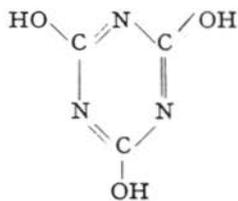


Riassunto. -- Nel quadro di alcune ricerche sul tautomerismo del gruppo N-C-O sono stati studiati gli spettri di assorbimento I R dei composti 2-4-6-trimetossi-triazina e 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimetil-esaidro-triazina. Lo spettro di quest'ultimo non risulta essere stato precedentemente descritto in letteratura. Il confronto delle bande misurate e le attribuzioni proposte confermano la struttura delle due forme tautomere.

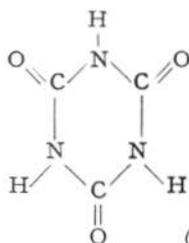
Summary. — Following previous researches on the tautomerism of the N-C-O group, the infrared absorption spectra of 2-4-6-trimethyl-triazine and 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimethyl-hexahydro-triazine have been studied. The spectrum of this latter compound was not yet described in the literature. The comparison between the proposed assignement and the measured bands confirms the structure of the two tautomeric forms.

INTRODUZIONE

Lo studio teorico del tautomerismo dell'acido cianurico impostato in precedenti ricerche (1) richiede la conoscenza dello spettro di assorbimento elettronico attribuibile alle due forme tautomere estreme:



(I)

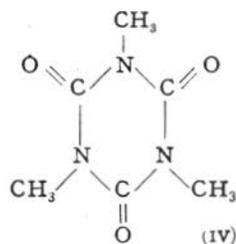
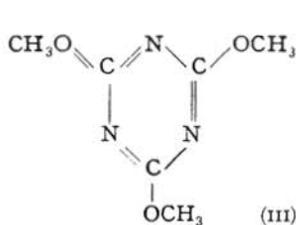


(II)

Il lavoro più recente su questo argomento pubblicato da HIRT e SCHMITT (2), conferma l'esistenza di uno spostamento dell'assorbimento verso le più alte energie quando si passa da una soluzione alcalina ad una acida (3). La discussione dei risultati mette tuttavia in evidenza difficoltà ed incertezze nell'attribuzione dell'assorbimento ai cromofori delle varie forme possibili presenti in soluzione.

Dal nostro punto di vista pensiamo di aver aggirato questa difficoltà nel seguente modo. Una teoria che si limiti a considerare solo gli elettroni π , come quella da noi prevista, non è in grado di apprezzare l'effetto dovuto ad un sostituente che non partecipi al sistema coniugato con un apporto di elettroni in orbitali di simmetria π -simile. Questo è appunto il caso quando gli atomi di idrogeno delle strutture I e II soprascritte vengono sostituiti con gruppi CH_3 . L'effetto del metile sulla posizione dei livelli energetici corrisponde infatti ad una perturbazione del secondo ordine e non è perciò tale da influenzare un calcolo di prima approssimazione come quello previsto. L'entità di esso può venire stimata sulla base del confronto tra lo spettro della trimetiltriazina e quello della triazina fatto in una nota precedente (4), sicchè è lecito presumere di ottenere risultati sperimentali validi per il confronto con quelli teorici. Infatti la scelta dei derivati metilici delle molecole I e II ha anche un'altro vantaggio: viene reso possibile in questo modo lo studio dell'assorbimento dei due cromofori in condizioni rigorosamente paragonabili per quello che riguarda la influenza dei solventi, mentre viene eliminata dal problema in modo definitivo ogni ambiguità ed ogni ipotesi relativa alla struttura chimica delle specie considerate.

Non essendo disponibili in letteratura dati adeguati e sufficienti, abbiamo deciso di preparare la 2-4-6-trimetossi-1-3-5-triazina (III) e lo isomero corrispondente 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimetil-esaidro-triazina (IV).



Poichè, come indicato nella parte sperimentale, la preparazione più conveniente del composto IV è la isomerizzazione termica della trimetossi-triazina (III), si è proceduto alla registrazione degli spettri infrarossi allo scopo di una caratterizzazione sicura dei due prodotti e delle rispettive condizioni di purezza. Questi spettri presentano inoltre un interesse di per se stessi essendo stato descritto fino ad ora (5), in modo sommario, solo lo spettro del composto III mentre quello di IV non risulta pubblicato. Ci è sembrato perciò giustificato dedicare ad essi una nota separata.

GLI SPETTRI INFRAROSSI

Gli spettri infrarossi dei due composti sono stati registrati sulle sostanze cristalline disperse in un disco di bromuro potassico (fig. 1 e 2) ed in soluzione di tetracloruro di carbonio. La regione 2000-630 cm^{-1} è stata esaminata con uno spettrofotometro Perkin Elmer, a doppio rag-

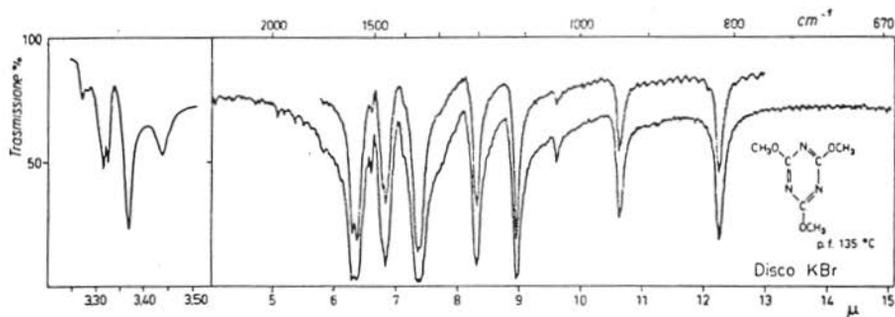


Fig. 1. - Spettro I R della 2-4-6-trimetossi-triazina in disco di KBr.

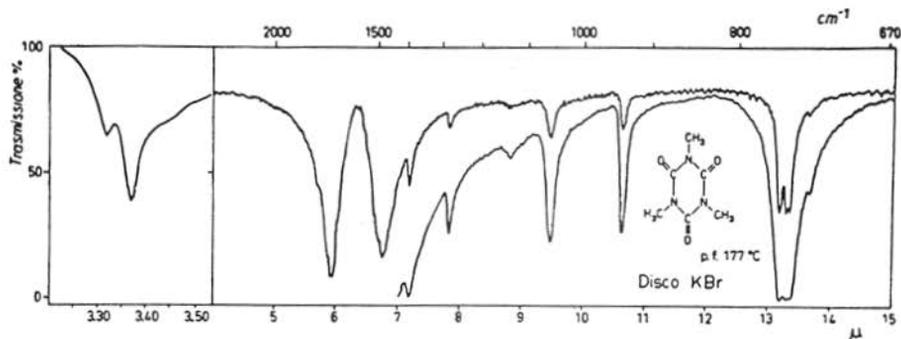


Fig. 2. - Spettro I R della 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimetil-esaidro-triazina in disco di KBr.

gio, Mod. 21, prisma di NaCl, mentre la regione intorno ai 3 μ è stata esaminata con uno strumento della stessa ditta, a singolo raggio e doppio passo, Mod. 112, con prisma di LiF. Le bande misurate sono elencate nella tabella I. Essendo stato osservato (6) che nella registrazione dello spettro dell'acido cianurico in disco di KBr alcune bande sono modificate a causa della complessazione tra la sostanza e l'alogenuro alcalino, abbiamo eseguito gli spettri I. R. anche su pasta di nujol. Poiché le bande rimangono invariate sia come intensità relativa che come posi-

TABELLA I. - Bande di assorbimento misurate (cm^{-1}). f = forte; m = media; d = debole; l = larga; sp = spalla

| 2-4-6-trimetossi-triazina | | 2-4-6-trimetil-1-3-5-trioxo-esaidro-triazina | |
|---------------------------|-------|--|------|
| 3053 | d | 3016 | d |
| 3037 | d | 2972 | f |
| 3008 | m | 1755 | sp.m |
| 2996 | m | 1693 | f |
| 2963 | m | 1677 | f |
| 2903 | d | 1480 | f |
| 1568 | f | 1425 | sp m |
| 1589 | f | 1388 | m |
| 1515 | d | 1278 | d |
| 1462 | f | 1135 | l d |
| 1472 | d | 1056 | m |
| 1400 | sp. d | 940 | m |
| 1359 | f | 758 | f |
| 1203 | f | 752 | f |
| 1117 | f | 749 | f |
| 1040 | d | 733 | d |
| 940 | f | | |
| 814 | f | | |

zione, se ne deduce che gli spettri registrati corrispondono effettivamente all'assorbimento delle sostanze in esame.

Una prima osservazione che risulta dal confronto degli spettri riguarda la purezza del composto IV: nel suo spettro sono del tutto assenti le bande intense a 817, 1117 e 1203 cm^{-1} dell'isomero III da cui esso è stato ottenuto. Le bande del gruppo C=O a 1677 e 1693 cm^{-1} e la assenza di assorbimento nella regione 1600-1500 cm^{-1} confermano inoltre qualitativamente la struttura IV, mentre viceversa la presenza delle bande a 1568 e 1589 cm^{-1} , e l'assenza di bande intense tra 1600 e 1750 cm^{-1} confermano qualitativamente la struttura III.

