59. E. CINGOLANI e A. GAUDIANO. — **Costanti di dissociazione e proprietà spettrofotometriche dell'idrazide dell'acido isonicotinico.**

Riassunto. — Gli AA. hanno misurato gli spettri di assorbimento dell'idrazide dell'acido isonicotinico a diversi pH.

E' stato messo in evidenza che l'idrazide isonicotinica può esistere in quattro forme: una indissociata, due derivanti dalla dissociazione basica e una derivante dalla dissociazione acida. I rispettivi massimi di assorbimento sono a 269, a 266 e a 296,5 mμ.

I valori delle costanti di dissociazione, determinati secondo un nuovo metodo grafico, sono risultati: $Kb_I = 3.10^{-11}$; $Kb_{II} = 3.10^{-13}$ e $Ka = 5{,}0.10^{-12}$.

In base a questi valori è stato costruito il diagramma di distribuzione delle varie forme, da cui risulta che la forma esistente al pH fisiologico, e quindi attiva contro il bacillo di Koch, è quella indissociata.

E' stata studiata la stabilità dell'idrazide isonicotinica in soluzione neutra, acida e alcalina ed è stato visto che dall'idrolisi alcalina si forma acido isonicotinico. E' stato quindi messo a punto un metodo per la determinazione spettrofotometrica contemporanea dell'acido isonicotinico e della sua idrazide, basato sulla misura dell'estinzione a 271 e a 299 mμ, in soluzione di HCl N/1 e di NaOH N/10. Se interessa solo il contenuto di idrazide isonicotinica, conviene eseguire la determinazione a 296,5 mμ in NaOH N/10.

Vengono riportati alcuni dati spettrofotometrici riguardanti l'acido isonicotinico, l'isonicotinato di etile, la N-N'-isonicotinilidrazina e l'idrazide dell'acido benzoico.

Résumé. — Les auteurs ont mesuré les spectres d'absorption de l'hydrazide de l'acide isonicotinique à divers pH.

On a mis en évidence que l'hydrazide isonicotinique peut exister sous quatre formes: une non-dissociée, deux dérivant de la dissociation basique, et une dérivant de la dissociation acide. Les maxima respectifs d'absorption sont: 269, 266, 263 et 296,5 mμ.

Les valeurs des constantes de dissociation, déterminées selon une nouvelle méthode graphique, sont: $Kb_I = 3.10^{-11}$; $Kb_{II} = 3.10^{-13}$ et $Ka = 5{,}0.10^{-12}$.

Sur la base de ces valeurs, on a construit le diagramme de distribution des différentes formes dont il résulte que la forme existante au pH physiologique, et par conséquent active contre le bacille de Koch, est celle indissociée.

On a étudié la stabilité de l'hydrazide isonicotinique en solution neutre, acide et alcaline, et on a vu que de l'hydrolyse alcaline il se forme de l'acide isonicotinique. On a ensuite mis au point une méthode pour la détermination spectro-photométrique simultanée de l'acide isonicotinique et de son hydrazide, basée sur la mesure de l'extinction à 271 et à 299 mμ, en solution de HCl N/1 et de NaOH N/10. Si c'est seulement le contenu d'hydrazide isonicotinique que l'on cherche, il convient de faire la détermination à 296,5 mμ en NaOH N/10.

On rapporte quelques données spectro-photométriques concernant l'acide isonicotinique, l'isonicotinate d'éthyle, la N-N'-isonicotinylhydrazine et l'hydrazide de l'acide benzoïque.

Summary. — The authors have measured the absorption spectra of the isonicotinic acid hydrazide at different pH values.

It has been found that the isonicotinic hydrazide can exist in four forms: one indissociate, two deriving from the base dissociation and one deriving from the acid dissociation. The respective absorption maxima are at 269, 266, 263 and 296.5 mμ.

The values of the dissociation constants, determined by a new graphic method, are shown to be: $Kb_1 = 3.10^{-11}$, $Kb_{11} = 3.10^{-13}$ and $Ka = 5.0.10^{-12}$.

On the basis of these values the graph of the distribution of the various forms has been made, from which it is seen that the form existing at the physiological pH, and therefore active against the Koch bacillus, is the indissociate one.

The stability of the isonicotinic hydrazide in neutral, acid and alkaline solutions has been studied and it has been found that from the alkaline hydrolysis isonicotinic acid is formed. Therefore a method has been worked out for the simultaneous spectrophotometric determination of the isonicotinic acid and of its hydrazide based on the measure of the extinction at 271 and 299 mμ in solutions of N/1 HCl and N/10 NaOH. When only the isonicotinic hydrazide content is desired, the determination can best be carried out at 296.5 mμ in N/10 NaOH.

Some spectrophotometric data are given regarding isonicotinic acid, ethyl isonicotinate, N-N'-isonicotinyldrazine and the hydrazide of benzoic acid.

Zusammenfassung.— Verff. haben die Absorptionsspektren des Isonikotinsäurehydrazids bei verschiedenen pH untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass das Isonikotinsäurehydrazid in vier verschiedenen Formen vorkommen kann: eine nicht dissoziierte, zwei die aus der basischen Dissoziation stammen und eine aus der sauren Dissoziation.

Die entsprechenden Absorptionsmaxima liegen bei 269, 266, 263 und 296,5 mμ.

Die Werte der Dissoziationskonstanten wurden nach einer neuen graphischen Methode bestimmt und mit $Kb_1 = 3.10^{-11}$, $Kb_{11} = 3.10^{-13}$ und $Ka = 5{,}0 \cdot 10^{-12}$ ermittelt. Auf Grund dieser Werte wurde ein Verteilungsdiagramm hergestellt für die verschiedenen Formen, aus dem hervorgeht, dass die bei physiologischem pH vorkommende Form, also die gegen den Koch'schen Bazillus wirksame, die nicht dissoziierte Form ist.

Es wurde die Stabilität des Isonikotinsäurehydrazids in neutraler, saurer und alkalischer Lösung untersucht: Es zeigte sich, dass aus der alkalischen Hydrolyse sich Isonikotinsäure bildet. Es wurde dann eine Methode zur gleichzeitigen spektrophotometrischen Bestimmung der Isonikotinsäure und ihres Hydrazids, ausgearbeitet, die auf der Extinktionsmessung bei 271 und bei 299 mμ in N/1 Salzsäure- sowie in N/10 Natronlaugelösung beruht. Wenn man sich lediglich für den Gehalt an Isonikotinsäurehydrazid interessiert, so empfiehlt es sich, die Bestimmung bei 296,5 mμ in N/10 NaOH durchzuführen.

Es werden einige die Isonikotinsäure, den Aethyl-Isonikotinat, das N-N'-Isonikotinyl-Hydrazid und das Benzoinsäure-hydrazid betreffende spektrophotometrische Angaben mitgeteilt.

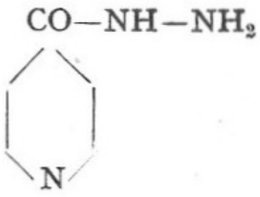
L'interesse suscitato di recente dall'idrazide dell'acido isonicotinico per la terapia delle infezioni tubercolari ci ha spinto a intraprendere il presente studio sul comportamento spettrofotometrico di questa sostanza con lo scopo di determinarne le costanti di dissociazione, analogamente a quanto abbiamo fatto per il tiocromo [1], e di studiare la possibilità di una determinazione contemporanea dell'isonicotinilidrazina e dei suoi eventuali prodotti di alterazione.

Gli spettri di assorbimento dell'idrazide isonicotinica in acqua e in soluzioni di acido cloridrico o di idrato sodico sono stati studiati, con risultati discretamente concordanti, da diversi Autori [2, 3, 4, 5, 6, 7]; nes-

---

(1) Gaudiano A., Cingolani E.: questi Rendiconti, *15*, 408 (1952).
(2) Kelly J. M., Poet R. B.: Am. Rev. Tuberc., *65*, 485 (1952).
(3) Businelli M., Rocchi B.: Il Farmaco, *7*, 153 (1952).
(4) Angelico R., Calò A., D'Amore A., Mariani A., Mariani - Marelli O., Scanga F.: questi Rendiconti, *15*, 627 (1952).
(5) Calò A., Mariani A., Mariani - Marelli O.: J. Pharm. Belg., *7*, 377 (1952).
(6) Scott P. G. W.: J. Pharm. Pharmac., *4*, 681 (1952).
(7) Neuss J. D., Scagers W. J., Moder W. J.: J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.), *41*, 670 (1952)

suno di essi ha però studiato la variazione dello spettro di assorbimento col variare del pH. Dalla formula dell'idrazide isonicotinica



e dal comportamento di altre idrazidi si può arguire che questa sostanza è capace di formare sali sia con acidi che con basi.

PARTE SPERIMENTALE.

L'idrazide dell'acido isonicotinico è stata, in un primo tempo, da noi preparata da idrato di idrazina e isonicotinato di etile secondo MEYER e MALLY (8) e VELLUZ e PETIT (9).

L'isonicotinato di etile è stato ottenuto dall'acido isonicotinico secondo le indicazioni di LEVINE e SNEED per il nicotinato di metile (10) e di BUU-HOÏ e coll. per l'isonicotinato di metile (11). Questi metodi permettono di ottenere l'estere etilico con buoni rendimenti e sono perciò da preferirsi agli altri riportati nella letteratura (12, 13).

Fra i metodi proposti per la preparazione dell'acido isonicotinico noi abbiamo seguito quello descritto da ARENS e WIBAUT (14), riportato in parte anche in « Organic Syntheses » (15), che consiste nel trattamento della piridina con anidride acetica in presenza di polvere di zinco e successiva ossidazione permanganica della 4-etilpiridina formatasi.

L'idrazide isonicotinica è stata cristallizzata da alcool etilico prima di ogni serie di misure perchè abbiamo notato che, anche se conservata nel vuoto su anidride fosforica, tende con il tempo ad alterarsi.

