

N-Alchil- e N-arilalchil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinoni attivi sul sistema nervoso centrale (*)

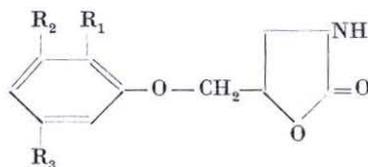
DOMENICO MISITI, ANDREA AMATO e VITTORIO ROSNATI

Laboratori di Chimica terapeutica

Riassunto. — Si descrive la sintesi di alcuni N-alchil- e N-arilalchil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinoni, preparati per azione del clorocarbonato d'etile sui corrispondenti 2-alchilammino- o 2-arilalchilammino-2-metil-1,3-propandioli. Questi amminoalcoli sono stati ottenuti per riduzione con idruro di litio e alluminio dalle corrispondenti 2-alchil- o 2-aril-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazoline.

Summary. — The synthesis of some N-alkyl and N-arylalkyl-4-methyl-4-hydroxymethyl-2-oxalidinones, prepared through the reaction of ethyl chlorocarbonate and the corresponding 2-alkylamino- or 2-arylalkylamino-2-methyl-1,3-propandioles, is herewith described. These aminoalcohols have been obtained through the reduction with lithium and aluminium hydride of the corresponding 2-alkyl- or 2-aryl-4-methyl-4-hydroxy-methyl-2-oxazolines.

Recentemente sono apparsi in letteratura diversi lavori che riportano le interessanti proprietà farmacologiche di alcuni 2-oxazolidinoni-5-sostituiti (I-a, b, c) (1).



- (I-a) $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{H}$
(I-b) $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{H}$
(I-c) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

L'attività sul sistema nervoso centrale del 5-(2-metossi-fenossimetil)-2-oxazolidinone (I-a) è stata descritta successivamente da A. ISGRO (2).

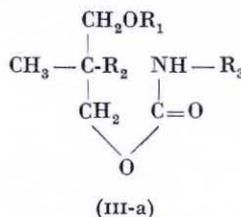
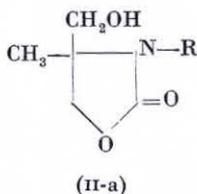
(*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.* 93, 1118 (1963).

H. C. B. DENBER⁽³⁾, E. FISCHER e coll.⁽⁴⁾. Questi Autori misero in evidenza che il 2-oxazolidinone (I-a) possiede, accanto ad una bassa tossicità e notevoli proprietà miorilassanti e anticonvulsivanti, una specifica azione psicofarmacologica. Queste osservazioni, ed in particolare l'azione tranquillante, furono successivamente confermate e ampliate da altri Autori^(5, 6). Analoghe proprietà anticonvulsivanti, analgesiche e miorilassanti sono state descritte per gli altri 2-oxazolidinoni strutturalmente vicini: il 5-(2-metil-fenossimetil)-2-oxazolidinone (I-b) ed il 5-(3,5-dimetilfenossimetil)-2-oxazolidinone (I-c)⁽⁷⁾.

La sostituzione sulla posizione 5 dell'anello del 2-oxazolidinone non sembra tuttavia essere determinante per l'attività sul sistema nervoso centrale; essa infatti risulta presente anche in alcuni 2-oxazolidinoni 4-sostituiti⁽⁸⁾.

Allo scopo di ricercare alcuni possibili rapporti tra struttura chimica e attività sul sistema nervoso centrale in questa classe di composti, ci è parso interessante studiare alcuni 2-oxazolidinoni 4,4-disostituiti di formula generale (II-a), in cui R rappresenta un gruppo alchilico o arilalchilico.

L'interesse di questa ricerca derivava dal fatto che nella molecola dei 2-oxazolidinoni (II-b) sono incorporati elementi strutturali presenti anche in altri farmaci dotati di azione elettiva sul sistema nervoso centrale, in particolare derivati dell'1,3-propandiolo 2,2-disostituito (III-a):



La formula (III-a) comprende infatti la struttura del 2-metil-2-n.propil-1,3-propandiolo-dicarbamato (*), del N-isopropil-2-metil-2-n.propil-1,3-propandiolo-dicarbamato (***) e del 2-metil-2-sec.butil-1,3-propandiolo-dicarbamato (***)).

Nelle tabelle 1 e 2 sono raggruppati i nuovi ammino-alcoli e i 2-oxazolidinoni con alcune loro caratteristiche chimico-fisiche.

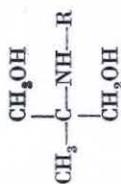
I 2-alchilammino- e i 2-arilalchilammino-2-metil-1,3-propandioli (I → VIII) sono stati preparati con un metodo generale per riduzione con idruro di litio e alluminio delle corrispondenti 2-alchil- o 2-aril-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazoline. L'amminoalcol (v) è stato ottenuto anche per

(*) Meprobamato.

(**) Carisoprodol.

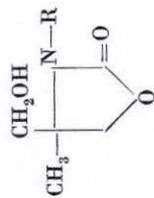
(***) Capla.

TABELLA I



N.	— R	Formula bruta	p.cb., °C/mm	p.f.	C %		H %		N %	
					calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	trov.
I	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₈ H ₁₉ NO ₂	86-88/0,005	68-70	59,59	59,45	11,88	11,93	8,69	8,54
II	—CH ₂ C(CH ₃) ₃	C ₉ H ₂₁ NO ₂	144-45/12	85-86	61,67	61,82	12,08	12,16	7,99	7,80
III	—CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₀ H ₂₃ NO ₂	118-19/0,07	30-32	63,45	63,48	12,25	12,50	7,40	7,32
IV	—CH ₂ CH(C ₂ H ₅) ₂	C ₁₀ H ₂₃ NO ₂	108-10/0,02	42-43	63,45	63,38	12,25	12,16	7,40	7,41
V	—CH ₂ C ₆ H ₅	C ₁₁ H ₁₇ NO ₂	—	83-85	67,66	67,63	8,78	8,60	7,17	7,41
VI	—CH ₂ C ₆ H ₄ pCl	C ₁₁ H ₁₆ ClNO ₂	—	100-02	57,51	57,47	7,02	7,22	6,10	6,11
VII	—CH ₂ C ₆ H ₄ pOCH ₃	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	—	82-84	63,97	64,12	8,50	8,44	6,22	6,09
VIII	—CH ₂ C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃ (3,4,5)	C ₁₄ H ₂₃ NO ₅	—	115-17	58,93	58,85	8,13	8,00	4,91	4,90
IX	—CH ₂ CHOHC ₆ H ₅	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	—	107-08	63,97	63,97	8,50	8,52	6,22	6,29

TABELLA 2



N.	— R	Formula bruta	p.eb., °C/mm	p.f.	C %		H %		N %	
					calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	trov.
X	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₉ H ₁₇ NO ₃	121-22/0,01	72-73	57,73	57,54	9,15	9,40	7,48	7,25
XI	—CH ₂ C(CH ₃) ₃	C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	—	138-41	59,67	59,68	9,52	9,70	6,96	6,97
XII	—CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	148-50/0,05	—	61,36	61,50	9,83	10,11	6,51	6,63
XIII	—CH ₂ CH(C ₂ H ₅) ₂	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	138-39/0,01	48-49	61,36	61,31	9,83	9,91	6,51	6,78
XIV	—CH ₂ C ₆ H ₅	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	—	92-93	65,14	65,04	6,83	7,00	6,33	6,14
XV	—CH ₂ C ₆ H ₄ pCl	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₃	—	119-20	56,36	56,39	5,51	5,72	5,43	5,70
XVI	—CH ₂ C ₆ H ₄ pOCH ₃	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄	—	132-134	62,14	61,92	6,82	6,63	5,57	5,69
XVII	—CH ₂ C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₂ (3,4,5)	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	225-30/0,02	136-139	57,86	57,88	6,80	6,88	4,50	4,44
XVIII	—CH ₂ CHOHC ₆ H ₅	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄	—	106-07	62,14	62,12	6,82	7,02	5,57	5,74

azione diretta del bromuro di benzile sul 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo accanto al corrispondente N-dibenzil derivato. L'amminoalcol (IX) è stato invece preparato per azione dell'ossido di stirene sul 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo.

Gli N-alchil- e N-arilalchil- 4-metil- 4-idrossimetil- 2-oxazolidinoni (X \rightarrow XVIII) sono stati preparati per azione del clorocarbonato di etile sui corrispondenti amminoalcoli in presenza di carbonato potassico. Il 3-benzil-4-metil-4-carbammil-ossimetil-2-oxazolidone (XIX) è stato preparato dal 2-oxazolidinone (XIV) attraverso il corrispondente clorocarbonato.

Le prove farmacologiche preliminari hanno messo in evidenza la scarsissima tossicità dei 2-oxazolidinoni qui descritti (DL 500-800 mg/Kg i.p. nel topo), l'assenza di significativi effetti sul sistema cardiovascolare, l'induzione iniziale di uno stato di eccitazione transitoria (100-150 mg/Kg) cui segue una prolungata fase di depressione di origine centrale. I dati farmacologici relativi verranno pubblicati in dettaglio in altra sede.

PARTE SPERIMENTALE (*)

Preparazione dei 2-alchilammino- e dei 2-arilalchilammino-2-metil-1,3-propandioli (I \rightarrow VIII). Riduzione con idruro di litio e alluminio di 2-alchil- e 2-aril-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazoline. — La soluzione di 2-alchil- o di 2-aril-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina (0,1 moli) in etere o tetraidrofurano viene aggiunta lentamente alla soluzione eterea di LiAlH_4 (0,25 moli). La miscela viene riscaldata a ricadere per 20 ore circa. Si decompone poi cautamente il complesso nel modo usuale, per trattamento con acqua e poi con NaOH diluita. Si filtrano i sali inorganici che vengono lavati a fondo con etere. La soluzione eterea viene seccata su Na_2CO_3 e poi privata del solvente. I 2-alchilammino ed i 2-arilalchilammino-2-metil-1,3-propandioli grezzi vengono purificati per distillazione frazionata o per cristallizzazione.

2-Isobutilammino-2-metil-1,3-propandiolo (I). — Il prodotto grezzo ottenuto riducendo la 2-isopropil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidina (9) in soluzione tetraidrofuranica è stato purificato per distillazione e ricristallizzato da benzolo-esano. Resa 86%. Lo spettro I.R. (CHCl_3) di (I) mostra bande di assorbimento a: 3367 (m), 2915 (s), 2841 (m), 1466 (m), 1408, 1385, 1366, 1323, 1263, 1085, 1043 (s) cm^{-1} .

2-Neopentilammino-2-metil-1,3-propandiolo (II). — Il prodotto grezzo ottenuto riducendo la 2-terz-isobutil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina

(*) I punti di fusione e di ebollizione non sono corretti. Gli spettri I.R. sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer mod. 21.

(⁹) in soluzione eterea viene purificato per distillazione e ricristallizzato da esano. Resa 86%.

2-*n*. *Esilammino-2-metil-1,3-propandiolo* (iii). — Il prodotto grezzo ottenuto per riduzione della 2-*n*.pentil-4-metil-idrossimetil-2-oxazolina (⁹) per distillazione nel vuoto dà un olio che solidifica soltanto dopo molto tempo. I cristalli sono ricristallizzati da esano. Resa 88%. Lo spettro I.R. (CCl₄) di (iii) mostra bande a: 3390 (m), 2915 (s), 2865 (m), 1473 (m), 1381, 1325, 1280, 1172, 1120, 1055 (s) cm⁻¹.

2-(2-*Etil*)-*butilammino-2-metil-1,3-propandiolo* (iv). — Il prodotto grezzo ottenuto per riduzione della 2-(1-*etil*)-propil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina (⁹) in soluzione eterea per distillazione nel vuoto dà un olio che solidifica soltanto dopo diversi giorni. I cristalli sono ricristallizzati da esano. Resa 92%.

