efter försök avsedda att klargöra betydelsen av variation av reagensmängd och uppvärmningstid övergingo vi till fastställandet av sambandet mellan halten oxidimorfin och extinktion. Detta samband skall ju, om Lamberts och Beers lagar gälla, vara rätlinigt. Ett sådant försök visas i fig. 3, där rena oxidimorfinlösningar ha använts. Kurvans utseende föranledde oss att antaga, att glyoxylysmängden var otillräcklig, varför vi, genom att ändra på föreskrifterna för reagensets beredning, sökte framställa ett starkare reagens. Sålunda förlängdes reduktionstiden och togs en mera koncentrerad

oxalsyrelösning i arbete. Dessa försök gävo ej åsyftat resultat. Vi funno också, att det var svårt att reproducera reagensets sammansättning, varför vi sökte renframställa glyoxylsyra. Detta är ett ganska besvärligt företaget, och hitintills ha vi ej heller lyckats inköpa färdig substans. Dessa svårigheter kommo oss att söka andra vägar.



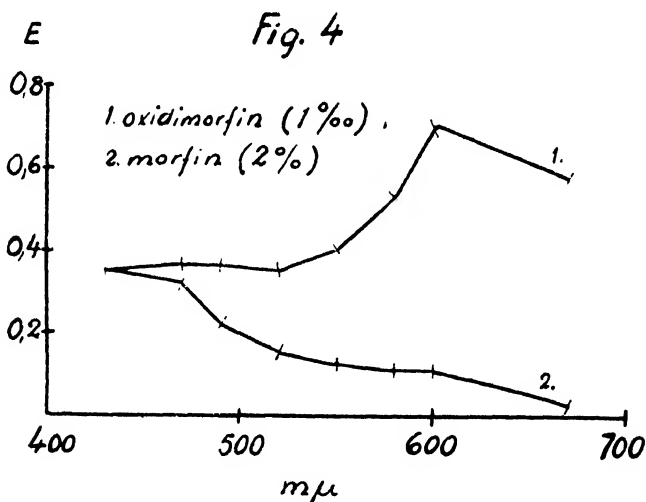
Metoder med aromatiska aldehyder.

Drevon^{*)} har bl. a. undersökt ett antal aromatiska aldehyders färgreaktioner med morfin och oxidimorfin ur kvalitativ synpunkt. Han anser sig kunna fastslå, att det är aldehydgruppen, som betingar färgen, eftersom han med negativt resultat prövat närbesläktade syror, alkoholer och fenoler. Oxidimorfin har också fått användning som reagens på aldehyder^{*)}. Detta uppslag ha vi byggt vidare på och sökt tillämpa på det kvantitativa problem, vi förelagt oss, nämligen att bestämma små mängder oxidimorfin i närvaro av relativt stora mängder morfin. De aldehyder vi i detta sammanhang pröfvade voro: bensaldehyd, ortonitrobensaldehyd, salicylaldehyd, kanelaldehyd, paradimetylaminobensaldehyd, protokatekualdehyd och vanillin.

I samtliga fall har *Drevon* använt en 3 ‰ lösning av ifrågavarande aldehyd i koncentrerad svavelsyra och därtill satt några centigram alkaloid, varefter uppvärmts i kokande vattenbad 3—10 minuter. Vid förprovningarna anslöto vi oss nära till dessa försöksbetingelser. Vi använde dock en 1 ‰ lösning av oxidimorfin och en 2 ‰ av morfinhydroklorid. I samtliga fall gav oxidimorfin en mer eller mindre klart grön färg och morfin en violett. Mätningarna ha nu och i fortsättningen utförts med Hilgers »Spekker photoelectric absorptiometer». Resultaten av dessa förprovningar blevo:

- a) *Bensaldehyd*: skillnad i extinktion vid våglängd 600 m μ (oxidimorfins maximum) är tillräcklig för att möjliggöra en kvantitativ bestämning av oxidimorfin i närvaro av morfin. Reagensets egenfärg är dock kraftig.
- b) *Ortonitrobensaldehyd*: även morfin har i det gröna området en ganska kraftig extinktion. Vid uppvärmning inträder en störande förändring i nyansen.

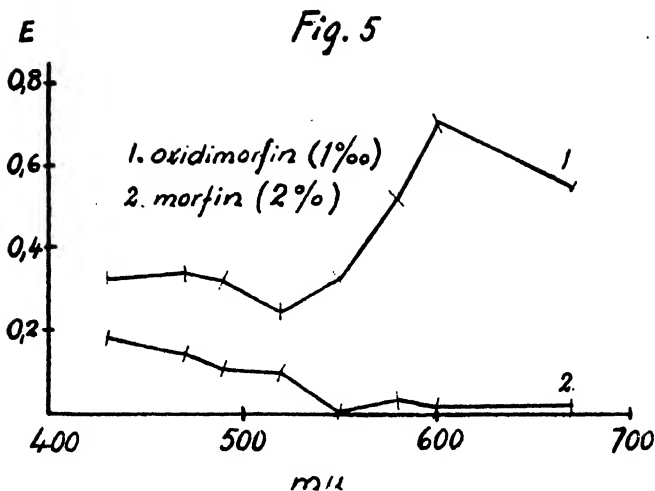
- c) *Salicylaldehyd* gav en kraftig egenfärg men endast en mycket svag färg med oxidimorfin och morfin.
- d) *Kanelaldehyd* gav alltför kraftig egenfärg för att vara lämplig.
- e) *Paradimetylaminobensaldehyd* (ej prövad av *Drevon* men däremot av *Pesz⁷*) gav med morfin redan i kyla kraftig färgning, som stegrades vid värmning. Med oxidimorfin erhöles en svagt grön färg, som vid fortsatt uppvärmning förändrades.
- f) *Protokatekualdehyd*, som gav svag egenfärg, reagerade med morfin under bildning av en svagt violett färg och med oxidimorfin av en kraftigt grön färg. Detta reagens var det hittills lämpligaste och gav extinktionskurvor, som återgivas i fig. 4. Försöksbetingelserna voro följande: 0,4 ml 1 ‰ oxidimorfinlösning resp. 2 ‰ morfinhydrokloridlösning försattes med 8 ml 3 ‰ protokatekualdehyd i koncentrerad svavelsyra. Därefter uppvärmdes 10 minuter i kokande vattenbad.



- g) *Vanillin*, som ju kemiskt står protokatekualdehyden mycket nära, gav resultat, som nära överensstämde med dem, som erhöles med protokatekualdehyd. Extinktionskurvorna, erhållna under samma betingelser, visas i fig. 5, varav framgår, att vanillin synes vara något fördelaktigare än protokatekualdehyd. Därtill kommer, att vanillin är ett officinellt preparat. Dessa resultat föranledde oss att arbeta vidare med vanillin. Oxidimorfins extinktionskurva har sitt maximum vid 600 mμ, vid vilken våglängd mätningarna i fortsättningen således böra företagas.