Date le analogie che il composto IV presenta con quella che è ritenuta essere la struttura dell'acido cianurico solido (^{7, 8}), conviene discuterne lo spettro per primo. Per semplificare la discussione è conveniente considerare il gruppo CH_3 come un'unica massa, facendo perciò astrazione dalle vibrazioni dell'atomo di idrogeno che verranno considerate a parte. La molecola IV viene così ridotta ad un sistema di 12 masse in un piano, di simmetria D_{3h} per la quale sono possibili 30 vibrazioni fondamentali. Fra queste le 3 di classe A_2'' e le 7×2 della classe E' sono attive in assorbimento infrarosso.

Allo scopo di stabilire una attribuzione ragionevole dell'assorbimento osservato sono state costruite le configurazioni dei modi vibrazio-

nali suddetti, riportate nelle fig. 3 e 4. Da esse si vede che le vibrazioni A_2'' fuori del piano sono tutte da attendersi nella regione delle basse frequenze, forse con la sola possibile eccezione delle tre bande

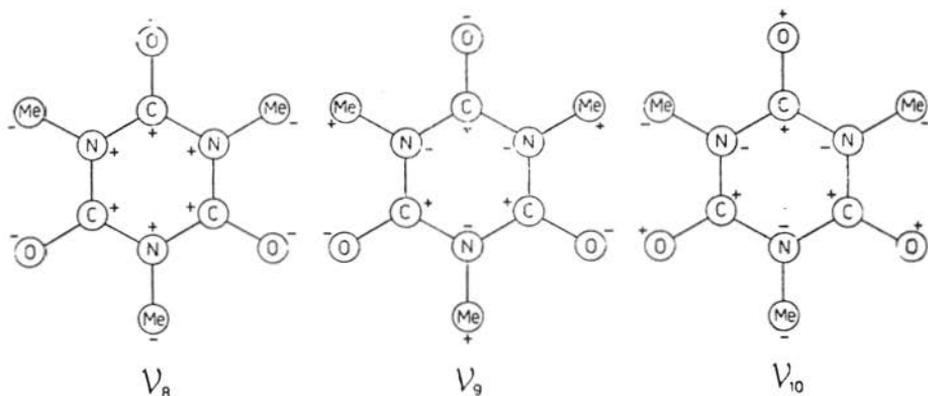


Fig. 3. - Configurazione dei modi vibrazionali A_2'' (D_{3h}).

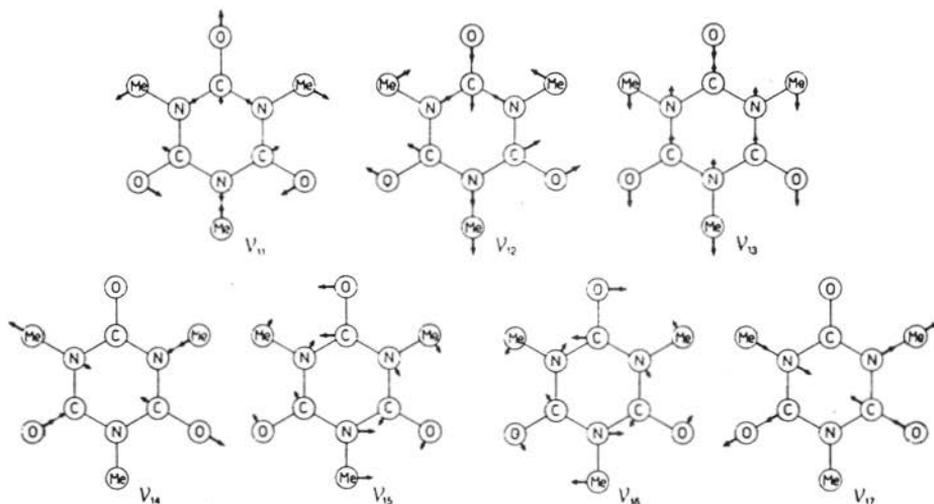


Fig. 4. - Configurazione dei modi vibrazionali E' (D_{3h}).

749 - 752 - 758 cm^{-1} per le quali appare tuttavia preferibile una differente attribuzione. Le 7 vibrazioni degeneri E' nel piano dell'anello possono venir descritte nel modo seguente:

- ν_{11} e ν_{12} { deformazioni dell'anello con vibrazione di valenza del gruppo N-CH₃
 ν_{13} deformazione piana dei gruppi C=O ed N-CH₃
 ν_{14} vibrazione di valenza del gruppo C=O
 ν_{15} vibrazione piana dell'anello
 ν_{16} { vibrazione piana dell'anello con oscillazione piana dei gruppi C=O ed N-CH₃
 ν_{17} deformazione piana dell'anello

Con queste designazioni si possono perciò stabilire le attribuzioni riportate nella tabella II.

TABELLA II. - Attribuzione delle bande della 2-4-6-trimetil-1-3-5-trioxo-esaidro-triazina che non coinvolgono gli atomi di idrogeno.

| Vibrazione | Frequenza (cm ⁻¹) | Attribuzione |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| ν (C=O) | 1693 1677 | ν_{14} |
| ν (N-CH ₃) | 1278 | ν_{11} o ν_{12} |
| ν (C-N) (anello) | 1056 | ν_{15} |
| ν (anello) | 758 752 749 | ν_{17} |

Lo spettro della trimetossi-triazina si presenta notevolmente più ricco di bande intense, cosa da attendersi data la più bassa simmetria della molecola. E' abbastanza agevole tuttavia identificare le vibrazioni tipiche dei legami tra le bande intense osservate, come indicato in tabella III.

TABELLA III. - Identificazione delle vibrazioni tipiche nella 2-4-6-trimetossi-triazina.

| ν (C-N) anello | ν (C-O) | ν (O-CH ₃) | ν (anello) |
|--|-----------------------|----------------------------|----------------------|
| 1589 cm ⁻¹ 1568 cm ⁻¹ | 1203 cm ⁻¹ | 1117 cm ⁻¹ | 814 cm ⁻¹ |

Sono rimaste fuori da questo quadro le bande intense 1480 , 1388 cm^{-1} di IV e 1462 , 1339 cm^{-1} di III, oltre alla banda 940 cm^{-1} comune ai due composti e diversa solo per la intensità, che è sensibilmente maggiore in III. Le due coppie di bande ci sembrano attribuibili senza possibilità di equivoci alla deformazione, asimmetrica e simmetrica rispettivamente, del gruppo CH_3 . La differenza di posizione e di separazione, $(1480 - 1388) = 92$ cm^{-1} in IV e $(1462 - 1339) = 103$ cm^{-1} in III, è facilmente comprensibile se si pensa che il metile è in un caso legato all'azoto e nell'altro all'ossigeno. L'assorbimento del gruppo CH_3 verrà discusso ulteriormente più avanti.

L'attribuzione della 940 cm^{-1} solleva maggiori difficoltà. Un assorbimento nella regione $900-1000$ cm^{-1} è infatti decisamente assente nello spettro IR dei cristalli di acido cianurico (⁷), mentre una debolissima banda intorno a $920-930$ cm^{-1} si osserva sulle soluzioni (⁹) della triazina e della trietil-triazina. La stessa banda è presente con una intensità modesta nella tricloro-triazina (¹⁰) e con intensità abbastanza elevata nella trimetil-triazina (⁹). Infine una banda di media intensità a 910 cm^{-1} è presente nello spettro IR dell'acido idro-ossosico (¹¹) (2-carbossil-4-6-dioxo-esaidro-triazina), che ha ovvie analogie strutturali con il composto IV. Quando si passa dallo infrarosso al Raman la vibrazione 921 cm^{-1} appare con intensità modesta negli spettri della triazina (⁹) e con intensità relativamente più elevata negli spettri dell'acido cianurico (¹²), sia in soluzione acida che in soluzione alcalina. Queste circostanze inducono a pensare che si tratti in tutti i casi di una banda inattiva in infrarosso ma attiva in Raman, la cui comparsa nello IR è legata alla invalidazione delle regole di selezione causata da una riduzione della simmetria molecolare. Nel caso che la simmetria molecolare sia la più elevata possibile (D_{3h}) tale banda può appartenere a due sole classi: A'_1 oppure E'' . Affinchè una banda appartenente a tali classi diventi attiva in infrarosso, la simmetria molecolare deve ridursi ai gruppi indicati nella tabella IV.

TABELLA IV. - Classi dei vari gruppi di simmetria cui possono ridursi le vibrazioni A'_1 ed E'' del gruppo D_{3h} .

| D_{3h} | | D_3 | | C_{3v} | | C_3 | | C_{2v} | | C_2 | |
|----------|----|-------|-------|----------|-------|-------|-------|----------|----|-------|-------|
| A'_1 | p | | | A_1 | p | A | p | A_1 | p | A | p^* |
| E'' | dp | E | p^* | E | p^* | E | p^* | B_1 | dp | B | dp |

p = polarizzata; dp = depolarizzata; p^* = parzialmente polarizzata.

Le cause che provocano una riduzione della simmetria molecolare possono essere diverse: nella fase cristallina ciò può dipendere dalle interazioni con le molecole adiacenti. L'assenza della 921 cm^{-1} nell'acido cianurico solido (^{7, 10}) può prendersi quindi come una indicazione che la molecola conserva nel cristallo una simmetria D_{3h} o almeno D_3 . Quando la molecola viene disciolta, una qualunque interazione col solvente che disturbi la planietà della molecola può rendere attiva nello I R la vibrazione in questione nelle classi C_{3v} o inferiori: questo può spiegare la presenza della 921 cm^{-1} nella triazina, e nella triclora-triazina. Nella trimetil-triazina la rotazione del gruppo CH_3 intorno all'asse del legame C — C ed una contemporanea combinazione con la vibrazione fuori piano del CH_3 appare come la spiegazione più ovvia della intensità della banda intorno a 930 cm^{-1} . Questa osservazione conduce direttamente alla spiegazione della nostra 940 cm^{-1} che diventa una banda permessa quando si consideri la riduzione di simmetria dovuta per lo meno a due effetti: (a) deformazione della molecola nel reticolo cristallino, (b) rotazioni dei gruppi CH_3 . Ed appare ovvio, da questo punto di vista, che la banda compaia con intensità notevolmente più elevata nella trimetossitriazina, per la quale la simmetria più elevata possibile è solo C_3 , rispetto a quella C_{3h} dell'isomero IV.