2-*Benzilammino-2-metil-1,3-propandiolo* (v). — *a*) Ad una soluzione calda di g 10,5 di 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo in 100 cm³ di diossano anidro si aggiunge una soluzione di g 17 di bromuro di benzile in 30 cm³ di diossano. Si riscalda all'ebollizione per 45' e poi si tira a secco a pressione ridotta. Il residuo viene trattato con acqua: la parte insolubile (g 4) è costituita da un solido che dopo cristallizzazione da etanolo dà cristalli di 2-*dibenzilammino-2-metil-1,3-propandiolo* con p.f. 122-3°. Analisi:

trov. %: C 75,57; H 7,95; N 4,99;
per C₁₈H₂₃NO₂ calc. : 75,75; 8,12; 4,91.

La soluzione acquosa residua per eliminazione del solvente lascia un olio che per trattamento con poco etere solidifica totalmente. Si ottengono così g 10 di (v) che viene ricristallizzato da benzolo. Lo spettro I.R. (CHCl₃) mostra bande a: 3390 (m), 2915 (m), 2857 (m), 1500, 1456 (s), 1414, 1374, 1325, 1212, 1163, 1042 (s) cm⁻¹.

b) Per riduzione con LiAlH₄ della 2-*fenil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina* (¹⁰) in soluzione tetraidrofuranica si ottiene il diolo (v) con una resa dell'80%. Il suo punto di fusione in miscela con il prodotto ottenuto secondo *a*) non mostra alcuna depressione.

2-*p*.*Clorobenzilammino-2-metil-1,3-propandiolo* (vi). — Il prodotto grezzo ottenuto dalla riduzione della 2-*p*.clorofenil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina (¹⁰) in soluzione tetraidrofuranica viene cristallizzato da benzolo: resa 81%. Lo spettro I.R. (CHCl₃) di (vi) mostra bande a: 3448, 2899, 1495 (m), 1408, 1377, 1220, 1092 (m), 1046 (m), 1017 (m), 841, 810 cm⁻¹.

2-*p*-Metossibenzilammino-2-metil-1,3-propandiolo (VII). — Il prodotto grezzo ottenuto per riduzione della 2-*p*-metossifenil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina (¹⁰) in soluzione tetraidrofuranica viene purificato per cristallizzazione da benzolo: resa 91%.

2-(3,4,5-Trimetossibenzil)-ammino-2-metil-1,3-propandiolo (VIII). — Il prodotto grezzo ottenuto per riduzione della 2-(3,4,5-trimetossifenil)-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolina (¹⁰) in soluzione tetraidrofuranica si presenta soltanto in parte cristallino: esso viene ripreso con benzolo e la parte cristallina separata per filtrazione. Si ottiene così il propandiolo (VIII) con una resa del 65%. Dalla frazione oleosa rimasta disciolta in benzolo, si ottiene per distillazione un olio incolore con p.eb. 102-104° a 0,01 mm. Dalla cromatografia su strato sottile risulta che esso è un prodotto unitario. I valori analitici (trov. %: C 58,66; H 6,61) sono in accordo per una formula C₉H₁₂O₄; quest'ultima tuttavia è inconsistente con i dati ricavabili dallo spettro di R.M.N. Da tale spettro risultano presenti 9 protoni appartenenti a 3 gruppi metossilici (3,78 ppm); due protoni aromatici equivalenti (6,54 ppm); due protoni alifatici equivalenti (4,56 ppm) ed un protone appartenente ad un ossidrilico (2,74 ppm). Sulla base di questi dati spettroscopici (per cui i dati analitici appaiono sicuramente erratici), questo prodotto secondario risulta essere 3,4,5-trimetossi-benzilalcol (*).

2-(2-Fenil-2-idrossietil)-ammino-2-metil-1,3-propandiolo (IX). — Una miscela di ossido di stirene (g 12; 0,1 moli) e di 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo (g 10,5; 0,1 moli) in alcol etilico (30 cm³) viene riscaldata all'ebollizione per 7 ore. Dopo aver eliminato l'alcol a pressione ridotta, il residuo, ripreso con benzolo, separa cristalli di diolo (IX) che vengono purificati per cristallizzazione da benzolo-etanolo. Resa 60%.

Preparazione degli N-alchil- e N-arilalchil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinoni (x → XVIII). — Si scioglie a caldo in diossano anidro (250 cm³) una miscela di 2-alchilammino- o di 2-arilalchilammino-2-metil-1,3-propandiolo (0,05 moli) e di clorocarbonato d'etile (0,1 moli); si aggiungono 0,1 moli di K₂CO₃ anidro e si scalda all'ebollizione per 20 ore circa sotto agitazione. Dopo raffreddamento si filtrano i sali inorganici e si tira a secco la soluzione diossanica. Il residuo così ottenuto è purificato per distillazione frazionata o per cristallizzazione.

(*) Il 3,4,5-trimetossi-benzilalcol si è verosimilmente formato per riduzione con LiAlH₄ di un'impurezza di 2-(3,4,5-trimetossi-fenil)-4-metil-(3,4,5-trimetossi-benzoilosimetil)-2-oxazolina presente nella 2-oxazolina di partenza.

3-Isobutil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (x). — Ottenuto a partire dal 2-isobutilammino-2-metil-1,3-propandiolo (i). Il prodotto grezzo dopo rettificazione solidifica rapidamente e viene ricristallizzato da benzolo-esano. Resa 53%. Lo spettro I.R. (nujol) del composto mostra bande di assorbimento a: 3367 (m), 1704 (vs), 1479 (m), 1445 (s), 1418 (s), 1374 (m), 1337 (m), 1305, 1252 (m), 1209, 1163, 1142 (m), 1125 (m), 1065 (s), 1056 (s), 1010 (m), 994 (m), 960, 943, 918, 908, 867, 817, 776 (m), 743, 703 (m) cm^{-1} .

3-Neopentil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xi). — Ottenuto a partire dal 2-neopentilammino-2-metil-1,3-propandiolo (ii). In questo caso il prodotto finale della reazione è contaminato da circa il 30% di prodotto di partenza che viene separato facilmente per la sua grande solubilità in etere. Si separano in questo modo i cristalli di oxazolidinone (xi) praticamente insolubile in etere. Essi vengono purificati per ricristallizzazione da benzolo. Resa 60%. Lo spettro I.R. (nujol) del composto, mostra bande di assorbimento a: 3367 (m), 1706 (vs), 1478 (m), 1414 (m), 1362 (m), 1351 (m), 1326 (m), 1250 (m), 1229 (m), 1205, 1193, 1156 (m), 1117, 1080 (s), 1062 (s), 1045 (s), 1007, 994, 932, 914, 902, 777 (m), 757, 704 (m) cm^{-1} .

3-n. Esil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidone (xii). — Ottenuto a partire dal 2-n. esilammino-2-metil-1,3-propandiolo (iii). — Il prodotto grezzo viene purificato per distillazione. Resa 86%. Lo spettro I.R. (CCl_4) del composto mostra bande di assorbimento a: 3390 (m), 2915 (m), 2857 (m), 1740 (vs), 1468, 1445, 1414 (m), 1321, 1252, 1171, 1062 (m), 1029 cm^{-1} .

3-(2-Etil)-butil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xiii). — Ottenuto a partire dal 2-(2-etil)-butilammino-2-metil-1,3-propandiolo (iv). Il prodotto grezzo distillato, solidifica dopo molto tempo e viene ricristallizzato da esano. Resa 74%. Lo spettro I.R. (nujol) del composto mostra bande di assorbimento a: 3344 (m), 1709 (vs), 1488 (m), 1422 (s), 1348, 1333, 1309, 1290, 1242, (m), 1202, 1172 (m), 1066 (s), 1054 (s), 1013 (m), 1001 (m), 914, 816, 787, 767 (m), 698 (m) cm^{-1} .

3-Benzil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xiv). — Ottenuto a partire dal 2-benzilammino-2-metil-1,3-propandiolo (v). Il prodotto grezzo viene ricristallizzato da benzolo. Lo spettro I.R. (nujol) del composto mostra bande di assorbimento a: 3425 (s), 1715 (vs), 1502 (m), 1445 (s), 1422 (s), 1393 (m), 1357 (m), 1319, 1256 (m), 1208, 1164 (m), 1121 (m), 1087 (s), 1066 (s), 1019 (s), 963, 932, 907, 870, 846, 818, 778 (m), 762 (m), 723 (m), 703 (s) cm^{-1} .

3-*p*.Clorobenzil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xv). — Ottenuto a partire dal 2-*p*.clorobenzilammino-2-metil-1,3-propandiolo (vi). Il prodotto grezzo viene ricristallizzato da benzolo. Resa 80%. Lo spettro I.R. (CHCl₃) del composto mostra bande di assorbimento a: 3390, 2900, 1742 (s), 1495 (m), 1478, 1435, 1404 (m), 1355, 1312, 1290, 1168, 1073 (m), 1027 (m), 1017 (m), 840, 803 cm⁻¹.

3-*p*.Metossibenzil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xvi). — Ottenuto a partire dal 2-*p*.metossibenzilammino-2-metil-1,3-propandiolo (vii). Il prodotto grezzo viene ricristallizzato da benzolo. Resa 90%. Lo spettro I.R. (nujol) del composto mostra bande di assorbimento a: 3367 (s), 1709 (vs), 1613 (m), 1582 (m), 1511 (s), 1437 (s), 1422 (s), 1410 (s), 1389 (m), 1361 (m), 1323, 1299 (m), 1253 (s), 1241 (m), 1171 (s), 1115 (m), 1063 (s), 1029 (m), 1014 (s), 909, 901, 844 (m), 830 (m), 816 (m), 772 (s), 752 (m), 745 (m), 708, 684 (m) cm⁻¹.

3-(3,4,5-Trimetossi-benzil)-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xvii) — Ottenuto a partire dal 2-(3,4,5-trimetossibenzil-ammino-2-metil-1,3-propandiolo (viii). Il prodotto grezzo distillato solidifica rapidamente e viene ricristallizzato dal benzolo. Lo spettro I.R. (nujol) del composto mostra bande di assorbimento a: 3401 (m), 1715 (m), 1595 (m), 1511 (m), 1425 (s), 1391, 1363, 1350, 1328 (m), 1244 (s), 1200, 1127 (s), 1981 (m), 1060 (m), 1022 (m), 1015 (m), 973, 965, 926, 903, 878, 852, 817, 773 (m), 752, 708 (m), 667 cm⁻¹.

3-(2-Fenil-2-idrossi)-etil-4-metil-4-idrossimetil-2-oxazolidinone (xviii). — Ottenuto dal 2-(2-fenil-2-idrossi)-etilammino-2-metil-1,3-propandiolo (ix). Il prodotto grezzo viene ripreso con benzolo ed il solido cristallino separato viene ricristallizzato da benzolo. Resa 62%.

3-Benzil-4-metil-4-carbammil-ossimetil-2-oxazolidinone (xix). — Una sospensione di 2-oxazolidinone (xiv) (0,1 moli) in toluolo è trattata a temperatura ambiente con una soluzione toluenica di fosgene (0,15 moli) e mantenuta sotto agitazione per 3 ore. Si raffredda a 10° e si aggiunge una soluzione di piridina (0,15 moli) in toluolo senza superare i 30°. La soluzione toluenica dopo filtrazione viene lavata con NH₄OH conc. raffreddando esternamente. Si separa un solido cristallino che dopo filtrazione ed essiccamento mostra p.f. 125-7°. Per ricristallizzazione da alcol metilico si ottengono cristalli di (xix) con p.f. 132°. Analisi:

trov. %: C 59,17; H 6,16; N 10,77;
per C₁₃H₁₆N₂O₄ calc. : 59,08; 6,10; 10,60.