Vanillinmetoden.

Som ovan nämnts synes vanillin vara ett reagens, som vi hade anledning hoppas vara brukbart i vårt fall. De faktorer, som kunna ha inflytande på extinktionen förutom mängden alkaloid äro: vanillinkoncentration, uppvärmningstid och svavelsyrakoncentration.



För att erhålla tillfredsställande reproducerbarhet fixerades försöksbetingelserna på följande sätt: I ett omsorgsfullt rengjort provrör uppmättes med mikropipett 0,50 ml vattenlösning av alkaloiden. Härtill sattes ur en »Vollpipett» 10,0 ml reagenslösning under oavbruten skakning och samtidig kylning i vatten. Efter tillsatsen gjordes blandningen homogen med hjälp av en omrörare av glas. Provröret nedsänktes sedan i ett kokande vattenbad under föreskriven tid, kylades under rinnande vatten, varefter lösningens extinktion mättes i en 1 cm kyvett. Samtidigt med provet gjordes ett blindprov, där alkaloidlösningen utbyttes mot samma volym vatten.

Vanillinkoncentrationens betydelse.

Reagensens vanillinhalt angivas i vikt/volym-procent, som i fortsättningen betecknas med %. Vi undersökte sambandet mellan extinktion vid 600 mμ och vanillinkoncentration. Vid dessa försök var uppvärmningstiden 10 minuter och den använda svavelsyran var ung. 95 %. Resultaten återfinnas i tabell 3 och fig. 6 (endast oxidimorfinkurvan utritad). Av dessa framgår, att en ökning av vanillinkoncentrationen utöver 1 % ej åstadkommer någon nämnvärd ökning av extinktionen vare sig hos oxidimorfin eller morfin. Vi ha därför i fortsättningen arbetat med 1 %-igt reagens.

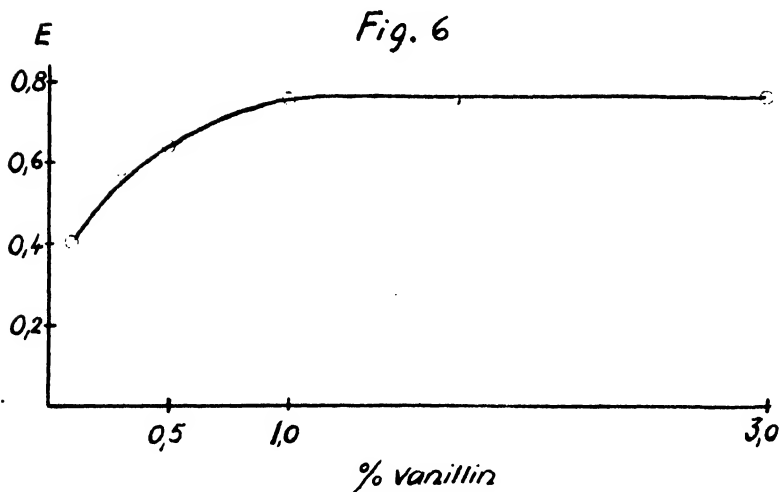
Uppvärmningstidens betydelse.

Vid dessa försök användes sålunda 1 %-igt reagens, berett av 95 %-ig svavelsyra. Sambandet mellan uppvärmningstid i kokande vattenbad och extinktion vid 600 mμ anges för oxidimorfin och morfin i tabell 4 och fig. 7 (differensen utritad). Av kurvans förlopp framgår, att en ökning av uppvärmningstiden utöver 20 minuter ej medför någon avsevärd ökning av färgintensiteten. Vi ha valt denna tid för att ej i onödan försvåra arbetet, ehuru ännu ej maximal färgintensitet uppnåtts.

Tabell 3.

Provlösningar: 1 ‰ oxidimorfin
 2 ‰ morfinhydroklorid
 Uppvärmningstid: 10 minuter

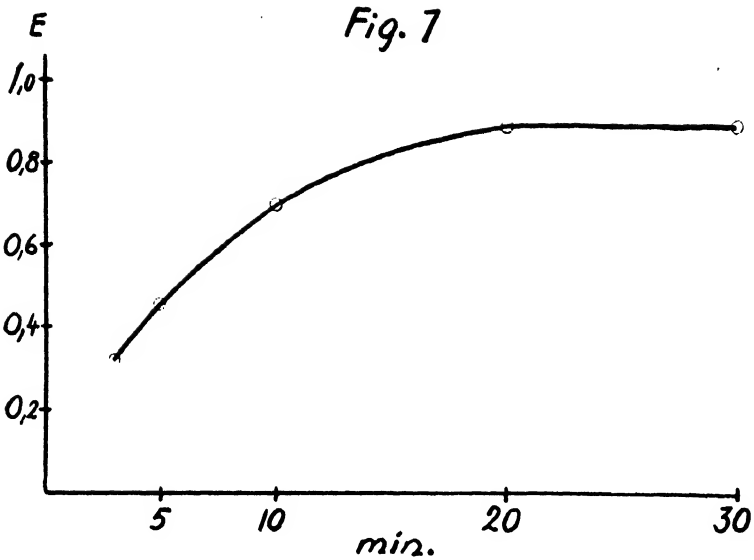
% vanillin	Extinktion mätt mot en lösning av 0,5 ml vatten och 10 ml reag. E	
	oxidimorfin	morfin
0,1	0,403	0,015
0,3	0,593	0,029
0,5	0,640	0,020
1,0	0,758	0,057
3,0	0,762	0,054



Tabell 4.

Reagens: 1 vikt/volym-procent vanillin i 95 % svavelsyra

Tid i min.	Extinktion E	
	oxidimorfin + morfin	morfin
3	0,339	0,023
5	0,486	0,036
10	0,720	0,022
20	0,940	0,040
30	0,998	0,108



Svavelsyrakoncentrationens betydelse.

