

49. G. B. MARINI-BETTOLO e MAURY MIRANDA. — Sul comportamento alla cromatografia e alla elettroforesi su carta di alcuni derivati ammoniaci quaternari.

**Riassunto.** — Viene studiato il comportamento cromatografico su carta di numerosi composti caratterizzati dal gruppo ammonico quaternario. Mentre si è trovato che il solvente più adatto era una miscela butanolo, acido acetico, acqua si è anche riscontrato che variando le percentuali dell'acido acetico si potevano avere per una sola sostanza due macchie, che devono essere attribuite rispettivamente all'anione alogeno e al catione ammonico.

A questo fine sono state effettuate numerose prove con questi composti di elettrocromatografia su carta che confermano la natura delle diverse macchie.

**Résumé.** — L'on étudie le comportement chromatographique sur papier de plusieurs composés caractérisés par le groupe ammonium quaternaire. Tandis qu'on a trouvé que le meilleur solvant était un mélange de butanol, acide acétique et eau, on a aussi constaté qu'en variant les pourcentages de l'acide acétique on obtenait deux taches pour une même substance, qui doivent être attribuées respectivement à l'anion halogène et au cation ammonique. La nature de ces taches a été confirmée aussi par la électrochromatographie sur papier.

**Summary.** — The behaviour in paper chromatography of a number of compounds characterized by the quaternary ammonium group was studied. During this study it was established that the most suitable solvent was a butanol-acetic acid-water mixture. It was also found that by varying the acetic acid percentages two spots could be produced for a single substance, one due to the halogen anion and the other to the ammonium cation.

A number of tests were carried out with these compounds by the paper electrochromatography method.

**Zusammenfassung.** — Das Verhalten zahlreicher Alkylammoniumsalze bei der Papier chromatographie wird untersucht. Es wurde festgestellt, dass das beste Lösungsmittel eine Mischung von Butanol, Essigsäure, und Wasser ist; weiterhin konnte man beobachten, dass bei Änderung der Essigsäure Konzentration für eine einige Substanz zwei Flecke auftreten, von der eine dem Halogenion, von der ander dem Ammoniumkation zuzuschreiben ist.

Zahlreiche Papier elektrochromatographische Versuche mit diesen Gemischen bestätigen die Natur der verschiedenen Flecke.

---

Nell'intento di stabilire la purezza di alcuni sali ammoniaci quaternari, difficilmente purificabili e caratterizzabili <sup>(1)</sup>, come pure per seguire il destino di tali composti negli organismi, abbiamo voluto impiegare la cromatografia su carta, che in questi casi poteva dimostrarsi molto utile date le piccole quantità di sostanze da mettere in evidenza.

Nella letteratura chimica, malgrado l'interesse che tali composti presentano, non si trova che la questione sia stata ancora direttamente affrontata.

Vanno ricordate le osservazioni di MUNIER e MACHEBOEUF <sup>(2)</sup> sulla colina e la neurina e quelle più recenti di WHITTAKER <sup>(3)</sup> che ha con successo applicato la cromatografia su carta al riconoscimento dei prodotti di idrolisi della succinil-colina.

Un altro aspetto dello studio dei sali di ammonio quaternari per mezzo dei metodi cromatografici è offerto dai lavori di KLEBRLE, SCHMID e KARRER <sup>(4)</sup> sui curari naturali.

Per questo motivo ci è sembrato interessante approfondire lo studio del comportamento cromatografico dei sali ammoniaci quaternari ed in particolare di alcuni derivati dotati di interesse biologico e farmacologico.

A questo scopo abbiamo esaminato diversi composti caratterizzati da una o più funzioni ammoniache quaternarie sotto forma di bromuri e di ioduri.

Dopo diverse prove preliminari, è stato trovato che il solvente più indicato per queste separazioni era una miscela di butanolo-acido acetico-acqua (4,3 - 1,4 - 4,3); in queste condizioni, infatti, si ha una buona separazione.