Le microanalisi sono state eseguite nel Laboratorio di Microanalisi dell'Istituto Superiore di Sanità: ringraziamo la Prof. M. MARZADRO ed i suoi collaboratori.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) FISCHER E., SZABÒ J. L. J. e LAVIUZZA M. - *Comun. Soc. Farm. Ter.*, Buenos Aires, 25 giugno 1957.
- (²) ISCRO A. - *Tesi Fac. Farm. Biochim. Univ. Buenos Aires* (1958).
- (³) DENBER H. C. B. - *Am. J. Psychiat.*, 115, 360 (1958).
- (⁴) FISCHER E., SZABÒ J. L. J. e STAMBURGO M. - *Nature*, 186, 893 (1960).
- (⁵) GRAY W. D., OSTERBERG A. C. e RAUCH C. E. - *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 134, 198 (1961).
- (⁶) FURCIUELE A. R., KINNARD W. J. e BUCKLEY J. P. - *J. Pharm. Sci.*, 50, 252, (1961).
- (⁷) CARROPL M. N., LUTEN W. R. e SOUTHWARD R. W. - *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 130, 280 (1961).
- (⁸) CLOSE J. - *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 95 (1951).
- (⁹) ROSNATI V. e MISITI D. - *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 573 (1960).
- (¹⁰) ROSNATI V. e MISITI D. - *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 155 (1960).

Ricerche nella serie dell'1,4-benzodiossano e del 2,3-diidro-benzofurano. Sintesi di 1,2-etandioli monocarbammati (*)

DOMENICO MISITI, ANDREA AMATO e VITTORIO ROSNATI

Laboratori di Chimica terapeutica

Riassunto. — Si descrive la sintesi di alcuni monocarbammati derivati da 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-etandioli e del 2-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo. Essi sono stati preparati per azione dell'ammoniaca sui corrispondenti 4-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-oni e sul 4-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,3-dioxolan-2-one. Questi carbonati ciclici sono stati ottenuti dai corrispondenti dioli per transesterificazione con carbonato d'etile. Si descrive anche la sintesi del 4-(2-metossi-fenossi)-1,2-butandiolo-1-carbammato.

Summary. — The synthesis of several monocarbammates derived from 2-(1,4-benzodioxan-2-yl)-1,2-ethandiols and 2-(2,3-dihydro-benzofuran-2-yl)-1,2-ethandiol is herewith described. They have been obtained through the reaction of ammonia with the corresponding 4-(1,4-benzodioxan-2-yl)-1,3-dioxolan-2-ones and 4-(2,3-dihydro-benzofuran-2-yl)-1,3-dioxolan-2-one. These cyclic carbonates have been obtained from the corresponding diols through reaction with ethyl carbonate. The synthesis of 4-(2-methoxyphenoxy)-1,2-butandiol-1-carbamate is also described.

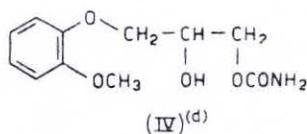
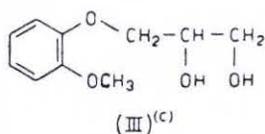
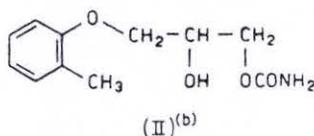
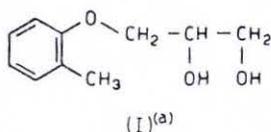
E' noto che numerosi eteri α -sostituiti della glicerina posseggono notevoli proprietà miorilassanti, dovute ad una depressione elettiva dei riflessi polisinaptici (1). Queste interessanti proprietà farmacologiche furono descritte la prima volta da BERGER e BRADLEY per il 3-(metil-fenossi)-1,2-propandiolo (1) (mianesima) (2, 3). Successivamente, numerose ricerche presero come modello la molecola della mianesina per studiare i rapporti tra struttura chimica e attività miorilassante. Tra le variazioni strutturali apportate a questa molecola, le più importanti riguardano l'influenza dei sostituenti sull'anello aromatico (4), la sostituzione di un gruppo etero aromatico con uno alifatico (5), la ramificazione della ca-

(*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.* 93, 1128 (1963).

tena laterale ⁽⁶⁾, l'introduzione di un gruppo carbammico al posto della funzione alcolica primaria ⁽⁷⁾. Quest'ultima variazione si rivelò particolarmente favorevole anche in rapporto al fatto che la breve durata d'azione della mianesina poteva essere attribuita alla rapida ossidazione della funzione alcolica primaria ⁽⁸⁾.

Queste ricerche, nel loro insieme, ebbero come risultato l'introduzioni in terapia di un certo numero di farmaci, per alcuni dei quali le relazioni strutturali con la mianesina sono molto evidenti (vedi formule II, III e IV).

Tenendo presente le proprietà farmacologiche di questi α -fenossi-eteri della glicerina ed il fatto che funzioni carbammiche sono presenti anche in altri potenti farmaci miorellassanti (*), abbiamo voluto estendere le precedenti ricerche ad alcuni carbammati nei quali gli elementi strutturali della glicerina fossero incorporati in strutture cicliche quali l'1,4-benzodiossano ed il 2,3-diidro-benzofurano (**). Inoltre, abbiamo voluto verificare se l'attività miorellassante fosse caratteristica oltre che



(a) Mianesina, Mefenesina; (b) Mefenesina carbammato, Tolseran*; (c) Myoscain E**; (d) Methocarbamol*.

* Nomenclatura dal New and Nonofficial Drugs, J. B. Lippincott, Philadelphia (1962).

** Nomenclatura da JACORSEN E. - Bull. Org. Mond. Santé, 21, 481 (1959).

degli α -fenossi-eteri derivati della glicerina, anche degli analoghi fenossi-eteri derivati dell'1,2,4-butantriolo.

Descriviamo in questa nota la sintesi dei carbammati (v), (vi), (vii), (viii) e (ix):

Le strutture dei carbammati (v), (vi) e (viii) possono essere ricondotte a quelle di α -fenossi-eteri della glicerina portanti una ramificazione

(*) 2-Metil-2-propil-1,3-propandiolo dicarbammato (meprobamato); N-isopropil-2-metil-2-propil-1,3-propandiolo dicarbammato (carisoprodol).

(**) Un'attività miorellassante dello stesso ordine di quella della mianesina era già stata descritta per l'(1,4-benzodiossano-2-il metil)- α -gliceril-etero, in cui gli elementi strutturali della glicerina fanno parte della catena laterale ⁽⁹⁾.

I carbammati descritti in questa nota sono stati preparati secondo il metodo qui schematizzato:

Il 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-etandiolo-1-carbammato (v) è stato preparato per azione dell'ammoniaca acquosa sul 4-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (xii-a) ottenuto per transesterificazione fra dietil carbonato ed il 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-etandiolo (xi-a) ⁽¹⁰⁾. Lo stesso carbammato (v) è stato anche preparato direttamente dal diolo (xi-a) per azione del fosgene e successivo trattamento con ammoniaca anidra in soluzione eterea.

Il 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo-1-carbammato (vi) è stato preparato a partire dalla cloridrina (x-b) ⁽¹¹⁾ che per trattamento con formiato sodico in glicol etilenico ha fornito con buone rese il 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo (xi-b); da questo diolo per transesterificazione con dietil carbonato è stato ottenuto il 4-metil-4-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (xi-b), da cui per azione dell'ammoniaca acquosa è stato infine preparato il carbammato (vi).

Il 3-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo-1-carbammato (vii) è stato analogamente preparato a partire dalla cloridrina (x-c) ⁽¹²⁾ attraverso il 3-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo (xi-c) ed il corrispondente carbonato ciclico 4-(1,4-benzodiossan-2-il-metil)-1,3-dioxolan-2-one (xii-c).

Il 2-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo-1-carbammato (viii) è stato preparato a partire dal 2-(2,3-diidrobenzofuran-2-il)-2-idrossi-1-cloroetano (x-d) ottenuto per riduzione con sodio-boro idruro del 2-cloroacetil-2,3-diidrobenzofurano ⁽¹³⁾. Dalla cloridrina (x-d), con le reazioni già illustrate per le sintesi dei precedenti carbammati, sono stati ottenuti l'1-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo (xi-d) ⁽¹⁴⁾ ed il 4-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (xii-d).

Il 4-(2-metossi-fenossi)-1,2-butandiolo-1-carbammato (ix) è stato ottenuto dal carbonato ciclico (xii-c) a sua volta preparato in quattro passaggi a partire dal 3-(2-metossi-fenossi)-propionil-cloruro. Questo cloruro acido per trattamento con diazometano e acido cloridrico secondo la reazione di Clibbens-Nierenstein ha fornito l'1-cloro-4-(2-metossi-fenossi)-butan-2-one, che per riduzione con sodio-boro idruro ha dato l'1-cloro-2-idrossi-4-(2-metossi-fenossi)-butano (x-e). Da questa cloridrina, analogamente a quanto descritto per i casi citati, è stato preparato il 4-(2-metossi-fenossi)-1,2-butandiolo (xi-e), da cui il corrispondente 4-(2-metossi-fenil-etil)-1,3-dioxolan-2-one (xii-e).

La ricerca farmacologica su carbammati descritti in questa nota è tuttora in corso. I risultati preliminari hanno tuttavia indicato che i carbammati derivati dell'1,4-benzodiossano (le cui strutture possono essere ricondotte a quelle degli α -fenossi-eteri della glicerina) posseggono notevoli proprietà miorilassanti nel coniglio a dosi di 70 mg/Kg i.v. Per contro, l'analogo carbammato (VIII) derivato del 2,3-diidro-benzofurano è risultato dotato di scarsissima attività. Infine, il carbammato (IX) [che rappresenta l'omologo superiore del carbammato (VI)] è risultato nel coniglio del tutto sprovvisto di attività miorilassante sino a 100/Kg i.v.

Le ricerche farmacologiche relative alle proprietà ed al modo d'azione di questi carbammati verranno pubblicate in dettaglio in altra sede.

PARTE SPERIMENTALE (*)

4-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (XII-a). — Una soluzione di 1-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-etandiolo (¹⁰) (g 5; 0,025 moli) in carbonato di etile (g 12; 0,1 moli) viene riscaldata a 130-140°, in presenza di metilato sodico (g 0,1), in un pallone munito di una rettifica per separare l'alcol etilico di reazione. Il riscaldamento è mantenuto per 9-10 ore. Eliminato il carbonato di etile a pressione ridotta si ottiene un residuo che viene ripreso con cloroformio e lavato con acqua. Gli estratti cloroformici, seccati su CaCl₂, forniscono dopo eliminazione del solvente un residuo oleoso che solidifica totalmente. Resa 85%. Un campione cristallizzato da benzolo fornisce cristalli di carbonato ciclico (XII-a) con p.f. 111-113°. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 1976 (s), 1595 (m), 1497 (s), 1484 (m), 1422, 1350, 1328, 1304, 1287 (m), 1274 (m), 1267 (s), 1250 (m), 1212, 1198, 1176 (s) 1163 (m), 1149, 1130, 1115 (m), 1091 (s), 1079, 1049 (s), 1034 (m), 1015 (m), 926, 902, 874, 864, 845, 797, 767 (m), 762 (m), 752 (s), 725 (m) cm⁻¹. Analisi:

trov. %: C 59,36; H 4,35;
per C₁₁H₁₀O₅ calc. : 59,46; 4,54;

2-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,2-etandiolo-1-carbammato (V). — a) Una miscela di 1,3-dioxolan-2-one (XII-a) (g 1; 0,0045 moli) e di NH₄OH (5 cm³; soluzione al 32%) in diossano (5 cm³) viene riscaldata in tubo chiuso a 80° per 5-6 ore. Eliminati i solventi si ottiene un residuo che viene sciolto in etere; la soluzione eterea viene lavata con acqua e poi seccata su

(*) I punti di fusione e di ebollizione non sono corretti. Gli spettri I.R. sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer, mod. 21.