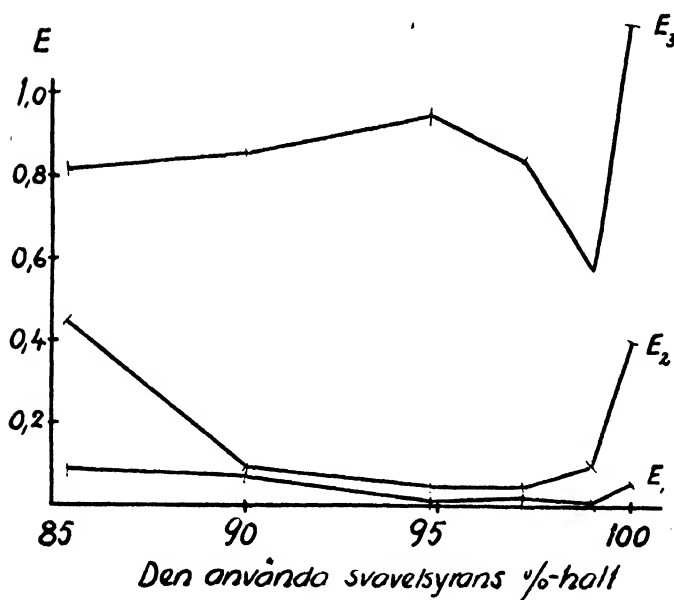
Vid undersökningens början beaktades ej eventuella variationer i svavelsyrans koncentration. Emellertid erhöles vid användning av olika partier svavelsyra något olika värden, vilket föranledde oss att även undersöka svavelsyrakoncentrationens betydelse. Av skäl, som framkomma senare i denna uppsats (jfr sid. 13), ha vi varierat den använda svavelsyrans halt mellan 85 % och 100 %. Reagensets vanillinhalt har hela tiden varit 1 %. Vid försök rörande dessa förhållanden ha vi mätt extinktionen vid 600 m μ , dels i en lösning innehållande 0,50 ml vatten och 10,0 ml reagens, dels 0,50 ml 2 % morfinhydrokloridlösning och 10,0 ml reagens och dels i 0,50 ml av en lösning, som är 1 ‰ med avseende på oxidimorfin och 2 % med avseende på morfinhydroklorid, samt 10,0 ml reagens. Alla dessa lösningar ha mätts mot rent vatten. Vi ha valt denna metodik av följande anledning: Vid bestämning av oxidimorfinhalt i morfinlösningar bör morfin vara närvarande i blindprovet, eftersom morfin även vid 600 m μ har en viss extinktion. Det är alltså differensen mellan extinktionen för oxidimorfin-morfinlösning och enbart morfinlösning, som är av intresse. Men vi önska också ha uppgift om extinktionens absoluta belopp, varför blindprov innehållande dels vatten och reagens, dels enbart rent vatten medtagits.

Resultaten av mätningarna vid 20 minuters uppvärmning framgå av tabell 5 och fig. 8. I tabellens kolumn 2 (E_1) äro uppförda de extinktioner, som erhöles vid mätning av vatten och reagens mot rent vatten, i kolumn 3 (E_2), extinktioner erhöles med morfinlösning och reagens mot rent vatten och slutligen i kolumn 4 (E_3) extinktioner, erhöles med oxidimorfin-morfinlösning och reagens mot rent vatten.

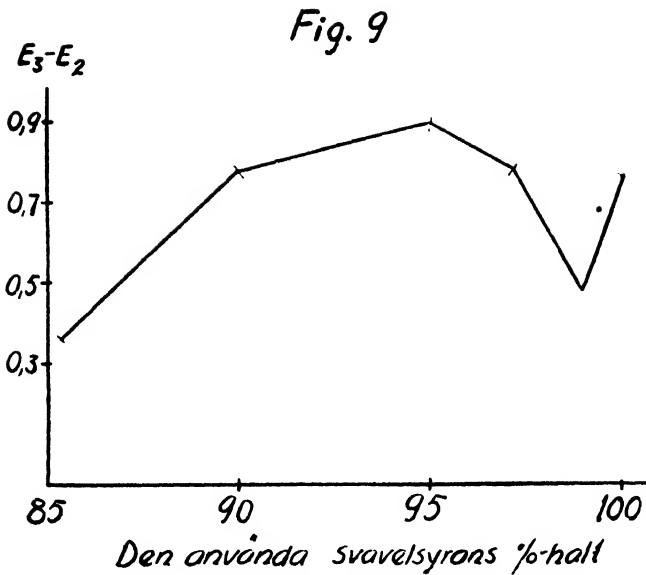
Tabell 5.
Uppvärmningstid: 20 min.

1 Den använda svavelsyrans %-halt	2 Extinktion		
	3 E_1	4 E_2	5 E_3
85,4	0,088	0,458	0,818
90,0	0,073	0,091	0,863
94,8	0,010	0,050	0,950
97,2	0,015	0,050	0,840
99,0	0,010	0,092	0,572
100,0	0,053	0,405	1,175

Fig. 8
Uppvärmningstid: 20 min.



Studera vi fig. 8, finna vi, att differensen mellan E_1 och abscissaxeln är ett mått på reagensets egenfärg. Differensen mellan E_2 och E_1 är ett mått på morfins extinktion vid denna våglängd. Slutligen är differensen mellan E_3 och E_2 extinktionen hos oxidimorfin. Ju större denna senare differens är, ju större är mätnoggrannheten. Denna differens är utritad i fig. 9. Observeras bör, att linjerna endast förena sammanhörande punkter men ej giver uttryck för kurvornas verkliga förlopp.



Av fig. 9 framgår, att 95 % svavelsyra är ur alla synpunkter den mest lämpliga. Tyvärr måste man också konstatera, att ett fastläggande av syrans styrka på 1 % när är önskvärt.

Figurernas överraskande utseende gjorde det önskvärt att få belägg för riktigheten genom att undersöka förhållandena även vid 10 och 5 minuters uppvärmning. Resultaten av dessa undersökningar visas i figurerna 10 och

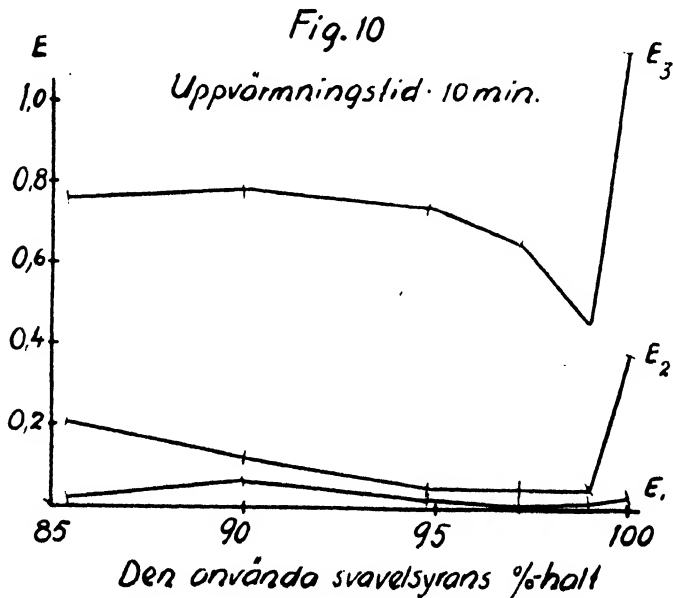
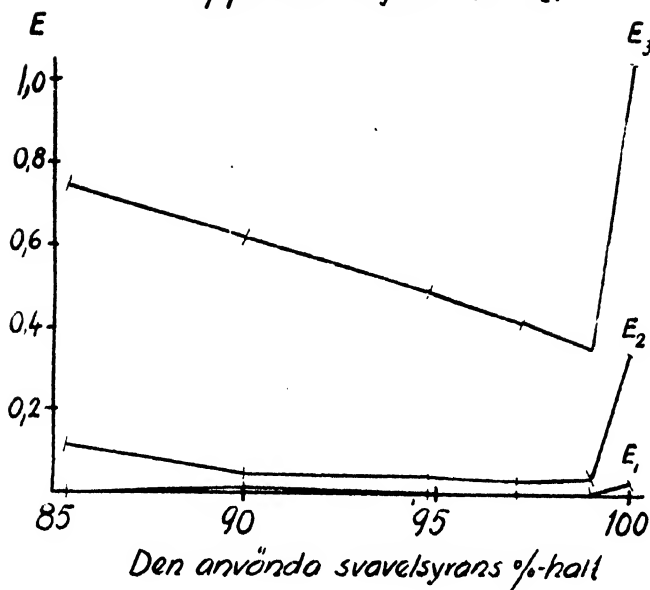


Fig. 11

Uppvärmningstid: 5 min.