Quando III e IV vengono disciolte in CCl_4 le deformazioni imposte dalle molecole adiacenti vengono ad annullarsi e la banda 940 cm^{-1} subisce proporzionalmente una riduzione di intensità (fig. 5). Questa interpretazione dei risultati sperimentali non definisce tuttavia la attribuzione della banda in questione. Una decisione obiettiva sarà possibile solo in base ad uno studio della sua polarizzazione nello spettro Raman. Data la presenza della banda in un numero notevole di derivati della triazina (¹³) e l'aumento di intensità che sempre si accompagna ad una riduzione della simmetria (^{13, 14}), l'attribuzione più fondata ci appare quella di un modo proprio dell'anello C_3N_3 (*). Ed ancora, poichè tale banda è presente sia in III che in IV e nell'acido idro-ossosonico, e pertanto non appare dipendente dallo stato della coniugazione π , pensiamo che debba attribuirsi ad un modo nel quale la coniugazione, legata alla planietà dell'anello, è senza influenza; e cioè ad una deformazione di classe E'' fuori del piano dell'anello.

(*) A questo proposito è opportuno rilevare che la banda 930 cm^{-1} è notevolmente più intensa nella 2-metil-4-6-dicloro-triazina che non nella triclora-triazina (¹³). Analogamente una banda $920\text{-}930\text{ cm}^{-1}$, assente nello spettro IR della melamina e di molti suoi derivati sostituiti ai gruppi NH_2 , compare quando la sostituzione interessa più direttamente la simmetria dell'anello, per es. nella 2-fenossi-4-6-diamminotriazina (¹⁴).

Resta da considerare con qualche dettaglio l'assorbimento del gruppo CH_3 nella regione delle vibrazioni di valenza del C-H. Poichè le bande misurate possono attribuirsi solamente alle vibrazioni del C-H metilico, la differente struttura dei due assorbimenti può essere messa in relazio-

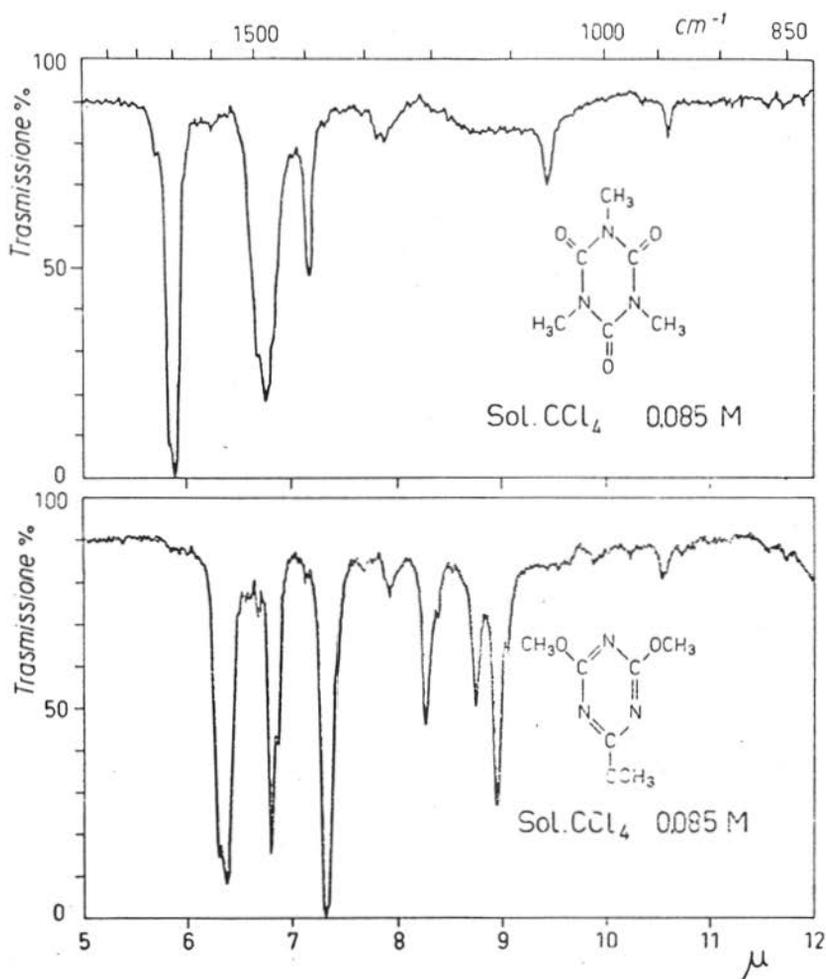


Fig. 5. - Spettri I R della 2-4-6-trimetossi-triazina e della 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimetil-esaidro-triazina in soluzione di CCl_4 .

ne alle differenti condizioni del gruppo CH_3 nei due composti. Nel caso della trimetossi-triazina ci sembra lecito considerare la molteplicità delle bande come dipendente da una notevole libertà del gruppo metile per quanto concerne sia la rotazione intorno al proprio asse C_3 sia l'orientazione rispetto al legame C (anello) — O. Noi interpretiamo in-

fatti le deboli bande satelliti 3053-3037 cm^{-1} da un lato e la 2903 cm^{-1} dall'altro come dipendenti della differente giacitura possibile per il legame $\text{O} - \text{CH}_3$ rispetto all'anello aromatico della triazina. Le altre bande, cioè il massimo a 2963 cm^{-1} ed il doppietto 2996-3008 cm^{-1} sono proprie del metile anche quando per esso non sono possibili tali deformazioni torsionali. Infatti nel caso dello isomero IV le due bande centrali 2972 e 3013 cm^{-1} corrispondono quasi esattamente come separazione (44 cm^{-1}) e come intensità relativa alle 2963 e 3008 cm^{-1} del composto III. Poichè in IV al metile è consentita solamente la rotazione intorno al proprio asse C_3 ed una precessione intorno all'asse di simmetria C_2 della molecola, ci sembra lecito attribuire la larghezza delle bande 2972 e 3016 cm^{-1} ad una struttura rotazionale e torsionale non risolta. Inoltre, poichè abbiamo più sopra suggerito che la apparizione della 940 cm^{-1} nei composti III e IV e della 930 cm^{-1} nella trimetil-triazina (⁹) è legata alla riduzione della simmetria molecolare causata anche dai moti torsionali e rotazionali dei gruppi CH_3 , uno studio della struttura rotazionale della banda suddetta e di quelle della regione 3μ , potrebbe servire ad accertare il fondamento della nostra attribuzione (*).

Una ultima osservazione va ancora fatta a proposito di un recente tentativo (¹⁵) di distinguere le vibrazioni del C-H nei gruppi O-CH_3 ed N-CH_3 . Il confronto delle bande da noi misurate su III e IV con quelle dell'anisolo, fenetolo e veratrolo (¹⁶), da un lato e con quelle osservate per gran parte dei composti che possiedono il gruppo N-CH_3 , dall'altro (¹⁷), conduce a concludere che l'identificazione proposta (¹⁵) è ben lontana dall'essere sufficiente a distinguere le diverse situazioni del gruppo CH_3 sia esso legato ad un atomo di ossigeno oppure ad un atomo di azoto.

PARTE SPERIMENTALE

La 2-4-6 trimetossi-triazina è stata preparata secondo J. DUDLEY e coll. (¹⁸) aggiungendo la 2-4-6-tricloro-triazina ad una soluzione di idrossido di sodio in metanolo. Per ricristallizzazione da acqua sono stati ottenuti cristalli aghiformi con punto di fusione 135°C. Analisi:

| | | | | | | |
|--|--------|--------|-------|-------|---|-------|
| trov. % : | C | 42,12; | H | 5,58; | N | 25,09 |
| per $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ calc. % : | 42,10; | 5,30; | 24,55 | | | |

(*) Può essere utile segnalare a questo proposito che, secondo le nostre osservazioni, la trimetil-triazina ed il composto IV hanno già a temperatura ambiente una tensione di vapore sensibilmente alta.

Per la 2-4-6-trioxo-1-3-5-trimetil-esaidro-triazina è stato seguito, in linea di massima, il metodo descritto da HOFMANN⁽¹⁹⁾ e BILMAN e BJERRUM⁽²⁰⁾ consistente in una isomerizzazione per via termica della 2-4-6-trimetossi-triazina. La ebollizione a ricadere (30 minuti circa) è stata però fatta seguire da una distillazione onde eliminare i prodotti colorati dovuti a parziale decomposizione. Questi si sono formati malgrado il controllo della temperatura tra 270-280°C mediante un bagno di lega metallica. Si sono ottenuti, per ricristallizzazione da acqua, cristalli con punto di fusione 176°C.