Na_2SO_4 . Dopo eliminazione dell'etere si ottiene un residuo che viene distillato; si raccolgono due frazioni: la prima frazione (g 0,2 con p. eb. 120-125° a 0,05 mm) è costituita da 1-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-etandiole, la seconda frazione (g 0,7 con p. eb. 160-165° a 0,005 mm) è costituita dal carbammato (v), che per riposo solidifica totalmente. (Resa 64%). Dopo cristallizzazione da cloroformio il carbammato mostra p.f. 117-119°. Un campione ricristallizzato per l'analisi ha p.f. 120-121°. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 3425 (m), 3311 (m), 3247, 1704 (s), 1618 (m), 1595 (m), 1497 (m), 1412 (m), 1326 (m), 1302 (m), 1279 (m), 1255 (m), 1227 (m), 1195 (m), 1147, 1134, 1103 (m), 1087 (m), 1072 (m), 1032 (m), 1009 (m), 974, 909 (m), 853 (m), 780, 767 (m), 752 (m), 746 (s), 692, 671 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 55,18; H 5,29; N 5,87;
 per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ calc. : 55,23; 5,48; 5,86;

b) Una soluzione toluenica di fosgene al 15% (15 cm^3 pari a 0,022 moli) viene aggiunta lentamente ad una soluzione di 1,2-etandiole (XI-a) (g. 2,2; 0,011 moli) in benzolo (30 cm^3). La miscela di reazione, dopo riposo di qualche ora, viene concentrata a metà volume a pressione ridotta e poi saturata con una corrente di ammoniacca gassosa secca. Il solido separatosi durante il passaggio di ammoniacca viene lavato a fondo con acqua, seccato e infine cristallizzato da cloroformio: si ottengono così cristalli di carbammato (v) (g 1,9; resa 73%) con p.f. 109-112°. Un campione ricristallizzato per l'analisi mostra p.f. 117-119° e non deprime in miscela con il carbammato preparato secondo il metodo a). Analisi:

trov. %: C 55,14; H 5,36; N 5,71;
 per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ calc. : 55,23; 5,48; 5,86.

2-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,2-propandiole (XI-b). — Una sospensione di 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-2-metil-2-idrossi-1-cloro-etano (¹¹) (g 6,9; 0,03 moli) e formiato sodico (g 4,2; 0,06 moli) in glicol etilenico (90 cm^3) è riscaldata sotto agitazione e in corrente di azoto a 140° per 3 ore. Dopo aver eliminato il solvente, il residuo è ripreso con acqua ed estratto ripetutamente con cloroformio. Gli estratti cloroformici riuniti sono seccati su Na_2SO_4 e dopo eliminazione del solvente forniscono un residuo oleoso che viene distillato sotto vuoto. Si raccoglie un'unica frazione (g 5,4; p. eb. 128-132° a 0,05 mm) costituita dal propandiole (XI-b). (Resa 86%). Il prodotto per riposo solidifica totalmente e dopo cristallizzazione da benzolo mostra p.f. 96-97°. Lo spettro I.R. (CHCl_3) mostra bande di assorbimento a: 3534, 3425, 2959, 2907, 2857, 1595 (m), 1493 (s).

1460 (m), 1401, 1381, 1300 (m), 1263 (s), 1247 (m), 1110 (m), 1087 (m), 1073 (m), 1034 (m), 980-973, 909, 866-855 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 62,79; H 6,68;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$ calc. : 62,84; 6,71.

4-Metil-4-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (xii-b). — Questo prodotto è stato sintetizzato a partire dal 2-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo seguendo il metodo descritto per l'1,3-dioxolan-2-one (xii-a). Il prodotto grezzo ottenuto è stato purificato per distillazione dando un olio incolore (p.eb. 128-130° a 0,02 mm) che per riposo solidifica totalmente. Resa 80%. Un campione ricristallizzato da CCl_4 mostra p.f. 92-94°. Lo spettro I.R. (CHCl_3) mostra bande di assorbimento a: 2941, 2890, 2841, 1802 (s), 1595 (m), 1488 (s), 1464, 1383, 1328, 1299, 1264 (s), 1247 (s), 1225 (m), 1188, 1145, 1116 (m), 1107 (m), 1089 (s), 1070 (m), 1058 (s), 1037 (m), 1017, 917, 863-853 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 61,14; H 5,32;
per $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calc. : 61,01; 5,12.

2-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo-1-carbammato (vi). — Una soluzione di 4-metil-4-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (g 1,5; 0,0063 moli) in diossano (10 cm^3) viene riscaldata con una soluzione di NH_4OH (10 cm^3 : soluzione al 32%) in tubo chiuso a 85° per 2 ore. Eliminati i solventi a pressione ridotta si ottiene un residuo solido con p.f. 140-144°. Resa 88%. Un campione ricristallizzato più volte da clorofornio mostra p.f. 150-152°. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 3484 (m), 3401 (s), 3300 (m), 3226 (m), 3175 (m), 1686 (s), 1616 (s), 1592 (m), 1495 (s), 1416 (s), 1335 (m), 1323 (m), 1299 (m), 1263 (s), 1253 (s), 1195 (m), 1145 (m), 1136 (m), 1109 (m), 1093 (s), 1085 (s), 1072 (s), 1031 (m), 1013 (m), 983 (m), 963 (m), 938 (m), 926 (m), 900 (m), 873 (m), 836 (m), 786 (m), 755 (s), 745 (s), 721, 696 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 57,03; H 6,04; N 5,76;
per $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ calc. : 56,91; 5,97; 5,53.

3-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo (xi-c). — Questo prodotto è stato ottenuto per reazione del 3-(1,4-benzodiossan-2-il)-2-idrossi-1-cloropropano (¹²) con formiato sodico a 145-150° operando analogamente a quanto descritto per l'1,2-propandiolo (xi-a). Il prodotto grezzo viene purificato per distillazione: si ottiene così il propandiolo (xi-c) sotto forma di un olio viscoso limpido (p. eb. 150-155° a 0,02 mm). Resa 75%. Lo spettro I.R. (velo liquido) mostra bande di assorbimento a: 3390, 3300, 2899 (m),

2857 (m), 1595 (s), 1495 (vs), 1466 (m), 1304 (s), 1269-1250, 1198 (m), 1112 (s), 1040 (vs), 1020 (s), 963 (m), 888, 849, 828, 753-747 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 62,85; H 6,72;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$ calc. : 62,84; 6,71.

4-(1,4-Benzodiossan-2-il-metil)-1,3-dioxolan-2-one (xii-c). — Questo prodotto è stato ottenuto a partire dal 3-(1,4-benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo operando analogamente a quanto descritto per l'1,3-dioxolan-2-one (xii-a). Il prodotto grezzo dopo cristallizzazione da poco benzolo ha p.f. 91-93°. Resa 80%. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 1779 (s), 1512 (m), 1495 (s), 1477 (m), 1346-1333, 1304, 1287 (m), 1274 (m), 1263 (m), 1252 (m), 1196, 1181 (s), 1168 (m), 1134, 1103, 1079 (m), 1059 (m), 1042 (s), 1027, 1018, 915, 894, 883, 857, 827, 820, 773 (m), 755 (s), 717 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 61,20; H 4,97;
per $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calc. : 61,01; 5,12.

3-(1,4-Benzodiossan-2-il)-1,2-propandiolo-1-carbammato (vii). — Il carbammato (vii) è stato ottenuto facendo reagire in tubo chiuso l'ammoniaca sull'1,3-dioxolan-2-one (xii-c) seguendo il metodo a) descritto per il carbammato (v). Il prodotto grezzo ottenuto viene purificato per distillazione; si ottiene così il carbammato (vii) sotto forma di olio viscoso incolore (p. eb. 165-168° a 0,05 mm). Resa 70%. Lo spettro I.R. (CHCl_3) mostra bande di assorbimento a: 3521 (m), 3413 (m), 2899, 1724 (s), 1592 (m), 1493 (s), 1464, 1395 (m), 1342-1325 (m), 1302, 1279 (m), 1266 (s), 1250 (s), 1188, 1109 (m), 1070 (m), 1040 (m), 1017, 912 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 57,00; H 6,00; N 5,60;
per $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ calc. : 56,91; 5,97; 5,53.

2-(2,3-Diidro-benzofuran-2-il)-2-idrossi-1-cloro-etano (x-d). — Ad una soluzione di 2-cloacetil-2,3-diidro-benzofurano (¹³) (g 4; 0,02 moli) in metanolo (50 cm^3) si aggiunge a porzioni, sotto agitazione, NaBH_4 (g 0,4; 0,01 moli). Durante tutta l'aggiunta si mantiene la temperatura al di sotto di -5°C . Dopo riposo di un'ora, si neutralizza con CH_3COOH e si elimina il solvente a pressione ridotta. Il residuo è trattato con acqua (5 cm^3) ed estratto a fondo con etere. Gli estratti eteri riuniti vengono seccati su Na_2SO_4 . Dopo eliminazione del solvente si ottiene un residuo oleoso che per distillazione fornisce un'unica frazione (g 3,8; resa 95%, p. eb. 77-80° a 0,01 mm) costituita da cloridina (x-d). Lo spettro I.R. (velo liquido)

mostra bande di assorbimento a: 3425 (m), 3030, 2924 (m), 1597 (m), 1479 (s), 1462 (s), 1439, 1321 (m), 1229 (s), 1163 (m), 1093 (m), 1067 (m), 1014 (m), 988, 961 (m), 872 (m), 858 (m), 794, 750 (s), 709 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 60,73; H 5,59; Cl 17,54;
per $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$ calc. : 60,46; 5,58; 17,85.

1-(2,3-Diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo (¹⁴) (XI-d). — Una soluzione di 1-cloro-2-idrossi-2-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-etano (g 2; 0,01 moli) e di formiato sodico (g 1,4; 0,02 moli) in glicol etilenico (30 cm^3) viene riscaldata sotto agitazione ed in ambiente di azoto a 150° per 3 ore circa. L'elaborazione della miscela di reazione viene condotta analogamente a quanto descritto per l'1,2-propandiolo (XI-b). Il prodotto di reazione grezzo viene purificato per distillazione ottenendosi il diolo (XI-d) (g 1,7; resa 93%; p.eb. 120-125° a 0,01 mm) sotto forma di un olio incolore viscoso che, dopo lungo tempo, solidifica. Un campione cristallizzato da poco benzolo mostra p.f. 90-92°. Lo spettro I.R. (CHCl_3) mostra bande di assorbimento a: 3546 (m), 3425-3333 (m), 2967, 2899 (m), 1595 (m), 1477 (s), 1458 (m), 1319, 1227-1200 (s), 1170, 1163, 1091 (m), 1040 (m), 1014 (m), 975 (m), 950 (m), 886, 857 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 66,76; H 6,71;
per $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ calc. : 66,65; 6,71.

4-(2,3-Diidro-benzofuran-2-il)-1,3-dioxolan-2-one (XII-d). — Questo prodotto è stato ottenuto a partire da 1-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo seguendo il metodo descritto per l'1,3-dioxolan-2-one (XII-a). Resa 75%. Il prodotto grezzo dopo cristallizzazione da benzolo mostra p.f. 160-161°. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 1805 (m), 1776 (s), 1595, 1481 (s), 1395 (m), 1326, 1295, 1287, 1242, 1225 (m), 1200, 1167 (s), 1096 (m), 1071 (m), 1045 (m), 1017, 957, 941, 901, 860, 855, 815, 790, 768, 754 (m), 749 (s), 728, 713 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 64,13; H 4,87;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$ calc. : 64,07; 4,89.