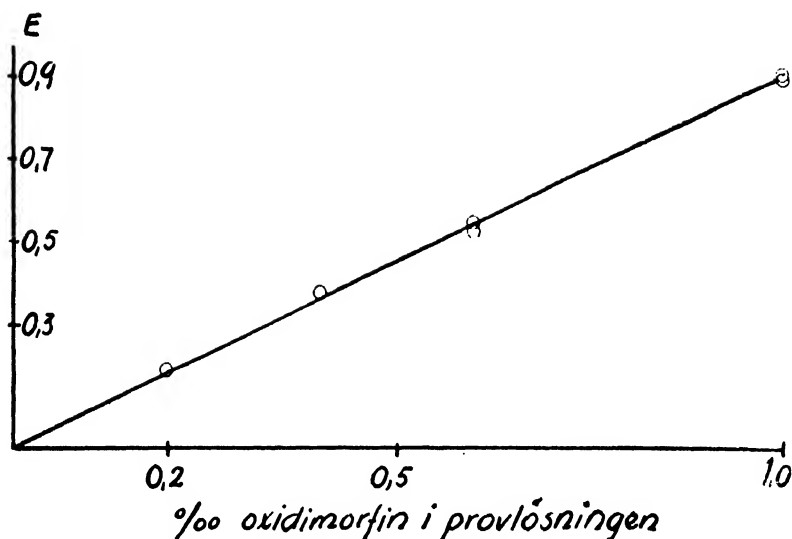
11, där beteckningarna E_1 , E_2 och E_3 ha samma betydelse som i fig. 8. Försöken visa, att liknande förhållanden återkomma som vid 20 minuters uppvärmning. Vidare framgår det, att 95 % svavelsyra i kombination med 20 minuters uppvärmning giver det bästa resultatet.

Innan en slutgiltig metod kunde formuleras var det nödvändigt att undersöka om Lamberts och Beers lagar gälla, d. v. s. att extinktionen är proportionell mot halten oxidimorfin. Vid de försök, som gjordes i detta syfte, var morfinhydrokloridhalten i provlösningen hela tiden 2 % under det att oxidimorfinhalten varierade mellan 0 och 1 %_w. Mätningarna av extinktionen gjordes vid 600 m μ mot ett blindprov innehållande 2 % morfin. Resultaten återfinnas i tabell 6 och fig. 12. Dessa visa, att sambandet är rätlinigt. Linjens lutning har medelst »minsta kvadratmetoden» beräknats till 0,902.

Tabell 6.

0,00 oxidimorfin i provlösningen	Extinktion E
0,2	0,190
0,4	0,372
0,6	0,549
0,6	0,530
1,0	0,894
1,0	0,907

Fig. 12



Reaktionen har också visat sig gynnsam i det avseendet, att färgen håller sig oförändrad åtminstone ett dygn.

Metod.

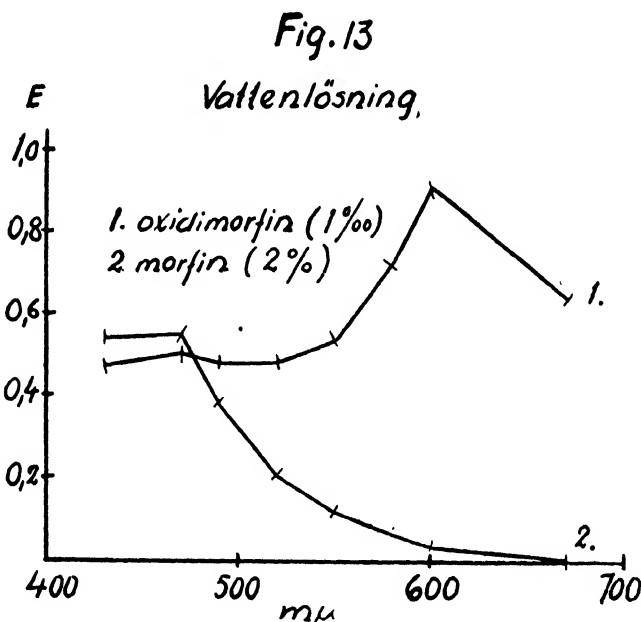
Med stöd av ovan anförda undersökningar kan metoden för bestämning av små mängder oxidimorfin i närvaro av relativt stora mängder morfin formuleras på följande sätt: I ett omsorgsfullt rengjort och torkat provrör uppmätas med mikropipett 0,50 ml av provlösningen. Härtill sätts ur en »Vollpipett» 10,0 ml reagenslösning, som består av 1,0 g vanillin löst i 100 ml 95 % svavelsyra. Reagenstillsatsen sker sakta och under oavbruten skakning och samtidig kylning i vatten. Efter tillsatsen göres blandningen homogen genom omröring med en glasstav. I anslutning härtill beredes på samma sätt ett blindprov, där dock provlösningen utbytes mot 0,50 ml nyberedd morfinlösning av samma koncentration som i provet. De båda provrören nedsänkas i kokande vattenbad under 20,0 minuter. Därefter kylas de under rinnande vatten. Skillnaden i extinktionen mätes vid 600 m μ i kyvetter av lämplig storlek.

Mätningar i närvaro av glycerin och sprit.

Ursprungligen bereddes för injektion avsedda morfinlösningar av enbart vatten och morfinhydroklorid. Omkring år 1943 började man emellertid inom militärfarmacien i Sverige att till lösningen också sätta glycerin och sprit. Avsikten härmed är att förhindra sönderfrysning av förvaringskärlen. Om en sådan lösning fryser, bildas nämligen en kristallgröt, som ej spränger kärlen. Sedermera har denna tillsats även upptagits i Svenska farmakopén

1946. Lösningsmedlet är här glycerin 5 g, sprit 15 g och vatten till 100 ml. Detta Lösningsmedel avses, då i fortsättningen glycerin-sprit-lösning omnämnes. Det var därför av intresse att pröva den av oss utarbetade metodens användbarhet i närvaro av glycerin och sprit. Det visade sig då, att uppvärmningen med vanillin och svavelsyra åstadkom en ganska kraftig brunfärgning. Vi funno, att den orsakades av glycerinet och att färgintensiteten varierade med svavelsyrans styrka.

