

46. G. PRUNER e M. BOCCACCI. — Sul decorso della reazione di ossidazione dell'idrazide dell'acido isonicotinico con ferricianuro di potassio. (*)

Riassunto. — Viene esaminata la reazione di ossidazione dell'idrazide dell'acido isonicotinico con ferricianuro di potassio, allo scopo di conoscere i prodotti secondari che si formano in tale reazione, dato che non è stato possibile nelle varie condizioni esaminate, di raggiungere i 4 equivalenti di ossidazione richiesti dalla reazione. La presenza oltre all'acido isonicotinico, come prodotto principale della reazione, di altri derivati dell'INI, viene accertata con la cromatografia su carta. Viene inoltre descritto un nuovo metodo di preparazione della 1,2-diisonicotinilidrazina e di due combinazioni della stessa con acido ferrocianidrico.

Résumé. — On examine la réaction d'oxydation de l'hydrazide de l'acide isonicotinique avec le ferricyanure de potassium, dans le but de connaître les produits secondaires qui se forment pendant cette réaction étant donné qu'il n'a pas été possible, dans les différentes conditions examinées d'atteindre les 4 équivalents d'oxydation exigée par la réaction. On montre par la chromatographie sur papier la présence, non seulement de l'acide isonicotinique comme produit principal de la réaction, mais encore d'autres dérivés de l'INI. On décrit en outre une nouvelle méthode de préparation de la 1,2-diisonicotinilhydrazine et de deux combinaisons de celle-ci avec l'acide ferrocyanhydrique.

Summary. — The AA. examine the oxidation reaction of isonicotinylhydrazine with potassium ferricyanide in order to determine the secondary products formed by such a reaction. As pointed out by the AA., it has been impossible to obtain, in various conditions, four oxidation equivalents as required by the reaction. The presence of other INI derivatives, besides isonicotinic acid, as main product of the reaction, has been determined by paper chromatography. Moreover, the AA. describe a new method for preparing 1,2-diisonicotinylhydrazine, and combination products of such a substance with hydrogenferrocyanide.

Zusammenfassung. — Es wird die Oxydationsreaktion von INH mit Kaliumferricyanid untersucht, um die in dieser Reaktion sich bildenden Begleitstoffe zu erforschen, da es bisher nicht möglich war, in den unter-

(*) Comunicazione al VII Congresso Nazionale di Chimica - Genova, 30 maggio-5 giugno 1954.

suchten Reaktionsbedingungen, die von der Reaktion geforderten 4 ossidationsequivalente zu erreichen.

Mittels der Papierchromatographie wird, ausser der Nikotinsäure als Hauptprodukt, die Gegenwart anderer Derivate des INH festgestellt.

Ferner wird ein neues Verfahren zur Herstellung von 1,2-Diisonicotinylhydrazid, sowie von zwei Verbindungen desselben mit Ferrocyansäure beschrieben.

In una precedente Nota ⁽¹⁾ fu descritto un metodo di determinazione dell'INI (isonicotinil idrazide) basato sull'ossidazione con ferricianuro e determinazione con solfato cerico del ferrocianuro che si forma.

L'ossidazione viene effettuata su mg 0,05 - 1,0 di INI in ambiente moderatamente alcalino per carbonato sodico; variazioni entro dati limiti della concentrazione di ferricianuro conducono a risultati concordanti e perfettamente riproducibili (fig. 1); una molecola di INI richiede 3,5 equivalenti di ossidazione.

Nella stessa Nota si citano altri due metodi fondati sulla ossidazione in ambiente alcalino con ferricianuro; quello di LAUBIE ⁽²⁾ che si serve