4-(2,3-Diidro-benzofuran-2-il)-1,2-etandiolo-1-carbammato (VIII). — Questo prodotto è stato ottenuto a partire da 4-(2,3-diidro-benzofuran-2-il)-4,3-dioxolan-2-one seguendo il metodo descritto per il carbammato (VI). Il prodotto grezzo solidifica totalmente e viene purificato per cristallizzazione da cloroformio. Resa 78%. Un campione ricristallizzato ha p.f. 130-131°. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 3448 (s),

3279-3205 (m), 3155, 1739 (m), 1684 (s), 1592 (m), 1484 (m), 1429, 1420 (m), 1399 (m), 1362 (s), 1330 (m), 1321 (m), 1295 (m), 1269, 1239 (m), 1222, 1166 (m), 1134 (m), 1094 (s), 1015, 985 (m), 968 (m), 936, 901 (m), 866 (m), 833, 798, 779 (m), 742 (s) cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 58,96; H 5,80; N 6,25;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ calc. : 59,18; 5,87; 6,28.

3-(2-Metossi-fenossi)-propionil cloruro. — Grammi 9 di acido 3-(*o*-metossi-fenossi)-propionico (¹⁵) sono trattati con 45 cm^3 di SOCl_2 . La miscela di reazione è lasciata a temperatura ambiente per mezz'ora, poi riscaldata a 55-60° per un'ora e mezza. L'eccesso di SOCl_2 viene eliminato a pressione ridotta; il residuo è ripreso con benzolo anidro (50 cm^3) ed il solvente è nuovamente eliminato. Il residuo solido così ottenuto è costituito dal cloruro acido grezzo, che viene purificato per cristallizzazione da esano. I cristalli mostrano, p.f. 45-47°. Resa g 9 (98%). Analisi:

trov. %: C 56,07; H 4,90; Cl 16,26;
per $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ calc. : 55,95; 5,17; 16,53.

1-Cloro-4-(2-metossi-fenossi)-butan-2-one. — Una soluzione del precedente cloruro acido (g 4,8; 0,022 moli) in etere assoluto (50 cm^3) viene fatta gocciolare sotto agitazione, in una soluzione eterea di diazometano 0,4 M (115 cm^3 ; 0,046 moli). Durante tutta l'aggiunta, la temperatura non deve superare i 2-3°. Si lascia a sè per diverse ore e si fa poi gorgogliare per 2 ore una lenta corrente di HCl gassoso. Si elimina il solvente a pressione ridotta su KOH solido. Il residuo oleoso, ripreso con diossano acquoso (1:1), separa immediatamente cristalli incolori (g 4,6) di clorochetone con p.f. 85-88°. Per ricristallizzazione da diossano acquoso (4:1) si ottengono cristalli con lo stesso punto di fusione. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 3538 (s), 3322, 3215, 1739 (vs), 1656, 1595 (m), 1527, 1511 (s), 1401 (s), 1329 (m), 1304, 1290, 1255 (vs), 1222 (vs), 1182 (s), 1122 (vs), 1103 (m), 1053, 1042, 1026 (s), 933, 907, 836, 826, 783, 769 (m), 738 (vs), 727 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 53,69; H 5,97; Cl 14,26;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ calc. : 53,55; 6,13; 14,37.

La microdeterminazione dell'acqua di cristallizzazione con l'apparecchio Edwards Modello MDA2 ha dato:

trov. %: H_2O 7,99;
per $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ calc. : 7,87.

Un campione di questo clorochetone idrato è distillato: si ottiene un liquido incolore viscoso con p.eb. 115-117° a 0,01 mm. Analisi:

trov. %: C 57,45; H 5,70; Cl 15,50;
per $C_{11}H_{13}ClO_3$ calc. : 57,77; 5,73; 15,50.

1-Cloro-2-idrossi-4-(*o*-metossi-fenossi)-butano (x-e). — Grammi 4,6 (0,018 moli) del precedente clorochetone idrato vengono sciolti in 120 cm³ di metanolo ed alla soluzione si aggiungono a porzioni, sotto agitazione, g 0,38 (0,01 moli) di NaBH₄. Durante tutta l'aggiunta si mantiene la temperatura a 16-18°. Dopo riposo di un'ora si neutralizza con CH₃COOH (1 cm³) e si elimina il solvente a pressione ridotta. L'usuale elaborazione fornisce un residuo oleoso che viene distillato: si raccolgono così g 4,2 (resa 91%) di cloridrina (x-e), liquido incolore viscoso che solidifica completamente per prolungato riposo. Un campione purificato per cristallizzazione da benzolo ha p.f. 56-58°. Lo spettro I.R. (CHCl₃) mostra bande di assorbimento a: 3483, 2967, 2924, 2817, 1597 (m), 1506 (s), 1467 (m), 1457 (m), 1439, 1386, 1325, 1292, 1251 (s), 1177 (m), 1122 (s), 1048 (m), 1029 (m), cm⁻¹. Analisi:

trov. %: C 57,19; H 6,54; Cl 15,51;
per $C_{11}H_{15}ClO_3$ calc. : 57,31; 6,56; 15,37.

4-(2-metossi-fenossi)-1,2-butandiolo (xi-e). — Questo diolo è stato preparato a partire dalla cloridrina precedente per reazione con formiato di sodio in glicol etilenico a 145-150°, seguendo il procedimento descritto per l'1,2-propandiolo (xi-b). Il diolo (xi-e) così ottenuto è un liquido viscoso con p.eb. 125-128° a 0,02 mm che solidifica rapidamente; un campione cristallizzato da benzolo ha p.f. 56-57°. Lo spettro I.R. (CCl₄) mostra bande di assorbimento a: 3509 (m), 2924 (m), 1600 (m), 1508 (vs), 1468 (m), 1458 (s), 1451, 1399, 1376, 1325, 1253 (vs), 1179 (m), 1124 (s), 1047, 1033 (m), 998 cm⁻¹. Analisi:

trov. %: C 62,15; H 7,40;
per $C_{11}H_{16}O_4$ calc. : 62,25; 7,60.

4-(*o*-Metossi-fenilettil)-1,3-dioxolan-2-one (xii-e). — Questo prodotto è stato sintetizzato a partire dall'1,2-butandiolo (xi-e) seguendo il metodo descritto per la preparazione dell'1,3-dioxolan-2-one (xii-a). Il prodotto di reazione grezzo è stato purificato per distillazione dando un olio incolore viscoso con p.eb. 150-155° a 0,01 mm. Resa 80%. Lo spettro I.R. (CHCl₃) mostra bande di assorbimento a: 2959, 2899, 2801, 1795 (s),

1745, 1590 (m), 1497 (s), 1471 (m), 1460 (m), 1449 (m), 1435, 1385 (m), 1364, 1323, 1248 (s), 1274 (s), 1120 (m), 1103 (m), 973, 905 cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 60,39; H 6,20;
per $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ calc. : 60,50; 5,92.

2-Idrossi-4-(2-metossi-fenossi)-1,2-butandiolo-1-carbammato (ix). — Il carbammato (ix) è stato ottenuto a partire dal carbonato ciclico precedente (xii-e) per trattamento con NH_4OH secondo il metodo adottato per la sintesi del carbammato (vi). Il prodotto grezzo dopo cristallizzazione da cloroformio ha p.f. 113-114°. Resa 85%. Lo spettro I.R. (nujol) mostra bande di assorbimento a: 3425 (s), 3300 (s), 3175 (m), 1689 (vs), 1608 (m), 1592 (m), 1508 (s), 1433 (s), 1361 (s), 1330 (m), 1287 (m), 1255 (s), 1224 (s), 1182 (m), 1119 (s), 1089 (s), 1066 (m), 1054 (m), 1038 (m), 1020 (m), 998, 995 (m), 920 (m), 908 (m), 892, 848, 838, 787, 766 (m), 744 (s), 738 (s) cm^{-1} . Analisi:

trov. %: C 56,46; H 6,99; N 5,25
per $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ calc. : 56,46; 6,71; 5,49.

Ringraziamo la Prof. Margherita MARZADRO del Laboratorio di Microanalisi dell'Istituto Superiore di Sanità per aver eseguito le determinazioni microanalitiche.

BIBLIOGRAFIA

- (1) JACOBSEN E. - Bull. Org. Mond. Santé, 21, 411-493 (1959).
- (2) BERGER F. M. e BRADLEY W. - Brit. J. Pharmacol., 1, 265 (1946).
- (3) BERGER F. M. - Brit. J. Pharmacol., 2, 241 (1947).
- (4) BERGER F. M. - J. Pharmacol., 93, 470 (1948); BERGER F. M. - Pharmacol. Rev., 1, 243 (1949); MORGAN A. M., TRUITT E. B. e LITTLE J. M. - J. Am. Pharm. Ass., 46, 374 (1957).
- (5) BERGER F. M., BOECKELHEIDE V. e TARBELL D. S. - Science, 108, 561 (1948); BERGER F. M. - Fe. Proc., 3, 274 (1949); BERGER F. M. - Arch. Intern. Pharmacodyn., 85, 474 (1957); BERGER F. M. - J. Pharmacol., 96, 213 (1949); BOINES G. J. e HOROSHAK S. - Ind. Med. Surg., 22, 228 (1953).
- (6) SLATER I. H., JONES G. T. e YOUNG W. K. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 93, 528 (1956).
- (7) BERGER F. M. - J. Pharmacol. Exptl. Therap., 104, 468 (1952); DE SALVA S. J. CLEMENTS G. R. e ERCOLI N. - J. Pharmacol. Exptl. Therap., 126, 318, (1959).
- (8) RILEY R. F. e BERGER F. M. - Arch. Biochem., 20, 159 (1949).
- (9) PETROW V., STEPHENSON O. e WYLD A. M. - J. Pharm. Pharmacol., 12, 37 (1960).
- (10) ROSNATI V. e DE MARCHI F. - Tetrahedron, 18, 289 (1962).
- (11) MISITI D. DE MARCHI F. e ROSNATI V. - Gazz. Chim. Ital., 93, 1044 (1963).
- (12) ROSNATI V. DE MARCHI F. e MISITI D. - Gazz. Chim. Ital., 91, 1365 (1961).
- (13) ROSNATI V. DE MARCHI F. MISITI D. e FRANCESCAGLIA C. - Gazz. Chim. Ital., 94, 979 (1964).
- (14) ZAUGG H. E. - J. Am. Chem. Soc., 76, 5818 (1954) ha già descritto questo prodotto per altra via.
- (15) PFEIFFER P., OBERLIN H. e KÖNERMANN E. - Ber., 58, 1955 (1925).

Ricerche sulla ficina

Nota I. — Purificazione, caratterizzazione e composizione in amminoacidi. (*)

G. B. MARINI-BETTÒLO, PIERO U. ANGELETTI (**), MARIA L. SALVI (**),
LEONARDO TENTORI e GIROLAMO VIVALDI

Laboratori di Chimica biologica e Laboratori di Biologia

Riassunto. — Viene descritta la purificazione della ficina dal lattice di *Ficus*, come pure dalla polvere di lattice, e la sua cristallizzazione.

Vengono determinate alcune caratteristiche di questo enzima ed in particolare l'attività proteolitica in confronto alla tripsina ed alla papaina in presenza di inibitori e di attivatori.

Con il metodo della sedimentazione ne è stato determinato il peso molecolare pari a 26.500.

La ficina così purificata è stata idrolizzata, gli amminoacidi determinati con il metodo di STEIN e MOORE, stabilendo il numero dei residui di amminoacidi presenti nella molecola.