Analisi:

trov. %: C 42,53; H 5,73; N 24,99
per C₆H₉N₃O₃ calc. %: 42,10; 5,30; 24,53

Le misure nella regione del 3 μ con prisma LiF sono state eseguite sull'apparecchio Perkin-Elmer Mod 112 dell'Istituto di Chimica Generale dell'Università di Roma, cortesemente messo a nostra disposizione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

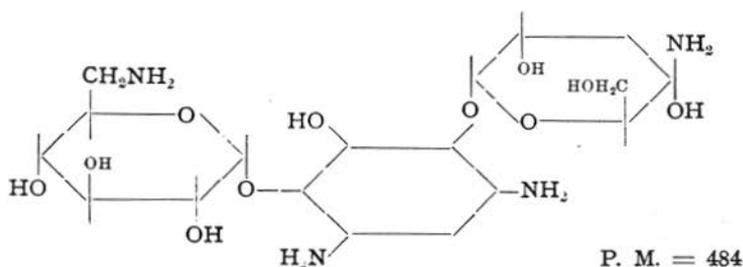
- (¹) PAOLONI L. - Gazz. chim. ital., 84: 729, 735 (1954).
- DEWAR M. J. S. e PAOLONI L. - Trans. Faraday Soc., 53: 261 (1957).
- (²) HIRT R. C. e SCHMITT R. G. - Spectrochim. Acta, 12: 127 (1958).
- (³) AGALIDIS E., FROMHERZ H. e HARTMANN A. - Ber., 71: 1397 (1938).
- KLOTZ I. M. e ASKOUNIS T. - J. am. chem. Soc., 69: 801 (1947).
- (⁴) PAOLONI L. - Gazz. chim. ital., 84: 742 (1954).
- (⁵) FINKELSTEIN A. I. - Optics Spectroscopy, 5: 264 (1958).
- (⁶) PADGETT W. M., TALBERT J. M. e HAMNER W. F. - J. chem. Phys., 26: 939 (1957).
- (⁷) NEWMAN R. e BADGER R. M. - J. am. chem. Soc., 74: 3543 (1952).
- (⁸) WIEBENGA E. H. - J. am. chem. Soc., 74: 6156 (1952).
- (⁹) GOUBEAU J., JAHN E. L., KREUTZBERGER A. e GRUNDMANN C. - J. phys. Chem., 38: 1078 (1934).
- (¹⁰) ROOSENS A. - Bull. Soc. Chim. Belge, 59: 377 (1950).
- (¹¹) BRANDENBERGER H. e BRANDENBERGER R. H. - Helv. chim. Acta, 37: 2207 (1954).
- (¹²) ITO M. - Bull. chem. Soc. Japan, 26: 339 (1953).
- (¹³) REIMSCHUESSEL H. K. e McDEVITT N. T. - J. am. chem. Soc., 82: 3756 (1960).
- (¹⁴) PADGETT W. M. e HAMNER W. F. - J. am. chem. Soc., 80: 803 (1958).
- (¹⁵) DALTON F., HILL R. D. e MEAKINS G. D. - J. chem. Soc., 2927 (1960).
- (¹⁶) HENBEST H. B., MEAKINS G. D. e NICHOLLS B. - J. chem. Soc., 1462 (1957).
- (¹⁷) HILL R. D. e MEAKINS G. D. - J. chem. Soc., 760 (1958).
- (¹⁸) DUDLEY J. R., THURSTON J. T., SCHAEFER F. G., HOLM-HANSEN D., HULL C. J. e ADAMS P. - J. am. chem. Soc., 73: 2986 (1951).
- (¹⁹) HOFMANN A. - Ber., 19: 2063 (1886).
- (²⁰) BILMAN E. e BJERRUM J. - Ber., 30: 503 (1917).

81. F. COTTA-RAMUSINO, R. INTONTI, A. STACCHINI. — Metodo per la determinazione quantitativa e per la separazione della Kanamicina da altri antibiotici.

Riassunto. — E' stato studiato un metodo per la determinazione quantitativa della Kanamicina fondato sulla reazione con ninidrina. Per la separazione della Kanamicina da altri antibiotici che reagiscono con la ninidrina è stato studiato un procedimento basato sulla cromatografia di scambio ionico.

Summary. — A spectrophotometric method has been studied for the quantitative determination of Kanamycin based on the reaction with ninhydrin. For the separation of Kanamycin from other antibiotics that react with ninhydrin, a procedure based on ion exchange chromatography has been studied.

La Kanamicina, nuovo antibiotico isolato da UMEZAWA e coll. ⁽¹⁾ da colture di *Streptomyces kanamyceticus*, è una sostanza basica, usata in terapia come solfato; la sua formula di struttura è:



Il dosaggio della Kanamicina si effettua per via microbiologica ed in letteratura non è descritta una determinazione quantitativa per via chimica (*).

Il procedimento che qui si descrive è fondato sulla reazione con la ninidrina, già adoperata per il riconoscimento della Kanamicina ⁽¹⁾.

La ninidrina è il reattivo più caratteristico dei gruppi amminici e

(*) Nel numero di settembre degli *Annales de l'Institut Pasteur* è stato pubblicato da G. MOUSTARDIER e coll. un metodo colorimetrico per dosare la Kanamicina nei liquidi biologici, fondato sulla reazione con carbazolo. Questo lavoro fu letto quando

dà una colorazione con massimo di assorbimento a 575 m μ ; la reazione avviene a caldo e l'intensità della colorazione dipende dalla temperatura, dalla durata del riscaldamento, dal pH della soluzione e decresce nel tempo.

STEIN e MOORE (2) hanno studiato a fondo la riproducibilità di questa reazione e la sua applicazione alla determinazione quantitativa degli amminoacidi.

La presenza di quattro funzioni amminiche primarie nella molecola della Kanamicina impartisce a questa reazione una elevata sensibilità. Risultati quantitativi e riproducibili sono stati ottenuti in determinate condizioni di lavoro che vanno rigorosamente rispettate.

METODO SPETTROFOTOMETRICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA KANAMICINA.

Reattivi:

a) Tampone citrato (diluito 1 a 1 pH = 5,0): g 21,0 di acido citrico monoidrato si sciolgono in 200 ml di idrossido di sodio N/1 e quindi si porta a 500 ml con acqua.

b) Soluzione di ninidrina; g 0,080 di SnCl₂·2H₂O si sciolgono in 50 ml di tampone citrato; g 2,0 di ninidrina si sciolgono in 50 ml di etere monometilico del glicol etilenico (metil cellosolve). Si mescolano le due soluzioni e si fa passare una corrente di azoto. Il reattivo deve essere conservato in frigorifero.

Per le prove è stato impiegato un campione di solfato di Kanamicina purificato con ripetute cristallizzazioni con metanolo acquoso, fino ad ottenere un contenuto in base del 76,5% (teorico 80,6%).

Il diagramma della fig. 1 mostra che la reazione eseguita come viene qui descritto, segue la legge di Lambert-Beer nell'intervallo di concentrazione fra 25 e 150 μ g di Kanamicina.

Procedimento:

5 ml della soluzione contenente 20 mg/litro del campione da analizzare si versano in un palloncino tarato da 10 ml, si aggiungono con pipetta a rapido svuotamento 4 ml della soluzione di ninidrina (b); nello stesso modo si prepara una prova di riferimento con 5 ml di soluzione contenente 20 mg/litro di Kanamicina base ed una prova in bianco con 5 ml di acqua.

S'immergono i tre palloncini in acqua a 100° C per 23 minuti. Si raffredda sotto un getto d'acqua, si porta a volume e dopo 15 minuti dalla fine del riscaldamento si legge in celle da 1 cm l'assorbimento a 573 m μ della prova di riferimento e di quella in esame, entrambe riferite alla prova in bianco.

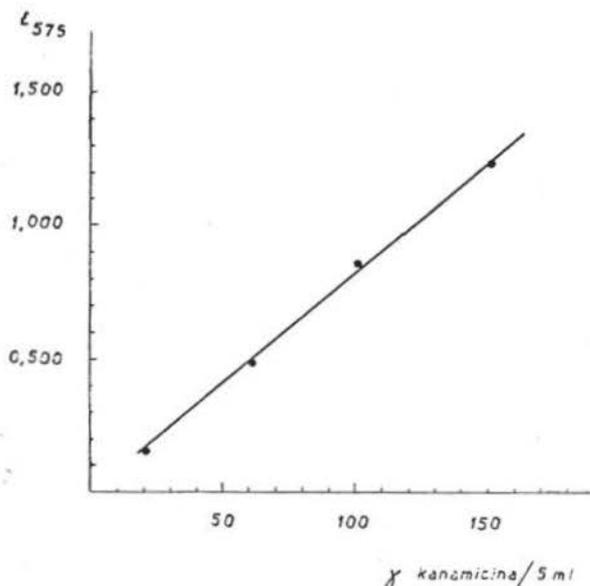


Fig. 1. - Reazione tra ninidrina e Kanamicina: assorbimento in funzione della concentrazione.

La quantità di Kanamicina presente nella soluzione in esame è data dalla formula:

$$\text{mg/litro di Kanamicina base} = \frac{E_x}{E_{\text{rif.}}} \cdot 20$$

dove E_x ed $E_{\text{rif.}}$ rappresentano rispettivamente gli assorbimenti della soluzione in esame e di quella di riferimento.

SEPARAZIONE DELLA KANAMICINA DA BACITRACINA, TIROTRICINA, NEOMICINA, VIOMICINA.