Va osservato che se si rivelano le macchie con iodio <sup>(5)</sup> appaiono, per ogni sostanza due macchie, anche se questa è stata accuratamente purificata.

Dato che, operando con miscele di diverse sostanze, non appaiono due macchie per ogni sostanza, ma tante macchie quante sono le sostanze

---

<sup>(1)</sup> ROGERS, BOVET, LONGO e MARINI-BETTOLO - *Experientia*: 9, 260 (1953).

<sup>(2)</sup> MUNIER - *Bull. Soc. Chim.* 833 (1952).

<sup>(3)</sup> WHITTAKER - *Experientia*: 7, 217 (1951); WHITTAKER e WIEJSUNDERA: *Biochem. J.* 50, 475 (1953)

<sup>(4)</sup> *Helv. Chim. Acta* 35, 1864 (1952).

<sup>(5)</sup> MARINI-BETTOLO e GUARINO - *Experientia* 6, 309 (1950).

più una, nel caso che si impieghino tutti ioduri o tutti bromuri, abbiamo fatto l'ipotesi che una delle macchie fosse da attribuire allo ione I' e rispettivamente allo ione Br'.

Si verificherebbe cioè in ambiente acido una separazione nei sali ammonici quaternari in anione e catione, come avviene per i sali inorganici (6) e anche nel caso di alcuni sali organici come picrati e tartrati.

Ulteriori prove con numerosi derivati hanno confermato che i diversi ioduri di alchil-ammonio danno due macchie, una delle quali con  $R_F$  che praticamente si aggirano tra 0,32 e 0,35.

Tale macchia dà la reazione specifica dello iodio con nitrato di argento. Il valore dell' $R_F$  è vicino a quello riportato da M. LEDERER (7) per

TABELLA 1.

$R_F$  di alcuni sali ammonici quaternari. Carta Whatman 1. Solvente butanolo-acido acetico-acqua (4,3-1,4-4,3).

Sostanze	$R_F$	$R_F'$
$CH_3CH_2CHN(CH_3)_3J$	0,37	0,67
$CH_3CH_2CH_2ON(CH_3)_3J$	0,39	0,70
$CH_3ON(CH_3)_3J$	0,37	0,53
$CH_3N(CH_3)_3Br$	0,26	0,43
$C_2H_5N(C_2H_5)_3J$	0,33	0,61
$C_2H_5N(CH_3)_3J$	0,37	0,52
$C_2H_5ON(CH_3)_3J$	0,37	0,64
Flaxedil (Triodoetilato di galamina)	0,37	0,40
Succinilcolina ioduro	0,38	0,39
Decametonio ioduro	0,37	0,54
1216 IS ioduro (*)	0,38	0,84
1142 IS bromuro (**)	0,23	0,29
Ammonio ioduro	0,37	
Metilammina cloridrato		0,52

(6) LEDERER M. - Science 110, 115 (1949); BURSTALL, DAVIES, LINSTEAD e WELLS - J. Chem. Soc. 516 (1930).

(7) Chromatographie. Hermann, Paris; 1952, pag. 54.

(\*) Gazz. Chim. Ital. 23, 352 (1953) 1-metil-N-tert-butil-benzilammina iodometilato

(\*\*) Palazzo e Virno: Farmaco, in stampa: dibromuro di esamtilen-bis (acetammino-dimetil-ammonio).