Vi bestämde först extinktionskurvorna för såväl morfin som oxidimorfin dels i vattenlösning, dels i närvaro av glycerin och sprit. Därvid ha vi arbetat enligt den tidigare beskrivna allmänna metoden. Morfinhydroklorid-lösningens halt var 2 % och oxidimorfinlösningens 1 ‰. I fig. 13 visas kurvornas utseende i vattenlösning och i fig. 14 utseendet i glycerin-sprit-lösning*). Som synes ligger oxidimorfinkurvans maximum vid samma våglängd i båda figurerna.

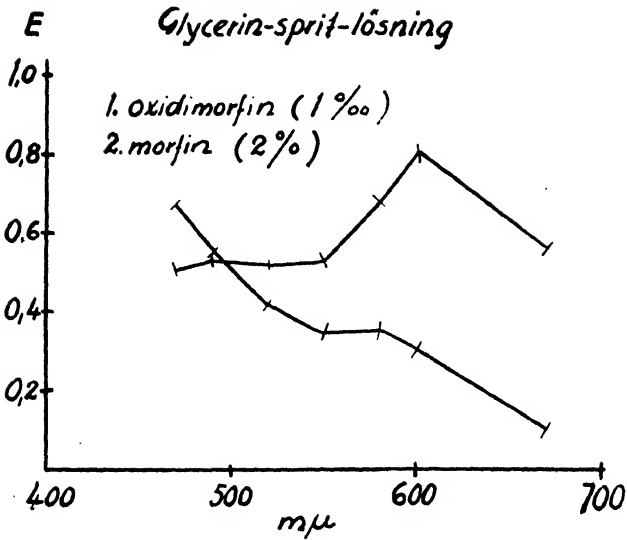


Den vid arbete i ren vattenlösning fastställda vanillinkoncentrationen, 1 vikt/volym-procent, och uppvärmningstiden, 20,0 minuter, kunde med fördel även tillämpas vid arbete med glycerin-sprit-lösningar. Detta visas i figurerna 15 och 16. Kurvorna ha i stort sett samma förlopp som motsvarande kurvor med rent vatten som lösningsmedel, figurerna 6 och 7.

Som tidigare visats hade svavelsyrans koncentration betydelse vid bestämningar i rena vattenlösningar. För att få klarhet i förhållandena i glycerin-sprit-lösningar var det av betydelse att även här utföra liknande försök.

*) Att fig. 5 och 13 ej äro identiska beror på olika försöksbetingelser. I förra fallet var den slutgiltiga metodiken ännu ej utarbetad.

Fig. 14



Enda skillnaden är, att glycerin-sprit-lösning använts i stället för ren vatten-lösning.

I fig. 17 återfinnas försöken vid 20,0 minuters uppvärmning i kokande vattenbad. Differensen mellan E_0 och abscissaxeln, reagensets egenfärg, är

Fig. 15.

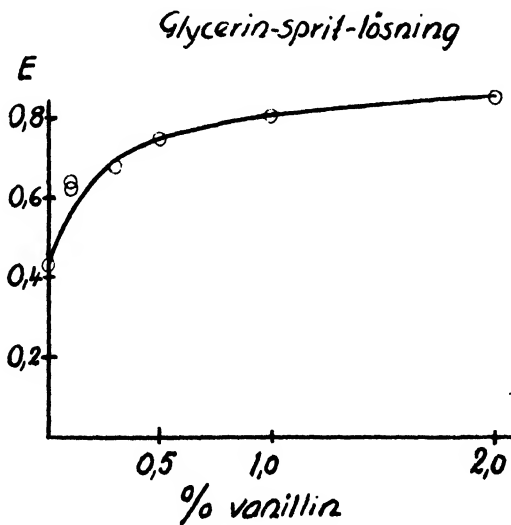
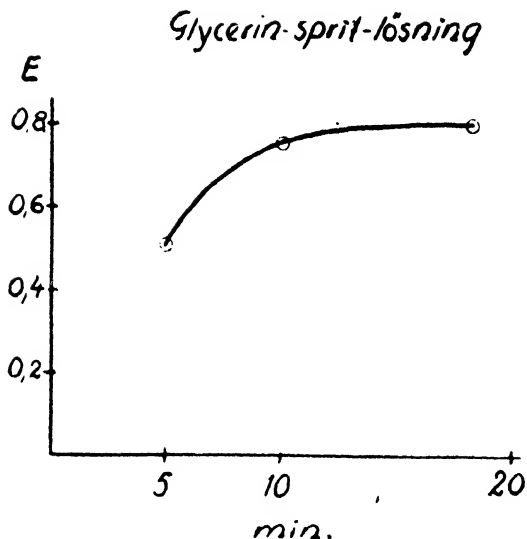