Per applicare il procedimento dianzi descritto quando la Kanamicina è in presenza di altri antibiotici che danno la stessa reazione con la ninidrina, si è studiato il comportamento di queste sostanze nella cromatografia di scambio ionico.

| N. | (Na ⁺) | (OH ⁻) | (Na ⁺) · (OH ⁻) | Volume di eluizione in ml |
|----|-------------------------|-------------------------|---|------------------------------|
| 1 | 1,0 · 10 ⁻¹ | 1,0 · 10 ⁻⁵ | 1,0 · 10 ⁻⁷ | > 500 |
| 2 | 7,6 · 10 ⁻² | 4,5 · 10 ⁻⁵ | 3,4 · 10 ⁻⁷ | > 500 |
| 3 | 3,8 · 10 ⁻² | 1,0 · 10 ⁻¹ | 3,8 · 10 ⁻⁶ | 100 |
| 4 | 4,0 · 10 ⁻² | 1,25 · 10 ⁻¹ | 5,0 · 10 ⁻⁶ | 85 |
| 5 | 9,5 · 10 ⁻² | 6,6 · 10 ⁻¹ | 6,3 · 10 ⁻⁵ | 75 |
| 6 | 1,32 · 10 ⁻² | 7,2 · 10 ⁻¹ | 9,5 · 10 ⁻⁶ | 50 |
| 7 | 1,88 · 10 ⁻² | 8,2 · 10 ⁻¹ | 1,54 · 10 ⁻⁵ | 30 |
| 8 | 2,0 · 10 ⁻¹ | 8,0 · 10 ⁻⁵ | 1,60 · 10 ⁻⁵ | 25 |
| 9 | 1,0 · 10 ⁻¹ | 1,0 · 10 ⁻¹ | 1,0 · 10 ⁻² | 5 |

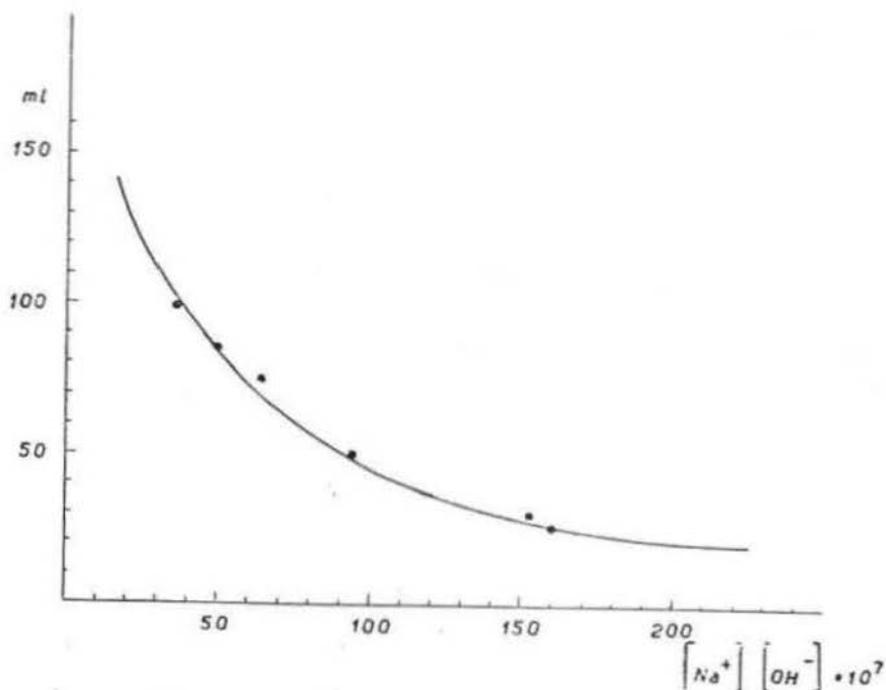


Fig. 2. - Volume di eluente in funzione del prodotto delle concentrazioni (Na⁺) ed (OH⁻).

Sono stati sperimentati diversi tipi di resine, colonne di varie dimensioni e tamponi per l'eluizione con gradienti di 0,05 pH; si è cercato di ottenere una buona separazione cromatografica con una velocità di flusso tra 30 e 40 ml/ora.

Le condizioni di lavoro in seguito descritte hanno dato risultati soddisfacenti con un recupero del 98,0% di Kanamicina purchè si adoperino quantità di antibiotico comprese tra 1 e 2 mg.

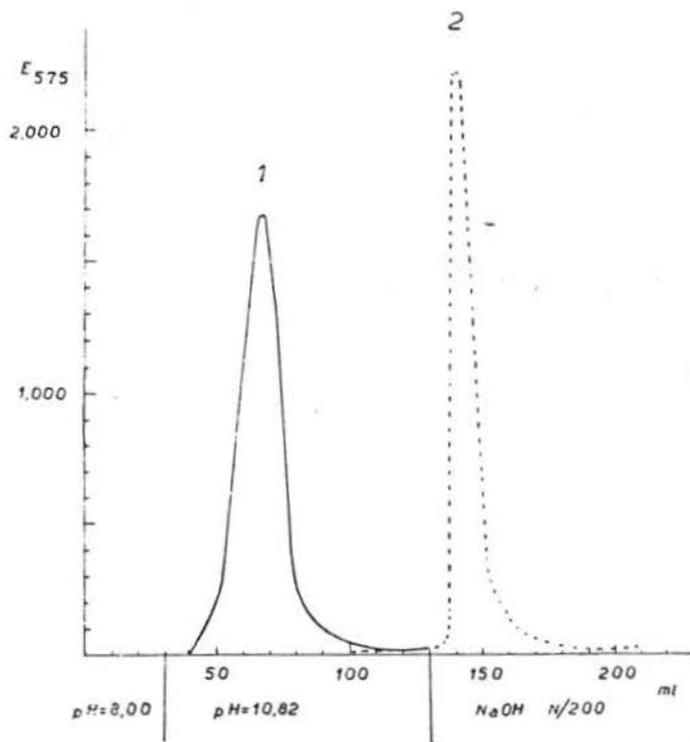


Fig. 3. - Curve di eluizione della Kanamicina (1) e della Neomicina (2).

La Bacitracina e la Tirotricina vengono eluite con un volume di tampone fosfato pH 8 (tabella I N. 4) inferiore a 30 ml; la Neomicina e la Viomicina non vengono eluite da 100 ml di tampone carbonato sodico a pH 10,82; la eluizione della Neomicina può essere convenientemente eseguita con NaOH N/200. Il carbonato sodico a pH 10,82 (tabella I N. 5) consente di eluire la Kanamicina in un volume di 75 ml e nel contempo è sufficientemente selettivo.

Nel corso di queste prove si è visto che il volume di tampone neces-

sario a spostare quantitativamente la Kanamicina dalla colonna di resina è funzione inversa del prodotto delle concentrazioni degli ioni OH^- ed Na^+ ; in prima approssimazione si può assumere che nel ristretto campo esaminato, gli effetti eluenti dello ione Na^+ e dello ione OH^- siano equivalenti. Il grafico della fig. 2 — ricavato dalla tabella I — mette in evi-

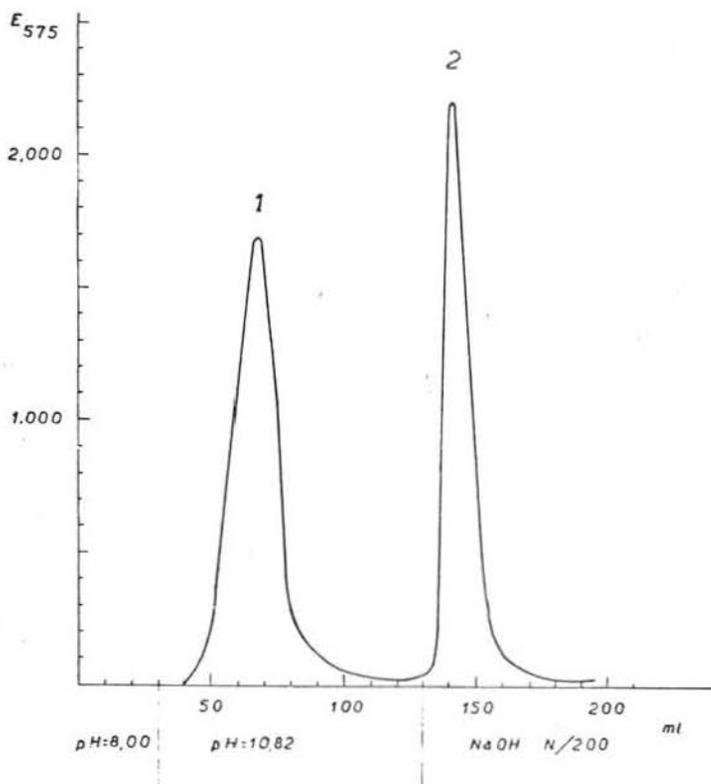


Fig. 4. - Curve di eluizione di una miscela di Kanamicina (1) e di Neomicina (2).

denza la variazione del volume di eluente necessario per eluire 1-2 mg di Kanamicina in funzione del prodotto delle concentrazioni (Na^+) ed (OH^-) espressi in grammo-ione per litro.

Nella fig. 3 sono riportate le curve di eluizione della Kanamicina solfato, con tampone a pH 10,82 e della Neomicina solfato con soluzione N/200 di NaOH; sulle ascisse sono riportati i ml di eluente e sulle ordinate le quantità di Kanamicina e Neomicina determinate con la reazione con ninidrina. Nella fig. 4 sono riportate le curve di eluizione di una miscela dei due antibiotici (mg 1 di Kanamicina e mg 1 di Neomicina).

E' indispensabile, preparata la colonna di resina, determinare l'andamento della curva di eluizione, cromatografando una soluzione standard contenente 1 mg di Kanamicina. Questa prova, descritta in seguito, è chiamata « standardizzazione della colonna ».