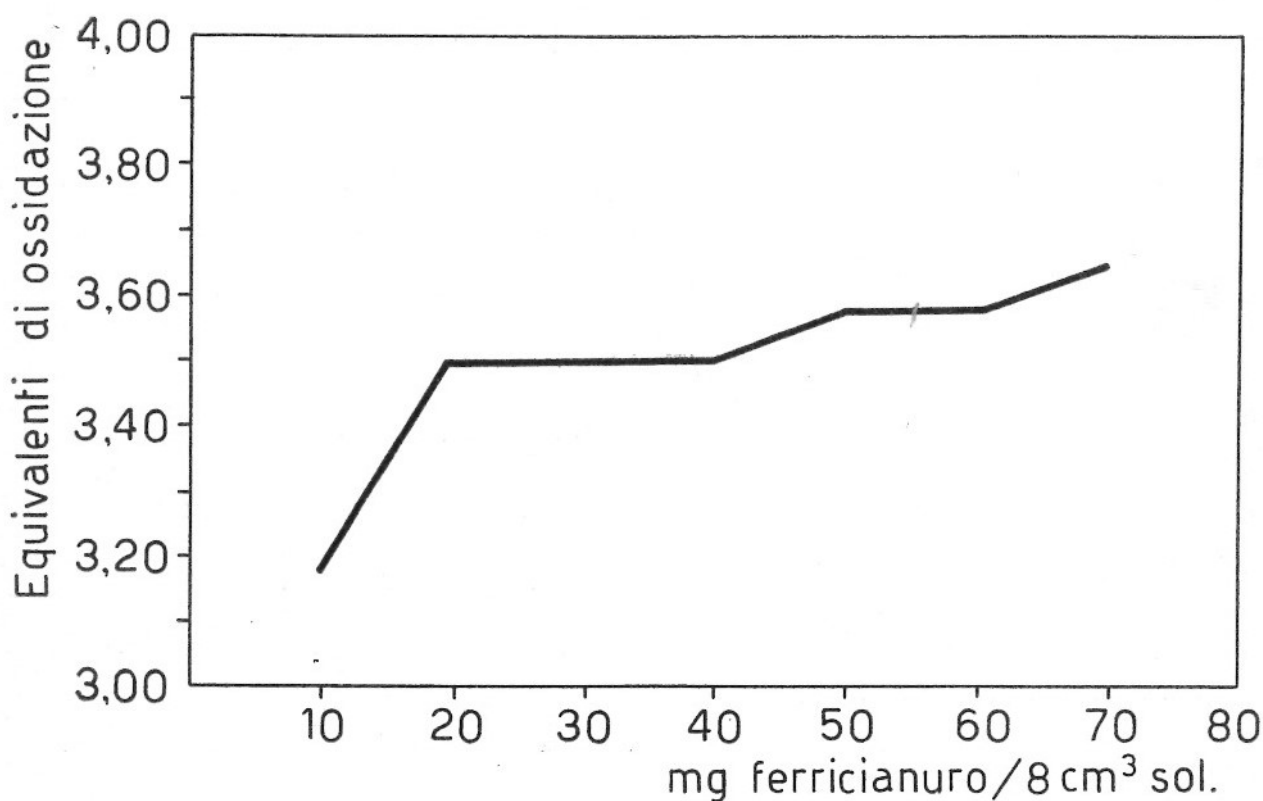
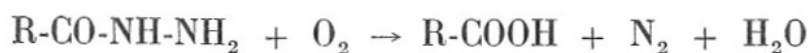


Fig. 1. - Il grafico rappresenta il rapporto tra i mg di $K_3Fe(CN)_6$ impiegati per l'ossidazione di 1 mg INI ed i corrispondenti equivalenti di ossidazione.

del colore dello stesso ferricianuro come indicatore per riconoscere la fine della reazione, e quello di HARTING ⁽³⁾ che misura l'azoto che si svolge.

LAUBIE ritiene che la reazione si svolga nel modo stechiometricamente più ovvio con consumo di 4 equivalenti di ossidazione:



Lo scarto tra 3,5 e 4,0 equivalenti di ossidazione è troppo grande per metodi che sono fondati sulla stessa reazione e che si conducono in condizioni abbastanza simili. Ci è sembrato perciò interessante sottoporre ad accurato esame i tre metodi, ciascuno nelle condizioni descritte dai tre Autori al fine di chiarire le divergenze trovate. Abbiamo ottenuto i risultati che qui brevemente riassumiamo, rimandando per i particolari alla parte sperimentale.

Il metodo di LAUBIE, eseguito sia con le modalità indicate dall'A., sia titolando con solfato di cerio il ferrocianuro che si forma, conduce sempre a 3,5 equivalenti di ossidazione, e la quantità di azoto che si svolge corrisponde al 93% di quello richiesto dalla reazione sopra descritta, cioè 0,93 grammo molecole di azoto per 1 grammo molecola di INI.

Nel metodo di HARTING la quantità di ferrocianuro che si forma, titolata con solfato cerico, corrisponde a 3,9 equivalenti di ossidazione, mentre la quantità di azoto che si sviluppa corrisponde a quello che prevede la equazione, cioè ad 1 grammo molecola.

Il metodo ceriometrico infine, fornisce 3,5 equivalenti di ossidazione nella titolazione del ferrocianuro con solfato cerico e 0,95 gr. molecole di azoto.