Per il triptofano la determinazione è stata effettuata sia con il metodo della N-bromosuccinimide, che secondo il metodo spettrofotometrico.

Summary. — The AA. describe the purification of ficin from *Ficus* latex as well as from latex powder, and its crystallization.

Some characteristics of this enzyme are determined and particularly its proteolytic activity as compared with trypsin and papain in the presence of inhibitors and activators.

Molecular weight determined by sedimentation is 26,500.

The ficin thus purified has been hydrolyzed and the amino-acids determined through the STEIN and MOORE method. The number of amino-acids residues present in the molecule has been established.

Tryptophan determination has been effected both with the N-bromosuccinimide and the spectrophotometric method.

Tra gli enzimi proteolitici di origine vegetale hanno particolare importanza la papaina, la ficina e la bromelina.

(*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.*, 93, 1239 (1963).

(**) Istituto di Chimica della Facoltà di Medicina dell'Università Cattolica del S. Cuore - Centro Nazionale per la Chimica del Farmaco e le Sostanze biologiche attive del C.N.R. - Roma.

La papaina come è noto, si ricava dalla *Carica papaya* pianta che vegeta nei tropici. Date le numerose applicazioni pratiche lo studio della papaina è stato particolarmente approfondito da vari ricercatori. La papaina è stata riconosciuta come un enzima polipeptidico, la cui sequenza di amminoacidi è stata quasi completamente chiarita dagli studi di E. SMITH, J. R. KIMMEL e A. LIGHT (1).

La bromelina, proteasi presente in molte bromeliacee e ricavata dall'ananas (*Bromelia ananas* L.) è stata recentemente purificata e studiata da T. MURACHI e H. NEURATH (2).

La ficina che si trova nel lattice delle piante del genere *Ficus* è anch'essa un enzima proteolitico di natura polipeptidica.

Nelle regioni del bacino amazonico e dell'Orinoco (Brasile, Perù, Colombia, Ecuador, Venezuela e le Guyane) il lattice di *Ficus*, generalmente di *Ficus antihelminthica* si usa largamente nella medicina popolare per combattere le parassitosi intestinali e anche nell'anchilostomiasi, seppure la presenza nel lattice di talune sostanze possa provocare fenomeni di intossicazione e di intolleranza soprattutto nei bambini.

L'azione antielmintica si è voluta attribuire alla presenza nel lattice di *Ficus* di un principio analogo alla santonina (3) mentre può venire facilmente spiegata dalle proprietà proteolitiche dell'enzima, che risulta quattro volte più attivo della papaina.

In considerazione dell'interesse presentato da questo enzima vegetale e della relativa scarsità di dati riguardanti la sua struttura, nel quadro degli studi intrapresi da alcuni anni (4) sulla flora sud-americana, abbiamo iniziato una serie di ricerche allo scopo di meglio caratterizzare questa sostanza.

La ficina è stata ottenuta allo stato cristallino da A. WALTI (5) che ne ha descritte alcune proprietà biochimiche, che consentono dedurre che si tratta di un enzima sulfidrilico in quanto viene inattivato dai reattivi dei gruppi tiolici e dagli agenti ossidanti.

I gruppi amminici liberi nella molecola non sono essenziali come ha dimostrato COHEN; acetilando la ficina non ne viene alterata nè la sua attività nè il suo campo di pH (6).

Recentemente J. E. LIENER (7) ha studiato il numero e la reattività dei gruppi tiolici nella molecola della ficina concludendo che essa deve contenere almeno due gruppi SH, uno dei quali facente parte del gruppo attivo dell'enzima, mentre un gruppo S—S non sarebbe legato all'attività enzimatica.

Dalla polvere grezza, proveniente dal lattice di *Ficus* della Colombia, si è ottenuta dopo soluzione in acqua, dialisi e successiva precipitazione da solfato ammonico una soluzione concentrata, che si purifica ulteriormente per cromatografia su DEAE-cellulosa, impiegando un tampone Tris-fosfato; in queste condizioni una parte delle proteine viene fissata alla colonna mentre la frazione che si eluisce contiene praticamente tutta l'attività proteolitica (fig. 1).

Dopo dialisi sotto vuoto contro tampone acetato si sottopone la ficina così purificata ad una nuova cromatografia su colonna di CM-cellulosa, impiegando per l'eluizione un gradiente di tampone acetato.

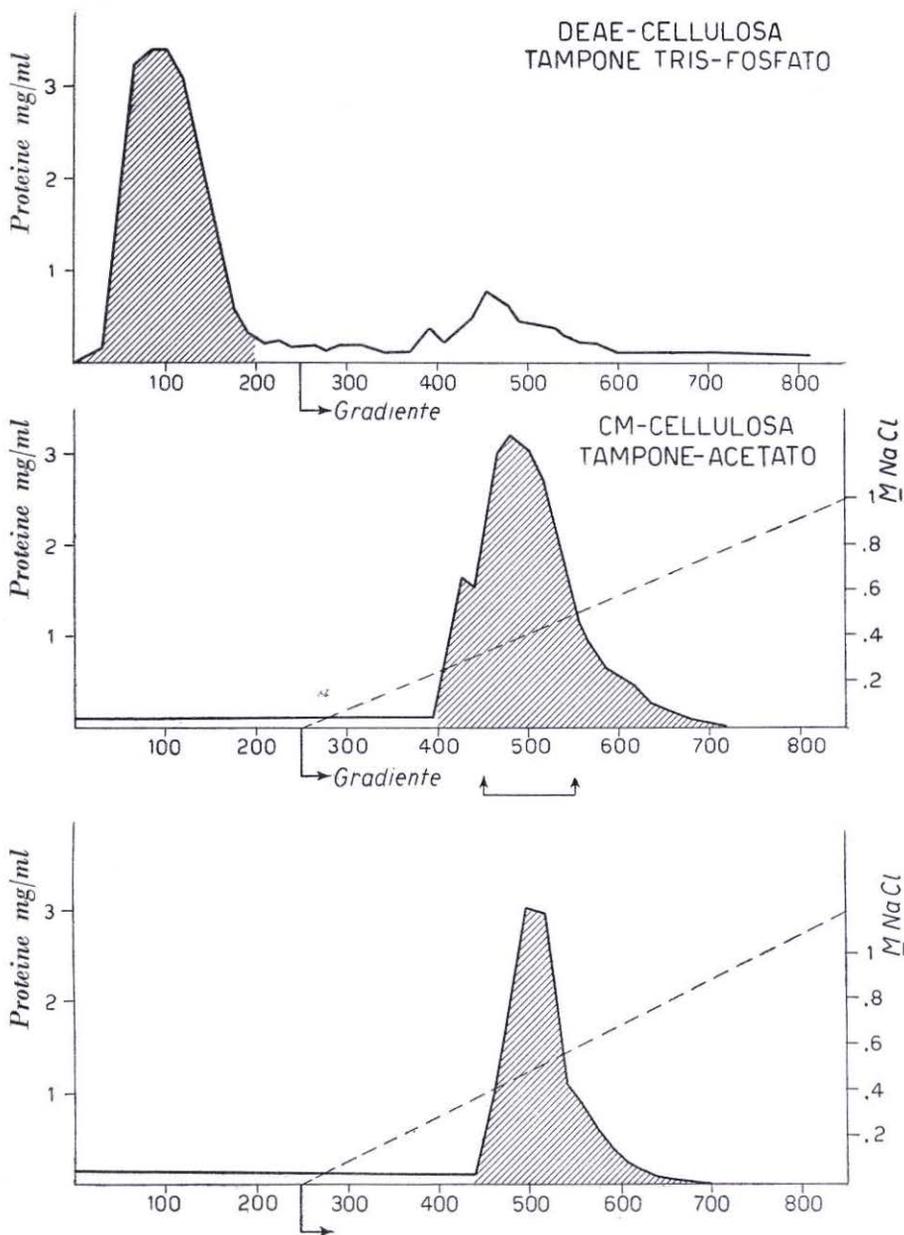


Fig. 1. — Comportamento cromatografico della ficina su colonne di cellulosa a scambio ionico.

Successive cromatografie mostrano che il comportamento cromatografico è costante e riproducibile in queste condizioni.

L'enzima si concentra per dialisi oppure si liofilizza. La soluzione concentrata lasciata a pH 5 cristallizza con il tempo.

Campioni di ficina purificati con questo metodo sono stati analizzati all'Ultracentrifuga Spinco Mod. E ed hanno dato alla sedimentazione un valore di PM pari a 26.500.

L'attività proteolitica della ficina così purificata è stata determinata sulla caseina in varie condizioni sperimentali in confronto con altre proteasi come la tripsina e la papaina. Nella fig. 2 sono riportate le curve di pH per l'attività proteolitica della ficina in confronto alla papaina.

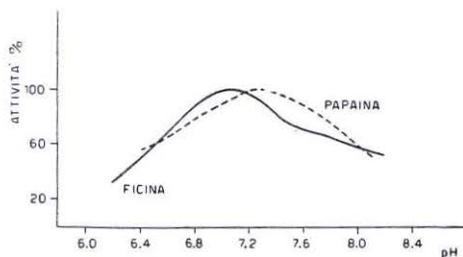


Fig. 2. — Attività enzimatica della ficina e della papaina a vari pH.

Nella fig. 2 sono riportate le curve di pH per l'attività proteolitica della ficina in confronto alla papaina. Si osserva che nel caso della ficina si ha una zona piuttosto ampia con valori ottimali intorno a pH 7, mentre per la papaina il pH ottimale è spostato verso valori superiori intorno a pH 7,4-7,6.

Nella fig. 3 sono riportati gli andamenti della equazione di Lineweaver e Burch per papaina e ficina, usando come substrato

la caseina. La costante di Michaelis pare molto simile per entrambi gli enzimi.

Si è anche studiata comparativamente l'azione di diversi inibitori specifici sull'attività della ficina e della papaina; si osserva che lo ione mercurico inibisce completamente questi enzimi che vengono invece esaltati dal versene e dalla cisteina (vedi tabella 1).

L'azione invece di due inibitori naturali della tripsina, l'ovomucoide e la farina di soia è nulla sulla ficina e sulla papaina (vedi tabella 2).

La determinazione dell'azoto totale nella ficina è stata eseguita con il micrometodo di Kjeldhal modificato da E. A. KABAT, M. M. MEYER e C. C. THOMAS⁽⁸⁾. La percentuale di azoto in tre determinazioni su tre campioni è risultata essere del 15,5 %.

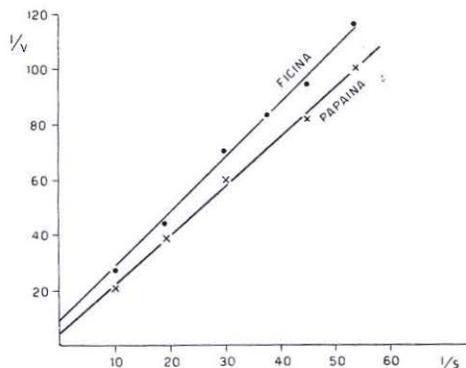


Fig. 3. — Equazione di Lineweaver e Burch per ficina e papaina usando caseina come substrato.

Per determinare gli ammino-acidi presenti nella ficina è stata impiegata la tecnica cromatografica automatica di D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN e S. MOORE (9).

A questo scopo i campioni di ficina sono stati idrolizzati con HCl 6N per 24 ore a ricadere.

Gli ammino-acidi acidi e neutri, sono stati cromatografati su colonna di Amberlite IR 120 ed eluiti con un sistema di tampone citrato pH 3,25-4,25.

TABELLA 1

Effetto di ioni sull'attività enzimatica della Ficina e della Papaina.