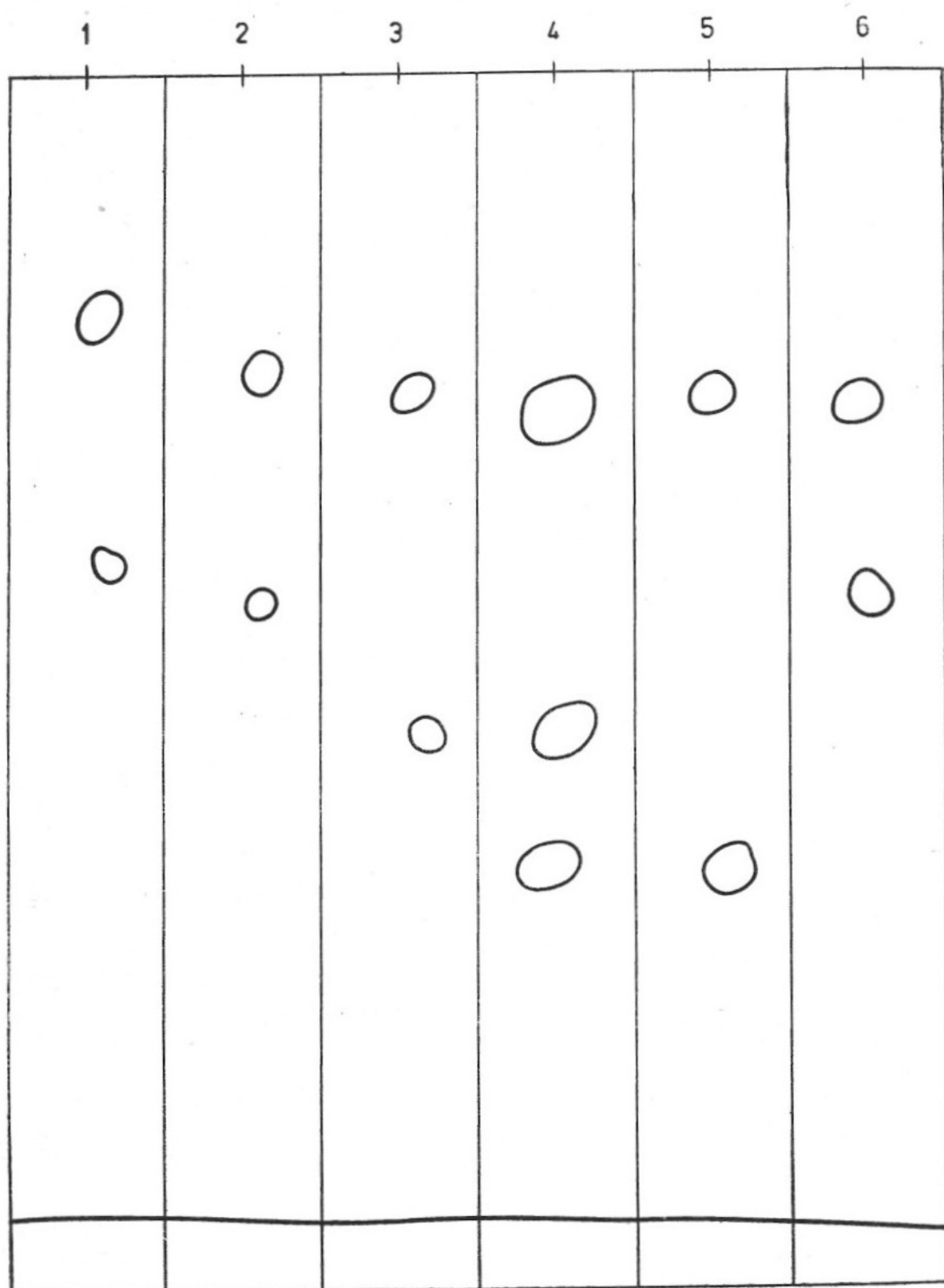


Fig. 1. - Cromatografia su carta Whatman 1, solvente butanolo-acido acetico-acqua (4,3-1,4-4,3) di alcuni derivati ammonici quaternari. Rivelazione con vapori di iodio. 1) Bromuro di tetrametilammonio; 2) ioduro di etil-trimetilammonio; 3) ioduro di propil-trimetilammonio; 4) ioduro di propil-trimetilammonio + ioduro di propossi-trimetilammonio; 5) ioduro di propossi-trimetilammonio; 6) ioduro di etil-trimetilammonio.

l' $R_F$  dello ione  $I'$  in diversi ioduri inorganici e coincide con quello ottenuto da noi con lo ioduro ammonico e l'acido iodidrico ( $R_F$  0,36).