TABELLA 1.

Metodo	gr. mol. N svolto	Equivalenti di ossidazione
Ceriometrico	0,95	3,5
Laubie	0,93	3,5
Harting	1,00	3,9

Solo il metodo di HARTING quindi dà risultati prossimi o corrispondenti a quelli teorici; negli altri due metodi non solo l'ossidazione è incompleta ma non vi è corrispondenza tra i valori ceriometrici della ossidazione $\frac{3,5}{4,0} = 0,875$ ed i valori gassometrici di 0,93 e 0,95; sfug-

R_f	Confronto	Laubie estr. etere	Laubie estr. alc. isobut.	Harting estr. etere	Harting estr. alc. isobut.	Colore delle macchie
0,97						marrone
0,94						grigio-verde
0,78						{ marrone (crom.a) rosa (crom.c)
0,58						marrone
0,36						avana
0,30						viola
—						
	a	b	c	d	e	

Fig. 2. - Cromatogrammi di estratti eterici ed isobutanolici dei liquidi della reazione in ambiente alcalino tra INI e ferricianuro di potassio: nel cromatogramma *a* la macchia ad R_f 0,30 = acido isonicotinico ($50\mu g$), quella ad R_f 0,36 = 1,2-diisonicotinilidrazina ($50\mu g$), e quella ad R_f 0,78 = INI ($50\mu g$). La macchia del cromatogramma *a* ad R_f 0,78 (INI) è di color marrone, mentre del cromatogramma *c* avente lo stesso R_f è di color rosa (fugace).

gono pertanto alla completa ossidazione prodotti che si dovrebbero ritrovare nel liquido di reazione.

Abbiamo cercato di isolare tali prodotti di non completa ossidazione, servendoci della cromatografia su carta.

Operando sul liquido della reazione eseguita secondo LAUBIE, oltre all'acido isonicotinico, si rilevano piccole quantità di altre 4 sostanze (fig. 2); nel liquido della reazione eseguita secondo HARTING, oltre all'acido isonicotinico si rilevano quantità molto piccole di una sola sostanza identica a una delle quattro ottenute col metodo di LAUBIE. Nes-

suna delle sostanze isolate è stata da noi identificata; l'unico prodotto di confronto a nostra disposizione era l'1,2-diisonicotinilidrazina (DINI) che, del resto, non fu riscontrata nei prodotti di reazione. Difatti essa nelle condizioni dei tre metodi studiati viene completamente ossidata ad acido isonicotinico senza dare reazioni secondarie.

Si può pertanto affermare che la reazione di ossidazione dell'INI con ferricianuro non decorre in modo semplice, ma oltre ad acido isonicotinico conduce a prodotti secondari, non ancora identificati, di non completa ossidazione.

Nel corso degli esperimenti è stata preparata con un nuovo metodo la 1,2-diisonicotinilidrazina che venne recentemente studiata da Fox e GIBAS ⁽⁴⁾ che la trovarono di potere tubercolostatico in vivo di poco inferiore alla INI e di tossicità sul topo inferiore alla prima. In vitro invece la attività tubercolostatica della DINI è trascurabile, come dimostrato da M. N. SHCHUKINA e Coll. ⁽⁵⁾ e da M. DE CARO del Laboratorio di microbiologia di questo Istituto.

Sono state anche preparate due combinazioni della DINI con l'acido ferrocianidrico, che hanno interesse puramente chimico; non è però da escludere che una simile combinazione della DINI possa avvenire con altri radicali acidi, in modo da formare composti ad azione tubercolostatica.

PARTE SPERIMENTALE

Misure gassometriche. — Per la misura dello svolgimento di azoto abbiamo usato una apparecchiatura simile a quella descritta da HARTING.

Per il metodo ceriometrico, che richiede la misura di piccoli volumi di azoto, ci siamo serviti di un microureometro.

I valori riportati nella tabella I sono la media di parecchie determinazioni.

Cromatografia su carta. — Abbiamo seguito la tecnica di HUEBNER ⁽⁶⁾ che usa come solvente l'n-butanolo saturato con idrato di ammonio 1,5 N e rivela le macchie dei componenti esponendo la carta a vapori di BrCN e quindi spruzzando con soluzione di benzidina al 0,25% in alcool di 50°.

Unica variante da noi apportata è che dopo spruzzamento con la soluzione di benzidina, le strisce ancora umide vengono nuovamente espo-

ste ai vapori di BrCN. In tal modo si aumenta notevolmente la sensibilità del metodo.