Fig. 16

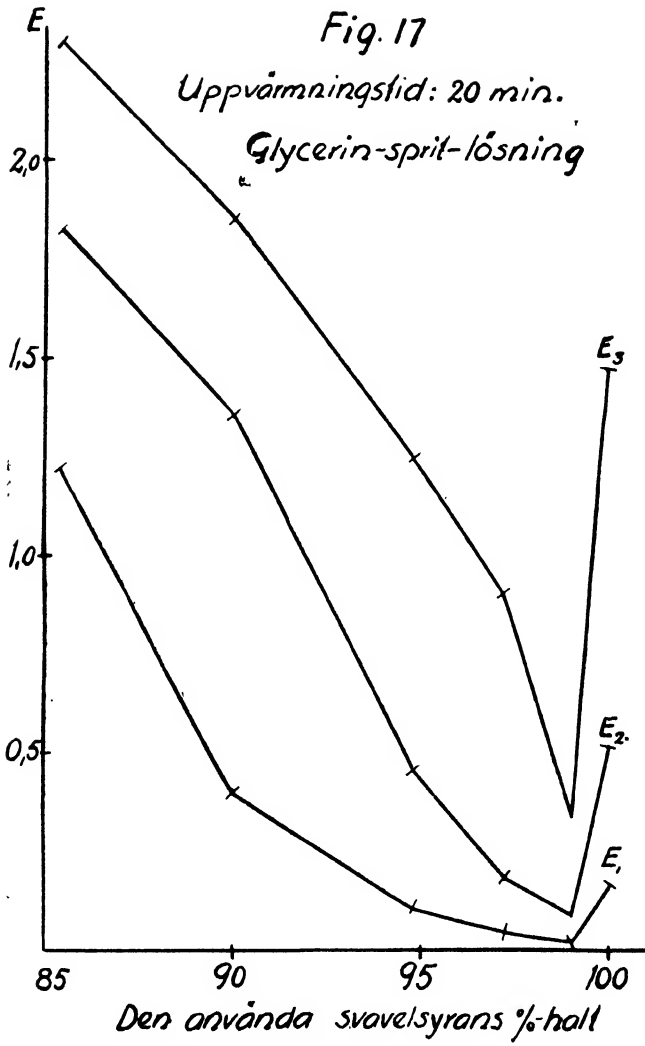


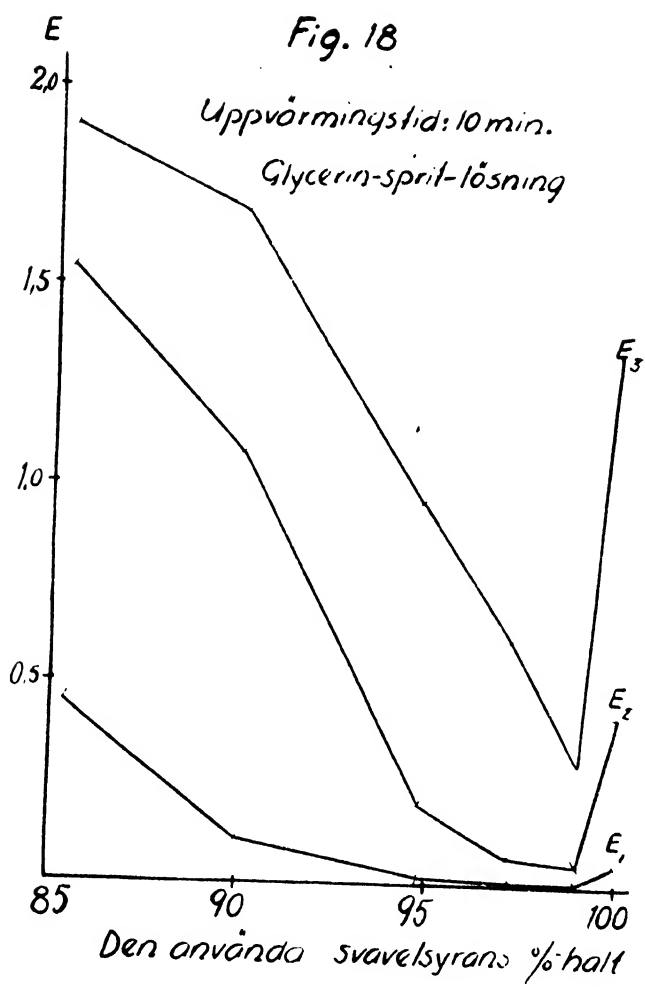
högst betydande. I förhoppning om att få svagare egenfärg arbetade vi med svavelsyrakoncentrationer ned till 85 %. Märkligt nog visade det sig emellertid, att egenfärgen i stället tilltog vid lägre syrakoncentration. Differensen mellan E_2 och E_1 , som betyder morfins extinktion vid 600 m μ , och differensen mellan E_3 och E_2 , oxidimorfins extinktion, är avsevärt mindre beroende av variationer av svavelsyrans styrka. Differensen $E_3 - E_2$ har sitt största värde vid användning av 95 % svavelsyra. Det är också tydligt, att svagare syra ej kan användas på grund av reagensets egenfärg. Mätresultaten vid dessa höga extinktionsvärden äro ej så noggranna.

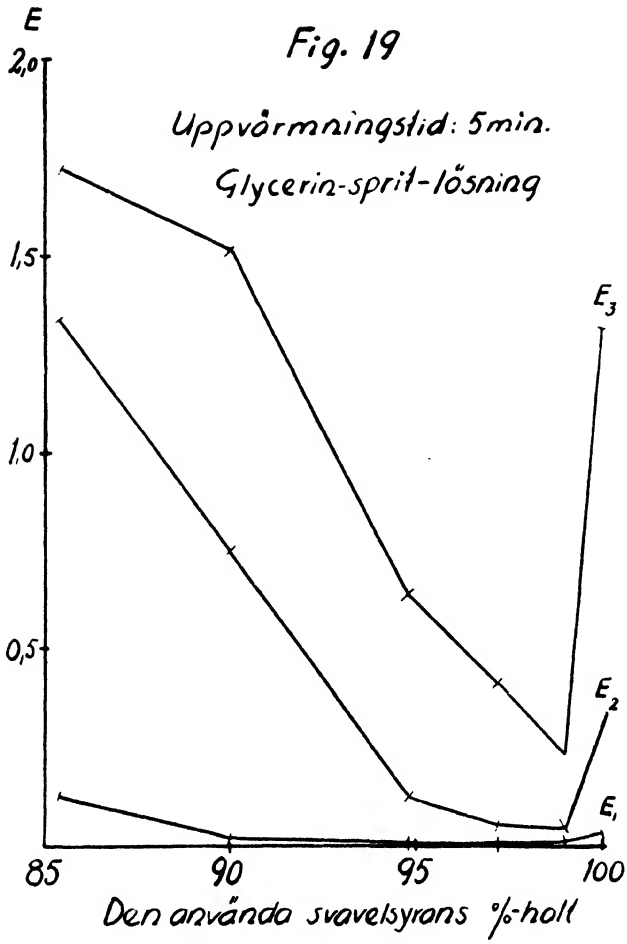
För jämförelses skull ha försök även utförts med 10 och 5 minuters uppvärmning. Resultaten återfinnas i figurerna 18 och 19. Särskilt reagensets egenfärg avtager markant med minskad uppvärmningstid. Någon anledning att frångå den allmänna metoden föreligger dock ej, ty fortfarande är 20,0 minuters uppvärmning och användning av 95 % svavelsyra de lämpligaste försöksbetingelserna.

Påpekas bör dock, att mätning av små mängder oxidimorfin i närvaro av relativt stora mängder morfin ej kan ske med samma noggrannhet i glycerin-sprit-lösning som i vattenlösning. Orsaken härtill är, dels att differensen $E_3 - E_2$ är mindre, dels att E_2 -värdet är större. Det är ej heller otroligt, att olika glycerinkvaliteter kunna giva olika resultat.

Att kurvan, som anger sambandet mellan extinktionen och oxidimorfinkhalten får ett annat förlopp kan man förutsäga av tidigare försök, väsentligt är dock, att sambandet är rätlinigt, vilket försöken i tabell 7 och fig. 20 avse att visa. Kurvan är en rät linje med lutningen 0,811, beräknad medelst »minsta kvadratmetoden».



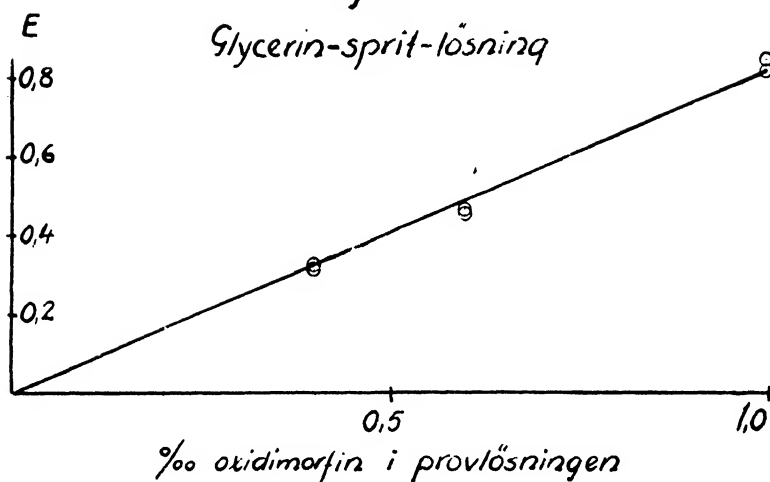




Tabell 7.