Alcune misure sono state ripetute con prodotti commerciali di diversa provenienza; solo dopo ricristallizzazione da alcool etilico questi hanno dato risultati coincidenti con quelli ottenuti con il prodotto puro da noi preparato.

La N-N'-isonicotinil-idrazina, già nota in letteratura (16), ci è stata

---

(8) Monatsh., *33*, 393 (1912) in Chem. Zentr., II, 355 (1912).
(9) Bull. Soc. Chim., [5], *12*, 951 (1945).
(10) J. Am. Chem. Soc., *73*, 5614 (1951).
(11) BUU - HOÏ P., XUONG D., NAM H., BINON F., ROYER R.: J. Chem. Soc. 1358 (1953).
(12) CAMPS R.: Archiv für Pharm., *240*, 345 (1902).
(13) LEIS D. G., CURRAN B. C.: J. Am. Chem. Soc., *67*, 79 (1945).
(14) Rec. Trav. Chim., *60*, 119 (1941).
(15) *27*, 38 (1947).
(16) GRAF R.: J. Prakt. Chem., *138*, 289 (1933); YALE H. L., LOSEE K., MARTINS J., HOLSING M., PERRY F. M., BERNSTEIN J.: J. Am. Chem. Soc., *75*, 1933 (1953).

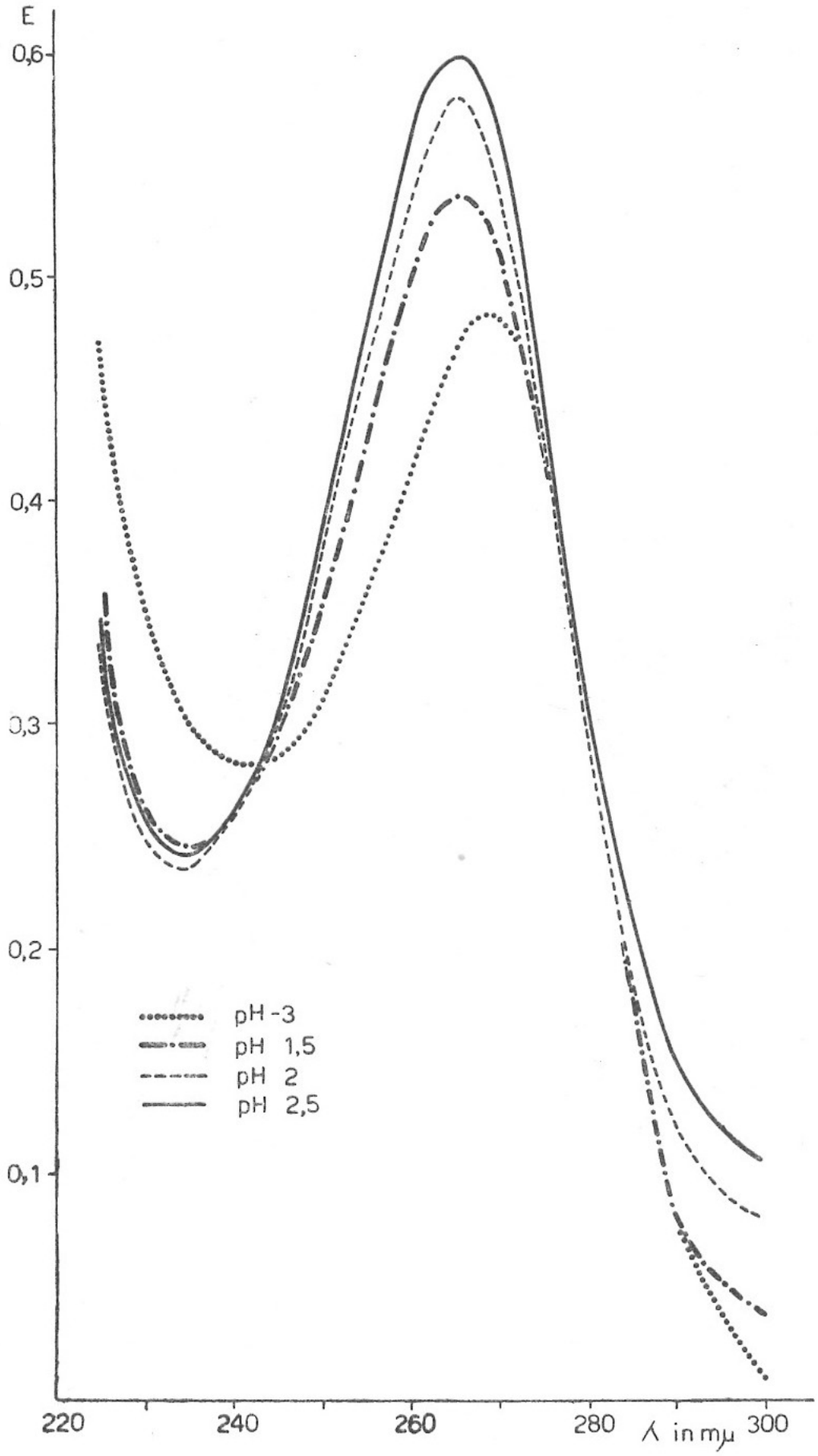


Fig. 1. - Spettri dell'idrazide isonicotinica in soluzione solforica (ph = —3) e in soluzione tampone a forza ionica 0,1 (concentrazione M/10000).

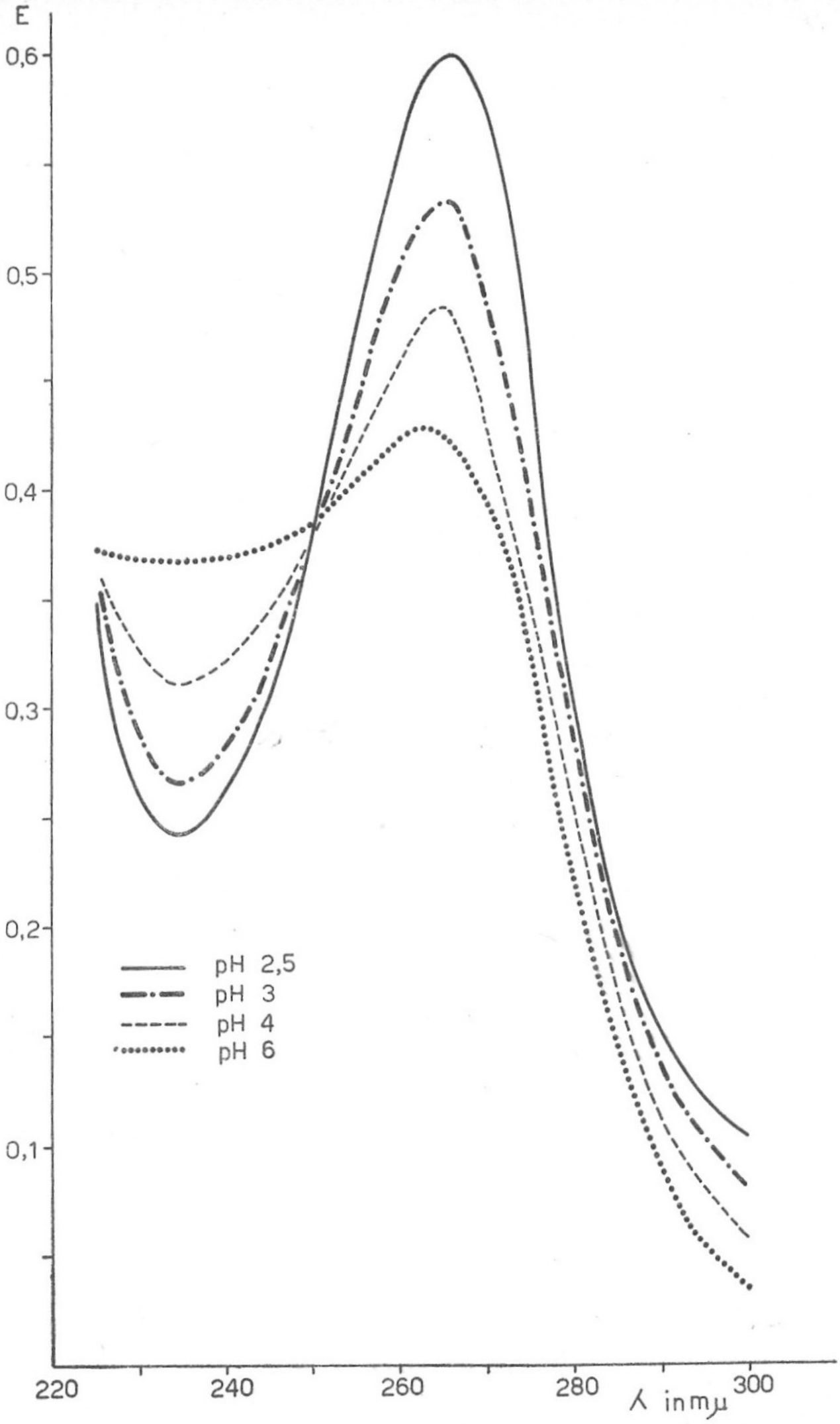


Fig. 2. - Spettri dell'idrazide isonicotinica in soluzione tampone a forza ionica 0,1 (concentrazione M/10000).

data da G. Pruner, che l'ha ottenuta per ossidazione della idrazide con un procedimento che verrà da lui comunicato.

L'idrazide benzoica è stata da noi preparata da benzoato di etile e idrato di idrazina, secondo Curtius e coll. ([17]).

Le misure spettrofotometriche sono state eseguite con lo spettrofotometro Beckman Mod. DU, usando vaschette di quarzo da 1 cm, su soluzioni M/10000 preparate al momento dell'uso.

La temperatura durante le esperienze era di $20^0 \pm 2$.