Ioni	Attività relativa %	
	Ficina	Papaina
—	100	100
Hg ²⁺	0	0
F ⁻	110	100
Mn ²⁺	105	95
Mg ²⁺	100	100
Versene	150	150
Cisteina	160	120

TABELLA 2

Effetto di inibitori naturali sull'attività proteolitica.

Inibitori (*)	Inibizione %		
	Tripsina	Ficina	Papaina
Ovomucoide	90	7	0
Farina di Soja	100	0	0

(*) Volumi uguali di soluzione enzimatica (10 mg/ml) e di soluzione dell'inibitore (10 mg/ml) sono incubati per 15' a 25°C, prima di misurare l'attività proteolitica.

Gli ammino-acidi basici sono stati cromatografati su colonne di Amberlite IR 120 con tampone citrato pH 5,28.

La determinazione quantitativa dei singoli ammino-acidi è stata eseguita automaticamente mediante reazione cromatica con la ninidrina. Le letture fotometriche sono state registrate in forma di curve (vedi fig. 4).

La determinazione del triptofano è stata eseguita direttamente sulla ficina sia con il metodo alla N-bromo succinimide di K. A. PATCHORNIK, W. B. LAWSON e B. WITKOP⁽¹⁰⁾ che con il metodo spettrofotometrico di T. W. GOODWIN e R. A. MORTON⁽¹¹⁾.

I risultati ottenuti nelle analisi di tre campioni di ficina (provenienti da tre diverse preparazioni) sono riportati nella tabella 3. Data la notevole

TABELLA 3

	Ficina I			Ficina IIB			Ficina III		
	μM	μg	%	μM	μg	%	μM	μg	%
Lisina	0,37	54,1	3,40	0,51	74,6	4,43	0,47	68,71	4,39
Istidina	0,11	17,1	1,08	0,11	17,1	1,02	0,10	15,52	0,99
Ammonio	2,26	40,9	2,57	2,18	39,3	2,33	2,43	43,81	2,80
Arginina	0,63	109,7	6,90	0,49	85,4	5,07	0,47	81,87	5,23
Acido aspartico	1,10	146,4	9,21	1,38	183,7	10,90	1,26	167,71	10,72
Treonina	0,56	66,7	4,20	0,65	77,4	4,59	0,62	73,85	4,72
Serina	0,85	89,3	5,62	0,87	91,4	5,42	0,77	80,91	5,17
Acido glutammico	1,39	204,5	12,86	1,41	208,9	12,39	1,32	194,21	12,41
Prolina	0,65	74,8	4,71	0,74	85,2	5,05	0,63	72,53	4,63
Glicina	1,68	126,1	7,93	1,86	139,6	8,28	1,73	129,87	8,30
Alanina	1,15	102,5	6,45	1,28	114,0	6,76	1,19	106,02	6,77
$\frac{1}{2}$ Cistina	0,45	54,1	3,40	0,45	54,1	3,21	0,45	54,07	3,45
Valina	1,01	118,3	7,44	0,93	108,9	6,46	0,87	101,92	6,51
Metionina	0,19	28,3	1,78	0,15	22,4	1,33	0,19	28,35	1,81
Isoleucina	0,38	49,8	3,13	0,47	61,6	3,65	0,43	56,40	3,60
Leucina	0,87	114,1	7,18	0,94	123,3	7,32	0,84	110,18	7,04
Tirosina	0,71	128,6	8,00	0,76	137,7	8,17	0,69	125,02	7,99
Fenilalanina	0,38	64,3	4,05	0,36	60,9	3,61	0,32	54,14	3,46
Triptofano	1.589,1			1.685,5			1.565,1		

concordanza dei dati ottenuti in ciascun esperimento è stato possibile tabulare da parte i valori medi degli esperimenti e calcolare il contenuto in micromole di ogni singolo ammino-acido per g di proteina, nonchè eseguire un calcolo approssimato del valore intero dei residui di ogni singolo ammino-

acido contenuto nella molecola della ficina, riferendosi al peso molecolare di 26.500, riportando i valori nella tab. 4.

Sono in corso esperienze per la determinazione di gruppi terminali e di idrolisi della ficina mediante enzimi specifici per poter stabilire la forma e la sequenza di questi ammino-acidi nella molecola.

TABELLA 4

	Valori medi		Residui pM 26.500
	M per 1.643,7 µg	µM per g	
Lisina	0,45	266,9	7
Istidina	0,11	65,2	2
Ammonio	2,29	1.358,3	—
Arginina	0,53	314,4	8
Acido aspartico	1,25	741,4	20
Treonina	0,61	361,8	10
Serina	0,83	492,3	13
Acido glutammico	1,38	818,6	22
Prolina	0,67	397,4	11
Glicina	1,76	1.044,0	28
Alanina	1,21	717,0	19
½ Cistina	0,45	266,9	7
Valina	0,94	557,6	15
Metionina	0,18	106,8	3
Isoleucina	0,43	255,0	7
	0,88	522,0	14
Tirosina	0,72	427,1	11
Fenilalanina	0,35	207,6	6
Triptofano	—	122,4	3

Ficina. — È stata ottenuta dal lattice di *Ficus* proveniente dal *Ficus anthelmintica* Ric. o *Ficus radula* Willd., conosciuto in Brasile come Lombrigueira o Caxinguba.

Il lattice conosciuto anche nei paesi di lingua spagnola come *leche de ojé*, o *leche de Higueroña* è stato ottenuto da Iquitos in Perù.

Della stessa origine è anche della polvere grezza di ficina.

Altri campioni sono stati ottenuti da piante provenienti dal Rio Magdalena in Colombia.

Desideriamo ringraziare per l'invio di questi campioni il servizio di Cooperacion del Perù e il Prof. G. NAVARRO della Università Javeriana (Bogotà).

Purificazione della ficina. — Grammi 10 della polvere grezza, preparata dal lattice di Fico, si disciolgono in 100 ml di HCl 0,01 N. La sospensione così ottenuta, torbida e leggermente gialla viene direttamente dializzata per 24 ore in camera fredda, contro acqua distillata e quindi centrifugata per 30' a 6.000 rpm. Il precipitato si scarta, mentre il supernatante chiaro e leggermente giallognolo viene ritenuto.

Grammi 30 di solfato di ammonio si aggiungono quindi a 100 ml del supernatante e si lascia per un'ora a 4°C. In queste condizioni la maggior parte dell'attività proteolitica viene precipitata e si raccoglie per centrifugazione. Il precipitato si lava ancora con una soluzione al 30 % di solfato di ammonio, viene centrifugato e quindi si raccoglie e si discioglie in 50 ml di acqua distillata. La soluzione quindi si dializza per 3 giorni, contro acqua, allo scopo di rimuovere tutto il solfato di ammonio.

A questo punto la soluzione di ficina viene ulteriormente purificata mediante cromatografia su colonna di cellulosa a scambio ionico.

Millilitri 15 della soluzione di ficina, contenenti circa 500 mg della enzima, si dializzano contro campione Tris-fosfato 0,05 M, pH 7,2 e quindi si applicano su una colonna di DEAE-cellulosa, previamente equilibrata con lo stesso tampone. Le dimensioni della colonna, sono circa 16 × 2 cm. Dopo che la soluzione si è adsorbita alla colonna, questa viene lavata con il tampone Tris-fosfato (circa 200 ml) e quindi si inizia una eluizione a gradiente salino, fino a concentrazione 1 M di NaCl nello stesso tampone. Si raccolgono le frazioni (di circa 8 ml), mediante un raccoglitore automatico. In queste condizioni circa l'80 % delle proteine non rimane assorbito alla DEAE-cellulosa e viene eluito nelle prime frazioni.

Queste riunite insieme si concentrano mediante dialisi sotto vuoto, contro un tampone di acetato 50 mM, pH 5. Si impiega quindi una colonna di CM-cellulosa per la successiva purificazione.

Circa 400 mg di ficina si portano su di una colonna di CM-cellulosa di 16 × 2 cm previamente equilibrata con tampone acetato e si lasciano adsorbire. Si inizia quindi un lavaggio con il tampone acetato (circa 200 ml), seguito da eluizione a gradiente lineare, realizzato mediante due camere di mescolamento, connesse in batteria. La prima camera contiene tampone acetato 50 mM, pH 5 e la seconda contiene NaCl 1 M nello stesso tampone.

Le proteine vengono misurate nelle varie frazioni mediante il metodo Lowry, usando albume bovino come standard.

Si ripete l'operazione sulla frazione così purificata e si ottiene un'altra frazione con le stesse caratteristiche. Questa si dializza nel vuoto e quindi si liofilizza in modo da ridurre il volume a 20 ml. La soluzione lasciata a sè in camera fredda a pH 5 cristallizza dopo alcuni giorni.

Determinazione del P. M. per ultracentrifugazione. — L'omogeneità e il grado di purezza della ficina così purificata sono stati controllati mediante l'analisi all'ultracentrifuga.

A questo scopo è stata impiegata una soluzione di ficina all'1 % in tampone fosfato a pH 7. La curva di sedimentazione è stata effettuata in una ultracentrifuga Beckmann Mod. E. Spinco. In queste condizioni si ottiene un unico massimo peso molecolare calcolato 26.500.

Determinazione dell'attività proteolitica della ficina. — Grammi 1 di caseina secondo HAMMARSTEN (Merck) si sciolgono in 100 ml di tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2 scaldando leggermente per facilitare la soluzione.

Ad ognuna di una serie di provette si aggiungono 1 ml di soluzione di caseina e quindi 0,1 ml di soluzione di ficina a diverse concentrazioni.

Le provette vengono incubate in b.m. a 37° per 30'. Al termine dell'incubazione la reazione viene interrotta per aggiunta di acido tricloroacetico al 5 % nella misura di 2 ml per provetta.

Le provette vengono quindi centrifugate a 3000 giri per 15'. Quindi si misura la densità ottica del supernatante a 280 m μ in uno spettrofotometro Beckmann DU.

Contemporaneamente si fanno saggi in parallelo con tripsina e papaina (impiegando a questo scopo campioni cristallizzati della Sigma Co. di Saint-Louis).

Per stabilire il pH ottimo di attività proteolitica della ficina, si effettua una prova mettendo ad incubare una stessa quantità di enzima con caseina disciolta in tampone fosfato a vari pH.

Si sono anche effettuate prove per stabilire l'attività enzimatica con concentrazioni variabili di caseina. In tal modo si ricavano i valori per la equazione di LINEWEAVER e BURCHS (vedi fig. 3).

Azione degli inibitori o attivatori della ficina. — L'azione degli attivatori o inibitori della ficina è stata studiata aggiungendo l'inibitore o l'attivatore in concentrazione 5 mM ad una soluzione dell'enzima contenente 10 mg/ml.

Dopo l'incubazione per un'ora si determina l'attività enzimatica dei vari campioni come sopra riportato.

Determinazione degli ammino-acidi. — I campioni di ficina sono stati idrolizzati per riscaldamento all'ebollizione per 24 ore con HCl 6N.

L'idrolizzato, dopo avere allontanato l'HCl per evaporazione a b.m., viene disciolto in tampone di citrato sodico 0,2 M, pH 2,2 in modo che la soluzione ottenuta contenga in 1 ml la quantità di idrolizzato corrispondente ad 1 mg della proteina.