Nella Tabella 1 sono riportati gli  $R_F$  delle macchie ottenute con diversi sali ammoniacali quaternari. Nella fig. 1 è riportata una cromatografia di confronto tra diversi derivati di questo tipo.

Si può anche osservare che in alcuni casi nei quali non si ha netta separazione dell'alogenuro dal catione, appare una diversa colorazione

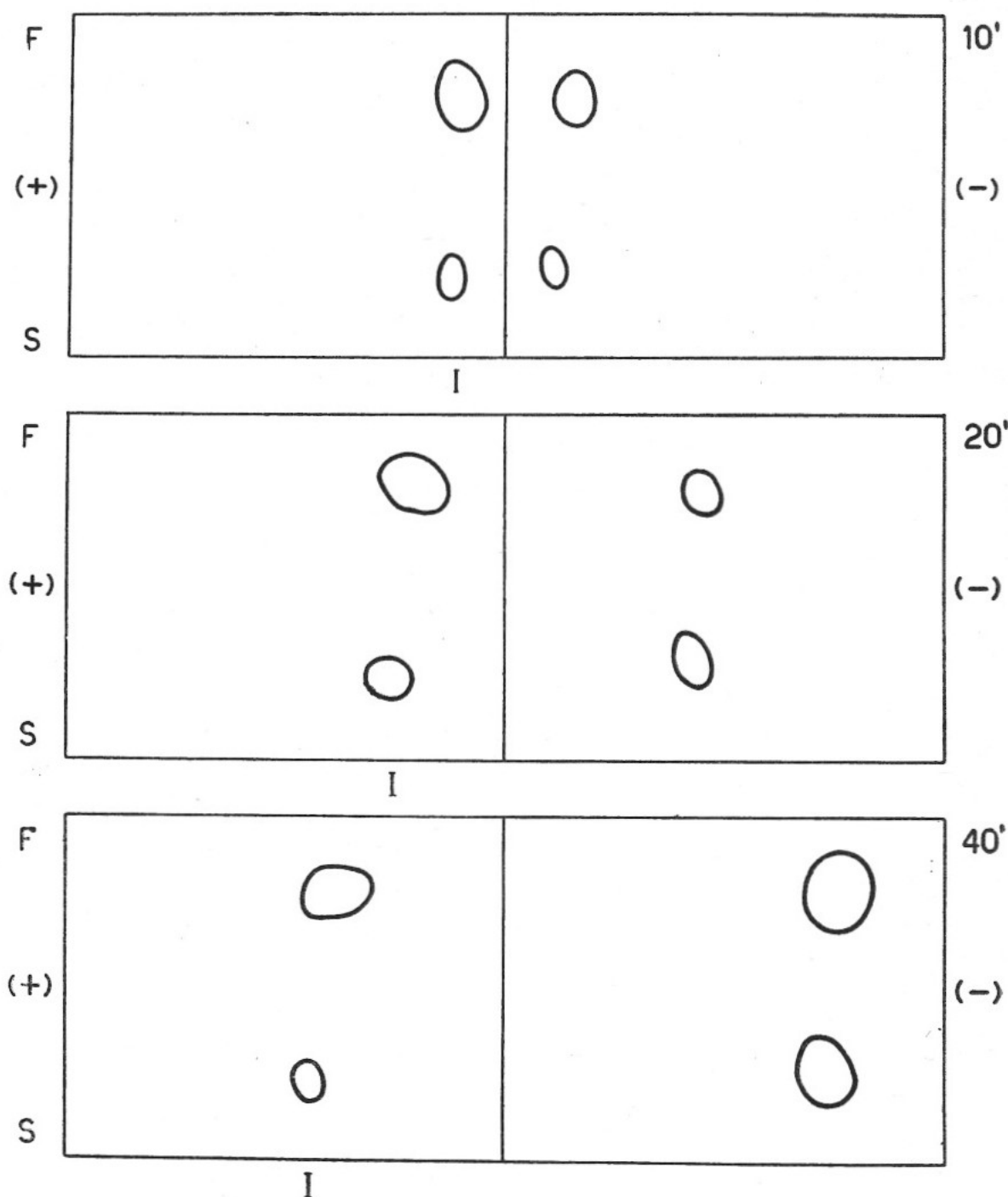


Fig. 2. - Elettroforesi su carta del Flaxedil (F) e della succinilcolina (S). Rivelazione con vapori di iodio. Le macchie che si ritrovano verso l'anodo vanno attribuite allo ione  $I'$ . La linea centrale rappresenta il punto di origine.

della macchia che si divide in due zone quando si riveli con vapori di iodio.

La sensibilità del metodo per mettere in evidenza tali sostanze va da 4  $\mu\text{g}$  a 10  $\mu\text{g}$ .

Una interessante conferma a quanto sopra è il comportamento all'elettroforesi su carta degli stessi sali ammonici quaternari. Le