Le soluzioni tampone di cui ci siamo serviti sono state quelle di Sörensen (glicocolla — HCl e glicocolla — NaOH, con $\mu = 0{,}1$) per valori di pH compresi tra 1,5 e 3,5 e tra 9 e 12,5. La soluzione in HCl N/10 è stata considerata a pH = 1, mentre per i valori più bassi abbiamo usato miscele di acido solforico e acqua servendoci dei valori di Hammett e Deyrup ([18]). Il campo di pH tra 3,5 e 9 è stato coperto con i tamponi di acetati e di fosfati portati a $\mu = 0{,}1$. La soluzione in NaOH N/10 è stata considerata a pH 13.

In ambiente molto acido (pH inferiore a 0) l'idrazide isonicotinica mostra, al disopra di 220 mμ, un solo massimo di assorbimento, a 269 mμ. Al crescere del pH il massimo si sposta fino a 266 mμ, mentre il valore dell'estinzione aumenta (fig. 1). Questo processo continua fino a pH 2,5, dopodichè il massimo continua a spostarsi verso le lunghezze d'onda minori e il valore dell'estinzione diminuisce. Fra pH 6 e pH 9 circa, lo spettro non subisce variazioni, presentando sempre un massimo a 263 mμ (fig. 2). A pH maggiori di 9 lo spettro di assorbimento presenta variazioni molto forti, fino a stabilizzarsi a pH intorno a 13 (fig. 3). Si ha allora un massimo a 296,5 mμ, un flesso fra 275 e 285 mμ e un altro massimo a 237,5 mμ. La presenza di un secondo massimo si può rilevare anche a pH acidi: p. es. in HCl N/1 si ha un massimo di assorbimento a 215 mμ; il rapporto E_{215}/E_{272} è eguale a 1,17, esso però ha valore puramente indicativo, dato che al disotto di 220 mμ le misure sono influenzate dalla luce diffratta. In semplice soluzione acquosa non si hanno altri massimi, in tutta la zona sopra i 206 mμ, oltre a quello già citato a 263 mμ. Non abbiamo potuto ricercare la presenza di questo secondo massimo in soluzioni tamponate, perchè le soluzioni tampone di confronto non erano sufficientemente trasparenti da permettere l'azzeramento dell'apparecchio a basse lunghezze d'onda.

([17]) Curtius T.: J. Prakt. Chem., [2], *50*, 275 (1894); Curtius T., Struve G.: ibidem pag. 293.

([18]) J. Am. Chem. Soc., *54*, 2721 e 4293 (1932).

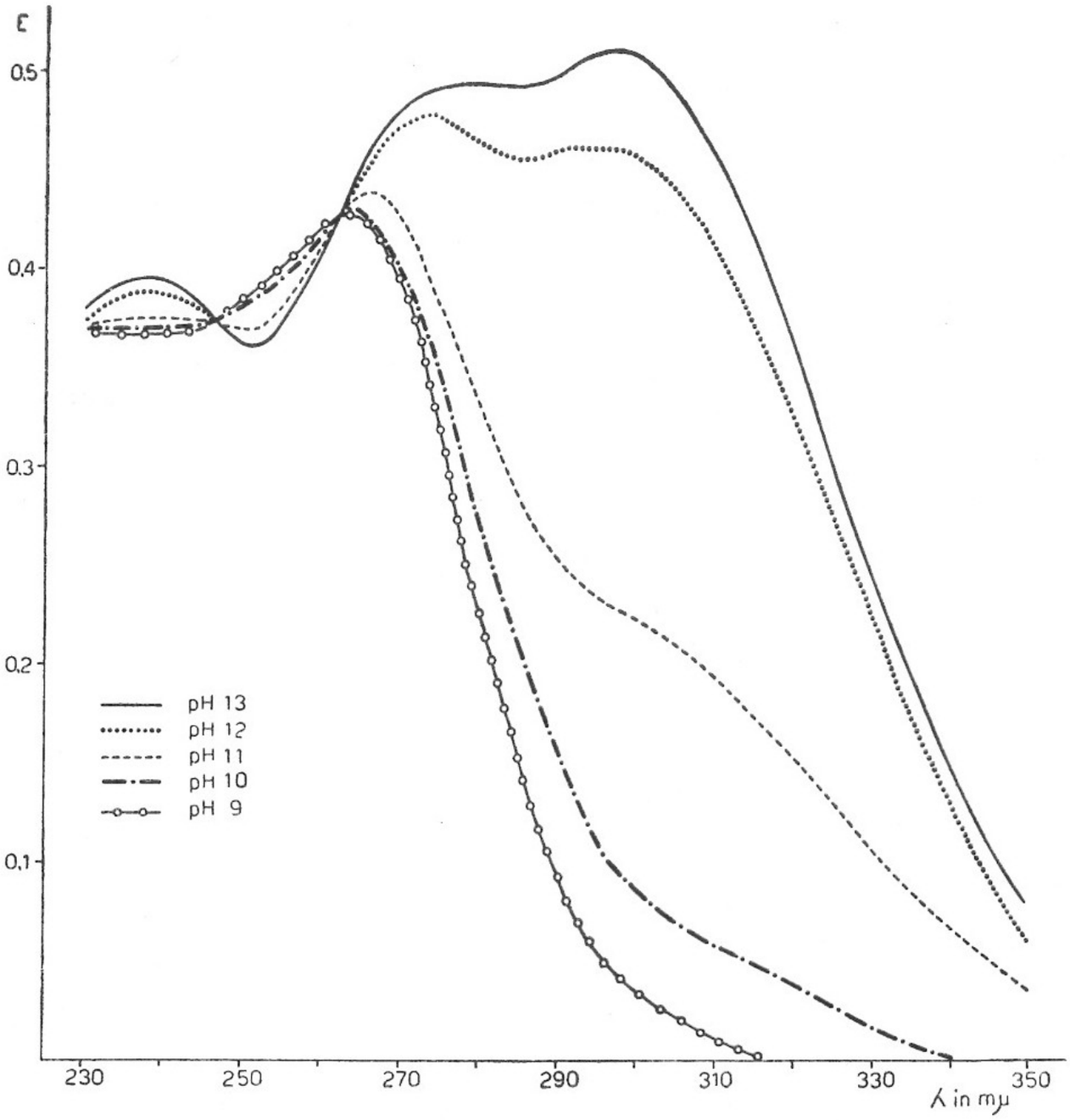
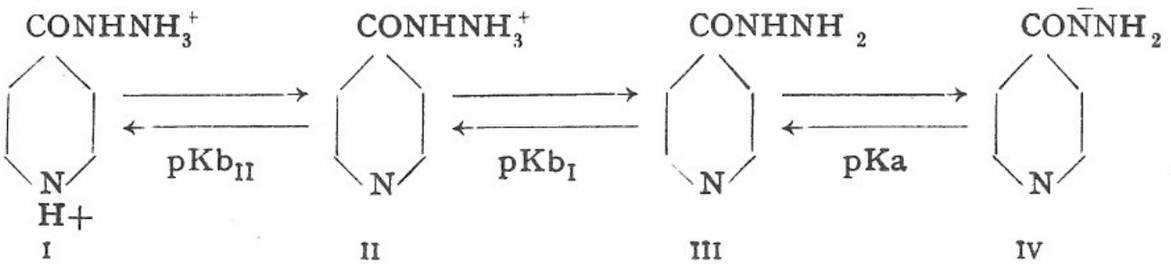


Fig. 3. - Spettri dell'idrazide isonicotinica in soluzione tampone a forza ionica 0,1 (concentrazione M/10000).

Dall'esame delle figg. 1, 2 e 3 appare che le curve di assorbimento a pH inferiori a 2,5 (fig. 1), hanno un punto isosbestico a 243-244 mμ; quelle tra pH 2,5 e pH 6-9 (fig. 2) hanno invece un punto isosbestico a 250-251 mμ; mentre le altre (fig. 3) hanno, al disopra dei 230 mμ, una coppia di punti isosbestici a 246,5 mμ e a 262,5 mμ. La presenza di questi punti isosbestici indica l'esistenza di tre distinti equilibri e quindi di quattro forme a diversa carica elettrica.

Esaminando la formula dell'idrazide isonicotinica si può arguire che le forme, tra di loro in equilibrio, sono le seguenti:



Allo scopo di stabilire se la dissociazione della forma II interessasse l'—NH_2 del gruppo idrazinico o l'azoto del nucleo piridinico, abbiamo esaminato la variazione con il pH degli spettri di assorbimento dell'acido isonicotinico e dell'idrazide benzoica; nella fig. 4 abbiamo riportato come varia col pH l'estinzione di questi due composti e dell'idrazide isonicotinica, ad una lunghezza d'onda opportunamente scelta. Si può vedere che in campo acido la curva dell'idrazide isonicotinica mostra due flessi, corrispondenti alle due dissociazioni basiche; quella dell'acido isonicotinico presenta anch'essa due flessi corrispondenti uno alla dissociazione basica (azoto piridinico) e l'altro alla dissociazione acida (il secondo è