‰ oxidimorfin i provlösningen	Extinktion E
0,4	0,325
0,4	0,315
0,6	0,456
0,6	0,463
1,0	0,844
1,0	0,814

Fig. 20



I en kommande uppsats skola ovan vunna erfarenheter tillämpas på de praktiska problem, som vi förelagt oss.

Litteratur:

1. Farm. Revy 45, 49 (1946)
2. Drevon: J. Ph. Chim. 22, 97 (1935)
3. Am. J. Ph. 105, 503 (1933)
4. Arch. d. Pharm. 266, 641 (1928)
5. J. Ph. Chim. (8) 22 (127) 97—106 (1/8 1935)
6. Leulier--Drevon: Bull. Soc. Chim. Biol. 14, 521 (1932)
7. J. Ph. Chim. 27, 255 (1938)
8. J. Ph. Chim. 26, 292 (1937)
9. Breton: Ann. pharm. franc. 3, 72 (1945)
ref. Ph. Abstr. 13, 16 (1947).

SUMMARY

Quantitative Determination of Oxidimorphine in Morphine

by

Nils Thörn and Allan Ågren

We have examined the possibility of a quantitative determination of small amounts of oxidimorphine (pseudomorphine) in the presence of relatively great quantities of morphine, in order to study the stability of morphine-solutions afterwards.

*Dietzel and Huss*¹⁾ have shown, that in the sterilization and storage of morphine-solutions, oxidimorphine is formed. They have investigated this change as brought about by different sterilizing methods in the ultra-violet region of the spectrum. We have however found, that when conditions of sterilization and storage are normal, such small amounts are formed, that this method does not give sufficiently exact values. In Fig. 1, where the molar extinction coefficient (ϵ) has been plotted against the wave-length ($m\mu$), the following extinction curves are shown:

1. Oxidimorphine calculated as Morphine hydrochloride
(= 100 % oxidation)
2. Morphine hydrochloride
3. 12,7 % oxidation
4. 6,5 % oxidation
5. 2,6 % oxidation

Instead we have tried to find out a new colorimetric direct-method and in doing so we have, among other things, investigated the suitability of using some aldehyds as reagents for oxidimorphine. We have found that vanillin dissolved in concentrated sulfuric acid is a good reagent. By heating on the water bath a green color is formed with oxidimorphine and a violet one with morphine. The extinction curves are found in Fig. 13, where »method» described below has been applied. The test solution has been 1 %_w oxidimorphine and 2 % morphine hydrochloride respectively. Maximal extinction has been measured at about 600 $m\mu$, where the subsequent measurements have been made. The apparatus used was a Hilger »Spekker Photoelectric Absorptiometer».

The following factors have been varied: The vanillin-concentration of the reagent (Tab. 3, Fig. 6), the time of heating (Tab. 4, Fig. 7) and the concentration of sulfuric acid (Tab. 5, Fig. 8).

In Fig. 6, which shows the shape of the oxidimorphine-curve, a solution of 1 %_w oxidimorphine and heating-time of 10 min. has been used. This fig. shows, that practically maximal extinction is obtained with 1 % vanillin.

Fig. 7 shows that the extinction of the oxidimorphine is dependent on the heating time. After 20 min. there is only a small increase of the color intensity.

The percentage of the sulfuric acid used has been varied in Fig. 8. The three curves shown have all been obtained by measuring the extinction against pure water. E_1 shows the extinction of the reagent, E_2 the extinction

of morphine-solution + reagent and E_3 the extinction of a solution of oxidimorphine + morphine + reagent. The difference between E_3 and E_2 (plotted in Fig. 9) is thus the extinction of oxidimorphine. This fig. shows that 95 % sulfuric acid is most suitable, and the percentage ought to be fixed within 1 %.

At last it has been shown, that the laws of Lambert and Beer are valid, which appears from Tab. 6 and Fig. 12, where the »method» has been followed in all details. On the absciss-axis the percentage of the test solution as regards oxidimorphine has been plotted in ‰.

»Method.»

In a carefully cleaned and dried test tube 0,50 ml. of the test solution are measured out with a micropipette. 10,0 ml. reagent-solution are added by pipette, the solution consisting of 1,0 g. of vanillin dissolved in 100 ml. 95 % sulfuric acid. The addition of reagent must be made stowly and while shaking without interruption and at the same time cooling in water. After the addition the mixture is made homogeneous by stirring with a glass rod. At the same time and in the same way a check is made, in which however 0,50 ml. of fresh prepared morphine-solution of the same concentration as in the test is used instead of the test solution. The two test tubes are immersed in a boiling water bath for 20 min. They are then cooled in running water. The difference in the extinction is measured at 600 m μ in an absorption cell of convenient magnitude. The color will keep unchanged for at least one day.

In the investigations mentioned above the solvent has been water. In Ph. Svec. Ed. XI however the following solvent is used for »Injectabile morphini hydrochloridi»: Glycerol 5 g., ethyl alcohol (90 vol. %) 15 g. and water to make up 100 ml. The usefulness of the »method» mentioned above has therefore been tried with such solutions. In Fig. 14 the extinction at different wave-lengths is shown, in Fig. 15 the influence of the vanillin-concentration, in Fig. 16 the import of the heatingtime and Fig. 17 shows, how the percentage of the sulfuric acid used influences the extinction (see Fig. 13, 6, 7, 8). All of these figures show, that the conditions given in the »method» are most suitable also when this solvent is used. The high extinction values shown in Fig. 17 especially when using less concentrated sulfuric acid, are caused by the presence of glycerol. It is possible, that different qualities of glycerol give different values. Finally the connection between the oxidimorphine-percentage of the test solution and the extinction is revealed in Fig. 20.

Injectabile sulfuris

Av *Sven Wester*

(Apotekens kontrolllaboratorium, Stockholm)

(Inserted in Coll. Pharm. Suec. IV, 1949)

Parenteral behandling med svavel infördes i början av 1900-talet mot bl. a. tuberkulos och syfilis. Större betydelse fick från omkring 1920 användningen av svavelinjektioner mot vissa reumatiska infektionssjukdomar. Omdömena om denna behandlingsmetod ha emellertid växlat starkt, och enligt uppgift användes den ej längre vid de ledande amerikanska sjukhusen (1). Under det senaste decenniet ha svavelinjektioner huvudsakligen använts i samband med desensibilisering vid allergiska sjukdomar, varvid svavlet, löst eller suspenderat i olja, injiceras djupt intramuskulärt. I allmänhet orsakar injektionen, i varje fall större doser, en kraftig temperaturstegring, leukocytos och vissa andra reaktioner av samma typ, som framkomma vid "ospecifik proteintterapi". Intramuskulära svavelinjektioner orsaka ganska stark, övergående smärta på injektionsstället, av vilken anledning svavelpreparaten ofta äro försatta med ett lokalanestetikum, t. ex. bensokain eller bensylkarbinol.