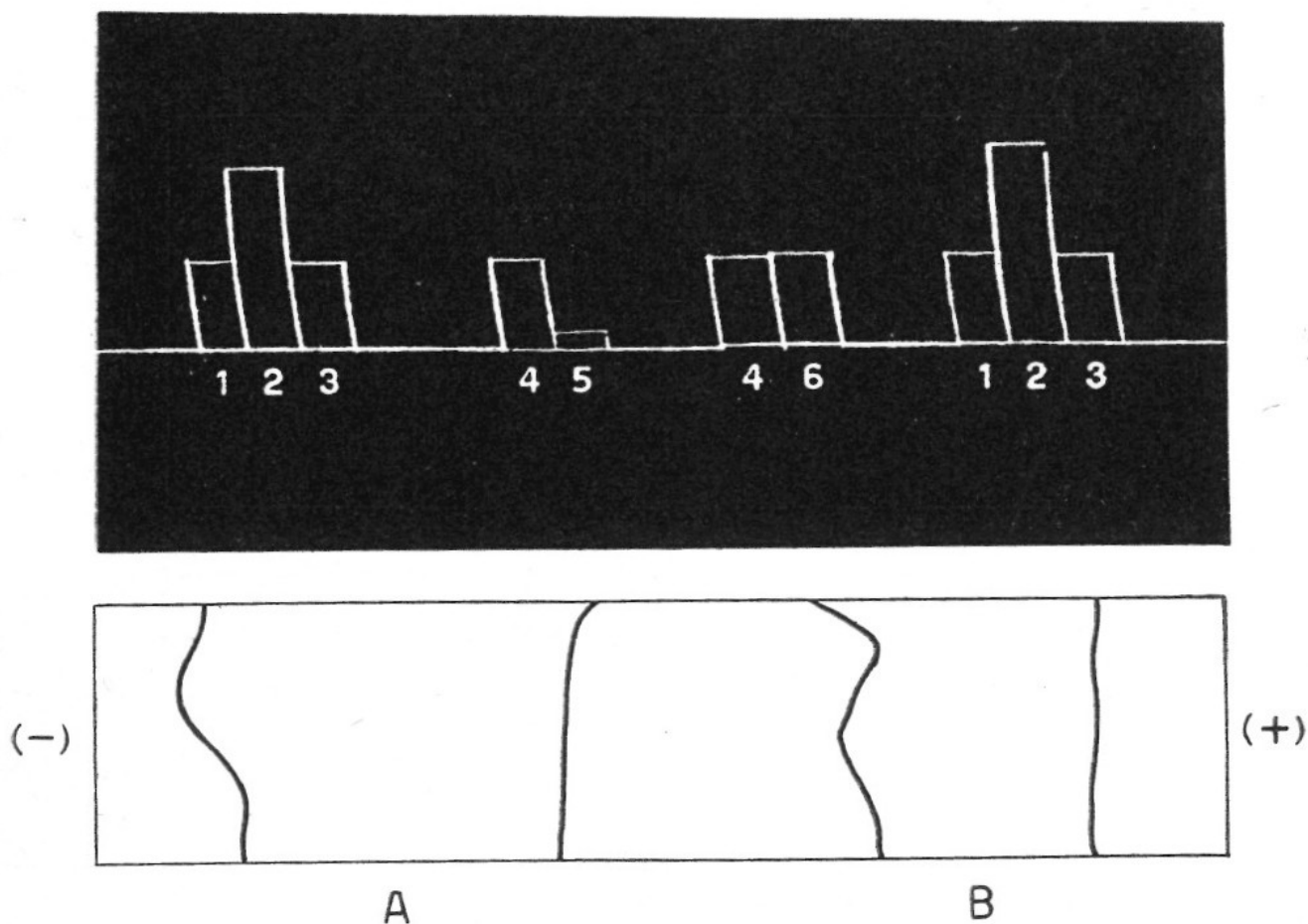


Fig. 3. - Azione degli eluati delle macchie ottenute mediante la elettrocromatografia del flaxedil (triiodoetilato di galamina) sul *Rectus abdominis* di Rana. A: eluato dello spazio catodico; B: eluato dello spazio anodico.

- |  |  |
|--|--|
| 1: acetilcolina $2 \cdot 10^{-6}$ 0,4 ml | 4: acetilcolina $1 \cdot 10^{-6}$ 1,0 ml     |
| 2: acetilcolina $2 \cdot 10^{-6}$ 0,8 ml | 5: acetilcolina $1 \cdot 10^{-6}$ 1,0 ml + A |
| 3: acetilcolina $2 \cdot 10^{-6}$ 0,4 ml | 6: acetilcolina $1 \cdot 10^{-6}$ 1,0 ml + B |

esperienze sono state condotte con un apparecchio di MACHEBOEUF-RIBYROTTE impiegando come elettrolita un tampone a pH 3. Si realizza in questo modo una netta separazione per i diversi sali ammonici quaternari dell'anione e del catione che migrano rispettivamente verso il polo positivo e negativo.

La migrazione è proporzionale al tempo di passaggio della corrente, come si può anche dedurre dalla fig. 2, dove sono riportati gli elettroferogrammi del Flaxedil e della Succinilcolina.

La visualizzazione delle macchie viene effettuata anche in questo caso esponendo la carta ai vapori di iodio.

La natura dell'anione e del catione, nel caso ad es. del Flaxedil è stata confermata anche per via biologica. Si è infatti osservata la inibizione, sul *Rectus abdominis* di Rana, dell'azione dell'acetil-colina da parte dell'eluato sia dell'anione che del catione. Come si poteva prevedere essa è stata positiva solo con il catione, dato che l'anione è costi-