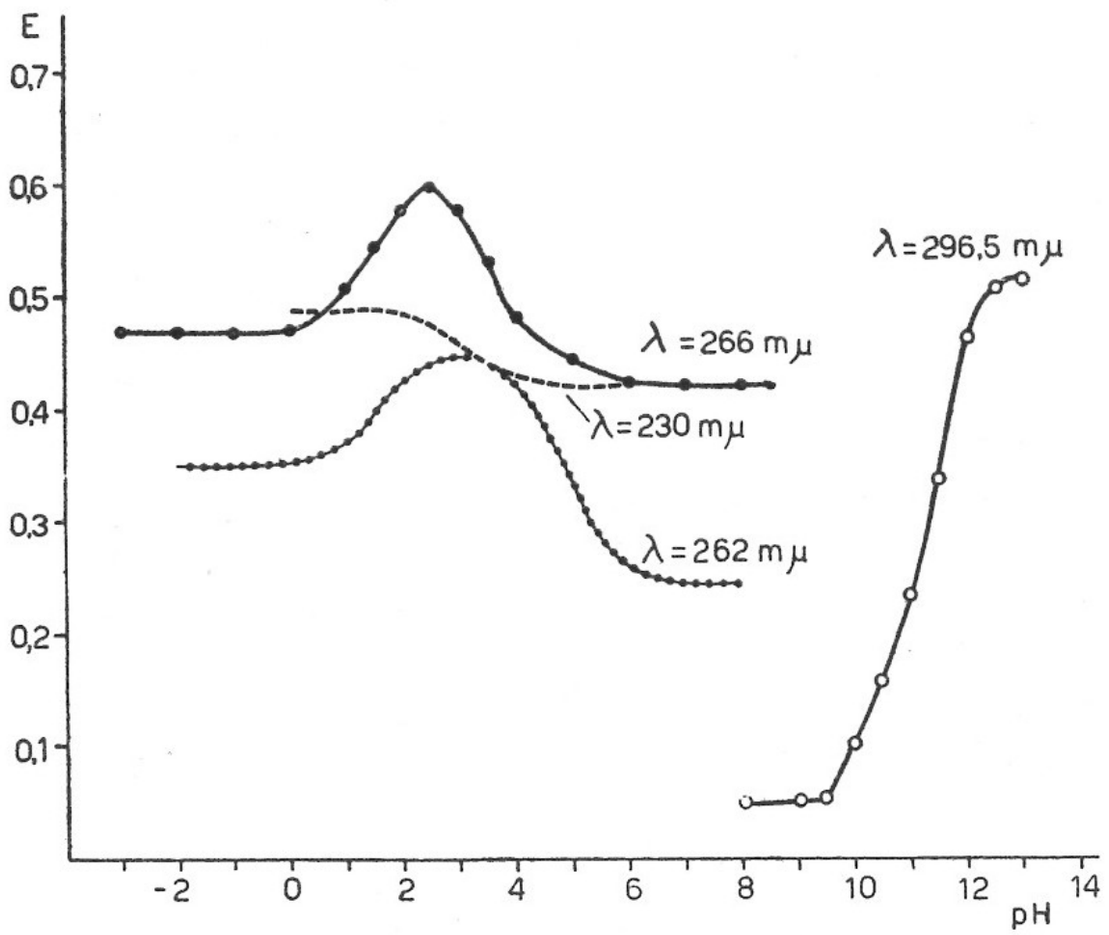


Fig. 4. - Variazione dell'estinzione alle lunghezze d'onda indicate, in funzione del pH: $\lambda = 266$ mμ e $\lambda = 296{,}5$ mμ, idrazide isonicotinica; $\lambda = 230$ mμ, idrazide benzoica; $\lambda = 262$ mμ, acido isonicotinico.

quello a pH più alto perchè dalla letteratura ([19]) si ha che il pKa dell'acido isonicotinico è 4,96); quella, infine, dell'idrazide benzoica mostra un solo flesso corrispondente alla dissociazione dell'—NH_2. E' logico argomentare che nella curva dell'idrazide isonicotinica il flesso corrispondente al pH più basso si riferisce alla dissociazione dell'azoto piridinico, in quanto corrisponde a quello equivalente dell'acido isonicotinico; il flesso, invece, che si trova a pH più alto si riferisce alla dissociazione dell'—NH_2 idrazinico, in quanto corrispondente a quello dell'idrazide benzoica. Un comportamento apparentemente anomalo presenta l'isonicotinato di etile, la cui curva E/pH a 272,5 mμ (non riportata nella fig. 4 per non complicarla) mostra un solo flesso, dovuto evidentemente alla dissociazione dell'azoto piridinico, a pH 3,5. Questo composto però, come chiariremo meglio in sede di discussione, si discosta sia dall'acido isonicotinico che dalla sua idrazide per la presenza, in posizione 4, di un gruppo meno polare.

Il terzo flesso, che la curva E/pH dell'idrazide isonicotinica mostra nel campo dei pH alcalini (fig. 4), si riferisce evidentemente alla dissociazione acida del gruppo idrazinico ed essendo molto distanziato dagli altri due si presta bene al calcolo grafico del pKa. Il valore che si ottiene graficamente dalla fig. 4, cercando sull'asse delle ascisse il punto corrispondente alla media delle ordinate massima e minima, è pKa = 11,3. Lo stesso valore si ottiene usando un altro metodo grafico, di cui ci siamo serviti, in analogia a quanto si suol fare nelle titolazioni potenziometriche: riportando in un diagramma il valore $\Delta E/\Delta pH$ in funzione del pH, si può costruire per punti una curva il cui massimo corrisponde al pK (fig. 5). Anche con questo metodo si trova pKa = 11,3. Il valore di pKa può infine calcolarsi in base alla formula:

$$pKa = pH - \log \frac{\varepsilon_x - \varepsilon_{III}}{\varepsilon_{IV} - \varepsilon_x}$$

dove ε_x è l'estinzione (molare) al pH considerato per λ = 296,5 mμ e ε_{III} e ε_{IV} sono le estinzioni delle forme III (pH 6-9) e IV (pH 14) alla stessa lunghezza d'onda. Per ottenere ε_{IV} abbiamo operato in ambiente di NaOH N/1, limitando la misura a 296,5 mμ, data l'instabilità dell'idrazide isonicotinica in ambiente alcalino. I valori di ε_{III} e ε_{IV} sono, rispettivamente, 470 e 5190. Si trova, in media, pKa = 11,18. Se poi s'introduce la correzione per il coefficiente di attività si ha:

$$pKa = 11{,}18 - \frac{\log f_{IV}}{\log f_{III}}$$

([19]) Ostwald: Zeits. Phys. Chem., *3*, 387 (1889), in Beilstein: Handbuch der Organischen Chemie, Springer, Berlin, *22*, 45 (1935).

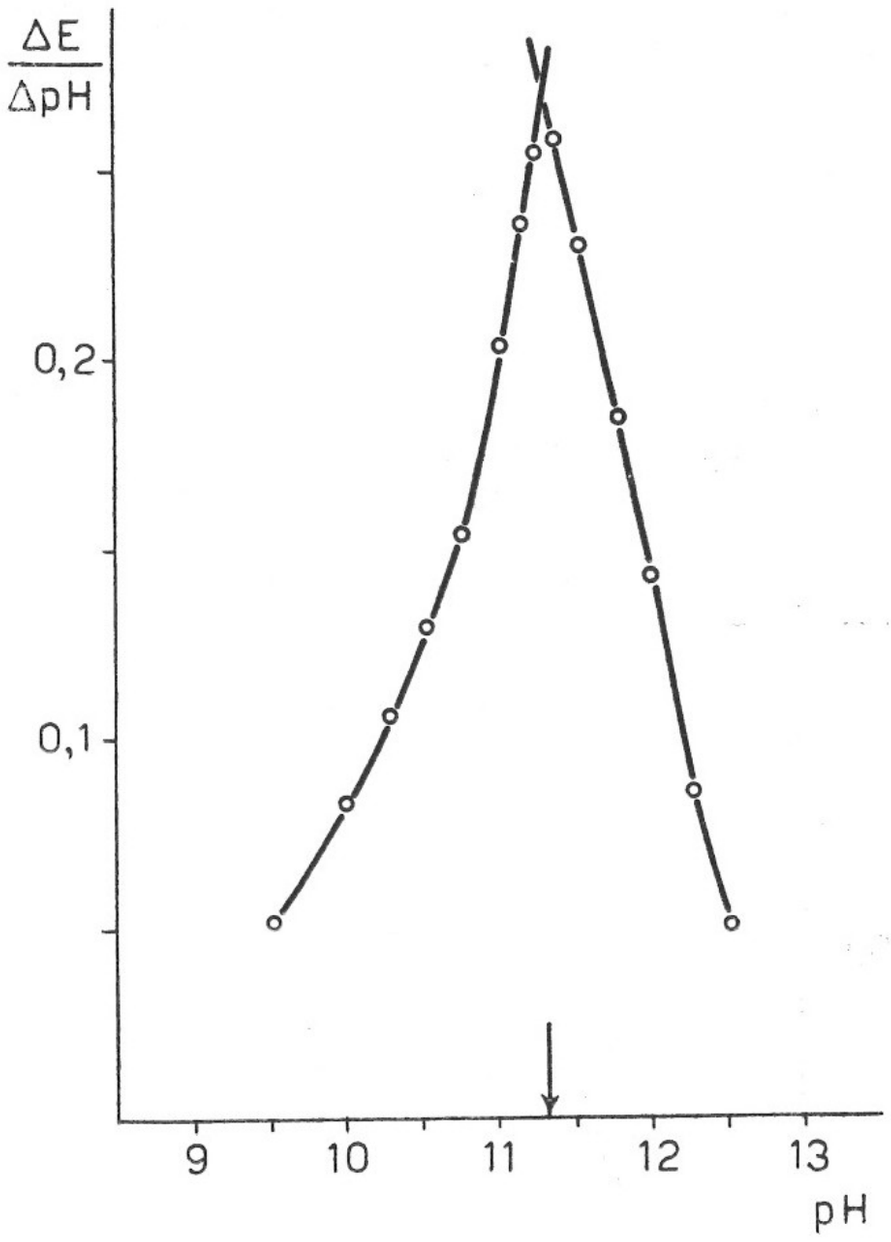


Fig. 5. - Variazioni di $\triangle E/\triangle pH$, in funzione del pH alla lunghezza d'onda di 296,5 mμ (la freccia corrisponde al punto di massimo).

dove f_{IV} e f_{III} sono i coefficienti di attività delle forme IV e III.

Con la formula abbreviata di DEBYE-HÜCKEL si ha:

$$- \log f_{IV} = \frac{0{,}5\ z \sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}} = \frac{0{,}5 \sqrt{0{,}1}}{1 + \sqrt{0{,}1}} = 0{,}12$$

e quindi pKa = 11,30, da cui Ka = $5{,}0.10^{-12}$.