Le soluzioni da cromatografare vengono preparate estraendo i liquidi di reazione alcalini prima a lungo con etere e poi con alcool isobutilico.

Dopo l'estrazione i solventi vengono evaporati ed il residuo ripreso in 0,1 - 0,2 cm³ di acqua. Nella fig. 2 sono riprodotti vari cromatogrammi ottenuti col metodo ascendente da tali soluzioni, di confronto con una soluzione contenente INI, acido isonicotinico e DINI. Per tutte le prove ci siamo serviti di un campione di INI di estrema purezza e che alla cromatografia dava solo una macchia.

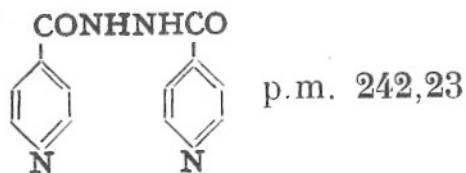
Dall'esame dei cromatogrammi si rileva che con il metodo di LAUBIE si formano due sostanze estraibili con etere ($R_f=0,94$ e $0,97$ crom.b) e due sostanze non estraibili con etere ma che passano poi in alcool isobutilico ($R_f=0,78$ e $0,58$ crom.c); notare che la macchia con $R_f=0,78$ è di color rosa, mentre nel confronto la macchia dell'INI che ha ugual R_f è di color mattone. Il grosso è costituito da acido isonicotinico, ($R_f=0,30$) il cui sale sodico solo in parte viene estratto con alcool isobutilico dalla soluzione alcalina.

Con il metodo di HARTING, invece, si forma, oltre all'acido isonicotinico, una sola sostanza presente in piccola quantità, estraibile con etere e che alla cromatografia si rivela identica ad una delle due sostanze presenti nell'estratto eterico dei liquidi di reazione secondo LAUBIE ($R_f=0,97$).

Non ci è stato possibile sin'ora identificare alcuna di queste sostanze secondarie che si formano nel corso della reazione. Per il confronto cromatografico disponevamo soltanto della DINI ($R_f = 0,36$) oltre che dell'acido isonicotinico.

METODO DI PREPARAZIONE DELLA DINI.

La 1,2-diisonicotinilidrazina (DINI)



è stata da noi ottenuta per ossidazione dell'INI con ferricianuro in ambiente alcalino (in sol. tamponata a pH 10 ca.). La sua preparazione è stata effettuata per la prima volta da GRAF (7) trattando il cloruro di isoni-

cotinile con idrato di idrazina, oppure l'INI con nitrato di amile. Un metodo più recente viene descritto da GAUTIER ⁽⁸⁾ che la ottiene per ossidazione dell'INI con ossido mercurico.

Si ottiene la DINI per ossidazione dell'INI con ferricianuro di potassio, operando nel seguente modo: si prepara la soluzione seguente:

fosfato di sodio dodecaidrato	g 4,16
fosfato monopotassico	g 0,71
carbonato di sodio secco	g 2,14
acqua q. b. a	cm ³ 500

Si scioglie 1 g di INI in 200 cm³ di tale soluzione che ha pH 10 ca. A parte si sciolgono g 10 di ferricianuro di potassio in 200 cm³ della stessa soluzione. Si versa quindi poco per volta la soluzione di ferricianuro in quella dell'INI, sotto continua agitazione. Ultimata l'aggiunta, che provoca un forte sviluppo gassoso, si lascia depositare per qualche ora il precipitato in frigorifero, quindi si raccoglie alla pompa e si lava bene con acqua.

Si ottengono dei cristalli incolori aghiformi che si ricristallizzano bene da acqua nella quale sono pochissimo solubili a freddo (0,03%). La resa è del 40% ca. Il prodotto cristallizza con due molecole di acqua che perde a 100°, ha p. f. 263°, forma un picrato con p. f. 273° e, secco, dà alla analisi il 23,15% di azoto. Ha una funzione debolmente acida e dà un sale sodico di color giallo che si può ricristallizzare da alcool.

Il prodotto ha tutte le caratteristiche della DINI, che, per i confronti, abbiamo preparato col metodo di Graf per ossidazione dell'INI con nitrito di amile.

Il suo spettro di assorbimento nell'U.V. in NaOH N/10 è riportato nella figura 3 di confronto con gli spettri dell'INI e dell'acido isonicotinico.