In definitiva il procedimento che si propone per separare la Kanamicina dalla Bacitracina, Tirotricina, Neomicina, Viomicina e poi dosarla consta delle seguenti operazioni:

- 1) Preparazione della colonna di resina;
- 2) Standardizzazione della colonna;
- 3) Analisi del campione in esame che comprende la separazione cromatografica, la reazione alla ninidrina eseguita sugli eluati e contemporaneamente su una soluzione di riferimento a concentrazione nota di Kanamicina e su una prova in bianco.

Preparazione della colonna di resina:

Si usa la resina cationica Dowex 50W - X8 - 200/400 mesh in forma sodica. Prima dell'uso la resina deve essere sottoposta ad un trattamento preliminare con HCl 4/N su filtro a setto poroso; si lava poi con acqua, indi con NaOH 2/N fino a reazione alcalina; si raccoglie la resina, si sospende in NaOH N/1 e si riscalda a bagno maria bollente per un'ora agitando periodicamente; si decanta la soluzione di NaOH e si ripete questo trattamento per 3 volte; si filtra, si lava con acqua e si prepara una colonna alta cm 6, con diametro di cm 1,1. Non conviene superare tale altezza per evitare la formazione di code; d'altra parte colonne più basse non assicurano la separazione delle altre sostanze.

La colonna viene lavata con flusso di acqua in controcorrente per eliminare l'aria, quindi sottoposta ad un lavaggio con HCl N/1 fino a reazione acida, seguito da un lavaggio con NaOH N/1 fino a reazione alcalina, ripetuti 3-4 volte per eliminare eventuali impurezze e raggiungere l'assestamento definitivo che assicura la riproducibilità del funzionamento della colonna; si completa con un lavaggio finale con acqua fino a reazione neutra.

Standardizzazione della colonna:

Occorrono i seguenti reattivi:

a) tampone fosfato (pH = 8,0) : ml 1 di acido fosforico M/1 si diluisce a 500 ml con fosfato bisodico M/20;

b) tampone carbonato (pH = 10,82) : g 0,500 di carbonato sodico anidro si sciolgono in 1000 ml di H₂O;

c) acido acetico 0,13 M : 7,5 ml di acido acetico glaciale si diluiscono a 1000 ml.

Si prepara una soluzione in acqua contenente mg 1,30/ml di solfato di Kanamicina (corrispondente ad 1 mg di base); ml 1 di questa soluzione si porta su colonna lavando successivamente con 3 frazioni da 10 ml di tampone fosfato (a).

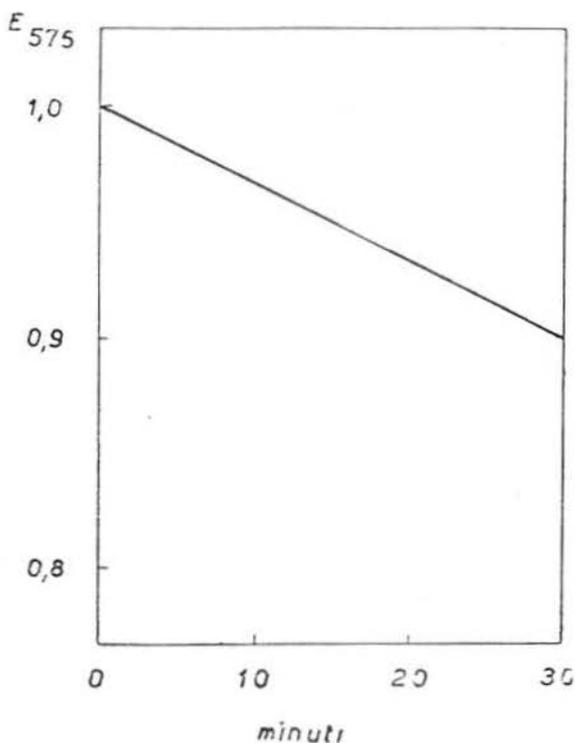


Fig. 3. - Variazione della intensità della colorazione della Kanamicina con ninidrina.

Si procede quindi alla eluizione con tampone carbonato (b) raccogliendo 20 frazioni da 5 ml ciascuna, in palloncini tarati da 10 ml. L'eluizione deve essere continua e la sua velocità compresa fra 30 e 40 ml/ora: interruzioni o variazioni di velocità modificano sensibilmente l'andamento della curva di eluizione.

Ciascuna frazione si neutralizza con 0,5 ml di acido acetico diluito (c) e quindi si aggiungono 4 ml di soluzione di ninidrina.

Contemporaneamente si prepara la prova in bianco, anche in palloncino da 10 ml, con 5 ml di tampone carbonato, 0,5 ml di acido ace-

tico, 4 ml di soluzione di ninidrina; si prepara inoltre, sempre in palloncino da 10 ml, una prova di riferimento con 5 ml della stessa soluzione di Kanamicina, diluita però 1 a 50 con tampone carbonato, 0,5 ml di acido acetico e 4 ml di soluzione di ninidrina. Si agita e s'immergono i 22 palloncini (20 contenenti gli eluati, uno la prova in bianco ed uno la prova di riferimento) in acqua riscaldata a 100° C per 25 minuti; si raffreddano sotto un getto di acqua e si porta a volume; si legge allo spettrofotometro l'assorbimento a 575 m μ rispetto alla prova in bianco.

L'intensità della colorazione decresce con il tempo (fig. 5) e le misure dovrebbero essere fatte esattamente dopo 15 minuti dalla fine del riscaldamento; in pratica è sufficiente che siano fatte fra 10 e 20 minuti dalla fine del riscaldamento; si ha così disponibile il tempo necessario per eseguire le 21 letture.

Il rendimento della colonna, cioè la percentuale di Kanamicina eluita è data da:

$$\frac{\text{somma assorbimento degli eluati}}{\text{assorbimento prova di riferimento} \cdot 10} \cdot 100 = \% \text{ Kanamicina eluita}$$

Con tale tecnica si deve recuperare non meno del 98,0% di Kanamicina presente.

Analisi del campione:

La soluzione del campione da analizzare deve contenere da 1 a 2 mg/ml di Kanamicina; deve essere neutra ed il suo contenuto salino non deve essere superiore a 0,1 moli/litro.

La colonna dopo la prova di standardizzazione, deve essere rigenerata mediante successivi lavaggi con 50 ml di ciascuna delle seguenti soluzioni, eseguiti nell'ordine qui indicato: NaOH N/4; H₂O; HCl N/4; H₂O; NaOH N/4; H₂O.

Nella colonna così rigenerata si versa 1 ml della soluzione in esame; si inizia quindi la eluizione prima con tampone fosfato e poi con carbonato, esattamente come è descritto nella voce « Standardizzazione della colonna »; si esegue poi la reazione con ninidrina sulle 20 frazioni di eluato, sulla prova in bianco e su una prova di riferimento preparata con 5 ml di soluzione standard contenente 20 μ g/ml di Kanamicina base.

Si traccia quindi la curva di eluizione riportando sulle ascisse i ml di eluato e sulle ordinate i corrispondenti assorbimenti; tale curva viene confrontata con quella ottenuta nella standardizzazione della colonna.

La eventuale presenza di sostanze estranee non completamente separate con la cromatografia, viene messa in evidenza da irregolarità nella forma della curva.

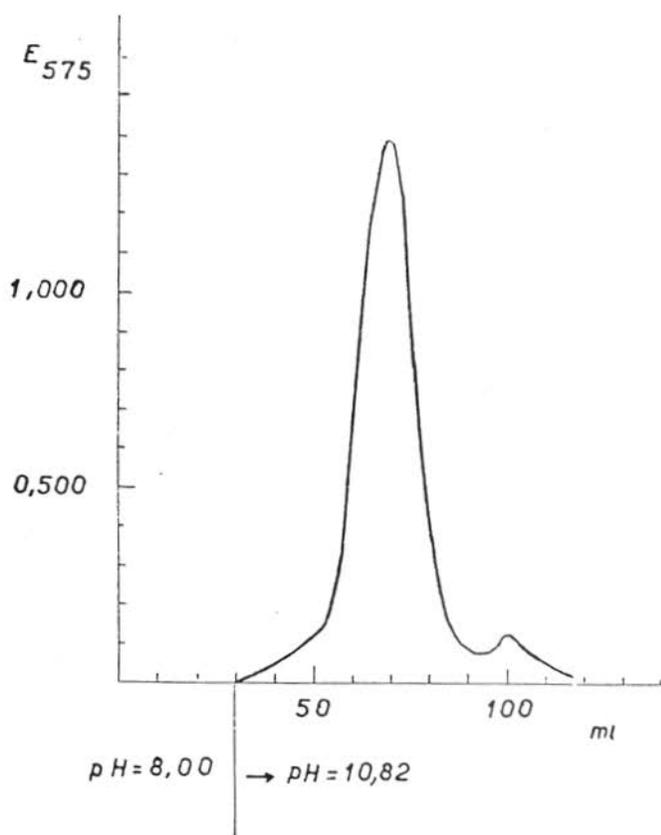


Fig. 6. - Curva di eluizione di solfato di Kanamicina commerciale.

La quantità di Kanamicina base presente nella soluzione in esame si ottiene applicando la formula:

$$\text{mg/ml Kanamicina} = \frac{\text{somma assorbimento degli eluati}}{\text{assorbimento prova di riferimento} \cdot 10}$$

Nella fig. 6 è riportata la curva di eluizione di un campione di solfato di Kanamicina commerciale; in essa si nota la presenza di un secondo massimo di piccola entità.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) UMEZAWA H., UEDA M., MAEDA K., YAGASHITA K., KONDO S., OKAMI Y., UTAHARA R., OSATO Y., NITTA K., TACHEUCHI T. - *J. Antib. Ser. A*, 40: 181 (1957).
 (²) MOORE S., STEIN W. H. - *J. biol. Chem.*, 176: 367 (1948).