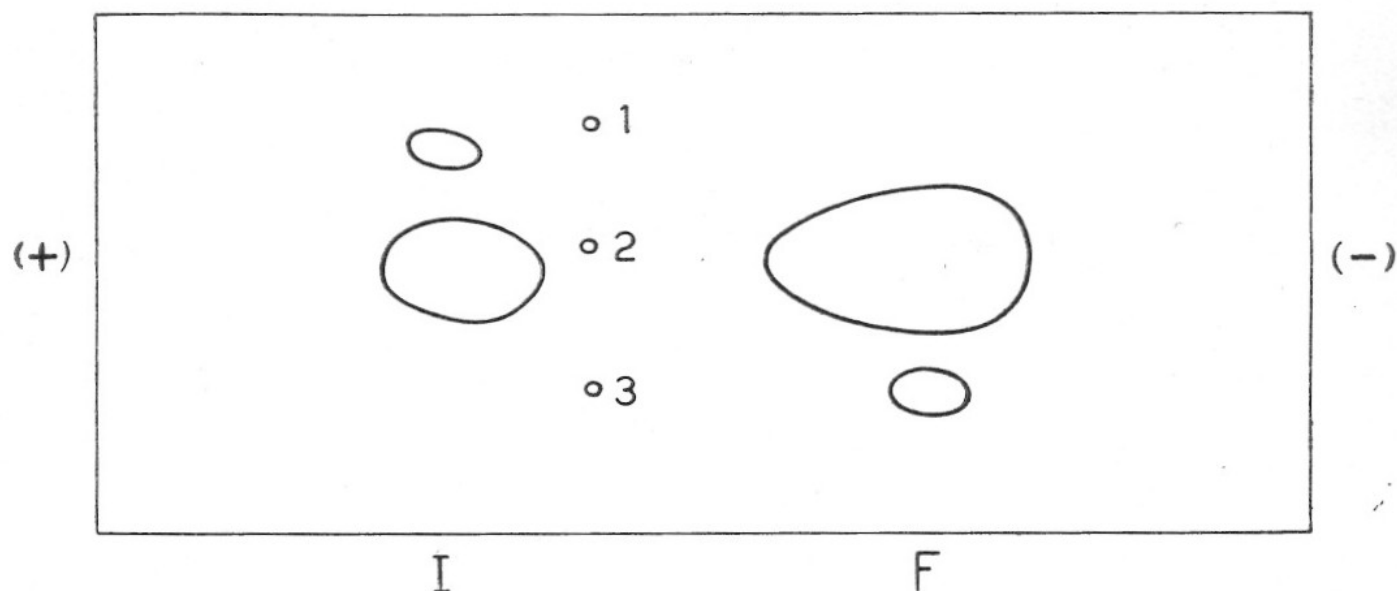


Fig. 4. - Elettrocromatografia del Flaxedil (triiodoetilato di galamina) di confronto con gli eluati delle macchie che si ottengono effettuando la cromatografia su carta dello stesso Flaxedil con solvente butanolo-acido acetico-acqua (4,3-1,4-4,3).

- 1: eluato macchia Flaxedil  $R_f$  :0,37)
- 2: Flaxedil
- 3: eluato macchia Flaxedil ( $R_f$  : 0,40)

tuito solo da I'. Nella fig. 3 vengono riportati i grafici di questa esperienza.

La identità delle macchie che si hanno nella cromatografia su carta dei sali ammoniaci quaternari può essere inoltre stabilita inequivocabilmente con i metodi elettrocromatografici.

Effettuando la cromatografia di un sale ammonico quaternario quale il Flaxedil, con la miscela butanolo-acido acetico-acqua si hanno due macchie. Eluando le zone corrispondenti alle due macchie e sottoponendo questi eluati alla elettroforesi su carte insieme, per confronto, a un campione di Flaxedil, si è notato al termine della operazione un perfetto parallelismo tra il comportamento della macchia dell'anione del Flaxedil e quella dell'eluato della macchia ad  $R_f$  minore ed analogamente un eguale spostamento per il catione e l'eluato a  $R_f$  maggiore. (Vedi fig. 4).

Quanto sopra esposto permette concludere che è possibile per mezzo della cromatografia su carta mettere in evidenza e spesso separare numerosi sali ammoniaci quaternari, quali la colina, la acetil-colina, il flaxedil, la succinilcolina etc. come pure vari curari di sintesi senza avere inconvenienti anche se si impieghino i bromuri o gli ioduri. I sistemi elettrocromatografici possono inoltre essere di grande aiuto in questi casi per stabilire la natura delle macchie.

La sensibilità del metodo è di 5-10  $\mu$ g. Esso è pertanto utilizzabile nello studio del metabolismo di numerosi farmaci caratterizzati dalla presenza di una funzione ammoniacale quaternaria.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica terapeutica. —  
Rio de Janeiro - Instituto de Biofisica da Universidade do Brasil.

---