I valori di pKb_I e pKb_{II} non possono calcolarsi direttamente dal diagramma della fig. 4 col primo metodo grafico sopra indicato perchè,

essendo i due valori di pKb troppo vicini, non c'è nessun pH a cui esista la forma II praticamente pura; ne segue che la curva E/pH, nel tratto intorno a pH 2,5, è più bassa di quanto sarebbe se ci si trovasse in presenza della forma II pura e quindi i due punti di flesso, corrispondenti ai due punti di maggior pendenza della curva, non sono facilmente individuabili, in quanto non coincidono con quelli ricavabili col suddetto metodo grafico, ma sono entrambi più vicini alla perpendicolare che incontra l'asse delle ascisse nel punto corrispondente al pH 2,5. Per lo stesso motivo, non si può ricorrere al calcolo sopra esposto perchè non è noto il valore di ε_{II}. Ci è sembrato invece soddisfacente il secondo metodo grafico, in base al quale abbiamo trovato (fig. 6) due massimi

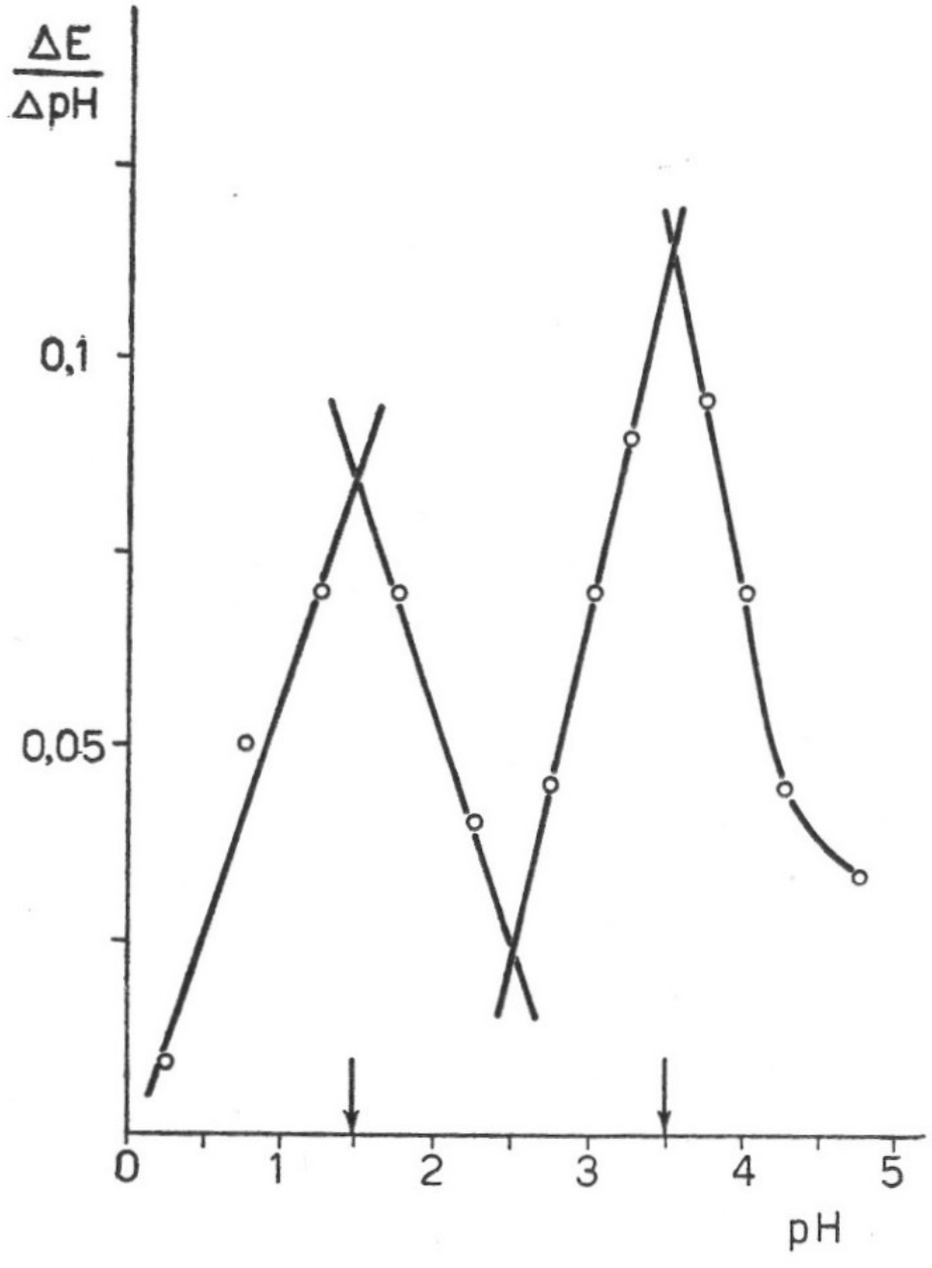


Fig. 6. - Variazione di $\triangle E/\triangle pH$ in funzione del pH alla lunghezza d'onda di 266 mμ (le frecce corrispondono ai punti di massimo).

corrispondenti a pH 3,5 e pH 1,5. Trattandosi di costanti basiche, i valori di pKb si otterranno facendo il relativo complemento a 14; si avrà quindi $pKb_I = 10{,}5$ e $pKb_{II} = 12{,}5$, da cui

$$Kb_I = 3.10^{-11} \quad \text{e} \quad Kb_{II} = 3.10^{-13}$$

L'applicazione di alcuni metodi di calcolo impiegati per casi di costanti di dissociazione fra loro vicine ([20], [21], [22], [23]) non ci ha dato risultati più precisi del nostro calcolo grafico.

In base ai valori di pK cosí trovati abbiamo costruito il diagramma di distribuzione delle quattro forme (fig. 7); da esso risulta quanto ab-

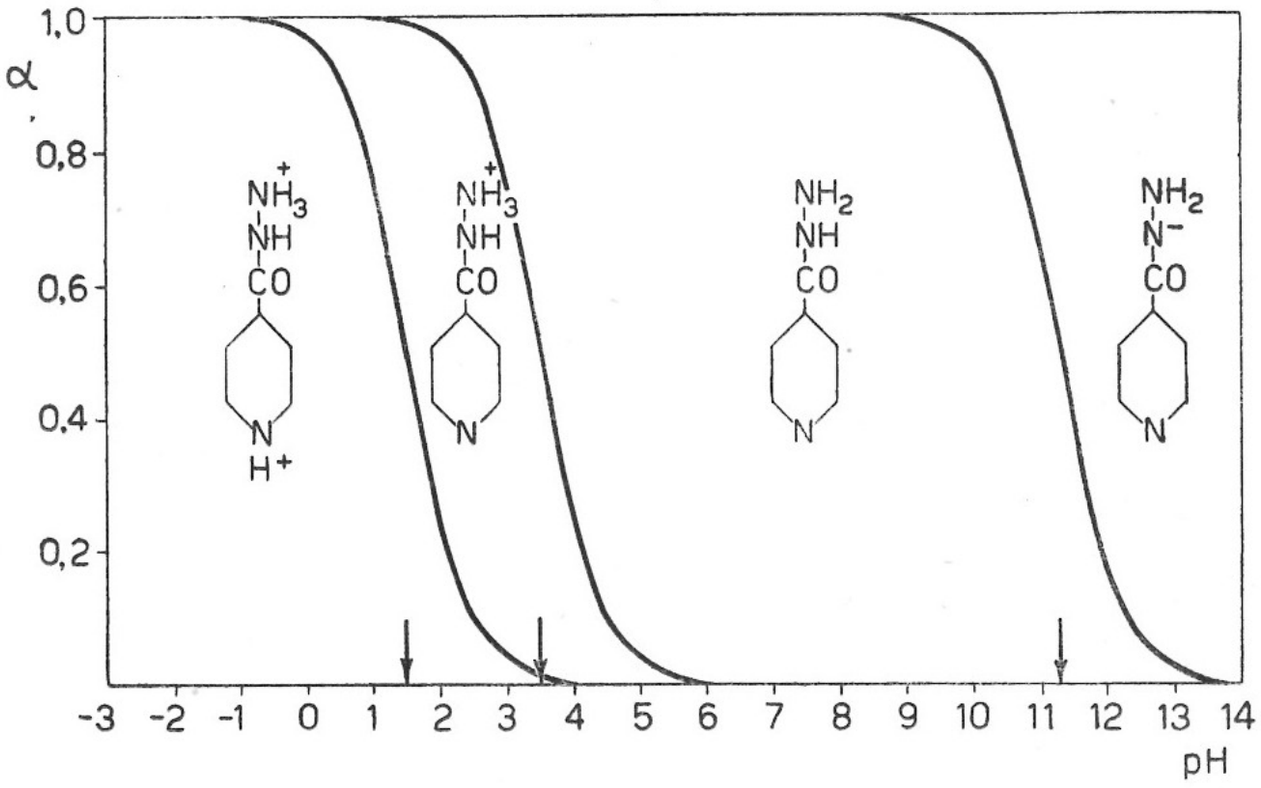


Fig. 7. Curve di distribuzione delle quattro forme dell'idrazide isonicotinica.

biamo già detto sopra e cioè che, mentre le forme I, III e IV possono essere ottenute da sole, la forma II è sempre accompagnata dalle forme I e III.