82. G. LA PAROLA e Carla JACOBELLI TURI. — La 6-benzoil-metilsulfossitriazina dal monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico.

Riassunto. — Contrariamente alle indicazioni rilevate in letteratura viene dimostrato che è possibile ottenere, con ottima resa, il monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico, la cui formula viene dimostrata:

a) ciclizzando il prodotto per avere la 6-benzoil-metil-sulfossitriazina, che trattata con ipobromito sodico sostituisce dapprima il gruppo solfidrilico con il gruppo ossidrilico, per trasformarsi successivamente nel composto dibromurato dell'ammide dell'acido β -benzoil propionico. Quest'ultima se ridotta con zinco ed acido acetico dà, dopo idrolisi acida, l'acido β -benzoil propionico, mentre con zinco, secondo Clemmensen, dà l'acido γ -fenil butirrico:

b) mettendo in rilievo che nella 6-benzoil-metil-sulfossitriazina è ancora libero e reattivo un gruppo chetonico. A tal fine essa è stata fatta reagire con tiosemicarbazide per ottenere il tiosemicarbazone corrispondente, già noto in letteratura.

Summary. — In contradiction to statements in the literature it has proved possible to obtain benzoyl pyruvic acid monothio semicarbazone in good yield. Its structure was demonstrated as follows.

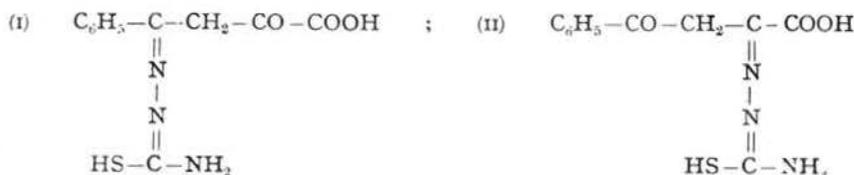
a) Cyclization gave 6-benzoyl-methyl-sulphoxytriazine which on treatment with sodium hypobromite was first substituted with hydroxyl in place of the sulphhydryl group. Successive reactions of the product gave a brominated β -benzoyl propionamide. This on reduction with zinc and acetic acid followed by acid hydrolysis gave β -benzoyl propionic acid, whereas a Clemmensen reaction with zinc gave γ -phenyl-butyric acid.

b) It was shown that the ketonic group was still free and reactive in 6-benzoyl-methyl-sulphoxytriazine. For this, treatment with thiosemicarbazide gave the thiosemicarbazone corresponding to that described in the literature.

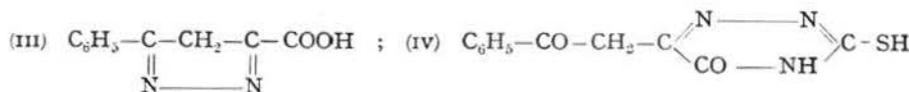
Nel corso di alcune ricerche si è rilevato che in letteratura non è stato descritto il monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico, nè in genere sono indicati quelli degli acidi α , γ chetonici. Anzi in una memoria di CATTELAIX (1) sulla preparazione del tiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico e sul prodotto che ne deriva per ciclizzazione, l'A. ritiene che non sia possibile ottenere il monotiosemicarbazone predetto.

L'apparente anomalia rilevata dalla letteratura secondo cui l'acido benzoil piruvico pur avendo due gruppi chetonici, non poteva dare il monotiosemicarbazone, mentre dà il ditiosemicarbazone, ci ha indotto ad esaminare le cause che potevano contrastare tale preparazione.

Le ricerche sistematiche intraprese ci hanno dato il risultato sperato, in quanto si è potuto precisare che il prodotto in oggetto si può ottenere facilmente, con ottima resa, purchè si operi a pH 5. Il prodotto ottenuto è di colore giallo chiaro, fonde a 138° con decomposizione e potrebbe avere una delle seguenti formule di struttura, a seconda del gruppo chetonico che reagisce:



Per confermare quali dei due prodotti si era ottenuto si è ricorsi alla ciclizzazione, ricordando che i tiosemicarbazoni ciclizzano più facilmente dei semicarbazoni, come hanno dimostrato vari Autori (2). E' evidente che a seconda della posizione del gruppo chetonico cui è legato il radicale tiosemicarbazinico si sarebbe potuto ottenere uno dei seguenti prodotti:

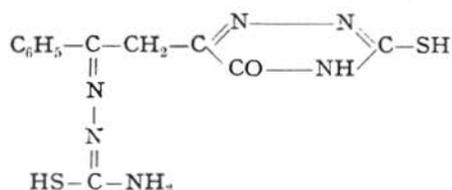


La ciclizzazione è stata eseguita riscaldando a circa 60° il monotiosemicarbazone in soluzione alcolica neutra o acquosa leggermente acida

per acido acetico. In tali condizioni si ottiene una sostanza bianco giallognola che, purificata più volte, fonde a 240° con decomposizione ed alla quale in base ai risultati della analisi si poteva attribuire la formula (IV). Per confermare tale formula si è seguito il procedimento adottato da BOUGAULT (3) per dimostrare la formula dei derivati delle sulfositriazine ottenute da vari acidi α chetonici. A tal fine il prodotto (IV) è stato trattato con ipobromito che agisce sostituendo il gruppo —SH in posizione 3 con il gruppo —OH e, in un tempo successivo, spezzando l'anello triazinico in posizione 2, 4 con produzione di azoto e formazione del composto dibromurato dell'ammide dell'acido β benzoil propionico, che per riduzione con zinco ed acido acetico diluito dà l'acido β benzoil propionico, mentre per riduzione con amalgama di zinco secondo Clemmensen si forma l'acido γ fenil butirrico, p. f: 48°.

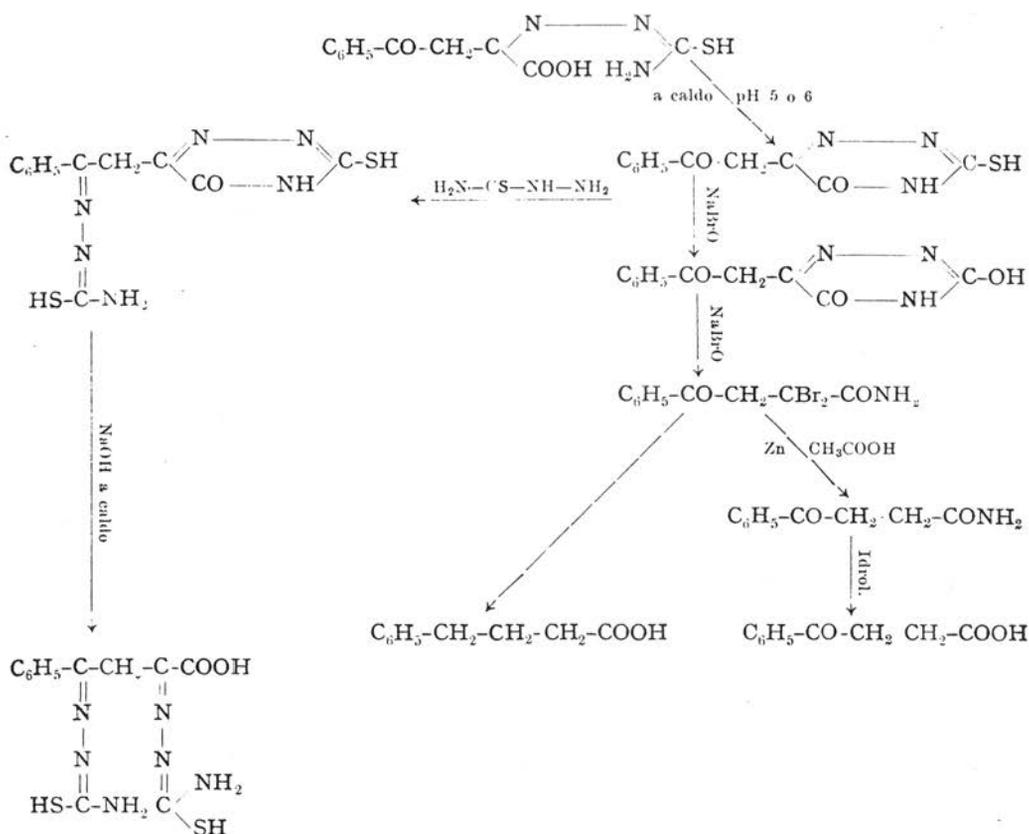
Non si è ritenuto di isolare la diossitriazina ed il composto dibromurato dell'ammide dell'acido β benzoil propionico, che si formano nelle fasi di trasformazione della 6-benzoil-metil-sulfositriazina in acido β benzoil propionico, perchè la loro formazione è certa, essendo noto il meccanismo di reazione dell'ipobromito sulle sulfositriazine.

Pur essendo superfluo, si è ritenuto opportuno dimostrare che nella benzoil-metil-sulfositriazina ottenuta (IV) è ancora libero e reattivo un gruppo chetonico, facendolo reagire con tiosemicarbazide nelle condizioni adottate dal Cattelain. Si è ottenuto così il tiosemicarbazone della benzoil-metil-sulfositriazina, p.f. 252°.



già preparata dal Cattelain riscaldando il ditiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico in ambiente alcalino.