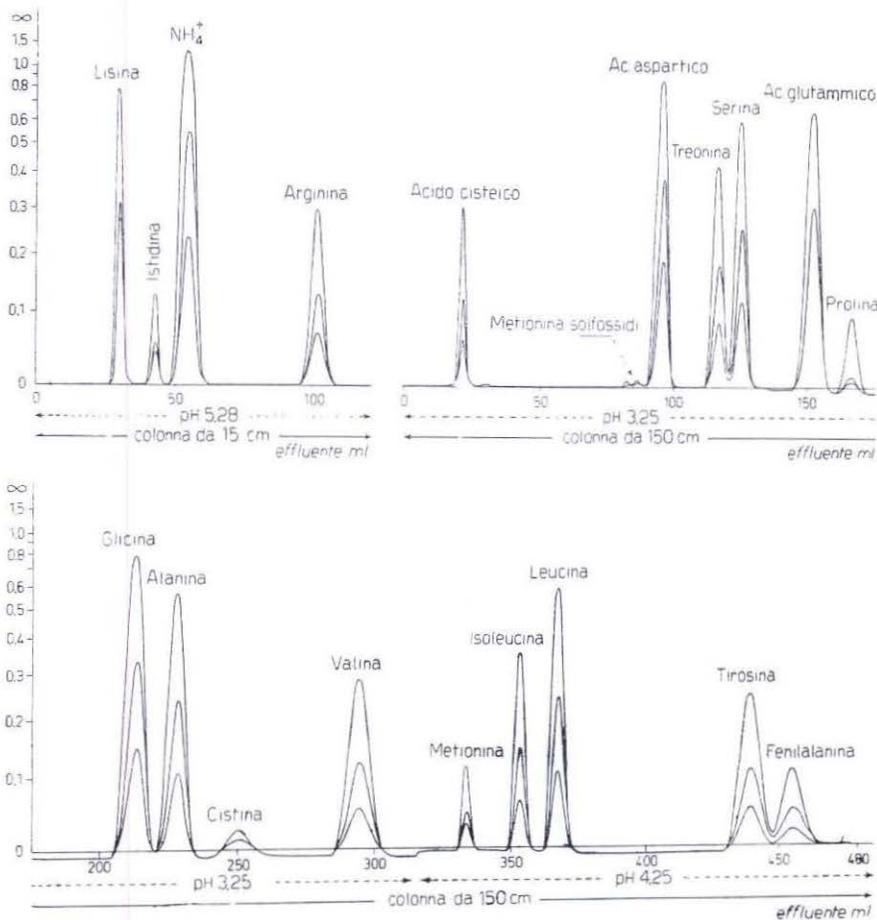


Fig. 4. — Cromatografia su colonna dell'idrolizzato della Ficus.

La composizione in ammino-acidi si determina secondo la tecnica cromatografica automatica di SPACKMAN, STEIN e MOORE (¹). Gli ammino-acidi acidi e neutri si cromatografano su colonne di Amberlite IR 120 di cm 150 × 0,9 con un sistema di eluzione costituito da soluzione tampone di citrato sodico a pH 3,25 0,2 M e pH 4,25 0,2 M, con una velocità di flusso di 30 ml per ora, ad una temperatura di 50°. Il volume totale di effluente raggiunge i 480 ml.

I dati necessari per il calcolo sono ricavati da due determinazioni dell'assorbimento a $280\text{ m}\mu$, eseguite sullo stesso campione prima dell'aggiunta di bromosuccinimide e a trasformazione completa, con uno spettrofotometro Beckman DU. La differenza fra gli assorbimenti iniziali e finali viene corretta moltiplicandola per il fattore empirico 1,31 che permette di tener conto dell'assorbimento a $280\text{ m}\mu$ dei prodotti di ossidazione del triptofano. L'assorbimento così corretto viene diviso per la estinzione molare del triptofano

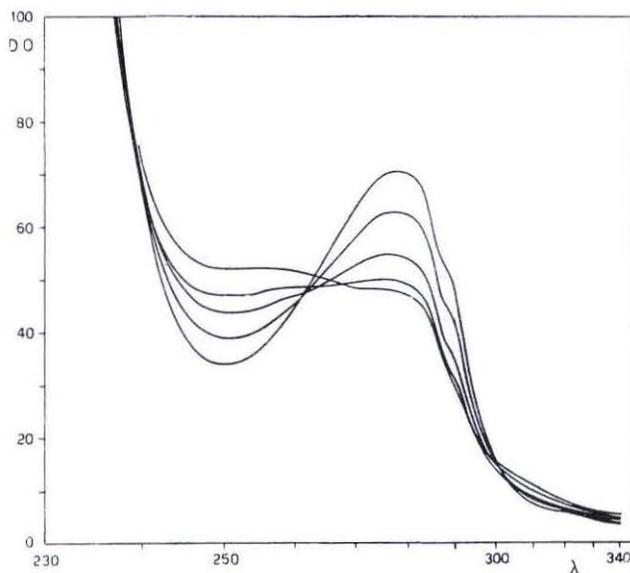


Fig. 5. — Determinazione del triptofano nella ficina con il metodo della N-bromosuccinimide.

tofolano per risalire al numero di moli dell'aminoacido contenuto nella soluzione: $\epsilon_{280\text{ m}\mu}^{\text{Tyr}} = 5820$.

Il calcolo della percentuale di triptofano contenuta nella proteina è ovvio ma deve ancora essere corretto per tener conto del fatto che nella molecola proteica è contenuto il residuo triptofil; fattore di correzione per il residuo triptofil = 1,096.

B) *Metodo Spettrofotometrico.* — Il metodo è basato sul fatto che per soluzioni proteiche in NaOH 0,1 N l'assorbimento nell'ultravioletto è dovuto quasi esclusivamente al triptofano ed alla tirosina poichè in queste condizioni l'assorbimento dovuto alla fenilalanina presenta un massimo molto basso a $258\text{ m}\mu$. È pertanto possibile, eseguendo le misure alle lunghezze

Gli ammino-acidi basici si cromatografano su colonne di Amberlite IR 120 di cm $15 \times 0,9$ impiegando come eluente un tampone di citrato sodico a pH 5,28 e 0,35 M, con una velocità di flusso di 30 ml per ora, ad una temperatura di 50°.

La velocità di flusso, per tutti e due i tipi di colonna è di 1 ml per 2', il reattivo alla ninidrina si riunisce automaticamente all'effluente nel volume di 0,5 ml ogni 2'; l'intensità del colore blu, che si sviluppa dopo 15' di permanenza della miscela in un b.m. bollente, si determina per mezzo di un sistema di fotometria continua a 540 m μ ; con lo stesso sistema, ma ad una lunghezza d'onda di 440 m μ si determina l'intensità del colore giallo sviluppato dalla reazione della ninidrina con la prolina.

I risultati delle letture fotometriche si registrano in forma di curva su di un apparecchio registratore automatico. L'integrazione delle curve così ottenute si esegue in genere con il metodo altezza — tempo — larghezza e, occasionalmente, con il metodo della addizione degli assorbimenti quando si trattava di massimi troppo bassi o con andamento asimmetrico.

DETERMINAZIONE DEL TRIPTOFANO

A) *Metodo della N-Bromosuccinimide.* — Il metodo è basato sul fatto che la N-bromosuccinimide trasforma il triptofano contenuto nelle proteine in lattone dell'acido 5-bromossindol-propionico.

Dal punto di vista spettrofotometrico questa reazione ha come conseguenza la scomparsa dell'assorbimento dell'anello indolico a 280 m μ e la concomitante comparsa di una nuova banda compresa fra 240 e 250 m μ nonchè di un'altra piccola banda tra 300 e 320 m μ .

La reazione si svolge in ambiente acido, ha un andamento istantaneo e lineare e si arresta quando sono stati consumati 1,5 ml di bromosuccinimide per 1 mole di triptofano.

Si opera su una soluzione contenente lo 0,05 % di ficina in tampone Acetato di sodio-acido acetico 0,1 M pH 4.

La reazione viene seguita allo spettrofotometro registratore Beckman impiegando un bianco costituito dal tampone e registrando lo spettro di assorbimento alle lunghezze d'onda comprese fra 340 e 240 m μ .

Si aggiungono quindi a brevi intervalli di tempo 5 μ l di una soluzione acquosa di N-bromosuccinimide al 0,178 %. Dopo ciascuna aggiunta viene registrato lo spettro di assorbimento: questa operazione permette di seguire la diminuzione della banda a 280 m μ , dovuta all'anello indolico. Le aggiunte di bromo-succinimide vengono eseguite fino a quando, con due successive aggiunte, non si osserva un'ulteriore diminuzione dell'assorbimento a 280 m μ , ottenendosi così la prova della completa ossidazione del triptofano (vedi fig. 5).

d'onda di 280,5 e 294,5 calcolare il contenuto di triptofano e tirosina applicando la formula

$$E = y A + (x - y) B \quad \text{da cui}$$

$$y = \frac{E - x B}{A - B} \quad \text{dove}$$

$x = N^{\circ}$ totale di moli in soluzione;

$y = N^{\circ}$ di moli di tirosina;

$x - y = N^{\circ}$ di moli di triptofano;

$A = \epsilon$ molare della tirosina a 280,5 $m\mu$;

$B = \epsilon$ molare del triptofano a 280,5 $m\mu$;

$E =$ estinzione della soluzione.

Si opera su soluzioni contenenti 0,01 e 0,05 % di ficina in NaOH 0,1 N.

Il valore di x viene ricavato dal rapporto fra l'assorbimento a 294,5 $m\mu$ e la estinzione molare della tirosina alla stessa lunghezza d'onda. A 294,5 $m\mu$ esiste un punto di intersezione degli spettri della tirosina e del triptofano: nei punti di intersezione l'intensità dell'assorbimento costituisce una misura diretta della concentrazione molare totale dei due amminoacidi presenti nel soluto, qualunque sia la percentuale relativa dei due componenti, mentre a qualsiasi altra lunghezza d'onda l'intensità dell'assorbimento è influenzata dalla proporzione in cui i due componenti sono contenuti. Poichè si osserva un massimo della tirosina a 294 $m\mu$ è perfettamente lecito eseguire il calcolo in base all'estinzione molare della tirosina a 294,5 $m\mu$.

Il valore di E si ricava dalla determinazione dell'assorbimento a 280,5 $m\mu$ poichè questa lunghezza d'onda corrisponde al massimo del triptofano e quindi il rapporto $\Delta\epsilon/\Delta$ per il triptofano è minimo.

Le estinzioni molarie della tirosina a 294,5 $m\mu$ ed a 280,5 $m\mu$ sono state ricavate sperimentalmente da soluzioni 0,1 mM dei due amminoacidi in NaOH 0,1 N e sono risultate le seguenti: $\epsilon_{294,5}^{\text{Tyr}} = 2420$ slit 5,2; $\epsilon_{280,5}^{\text{Tyr}} = 1660$ slit 5,8; $\epsilon_{280,5}^{\text{Tyr}} = 5450$ slit 5,8.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SMITH E., KIMMEL J. R. e LIGHT A. - Int. Congr. Biochem. 5 th Congr. Moskow, Symposium 4 (1961).
- (2) MURACHI T. e NEURATH H. - J. Biol. Chem., 235, 99 (1960).
- (3) ALTMAN R. F. A. - Bol. Inst. Pesq. Amazonas C.N.P. Rio de Janeiro 3 (Quimica) (1958).
- (4) MARINI-BETTÒLO G. B.
- (5) WALTJ A. - J. Am. Chem. Soc., 60, 493 (1938).
- (6) COHEN W. - Nature, 182, 659 (1958).
- (7) LIENER J. E. - Biochim. Biophys. Acta, 53, 332 (1961).
- (8) KABAT E. A., MEYER M. M. e THOMAS C. C. - Exptl. Immunochem, p. 282 (1954).
- (9) SPACKMANN D. H., STEIN W. H. e MOORE S. - Anal. Chem., 30, 1190 (1958).
- (10) PATCHORNIK K. A., LAWSON W. B. e WITKOP B. - J. Am. Chem. Soc., 80, 4747 (1958).
- (11) GOODWIN T. W. e MORTON R. A. - Biochem. J., 40, 628 (1946).