Avendo osservato che lo spettro di soluzioni alcaline dell'idrazide isonicotinica varia piuttosto rapidamente con il tempo, evidentemente

---

([20]) Hughes E. B., Jellinek H. H. G., Ambrose B. A.: J. Phys. Coll. Chem., *53*, 414 (1949).
([21]) Thamer B. J., Voigt A. F.: J. Phys. Chem., *56*, 225 (1952).
([22]) Lunn A. K., Morton R. A.: Analyst, *77*, 718 (1952).
([23]) Sacconi L.: Rend. Acc. Naz. Lincei (classe Sci. fis. mat. e nat.), [8], *8*, 376 (1950).

in concomitanza con un'alterazione chimica, abbiamo voluto seguire quest'alterazione determinando, in successivi intervalli di tempo, gli spettri di una soluzione di idrazide M/10000 in NaOH N/10 lasciata a temperatura ambiente. Come si vede dalla fig. 8, l'alterazione è notevole, specialmente nei primi giorni, ma non così rapida come risulta dal lavoro di Businelli e Rocchi (²). Dopo circa 100 giorni lo spettro si stabilizza con un massimo a 265 mμ e un minimo a 240 mμ; confrontando questo spettro con quello dell'acido isonicotinico in NaOH N/10

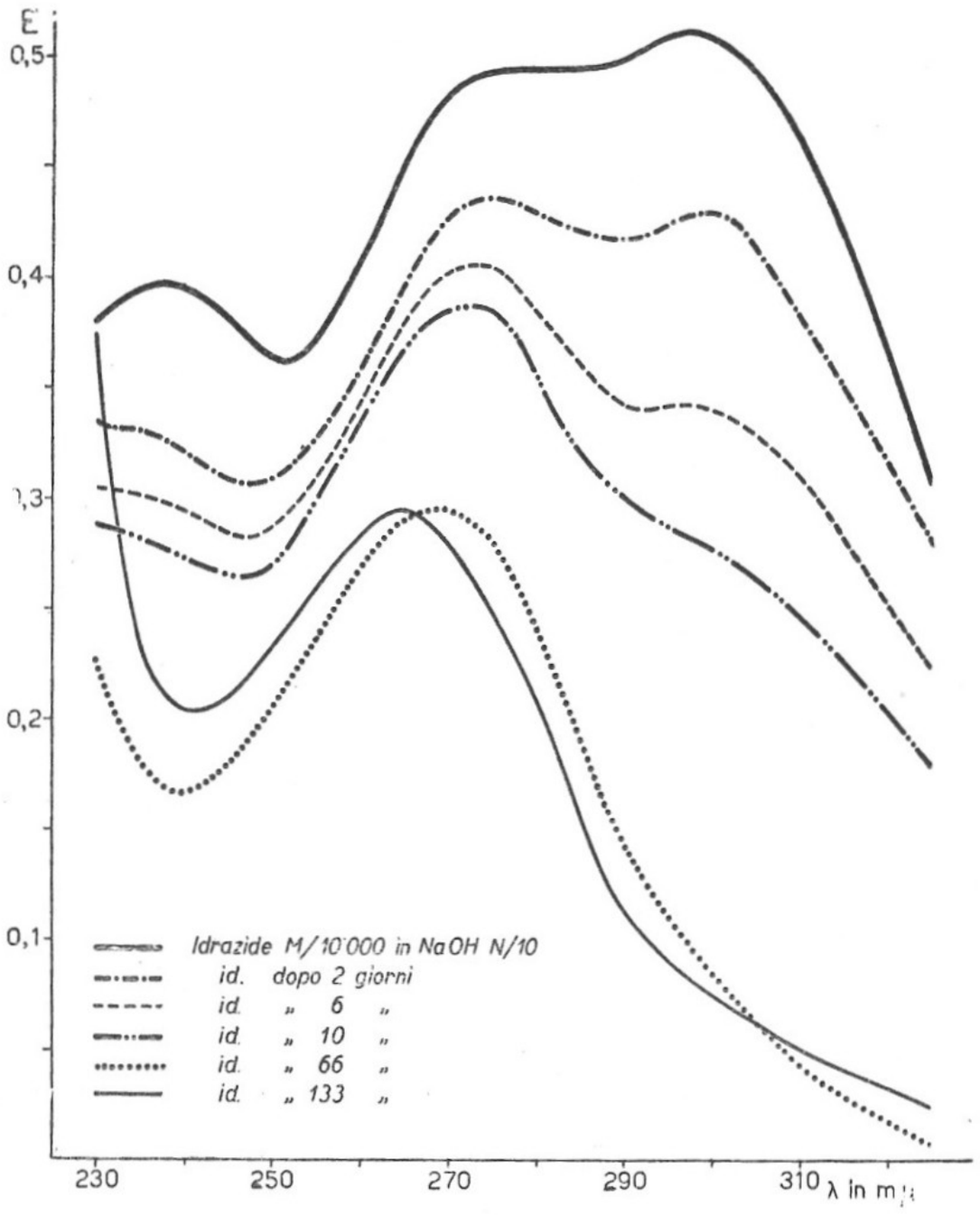


Fig. 8. - Variazione dello spettro d'assorbimento dell'idrazide isonicotinica lasciata in NaOH N/10 a temperatura ambiente per diversi periodi di tempo (concentrazione M/10000).

(fig. 9), si può arguire che il principale prodotto dell'alterazione è acido isonicotinico. Una conferma indiretta di ciò abbiamo avuto nella negatività della reazione con α-naftochinonsulfonato sodico secondo Rubino

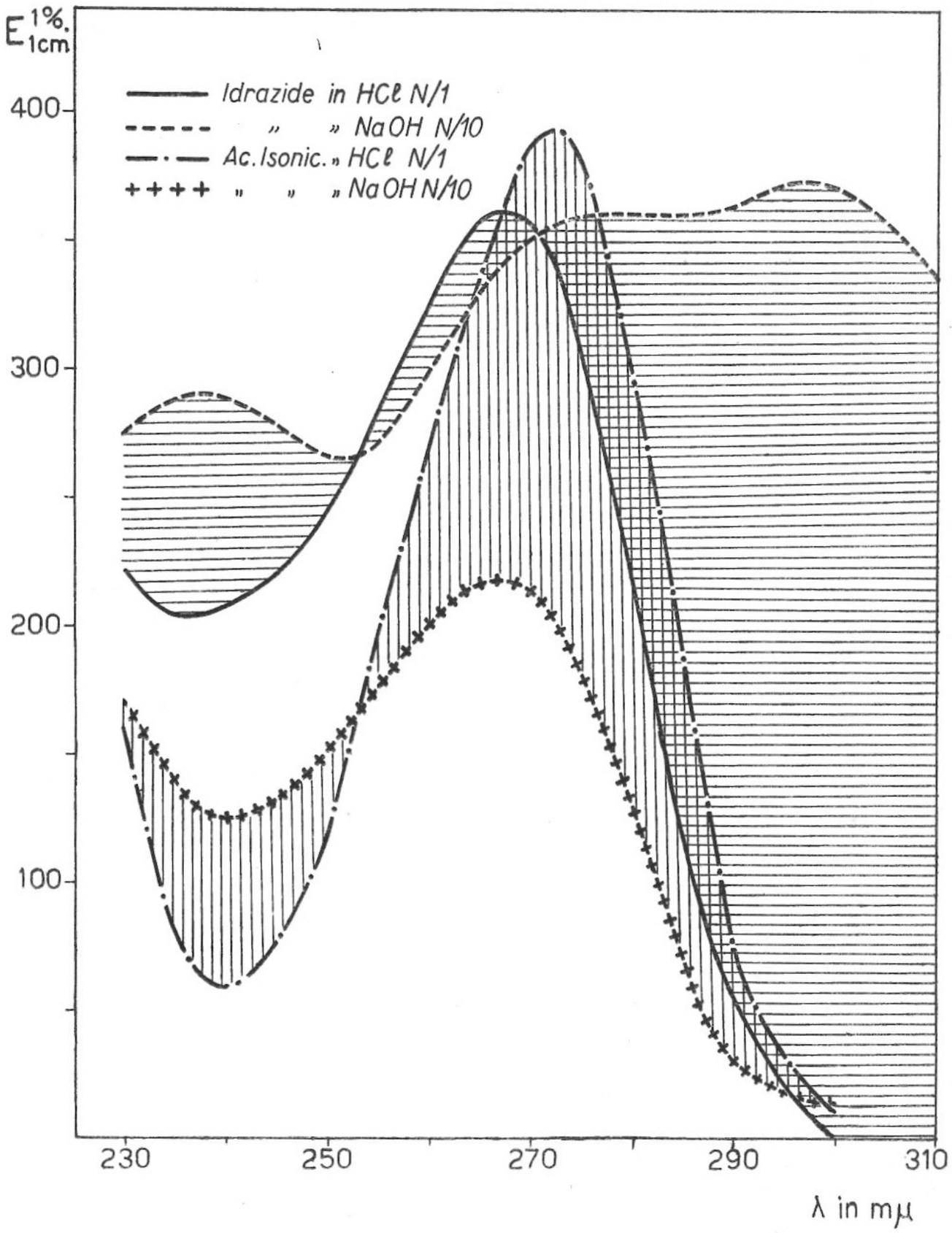


Fig. 9. - Spettri dell idrazide isonicotinica e dell'acido isonicotinico in HCl N/1 e in NaOH N/10.

e Bracco ([24]) e nel fatto che con il reattivo di Nessler si aveva colorazione gialla, mentre l'idrazide in soluzione M/10000 in NaOH N/10 dà precipitato arancione; siccome poi in NaOH N/10 l'idrazina M/10000 dà anch'essa un precipitato arancione, mentre l'NH_4OH in analoghe condizioni dà colorazione gialla, abbiamo concluso che nella soluzione erano presenti isonicotinato di sodio e idrato di ammonio.

Abbiamo voluto anche saggiare la stabilità dell'idrazide isonicotinica in soluzione neutra e acida. In questa circostanza abbiamo potuto notare, come era prevedibile, che l'abbassamento del massimo di assorbimento, in ambiente acido o neutro, non è proporzionale all'alterazione dell'idrazide, perchè il nucleo piridinico resta inalterato. La determinazione si può eseguire convenientemente, però, in NaOH N/10 a 296,5 mμ. Una soluzione M/10000 in HCl N/10 dopo 120 giorni aveva l'estinzione a 266 mμ praticamente inalterata; portando invece la stessa soluzione ad una concentrazione di NaOH N/10, si aveva, a 296,5 mμ, un abbassamento dell'estinzione del 16%. Un'analoga prova eseguita in semplice soluzione acquosa ha dato, dopo 90 giorni, un abbassamento dell'estinzione a 263 mμ dell'8%, mentre la misura in NaOH N/10 dava un abbassamento del 24%. Di questa alterazione è in parte responsabile l'ossigeno disciolto nell'acqua: infatti in soluzione acquosa disareata con azoto l'abbassamento risultava del 6% e del 18% in ambiente acido e neutro rispettivamente. Da questi risultati si può concludere che, mentre le soluzioni alcaline sono facilmente alterabili, quelle in sola acqua sono più stabili e ancor più lo sono quelle acide; la presenza di ossigeno accelera l'alterazione.