Le reazioni sopra dette possono essere compendiate nello schema seguente:



Ci sembra dunque di aver dimostrato che, contrariamente alle indicazioni rilevate in letteratura, è possibile preparare il monotiosemi-carbazono dell'acido benzoil piruvico con ottima resa e che da esso si possa ottenere per ciclizzazione la 6-benzoil-metil-sulfossitriazina.

PARTE SPERIMENTALE

Acido benzoil piruvico. — L'acido benzoil piruvico è stato preparato per condensazione di quantità equimolecolari di ossalato dietilico e di acetofenone, in presenza di etilato sodico, secondo le indicazioni di BRÖMME e CLAISEN (4) con un rendimento di circa il 90%, poichè contemporaneamente si formano come prodotti secondari l'etere benzoil piruvico e l'ossalil diacetofenone.

Si è avuta cura di purificare il prodotto perchè tali composti secon-

dari, contenendo gruppi chetonici, avrebbero reagito facilmente con la tiosemicarbazide, dando prodotti diversi da quello desiderato. A tal fine, l'acido benzoil piruvico è stato purificato disciogliendolo nella soluzione acquosa di un acetato alcalino in cui tali prodotti secondari sono insolubili e riprecipitandolo con acido cloridrico in eccesso. Il prodotto dopo separazione ed essiccazione all'aria è stato lavato con cloroformio bollente, ripetendo la purificazione fino a p.f. 156°. L'acido benzoil piruvico è stato quindi cristallizzato da alcole-acqua o da acido acetico-acqua.

Monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico. — g 4 di acido benzoil piruvico vengono disciolti a freddo in 25-30 cm³ di NaOH N. Ottenuta la soluzione si aggiungono g 1,8 di tiosemicarbazide, disciolta a caldo in 20 cm³ di acqua, aggiunti di 2 cm³ di acido acetico glaciale. Si controlla il pH della miscela e, se è necessario, si aggiusta a 5 per ulteriore aggiunta di acido acetico.

In queste condizioni se l'acido benzoil piruvico contiene ancora come impurezza l'ossalil diacetofenone, si nota la formazione di un precipitato che conviene eliminare per filtro.

In ogni caso si lascia la miscela a temperatura ambiente per 24 ore, poi si filtra e il filtrato viene addizionato di 10-15 cm³ di HCl al 25%, per precipitare il monotiosemicarbazone formatosi. Conviene aggiungere l'acido cloridrico lentamente, agitando la soluzione, altrimenti facilmente si formano prodotti resinosi che rendono difficile la purificazione e la successiva cristallizzazione del prodotto. Il precipitato viene filtrato, lavato con acqua e cristallizzato da alcole-acqua (2:1). Si ottiene un prodotto giallo chiaro che inizia a fondere parzialmente a 158°, poi solidifica rapidamente per fondere con decomposizione a 200°.

| | | | | | | | | | |
|---|---------|---|--------|---|-------|---|--------|---|-------|
| | Trov. % | C | 49,93; | H | 4,14; | S | 11,98; | N | 15,94 |
| per C ₁₁ H ₁₁ O ₃ N ₃ S | Calc. % | | 49,81; | | 4,18; | | 12,09; | | 15,84 |

Si è potuto constatare in varie preparazioni che la formazione del monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico dipende esclusivamente dal pH della soluzione, anche se si aumenta la quantità di tiosemicarbazide rispetto a quella dell'acido benzoil piruvico purchè si operi a pH = 5 per acido acetico; invece, operando in ambiente neutro o alcalino si è ottenuto il ditiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico identico a quello che è stato descritto da CATTELAÏN (1).

Trasformazione del monotiosemicarbazone dell'acido benzoil piruvico in 6-benzoil-metil-sulfossitriazina (IV). — g 1 del monotiosemicarbazone predetto sono stati riscaldati a ricadere in soluzione alcolica. Dopo 3 ore

si può già constatare la formazione della 6-benzoil-metil-sulfossitriazina, dopo 12 ore la trasformazione si può considerare completa. Da g 1 di tiosemicarbazone si sono ottenuti g 0,88 della benzoil-metil-sulfossitriazina. (Teorico 0,91).

Allo stesso risultato si perviene operando in ambiente acido e cioè riscaldando per otto ore g 1 di ditiosemicarbazone disciolto a caldo in 100 cm³ di acqua aggiunti di 3 cm³ di acido acetico.

Preparazione della 6-benzoil-metil-sulfossitriazina (IV). — Si è ritenuto utile preparare anche la 6-benzoil-metil-sulfossitriazina per reazione diretta facendo reagire g 4 di acido benzoil piruvico disciolti in soluzione di NaOH N con g 1,8 di tiosemicarbazide disciolta in acqua e acido acetico e portando il pH della miscela a 5 con aggiunta di acido acetico. La soluzione viene fatta bollire dolcemente per 8 ore; per raffreddamento si separa un prodotto cristallino che viene separato per filtro e lavato con acqua. Si cristallizza da alcole-acqua (1:2) e fonde a 240° con decomposizione ed ha dato all'analisi i seguenti risultati:

| | | | | | |
|---|---------|----------|--------|----------|---------|
| | Trov. % | C 53,42; | H 3,7; | S 12,86; | N 16,56 |
| per C ₁₁ H ₉ N ₃ SO ₂ | Calc. % | 53,35; | 3,67; | 12,90; | 17,00 |

Se il riscaldamento della soluzione viene protratto per un tempo inferiore, la resa in 6-benzoil-metil-sulfossitriazina è minore e, separando il precipitato, è facile riconoscere nella soluzione, previa acidificazione con HCl al 25%, il tiosemicarbazone che non ha reagito.

Preparazione del tiosemicarbazone della 6-benzoil-metil-sulfossitriazina dalla 6-benzoil-metil-sulfossitriazina. — g 2 di 6-benzoil-metil-sulfossitriazina sono stati disciolti in 20 cm³ di soluzione di idrato sodico al 5%. Si aggiungono g 2 di tiosemicarbazide, precedentemente disciolti a caldo in 30 cm³ di acqua contenenti 1,2 cm³ di acido acetico. Si controlla che il pH della soluzione sia compreso tra 6 e 7, altrimenti si aggiusta con soluzione diluita di idrato sodico. Dopo 2 ore si filtra e si precipita il prodotto con soluzione diluita di acido acetico in eccesso. Il prodotto viene filtrato su Buchner e seccato in stufa a 50°. Si ottengono g 2,30 di un prodotto giallo chiaro (teorico g 2,56) che viene cristallizzato dall'alcole oppure da acqua-alcole p.f. 252°.

| | | | | | |
|---|---------|----------|---------|---------|---------|
| | Trov. % | C 44,98; | H 3,71; | N 25,98 | S 20,31 |
| per C ₁₂ H ₁₂ N ₆ S ₂ O | Calc. % | 45,01; | 3,78; | 26,25; | 20,31 |

Azione dell'ipobromito sulla 6-benzoil-metil-sulfossitriazina. — g 2 di 6-benzoil-metil-sulfossitriazina sono stati disciolti in 30 cm³ di soluzione di NaOH al 5%. Si aggiunge quindi la soluzione di ipobromito preparata secondo le indicazioni di Bougault (a 150 g di NaOH disciolti in 100 cm³ di H₂O vengono aggiunti 5 cm³ di bromo) (5). Quando è cessato lo svolgimento gassoso e tutto il liquido è colorato in giallo, si aggiungono 10 cm³ di soluzione satura di bisolfito per eliminare l'eccesso di bromo. La soluzione fortemente alcalina viene acidificata ed estratta con etere. L'estratto etero viene lasciato evaporare ed il residuo viene ripreso con 15 cm³ di acido acetico diluito (1:1).

Riduzione. — La soluzione acetica di cui sopra viene addizionata di g 1 di zinco in polvere e riscaldata per 2 ore su b.m. bollente. Dopo raffreddamento si aggiungono 10 cm³ di acqua e si estrae ripetutamente con etere. Per evaporazione dell'etere si ottengono g 0,6 di un prodotto bianco cristallino, il cui p.f. 143° corrisponde alla amide dell'acido benzoil propionico. Infatti per idrolisi acida di quest'ultima si ottiene, previa estrazione con etere, una sostanza giallo chiara, p.f. 116°, che l'analisi ha confermato essere acido β benzoil propionico.

| | | | |
|--|---------|----------|--------|
| | Trov. % | C 67,36; | H 5,09 |
| per C ₁₀ H ₁₀ O ₃ | Calc. % | 67,40; | 5,66 |

Inoltre, il prodotto ottenuto dall'azione dell'ipobromito sulla 6-benzoil-metil-sulfossitriazina è stato pure ridotto con zinco amalgamato secondo CLEMMENSEN (6), ottenendo con ottima resa l'acido γ fenil butirico p.f. 48°.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CATTELAİN M. H. E. e CHABRIER P. - Bull. Soc. chim. France, II, 1098 (1947).
- (2) GODFRIN M. A. - J. Pharm. Chem., 30: VIII S 321 (1939).
- (3) BOUGAULT M. L. e DANIEL L. - Compt. rend. CLXXXVI, 131 (1928).
- (4) BRÖMME E. e CLAISEN L. - Ber. XXI, 1132 (1888); XX, 2184 (1887).
- (5) BOUGAULT M. - J. Pharm. Chem., 11: VII S 3 (1913).
- (6) MARTIN E. L. - Org. Synth. collect. vol., 2: 499 (1946).