La DINI nelle condizioni dei metodi di LAUBIE e di HARTING e ceriometrico, viene completamente ossidata ad acido isonicotinico (4 equivalenti di ossidazione).

METODI DI PREPARAZIONE DEI FERROCIANURI DELLA DINI.

Durante la messa a punto del metodo di preparazione della DINI, ci capitava a volte, in determinate condizioni, di osservare la formazione di cristalli rossi romboedrici, che filtrati e seccati davano all'analisi

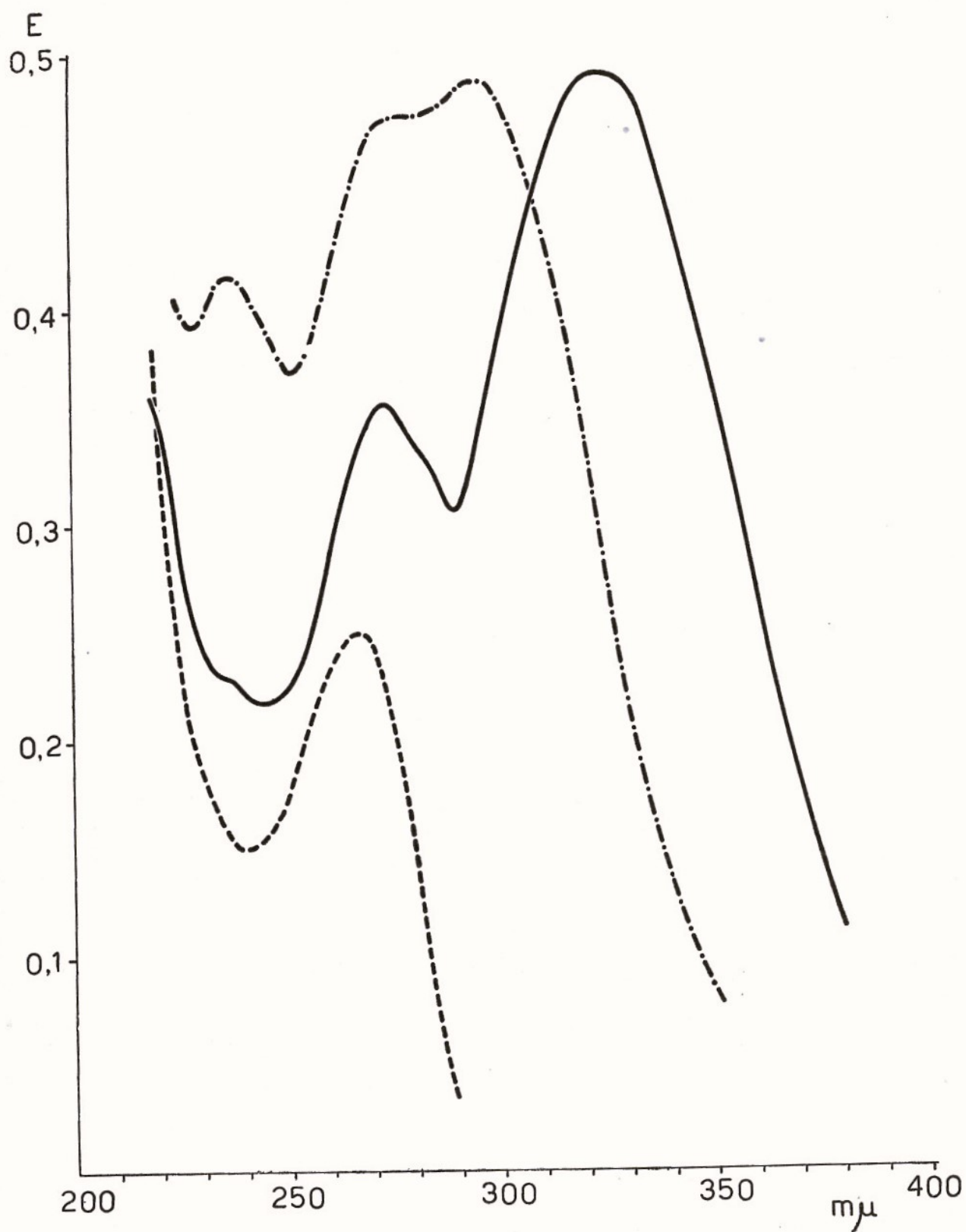


Fig. 3. - Curve di assorbimento nell'U.V. in NaOH N/10 di:

- acido isonicotinico 10^{-4} M
- · · · · idrazide isonicotinica 10^{-4} M
- 1,2-diisonicotinilidrazina $5 \cdot 10^{-5}$ M

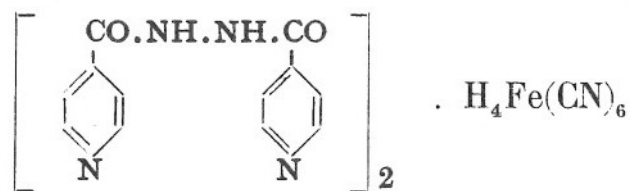
l'8,0% di Fe mentre le loro soluzioni davano con FeCl_3 precipitato di ferrocianuro ferrico.