Avendo constatato che per alterazione delle soluzioni di idrazide isonicotinica si forma acido isonicotinico, ci è sembrato interessante mettere a punto un metodo di determinazione spettrofotometrica dei due prodotti presenti nella stessa soluzione. Un criterio qualitativo per svelare la presenza di acido isonicotinico in una soluzione di idrazide è stato già indicato da Angelico e coll. ([4]) e da Calò, Mariani e Mariani-Marelli ([5]): l'idrazide in HCl N/10 mostra un rapporto $E_{min} / E_{max} = 0{,}50$, mentre l'acido lo ha di 0,225; quindi una diminuzione del rapporto E_{min} / E_{max} indica presenza di acido isonicotinico. Questo criterio però, oltre ad essere puramente qualitativo, non è molto sensibile ed è inficiato dal fatto che, come hanno constatato gli Autori citati, la presenza di impurezze aspecifiche può innalzare il rapporto suddetto. Il metodo che noi descriviamo, già applicato da Vacher e coll. alle vitamine

([24]) Min. Med., *43*, 1136 (1952).

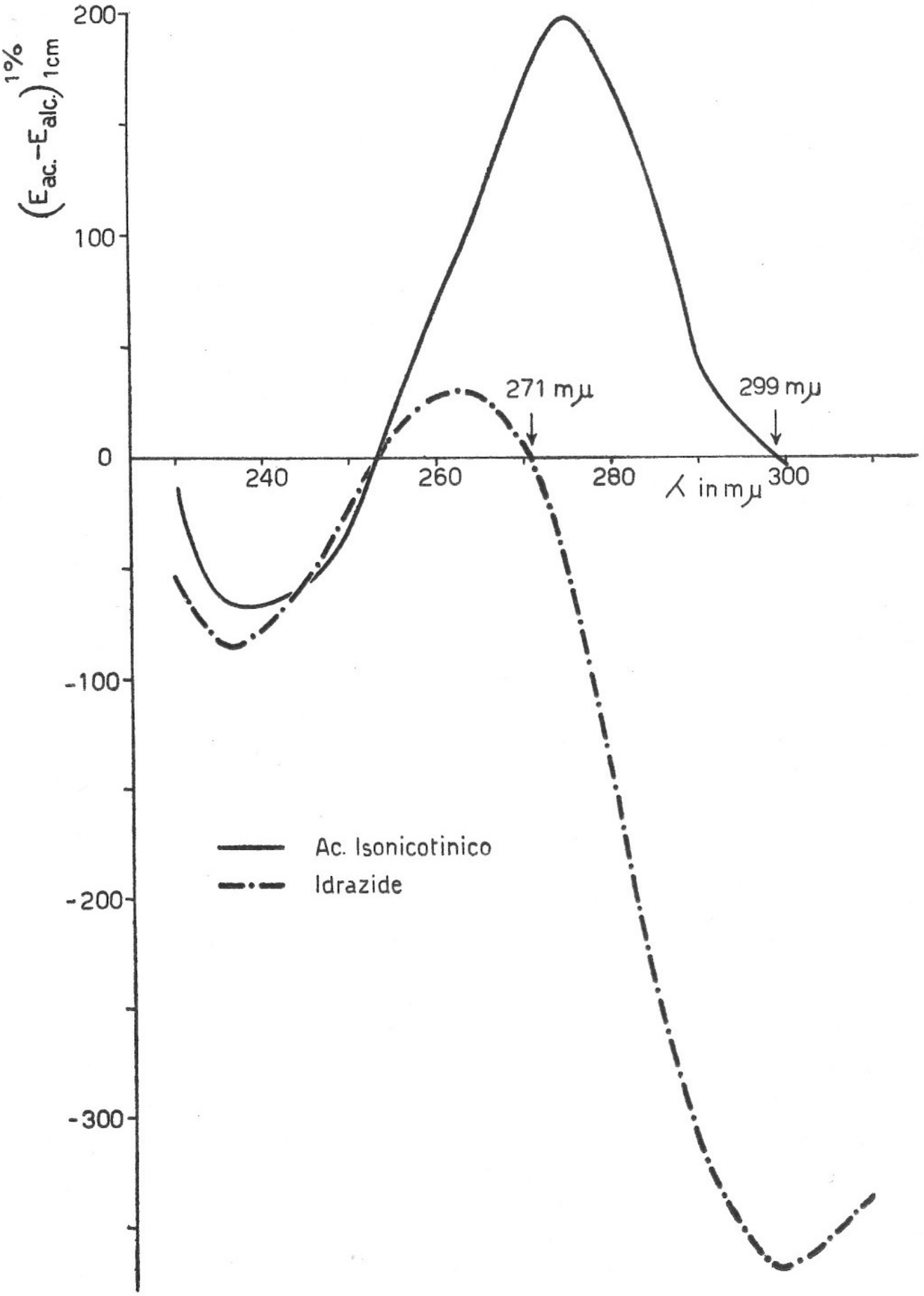


Fig. 10. - Variazione della differenze $E_{ac.} - E_{alc.}$ in funzione della lunghezza d'onda per l'acido isonicotinico e per la sua idrazide.

B_6 e C ([25]) e da Herington ad alcuni omologhi della piridina ([26]), è basato sulla misura dell'estinzione a due lunghezze d'onda in due soluzioni a diverso pH. Avendo notato che la differenza nel rapporto E_{min} / E_{max} fra acido isonicotinico e idrazide si accentua al diminuire del pH, abbiamo scelto per le misure l'ambiente acido per HCl N/1, in modo che anche il semplice criterio qualitativo risulta maggiormente sensibile; per le misure in ambiente alcalino ci siamo serviti invece della NaOH N/10. Gli spettri in HCl N/1 e in NaOH N/10 dell'acido isonicotinico e della sua idrazide sono riportati nella fig. 9. Come si vede da essa, e ancor meglio dalla fig. 10, in cui sono riportati i valori delle differenze $E_{ac.} - E_{alc.}$, cioè delle estinzioni in ambiente acido e alcalino, riferite alla stessa concentrazione percentuale, a 271 mμ l'idrazide ha lo stesso valore di $E^{1\%}_{1\ cm}$ in HCl N/1 e in NaOH N/10, mentre l'acido isonicotinico ha una differenza di estinzione che, per una concentrazione di 10 μg/cm³, è di 0,182; a 299 mμ, invece, il △ E è nullo per l'acido isonicotinico, mentre è di 0,360 per l'idrazide alla concentrazione di 10 μg/cm³. Per eseguire la determinazione, si preparerà una soluzione in HCl N/1 e un'altra in NaOH N/10, entrambe alla concentrazione di circa 20 μg/cm³; si misurerà poi l'estinzione delle due soluzioni a 271 e a 299 mμ (la misura per la soluzione alcalina va eseguita piuttosto rapidamente, perchè l'idrazide in alcali si altera facilmente). Si fa poi la differenza $E_{ac.} - E_{alc.}$ a 271 mμ e quella $E_{alc.} - E_{ac.}$ a 299 mμ; dai valori così ottenuti di $\triangle E_{271}$ e $\triangle E_{299}$ si risale alla concentrazione in acido e idrazide in base al grafico della fig. 11 o mediante le formule seguenti:

$$\frac{\triangle E_{271} . 10000}{182} = \text{μg di acido isonicotinico per cm}^3$$

$$\frac{\triangle E_{299} . 10000}{368} = \text{μg di idrazide isonicotinica per cm}^3.$$

Va da sè che, se interessa soltanto la concentrazione dell'idrazide, basterà misurare l'estinzione in NaOH N/10 a 296,5 mμ. A questa lunghezza d'onda si ha infatti un massimo di assorbimento, con $E^{1\%}_{1\ cm} =$ = 375, mentre l'assorbimento dell'acido isonicotinico è trascurabile. In tal caso converrà scegliere una concentrazione di 10-15 μg/cm³, mentre per la determinazione contemporanea abbiamo consigliato una concentrazione intorno ai 20 μg/cm³ per poter più facilmente determinare an-

([25]) Vacher M., Faucquembergue D.: Bull. Soc. Chim. Biol., *31*, 1449 (1949).
([26]) Faraday Soc. Discuss., *9*, 26 (1950).