Dispensatorium Danicum 1938 upptar *Oleum sulfuris pro injectione*, en 1-procentig *uppslamning* av fällt svavel i olivolja. Beredningen framställes aseptiskt och avfyller på sterila kärl, t. ex. injektionsflaskor med gummihätta.

MB 1914 (2) anger ett liknande preparat, *Injectabile sulfuris*, bestående av en 0,5-procentig lösning av fällt svavel i olivolja med följande beredningsföreskrift: Det fällda svavlet utrives noggrant med olivoljan och löses genom försiktig uppvärmning. Lösningen upphettas i slutet kärl i torkskåp vid 140° under 3 timmar. Utlämnas i vidhalsat, med glaspropp slutet kärl eller i ampuller å 1 ml.

Vid den driftskontroll, som vid Apotekens kontrolllaboratorium utföres av å distriktslaboratorierna framställd injektionsmedicin, har *Injectabile sulfuris* undersökts vid ett flertal tillfällen. Därvid har i regel bestämts såväl halten totalsvavel som halten "fritt" svavel.

Den förra bestämningen innebär en förbränning av organisk substans med kaliumklorat och salpetersyra, varvid svavlet oxideras till sulfat, som efter

avlägsnande av salpetersyran utfälles som bariumsulfat och bestämmes gravimetriskt (3). Totalsvavelhalten har icke vid något tillfälle visat anmärkningsvärd avvikelse från deklarerad mängd.

Vid bestämning av fritt svavel överföres detta till rodanid genom kokning med kaliumcyanid-trietanolaminlösning. Efter avkylning bindes överskottet cyanid med formalin, blandningen surgöres med salpetersyra och försättes med 1/10 normalt silverniträt i överskott. Efter filtrering återtitreras överskottet silverniträt (4). Resultaten visa anmärkningsvärda variationer i halten fritt svavel, från 40 till 80 % av totalhalten. Parallellt med låg halt fritt svavel har kunnat iakttagas en påtaglig mörkfärgning av oljan och en mer eller mindre utpräglad, obehaglig lukt. Vid framställning enligt MB, som innefattar 3 timmars upphettning vid 140°, ske uppenbarligen mellan svavel och oljans omättade fettsyror reaktioner, som i huvudsak innebära en addering av svavel till fettsyornas dubbelbindningar. En svavelolja med denna sammansättning är ej önskvärd, eftersom verkan av svavelinjektionerna torde få tillskrivas en omsättning mellan elementärt svavel och vävnadens proteiner.

Den successiva minskningen av halten fritt svavel vid uppvärmning visas av följande försök. 0,500 g fäällt svavel utrevs med litet olivolja. Suspensionen försattes med olja till 100,0 ml. Genom värmning på vattenbad och omskakning löstes svavlet i oljan, som därefter dispenserades i tre glasburkar med propp. Ett prov värmebehandlades ej ytterligare, ett prov upphettades 1 timme vid 140° och ett 3 timmar vid samma temperatur. Efter avsvälning bestämdes halten fritt svavel (se tabellen).

Table 1.

Heating at 140°C for	Free sulphur mg./ml.	Colour of the sulphur oil
0 hours	4,8 5,0	light yellow
1 hour	4,3 4,3	yellow
3 hours	3,4 3,2	yellowish brown

MB tillåter ej, att Injectabile sulfuris expedieras i injektionsflaska, försedd med gummihätta. Någon motivering för detta förbud har iörf. ej kunnat finna. Som jämförelse kan nämnas den i *Pharmacopoea Danica 1948* upptagna *Injectabile sulfuris*, som består av en suspension av 1 % fäällt svavel och 4 % bensokain i olivolja. Beredningen framställes aseptiskt genom utrivning av substanserna med förut steriliserad olivolja. Blandningen omskakas och fördelas på sterila kärl. Därvid tillåtes även "hätteglast". Beredningen må endast förvaras intill 1 år efter framställningen.

På grundval av de funna resultaten föreslås följande *ändrade beredningsföreskrift* för *Injectabile sulfuris*:

Sulfur praecipitatum	0,5 g
Oleum olivae sterilisatum	q. s.
	<hr/>
	100 ml

Det fällda svavlet utrivs omsorgsfullt med den sterila olivoljan och löses genom uppvärmning på vattenbad.

Lösningen avfylls på för utlämnande avsedda kärl utan efterföljande upphettning. Fig. v. 0,92.

Beredningen utföres aseptiskt.

Förordnas Ampullae sulfuris, svaveloljeampuller, skola ampuller med 1 ml *Injectabile sulfuris* utlämnas.

Kommentar: Svavlet måste först suspenderas i en mindre mängd steril olja, eftersom det annars lätt bildar klumpar, vilket försvårar upplösningen. Suspensionen sättes till återstoden av den sterila oljan, och svavlet bringas i lösning genom 15 à 20 minuters uppvärmning på vattenbad under omskakning. Injektionsflaskor med gummihättor kunna användas, vilket f. ö. redan tillämpats av ett antal apotek med sjukhusleveranser. I avvaktan på resultatet av hållbarhetsundersökningar bör beredningen lämpligen ej förvaras längre tid än 1 år. Eftersom beredningen framställs aseptiskt utan efterföljande upphettning, skall den underkastas bakteriologisk prövning.

Litteratur:

1. *Sollman*, A Manual of Pharmacology, 7th Ed., 127 (1948).
2. Samling av Benämningar etc. godkänd av Kungl. Medicinalstyrelsen 1944. Stockholm.
3. Analysmetoder, Häfte IX, 38 (1933).
4. *Allport*, Quart. J. Pharm. VI, 431 (1933).

SUMMARY

Injectabile sulfuris

By *Sven Wcster*

From Apotekens kontrollaboratorium, Stockholm

Injectabile sulfuris (2) is prepared from 0,5 gm. of precipitated sulphur and 100 ml. of olive oil. The sterilization is performed at 140° for three hours. This mode of preparing the injection is shown to be unsuitable as the sulphur to a great extent is added to the double bonds of the unsaturated fatty acids. The colour of the preparation is a function of the time of sterilization at 140° C. The decrease of the free sulphur content in the preparation and the increase in colour is seen in table 1.

It is proposed to prepare the injection by dissolving the sulphur in sterilized olive oil at water bath temperature and to test the preparation for sterility.

DATE OF ISSUE

The book must be returned within 3/7/44 days of its issue. A fine of ONE ANNA per day will be charged if the book is overdue.

--	--	--	--	--