Il contenuto in ferro corrispondeva a quello calcolato per un sale neutro dell'acido ferrocianidrico con la DINI. Per la sua identificazione abbiamo operato nel seguente modo: una quantità pesata del prodotto cristallino secco, si sospende in alcool assoluto e poi si aggiunge NaOH 10% goccia a goccia sino a scomparsa dei cristalli rossi. Si filtra con cura il ferrocianuro di sodio formatosi lavandolo più volte con alcool assoluto. Il filtrato si porta a volume con NaOH N/10.

Lo spettro nell'U.V. di tale soluzione risulta identico a quello della DINI. Dal valore dell'assorbimento a 325 $\text{m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 438$) si può calcolare che la DINI è presente in misura del 69,16% nel prodotto in esame.

Per neutralizzazione della soluzione alcalina, si formano cristalli aghiformi con p. f. 263° (il p. f. di miscela con DINI rimane a 263°).

Il precipitato di ferrocianuro di sodio rimasto sul filtro, si scioglie in acqua in modo quantitativo e si porta a volume. Determinando il ferrocianuro ceriometricamente, si può calcolare che l'acido ferrocianidrico costituisce il 30,84% del prodotto in esame. Esso ha quindi la seguente costituzione:



Si può preparare:

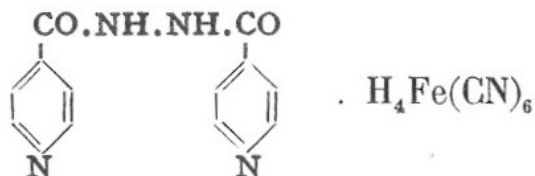
a) dall'INI: si mescolano ugual volumi di una soluzione di INI al 4% e di una soluzione di ferricianuro potassico al 28%. Precipita dapprima la DINI che poi si combina lentamente col ferrocianuro dando il suo sale neutro;

b) direttamente dalla DINI: si scioglie 1 g di DINI in 20 cm^3 di acqua con poche gocce di HCl diluito; aggiungendo a tale soluzione 20 cm^3 di soluzione di ferrocianuro di potassio al 10%, si ha la formazione immediata dei cristalli rossi del sale, la cui solubilità è del 0,15% ca. in acqua.

Se la combinazione si fa avvenire in ambiente molto acido, invece del sale neutro si forma il sale acido della DINI con l'acido ferrocianidrico, che precipita in forma di cristalli gialli invece che rossi.

Il prodotto ha un contenuto in ferro del 12,2% ed analizzato col metodo già descritto per il sale neutro, risulta costituito dal 53% di DINI e dal 47% di acido ferrocianidrico.

Esso ha quindi la seguente costituzione:



Per ottenerlo si opera nel seguente modo: g 1,60 di DINI si sciolgono in 40 cm³ di acqua con l'aggiunta di 8 cm³ di HCl diluito. Per aggiunta di 50 cm³ di ferrocianuro di potassio al 10% si formano istantaneamente i cristalli gialli del ferrocianuro acido della DINI.

Tali cristalli, risospesi in acqua hanno la particolarità di trasformarsi rapidamente nei cristalli rossi del sale neutro.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PRUNER G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 434 (1954).
- (²) LAUBIE H. - Bull. Pharm. Bordeaux, 90: 106 (1952).
- (³) HARTING H. - J. Am. Pharm. Ass., 42: 323 (1953).
- (⁴) FOX H. H. e GIBAS J. T. - J. Org. Chem., 17: 1633 (1952).
- (⁵) SHCHUKINA M. N. e Coll. - Chem. Abstr., 46: 10431i (1952).
- (⁶) HUEBNER C. - Nature, 167: 119 (1951).
- (⁷) GRAF R. - Journ. prakt. Chemie, 138: 289 (1953).
- (⁸) GAUTIER J. A. - Comp. rend., 222: 394 (1946).