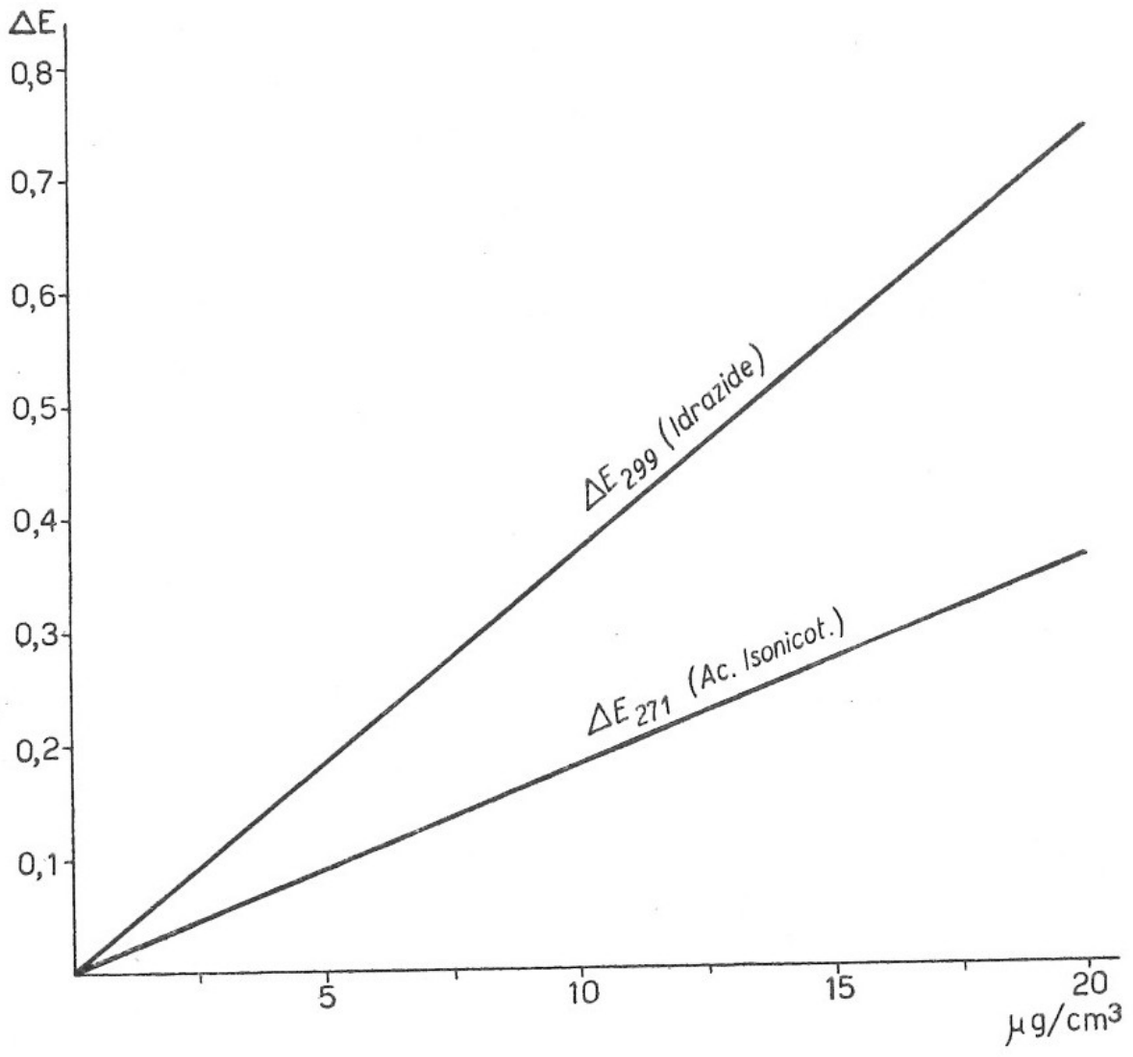


Fig. 11. - Grafico per il calcolo della concentrazione di acido isonicotinico e sua idrazide.

che l'acido isonicotinico in piccole percentuali rispetto all'idrazide. Se, ad es., si ha un campione di idrazide isonicotinica contenente il 5% di acido isonicotinico, il valore di ΔE_{271} misurato su di una soluzione contenente 20 $\mu g/cm^3$ della miscela sarà di 0,018 e quindi misurabile ancora con una discreta approssimazione.

La determinazione contemporanea così come l'abbiamo descritta si può eseguire solo se altre impurezze eventualmente presenti hanno uno spettro di assorbimento che non varia apprezzabilmente col pH, alla concentrazione in cui sono presenti. A questo proposito abbiamo determinato gli spettri in HCl N/1 e in NaOH N/10 dell'isonicotinato di etile e della N-N'-isonicotinilidrazina. Nella tabella seguente riportiamo le lunghezze d'onda corrispondenti ai massimi e ai minimi di assorbi-

mento in HCl N/1 e in NaOH N/10 dell'idrazide isonicotinica, dell'acido isonicotinico, della N-N'-isonicotinilidrazina e dell'isonicotinato di etile:

Composti	HCl N/1		NaOH N/10	
	λ Max.	λ Min.	λ Max.	λ Min.
Idrazide dell'acido isonicotinico	215	236,5	237,5	229
	267,5	—	(275-285)	251,5
	—	—	296,5	—
Acido isonicotinico	216	240	266,5	240
	272	—	—	—
Isonicotinato di etile	216,5	243	266,5	240
	272,5	—	—	—
N-N'-isonicotinilidrazina	212,5	236,5	274	245
	266,5	—	325	290

Per le misure eseguite in NaOH N/10 non è stato possibile effettuare le letture al disotto di 220 mμ.

Discussione dei risultati.

L'aver messo in evidenza nell'idrazide isonicotinica la possibilità di due dissociazioni basiche e di una acida è in accordo con la formula di questa sostanza. Abbiamo già esposto nel corso della parte sperimentale i motivi per cui abbiamo attribuito la costante di dissociazione basica più forte (Kb_I) all'-NH_2 del gruppo idrazinico. Non sono riportati in letteratura dati numerici relativi alle costanti di dissociazione di altre idrazidi, ma il valore da noi trovato (3.10^{-11}) è in perfetto accordo con quello ottenuto recentemente da Fallab ([27]) per l'idrazide isonicotinica con un metodo conduttimetrico. Questo Autore però non specifica a quale gruppo della molecola possa essere dovuta la dissociazione basica da lui misurata; il metodo da lui usato non gli consente inoltre di osservare la seconda dissociazione basica (Kb_{II}), per la quale noi abbiamo trovato il valore di 3.10^{-13}.

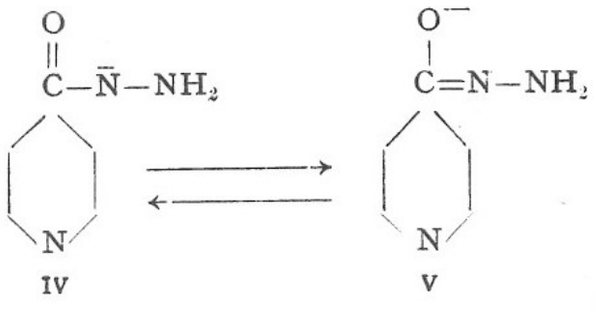
Quest'ultima è stata da noi attribuita, come già detto, all'azoto piridinico. Come si vede dalla fig. 4, essa è molto vicina alla costante

([27]) Helv. Chim. Acta, *36*, 2 (1953).

di dissociazione basica dell'acido isonicotinico. Lo stesso parallelismo si nota fra acido nicotinico e nicotinammide; per questi composti i valori delle costanti di dissociazione riferentisi all'azoto piridinico sono rispettivamente $3{,}55.10^{-11}$ e $2{,}24.10^{-11}$ ([28]). I composti, invece, con un sostituente poco polare (picoline), hanno un valore di Kb molto più elevato: per la 4-metilpiridina Kb = $4{,}54.10^{-9}$ e per la 3-metilpiridina Kb = $1{,}06.10^{-8}$ ([26]). Questo spiega, probabilmente, perchè il valore di Kb da noi trovato per l'isonicotinato di etile (circa 3.10^{-12}) è intermedio fra quelli dell'acido isonicotinico e della 4-metilpiridina: infatti il carbossietile ha una polarità intermedia fra quella del carbossile e del metile.

E' interessante altresì rilevare che lo spostamento del carbossile dalla posizione 3 alla posizione 4 porta ad una diminuzione di Kb, mentre lo stesso spostamento del metile porta ad un aumento di Kb.

Quanto alla costante di dissociazione acida, non possiamo confrontare il valore da noi trovato ($5{,}0.10^{-12}$) con quelli di altre idrazidi perchè non ci risulta che ne siano state determinate. La facoltà delle idrazidi di dissociarsi con alcali è già stata messa in evidenza da Curtius e coll., ([29]) che ne hanno preparato numerosi sali metallici. Secondo Oddo, esiste un equilibrio tautomero fra le idrazidi e le « isoidrazidi » ([30]); in ambiente alcalino si ha quindi:



IV V

L'esistenza in ambiente alcalino della forma V spiega la forte variazione che subisce lo spettro di assorbimento a pH elevati. L'idrazide benzoica subisce anch'essa una variazione spettrale, ma non così forte: si ha uno spostamento batocromo del massimo, che in NaOH N/10 è a 265 mμ.

Quanto al secondo scopo prefissoci, di carattere puramente analitico, abbiamo potuto concludere che alla determinazione spettrofotome-

---

([28]) Jellinek H. H. G., Wayne M. G.: J. Phys. Chem., *55*, 173 (1951).

([29]) Curtius T.: J. Prakt. Chem., [2], 50, 280 (1894); Curtius T., Struve G., ibidem pag. 298; Curtius T., Portner E.: ibidem, [2], *58*, 190 (1898); Curtius T., Trochmann O.: ibidem, [2], *51*, 165 (1895); Curtius T., Foersterling H. A.: ibidem pag. 371

([30]) Oddo G.: Rec. Trav. Chim., *48*, 875 (1929).

trica in HCl N/10, consigliata anche dal « New and Nonofficial Remedies » ([31]), è da preferirsi la determinazione in NaOH N/10 a 296,5 mμ, purchè eseguita con una certa rapidità. In presenza di molto acido isonicotinico bisognerà ricorrere al metodo che abbiamo descritto.

Dalle ricerche che abbiamo esposto risulta che la forma sotto cui si trova l'idrazide isonicotinica al pH fisiologico, e sotto cui quindi esercita la sua attività antitubercolare, è la forma indissociata (ved. fig. 4). Questo dovrebbe spiegare la facilità con cui essa è capace di attraversare la capsula lipoidica del bacillo di Koch.

Poichè in soluzione acquosa la isonicotinilidrazina è parzialmente associata ([32]), non è da escludere che nei liquidi dell'organismo abbia la capacità a fornire combinazioni molecolari.

Addendum. — In un recente rapporto della « Food and Drug Administration » ([33]) viene consigliato di eseguire la misura spettrofotometrica in HCl N/10 e in NaOH N/10.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

([31]) J. Am. Med. Ass., *151*, 740 (1953); J. Pharm. Pharmac., *5*, 472 (1953).
([32]) Toffoli F.: Semplice metodo isopiestico, ecc.; Questi Rendiconti, in corso di stampa.
([33]) Carol J.: J. Ass. Off. Agric. Chem. *36*, 722 (1953).